

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA



**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE
INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (CHIP)
APLICADA AL ESTUDIO DE PCNA UNIDO AL ADN”**

T E S I S

que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

Nazul Edmundo Becerril López

México, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente	Prof. Jorge Manuel Vázquez Ramos
Vocal	Profa. Irma Bernal Lugo
Secretario	Prof. José Pedraza Chaverri
1er. Suplente	Prof. Francisco Javier Plascencia de la Parra
2º. Suplente	Profa. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio en donde se desarrolló el tema:
UNAM, Facultad de Química, Edificio E, Laboratorio 114.

Asesor:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Firma

Supervisor Técnico:

Dra. Minerva Martinez Alfaro

Firma

Sustentante:

Nazul Edmundo Becerril López

Firma

Quiero Agradecer:

A mis padres Victor y Vicky por el apoyo incondicional que me han brindado y por la sabiduría de vida que me transmitieron.

A Paulette por las delicias culinarias que nutrieron mi cuerpo y me daban fuerzas para seguir.

A Sebastián por su inagotable frescura.

A mi hermano Philippe por sus consejos y por sus oraciones.

Al Dr. Jorge Vázquez por su apoyo y por la dirección que me brindo durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Minerva Martínez por su ayuda y asesoría en la estandarización de la técnica y los experimentos realizados.

A todos los maestros que tuve a lo largo de la carrera y que supieron transmitirme sus conocimientos.

A mis compañeros de la carrera, especialmente a Naya y a Helen, con los que compartí madrugadas realizando tareas y estudiando hasta el cansancio, por su ayuda y por sus ánimos.

A CONACYT y al SNI por la beca de ayudante de investigador que me proporcionaron en la realización del proyecto

A DGAPA-PAPIIT IN-200706

Dedicó esta Tesis:

A toda mi familia, a mi bisabuelo Julio, a mi bisabuela Chelito, a mi abuelo Tanilo -que en paz descansen-, a mis abuelos Rubén y More, a todos mis tíos y primos, en especial a Jonatan, Jorge y Ernesto, a quienes considero mis hermanos. A mis padres Victor y Vicky, ya que sin ellos no me hubiera sido posible estudiar una carrera. Por la herencia que me dieron y porque gracias a ellos existo.

A mi nueva familia, Paulette y Sebastián, que me motivaron a continuar mi carrera cuando estaba a punto de abandonarla y dieron un nuevo rumbo a mi vida. A mis nuevos hermanos: Philippe, Heriberto, Jorge, Rubén, Luis, Vicente, Marco Antonio, Paco, Samuel y a todos los C. y E. del C. S. Por su amor, su amistar y por el camino que compartimos.

A Nayade y a Helena, por la gran ayuda que me brindaron para terminar mis materias, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A los compañeros del laboratorio 114, sin los ratos amenos que pase con ustedes y las cascarritas que nos echamos, las frustraciones que surgieron al realizar la tesis, me hubieran vuelto loco.

A Nicolás y Adrián, por su valiosísima amistad. Y a Vanesa, Sandro, Lupe, Raúl, Mario, Olmo, Bety, Moye, Geo, Maricarmen, Nari, Suhaila y Santiago.

A los nuevos compañeros de la COFEPRIS, en especial a Carolina, Lulu, Gabo y Yadira, por su amistad y apoyo.

INDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>RESUMEN</u>	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. Sistema biológico: la semilla de maíz	3
I.2. Generalidades del Ciclo Celular	5
I.3. Replicación del DNA	7
I.4. Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)	10
I.4.1. Función de PCNA.....	12
I.4.2. Proteínas asociadas a PCNA.....	12
I.5. Técnica de la Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)	15
I.5.1. Reseña histórica de la Técnica	16
I.5.2. Parámetros Críticos.....	17
I.5.2.i. Fijación o entrecruzamiento	18
I.5.2.ii. Fragmentación.....	19
I.5.2.iii. Inmunoprecipitación.....	19
I.5.2.iv. Aislamiento del ADN y la proteína.....	20
II. ANTECEDENTES	21
III. OBJETIVOS	22
III.1. Objetivo General	22
III.2. Objetivos Específicos	22
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
V.1. Materiales	26
V.1.1. Material biológico.....	26
V.2. Métodos	26
V.2.1. Obtención de embriones de elote	26
V.2.2. Entrecruzamiento de la cromatina.....	27
V.2.3. Análisis del progreso del entrecruzamiento.....	27
V.2.4. Reversión del entrecruzamiento.....	27
V.2.5. Electrotransferencia e inmunodetección (western blot).....	28
V.2.6. Extracción de la cromatina.....	29
V.2.7. Análisis de la cromatina intacta.....	30
V.2.8. Análisis de las fracciones obtenidas en la extracción de la cromatina	31
V.2.9. Cuantificación de proteínas y ADN.....	31
V.2.10. Fragmentación de la cromatina.....	32
V.2.11. Separación del ADN.....	33
V.2.12. Ensayos de inmunoprecipitación.....	33
V.2.13. Detección del ADN asociado a PCNA	35
V.2.14. Obtención de ejes embrionarios de maíz.....	36
V.2.15. Imbibición de ejes embrionarios de maíz.....	36
V.2.16. Extracción de proteínas (extracto crudo).....	37
V.2.17. Extracción de cromatina de los ejes embrionarios y comparación con la cromatina de embriones de elote	37

VI. RESULTADOS	38
VI.1. Progresión del entrecruzamiento	38
VI.2. Determinación del tiempo óptimo de reversión del entrecruzamiento	39
VI.3. Análisis de la extracción de la cromatina	41
VI.4. Pruebas de fragmentación de la cromatina	43
VI.5. Ensayos de inmunoprecipitación	45
VI.5.1. Inmunoprecipitación de extracto crudo.....	45
VI.5.2. Inmunoprecipitación de la cromatina; tiempo óptimo de entrecruzamiento.....	46
VI.5.3. Inmunoprecipitación de la Cromatina; cantidad óptima de anticuerpo.....	48
VI.5.4. Inmunoprecipitación de la Cromatina; estimación del tiempo óptimo de incubación con la proteína A-Agarosa.....	48
VI.5.5. Inmunoprecipitación de la Cromatina utilizando las condiciones óptimas establecidas.....	50
VI.6. Detección del ADN asociado a PCNA	50
VI.7. Detección de una Cdk-A asociada a PCNA	51
VI.8. Comparación del material biológico	53
VII. DISCUSIÓN	56
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. PERSPECTIVAS	63
<u>APÉNDICE I. DIAGRAMA METODOLÓGICO DE LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (CHIP)</u>	64
APÉNDICE II. SOLUCIONES UTILIZADAS	71
APÉNDICE III. REACTIVOS QUÍMICOS	73
APÉNDICE IV. COMPARACIÓN DE HISTONA H3 DE MAÍZ CON LA HISTONA H3 DE HUMANO	75
REFERENCIAS	76

ABREVIATURAS

Cdks	Cinasas dependientes de ciclinas (cyclin dependent kinase)
CF	Cromatina fragmentada
CHMW	Cromatina de alto peso molecular
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CI	Cromatina intacta (no fragmentada)
EC	Extracto crudo de proteínas
EDTA	Ácido elilen diamino tetra acético
Fen1	Flap endonucleasa 1
kD	Kilodaltons
MNasa	Nucleasa micrococal
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP	Proteína que interactúa con PCNA
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pol	Polimerasa
PSTAIRES	Dominio de siete aminoácidos:
ET	Extracto total
S	Sobrenadante
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloro-acético
TEMED	N,N,N', N'-Tetrametil etilendiamina

RESUMEN

La presente investigación describe la estandarización de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) cuando éste se encuentra unido al ADN. Este método involucra tres grandes pasos: 1) entrecruzamiento de los complejos proteína-ADN y proteína-proteína *in vivo*, 2) extracción y fragmentación de la cromatina, y 3) recuperación de PCNA mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra la proteína. La técnica ChIP es una herramienta muy versátil, sin embargo el procedimiento requiere la optimización de las condiciones. Se realizaron diferentes modificaciones a la técnica original para aplicarla a embriones de maíz y determinar las condiciones óptimas para recuperar en los inmunoprecipitados a PCNA, tales como el incremento en el tiempo de entrecruzamiento con formaldehído, la utilización de una nucleasa micrococcal para optimizar la fragmentación de la cromatina, determinar la cantidad de anticuerpo necesario para la inmunoprecipitación, etc. Utilizando este procedimiento se logró determinar las condiciones óptimas para recuperar en los inmunoprecipitados a PCNA, detectar al ADN asociado y también a una cinasa dependiente de ciclina, Cdk -A con un dominio de aminoácidos PSTAIRE.

I. INTRODUCCIÓN.

La mayoría de los investigadores señalan que el maíz se derivó de una hierba nativa del Valle de Tehuacán, al sur de México, hace aproximadamente 4600 años, sin embargo, el origen exacto del maíz aún es debatido. El maíz es el único cereal originario de América y la cosecha de este grano hizo posible el florecimiento de las grandes civilizaciones mesoamericanas.

Actualmente, esta planta es usada para la producción de forraje y como base para la fabricación de una gran cantidad de alimentos, productos farmacéuticos y productos de uso industrial. Debido a su productividad y adaptabilidad, el cultivo de maíz se ha extendido rápidamente por todo el planeta y su producción ocupa el tercer lugar después del trigo y el arroz.

Basándonos en lo anterior, surge la inquietud de emplear esta planta como modelo de estudio y enfocar su investigación a diversos procesos, entre los que se encuentra la germinación, que permitan el mejoramiento de la planta mediante la obtención de tiempos más cortos de cosecha, condiciones de siembra menos exigentes, mejoras en el contenido nutritivo de la semilla y mayor accesibilidad de la semilla a la población.

Inicialmente es preciso conocer más acerca de la planta y sobre todo de la semilla y así poder entender a esta última como un modelo biológico viable.

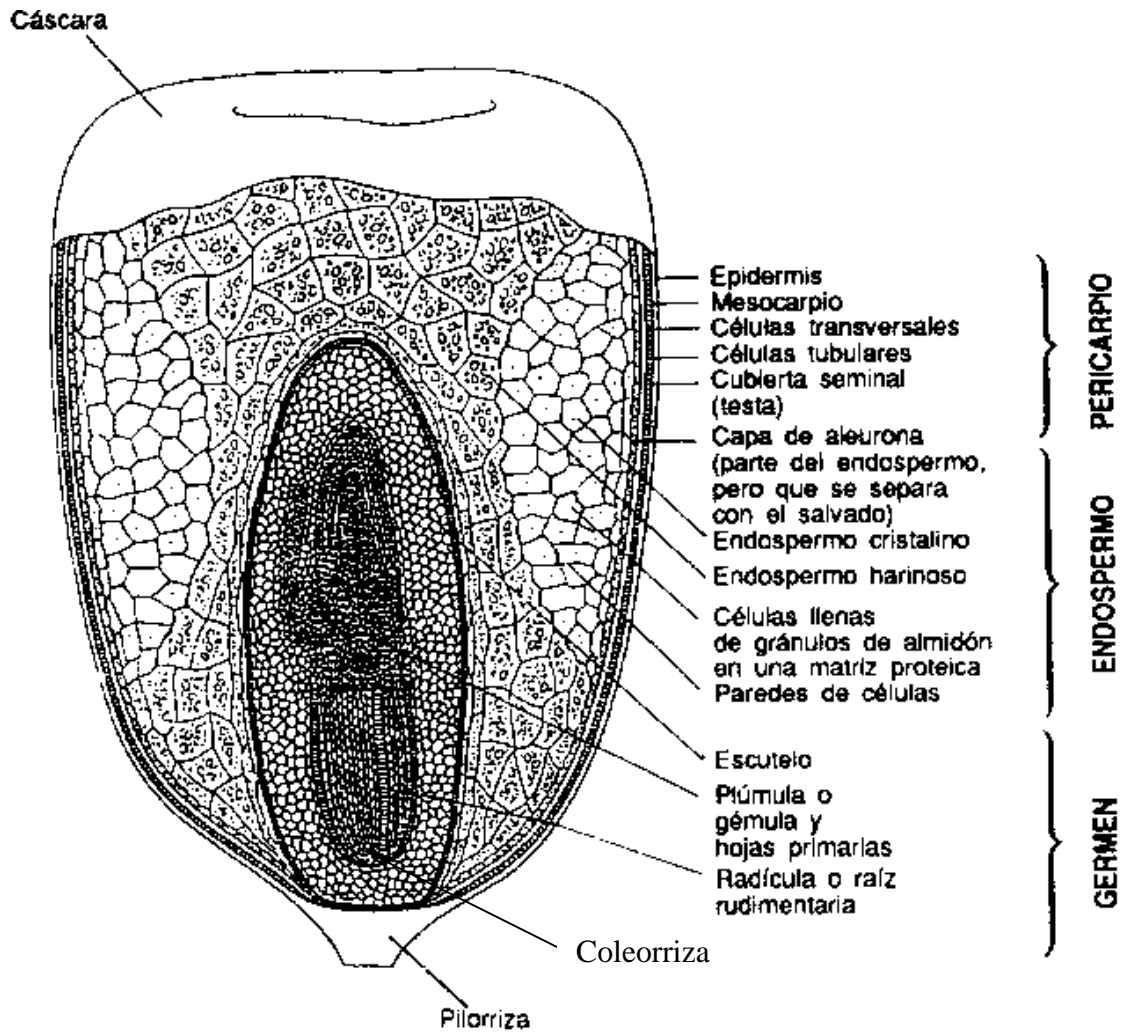
I.1. Sistema biológico: La semilla de maíz.

El maíz es una planta fanerógama del subtipo de las angiospermas monocotiledóneas, perteneciente a la familia de las poáceas (gramíneas), es un integrante

de la tribu Maydae, específicamente del género *Zea* y cuya especie *mays*, es la de mayor importancia nutricional. Como se mencionó anteriormente, es una especie monoica, lo que significa que sus inflorescencias, masculina y femenina, se ubican separadas dentro de una misma planta.

Aunque se considera inferior a otros cereales en cuanto a sus propiedades nutrimentales, su grano es una excelente fuente de carbohidratos debido a su alto contenido de almidones (80%). Además, la semilla de maíz, como muchas otras, posee un contenido bajo de agua, aproximadamente del 10% lo que implica que posee un metabolismo muy reducido o nulo (Kozlowski y Gunn, 1972; Jougenheimer, 1976; Bewley y Black, 1994).

Morfológicamente una semilla de maíz (fig. 1), está constituida principalmente por tres estructuras básicas: el embrión, el endospermo y la cubierta seminal o pericarpio. El tejido que formará la planta adulta es el eje embrionario, que se compone por la radícula (raíz rudimentaria), la caliptra (tejido que recubre al meristemo radicular), la coleoriza (tejido que cubre la caliptra, raíz primaria suprimida), la plúmula (tejido que se convertirá en el tallo y las hojas de la planta) y, finalmente el coleoptilo, que en el eje embrionario es el sitio al que se une el cotiledón. El embrión está conformado por el eje embrionario junto con su cotiledón. El endospermo es la capa que rodea al embrión y funciona como la reserva energética de la semilla debido a su alto contenido de carbohidratos. Finalmente, se encuentra la cubierta seminal, que se considera una de las estructuras más importantes de la semilla, ya que de su composición y permeabilidad depende la interacción de la semilla con el medio ambiente y la conclusión de la germinación con éxito (Mayer y Poljakoff -Mayber, 1984; Bewley y Black 1994).



(Facilitado por el Wheat Flour Institute, Chicago, Illinois, 1964)

Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.

I.2. Generalidades del Ciclo Celular.

La división celular es un proceso fundamental que todos los organismos vivos realizan, pero solo los eucariotes han hecho uso de una separación temporal entre la replicación del DNA (fase S) y la segregación de los cromosomas (fase M); ambas etapas están divididas por las fases G1 y G2 respectivamente. En la fase G1 del ciclo celular, se

determina si las células tienen las condiciones tanto ambientales como los factores de crecimiento necesarios para iniciar la replicación del DNA; en la fase G2 se revisa que todo el DNA haya sido duplicado fielmente (Hartwell y Weinert, 1989). De esta manera se asegura que la segregación del material genético sea correcta.

Las principales proteínas que controlan el ciclo celular son las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y sus subunidades reguladoras llamadas ciclinas. Debido a la importante función que tienen, las Cdks deben ser finamente reguladas. Como su nombre lo indica, requieren de una ciclina para ser activadas. La ciclina, además de activar a la Cdk, también ayuda a su estabilización, a su localización celular y le confiere especificidad de sustrato (Pines, 1995).

En mamíferos las Cdks responsables para la progresión de la fase G1 y entrada a la fase S son las Cdk4 y Cdk6, las cuales son activas en presencia de las ciclinas tipo D; en la transición G1/S el complejo activo está formado por Cdk2 unida a ciclina E principalmente; posteriormente se requiere de la función de Cdk2 unida a ciclina A en la fase S; en la fase G2/M el complejo activo es el de Cdk1 (ó Cdc2) unido a ciclina A o bien unido a ciclina B. La función de cada uno de los complejos en las diferentes etapas del ciclo celular permite que los procesos se realicen de manera controlada y ordenada para que la división celular se lleve a cabo exitosamente.

En plantas, los mecanismos básicos que controlan el ciclo celular se han conservado; sin embargo, su regulación es diferente debido a que las células de las plantas son totipotenciales y están controladas por fitohormonas (Jacobs, 1995; Coenen y Lomax, 1997). Los trabajos realizados en *Arabidopsis thaliana*, tabaco, alfalfa, chícharo y maíz han demostrado que en plantas existen cinco tipos de Cdks y por lo menos cuatro familias de ciclinas (Renaudin *et al.*, 1996; Joubes *et al.*, 2000) que han sido clasificadas en cinco

grupos: A, B, D y H de acuerdo a la homología que presenta su dominio de ciclinas con las ciclinas de mamíferos (Renaudin *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000)

I.3. Replicación del DNA.

La replicación del DNA es uno de los eventos más importantes dentro del ciclo celular. En eucariontes superiores, este proceso requiere la participación de una gran cantidad de proteínas esenciales, tales como helicasas, topoisomerasas, proteínas de unión a cadena sencilla (RPA), el factor de replicación C (RFC), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), DNA polimerasas, DNA primasa y DNA ligasa (fig. 2).

Para que la replicación se inicie se requiere de la acción de las helicasas, enzimas que desenrollan la doble cadena de DNA (Kornberg, 1988) y de esta manera permitir la apertura del DNA para que una de las cadenas pueda servir como molde para originar la nueva cadena de DNA.

Una vez que las cadenas de DNA quedan separadas, la proteína de replicación A (RPA) se une fuertemente al DNA de cadena sencilla para protegerlo y además evitar que se vuelva a formar la doble cadena. RPA es un complejo heterotrimérico formado por subunidades de 70, 32 y 14 kD (Wold y Kelly, 1988), que además de estabilizar el DNA de cadena sencilla también estimula la actividad de las DNA polimerasas α y δ (Kenny *et al.*, 1989).

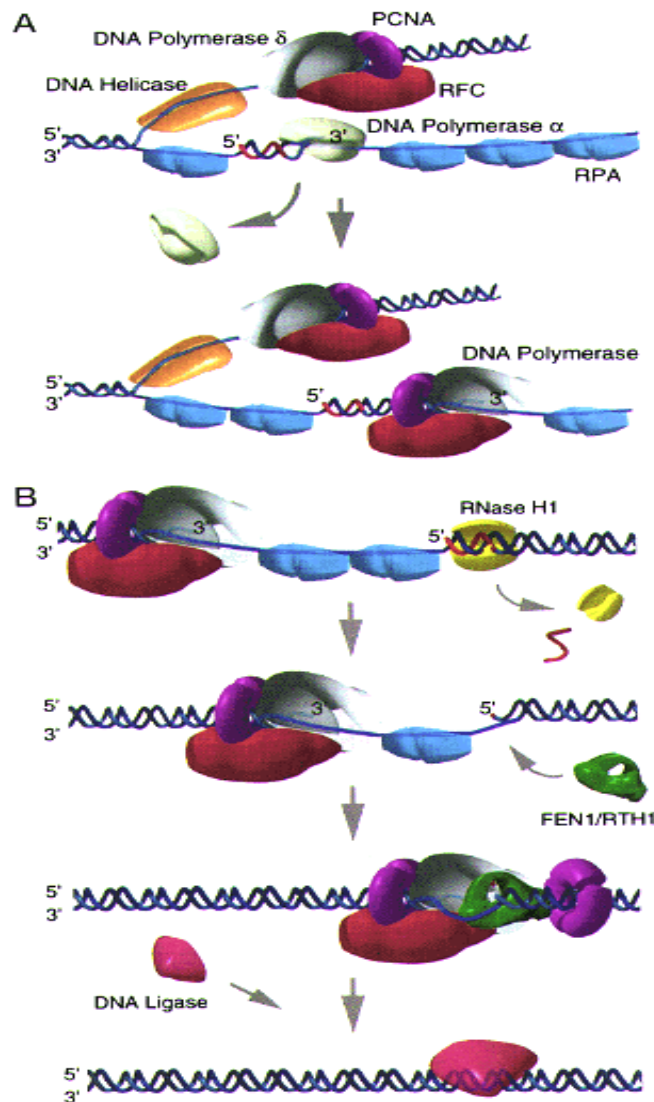


Figura 2. Enzimas y reacciones en la horquilla de replicación de eucariontes. La DNA polimerasa procesa los fragmentos de Okazaki en la cadena discontinua. (A) mientras la helicasa promueve el desacoplamiento de las cadenas complementarias en la horquilla de replicación, pol delta con RFC (factor de replicación C) y PCNA sintetizan el ADN de la cadena continua. La pol alfa inicia la síntesis de la cadena discontinua generando primers de ARN (segmento rojo) seguido de un pequeño segmento de ADN. Luego, RFC y PCNA se unen a pol delta o epsilon para continua con la síntesis de los fragmentos de Okazaki. (B) mientras pol delta se acerca río abajo a los fragmentos de Okazaki, la Rnasa H1 remueve los primers de RNA dejando un solo ribonucleótido -5'. Entonces FEN1/RTH1 remueve el ribonucleótido-5' y la DNA ligasa sella las uniones entre las cadenas sintetizadas. Obtenido de: R. A. Bambara, R. S. Murante, and L. A. Henricksen (1997) *Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork*. *J. Biol. Chem.* **272**: 4647-4650.

Las DNA polimerasas son las enzimas que se encargan de sintetizar la nueva cadena de DNA. En mamíferos existen varios tipos de polimerasas, las cuales actúan en diferentes etapas de la replicación del DNA. El complejo DNA polimerasa α /primasa es el único capaz de iniciar la síntesis de novo de DNA, ya que sintetiza el cebador o primer de RNA para generar un extremo 3'OH, permitiendo con ello que otra DNA polimerasa inicie la elongación de las cadenas continua y discontinua de DNA (Waga y Stillman, 1994). Este proceso requiere de una alternancia entre la DNA polimerasa α /primasa y las DNA polimerasas replicativas (δ o ϵ). Este cambio ocurre debido a que la polimerasa α es poco procesiva y se disocia del DNA después de que se sintetiza el cebador (Tsurimoto et al., 1990).

La DNA polimerasa δ participa en la síntesis de DNA tanto de la cadena continua como de la discontinua (Zlotkin et al., 1996). Además tiene una actividad intrínseca de exonucleasa 3'-5', lo que le permite corregir errores introducidos durante el proceso sintético para mantener la alta fidelidad de la replicación de DNA (Byrnes et al., 1976).

Además de las polimerasas, la replicación del DNA requiere de la participación de una RNasa H1 y/o Fen1, y de una DNA ligasa. Estas proteínas participan en la maduración de los fragmentos de Okazaki. La proteína Fen 1 es una exo/endonucleasa 5' -3' que remueve los cebadores de los fragmentos de Okazaki; la RNasa H1 también participa en la remoción de los cebadores. La DNA ligasa promueve la unión covalente de los fragmentos de Okazaki para así permitir la formación de cadenas de DNA maduras (**Turchi et al., 1994; Robert et al., 1997**).

Las proteínas clave involucradas en el ensamblaje de las polimerasas replicativas a la horquilla de replicación, son el factor de replicación C (RFC) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). RFC es un complejo formado por 5 subunidades (p140, p40, p38, p37 y p36) (Ellison y Stillman, 1998) y su unión al DNA es un prerequisite para ensamblar a las polimerasas replicativas al templado de DNA (Tsurimoto y Stillman, 1990b). El extremo 3'OH del cebador es reconocido por RFC, su unión al DNA desplaza a la DNA polimerasa α /primasa de la horquilla de replicación y promueve la asociación de PCNA con el DNA, lo que a su vez permite que la polimerasa δ pueda ensamblarse a la horquilla de replicación.

I.4. Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) inicialmente se identificó como una proteína nuclear reconocida por auto-anticuerpos de pacientes con lupus eritematoso sistémico y cuya síntesis estaba relacionada con el estado proliferativo de las células (Miyachi et al., 1978). Dos años después, Bravo y Celis (1980) identificaron una proteína que se sintetizaba durante la fase S del ciclo celular, a la que llamaron ciclina. Trabajos posteriores demostraron que PCNA y ciclina eran la misma proteína por lo que se le quedó el nombre de PCNA (Mathews et al., 1984). PCNA es una proteína que está altamente conservada en levaduras, insectos, animales y plantas (Matsumoto et al., 1987; Bauer y Burgers, 1988, Suzuka et al., 1989) y en todas las especies se ha demostrado que tiene un peso molecular de alrededor de 29 kDa.

Estudios de cristalografía han mostrado que PCNA es un complejo homotrimérico, el cual forma un anillo hexagonal (fig. 3). Cada monómero tiene una región llamada asa conectora del interdominio, en la cual se unen una serie de proteínas que contienen un dominio conocido como de interacción a PCNA (PIP).

En todas las especies estudiadas, PCNA es una proteína ácida con pI bajo (Kelman y O'Donnell, 1995). La distribución de cargas sobre el anillo es asimétrica, existe un potencial electrostático negativo en la parte externa del anillo y un potencial positivo en la cavidad central del anillo, lo que permite formar un complejo estable con el DNA

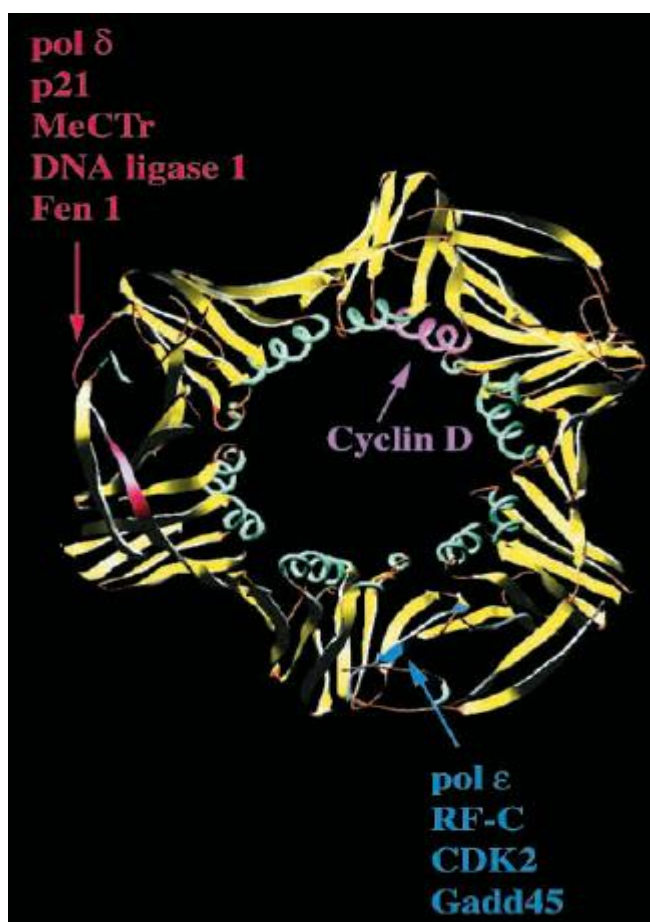


Figura 3. Muchas proteínas que se asocian a PCNA comparten sitios de unión. Las regiones más importantes de PCNA involucradas en las interacciones proteína - proteína son: (1) el interdomain connecting loop (aa L121 to E132; en rojo); (2) el lado interno de las alfa-helices en la región N-terminal (en rosa); y (3) la parte C-terminal (en azul). Para su mayor claridad solo se ilumina una región por monómero, pero hay que tomar en cuenta que PCNA es un homotrímico con tres regiones idénticas por cada anillo. (Giovanni Maga y Ulrich Hübscher, 2003)

1.4.1. Función de PCNA.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína esencial para el metabolismo del DNA ya que tiene funciones importantes en procesos celulares como la replicación del DNA su reparación y el control del ciclo celular (Prelich y Stillman, 1988; Shivji et al., 1992; Xiong et al., 1992).

Inicialmente se describió como un factor que estimulaba la actividad e incrementaba la procesividad de las DNA polimerasas tipo δ y ϵ (Tan et al., 1986; Prelich et al., 1987; Burgers, 1991). En esta función actúa como un "sliding clamp" o pinza móvil que rodea al DNA de manera dependiente del factor de replicación C (RFC) y así permite la entrada de la DNA polimerasa a la horquilla de replicación, a la que estimula.

1.4.2. Proteínas asociadas a PCNA.

En los últimos años una serie de reportes han demostrado que en células de mamíferos, PCNA se asocia a un gran número de proteínas (tabla 1) que participan en el metabolismo del DNA, como las DNA polimerasas δ y ϵ , RFC, Fen1, DNA ligasa 1, DNA topoisomerasa, MLHI, MSH2, XP-G y DNA metiltransferasa (Burgers, 1991; Tsurimoto et al., 1990; Li, et al., 1995; Levin et al., 1997, Umar et al., 1996; Gary et al., 1997 Y Chuang et al., 1997). Por lo anterior, se ha propuesto que PCNA es una proteína que además de ser un factor de procesividad de las DNA polimerasas, sirve como una plataforma que permite el reclutamiento de estas proteínas a la horquilla de replicación o bien al DNA con fragmentos de cadena sencilla (Kelman y Hurwitz, 1998).

PCNA también se asocia a proteínas que tienen funciones importantes en el control del ciclo celular como la ciclina D, proteínas cinasas dependientes de ciclina (Cdks) y p21

(Xiong et al., 1992; Waga et al., 1994; Koundriockoff et al., 2000). La ciclina D es una proteína que se asocia y activa a una cinasa dependiente de ciclina (Cdk) (Sherr, 1994). Se ha encontrado a PCNA formando un complejo cuaternario con la ciclina D, Cdk y p21. El significado fisiológico que tiene la formación de este complejo no ha sido determinado, pero es probable que contribuya en la coordinación entre la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA (Pagano et al., 1994; Tsurimoto, 1998).

Tabla 1a. Proteínas que se asocian a PCNA (Modificada de Giovanni Maga y Ulrich Hübscher, 2003

Proteínas que interacciona con PCNA	Función	Efecto de PCNA sobre la proteína de unión	Organismo donde se estudió la interacción	Referencias
--	----------------	--	--	--------------------

REPLICACIÓN

DNA polimerasa δ	Síntesis de DNA (cadena continua y discontinua); reparación de DNA.	Estimulación de su procesividad.	Humanos y levaduras	Zhang et al., 1999; Zhou et al., 1997; Ducoux et al., 2001
DNA polimerasa ϵ	Síntesis y reparación de DNA; punto de control en ciclo celular.	Estimulación de su procesividad.	Humanos y levaduras	Eisenberg et al., 1997; Dua et al., 2002
RFC (factor de replicación C)	Posicionador de PCNA en el extremo 3'OH del molde cebador, ATPasa.	Estimulación de su actividad de ATPasa.	Humanos y levaduras	Tsurimoto y Stillman, 1990; Zhang et al., 1999
FEN1 (flap endonucleasa)	Exonucleasa 5'-3' cebador de DNA y fragmentos de Okazaki.	Estimulación de su actividad de endonucleasa.	Humanos	Li et al., 1995 y Wu et al., 1996
DNA ligasa 1	Une los fragmentos de Okazaki de DNA.	Afecta la síntesis de DNA por pol δ y ϵ	Humanos	Levin et al., 1997

Tabla 1b. Proteínas que se asocian a PCNA (Modificada de Giovanni Maga y Ulrich Hübscher, 2003)

Proteínas que interactuana con PCNA	Función	Efecto de PCNA sobre la proteína de unión	Organismo donde se estudió la interacción	Referencias
-------------------------------------	---------	---	---	-------------

CICLO CELULAR

p21 (CIP1, WAF1)	Inhibidor de la actividad del complejo ciclina/Cdk.	Inhibe selectivamente la replicación del DNA	Humanos	Waga et al., 1994b
Ciclina D	Ciclina de G1; activa a Cdk.	Inhibe la replicación de DNA	Humanos	Xiong et al., 1992
Cdk2	Cinasa que participa en la transición G1/S y G2.	Desconocido	Humanos	Koundriockoff et al., 2000

REPARACIÓN DEL DNA

GADD45	Desconocida; detención del crecimiento y gen inducido por daño al DNA.	Desconocido	Humanos	Vairapandi et al., 2000
MyD118	Desconocido; gen de respuesta a la diferenciación terminal.	Desconocido	Humanos	Vairapandi et al., 2000
MLH1, MSH2	Reparación de DNA cuando hay mal apareamiento de bases.	Estimula la reparación del mal apareamiento de bases.	Humanos y levaduras	Umar et al., 1996; Clark et al., 2000
XP-G	Endonucleasa; escisión-reparación.	Estimula la reparación de DNA por escisión de nucleótidos. Induce resíntesis del DNA.	Humanos	Gary et al., 1997
DNA metil-transferasa	Metilación de citosinas en el DNA.	Blanco de un DNA sintetizado	Humanos	
CAF1 (Factor de Ensamblaje de la Cromatina 1)	Involucrado en la remodelación de la cromatina	Recluta proteínas al sitio de reparación	Humanos	Moggs et al., 2000
Uracil-DNA glicosilasa	Reparación del DNA por escisión de bases; remueve un uracilo de DNA.	Desconocido	Humanos	Chuang et al., 1997

I.5. Técnica de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Las interacciones proteínas-ADN tienen un papel muy importante en la regulación de importantes funciones celulares como la transcripción, la replicación y recombinación del ADN, reparación, segregación, estabilidad cromosomal, progresión del ciclo celular y silenciamiento epigenético. La estructura tridimensional de la cromatina es mantenida por la unión de histonas y otras proteínas reguladoras al ADN. Experimentos anteriores estudiaban la interacción del ADN con las proteínas mediante métodos *in vitro*, los cuales no toman en cuenta el contexto fisiológico de la célula y por lo tanto tienen una utilidad limitada. La técnica ChIP se ha convertido en una técnica muy utilizada para determinar la localización *in vivo* de sitios de unión de varios factores transcripcionales (Weinmann et al., 2002), histonas (Spencer et al., 2003) y otras proteínas (Ren et al., 2000). Debido a que las proteínas son capturadas en los sitios donde se unen con el DNA, la ChIP ayuda a encontrar estas interacciones en células vivas y puede ser complementada por técnicas como el PCR, Southern blot, Western blot, clonación o microarreglos, resultando en una gran versatilidad que incrementa el potencial de esta técnica.

La ChIP usualmente involucra el entrecruzamiento de la cromatina con formaldehído, seguido de sonicación o tratamiento con nucleasas para obtener fragmentos pequeños de ADN (fig. 4). Posteriormente se realiza una inmunoprecipitación con anticuerpos contra la proteína de interés que interactúa con el ADN. El entrecruzamiento es revertido y el ADN es liberado de las proteínas para ser analizado por diferentes métodos. De la misma manera la técnica de ChIP ha sido utilizada para determinar interacciones proteínas-ARN.

1.5.1. Reseña histórica de la técnica

El desarrollo de los procedimientos básicos de la inmunoprecipitación de la cromatina ha requerido de una larga jornada, muchos investigadores han contribuido a su evolución. El uso de formaldehído como agente de entrecruzamiento entre proteína - proteína, proteína-DNA y proteína-RNA se realizaba en los 60's (Brutlag, et al., 1969; Ilyn and Georgiev, 1969). En ese tiempo, el aislamiento de la cromatina o núcleos, contenía frecuentemente precursores radioactivos in vivo que eran fijados con formaldehído por periodos extensos de tiempo, seguidos por centrifugación en gradiente de CsCl que permitían monitorear la distribución de histonas sintetizadas a lo largo de la replicación del ADN. Uno de los primeros reportes claves de reversión del entrecruzamiento para liberar histonas para un análisis electroforetico detallado fue hecho por Jackson (1974) con condiciones que fueron refinadas por Solomon y Varshavsky unos años después (1985). Jackson y Chalkley (1981) reportaron el uso de estudios de cromatina fijada en una célula entera con formaldehído para preservar la estructura de la cromatina. Gilmour y Lis usaron radiación UV para entrecruzar proteínas que interactuaban con el ADN y fraccionando los aductos con anticuerpos específicos contra la RNA polimerasa y la topoisomerasa I (Gilmour y Lis, 1984; Gilmour et al., 1986). El grupo dirigido por Varshavsky reportó el uso de anticuerpos anti-histonas para el estudio de las asociaciones entre histonas y el DNA en relación con la transcripción (Solomon et al., 1988), y finalmente, Gorovsky y su equipo simplificaron y mejoraron esta aproximación básica y la aplicó para demostrar alteraciones en la interacción H1-DNA asociadas con cambios en la actividad transcripcional en la Tetrahymena (Dedon, et al., 1991).

1.5.2. Parámetros críticos de la técnica original.

Aunque la técnica tiene un procedimiento muy versátil, hay varias limitaciones y requiere la optimización de las condiciones para una extracción de ADN exitosa. El paso más importante probablemente es la unión del anticuerpo, y la calidad del anticuerpo es crucial para la recuperación de los fragmentos de ADN. A continuación hago una descripción de los factores de esta técnica.

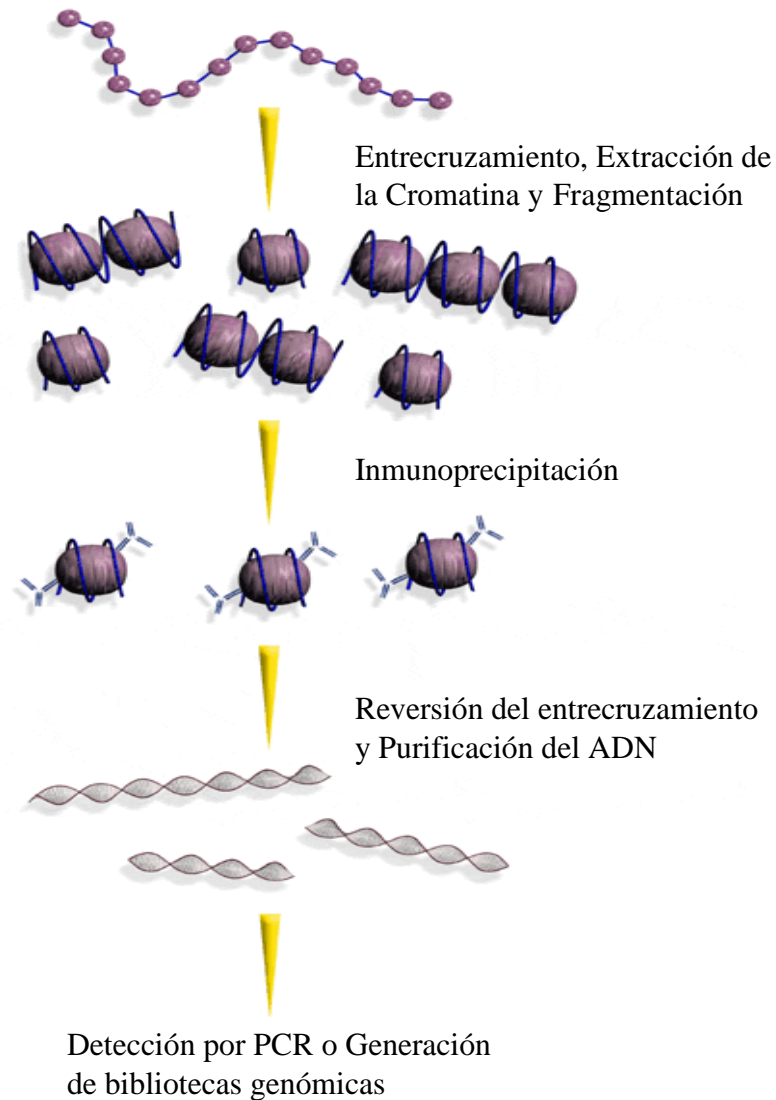


Figura 4. Los pasos originales de la técnica de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

i) *Fijación o entrecruzamiento.*

El primer paso de esta técnica es el entrecruzamiento del ADN y las proteínas. El formaldehído es el agente más utilizado debido a que es fácil revertir su efecto y gracias a su habilidad de formar uniones entre moléculas que tienen una asociación muy estrecha entre ellas. El formaldehído provoca la unión proteína-DNA, proteína-RNA así como la unión proteína-proteína atacando principalmente el grupo amino de lisina y las cadenas laterales de la adenina, guanina y citosina formando bases de Schiff con los grupos aminos e iminos (ver fig. 5). El entrecruzamiento excesivo puede provocar que la fragmentación por sonicación sea más difícil y que la pérdida de material inmunoprecipitado sea mayor. La reacción de entrecruzamiento se detiene con glicina con una concentración final de 0.125M, y el entrecruzamiento se puede revertir al calentar a 65°C por un tiempo determinado experimentalmente.

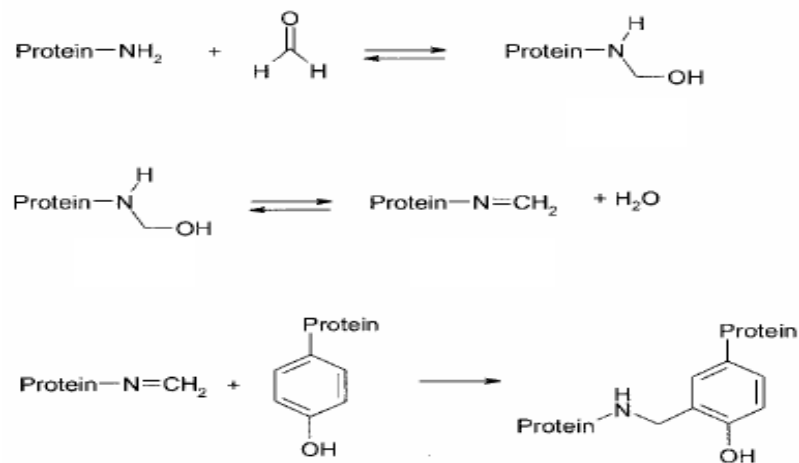


Figura 5. Entrecruzamiento de proteínas, mecanismo de acción del formaldehído.

ii) Fragmentación.

El siguiente paso importante es la fragmentación de la cromatina extraída. Esto es importante para evitar la pérdida de los complejos inmunoprecipitados por ser demasiado grandes. Los factores que afectan la sonicación incluye el volumen de la muestra, la profundidad a la que se encuentra la sonda del sonicador, la fuerza y la duración de la sonicación. El volumen de la muestra no debe exceder 1.0 ml, y la profundidad de la sonda puede incrementarse si la muestra es puesta en un tubo tipo eppendorf. La sonda debe estar a una profundidad no menor de 1.0 cm ya que la solución de cromatina contiene dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual puede provocar la formación de espuma y comprometer la eficiencia de la sonicación (Spencer et al., 2003). Mantener la muestra fría colocándola en hielo también ayuda a evitar la formación de espuma.

La digestión de la cromatina con nucleasa puede ser una alternativa para la fragmentación de la cromatina. La digestión de la nucleasa es más específica y puede formar fragmentos tan pequeños como 146 pb. La digestión puede detenerse adicionando EDTA a una concentración final de 5 mM (O'Neil et al., 2003).

iii) Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación es el paso más importante del procedimiento. El anticuerpo contra la proteína de interés permite que el complejo proteína-ADN se fije y posteriormente el complejo es precipitado. Antes de realizar la ChIP, se debe determinar si los anticuerpos usados son eficientes para la realización de la técnica. Se debe documentar la capacidad de los anticuerpos para inmunoprecipitar a PCNA en extractos celulares con los diferentes

amortiguadores utilizados en la técnica. Además, los anticuerpos policlonales son preferibles a los monoclonales para superar el enmascaramiento de los epítopes. La cantidad óptima del anticuerpo para la máxima unión de la proteína de interés debe ser determinada empíricamente para establecer el título óptimo. Usualmente la incubación es llevada a cabo toda la noche a 4°C con rotación constante.

El inmunoabsorbente usado comúnmente para separar el complejo antígeno - anticuerpo del extracto es proteína A-Sepharosa con ADN de esperma de salmón, o bien proteína G. Los anticuerpos de conejo tienen afinidades similares para con la proteína A y con la proteína G, mientras los anticuerpos de cabra tienen predilección por la proteína G (Spencer et al., 2003). Se debe determinar la cantidad de proteína A o G requerida para aislar el complejo. Por otra parte, para reducir las uniones no específicas, varios métodos son empleados. En primer lugar, puede adicionarse a la cromatina antes de entrar en contacto con el anticuerpo y el inmunoabsorbente ADN de esperma de salmón y albúmina sérica bovina (BSA) para lograr la reducción de uniones no específicas (Spencer et al., 2003).

iv) Aislamiento del ADN y la proteína

Una vez que se ha realizado la Inmunoprecipitación los complejos de ADN-proteína, el entrecruzamiento debe ser revertido y así poder trabajar con el ADN o las proteínas por separado. Después de la reversión del entrecruzamiento, el ADN se puede aislar degradando las proteínas y precipitando el ADN con la ayuda de un acarreador tal como el glicógeno. Por otro lado, las proteínas también pueden ser precipitadas y resuspendidas en un amortiguador de carga para analizarlas mediante Western Blot.

II. ANTECEDENTES.

En plantas, el control del ciclo celular es semejante a como sucede en mamíferos. Se han reportado Proteínas, actividades enzimáticas y mecanismos de control semejantes (Mironov et al., 1999). En el laboratorio donde trabajé los esfuerzos se han centrado en el estudio de la fase G1 del ciclo celular y su relación con la entrada a la fase S en un proceso de desarrollo como lo es la germinación de semillas de maíz, y para este propósito, se ha enfocado al estudio de las proteínas que determinan la entrada a la fase G1 del ciclo, como son las ciclinas tipo D y la cinasa Cdk-A (Nakagami et al., 1999; Gutierrez et al., 2002), y en una proteína fundamental para la fase S, PCNA. Independientemente de la función propuesta en la fase S, y a semejanza de lo que se ha encontrado en células de mamíferos, durante la germinación de maíz, PCNA también se asocia simultáneamente a ciclinas tipo D y a Cdk-A *in Vitro* (Sánchez et al., 2002). Estos complejos ternarios muestran actividad de cinasa tipo Cdk-A y esta actividad parece ser más relevante en las etapas iniciales de la germinación, precisamente cuando se desarrolla la fase G1 del ciclo. Además, la composición de los complejos ternarios y la actividad de cinasa, parecen ser reguladas por hormonas durante la germinación (Sánchez et al., 2004). Sin embargo, no se sabe si PCNA realiza estos complejos ternarios *in vivo*, ni se ha demostrado que estos complejos se realicen cuando PCNA se encuentra sobre el ADN. De ser así, esto podría significar que PCNA funciona como una deslizadora para que estos complejos localicen a sus proteínas blanco y las fosforilen, lo que constituiría una nueva función para PCNA.

Se ha clonado un gen de maíz que codifica para PCNA y se ha obtenido la proteína recombinante y su anticuerpo correspondiente, la cual detecta una proteína de aproximadamente 29 KD en extractos crudos de proteína de ejes embrionarios de maíz.

III. OBJETIVOS.

III.1. Objetivo General:

- Establecer y optimizar la técnica de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) en embriones de maíz para detectar el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que se encuentra sobre el ADN *in vivo*.

III.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la eficiencia del entrecruzamiento y el tiempo óptimo de reversión del entrecruzamiento.
- Analizar la eficiencia de la extracción de la cromatina
- Optimización de la fragmentación de la cromatina
- Realizar ensayos de Inmunoprecipitación, determinar la eficiencia de los anticuerpos, la cantidad óptima del anticuerpo, el tiempo óptimo de entrecruzamiento de la cromatina para detectar a PCNA y estimar el tiempo óptimo de incubación para fijar el anticuerpo a una resina.
- Determinar por la técnica de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) si la asociación entre PCNA y las ciclinas/cinasas se da cuando PCNA se encuentra unido al ADN.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

En primer lugar se realizó el entrecruzamiento de embriones durante tiempos progresivamente mayores. Después se hizo una trituración del material vegetal y una suspensión de proteínas (extracto total, ET). Analizando esta suspensión de proteínas mediante un Western Blot, definiremos la progresión del entrecruzamiento, para lo cual esperamos que haya un aumento proporcional en el peso molecular de las bandas detectadas con anticuerpos anti-PCNA, debido a la unión de PCNA con otras proteínas.

Utilizando las mismas suspensiones de proteína, se realizaron experimentos para determinar el tiempo óptimo de reversión del entrecruzamiento. Conforme el tiempo de reversión aumenta, se espera que el peso molecular de las bandas detectadas con un anticuerpo anti-PCNA finalmente lleguen a coincidir con el peso de un monómero de PCNA (~29 KD).

Posteriormente, la cromatina fue extraída y analizada por medio de Western Blot para detectar a PCNA y estar seguros que PCNA no se ha perdido en la extracción. Así se puede seguir adelante con las pruebas de fragmentación de la cromatina. Por otra parte, la detección de la Histona H3 que se hizo en las diferentes fracciones nos dará una idea de la eficiencia de la extracción de la cromatina, esperando que la Histona H3 solo sea detectada en las fracciones que no deseamos.

Se comparó el método de sonicación con el método de digestión de la nucleasa micrococcal (MNasa) para utilizar el método o la combinación de métodos que proporcionen fragmentos de ADN suficientemente pequeños (800-200 pb) como para ser inmunoprecipitados. Estos fragmentos fueron analizados mediante un gel de agarosa con bromuro de etidio.

Ulteriormente, la cromatina con diferentes tiempos de entrecruzamiento y que fue fragmentada, fue sometida a la cuantificación de proteína y ADN para analizar la eficiencia del entrecruzamiento. Se espera que conforme el entrecruzamiento es mayor, la proteína de la cromatina aumente y la cantidad de ADN sea muy similar, si la extracción es eficiente.

Después se hicieron ensayos de inmunoprecipitación con extractos crudos y los amortiguadores utilizados originalmente en la técnica de ChIP para determinar si es eficiente la inmunoprecipitación de PCNA con nuestros anticuerpos y si la astringencia de los amortiguadores que van a ser utilizados no es superior a la capacidad de los anticuerpos para fijar a PCNA. También se inmunoprecipitó a PCNA con las cromatinas extraídas de embriones entrecruzados por tiempos progresivamente mayores para determinar el tiempo de entrecruzamiento óptimo, ya que el entrecruzamiento excesivo podría evitar la detección de los epítopes por parte de los anticuerpos anti-PCNA y un tiempo de entrecruzamiento muy pequeño evitaría que las proteínas asociadas a PCNA se unan covalentemente y no puedan ser detectadas en los inmunoprecipitados.

Una vez fijado el tiempo de entrecruzamiento necesario para inmunoprecipitar eficientemente a PCNA de la cromatina, se usaron cantidades crecientes de anticuerpo anti-PCNA para determinar la cantidad de anticuerpo óptima para inmunoprecipitar la mayor cantidad de PCNA posible, manteniendo invariable la cantidad de cromatina.

Con el fin de estimar el tiempo que requiere el anticuerpo para fijarse a la resina, se incubó el anticuerpo, previamente incubado con la cromatina, durante tiempos crecientes a la resina y después de realizar los lavados de la inmunoprecipitación, se detectó la cantidad de anticuerpo y PCNA que se unió a la resina.

Una vez determinadas las condiciones de la inmunoprecipitación, esta se realizó con la cromatina entrecruzada a diferentes tiempos para reafirmar el tiempo óptimo de entrecruzamiento para realizar una inmunoprecipitación eficientemente.

Los complejos inmunoprecipitados se analizaron por medio de Western Blot para detectar la presencia de PCNA, y la posible presencia de proteínas asociadas, así como la extracción del ADN en los complejos obtenidos para demostrar que la proteína encontrada se une a PCNA cuando PCNA está acoplado al ADN.

Finalmente comparamos la cantidad de PCNA e Histona H3 que se encuentra en cromatina extraída de embriones de maíz con la que se puede encontrar en ejes embrionarios. Esto con el propósito de establecer la posible equivalencia que existe entre ambos materiales vegetales para el establecimiento de este estudio y poder realizarlo en un material biológico mucho más manipulable, como lo es el eje embrionario.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

A continuación se enumeran los materiales y equipos empleados para el desarrollo de la presente tesis. Los reactivos químicos, equipos, componentes de algunas soluciones y medios, así como su preparación se detallan en el apéndice.

V.1. Materiales.

V.1.1. Material biológico.

Semilla de maíz *Zea mays* L. variedad Chalqueño.

Embriones de maíz inmaduros de 15-18 días después de polinización variedad Cacahuazintle.

V.2. Métodos:

V.2.1. Obtención de embriones de elote.

Mediante el uso de una navaja de filo se rebana la parte más superficial del elote y con la ayuda de una espátula delgada se extrae el embrión completo, colocándolo en agua destilada fría para lavarla de los restos de almidón que pudiera tener. Los embriones se enjuagan con agua destilada dos veces.

V.2.2. Entrecruzamiento de la cromatina.

El material vegetal (4 gr de embriones) es entrecruzado con formaldehído a diferentes tiempos para determinar el tiempo óptimo de entrecruzamiento. Este proceso forma uniones covalentes entre las proteínas asociadas al ADN y proteínas asociadas entre si, mediante la formación de puentes de carbono. Primero se le aplica vacío al material vegetal sumergido en una solución de formaldehído al 1%, durante 0, 15, 30 min, 2 h y 4 h. La reacción se detiene aplicando glicina a una concentración final del 0.15 M y vacío durante 10 minutos para neutralizar el formaldehído; el material vegetal se lava con agua destilada para desechar el formaldehído restante.

V.2.3 Análisis del progreso del entrecruzamiento.

Una vez que se realizó el entrecruzamiento de los embriones por diferentes tiempos (0, 15, 30 min, 2 h y 4 h), éstos se someten a un choque térmico con nitrógeno líquido y posteriormente son puestos en un mortero con arena de mar y más nitrógeno líquido para ser triturados. Cuando se esta seguro que se ha obtenido un polvo muy fino, este polvo es resuspendido en 20 ml de el Amortiguador de Extracción 1 (ver apéndice), se realiza una filtración para desechar el material grueso y obtener un extracto total (ET) que es analizada mediante western blot para detectar el posible aumento en el peso molecular de las bandas detectadas con un anticuerpo anti-PCNA.

V.2.4. Reversión del Entrecruzamiento.

Para el caso de las pruebas de reversión del entrecruzamiento, se agregaron 480 µl de Amortiguador de Reversión (ver apéndice) a una muestra de 20 µl de extracto total suspendida en el Amortiguador de Extracción 1 (ver apéndice) de embriones entrecruzados

por 4 horas. Esta solución se incubó a 65°C a diferentes tiempos (0, 6, 12, 18 y 24 h) para detectar el tiempo óptimo de reversión del entrecruzamiento. Como control para determinar si hay pérdida de proteínas por el mismo proceso, se utilizaron 20 µl de suspensión de ET de embriones sin entrecruzar (0 min). Las proteínas son precipitadas con TCA a una concentración final del 20%, incubadas por 30 min, centrifugadas a 20000 g por 30 min, lavadas y centrifugadas a 20000 g por 15 min dos veces con acetona a -20°C y analizadas por Western Blot.

V.2.5. Electrotransferencia e inmunodetección (western blot).

A cada una de las muestras y se les adicionó 20 µl de amortiguador de carga (Laemmli, 1970), a continuación, dichas muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS -PAGE). Siempre que se utilizaba extracto crudo (EC, ver más adelante el punto **V.2.16**) como comparación se tomaba una cantidad equivalente a 30µg de proteína (10 µl). El gel se desarrolló con una diferencia de potencial eléctrico de 102 V hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzara aproximadamente 0.5 cm antes del final del gel. Hecho lo anterior, el gel se transfirió a una membrana de Immobilon (0.2 µm de poro), mediante un sistema de transferencia en seco (LKB “Transblot apparatus”) por 1.5 h empleando para ello una intensidad de corriente de 75 mAmp por membrana.

A continuación, las membranas se trataron con solución de bloqueo (ver apéndice) por 1 h. Transcurrido el tiempo se les adicionó el primer anticuerpo [anti -PCNA policlonal (dilución 1:2000), anti-histonaH3 policlonal (dilución 1:1000) o anti -PSTAIRE policlonal (dilución 1:500), según el caso] y se dejaron incubando con este anticuerpo por 12 h a 4°C.

Posteriormente se realizaron dos lavados con solución TETN250 y tres lavados con PBS 1x (ver apéndice) de 7 min cada lavado a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se incubó a las membranas con el segundo anticuerpo [anti-conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:10 000)]. Las membranas se lavaron 2 veces con TETN250 y 3 veces con amortiguador PBS 1x nuevamente. La detección se llevó a cabo colocando a la peroxidasa en contacto con el reactivo ECL (sustrato) y exponiendo la membrana a una película fotográfica.

V.2.6. Extracción de la Cromatina (fig. 6).

El material vegetal entrecruzado es pulverizado en un mortero con nitrógeno líquido y arena de mar para romper la pared celular. El polvo fino se resuspende en 20 ml de Amortiguador de Extracción 1 (ver apéndice) donde se disuelven las proteínas citoplasmáticas. Se realiza una centrifugación a 800 g y una filtración con gasa para desechar el material grueso y obtener un extracto total (ET) luego se centrifuga a 1800 g para separar las proteínas solubles (S1) que se encuentran en el citoplasma y precipitar los organelos y restos celulares (F1). Posteriormente se resuspende el pellet en 1 ml de Amortiguador de Extracción 2 (ver apéndice), un amortiguador con alta concentración de detergente (tritón al 1.1%) para diluir las membranas y los organelos, precipitando a 20000 g se separan las proteínas que se encontraban dentro de los organelos (S2) de la cromatina y algunos restos celulares (F2); este nuevo pellet se vuelve a resuspender en 500 µl de Amortiguador de Extracción 3 y se coloca cuidadosamente sobre 500 µl de Amortiguador de Extracción 4 (ver apéndice), un amortiguador con alta concentración de sacarosa que por su alta densidad permite desechar las proteínas que se encuentran unidas inespecíficamente a la cromatina (S3), además de precipitar y purificar la cromatina (F3)

centrifugando a 124000 g, la cual es resuspendida de nuevo en 500 µl de Amortiguador de Extracción 2 y centrifugado a 20000 g por 15 min para lavar la cromatina. El nuevo precipitado (CI) se resuspende en un amortiguador especial de acuerdo con el método de fragmentación.

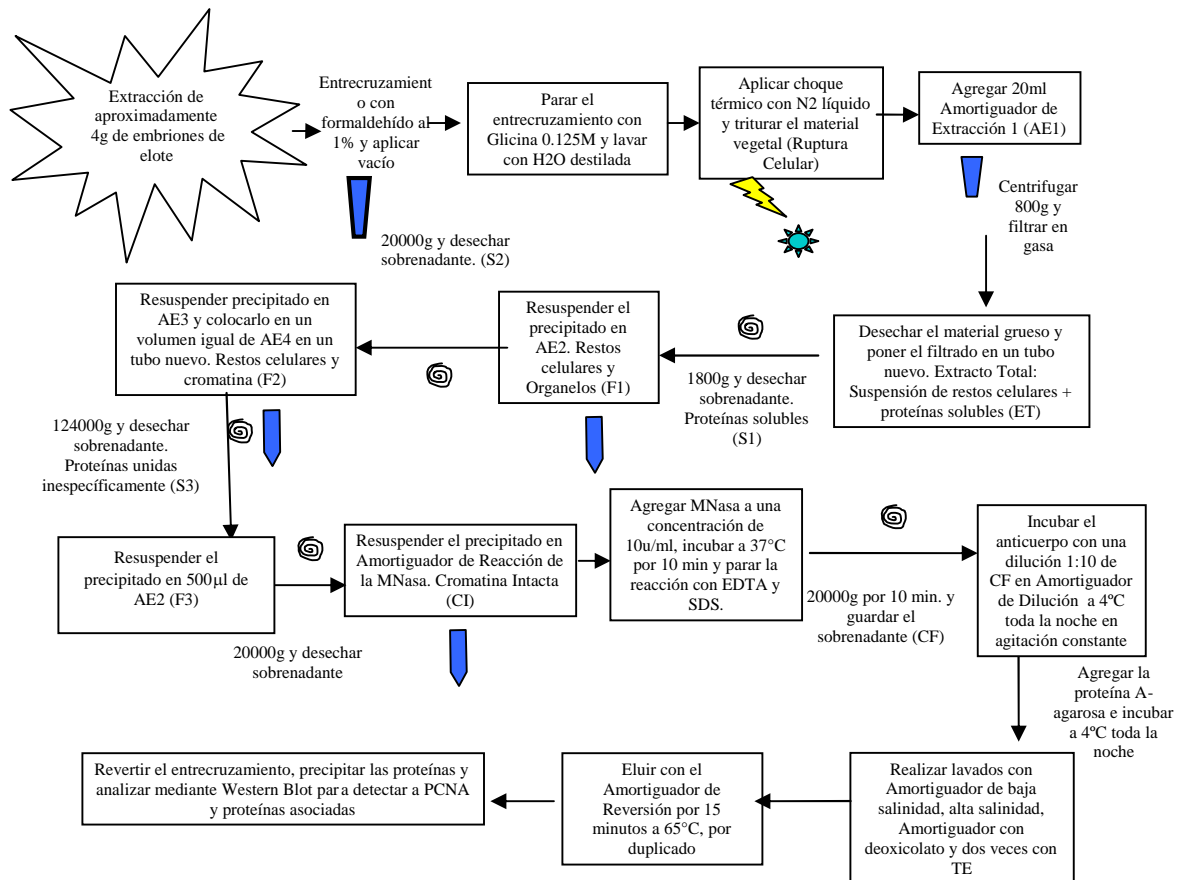


Figura 6. Diagrama metodológico utilizando la digestión con la nucleasa micrococcal como método para la fragmentación de la cromatina.

V.2.7. Análisis de la cromatina intacta.

Se tomaron 20 µl de cada suspensión de cromatina intacta (CI) de cada una de las extracciones de los embriones entrecruzados a diferentes tiempos (0, 15 y 30 min, 2 h y 4 h), las proteínas son precipitadas con TCA a una concentración final del 20%, incubadas

por 30 min, centrifugadas a 20000 g por 30 min, lavadas y centrifugadas por 15 min a 20000 g dos veces con acetona a -20°C, y analizadas por Western Blot con un anticuerpo anti-PCNA (ver punto V.2.5).

V.2.8. Análisis de las fracciones obtenidas en la extracción de la cromatina.

Se tomaron volúmenes equivalentes al 2% de cada fracción (ver fig. 6): extracto total (ET), 400 µl; primera fracción recuperada (F1), 20 µl; segunda fracción recuperada (F2), 10 µl; cromatina fragmentada (CF) 20µl; sobrenadante 1 (S1), 400 µl; sobrenadante 2 (S2), 20 µl y sobrenadante 3 (S3), 10 µl. Todas las fracciones eran de embriones entrecruzados por 2 h, el tiempo medio entre 0 y 4 hrs de entrecruzamiento. Los volúmenes de estas fracciones así tomados fueron precipitados con TCA al 20% y analizados mediante western blot con un anticuerpo anti-Histona H3 (ver punto V.2.5).

V.2.9. Cuantificación de proteínas y ADN.

Utilizando un método espectrofotométrico, se midió la absorbancia de 1 ml de una dilución 1:1000 de las cromatinas extraídas y entrecruzadas por 0 y 2 hrs, en una celda de cuarzo de 1ml a una longitud de onda de 280 nm para las proteínas y a 260 nm para el ADN. Se determinaron las lecturas tomadas restando el correspondiente blanco (Amortiguador de Reacción de la MNasa para la cromatina extraída), considerando que 1 mg/ml de proteína = 1 U.A. a 280 nm, y 50 µg/ml de ADN = 1 U. A. a 260 nm. Con este dato se determinó la concentración en mg/ml de la proteína presente en la muestra original. Posteriormente, utilizando el volumen de la muestra y los gramos de material vegetal utilizado, se obtuvo los miligramos de proteína por gramo de material vegetal.

Las mediciones anteriores se confirmaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). En este caso, se tomaron 5 μ l del extracto proteico crudo, 25 μ l de NaOH 1N y 200 μ l de reactivo de Bradford y se aforaron a un volumen de 1 ml con agua bidestilada. A continuación se efectuaron las lecturas a 595 nm en celdas de plástico. Previamente, se efectuó una curva patrón con un estándar de albúmina, la cual nos permitió establecer posteriormente la cantidad de proteína presente en la muestra original.

V.2.10. Fragmentación de la Cromatina.

Se han comparado dos métodos para fragmentar la cromatina: la sonicación o por medio de la digestión de la nucleasa micrococcal (MNasa). La cromatina resuspendida –en 1ml de Amortiguador de Lisis Nuclear para el caso de la sonicación y en 500 μ l de Amortiguador de Reacción de la MNasa para el caso de la digestión de la MNasa – debe ser fragmentada. La sonicación se realiza con 3 ciclos de 40 kHz por 20 segundos cada uno. Para la digestión por nucleasa micrococcal, ésta última se agrega en una concentración de 10 u/ml y se incuba durante 20 minutos a 37°C. La reacción se detiene agregando 54 μ l de EGTA 50 mM, 9 μ l de PMSF 100mM, 180 μ l de SDS al 5%, 90 μ l de NaCl 2M y 90 μ l del cocktail de inhibidores de proteasas 10X. Se tomaron 10 μ l de muestra de la cromatina fragmentada por la nucleasa micrococcal y 10 μ l de muestra al final de cada ciclo de sonicación de cromatina fragmentada por dicho método, y todas las muestras se resuspendieron en 490 μ l de Amortiguador de Reversión. A estas muestras se sometieron a la reversión del entrecruzamiento y se separó el ADN (ver punto ***V.2.11***) para analizarlo en un gel de agarosa al 1% y detectar los fragmentos obtenidos. El tamaño óptimo de los fragmentos debe ser entre 800 y 200 pb. En caso de que no se obtengan dichos fragmentos,

será necesario repetir o agregar ciclos de sonicado, según sea el caso. La muestra de cromatina fragmentada es centrifugada a 20000 g y el precipitado es desechado (CHMW)

V.2.11. Separación del ADN.

Una vez que se revierte el entrecruzamiento es posible separar el ADN de las proteínas. En primer lugar es necesario realizar la digestión de las proteínas. Se agrega 10 μ l de EDTA 0.5M, 20 μ l de Tris-HCl pH 8.0 1M y con 20mg/ml de proteinasa K, incubando durante 1 hora a 37°C, posteriormente se lleva a cabo la extracción de las proteínas con 500 μ l de una mezcla cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (1:1:1) y precipitando el DNA con acetato de sodio (50 μ l, 3M), glicógeno (20 μ g) y 2 volúmenes de etanol al 100%, centrifugando a 13000rpm. El pellet es lavado con 500 μ l de etanol al 70%.

V.2.12. Ensayos de inmunoprecipitación.

Se utilizaron 10 μ l de extracto crudo (~30 mg de proteína; ver punto **V.2.16**), se agregaron 50 μ l de inhibidor de proteasas 10X + 5 μ l de PMSF 100 mM + 400 μ l de Amortiguador de Dilución A continuación se agregó un exceso de anticuerpo (8 μ l de anticuerpo anti-PCNA) para asegurar la inmunoprecipitación y se incubo durante 12h a 4°C en agitación constante en un roscicero. Después de la incubación con el anticuerpo, se agregó 30 μ l de proteína A-Agarosa y se dejó incubar por 12h a 4°C en un roscicero. Los lavados se realizan con 1ml de los siguientes amortiguadores en el orden en que se disponen: Amortiguador de Baja Salinidad, Amortiguador de Alta Salinidad, Amortiguador de LiCl y dos lavados con Amortiguador TE (ver apéndice). En seguida se eluyen los inmunoprecipitados con 250 μ l de el Amortiguador de Reversión y calentando por 15

minutos a 65°C. Los eluidos se hacen por duplicado y se colocan en un tubo eppendorf limpio. Posteriormente se precipitan las proteínas y se analizan por Western Blot (ver punto V.2.5).

Se realizan diluciones 1:10 de las cromatinas fragmentadas entrecruzadas por diferentes tiempos (0, 15, 30 mins, 1, 2, 4 hrs) en el Amortiguador de Dilución para disminuir la cantidad de SDS del amortiguador en el que se encuentra la cromatina extraída de la manera siguiente: 50 µl de CF (~20mg de proteína) + 50 µl de inhibidor de proteasas 10X + 5 µl de PMSF 100 mM + 400 µl de Amortiguador de Dilución. A continuación se agregó un exceso de anticuerpo (8 µl de anticuerpo anti-PCNA) para asegurar la inmunoprecipitación y se incubo durante 12h a 4°C en agitación constante en un rosti cero. Después de la incubación con el anticuerpo, se agregó 30 µl de proteína A-Agarosa y se dejó incubar por 12h a 4°C en un rosticero. Los lavados se realizan con 1ml de los siguientes amortiguadores en el orden en que se disponen: Amortiguador de Baja S alinidad, Amortiguador de Alta Salinidad, Amortiguador de LiCl y dos lavados con Amortiguador TE (ver apéndice). En seguida se eluyen los inmunoprecipitados con 250µl de el Amortiguador de Reversión y calentando por 15 minutos a 65°C. Los eluidos se hacen por duplicado y se colocan en un tubo eppendorf limpio. Posteriormente se revierte el entrecruzamiento, se precipitan las proteínas. Las proteínas se analizan por western blot (ver punto V.2.5).

Para determinar la cantidad de anticuerpo óptima para la inmu noprecipitación se realizaron siete inmno precipitaciones con la cromatina fragmentada (CF) con 1 h de entrecruzamiento, agregando una cantidad creciente de anticuerpo en cada inmunoprecipitación (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 µl de anti-PCNA). Las diluciones y lavados se

realizaron de la misma manera como se mencionó con anterioridad, al igual que la elusión, la reversión del entrecruzamiento, la precipitación de las proteínas y el análisis por western blot.

La estimación del tiempo aproximado de incubación se realizó mediante dos inmunoprecipitaciones utilizando las condiciones óptimas establecidas, sin embargo se varió el tiempo de incubación de los complejos con la proteína A -Agarosa. Se realizó una incubación de 2 h y otra por 4 h. Las diluciones, lavados, elusión, reversión del entrecruzamiento, precipitación de las proteínas y el análisis mediante western blot se realizó de la misma manera como se realizó en los experimentos anteriores.

Finalmente se repitieron las inmunoprecipitaciones para determinar el tiempo óptimo de entrecruzamiento realizándolas con diluciones de CF entrecruzada a diferentes tiempos (15, 30 min, 1, 2 y 4 hrs) y utilizando las condiciones óptimas de cantidad de anticuerpo y tiempo de incubación con la proteína A -Agarosa que se establecieron. Las diluciones, lavados, elusión, reversión del entrecruzamiento, precipitación de las proteínas y el análisis mediante western blot se realizó de la misma manera como se realizó en los experimentos anteriores. Para la detección de las proteínas asociadas se realizaron los anticuerpos específicos en las membranas en las cuales se detectó previamente a PCNA en los inmunoprecipitados.

V.2.13. Detección del ADN asociado a PCNA

Se realizó una inmunoprecipitación de la CF entrecruzada por 1 h con anticuerpos anti-PCNA de la misma manera como se mencionó en el punto **V.2.11**, utilizando las condiciones óptimas establecidas. Esta inmunoprecipitación se realizó por triplicado, los complejos eluidos fueron sometidos a la reversión del entrecruzamiento y el ADN fue

extraído como se menciona en el punto *V.2.11*, posteriormente se colocó en un gel de agarosa con bromuro de etidio y se le aplicó corriente durante 10 min, tiempo suficiente para que la muestra entrara en el gel sin que se separaran las bandas de pesos moleculares diferentes. Esto permitía que los diferentes fragmentos de ADN estuvieran suficientemente concentrados como para ser detectados en el Fluor -S.

V.2.14. Obtención de ejes embrionarios de maíz.

Mediante el uso de una navaja de un filo y de manera manual, se separó, casi en su totalidad el endospermo y el escutelo del eje embrionario, procurando no dañar la estructura de los ejes. Los ejes se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a 4°C en un desecador hasta su empleo.

V.2.15. Imbibición de ejes embrionarios de maíz.

Se desinfectaron los ejes embrionarios utilizando hipoclorito de sodio 0.5% por 1 minuto. Se enjuagaron con agua estéril bidestilada/desionizada 3 veces, dejándolos secar completamente con aire estéril de la campana de flujo laminar. En cajas petri estériles se colocaron papeles filtro estériles con suficiente solución de imbibición para saturar el papel filtro y, sobre dicho papel, se colocaron los ejes embrionarios. El tiempo de inicio de la imbibición se tomó en cuenta desde el término de la colocación de dichos ejes en el papel. Se tapó y selló cada caja petri con parafilm. A continuación, se incubaron a 25°C en oscuridad, por 22 horas, tiempo en el cual se ha encontrado un aumento considerable en la cantidad de PCNA

V.2.16. Extracción de proteínas (extracto crudo).

Los ejes embrionarios (~1g) se trituraron con nitrógeno líquido y arena, y se homogenizaron exhaustivamente en un mortero con 5 ml de Amortiguador de Extracción (ver apéndice). Inmediatamente, se procedió a centrifugar el homogenado a 150 000 g por 30 min a 4°C y se retiró la fase acuosa que es la enriquecida en proteínas.

V.2.17. Extracción de cromatina de los ejes embrionarios y comparación con la cromatina de embriones de elote.

Se extrajeron 2 gr de ejes embrionarios, los cuales fueron sometidos al mismo procedimiento de entrecruzamiento (ver V.2.2) y extracción de cromatina (V.2.6) que los embriones, utilizando para este caso el tiempo de entrecruzamiento que resulte más eficiente para la detección de PCNA en los inmunoprecipitados de la cromatina. Se tomaron muestras de 20 µl de la cromatina de embriones y 20 µl de la cromatina de ejes embrionarios por duplicado. Las muestras se sometieron a la reversión del entrecruzamiento (ver V.2.4) y se analizaron mediante western blot, utilizando un anticuerpo anti-PCNA y otro anticuerpo anti-Histona H3 para comparar la cantidad de PCNA e Histona H3 en ejes embrionarios y en embriones de elote.

VI. RESULTADOS.

VI.1. Progresión del Entrecruzamiento.

Como se mencionó en la introducción, las condiciones de óptima fijación deben ser determinadas haciendo un experimento con diferentes tiempos de entrecruzamiento (0, 15, 30min, 1, 2 y 4h) de los embriones de elote en formaldehído al 1%. Realizando un Western Blot para detectar a PCNA, podemos determinar la magnitud del entrecruzamiento que se ha llevado a cabo. De esta forma, esperamos que las uniones covalentes que provoca el formaldehído entre PCNA y el ADN y otras proteínas, pueda ser visible con el aumento proporcional del peso molecular de PCNA debido a la unión con el ADN y otras proteínas. El Western Blot se llevó a cabo en extractos de extracto total (ET) y se reveló con un anticuerpo anti-PCNA.

En la figura 7 se observa que los extractos totales (ET) revelan un aumento de intensidad en las bandas de ~87kD y ~174kD, las cuales se asocian con el tamaño esperado para un trímero y un ditrímero de PCNA respectivamente, proporcional al aumento en el tiempo de entrecruzamiento, además de la consecuente disminución de la intensidad de las bandas de ~29kD –asociada al monómero de PCNA–, al igual que en las de ~50kD y la de ~52kD que podrían ser modificaciones postraduccionales de PCNA. La banda asociada al trímero aparece tempranamente, a partir de los 15 min de entrecruzamiento, mientras que la banda asociada al ditrímero se forma alrededor de las 2h de entrecruzamiento. Por otra parte, también puede notarse la aparición de un barrido en el carril donde se colocó el ET de embriones entrecruzados por 4h, que va aproximadamente desde los 63kD hasta los

175kD y que aparece también, aunque tenuemente, en el carril donde se colocó el ET de embriones entrecruzados por 2h.

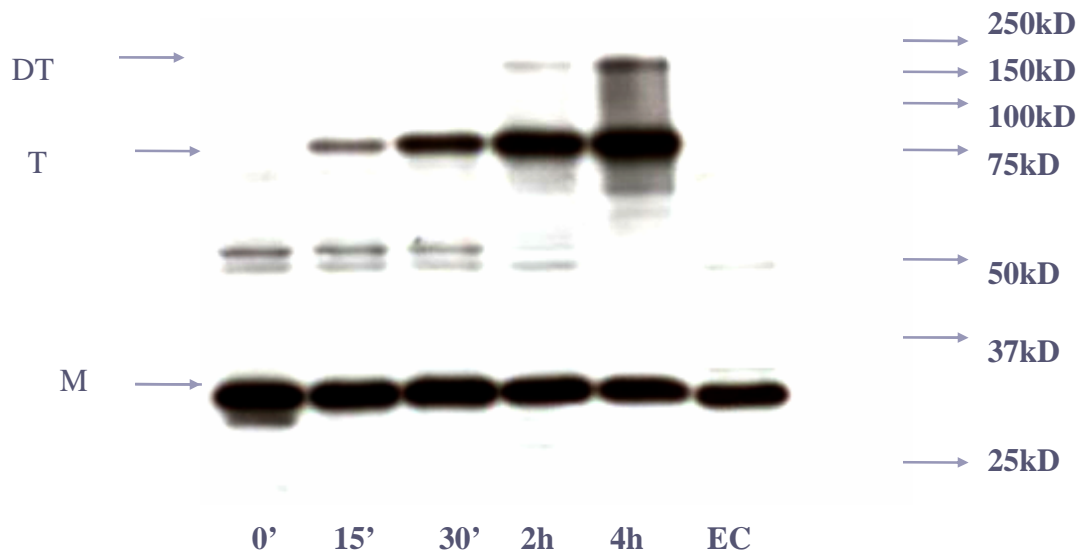


Figura 7. Eficiencia del entrecruzamiento. Los extractos totales (ET) de embriones entrecruzados por 0, 15, 30 min, 2, y 4 hrs, son analizados mediante western blot con anti - PCNA, comparados con un extracto crudo (EC). La banda de 29KD (M) se asocia al monómero de PCNA, la banda de 87KD (T) se asocia al trímero de PCNA y la banda de 174KD (DT) se asocia al dítmero de PCNA. Aparecen dos bandas de 50 y 52KD aproximadamente.

VI.2. Determinación del Tiempo Óptimo de Reversión del Entrecruzamiento.

Utilizando los mismos extractos totales (ET), se realizaron ensayos de reversión del entrecruzamiento con el objetivo de determinar el tiempo óptimo en el cual la unión covalente promovida por el formaldehído se revierte. De esta manera podremos evitar que las proteínas inmunoprecipitadas que sean analizadas mediante western blot, sean detectadas en un peso molecular que no les corresponde y además que el ADN que se extraiga no este contaminado o se pierda debido a su unión con las proteínas. Se realizaron ensayos de reversión del entrecruzamiento por 0, 6, 12, 18 y 24h al ET de embriones

entrecruzados por 4h y comparando con un ensayo realizado a un ET de embriones sin entrecruzar, para detectar la posible pérdida de proteína en el proceso.

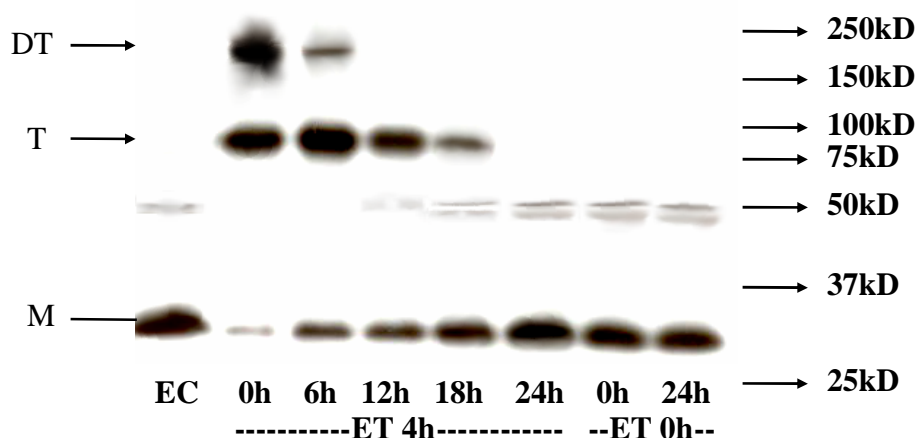


Figura 8. Pruebas de Reversión del Entrecruzamiento. El ET de embriones de elote entrecruzados por 4h (ET 4h) en formaldehído al 1% es incubado a 65°C en Amortiguador de Reversión por 0, 6, 12, 18 y 24 h y analizado mediante Western Blot con anti-PCNA, comparándolo contra un extracto crudo (EC) y ET de embriones de elote sin entrecruzar (ET 0h), incubando a 65°C en Amortiguador de Reversión por 0 y 24 h.

Puede verse en este experimento que la banda asociada al monómero de PCNA aumenta proporcionalmente con respecto al tiempo de incubación del ET, mientras que la intensidad de las bandas asociadas al dímero y trímero de PCNA va disminuyendo. Además, no existe variación alguna en la intensidad de las bandas que se pueden detectar en el ET de embriones de elote sin entrecruzar, aún después de ser incubadas por 24h a 65°C (fig. 8; ver ET 4h y ET 0h). Por otra parte, puede observarse que la banda asociada al trímero de PCNA tiene una intensidad mayor cuando la suspensión ha sido incubada por 6h, comparada con el inicio de la reversión; es posible que la reversión del entrecruzamiento del trímero se lleve a cabo más lentamente que la del dímero (fig. 8; comparar la banda del T de 6h con la de 0h). Adicionalmente encontramos que aparecen las

bandas de ~50kD y ~52kD después de las 12h de reversión del entrecruzamiento (fig. 8; ver los carriles de 12, 18 y 24h).

VI.3. Análisis de la Extracción de la Cromatina.

Una vez que se ha realizado la extracción de la cromatina, es necesario asegurarse de que la proteína que interesa al presente estudio este presente en nuestro pool de cromatina, además de verificar que la extracción se haya realizado eficientemente. En primer lugar, se realizó un western blot contra PCNA de la cromatina extraída de los embriones entrecruzados durante los tiempos que han sido mencionados más arriba.

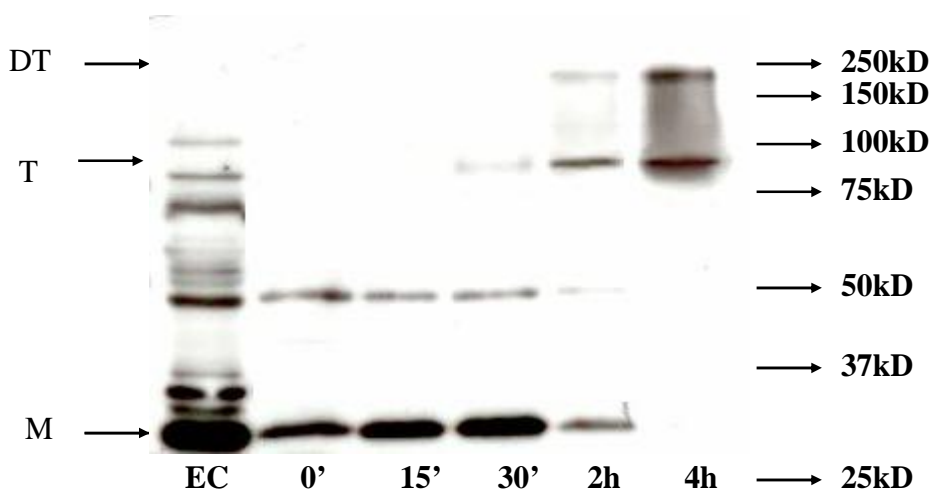


Figura 9. Análisis de la extracción de la cromatina. Previa extracción de la cromatina y fragmentación de la misma mediante la acción de la micronucleasa, se realizó un Wester Blot con anti-PCNA de los extractos obtenidos (CF) de embriones de elote entrecruzados por 0, 15, 30 min, 2 y 4 h. La banda de 29kD (M) se asocia al monómero de PCNA, la banda de 87kD (T) se asocia al trímero de PCNA y la banda de 174kD (DT) se asocia al ditrímero de PCNA. También aparece una banda de 50kD.

A diferencia de lo que se encontró en los extractos totales, la intensidad de la banda asociada al monómero de PCNA parece aumentar conforme aumenta el tiempo de entrecruzamiento (fig. 9; ver banda M de 0', 15' y 30'). Sin embargo, cuando los embriones

son entrecruzados por más de 2h, la cantidad de monómero disminuye considerablemente, mientras que las bandas del trímero y del dítrímero de PCNA van aumentando proporcionalmente con respecto al tiempo de entrecruzamiento (fig. 9; ver 2h y 4h). Por otra parte, si se compara la proporción que existe entre la banda de 50kD con respecto a las otras bandas, ésta tiene una intensidad mayor a la que se puede verificar en suspensiones de ET (ver fig. 9), sin mencionar que es la única que aparece en cromatina, mientras que la proteína de 52kD desaparece.

En cuanto a la eficiencia de la extracción, ésta se verificó realizando un western blot de las diferentes fracciones de la extracción contra la proteína Histona H3, que es una de las responsables de ensamblar la cromatina y se encuentra principalmente en el núcleo. El anticuerpo utilizado fue creado para la detección de Histona H3 de humano, por lo que se realizó una comparación previa entre la histona de humano y la histona de maíz, resultando en una identidad del 97% (ver anexo).



Figura 10. Análisis de la extracción de la cromatina. Se tomaron volúmenes equivalentes al 2% de cada fracción (ver fig. 6): extracto de proteína total (PT), 400µl; primera fracción recuperada (F1), 20µl; segunda fracción recuperada (F2), 10µl; cromatina fragmentada (CF) 20µl; sobrenadante 1 (S1), 400µl; sobrenadante 2 (S2), 20µl y sobrenadante 3 (S3), 10µl. Los volúmenes de estas fracciones así tomados fueron precipitados con TCA al 20% y analizados mediante western blot con un anticuerpo anti-Histona H3.

La intensidad de la banda asociada a Histona H3 en los precipitados recuperados es muy similar (fig. 10; ET, F1, F2 y EC), exceptuando a la cromatina fragmentada (CF). Parece ser que todos los precipitados mantienen la misma cantidad de Histona H3 conforme se van realizando las extracciones, mientras que la banda esta ausente en los primeros sobrenadantes (fig. 10; S1 y S2). Sin embargo, en el sobrenadante 3 (S3) que se desecha en

la última extracción, donde se purifica la cromatina mediante un gradiente de sacarosa (ver en Métodos, punto V.2.6. La extracción de la cromatina), aparece una banda en 16kD con una intensidad comparable, aunque ligeramente menor, a la que se observa en los precipitados que se recuperan antes de la purificación de la cromatina mencionada. Esto parece indicar que hay una fracción considerable de cromatina que se pierde en la última extracción.

La cantidad de proteína extraída en la cromatina, así como la cantidad de ADN que contiene, nos da una idea de la eficiencia de la extracción. Realizamos la cuantificación del ADN y de las proteínas de la cromatina extraída de embriones entrecruzados por 2h y sin entrecruzar.

Tabla 2. Cantidad de ADN y Proteína extraída en la cromatina de embriones de elote.

Tiempo de entrecruzamiento	0h	2h
ADN ($\mu\text{g/g}$ de material vegetal)	282.38 \pm 15.22	311.63 \pm 21.35
Proteína (mg/g de material vegetal)	12.04 \pm 0.74	14.04 \pm 0.62

De esta manera logramos determinar que mientras la cantidad de ADN extraído varía muy poco, por el contrario, la cantidad de proteína aumenta de manera directamente proporcional al tiempo de entrecruzamiento.

VI.4. Pruebas de Fragmentación de la Cromatina.

En el uso original de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina, es necesario realizar la fragmentación de la cromatina para restringir el número de bases de las secuencias de unión, sin embargo, también es necesario mantener fragmentos pequeños de cromatina para evitar la pérdida del material inmunoprecipitado. En la literatura se describen por lo menos dos métodos diferentes para fragmentar la cromatina: el método de la sonicación y el método de la digestión con una nucleasa. Estos métodos pueden ser alternativos, pero también pueden ser complementarios.

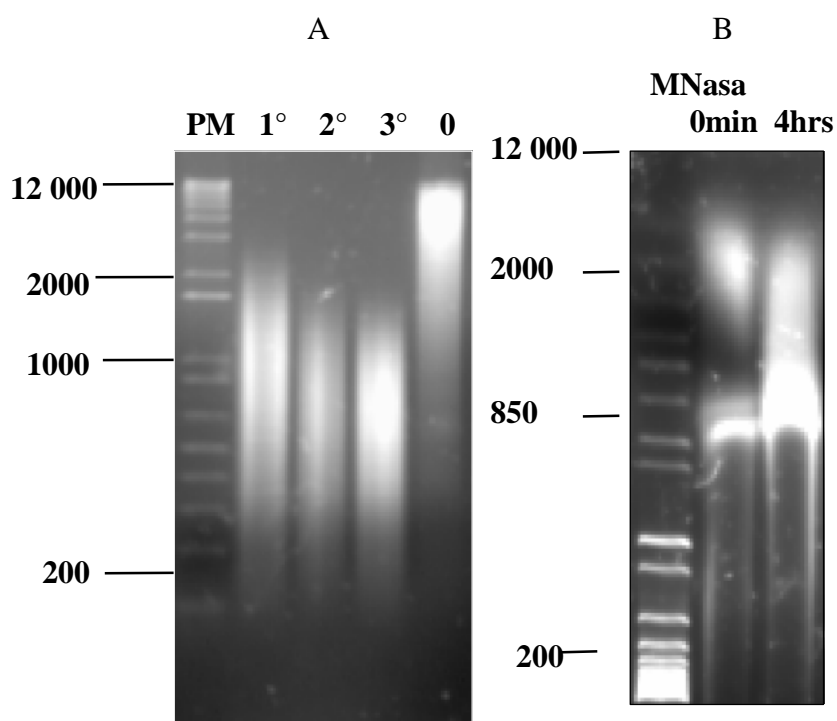


Fig 11. Comparación de métodos de fragmentación de la cromatina. (A): estado del DNA de extractos de cromatina entrecruzada por 4 h después sonicar por 3 ciclos a 40kHz de 20 seg y (B): cromatina entrecruzada por 0 min y 4 hrs sometidas a la actividad de la nucleasa micrococcal (CF). Comparación de Métodos

Dos muestras de cromatina de embriones entrecruzados por 1h se sometieron a ambos métodos por separado, utilizando una cromatina extraída de embriones sin entrecruzar como control. Los fragmentos obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa

con bromuro de etidio posterior a la reversión del entrecruzamiento y la separación del ADN.

Los fragmentos obtenidos mediante la técnica de sonicación están entre las 1000 y 200 pares de bases, se puede observar que el efecto de los ciclos de sonicación es acumulativo y que los fragmentos que se obtienen se encuentran en un rango que se puede observar como un barrido (fig. 11; A). Por el contrario, los fragmentos obtenidos mediante la acción de la nucleasa micrococcal tienen un rango mucho más restringido y además un tamaño menor a las 850 pb, mucho más pequeño que lo encontrado mediante la sonicación (fig. 11; B).

VI.5. Ensayos de Inmunoprecipitación.

VI.5.1. Inmunoprecipitación de Extracto Crudo:

Con el objetivo de verificar que PCNA puede ser inmunoprecipitado con las condiciones de astringencia de los amortiguadores y afinidad del anticuerpo utilizados para la técnica original de inmunoprecipitación de la cromatina, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de extractos crudos utilizando los Amortiguadores que se utilizan comúnmente en esta técnica y un exceso de anticuerpo anti-PCNA de maíz utilizado en el laboratorio. Se utilizaron controles para determinar si PCNA se unía inespecíficamente a la proteína A-Agarosa,

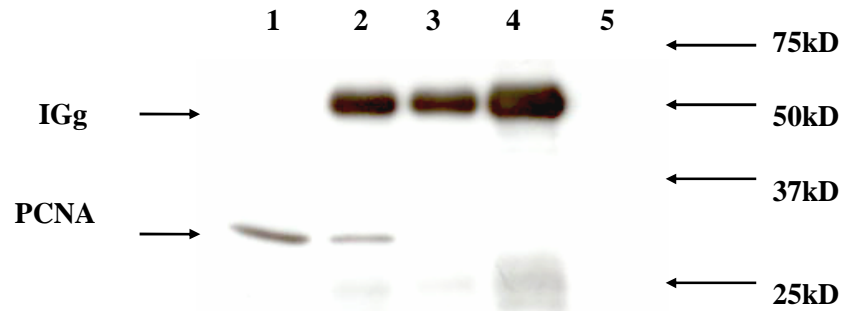


Figura 12. Inmunoprecipitación de extracto crudo. Se realizaron estas inmunoprecipitaciones de extracto crudo (15µl ~50µg de proteína) con un anticuerpo anti-PCNA (6µl) y realizando lavados con 1ml de Amortiguador de Baja Salinidad, 1ml de Amortiguador de Alta Salinidad, 1ml Amortiguador de LiCl y finalmente dos veces con 1ml de Amortiguador TE. 1: Extracto Crudo; 2: Proteína A-Agarosa con anti-PCNA y extracto crudo; 3: Proteína A-Agarosa con anti-PCNA y sin extracto crudo; 4: 6 µl de anti-PCNA; 5: Proteína A-Agarosa con extracto crudo. La banda de 50kD se asocia a la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGg) y la banda de ~29kD que aparece también en el extracto crudo (EC) se asocia a PCNA.

PCNA es inmunoprecipitado bajo las condiciones utilizadas en la técnica de CHIP y con el anticuerpo contra PCNA que se maneja en el laboratorio (fig. 12; ver carril 2). El control de proteína A-Agarosa con anticuerpo y sin extracto crudo no muestra ninguna banda que tenga el mismo tamaño que la banda reconocida en el extracto crudo, además se puede notar que la banda de 50kD asociada a la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGg) tiene una intensidad menor a la del control del anticuerpo (fig. 12; ver banda IGg de los carriles 3 y 4). El control de proteína A-Agarosa sin anticuerpo, no tiene ninguna banda que aparezca en el extracto crudo o en el control con el anticuerpo (fig. 12; ver carril 5).

VI.5.2. Inmunoprecipitación de la Cromatina; tiempo óptimo de entrecruzamiento

La inmunoprecipitación de proteínas entrecruzadas es un procedimiento complejo. Las proteínas unidas entre sí por puentes de carbono inducidos pueden formar complejos que oculten los epítopes de la proteína contra la cual está levantado el anticuerpo, por lo que es posible que un exceso en el tiempo de entrecruzamiento resulte en la pérdida del material inmunoprecipitado. Por otra parte, el entrecruzamiento es un procedimiento indispensable

para que las proteínas que se asocian a PCNA puedan ser inm unoprecipitadas y detectadas mediante western blot. Por esta razón es un requisito encontrar el tiempo óptimo de entrecruzamiento necesario para bajar la mayor cantidad de PCNA posible y también detectar a las proteínas asociadas.

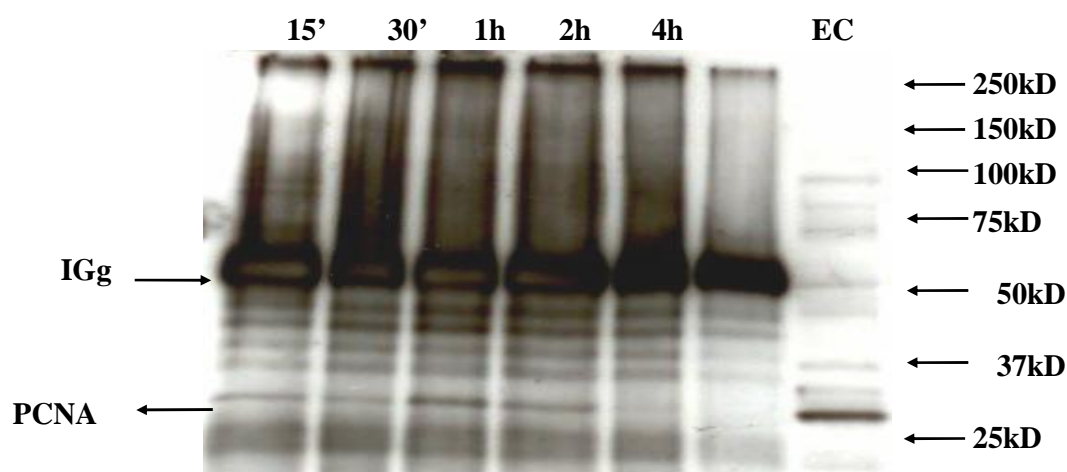


Figura 13. Inmunoprecipitación de la cromatina, tiempo óptimo de entrecruzamiento. Se realizó la inmunoprecipitación de la cromatina (50 μ l) con un anticuerpo anti-PCNA (8 μ l) de cada uno de los tiempos de entrecruzamiento (15, 30 min, 1, 2 y 4 h), utilizando 4 μ l de anti-PCNA () como control. Después de eluir los complejos, se revirtió el entrecruzamiento y se realizó la inmunodetección con anti-PCNA. La banda de 50kD se asocia a la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGg) y la banda de ~29kD que aparece también en el extracto crudo (EC) se asocia a PCNA.

La banda que se asocia con el monómero de PCNA se encuentra en el extracto crudo y en los inmunoprecipitados, sin embargo no se encuentra en el control del anticuerpo (ver fig 13;). Por otro lado, la mayor intensidad de esta banda se puede observar en los inmunoprecipitados de CF entrecruzada por 1h, seguida de la que tiene 2h, mientras que la banda es casi imperceptible en la cromatina entrecruzada por 4h (fig 13; ver 15', 30', 1h, 2h y 4h).

VI.5.3. Inmunoprecipitación de la Cromatina; cantidad óptima de anticuerpo

Una vez que se ha determinado el tiempo óptimo de entrecruzamiento de la cromatina para realizar la inmunoprecipitación, se requiere saber la cantidad de anticuerpo necesaria para bajar la mayor cantidad de PCNA posible, manteniendo constante la cantidad de cromatina y aumentando paulatinamente la cantidad de anticuerpo.

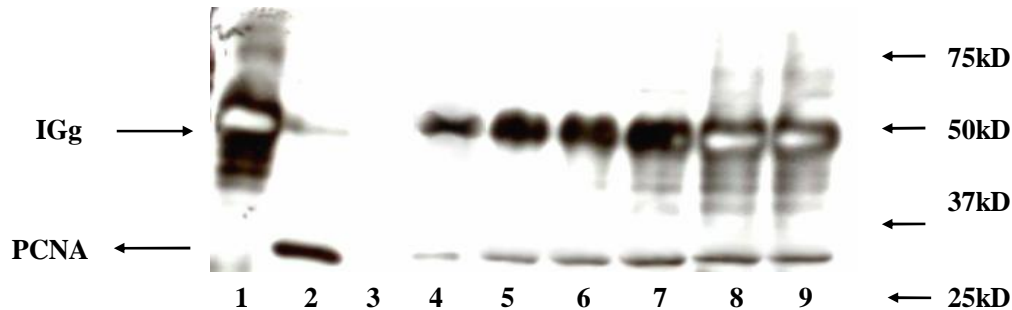


Figura 14. Inmunoprecipitación de la cromatina; determinación de la cantidad óptima de anticuerpo. Se realizó la inmunoprecipitación de la cromatina fragmentada (CF) con 1h de entrecruzamiento. Se aumentó la cantidad de anticuerpo mientras la cantidad de CF (50 μ l) y proteína A -Agarosa (40 μ l) permaneció constante. 1: anti-PCNA (6 μ l); 2: extracto crudo; 3: control negativo sin anticuerpo; 4: dilución 2:1000 de anti-PCNA (1 μ l); 5: dilución 4:1000 de anti-PCNA (2 μ l); 6: dilución 6:1000 de anti-PCNA (3 μ l); 7: dilución 8:1000 de anti-PCNA (4 μ l); 8: dilución 10:1000 de anti-PCNA (5 μ l); 9: dilución 12:1000 de anti-PCNA (6 μ l). La banda de ~50kD se asocia a la cadena pesada de la inmunoglobulina, mientras que la banda de ~29kD se asocia a PCNA.

La banda de 29kD asociada a PCNA aumenta proporcionalmente al incremento en la cantidad de anticuerpo, sin embargo, cuando la dilución del anticuerpo ha llegado a 8:1000, al parecer la intensidad de la banda no aumenta, sino se mantiene constante, a pesar de que la banda de 50kD, asociada a la cadena pesada de la IGg, sigue aumentando su intensidad (fig 14; ver los carriles del 4 al 9).

VI.5.4. Inmunoprecipitación de la Cromatina; estimación del tiempo óptimo de incubación con la proteína A -Agarosa:

Una vez que se ha realizado la incubación de la dilución de la cromatina con el anticuerpo, se realiza una nueva incubación con la proteína A -Agarosa para fijar a la resina

el anticuerpo y el complejo que lleva pegado. De esta manera se pueden realizar los lavados posteriores sin perder material en la inmunoprecipitación. El tiempo de incubación necesario para que la unión del anticuerpo con la proteína A -Agarosa se lleve a cabo es un dato importante para evitar la pérdida del material en la inmunoprecipitación.

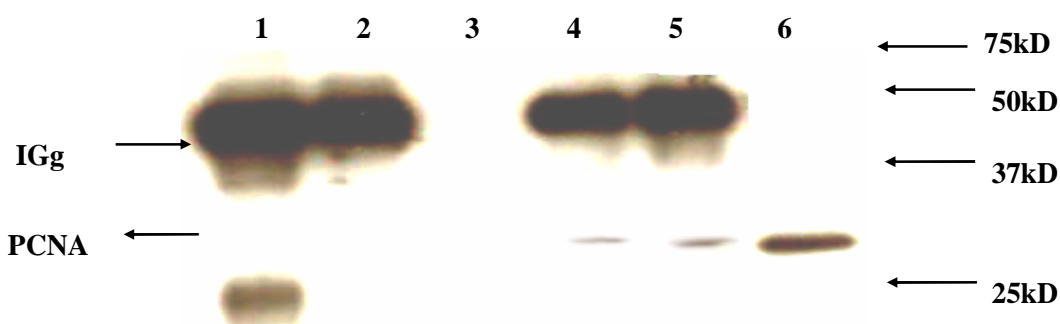


Figura 15. Inmunoprecipitación de la cromatina; estimación del tiempo aproximado de incubación con la proteína A-Agarosa. Posterior a la incubación del anticuerpo con la dilución de la cromatina, se realizó una incubación de 2 y 4 horas de esta mezcla con la proteína A -Agarosa, para después seguir con el protocolo normal de los lavados de la resina y elución de los complejos inmunoprecipitados. 1: anti-PCNA (4µl); 2: control negativo de proteína A-Agarosa y anticuerpo incubados por 12h a 4°C en agitación y sin agregarles CF; 3: control negativo sin anticuerpo; 4: incubación de 2h de la mezcla CF y anticuerpo con la proteína A-Agarosa; 5: incubación de 4h; 6: extracto crudo. La banda de ~50kD se asocia a la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGg) y la banda de ~29kD con el monómero de PCNA

La intensidad de la banda asociada a la cadena pesada de la IGg nos muestra la cantidad de anticuerpo que se une a la proteína A-Agarosa. Comparando la cantidad de anticuerpo colocado con la cantidad de anticuerpo unido a la resina después de incubar por 12h (fig. 15; carriles 1 y 2), podemos observar que no todo el anticuerpo que se coloca en la incubación se puede recuperar para ser analizado en el western blot. Por otra parte, la cantidad de anticuerpo que se recupera después de incubar por 12h es muy similar a aquella que se recupera en una incubación de 4h. De la misma manera la cantidad de PCNA inmunoprecipitado es muy similar en una incubación del anticuerpo por 2h con la proteína A-Agarosa y en una por 4h (fig. 15; carriles 2, 4 y 5).

VI.5.5 Inmunoprecipitación de la Cromatina utilizando las condiciones óptimas establecidas:

Una vez que se han realizados los experimentos para establecer las condiciones óptimas para la inmunoprecipitación, confirmamos nuevamente estas condiciones para la realización de la inmunoprecipitación.

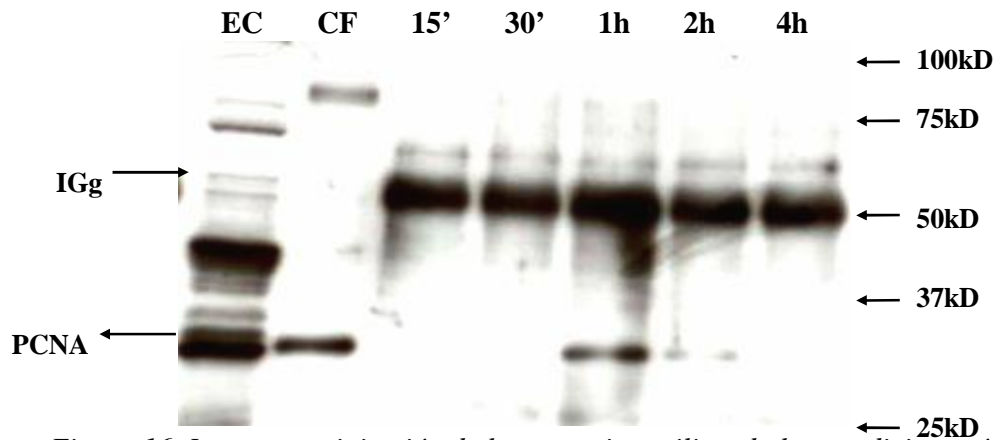


Figura 16. Inmunoprecipitación de la cromatina utilizando las condiciones óptimas establecidas. La inmunoprecipitación se realizó con una dilución 8:1000 (4ml) del anticuerpo anti-PCNA, incubando por 4h con la proteína A -Agarosa y probando nuevamente con las cromatinas con diferentes tiempos de entrecruzamiento (15', 30', 1h, 2h y 4h), y comparando con un extracto crudo (EC) y la cromatina entrecruzada por 30 min (CF).

Tal como sucedió anteriormente, la banda de ~29kD asociada al monómero de PCNA muestra una intensidad bastante considerable en el inmunoprecipitado de cromatina de 1h de entrecruzamiento, seguida de aquella detectada en el inmunoprecipitado de cromatina de 2h de entrecruzamiento (fig 16; 1h y 2h). Curiosamente, esta banda no es perceptible en ningún otro inmunoprecipitado.

VI.6. Detección del ADN asociado a PCNA.

Como se ha mencionado más arriba, PCNA funciona como una deslizadera que interviene en procesos de síntesis y reparación de todo el ADN, y por lo tanto, puede encontrarse asociada a cualquier secuencia. De esta manera, es imposible realizar una

reacción de amplificación del ADN asociado a PCNA por medio de una reacción de PCR. Por este motivo es necesario que el ADN obtenido mediante la inmunoprecipitación sea suficiente como para ser detectado directamente en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio sin ser sometido a una técnica de amplificación.



Figura 17. Detección de ADN asociado a PCNA. La inmunoprecipitación de la cromatina, utilizando las condiciones óptimas establecidas, se realizó por triplicado con cromatina de embriones sin entrecruzar (0') y con cromatina de embriones entrecruzados por 1h. Los complejos así eluidos se sometieron a la reversión del entrecruzamiento y posteriormente se extrajo el ADN para ser analizado en un gel de agarosa con bromuro de etidio. A la izquierda se muestra un carril vacío (-).

Como se esperaba, se encontró ADN en los inmunoprecipitados contra PCNA de cromatina de embriones entrecruzados por 1h, no así en los que se hicieron de cromatina de embriones sin entrecruzar (ver fig. 17).

VI.7. Detección de una Cdk-A asociada a PCNA

Los objetivos de los experimentos realizados en esta tesis, tienen como fin último la detección de proteínas unidas a PCNA cuando esta última se encuentra pegada al ADN de la cromatina. Se había mencionado que PCNA se une *in vitro* a las Cdks, entre otras proteínas. Pues bien, la Cdk A de maíz tiene un dominio PSTAIRE (prolina, serina, treonina, alanina, isoleucina, arginina y ácido glutámico) de unión a ciclinas, de tal forma que este dominio puede ser detectado realizando un western blot utilizando un anticuerpo

contra un péptido PSTAIRE. De esta manera se realizaron inmunoprecipitaciones de la cromatina (ChIP) contra PCNA y los complejos eluidos fueron analizados mediante western blot con un anticuerpo contra el péptido PSTAIRE para hacer evidente la posible interacción de PCNA con la cdkA mientras PCNA se encuentra unida al ADN.

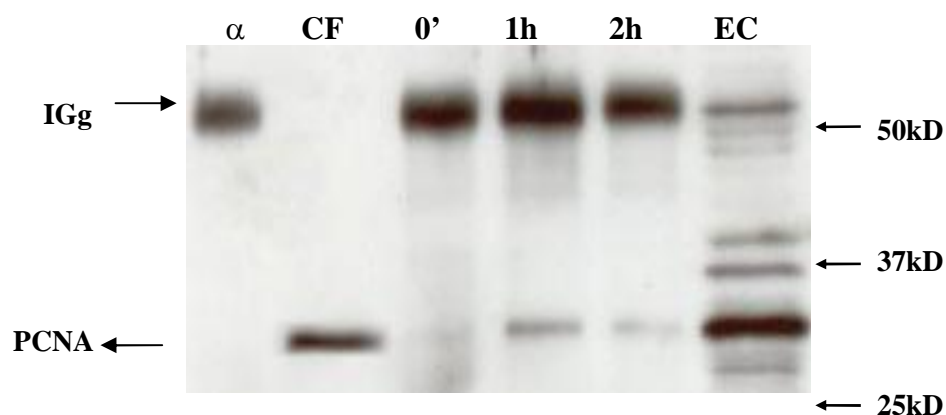


Figura 18. Realizando la inmunoprecipitación de cromatina de embriones entrecruzados por 1h, 2h y sin entrecruzar (0'), se tomaron los complejos eluidos para ser analizados mediante western blot con un anticuerpo anti-PCNA. Se compara contra un extracto crudo (EC) y contra la cromatina (CF) después de revertir el entrecruzamiento. Se colocaron 4 μ l de anti-PCNA para identificar la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGg).

Se verificó que PCNA se encontraba en los inmunoprecipitados, confirmando lo que hasta ahora se había detectado: la banda de PCNA tiene una intensidad mayor en inmunoprecipitados de cromatina de embriones entrecruzados por 1h (fig. 18; ver 1h) que en los que fueron entrecruzados por 2h (fig. 18; ver 2h). La banda difícilmente puede distinguirse, sin embargo, en los inmunoprecipitados de CF de embriones sin entrecruzar (fig. 18; ver 0').

Una vez que se verificó la presencia de PCNA en los inmunoprecipitados, se realizó la detección de una proteína con un dominio PSTAIRE, el cual se encuentra en la proteína CdkA.

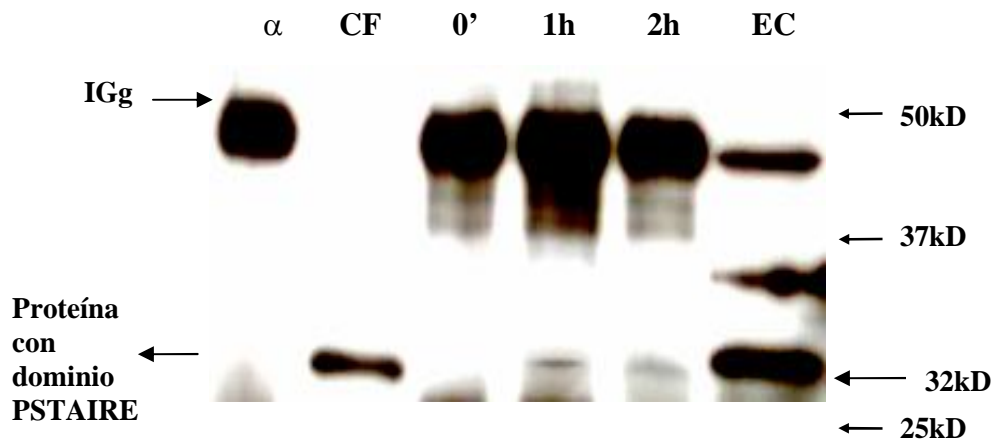


Figura 19. Detección del dominio PSTAIRE en CHIP contra PCNA. La misma membrana que fue analizada con un anticuerpo anti-PCNA es ahora lavada y reutilizada para realizar una inmunodetección con un anticuerpo anti -PSTAIRE. Se compara contra un extracto crudo (EC) y contra la cromatina (CF) después de revertir el entrecruzamiento. Se colocaron 4 μ l de anti-PCNA para identificar la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGg).

Este anticuerpo contra el dominio PSTAIRE detecta una proteína de ~32kD en inmunoprecipitaciones de cromatina de embriones entrecruzados por 1 y 2 h (fig. 19; ver 1h y 2h). La intensidad de la banda es proporcional a la intensidad de la banda de PCNA detectada en la misma membrana con un anticuerpo anti -PCNA.

VI.8. Comparación del Material Biológico.

Los ejes embrionarios de maíz son un material biológico mucho más apto para el estudio del ciclo celular; los tiempos de germinación y las diferentes condiciones hormonales, osmóticas y/o nutrimentales que tienen influencia sobre la germinación y el ciclo celular, pueden ser controladas con mayor facilidad, sin embargo es difícil obtener grandes cantidades de este material biológico en un tiempo muy corto. Adoptar este material para la realización de experimentos con el objetivo de establecer una metodología podría llevar largo tiempo. Es por esta razón que se optó por establecer las condiciones de

la técnica con un material biológico que puede obtenerse más fácilmente y sobre todo, con mayor rapidez. Es este el caso de los embriones de maíz de 21 días post -antesis.

Para establecer la posible equivalencia entre los embriones de elote y los ejes embrionarios de maíz, y así poder realizar esta técnica con ejes embrionarios, determinamos la cantidad de PCNA e Histona H3 presentes en una muestra de cromatina extraída de 2g de ejes embrionarios de maíz con 22h de germinación y 4g de embriones de elote de 21 días post-antesis. Ambos, tanto los embriones como los ejes, fueron sometidos a las mismas condiciones de entrecruzamiento (1h) y de extracción de la cromatina. Se tomaron 50µl de cromatina resuspendida en 1ml de Amortiguador de Lisis Nuclear para cada caso y fueron sometidos a la reversión del entrecruzamiento, a la precipitación de las proteínas y finalmente a la detección mediante Western Blot con anticuerpos contra PCNA e Histona H3 en membranas diferentes.

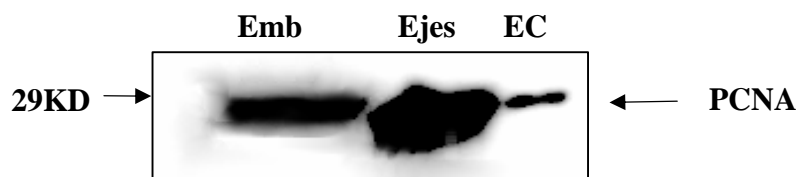


Fig 20. Se entrecruzaron 2g de ejes embrionarios con 22h de germinación (Ejes) y 4g de embriones de elote (Emb) con formaldehído al 1% durante 1h. Posteriormente se extrajo la cromatina bajo las mismas condiciones para ambos materiales vegetales, se tomó una muestra de 50 µl de cada extracto, se revirtió el entrecruzamiento y se precipitaron las proteínas con TCA para ser analizadas mediante western blot con un anticuerpo anti -PCNA.

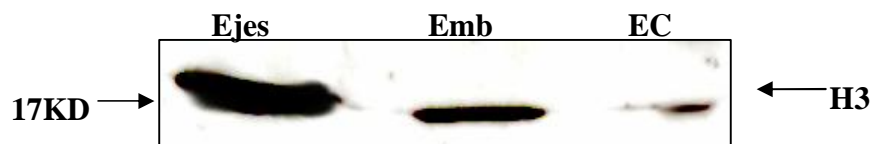


Fig 21. Se entrecruzaron 2g de ejes embrionarios con 22h de germinación (Ejes) y 4g de embriones de elote (Emb) con formaldehído al 1% durante 1h. Posteriormente se extrajo la cromatina bajo las mismas condiciones para ambos materiales vegetales, se tomó una muestra de 50 µl de cada extracto, se revirtió el entrecruzamiento y se precipitaron las proteínas con TCA para ser analizadas mediante western blot con un anticuerpo anti -Histona H3.

En las figuras 21 y 22 puede observarse claramente que la cantidad de PCNA e Histona H3 en embriones es menor a la encontrada en ejes, las bandas de 29kD y 17kD que se encontraron en cromatina fragmentada (CF) de ejes embrionarios tienen una intensidad aproximadamente del doble de aquella que se puede detectar en embriones de elote.

Para confirmar estos datos y verificar la diferencia que existe entre ambos materiales vegetales se realizó la cuantificación de proteína y ADN de ambas muestras.

Tabla 3. Cantidad de proteína y ADN en embriones y ejes

Material Vegetal	Proteína (mg/g de material vegetal)	ADN ($\mu\text{g/g}$ de material vegetal)
Embriones de elote	12.20	274.5
Ejes embrionarios con 22h de germinación	34.38	1023.75
Ejes embrionarios sin germinar	33.66	942.75

Como se puede observar en la tabla 3, la cantidad de proteína en ejes embrionarios es aproximadamente tres veces mayor a la que se encuentra en embriones de elote, mientras que la cantidad de ADN es casi cuatro veces mayor en ejes. Sin embargo, decidimos usar como material los embriones de elote dada su facilidad de extracción y de procesamiento.

VII. DISCUSIÓN.

Este trabajo tuvo como propósito determinar si PCNA se une a los complejos ciclinas tipo D/Cdk-A cuando se halla unido al ADN. Para lograr lo anterior fue fundamental montar una metodología que nos permitiera extraer y detectar a PCNA unido a la cromatina evitando que se perdieran las asociaciones que establece con otras proteínas mientras se encuentra unido al ADN. Fue la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) la que nos daba la posibilidad de extraer la cromatina e identificar una proteína concreta mediante anticuerpos específicos contra dicha proteína, además de formar uniones covalentes entre proteínas asociadas entre sí, evitando que se pierda la asociación en el procedimiento de extracción y aislamiento. De esta forma, primero establecimos el material vegetal que utilizaríamos para montar la metodología. Para establecer la metodología, dada la cantidad de material vegetal que se requiere y la dificultad que representa obtener los ejes embrionarios, es mucho más práctico extraer y utilizar los embriones de elote para estos fines.

En cuanto a los experimentos de entrecruzamiento se refiere, se observó una disminución en la cantidad de monómero de PCNA y un concomitante aumento en la cantidad de las formas de trímero y dítrmero, tanto en el extracto total (ET) como en la suspensión de la cromatina (CF), lo que muy probablemente es consecuencia del entrecruzamiento de PCNA. Esto se ve sustentado por el hecho de que las bandas que aparecen tienen un peso molecular del triple (~87kD) y séxtuple (~174kD) del que tiene el monómero de PCNA (~29kD) y cuando se revierte el entrecruzamiento desaparecen progresivamente los multímeros, mientras que el monómero de PCNA aumenta. Adicionalmente, se ha reportado en experimentos *in vitro* e *in vivo* la formación del

trímero y del dítrmero de PCNA en células de humano por la acción del formaldehído (Stanislav, 2005). Esto nos indica como es que se lleva a cabo la progresión del entrecruzamiento en los embriones de elote, y el barrido que se puede observar en las bandas que se asocian al trímero y al dítrmero podrían ser la consecuencia del entrecruzamiento de PCNA con múltiples proteínas con diferentes pesos moleculares (Maga y Hübscher, 2003). Por otra parte, parece ser que el trímero es más resistente a la reversión del entrecruzamiento que el dítrmero, esto puede deberse a que los puentes de carbono que se forman entre los monómeros de PCNA sean más numerosos que aquellos que se forman entre dos homotrimeros. EL análisis de mutantes en PCNA de humano ha sugerido que los residuos arginina 5 y lisina 110 en la parte posterior de PCNA son los puntos de contacto entre dos homotrimeros y, por lo tanto es muy probable que sean los únicos aminácidos entrecruzados (Stanislav, 2005).

Las proteínas de 52kD y 50kD que se observan con mayor claridad en los embriones sin entrecruzar, podrían ser modificaciones postraduccionales de PCNA, tales como la ubiquitinación, la fosforilación o la sumoilación. Las modificaciones postraduccionales por ubiquitinación y sumoilación son reconocidas como un medio efectivo para controlar la estabilidad, localización y actividad de proteínas intracelulares (Helle, 2005). También regula procesos tales como la reparación del ADN (Pfander et al., 2005), el transporte nuclear (Stade et al., 2002), la regulación transcripcional (Ross et al., 2002), etc. Se han realizado experimentos de sumoilación *in vitro* de PCNA de levadura (Colby et al., 2006) en los cuales hay una variación aproximada de 20k D en el peso molecular de PCNA sumoilado con AtSUMO1 y AtSUMO2 (isoformas de SUMO de Arabidopsis), mientras que con AtSUMO3 la variación es ligeramente menor (~18kD), lo cual sugiere que las bandas de 52kD y 50kD encontradas en ET y CF pudieran

corresponder a la conjugación de dos isoformas diferentes de SUMO con PCNA. Además, el hecho de que la banda de 50kD sea más intensa en la CF en comparación con ET, es indicativo que dicha proteína se encuentra en mayor proporción en el núcleo y que su función esta relacionada directamente con el ADN. Se sabe que la sumoilación en la arginina 164 de PCNA de levadura tiene implicaciones directas en la tolerancia al daño del ADN y se puede detectar principalmente durante la fase S, independientemente del daño al ADN (Helle, 2005).

Al verificar la eficiencia de la extracción de la cromatina notamos que en la cromatina que esta entrecruzada por 30 min hay mayor cantidad de monómero de PCNA que en aquella que no ha sido entrecruzada y la proteína asociada a la cromatina extraída es mayor en embriones entrecruzados por 2h que en aquellos que no fueron entrecruzados (con una diferencia de 3.36 a 0.64 mg de proteína por g de material vegetal). Tal pareciera que la extracción es más eficaz cuando la cromatina se encuentra entre cruzada. Es posible que los lavados que se realizan para extraerla y purificarla pueda provocar la pérdida de proteínas que se encuentran unidas al ADN pero no lo suficientemente fuerte como para resistir la astringencia de los amortiguadores de extracción. Por otra parte, la pérdida de histona H3 en el sobrenadante S3 parece deberse a la misma técnica de extracción. Se ha reportado la utilización de una técnica similar en la que la cromatina es extraída utilizando gradientes de sacarosa (Hallberg, 1994), y otro grupo de trabajo, utilizando dicha técnica localizó a la Histona en el sobrenadante, atribuyendo esto al rompimiento del núcleo y la liberación de la cromatina hacia el citosol (Cesary, 1999).

Al comparar los métodos de fragmentación es claro que la acción de la nucleasa micrococcal es suficiente para obtener los fragmentos del tamaño necesario para realizar la inmunoprecipitación (800-200pb), además de que se evita la pérdida de la cromatina en el

proceso de sonicación por la generación de espuma o por aquella que se adhiere al sonicador, por ejemplo. Una ventaja adicional del uso de enzimas de digestión del ADN ha sido reportada en la literatura. Los fragmentos de ADN obtenidos de esta forma son más fácilmente ligados y utilizados para la generación de bibliotecas génicas, en comparación con los fragmentos obtenidos por sonicación (Huang, et. al., 2006).

Los inmunoprecipitados de la cromatina, una vez determinadas las condiciones óptimas para realizarlos, revelaron que un tiempo de entrecruzamiento menor a 1h tiene como consecuencia una recuperación mínima de PCNA en los inmunoprecipitados. Esto puede deberse a que la cantidad de proteína es menor en los extractos de cromatina fragmentada (CF) cuanto menor es el tiempo de entrecruzamiento. Esto puede observarse en la pérdida de proteína que se detecta al realizar la cuantificación de la proteína de los extractos de CF de embriones con diferentes tiempos de entrecruzamiento. Es probable que el proceso de extracción y fragmentación de la cromatina provoque la pérdida de proteína, y por lo tanto de PCNA, debido a la astringencia de los amortiguadores de extracción y a que la unión de las proteínas con el ADN no es una unión covalente. En cuanto a la cantidad de PCNA detectado en inmunoprecipitados de cromatina fragmentada entrecruzada por más de 1h, el hecho de que sea menor puede obedecer a que los epítopes de PCNA que son reconocidos por los anticuerpos se vean enmascarados por la unión covalente que se forma con las proteínas asociadas o por la misma modificación que genera el formaldehído en la proteína al unírsele covalentemente.

Finalmente, los inmunoprecipitados realizados con un anticuerpo contra PCNA revelan la presencia simultánea del ADN (ver fig 17), de PCNA (ver fig. 18) y de una proteína con un dominio PSTAIRE (ver fig. 19). Esto nos indica que la proteína con dominio PSTAIRE está unida a PCNA cuando PCNA está unida al ADN *in vivo*. Algunas

de las proteínas que tienen este dominio son las cinasas dependientes de ciclinas, y específicamente las Cdk-A. Dichas proteínas, asociadas a las ciclinas tipo D tienen actividad de cinasa contra histona H1 y contra la proteína del retinoblastoma (pRB) (Sánchez, 2004); son proteínas estables durante el ciclo celular, pero su actividad de cinasa tiene un pico en las transiciones G1/S y G2/M (Mironov et al. 1999), lo cual sugiere que es regulada por otra proteína. Se ha descrito que esa proteína es la ciclina D, dando estabilidad, localización y especificidad para fosforilar diferentes sustratos (Pines, 1995). El complejo ciclina D2-CdkA de Arabidopsis puede fosforilar a la proteína relacionada con RB (RBR) de maíz y su actividad de cinasa es mayor en la transición G1/S y decae de ahí en adelante (Boniotti y Gutiérrez, 2001). Así, los experimentos reportados indican que los complejos ciclina D-CdkA controlan la entrada de las células en G1 en plantas a través de la inactivación de la supresión del crecimiento producido por PBR (Gutiérrez et al., 2002). Aunque la unión de PCNA y Cdk-A, y la actividad cinasa asociada, han sido descritas en la progresión de la germinación de ejes embrionarios de maíz (Sánchez, 2004), esta asociación no se ha descrito *in vivo*, y tampoco cuando PCNA se encuentra unido al ADN. Por otra parte, en mamíferos se ha propuesto que la Cdk2, la cual se une establemente a PCNA de manera directa cuando PCNA se encuentra sobre el ADN, pudiera ejercer su actividad de cinasa sobre diferentes proteínas que se unieran transitoriamente a PCNA tales como FEN1 (flap endonuclease 1), la ligasa 1 y la DNA polimerasa delta (Koundrioukoff, et al., 2000; Prosperini, 2006). Sin embargo, en plantas no se ha descrito la unión directa de Cdk-A y PCNA. Al parecer dicha unión se lleva a cabo indirectamente por mediación de la ciclina D, la cual se une específicamente a PCNA (Xiong et al., 1992). Todo esto hace suponer que PCNA, interactuando directamente con una ciclina D y ésta, a su vez, con la Cdk-A, podría jugar un papel de puerto de llegada de diferentes proteínas para ser

fosforiladas o bien una deslizadera que guiara a los complejos ciclinas/cinasas a sus proteínas blanco a través del ADN.

Esta técnica puede arrojar datos muy interesantes, sin embargo, como se mencionó con anterioridad, el material vegetal utilizado difícilmente puede ser manipulado para ser utilizado en estudios de ciclo celular, no así los ejes embrionarios. Por esta razón quisimos saber si la cantidad de PCNA e Histona H3 -que nos remite a la cromatina- es similar en ejes embrionarios y en embriones de elote, para que así podamos establecer una equivalencia para realizar esta técnica en ejes embrionarios. Así, encontramos que la cantidad de PCNA e Histona H3 en ejes embrionarios es aproximadamente 3 o 4 veces mayor que en embriones de elote. Es probable que la cantidad de agua que existe en embriones provoque que la cantidad de proteína por gramo de material vegetal sea mínima; además, los ejes embrionarios entran a la fase S entre las 20 y 24h de germinación, y esto va acompañado de un aumento en la cantidad de PCNA (Sánchez, 2004), mientras que durante la embriogénesis PCNA va disminuyendo (Herrera, 2000). Esto implica una ventaja en cuanto a la obtención de material, ya que para realizar experimentos en ejes embrionarios necesitaríamos una cantidad menor de material vegetal para obtener cantidades similares de cromatina a las que manejamos en los experimentos realizados con embriones de elote.

VIII. CONCLUSIONES.

- Se establecieron las condiciones óptimas para la realización de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en embriones de maíz.
- Mediante ésta técnica se logró identificar una proteína con dominio PSTAIRE, muy probablemente una Cdk-A, que se halla unida a PCNA mientras PCNA se encuentra unido al ADN *in vivo*.
- Una proteína de ~50kD fue detectada con un anticuerpo anti -PCNA en un western blot de cromatina
- La aparición de una banda de ~174kD en un western blot de cromatina y extr acto celular, con un anticuerpo anti-PCNA al incrementar el tiempo de entrecruzamiento con formaldehído, revelan la posible formación de un dítrmero de PCNA de maíz *in vivo*, reportado previamente solo en células de humanos.

IX. PERSPECTIVAS.

- Realizar la técnica de CHIP en ejes embrionarios utilizando las condiciones óptimas determinadas y realizar las modificaciones necesarias.
- Aplicar esta técnica en un proceso fisiológico como la germinación de ejes embrionarios de maíz y determinar la asociación de PCNA y Cdk-A a lo largo del progreso de la germinación, así como el comportamiento del posible trímero y la proteína de ~50kD en extractos de cromatina entrecruzada.
- Mediante esta técnica detectar otras proteínas que estén unidas a PCNA y a la cromatina para ayudar a dilucidar la función que tiene PCNA en la germinación de maíz y el progreso del ciclo celular.
- Utilizar la electroforesis de doble dimensión para determinar si la proteína de ~174kD es realmente el ditrímero de PCNA.
- Utilizar anticuerpos anti-SUMO o anti-Ubiquitina para determinar si la proteína de ~50kD corresponde a una sumoilación o ubiquitinación de PCNA.

APÉNDICE I: DIAGRAMA METODOLÓGICO DE LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

Día 1.

Esterilizar:

- a) papel filtro para secar los embriones
- b) 2 círculos de papel filtro por cada caja petri
- c) 1 caja petri grande
- d) Agua destilada
- e) Puntas de 5 ml y 1 ml
- f) Medio de imbibición con sacarosa al 2%
- g) Obtener 2gr de embriones por experimento

Preparar por muestra:

- 20 ml de Amortiguador de Extracción 1 pesando y almacenando la sacarosa por separado
- 2 ml de Amortiguador de Extracción 2 pesando y almacenando la sacarosa por separado
- 500 µl de Amortiguador de Extracción 3 pesando y almacenando la sacarosa por separado
- 500 µl de Amortiguador de Extracción 4 pesando y almacenando la sacarosa por separado
- 500 µl de Amortiguador de MNasa
- 20 ml de Amortiguador de Dilución del CHIP

- Glicina 2.5 M
- 120µl de Proteina A-Agarosa equilibrada en Amortiguador de Dilución

Almacenar todo a 4°C

- 1) Esterilizar los ejes embrionarios
 - a) Se colocan en NaClO al 0.1% (0.166 ml en 10 ml) por 30 seg.
 - b) Lavarlos con H₂O estéril 5 veces por 30 seg.
 - c) Secar los ejes en papel filtro estéril por 15 min.
- 2) Incubar los embriones en 5 ml de medio de imbibición y sacarosa al 2% a 25°C por 18 hrs.

Día 2.

Entrecruzamiento de la cromatina:

- 1) Colocar los embriones cosechados en un tubo Falcon de 50 ml
- 2) Lavar con 40ml de H₂O destilada dos veces y remover la mayor cantidad de H₂O posible
- 3) Adicionar 36 ml de H₂O destilada + 1 ml de formaldehído al 37% y sumergir hasta el fondo todos los embriones con una gasa.
- 4) Colocar el tubo con los embriones en la caja de vacío y mantener el vacío por 15 min.
- 5) Cerrar el vacío lentamente y sacudir el tubo para remover las burbujas de aire.
- 6) Adicionar 2ml de glicina 2.5M para detener el entrecruzamiento. Poner al vacío por 10 minutos.

- 7) Cerrar el vacío lentamente y remover las burbujas de aire.
- 8) Desechar sobrenadante y lavar los embriones con 40 ml de H₂O destilada dos veces.
Remover la mayor cantidad de H₂O y secar en papel absorbente los embriones.

Preparación de la cromatina:

- 1) Pre-enfriar el mortero con nitrógeno líquido y adicionar 2 pequeñas cucharadas de arena para moler el material vegetal. Moler hasta obtener un polvo muy fino.
- 2) Con una espátula fría adicionar el polvo a 20 ml de Amortiguador de Extracción 1.
Mezclar en vortex y mantener a 4°C hasta que la solución este homogénea.
- 3) Centrifugar a 30g por 3 min.
- 4) Filtrar el extracto con una gasa y colocar el líquido (**ET**) en un tubo Falcon frío y nuevo. Exprimir todo el líquido que se mantenga en la gasa.
- 5) Centrifugar el extracto a 1,800g por 20 min a 4°C
- 6) Cuidadosamente separar el sobrenadante (**S1**) y resuspender el precipitado en 1 ml de Amortiguador de Extracción 2 (**F1**) con la pipeta y transferir la solución resuspendida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 7) Centrifugar a 20,000g por 30 minutos a 4°C
- 8) Remover el sobrenadante (**S2**) y resuspender el precipitado (**F2**) en 500 µl de Amortiguador de Extracción 3 con la pipeta.
- 9) Colocar 500 µl del Amortiguador de Extracción 4 al tubo de la ultracentrífuga y agregar cuidadosamente por las paredes del tubo la solución del paso 8).
- 10) Centrifugar a 124,000g por 1 hr a 4°C

- 11) Remover sobrenadante (**S3**) y resuspender el precipitado en 500 μ l de Amortiguador de Extracción 2 (**F3**). Resuspender con la pipeta y con un vortex.
- 12) Centrifugar a 20,000g por 15min.
- 13) Resuspender el precipitado (**CI**) en 500 μ l Amortiguador de MNasa
- 14) Tomar 10 μ l de CI para correr en gel de Agarosa
- 15) Colocar 10u de nucleasa micrococcal e incubar a 37°C por 30min.
- 16) Agregar 54 μ l de EGTA 50mM, 9 μ l de PMSF 100mM, 180 μ l de SDS al 5%, 90 μ l de NaCl 2M y 90 μ l de inhibidor de proteasas 10X.
- 17) Centrifugar a 20,000g por 10 min a 4°C. Colocar el sobrenadante en un tubo Eppendorf limpio (**CF**) y guardar el precipitado (**CHMW**).
- 18) Tomar 10 μ l de CF para correr en un gel de agarosa.
- 19) Con las muestras del paso 14) y 18) correr un gel de agarosa. En las muestras sonicadas el DNA debe estar más corrido e intenso comparado con las muestras no tratadas, el rango debe estar entre 200-2000pb y la mayor parte debe estar entre las 500pb.
 - a) Agregar 500 μ l de Amortiguador de Reversión e incubar ambos tubos a 65°C toda la noche (12hrs).

Dia 3

- b) Agregar a la muestra de ADN 10 μ l de EDTA 0.5M, 20 μ l de Tris-HCl pH 8.0 1M y con 20mg/ml de proteinasa K, e incubar durante 1 hora a 37°C
- c) Agregar 500 μ l de una mezcla cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (1:1:1), agitar la mezcla por 5 min en un roscicero y eliminar la fracción orgánica.

- d) Precipitar con acetato de sodio (50µl, 3M), glicógeno (20µg) y 2 volúmenes de etanol al 100%, centrifugando a 13000rpm.
 - e) El pellet es lavado con 500µl de etanol al 70%.
 - f) Correr en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio
- 20) Transferir 1 alícuota de 50µl de la solución de cromatina a tubos Eppendorf limpios y agregar 450µl del Amortiguador de Dilución del CHIP. Por cada muestra realizar esta dilución por triplicado en tubos diferentes.
- 21) Adicionar 4µl de anticuerpo anti-PCNA a dos tubos. Rotar durante toda la noche a 4° C en un roscicero.
- Preparar y almacenar a 4°C:
- a) 5 ml de Amortiguador de Baja Salinidad
 - b) 5 ml de Amortiguador de Alta Salinidad
 - c) 5 ml de Amortiguador de LiCl
 - d) 7 ml de Amortiguador TE
 - e) 2.5 ml de Amortiguador de Reversión

Día 4

Lavados y elusión de los complejo inmunes

1. Adicionar 40 µl de Proteína A-Agarosa por tubo e incubar mínimo por 4hrs a 4°C agitando en un roscicero. Incubar 15 min. a temperatura ambiente.
2. Mantener todo el tiempo los tubos en el cuarto frío en un roscicero.
3. Centrifugar todos los tubos Eppendorf a 5000 rpm por 30 segundos para colectar las perlas y desechar el sobrenadante.

4. Adicionar lentamente 0.5 ml de Amortiguador de Baja Salinidad por tubo. Rotar por 5 min a temperatura ambiente en el roscicero.
5. Centrifugar a 3,000g por 30 segundos para coleccionar las perlas y descartar el sobrenadante.
6. Adicionar 0.5 ml de Amortiguador de Alta Salinidad por tubo. Rotar por 5 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 3,000g por 30 segundos para coleccionar las perlas y descartar el sobrenadante.
8. Adicionar 0.5 ml de Amortiguador de LiCl por tubo. Rotar por 5 min.
9. Centrifugar a 3,000g por 30 segundos para coleccionar las perlas y descartar el sobrenadante.
10. Adicionar 0.5 ml de Amortiguador TE por tubo. Rotar por 5 min.
11. Centrifugar a 3,000g por 30 segundos para coleccionar las perlas y descartar el sobrenadante.
12. Repetir el lavado con Amortiguador TE. Centrifugar a 3,000 g por 30 segundos para coleccionar las perlas y descartar el sobrenadante.
13. Eluir los complejos inmunes adicionando 250 µl del Amortiguador de Reversion.
14. Incubar a 65°C por 15 minutos. Utilizar brevemente el vortex para mezclar una vez hayan pasado 5 o 10 min. Centrifugar a 20,000 g por 30 segundos y transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio de 1.5ml.
15. Repetir la elusion con 250 µl del Amortiguador de Elusion y combinar los dos eluidos.

Reversion del Entrecruzamiento

- 1) Incubar por 24hrs a 65°C.

Preparar:

- i) 15 ml de Acetona

Dejar reposar a -20°C

Día 5

Obtención de las proteínas.

- 1) Adicionar TCA al 100% en una cantidad tal que la concentración final sea 20%.
- 2) Incubar por 30 min en hielo.
- 3) Centrifugar a 20,000g por 30min.
- 4) Lavar con 500 μl de acetona fría, resuspendiendo el pellet y centrifugar a 20,000 g por 15min.
- 5) Resuspender el pellet en 500 μl de acetona fría y almacenar a 4°C o continuar con el paso 6.

Día 6

- 6) Centrifugar a 20,000g por 15 minutos y secarlo por completo con aire seco.
- 7) Disolver el precipitado en Amortiguador de carga para Electroforesis en SDS - PAGE.
- 8) Desnaturalizar las proteínas a 92°C por 7 minutos y cargar el gel para la Electroforesis y Western Blot.
- 9) Colocar control de CF (20 μl) y anticuerpo anti-PCNA (4 μl).

APÉNDICE II. SOLUCIONES UTILIZADAS:

Amortiguador de Extracción 1 (20 ml)

0.4M Sacarosa (2.7384g de sacarosa)
10mM Tris-HCl pH 8.0 (200µl Tris-HCl 1M)
10 mM MgCl₂ (2 ml MgCl₂ 100mM)
5mM β-mercaptoetanol (2ml β-mercapto 50mM)
Inhibidor de proteasas (2ml inh. 10X)
1mM PMSF (200µl de PMSF 100mM)

Amortiguador de Extracción 2 (1.5ml)

0.25M Sacarosa (0.128g sacarosa)
10mM Tris-HCl pH 8.0 (15µl Tris-HCl 1M)
10mM MgCl₂ (150µl MgCl₂ 100mM)
1% Triton X-100 (300µl Triton X-100 5%)
5mM β-mercaptoetanol (150µl β-mercapt 50mM)
Inhibidor de proteasas (150µl inh. 10X)
1mM PMSF (15µl de PMSF 100mM)

Amortiguador de Extracción 3 (0.5ml)

1.7M Sacarosa (0.291g sacarosa)
10mM Tris-HCl pH 8.0 (5µl Tris-HCl 1M)
2mM MgCl₂ (10µl MgCl₂ 100mM)
0.15% Triton X-100 (15µl Triton X-100 5%)
5mM β-mercaptoetanol (50µl β-mercapto 50mM)
Inhibidor de proteasas (50µl inh. 10X)
1mM PMSF (5µl de PMSF 100mM)

Amortiguador de Extracción 4 (0.5ml)

2.5M Sacarosa (0.426g sacarosa)
10mM Tris-HCl pH 8.0 (5µl Tris-HCl 1M)
2mM MgCl₂ (10µl MgCl₂ 100mM)
0.15% Triton X-100 (15µl Triton X-100 5%)
5mM β-mercaptoetanol (50µl β-mercaptoetanol 50mM)
Inhibidor de proteasas (50µl inh. 10X)
1mM PMSF (5µl de PMSF 100mM)

Amortiguador de Lisis Nuclear (10ml)

50mM Tris-HCl pH 8.0 (500µl Tris-HCl 1M)
10mM EDTA (1ml EDTA 100mM)
1% SDS (2ml SDS 5%)
Inhibidor de Proteasas (1ml inh. 10X)
1mM PMSF (0.5ml PMSF 100mM)

Amortiguador de MNasa (0.5ml)

10mM Tris-HCl pH 8.0 (5µl Tris-HCl 1M)
10mM NaCl (2.5µl NaCl 2M)
3mM MgCl₂ (15µl MgCl₂ 100mM)
1mM CaCl₂ (5µl CaCl₂ 100mM)
4% igepal (20µl gel pal 100%)
1mM PMSF (5µl PMSF 100mM)

Amortiguador de Dilución del CHIP (20ml)

1.1% Triton X-100 (4.4ml Triton 5%)
1.2 mM EDTA (240µl EDTA 100mM)
16.7 mM Tris-HCl pH 8.0 (334µl Tris-HCl 1M)
167mM NaCl (1.67ml NaCl 2M)

LiCl Wash Amortiguador (100ml)

0.25M LiCl (1.0598g LiCl)
1% igepal (1ml gelpal)
1% deoxicolato de sodio (1g deoxicolato de Na)
1mM EDTA (1ml EDTA 100mM)
10mM Tris-HCl pH 8.0 (1ml Tris-HCl 1M)

Low Salt Wash Amortiguador (100ml)

150mM NaCl (7.5ml NaCl 2M)
0.1% SDS (2ml SDS 5%)
1% Triton X-100 (20ml Triton 5%)
2mM EDTA (2ml EDTA 100mM)
20mM Tris-HCl pH 8.0 (2ml Tris-HCl 1M)

High Salt Wash Amortiguador (100ml)

500mM NaCl (25ml NaCl 2M)
0.1% SDS (2ml SDS 5%)
1% Triton X-100 (20ml Triton 5%)
2mM EDTA (2ml EDTA 100mM)
20mM Tris-HCl pH 8.0 (2ml Tris-HCl 1M)

Amortiguador de Reversión (100ml)

25mM Tris-HCl pH 7.5
10mM EDTA
0.5% SDS

Amortiguador TE 10X (500ml)

100mM Tris-HCl pH 8.0 (50ml Tris 1M)
10mM EDTA (50ml EDTA 0.1M)

PBS 10X (500ml)

NaCl (40g)
KCl (1g)
Na₂HPO₄ anh. (7.2g)
NaH₂PO₄.H₂O (1.4g)

TETN250 4X (1L)

Tris-HCl pH 8.0 100mM (100ml Tris 1M)
EDTA 20mM (40ml EDTA 0.5M)
NaCl 1M (58.44g NaCl)
Tritón-X100 al 4% (40ml Tritón X100)

Gel de Agarosa al 1%

0.3g de Agarosa
Bromuro de Etidio (1.33µl)
c.b.p. 30 ml de TBE

Amortiguador de Transferencia (1L)

Glicina 0.192M (14.4g)
Tris-HCl 1M (pH 8.3) (25ml Tris 1M)
Metanol (200ml)
H₂O c.b.p 1000ml

Amortiguador de Electrodo 10X (1L)

Tris-HCl 250mM (30.32g Tris)
Glicina 1.92M (144g glicina)
SDS al 1% (10g SDS)
H₂O c.b.p. 1000ml

Amortiguador del Gel Apilador 2X pH 6.8 (100ml)

Tris-HCl (7.88g)
SDS (0.4g)

Amortiguador del gel separador 2X pH 8.8 (100ml)

Tris-HCl (23.64g)
SDS (0.4g)

Gel Separador de Acrilamida al 12% (x2 geles; 20ml)

Amortiguador pH 8.8	5ml
Acrilamida 30%	8ml
TEMED	20µl
Persulfato 20%	150µl
H ₂ O	6.83ml

Amortiguador de Extracción del extracto crudo

Tris HCl pH 7.5	25mM
MgCl ₂	15mM
NaCl	75mM
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5mM
DTT	1mM
Tritón X-100	2%
Sacarosa	250mM

Amortiguador de Imbibición

Tris-HCl pH 7.6	50mM
KCl	50mM
MgCl ₂	10mM
Sacarosa	2%

Gel Apilador de Acrilamida al 4% (x2 geles; 20ml)

Amortiguador pH 6.8	6ml
Acrilamida 30%	0.8ml
TEMED	10µl

Persulfato 20%	40µl
H ₂ O	3.66ml

Solución de Bloqueo (50ml)

2.5g de Leche descremada (Svelty)
0.9ml Tween al 50%
c.b.p. 50ml de PBS

Anticuerpo 1° (αPCNA 1:2000) (5ml)

2.5µl αPCNA
5ml de solución bloqueadora

Anticuerpo 1° (αPSTAIR 1:500) (5ml)

10µl αPSTAIR
5ml de solución bloqueadora
H₂O c.b.p. 100ml

Anticuerpo 1° (αH3 1:1000) (5ml)

5µl αH3
5ml de solución bloqueadora

Anticuerpo 2° (1:5000) (10ml)

1µl anticuerpo secundario
10ml de solución bloqueadora

APÉNDICE III

Reactivos Químicos.

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

El cloruro de sodio, el cloruro de magnesio, el cloruro de litio, el ácido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA) , el fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF), el tween, el tritón X-100, el persulfato de sodio, el fosfato mono-hidrogenado de sodio, el fosfato di-hidrogenado de sodio, el hidróxido de sodio y la sacarosa se adquirieron de J.T. Baker o MERCK. El ditiotreitól (DTT) se obtuvo de Research Organics.

La acrilamida, la metilén bis-acrilamida, el Tris base, se consiguieron de GIBCO-BRL Life Technologies Inc.

La nucleasa micrococal de *Staphylococcus aureus*, el glicógeno de mejillones, el igelpal, el deoxicolato de sodio, β -mercaptoetanol, el bromuro de etidio, el ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetileter)-tetra-acético (EGTA), y el TEMED se adquirieron de SIGMA-ALDRICH Chemicals. La proteínas a K de *Tritirachium album* se adquirió de Fluka.

La proteína A agarosa y las tabletas de inhibidores de proteasas (Complete™) fueron adquiridos de Roche.

El paquete ECL Western-blotting, la película fotográfica Hyperfilm y el anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa fueron de Amersham Pharmacia Biotech.

El marcador de peso molecular de proteínas se obtuvo de BIO -RAD, el del ADN de Invitrogen.

Las membranas de Immobilon PVDF fueron adquiridas de Millipore. La leche descremada Svelty de Nestle.

Los anticuerpos policlonales anti-PSTAIRE y anti-histona H3 fueron de Santa Cruz Biotech.

Los tubos tipo Eppendorf y las puntas de plástico para micropipeta, se adquirieron de SARSTEDT.

Equipo.

Se usaron los siguientes equipos: autoclave de AESA, vortex -Genie2 de Scientific Industries, Inc., horno de marca Lab-line Instrument, Inc., la incubadora es de Thermolyne. Las micropipetas de marca GILSON; la centrífuga de velocidad media y la microcentrifuga de marca Sorvall-Dupont; los aparatos de electroforesis vertical y el secador de geles son de BIO-RAD y las fuentes de poder, de marca GIBCO-BRL Life Technologies, Inc.; la campana de flujo laminar horizontal, de marca NuAire. El Ultrasonicador modelo Sonic Dismembrator es de Fisher Scientific. El sistema de transferencia en seco, “Transblot apparatus”, de LKB Bromma. La balanza es Mettler PK300

APÉNDICE IV. COMPARACIÓN DE HISTONA H3 DE MAÍZ CON LA HISTONA H3 DE HUMANO.

Histona H3 de Zea mays (136 aa):

1 martkqtark stggkprkq latkaarksa patggvkkph rfrpgtval r eirkyqkste

61 llirklpfqr lvreiaqdfk tdlrfqssav aalqeaeeay lvglfedtnl caihakrvti

121 mpkdiqlarr irgera

Chaubet,N., Philipps,G., Chaboute,M.-E., Ehling,M. and Gigot,C. (1986) Nucleotide sequences of two corn histone H3 genes. Genomic organization of the corn histone H3 and H4 genes Plant Mol. Biol. 6, 253-263

Histona H3 de Humano (136 aa):

1 martkqtark stggkprkq latkaarksa patggvkkph ryrpgtvalr eirryqkste

61 llirklpfqr lvreiaqdfk tdlrfqssav malqeaseay lvglfedtnl caihakrvti

121 mpkdiqlarr irgera

Green,L., Van Antwerpen,R., Stein,J., Stein,G., Tripputi,P., Emanuel,B., Selden,J. and Croce,C. (1984) A major human histone gene cluster on the long arm of chromosome 1 Science 226 (4676), 838-840

Idénticos = 132/136 (97%), Positivos = 135/136 (99%)

Query: 1

MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTE 60

MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHR+RPGTVALREIR+YQKSTE

Sbjct: 1

MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRFRPGTVALREIRKYQKSTE 60

Query: 61

LLIRKLFPQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEASEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTI120

LLIRKLFPQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAV ALQEA+EAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTI

Sbjct: 61

LLIRKLFPQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVAALQEAAEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTI 120

Query: 121 MPKDIQLARRIRGERA 136

MPKDIQLARRIRGERA

Sbjct: 121 MPKDIQLARRIRGERA 136

REFERENCIAS.

- Boniotti, M. Gutierrez, C. (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J.* 28: 341–350.
- Boniotti MB, Gutierrez (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *C. Plant J.*;28(3):341-50.
- Bauer GA, Burgers PM. (1988). Protein-protein interactions of yeast DNA polymerase III with mammalian and yeast proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Biochim Biophys Acta.* 20;951(2-3):274-9.
- Bewley, J.D., Black, M., (1994). *Physiology of Development and Germination. Seeds 2nd Ed,* Plenum Press, New York NY ISBN 0-306-44748-7.
- Byrnes JJ, Downey KM, Black VL, So AG. (1976). A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta. *Biochemistry.* 29;15(13):2817 -23.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brutlag, D., Schlehuber, C., and Bonner, J. (1969). *Biochemistry* 8, 3214 -3218
- Burgers PM. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem.* Nov 25;266(33):22698 -706
- Cezary Worjcik (1999) Proteasome activator subunit PA28a and related Ki antigen (PA28g) are absent from the nuclear fraction purified by sucrose gradient centrifugation *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 273±276

- Coenen, C. And Lomax, T.L. (1997). Auxin -cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci.* 2: 351 -356
- Colby T, Matthäi A, Boeckelmann A, Stuible HP. (2006). SUMO -conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from Arabidopsis. *Plant Physiol. Sep*;142(1):318 -32.
- Burgers PM. (1991). Saccharomyces cerevisiae replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem.* 25;266(33):22698 -706.
- Chuang, L. S., Ian, H. I., Koh, T. W., Ng, H. H., Xu, G. and Li, B. F. (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277, 1996-2000.
- Clark, A. B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R. K. and Kunkel, T. A. (2000). Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2 -MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 36498- 36501.
- Dedon, P.C., Soultz, J.A., Allis, C.D. and Gorovsky, M.A. (1991). *Mol. Cell. Biol.* 11, 1729 -1733.
- Dua, R., Levy, D. L., Li, C. M., Snow, P. M. and Campbell, J. L. (2002). In vivo reconstitution of Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase epsilon in insect cells. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 7889-7896.
- Ducoux, M., Urbach, S., Baldacci, G., Hubscher, U., Koundrioukoff, S., Christensen, J. and Hughes, P. (2001). Mediation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) -dependent DNA replication through a conserved p21(Cip1) -like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* 276, 49258-49266.
- E. Hallberg, (1994). Preparation of nuclei and nuclear envelopes: identification of an integral membrane protein unique to the nuclear envelope, in : J.E. Celis (Ed.), *Cell Biology*, vol. 1, Academic Press, San Diego, CA, 1994, pp. 613± 618.

- Eissenberg, J. C., Ayyagari, R., Gomes, X. V. and Burgers, P. M. (1997). Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase delta and DNA polymerase epsilon. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6367-6378.
- Ellison V, Stillman B. (1998). Reconstitution of recombinant human replication factor C (RFC) and identification of an RFC subcomplex possessing DNA-dependent ATPase activity. *J Biol Chem.* Mar 6;273(10):5979-87.
- Gary, R., Ludwig, D. L., Cornelius, H. L., MacInnes, M. A. and Park, M.S. (1997). The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.* 272, 24522-24529.
- Gui Ying LI, Miao XING, Bo HU (2004). A PSTAIRE CDK-like protein localizes in nuclei and cytoplasm of *Physarum polycephalum* and functions in the mitosis. *Cell research*; 14 (2): 169-175
- Gilmour, D.S., and Lis, J.T. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4275 -4279.
- Gilmour, D.S., Pflugfelder, G., Wang, J.C., and Lis, J.T. 1991. *Cell* 44, 401 -407.
- Giovanni Maga y Ulrich Hübscher. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 116, 3051 -3060
- Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Castellano MM, del Pozo JC. (2002). G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 480 -486.
- Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246: 629-634.
- Herrera I, Sanchez MP, Molina J, Plasencia J, Vázquez -Ramos JM. (2000). Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: regulation by

phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum* 110, 127–134.

Helle D. Ulrich (2005). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest *TRENDS in Cell Biology* Vol.15 No.10 October

Huang JM, Kim JD, Kim H, Kim J. (2006). An improved cloning strategy for chromatin-immunoprecipitation-derived DNA fragments. *Anal Biochem.* Sep 1;356(1):145 -7.

Ilyin, Y.V., and Georgiev, G.P. 1969. *J. Mol. Biol.* 41, 299 -303.

Tsurimoto T, Stillman B. (1990). Functions of replication factor C and proliferating -cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Feb 87(3):1023 -7.

Jackson, V. 1978. *Cell* 15, 945 -954

Jackson V, Chalkley R. (1974) The cytoplasmic estradiol receptors of bovine uterus. Their occurrence, interconversion, and binding properties. *J Biol Chem.* 1974 Ma r 10;249(5):1627-36.

Jackson, V. and Chalkley. R. 1981 *Cell* 23, 121 -134.

Jacobs, T. W. 1995. Cell Cycle control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 317 -339

Jennifer M. Huang, Jeong Do Kim, Hana Kim and Joomyeong Kim. (2006). An improved cloning strategy for chromatin-immunoprecipitation – derived DNA fragmets. *Analytical Biochemistry* Volume 356, Issue 1, 145 -147.

Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Herberle -Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., Renaudin, J.P. (2000). CDK-related protein kinasas in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 607 -620.

Jougenheimer, R.W. (1976). *Corn. Improvement, seed production and uses.* Wiley and Sons, U.S.A.

- Kelman Z, Hurwitz J. (1998). Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci.* 1998 Jul;23(7):236-8.
- Kelman, Z. and O'Donnell, M. (1995). Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Res.* 23, 3613-3620.
- Kenny MK, Lee SH, Hurwitz J. (1989) Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;86(24):9757 -61.
- Kornberg A. (1988). DNA replication. *Biochim Biophys Acta.* Dec 20;951(2-3):235-9. Review.
- Koundrioukoff, S., Jonsson, Z. O., Hasan, S., de Jong, R. N., van der Vliet, P. C., Hottiger, M. O. and Hubscher, 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.
- Kozlowski, T.T., Gunn, C.R. (1972). Importance and Characteristics, *Seed Biology: Physiological Ecology Series*, Academic Press, Inc., U.S.A., p. 1-7, 228-251.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Levin, D. S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. and Tomkinson, A. E. (1997). An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12863-12868.
- Li X, Li J, Harrington J, Lieber MR, Burgers PM. (1995). Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN -1 by proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* Sep 22;270(38):22109-12.
- Maga G, Hubscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.* 2003 Aug 1;116(Pt 15):3051 -60.

- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*. May 24 -30;309(5966):374-6.
- Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. (1987). Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Embo J.*; Mar 6(3):637-42
- Mayer, A.M. Poljakoff-Mayber. A. (1984). *The germination of seeds*. 4th ed. Pergamon Press, Inglaterra.
- Meyerowitz, E.M. (1997). Genetic control of cell division pattern in developing plants. *Cell*. 88: 299-308.
- Mironov V, de Veylder L, Van Montagu M, Inze´ D. (1999). Cyclin dependent kinases and cell division in plants: the nexus. *The Plant Cell* 11, 509 –521.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol.*; Dec 121(6):2228-34.
- Moggs, J. G., Grandi, P., Quivy, J. P., Jonsson, Z. O., Hubscher, U., Becker, P. B. and Almouzni, G. (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 20, 1206-1218.
- Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A. (1999). Tobacco retinoblastoma -related protein phosphorylated by a distinct cyclindependent kinase co mplex with cdc2/cyclin D in vitro. *The Plant Journal* 18, 243–252.
- O’Neill, L.P. and B.M. Turner. (2003). Immunoprecipitation of native chromatin: NchIP. *Methods* 31:76-82
- Pagano M, Theodoras AM, Tam SW, Draetta GF. (1994). Cyclin D1 -mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev* 1994 Jul 15;8(14):1627 -39
- Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S (2005) SUMO modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436: 428 –433

- Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin - dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J.* Jun 15;308 (Pt 3):697-711.
- Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase -delta auxiliary protein. *Nature.* Apr 2-8;326(6112):517-20.
- Prelich G, Stillman B. (1988). Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell.* Apr 8;53(1):117-26.
- Prosperi E. (2006). The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work. *Faseb J.* May 20(7):833-7.
- Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, Zeitlinger J, Schreiber J, Hannett N, Kanin E, Volkert TL, Wilson CJ, Bell SP, Young RA (2000) Genome -wide location and function of DNA binding proteins. *Science.* 2000 Dec 22;290(5500):2306 -9.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Feeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M. Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., Murray, J.A.H. (1996). Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* 32 : 1003-1018.
- Ross S, Best JL, Zon LI, Gill G (2002) SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10: 831 –842
- Sánchez MP, Torres A, Boniotti M.B., Gutiérrez C, Vázquez -Ramos J.M. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biology* 50, 167–175.
- Sánchez M. P., Gurusinghe S. H., Bradford K. J., Vazquez -Ramos J. M. (2004). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine

and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 412, pp. 515–523

Stéphane Koundrioukoff, Zophonías O. Jónsson, Sameez Hasan, Rob N. de Jong, Peter C. van der Vliet, Michael O. Hottiger, and Ulrich Hübscher. (2000). A Direct Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Cdk2 Targets PCNA -interacting Proteins for Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 30 Issue of july 28, pp. 22882-22887.

Sherr CJ (1994) Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells*. 1994;12 Suppl 1:47-55; discussion55-7.

Shivji, K. K., Kenny, M. K. and Wood, R. D. (1992). Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69, 367-374.

Solomon, M.J., Larsen, P.L., and Varshavsky, A. 1988. *Cell*. 53, 937 -947

Solomon MJ, Varshavsky A. (1985). Formaldehyde -mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Oct;82(19):6470 -4.

Spencer, V.A., J.M. Sun, L. Li, and J.R. Davie. (2003) Chromatin Immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31: 67-75

Stade K, Vogel F, Schwienhorst I, Meusser B, Volkwein C, Nentwig B, Dohmen RJ, Sommer T (2002) A lack of SUMO conjugation affects cNLS -dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem* 277: 49554–49561

Stanislav N. Naryzhny, Helen Zhao, and Hoyun Lee (2005). Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) May Function as a Double Homotrimer Complex in the Mammalian Cell Vol. 280, No. 14, Issue of April 8, pp. 13888–13894,

Suzuka I, Daidoji H, Matsuoka M, Kadowaki K, Takasaki Y, Nakane PK, Moriuchi T. (1989). Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is

present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; May 86(9):3189-93.

Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase -delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem.* Sep 15;261(26):12310 -6.

Thomas Colby, Anett Matthaⁱⁱ, Astrid Boeckelmann, and Hans -Peter Stuibl. (2006). SUMO-Conjugating and SUMO-Deconjugating Enzymes from Arabidopsis. *Plant Physiology*, Sep, Vol. 142, pp. 318–332,

Tsurimoto T, Melendy T, Stillman B. (1990). Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature.* Aug 9; 346(6284):534-9.

Tsurimoto T, Stillman B. (1989) Multiple replication factors augment DNA synthesis by the two eukaryotic DNA polymerases, alpha and delta. *Embo J.* 1;8(12):3883 -9.

Tsurimoto T, Stillman B. (1990) Functions of replication factor C and proliferating -cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Feb 87(3):1023-7.

Turchi JJ, Huang L, Murante RS, Kim Y, Bambara RA. (1994). Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;91(21):9803 -7.

Umar, A., Buermeyer, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Lis kay, R. M. and Kunkel, T. A. (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87, 65-73.

Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, A. G., Hoffman, B. and Liebermann, D. A. (2000). Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45 -mediated negative growth control. *J. Biol. Chem.* 275, 16810- 16819.

- Waga S, Stillman B. (1994). Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature*. May 19;369(6477):207 -12.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. (1994b). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.
- Warbrick, E. (1998) PCNA binding through a conserved motif. *BioEssays* **20**,195-199
- Weinmann AS, Farnham PJ. (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods*. Jan;26(1):37 -47.
- Wold MS, Kelly T. (1988). Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr;85(8):2523-7.
- Wu X, Li J, Li X, Hsieh CL, Burgers PM, Lieber MR. (1996). Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA. *Nucleic Acids Res*. Jun 1;24(11):2036-43.
- Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71, 505-514.
- Yamaguchi M, Fabian T, Sauter M, Bhalerao RP, Schrader J, Sandberg G, Umeda M, Uchimiya H. (2000) Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J*. Oct;24(1):11 -20. Erratum in: *Plant J* 2001 Feb;25(4):473.
- Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol. Biol. Cell* 4, 897-906.
- Zhang, P., Mo, J. Y., Perez, A., Leon, A., Liu, L., Mazloun, N., Xu, H. and Lee, M. Y. (1999). Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* 274, 26647-26653.

Zlotkin T, Kaufmann G, Jiang Y, Lee MY, Uitto L, Syvaaja J, Dornreiter I, Fanning E, Nathaniel T. (1996). DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40 - but not cellular-DNA replication. *Embo J.* May 1;15(9):2298-305.

Zhou, J.-Q., He, H., Downey, K. M. and So, A. G. (1997). The small subunit is required for functional interaction of DNA polymerase δ with the proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res.* 25, 1094-1099.