



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS DEL CICLO  
CELULAR EN MAÍZ.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**DONAJI DEL CARMEN MAYORAL REYES.**

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2009.**



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:** Profesor: JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS.

**VOCAL:** Profesor: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES.

**SECRETARIO:** Profesor: MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS.

**1er. SUPLENTE:** Profesor: JOSE IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ.

**2° SUPLENTE:** Profesor: ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 114 EDIFICIO E FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS.**

(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**DR. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ.**

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE :**

**DONAJI DEL CARMEN MAYORAL REYES.**

(nombre y firma )



*Dedico esta tesis a las dos mujeres que me formaron, inspiraron y apoyaron incondicionalmente. Angelina Reyes Harris y Olga Stella Harris Martínez. Gracias a ustedes soy.*

## Agradezco:

Al Dr. Jorge Vázquez por enseñarme a hacer ciencia.

A Pilo por sus consejos, apoyo e infinita paciencia.

A mis compañeros del L-114: Silvia Karina, Luis, Carlos, Manuel, Yaddith, Tavo, Miguel, Dago, German y Lupita.

A mi hermano por su apoyo y consejos.

A mi madrina, que es como una tía para mi y siempre procuró que no me faltara nada.

A mi familia, especialmente a mi tío Héctor, mi tía Laura y mis abuelos.

A Héctor, el amor de mi vida por estar a mi lado.

A todos mis maestros por impulsarme y contagiarme el amor por la química.

A mis amigos de la FQ: Andrea, Cristián, Silvia, Karla, Xóchitl, Mona, Chris, Neus, Ana, Erica, Alicia, Elivier, Pepe, Dan, Erick, Alex, Ro, Yecco, Pavel, Adrián, Humberto, Mau y Arturo.



Al Comité Educativo de la Fundación TELMEX quienes siempre creyeron en mí y me apoyaron económicamente durante mi carrera.



Al CONACYT por otorgarme una beca como Asistente de Investigador, durante en desarrollo del proyecto.

Al apoyo económico brindado por el Proyecto PAPIIT 202002 para la realización del proyecto.

## **Abreviaturas.**

ATP: Adenosin trifosfato

CAK: Cinasa activadora de ciclinas

CDK: Cinasa dependiente de Ciclina

CHX: Cicloheximida

Cyc: Ciclina

DNA: Ácido desoxiribonucleico

DTT: Ditionitrosol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GST: Glutación S transferasa

IgG: Inmunoglobulina tipo G

IPTG: Isopropil-D-b-tiogalactopiranosido

kDa: Kilo Dalton

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: pares de bases

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa.

SCF: Cinasa de fase S asociada a proteína de caja F

TEMED: N,N,N,N tetrametiloetilendiamina

# Índice.

I. Introducción.....	1
• Anatomía del maíz.....	1
• Germinación.....	2
• Ciclo celular.....	3
• Ciclo celular en plantas.....	6
II. Antecedentes.....	10
III. Hipótesis.....	13
IV. Objetivos.....	13
• Objetivo General.....	13
• Objetivos Particulares.....	13
V. Materiales y Métodos.....	14
• Materiales.....	14
• Métodos.....	14
VI. Resultados.....	22
• Clonación de un fragmento del gen correspondiente a la ciclina D5;3a.....	22
• Sobreexpresión del péptido codificado en la secuencia seleccionada de la ciclina D5;3.....	24
• Obtención de anticuerpos contra ciclina D5;3.....	28
• Estudio de la estabilidad de la ciclina D5;3 y otras proteínas del ciclo celular.....	28
VII. Discusión.....	32
VIII. Conclusiones.....	35
IX. Referencias.....	36

## I. Introducción.

“Los dioses Piltzintecuhtli y Xochipilli, tuvieron por hijo a Cinteotl. El dios hijo [...] se hundió en la tierra para producir diferentes vegetales útiles al hombre. Así, de sus cabellos salió el algodón; de una oreja la planta llamada huauhtzontli; de la nariz la chía; de los dedos, los camotes y del resto del cuerpo, otros muchos frutos. A su creación más destacada debe el dios su nombre principal, Cinteotl (el dios mazorca)” Cosmología Azteca.

Las semillas son componentes básicos de la alimentación a nivel mundial. Los cereales, como el maíz, representan por sí solos cerca del 90% de las semillas cultivadas y aportan más de la mitad de la ingesta energética *per capita* (Bewley, 1997). Para la agricultura, la germinación es uno de los temas de mayor importancia, ya que la producción de los distintos cereales depende de este proceso. La semilla contiene un embrión equipado estructural y fisiológicamente para formar un nuevo organismo autótrofo y autosuficiente.

- Anatomía de la semilla de maíz.

El modelo de trabajo dentro del presente proyecto fue el maíz; la semilla consta de las siguientes estructuras principales:

**Pericarpio o cáscara**, capa delgada que encierra a la semilla.

**Endospermo**, estructura que contiene el material de reserva que se moviliza para aportar energía durante la germinación.

**Escutelo**, estructura que cubre y protege al eje embrionario.

**Eje embrionario**, parte de la semilla que cuenta con la información para desarrollar una nueva planta de maíz, se divide a su vez en: radícula y plúmula.

**Pedúnculo**, raballo que sostiene a la semilla, uniéndola a la mazorca. (Bewley and Black, 1994)

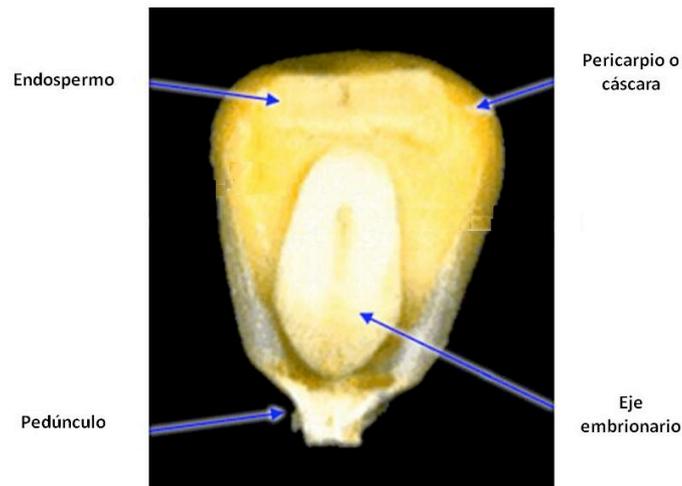


Figura 1: Anatomía de la semilla de maíz.

- Germinación.

Por definición, la germinación comprende una serie de eventos que comienzan con el ingreso de agua a una semilla seca y quiescente (imbibición) y terminan con la elongación del eje embrionario (Bewley and Black, 1994).

Durante la imbibición, la semilla quiescente reanuda su metabolismo. Las estructuras y enzimas necesarias para este despertar metabólico se encuentran, generalmente, en la semilla seca, habiendo resistido, al menos parcialmente intactas; a las etapas de secado y maduración de la semilla (Bewley and Black, 1994). Algunas de las proteínas indispensables durante las primeras etapas de la germinación, para el avance de la misma, son degradadas rápidamente durante la imbibición, para reemplazarse posteriormente con proteínas sintetizadas *de novo* (Bewley, 1982).

La germinación es un sistema apropiado para el estudio del ciclo celular en plantas, ya que la imbibición reactiva a las células meristemáticas que se encuentran en su mayoría en la fase G1 respecto al contenido de DNA, para entrar al ciclo celular (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003).

Adaptando la germinación para el estudio del ciclo celular, se ha acordado definirla como el proceso que engloba desde la imbibición de la semilla, hasta el término de la primera ronda de división celular (Cruz-García, et al. 1998). La división celular es resultado de la ejecución del ciclo celular (Nurse, 1994).

- Ciclo celular.

El ciclo celular es un proceso indispensable para la proliferación de células eucariontes que consta de cuatro fases: una fase de síntesis de DNA (Fase S, duplicación del genoma), una fase mitótica (Fase M, división) y dos fases intermedias denominadas G1 (postmitótica) y G2 (postsintética). Durante las fases intermedias la célula se asegura de contar con las condiciones apropiadas para continuar con la proliferación; dentro de la fase G1 la célula monitorea tanto su tamaño, como su entorno y, dentro de la fase G2, la duplicidad e integridad del DNA.

La regulación de la progresión del ciclo celular es de suma importancia para la célula, ya que involucra la detección y reparación de daños en el material genético, así como la prevención de la división celular descontrolada. La regulación de la progresión del ciclo celular es un proceso muy complejo. Dos moléculas claves para dicha regulación son las cinasas dependientes de ciclina y las ciclinas (Nurse, 1994).

#### Cinasas dependientes de ciclinas.

Las cinasas dependientes de ciclina (CDKs) son enzimas que, al unirse con las ciclinas, forman un complejo enzimático activo; el cual actúa sobre ciertos residuos de Serina o Treonina de sus proteínas blanco, transfiriéndoles un grupo fosfato proveniente del ATP (Nurse, 1994; Morgan, 1997). Al encontrarse activos, los complejos ciclina-CDK inducen dos grandes procesos: la duplicación

de centrosomas y del DNA, y la mitosis (Murray, 2004). Las CDKs se han clasificado de acuerdo a su dominio de interacción con ciclinas.

### Ciclinas.

Las ciclinas son proteínas encargadas de la regulación y progresión del ciclo celular. Estas proteínas reciben su nombre de la fluctuación que muestran a lo largo del ciclo celular (Nurse, 1994). Se clasifican de acuerdo a su secuencia de aminoácidos; los grupos de mayor importancia para el ciclo celular son seis: A, B, C, D, E y H. De acuerdo con el punto del ciclo celular en el cual se expresan, encontramos dos grupos: ciclinas de fase G1 y ciclinas mitóticas (Srivastava, 2002).

Aunque las ciclinas son proteínas heterogéneas, algunas comparten motivos estructurales comunes, dentro de los cuales encontramos una secuencia conservada de aproximadamente 100 aminoácidos conocida como caja ciclina, mediante la cual se unen a las CDKs (Hunt, 1991).

Las ciclinas son proteínas que muestran un rápido recambio durante el ciclo celular. Las ciclinas tipo A y tipo B, muestran una secuencia de reconocimiento, cercana al extremo amino terminal, llamada caja de destrucción, que es blanco de ubiquitinación, proceso que lleva a las proteínas a la destrucción vía proteosoma. Algunas ciclinas de G1 contienen una secuencia conservada, de aproximadamente 8 aminoácidos, denominada PEST, la cual es rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina; esta secuencia es también blanco de ubiquitinación (Salama et al., 1994).

La asociación de una CDK con una determinada ciclina define la actividad del complejo, la especificidad del sustrato, la localización subcelular del complejo y la estabilidad de la ciclina (Pines, 1995). Las CDKs se expresan constitutivamente, mientras que las ciclinas

son sintetizadas en puntos específicos del ciclo celular, en respuesta a señales intra y extracelulares.

#### Actividad específica de los distintos complejos ciclina-CDK.

La ciclina D es la primera ciclina producida en el ciclo celular en respuesta a factores extracelulares, como factores de crecimiento. La ciclina D se asocia a CDK4 formando un complejo que fosforila a la proteína de Retinoblastoma (RB). Al estar hiperfosforilada, la proteína RB se disocia del factor de transcripción E2F/DP1, lo que lo activa. La activación de E2F/DP1 provoca la transcripción de genes que permiten la acumulación de proteínas necesarias para la fase S, como son: ciclina A, ciclina E, DNA polimerasa, entre otras. La ciclina E se une a CDK2 formando un complejo que facilita la transición de la fase G1 a la fase de síntesis. La ciclina A, junto con CDK2/CDK1, regula las fases S y G2. La ciclina B se une a CDK1 y facilita la transición G2/M.

#### Regulación del complejo ciclina-CDK.

La actividad de los complejos ciclina-CDK puede regularse por medio de los siguientes mecanismos:

##### **a. La síntesis y destrucción de ciclinas.**

La disponibilidad de la subunidad ciclina regula la formación del complejo y es indispensable para su posterior activación. La síntesis de ciclinas D es un factor importante para la regulación durante las fases iniciales del ciclo celular. Las variaciones reportadas en presencia de hormonas sugieren que las ciclinas D actúan como sensores de estímulos externos (Pines, 1995; Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006). De acuerdo a su mecanismo de destrucción, estas ciclinas pueden ser constitutivamente inestables a lo largo del ciclo celular, o bien, inestables sólo en una etapa específica del ciclo celular (Pines, 1995).

### **b. Fosforilación y desfosforilación de sitios específicos.**

La activación de las CDKs requiere no sólo de la unión a una ciclina, sino también de la fosforilación de la CDK en la región llamada asa T, por parte de una cinasa activadora de CDKs, o CAK (Huntley and Murray, 1999). Además, se ha encontrado que las CDKs son afectadas por una regulación negativa que desestabiliza el complejo ciclina-CDK. Esta regulación es producto de la fosforilación de residuos conservados Thr 14 Tyr 15 en las CDKs, cercanos al extremo amino terminal, por parte de las enzimas Wee1 y myt1 (Fowler et al., 1998). La fosforilación es revertida por la fosfatasa CDC25.

### **c. Inhibidores.**

Tanto en mamíferos como en plantas, se han encontrado proteínas de bajo peso molecular (15-27kDa) que al unirse al complejo ciclina-CDK inhiben su actividad (Verkest et al. 2005). En mamíferos se ha observado que estos inhibidores responden a factores ambientales, como el daño por radiación UV (Duli et al., 1994).

- **Ciclo celular en plantas.**

Las plantas cuentan con un mecanismo de regulación del ciclo celular similar al que existe en animales (Figura 2). Entre las proteínas más conservadas están los complejos ciclina-CDK (Mironov, 1999).

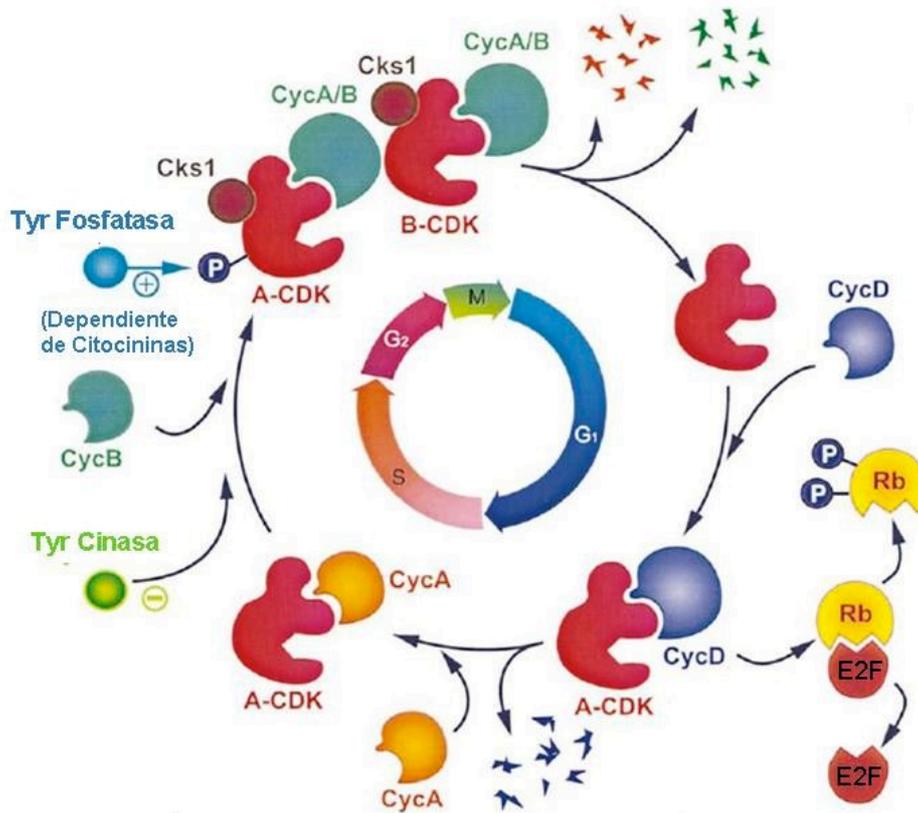


Figura 2: Esquema del Ciclo celular para plantas (Mironov, 1999), mostrando los momentos en que la participación de los diversos complejos Ciclina-CDK tiene lugar.

### CDKs en Plantas.

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 6 tipos de CDK, llamados CDKA-CDKF, siendo CDKA y CDKB las cinasas de mayor importancia para la progresión del ciclo celular (De Veylder et al., 2003). La CDKA cuenta con un motivo conservado de 16 aminoácidos conteniendo la secuencia PSTAIRE, mediante el cual consigue unirse a las ciclinas (Mironov, 1999). La CDKA no muestra una regulación a nivel transcripcional, pero a la cantidad de proteína muestra un incremento en la fase G1 temprana y una disminución cuando la célula sale de mitosis. Aunque esto podría no ser determinante para el avance del ciclo; se cree que CDKA participa tanto en la transición G1/S, como en la G2/M (Hemerly et al., 1995).

### Ciclinas en Plantas.

Las ciclinas en plantas se han dividido en cinco grupos: A, B, C, D y H, en base a la similitud que tienen respecto a sus homólogas en mamíferos (Vandepoele et al., 2002). En maíz se han encontrado, al menos, ciclinas A, B y D (Renaudin et al., 1996; Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006). Las ciclinas tipo A cuentan con tres subtipos denominados A1, A2 y A3. Su expresión no se limita a una fase específica del ciclo celular, ya que se han encontrado desde la fase S hasta la fase M y se ha reportado que el complejo CycA-CDKA muestra alta actividad de cinasa durante las fases S, G2 y M (Mironov, 1999). En estudios de expresión en células sincronizadas BY-2 de tabaco, se ha encontrado que la transcripción de los genes de ciclinas tipo A1 y A2 se induce a mediados de la fase S y decae a la mitad de la fase M.

Las ciclinas B tienen dos subtipos, CycB1 y CycB2; este tipo de ciclinas se expresan en mayor proporción durante la transición G2/M.

Se han encontrado 7 subtipos de ciclinas tipo D, su expresión se ha reportado durante la fase G1 y dentro de la transición G1/S (de Jager et al., 2005; Umeda et al. 1999). Se ha observado que las ciclinas D cuentan con una secuencia conservada LxCxE, cercana al extremo amino terminal, a través de la cual se unen a la proteína RBR (homóloga a la proteína de retinoblastoma en mamíferos);(Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006).

Las ciclinas tipo D se unen principalmente a CDKs tipo A (Healy et al., 2001). Este complejo fosforila e inactiva a RBR, permitiendo así la liberación del factor de transcripción E2F/DP (Figura 3), que regula la expresión de genes involucrados en la síntesis y

replicación del DNA, con lo que favorece la transición G1/S (Ramírez-Parra et al., 2003).

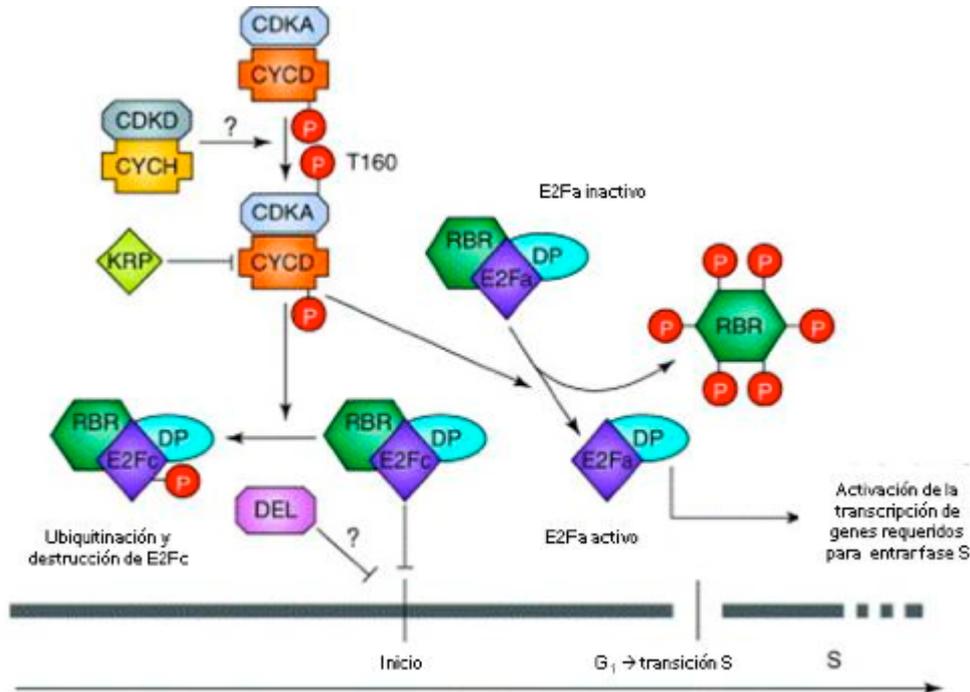


Figura 3: Actividad de ciclinas tipo D (Huntley and Murray, 1999), la asociación de ciclina D con CDKA forma un complejo que fosforila a la proteína RBR. Al estar hiper fosforilada, RBR libera a los factores transcripcionales E2Fa/DP, que facilitan la transición G1/S del ciclo celular.

### Elementos reguladores en plantas.

Otros elementos reguladores encontrados en plantas son las proteínas KRPs (moléculas homólogas a la familia de proteínas Cip/Kip de mamíferos) que al unirse a la CDK inhiben su actividad (Verkest et al. 2005) y las CAKs (Cinasas activadoras de CDK) ;(Vanderpoele et al. 2002).

## II. Antecedentes.

Se conoce que la mayoría, si no es que todas, las proteínas involucradas en el ciclo celular se encuentran presentes en el eje embrionario seco de maíz; a pesar de ello, se ha observado que la germinación se inhibe al inhibir la síntesis de RNA o de proteínas (Spiegel y Marcus, 1975; Sánchez Jiménez, et al., 1981; Sánchez Jiménez, et al., 1984).

Estudios previos realizados por el grupo del Dr. Jorge Vázquez, demostraron que al añadir cicloheximida a ejes embrionarios secos de maíz, con el fin de inhibir la síntesis de proteínas en horas tempranas de la germinación, una putativa ciclina D y la proteína PCNA (factor esencial para la replicación del DNA) se encontraban en la semilla seca, pero desaparecían gradualmente al avanzar la germinación; ambas virtualmente desaparecían después de 3-4h de iniciada la imbibición (Cruz-García et al., 1998; Herrera et al. 2000).

Dichos resultados sugieren que durante la germinación se da un recambio de las proteínas acumuladas durante la maduración de semilla, lo cual explica la necesidad de que exista transcripción/traducción en los ejes embrionarios, en horas tempranas de la germinación. Probablemente, el proceso de germinación requiera moléculas sintetizadas *de novo* y no hace uso de las proteínas almacenadas (Vázquez-Ramos and Sánchez 2003), o bien, le son insuficientes.

Las ciclinas tipo D son proteínas fundamentales para la cascada de señalización requerida para la estimulación de las células a entrar al ciclo celular, por lo cual, conocer su comportamiento durante las primeras horas de germinación, nos ayudará a comprender mejor cómo es que se inicia el ciclo celular.

Dos tipos de ciclinas D5 de maíz han sido reportadas por nuestro grupo: D5;3a (antes D5;1) y D5;3b (antes D5;2). Ambas ciclinas tienen un comportamiento distintivo ya que la cantidad de transcrito de D5;3a no varía durante las primeras 24h de germinación, mientras que el transcrito de la ciclina D5;3b tuvo un modesto incremento durante las primeras 12h, seguido de una disminución a las 18h de germinación. Este comportamiento distintivo de la ciclina D5;3b la vuelve una proteína interesante para posteriores estudios (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006). Mediante estudios *in silico*, se predijeron las secuencias de aminoácidos de las ciclinas D5;3a y b. Las cuales mostraron una identidad del 75%. Dentro del mismo análisis, se predijo que la masa molecular de las ciclinas sería muy cercana, ya que la CycD5;3a tiene solo 3 aminoácidos más.

Continuando con la caracterización de las ciclinas tipo D de maíz reportadas, se desarrolló un anticuerpo contra la ciclina D5;3b que reconoció una banda de 37kDa en extractos crudos de maíz; por la identidad de las ciclinas D5;3 y la masa molecular tan cercana, se sugirió que la señal mostrada en el western blot representaría la presencia de ambas proteínas (CycD5;3a y b). La señal correspondiente a las ciclinas D5;3 se encontró en ejes embrionarios secos. Durante la germinación, dicha señal se incrementó desde las 2h y hasta las 18h de imbibición. Posteriormente se observó un decremento hacia las 24h (Lara-Núñez et al, 2008).

Los anticuerpos mencionados arriba se hicieron a partir de la proteína completa (tomando la secuencia de ciclina D5;3a) y su obtención fue laboriosa y complicada, posiblemente, porque la sobreexpresión de esta proteína resultó ser tóxica para *Escherichia coli*. Adicionalmente, los anticuerpos no fueron muy específicos

dado que daban una señal pobre y reconocían otras proteínas en los extractos proteicos de maíz. Un objetivo del presente proyecto fue obtener nuevos anticuerpos, empleando sólo un fragmento de la ciclina D5;3a, y seleccionando dicho fragmento en base a su inmunogenicidad, tomando un fragmento con la menor semejanza posible a la ciclina D5;3b.

#### Estabilidad de proteínas del ciclo celular

En plantas, se ha observado que las ciclinas tipo A contienen una caja de destrucción, cercana al extremo amino terminal. Para el caso del subgrupo A1, con el cual se trabajó en el presente proyecto, la secuencia es RxAPLxNLIXN. Se cree que esta secuencia es blanco de ubiquitinación y es causa de una vida media corta (Gigot, 2000).

La CDKA también se ha encontrado en ejes embionarios de maíz secos. No se observó variación en la cantidad de proteína o del transcrito durante las 24h iniciales de germinación (Herrera-Teigeiro et al., 1999). La CDKA no parece contener secuencias PEST, o alguna otra que favoreciera su degradación por proteólisis por lo que se cree que es una proteína relativamente estable.

Analizando la expresión proteica de dos subtipos de ciclinas B, se observó que la ciclina B1 permanece constante y en altos niveles a lo largo del ciclo celular; mientras que, la ciclina B2 mostró un decremento importante en la anafase (Mews et al., 1997), indicando regulación de su acumulación por proteólisis.

En estudios de estabilidad realizados en cultivos de *Arabidopsis thaliana* (Figura 4), se ha visto que las ciclinas D tienen una estabilidad diferencial de acuerdo al subtipo, mientras que la proteína CDKA es estable (Planchais et al., 2004).

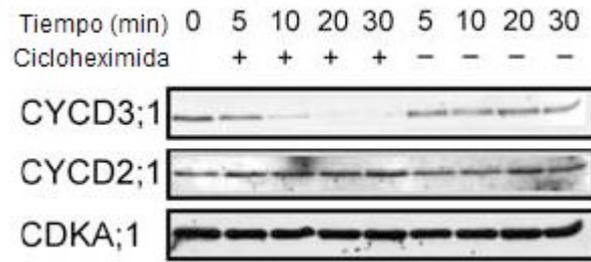


Figura 4: Estabilidad de proteínas del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*. (Planchais, 2004)

### III. Hipótesis.

Las proteínas del ciclo celular contenidas en la semilla seca no participan en el proceso de germinación, por lo cual, al inhibir la síntesis de proteínas en horas tempranas de germinación, las proteínas del ciclo celular desaparecerán.

### IV. Objetivos.

- Objetivo General.

Determinar la estabilidad de proteínas del ciclo celular como: Ciclina A, Ciclina D5 y CDKA, en las primeras horas de germinación.

- Objetivos Particulares.

1. Sobreexpresión y purificación de un fragmento inmunogénico, ubicado en el extremo amino terminal de la ciclina D5;3a de maíz.
2. Obtención y caracterización de un anticuerpo contra la Ciclina D5;3a.
3. Realización de ensayos de estabilidad mediante la detección de proteínas del ciclo celular de maíz empleando anticuerpos homólogos contra ciclina A1, D5;3a y CDKA.

## V. Materiales y Métodos.

- Materiales.

Semillas de maíz variedad chalqueño obtenidas directamente de un productor del Valle de Chalco.

- Métodos.

### **Obtención de anticuerpos contra el extremo amino de la ciclina D5;3A**

#### **Transformación de células competentes de *E.coli*.**

A una alícuota de 500ml de células competentes de *Escherichia coli* BL21 se agregó el vector pGEX 4T2 (Promega) ligado con el fragmento seleccionado de la ciclina D5;3a mediante la DNA Ligasa del fago T4 (Promega). Se mezcló por inversión, y se incubó la mezcla durante 20min en hielo. Posteriormente, se colocó durante 2min a 42°C, transcurridos los cuales se trasladó a un recipiente con hielo.

En una atmósfera estéril, se adicionó a la mezcla 1mL de medio LB (Luria Broth Base, Invitrogen) y se incubó 45min, a temperatura ambiente. Al término, la mezcla se centrifugó durante 30s., a 12000rpm, la mayor parte del sobrenadante fue eliminada, dejando alrededor de 100 µl para resuspender las células.

Para seleccionar las colonias transformadas, se sembró la mezcla resultante en cajas petri con agar LB (Lenox L Agar, Life Technologies) y ampicilina a una concentración final de 100µg/mL. Se corroboró que las colonias seleccionadas contaban con el vector y el fragmento de 383 pares de bases (pb) mediante la purificación del plásmido usando el Kit Illustra plasmid MiniPrep Spin (GE Healthcare), con la posterior digestión del plásmido con las enzimas de restricción Not I (Invitrogen) y Bam HI (Invitrogen). El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1.2% (p/v).

### **Sobreexpresión y purificación del péptido.**

A partir de las colonias aisladas de la transformación, se seleccionó la colonia denominada con el número uno para los siguientes procedimientos. De la colonia 1, se inoculó una asada en 3mL de medio LB con ampicilina y se incubó durante una noche, a 37°C. Posteriormente, se colocó 1mL del cultivo resultante en 250mL de medio LB con ampicilina, usando un matraz de 1L. Se incubó a 37°C, con agitación constante, hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 0.7 en la absorbancia de 595nm (aproximadamente 3h). Al obtener dicha densidad, se agregó Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,6mM y se incubó durante 2h más en las mismas condiciones. Al término, se centrifugó durante 15min a 12 000rpm, con el fin de concentrar las células contenidas en el medio. El pellet resultante se resuspendió en 40mL de PBS-Tritón 1% mediante agitación durante 30min. La mezcla se sonicó por 2min a una amplitud del 30% y se centrifugó durante 15 min a 12 000rpm.

El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.45mm y se colocó en una columna de glutatión sefarosa, previamente lavada con 20mL de Tris-HCl 50mM pH 8.0, para unir la proteína recombinante (Extremo amino de ciclina D5;3a-Glutatión S-Transferasa). Una vez que se hizo pasar la muestra por la columna, esta se lavó nuevamente y se agregaron 8mL de Tris-HCl 50mM pH 8.0, Glutatión 250mM, para despegar la proteína de fusión de la columna de afinidad. Esta fracción se cuantificó mediante el método de Bradford.

### **Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford.**

Para determinar la cantidad de proteína contenida en las distintas muestras, se comparó con una curva patrón. La curva patrón fue realizada por duplicado, colocando Albúmina Sérica Bovina en concentraciones finales de 1.2; 2.4; 3.6; 4.8; 6; 7.2; 8.4; 9.6: 10.6

y 12 $\mu$ g/ $\mu$ l a un volumen final de 100 $\mu$ l; posteriormente, se agregó a cada punto de la curva patrón 150  $\mu$ l del Reactivo de Bradford (dilución 1:4 de Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad).

Para cuantificar las muestras, se colocó por duplicado 1 $\mu$ l de la muestra, 99 $\mu$ l de agua desionizada y 150 $\mu$ l del Reactivo de Bradford.

La lectura de la absorbancia, tanto de la curva patrón como de las muestras, se efectuó en el espectrofotómetro Microplate Roadeo de Bio-Rad; con las mediciones de la curva patrón se obtuvo una ecuación lineal que nos permitió conocer la concentración de proteína en las muestras analizadas.

### **Inmunización y purificación de anticuerpos.**

Se inmunizaron por vía intramuscular 2 conejos durante 7 semanas, manteniendo una inyección por semana de 200 $\mu$ g de la proteína recombinante purificada mezclada en proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund.

Al término se obtuvo el suero total mediante punción cardiaca. El suero se centrifugó a 500g durante 20min a 4°C. El sobrenadante se purificó mediante el Kit Montage® Antibody Purification and Spin Columns with PROSEP-A-Media.

### **Ensayo de Estabilidad**

Para el ensayo de estabilidad se emplearon tres grupos de ejes embrionarios de maíz. La muestra A fungió como primer control y no recibió tratamiento, ni con vacío, ni con cicloheximida. La muestra B fue el segundo control, recibiendo el tratamiento con vacío pero sin añadir cicloheximida. La muestra C fue tratada con vacío, a fin de introducir en los ejes embrionarios cicloheximida, antibiótico empleado para inhibir la síntesis de proteínas.

### **Inhibición de la síntesis de proteínas.**

Se colocaron 15 ejes embrionarios, previamente lavados con cloro 0.8% y secados sobre papel absorbente, sobre papel filtro en un matraz kitasato de 100mL estéril, se adicionó 1mL de buffer de imbibición (Tris-HCl pH 7.6 50mM, Sacarosa 2%, MgCl<sub>2</sub> 10mM y KCl 50mM) y cicloheximida en una concentración final de 50mg mL<sup>-1</sup>. Una vez agregados los reactivos, se aplicó vacío durante 5min.

### **Imbibición.**

Los ejes embrionarios previamente tratados, se colocaron en una caja Petri pequeña con papel filtro debajo. Una vez que los ejes se acomodaron en la caja Petri, se agregó 1mL de buffer de imbibición estéril. Finalmente, se tapó la caja Petri y se mantuvo en la estufa a 25°C durante 3 y 6h.

### **Extracción de proteínas.**

Al término de la incubación, los ejes embrionarios se extrajeron de la caja y se homogenizaron a 4°C en un mortero estéril con 3mL de buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl pH 7.5 25mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, NaCl 75mM, EDTA pH 8.0 5mM, DTT 7.5mM, Tritón X-10 0.1%, Sacarosa 0.25mM, KCl 25mM, EGTA 1mM, NaF 50mM y β-glicerol fosfato 60mM; por cada 10mL de buffer de extracción, se adicionó una tableta de cocktail inhibidor de proteasas Complete®). La mezcla homogenizada fue centrifugada en tubos estériles durante 1h a 12 000rpm y 4°C. Al término, se colectó la fracción soluble, y ésta se centrifugó nuevamente durante 30min a 12 000rpm y 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril de 1.5mL y las proteínas contenidas en la muestra fueron cuantificadas por el método de Bradford. Las muestras obtenidas se confinaron a -70°C, para limitar su deterioro.

## **Western Blot.**

### **Preparación de muestras para la técnica SDS-PAGE.**

Una vez que se cuantificó la proteína en las muestras, se colocó en un tubo de ensaye de 2ml el equivalente en volumen a 40µg de proteína, se le agregó agua desionizada hasta completar 27µl y se adicionaron 13.5mL de amortiguador de carga (Tris-HCl 1M pH 6.8; SDS 4%; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0.02%, β-mercaptoetanol 10%). Se mezcló y calentó a 90°C durante 5min. La mezcla atemperada fue empleada para cargar en el gel de poliacrilamida.

### **Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).**

En un tubo de ensaye plástico con capacidad de 50mL se colocaron los reactivos indicados en la tabla 1 para la preparación del gel separador, se mezclaron y vertieron sobre los moldes correspondientes, se adicionó 1ml de isopropanol para evitar la formación de burbujas en la superficie del gel y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 10min.

Al término, se retiró el isopropanol y se vertió la mezcla del gel apilador (indicado en tabla 1). Se colocó el peine separador de carriles y se incubó a temperatura ambiente durante 10min. Finalmente, se retiró el peine y se eliminaron los residuos de poliacrilamida de los pozos usando una aguja.

Tabla 1: Composición de las soluciones para la preparación del gel de poliacrilamida.\*

	Gel Separador 12%		Gel Apilador 5%
Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8)	6.2mL	Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8)	0.81mL
Tris-HCl 0.75M pH 8.8	4.0mL	Tris-HCl 0.75M pH 6.8	1.7mL
Agua destilada	5.8mL	Agua destilada	2.5mL
Persulfato de amonio 10%	150 $\mu$ L	Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ L
TEMED	15 $\mu$ L	TEMED	10 $\mu$ L

\*Cantidades calculadas para la preparación de 2 geles

Los geles previamente preparados, se colocaron en un equipo de electroforesis Bio Rad y se agregaron 500ml de buffer de electrodos (Tris-HCl 0.025M pH8.0, Glicina 0.2M y SDS 1%). Posteriormente, se cargaron las muestras, previa preparación, en los pozos y se hizo pasar una corriente de 92Volts durante 2.5h.

### **Transferencia a membrana de Immobilon.**

Se restauró una membrana de Immobilon de 8.5cm\*5.5cm (Immobilon-pSQ Millipore tamaño de poro 0.2mm) sumergiéndola en Metanol al 100% durante 3min, posteriormente la membrana se sumergió en agua destilada durante 10 min para retirar el exceso de metanol, el lavado se repitió 2 veces. Al finalizar, se sumergieron la membrana y el gel de poliacrilamida en el buffer de transferencia (CAPS pH 8.0 Metanol 20%) durante 10 min, a fin de equilibrarlos. Al término, se colocaron en el equipo de transferencia (Milipor II, Pharmacia Biotech): 4 rectángulos de papel filtro, previamente humectados con el buffer de transferencia, la membrana de

transferencia, el gel de poliacrilamida y 4 rectángulos más de papel filtro humectados con buffer de transferencia. Se retiraron las burbujas de aire capturadas entre las capas con un rodillo y se hizo pasar una corriente eléctrica 75Volts por gel durante 1.5h.

### **Incubación con Anticuerpos y revelado.**

La membrana se bloqueó con una solución de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (fracción 5) al 3%, agitando continuamente durante 1 hora. Concluido el bloqueo, la solución se retiró y se colocó el primer anticuerpo (las concentraciones empleadas del primer y segundo anticuerpo se indican en la tabla 2) con solución astringente (PBS, NaCl 0.5M y Tween20 0.5%). La reacción permaneció en agitación durante 16h a 4°C, transcurridas las cuales se lavó con solución astringente durante 15min en agitación. El lavado se desarrolló por triplicado. Posteriormente, se colocó el segundo anticuerpo (IgG anti conejo ligado a Peroxidasa Sigma A6154) en la proporción indicada en la tabla 2, respecto a la solución astringente. La membrana con el segundo anticuerpo se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Al finalizar, se lavó la membrana por triplicado, como se describió anteriormente y se reveló por quimioluminiscencia, agregando los reactivos del Kit Immobilon Western Millipore (Cat. No. WBKLS0100) y exponiendo las membranas tratadas a una película fotográfica.

Tabla 2: Condiciones empleadas para la inmunodetección con fracción de IgG.

1ºAnticuerpo- Dilución	2ºAnticuerpo- Dilución	Tiempo de exposición de la membrana luminiscente a la placa fotográfica
Ciclina B1-1:1 000	1:40 000	30seg
Ciclina A1-1:2 500	1:40 000	5min
Ciclina D5;3-1:500	1:30 000	15min
CDKA-1:2 500	1:30 000	10min

### **Restauración de la membrana.**

Después del revelado, la membrana se lavó con solución astringente durante 15min. Al término, se adicionaron 5ml de Buffer de desnudado (Tris-HCl pH 7.8,  $\beta$ -mercaptoetanol y SDS 10%) y se incubó a 55°C durante 12min, agitando cada 2min. Una vez concluida la incubación, se colocó la membrana a temperatura ambiente durante 30min, transcurridos los cuales se lavó como anteriormente, por triplicado. Una vez restaurada la membrana se procedió a realizar el control de cargado empleando el anticuerpo contra ciclina B1 (317, cat #055 Santa Cruz Biotechnology) con la técnica anteriormente descrita.

## VI. Resultados.

### **Clonación de un fragmento del gen correspondiente a la ciclina D5;3.**

De la secuencia nucleotídica correspondiente al cDNA de la ciclina D5;3 (Figura 5); (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006), el Dr. Francisco Quiroz (IBT) amplificó con el Kit One Step RT-PCR (Invitrogen) un fragmento de 383 nucleótidos, usando los primers mostrados en la figura 5. La secuencia seleccionada por Quiroz, codifica para un péptido de 123 aminoácidos del extremo amino de la CycD5;3a y, de acuerdo con análisis *in silico* realizados mediante EMBOSS Antigenicity, el péptido es altamente inmunogénico.

Una vez amplificado el fragmento, se envió al laboratorio 114, para continuar con el proyecto. El fragmento se ligó y clonó en el vector pGEM T-easy (Promega), vector que permite la detección de colonias transformadas por la selección azul/blanco, siendo las colonias recombinantes de color azul. Una vez sobreexpresado, el fragmento de DNA se digirió con las enzimas BamHI y NotI para liberarlo del vector de clonación y se purificó usando el kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Secuencia Nucleotídica de la Ciclina D5;3a (AF351190)

```

1 GGAATTCCTT CCTCCTTTTC TGTTCCGGCGC CGTGCTCGCG CGCACCCACC CGCACGCCCC
61 AGTACCCCCA CGCTGCACAG TGCACGCCGA CTTTCCTCCG CCTTGCTGCT GCAAAGTCCGC
121 AACCACTGGA GGAAAAATCT TTTCCCTCAC TTTTCTTCCC TTTCCCCCCG CGCATGCACG
181 GGCTCTGATT GACGCCATGG GGGACGCCGC GGCCTCCACG TCCGCTCCCA CCACGCCAC
241 CTCCATCCTC ATCTGCCTGG AAGACGGCAG CGACCTTCTC GCCGATGCCG ACGATGGCGC
301 CGGCACTGAC CTCGTTGTGG OCCGCGACGA ACGTCTGCTT GTCGTGGACC AGGACGAGGA
361 GTATGTAGCG CTGCTCCTGT CCAAGGAGAG CGCGTCAGGC GCGCGCGGCC CGGTGGAGGA
421 AATGGAGGAC TGGATGAAGG CCGCGCGCTC CGGATGCCGC CGCTGGATCA TCAAGACCAC
481 GCGCATGTTT CGGTTCCGGG GAAAGACCGC TTACGTCCGG GTGAATTACC TCGATCGCTT
541 CCTGGCCCAA CGGCCAGTCA ATAGGGAGCA TGGGTGGGGT CTGCAGCTGC TCATGGTGGC
601 GTGCATGTGG CTGGCGACCA AGCTGGAGGA GCACCACGCT CCGCGGCTGT CGGAGTTGCC
661 CCTGGACCGG TGCAGTTCG GGTTCGACCG CGCGTCCGTG CTGCGGATGG AGCTCCTCGT
721 CCTGGGCACC CTCGAGTGGC GGATGGTCCG CGTCACCCCC TTCCCTTACA TCAGCTGCTT
781 CCGCGCGCGG TTCCGGCAGG ACGAGCGCCG GCGGTCCTC GTGCGCGCCG TGGAGTCCGT
841 CTTCGCGCGG ATCAGAGCGA TGAGCTCGGT GGAGTACCAG CCGTCGACCA TCGCCGTAGC
901 ATCCATCCTC GTCGCTCGCG GCAGGGAGAC GCCCGCCCGC AATCTGGACG CGCTCAAGGC
961 GATCCTGGGC TCATCATTTC GCGAGCTAGA CACCGGGCAT GTGTACTCCT GCTACAGCGC
1021 AATGATTCGG GAGGACGACA AGTCGCCGAC GCAGTCGACG TCGACGTGCA CGGGGGTGGC
1081 GTCCTCGGGC GTCTCTGTGG CCGCGCACCG CGGGGGGAGC GGGAGTCCCA GCCCCCGGG
1141 CGCTTCCGTG TCCGTGGGCG CCAATAATGC CGCTGGCACG GCCCGCGCGG CAACCACCGA
1201 CAACCGCAAC AAGAGGAGAC GGTTCGCGTC ACCTCAGCGA CAGTAGGAGC AGCTCAGCTG
1261 CTGGCAGTGC ATTGCAGTGC AGTGCAGTCC AGCTGCGTTT TCTTTTTC A GCTCACCATT
1321 TCCTTTTGGT GCCGATTGTT TCTTCAGGGG TGGCCGTAGA GTGATTTGGT AATTTAGTGC
1381 CGGAAAGATT AGTCCGGTGT CGCAGAGTGA TTTGGTAATT TAGTGCCGGA AAGATTTCTT
1441 TGTTTTGAGG AGATCTTTCG CGGGACCAAA GGGAGGGGG CAGTGTAAG ACGACAGAAC
1501 AAGCGTGAAG GCCTCGAGAG TCGAGACCTC ACAGGGTACC GCCTAGCGCC TACTGGGGTG
1561 AAAAGTAAAGT CAAGGAGTCG GGAGGGTGTG TGTGAATACC GTTTGTAGCA GCTAGTCCGT
1621 CCGTCTGTCT TTTTTTTTTT CTTTCTGTTT ATTAATTATT AATAGCCTGC TAGATTTTCAT
1681 TTAATAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA

```

Secuencia de los Primers empleados para la amplificación (5'-3')	
FWa185	<b>CTG ATT GAC GCC ATG GGG GAC</b>
Rva 547	<b>TCC CTA TTG ACT CGC CGT TGC</b>

Secuencia seleccionada de Ciclina D5;3a (AF351190)

```

CTGATT GACGCCATGG GGGACGCCGC GGCCTCCACG TCCGCTCCCA CCACGCCAC
241 CTCCATCCTC ATCTGCCTGG AAGACGGCAG CGACCTTCTC GCCGATGCCG ACGATGGCGC
301 CGGCACTGAC CTCGTTGTGG CCCGCGACGA ACGTCTGCTT GTCGTGGACC AGGACGAGGA
361 GTATGTAGCG CTGCTCCTGT CCAAGGAGAG CGCGTCAGGC GCGCGCGGCC CGGTGGAGGA
421 AATGGAGGAC TGGATGAAGG CCGCGCGCTC CGGATGCCGC CGCTGGATCA TCAAGACCAC
481 GCGCATGTTT CGGTTCCGGG GAAAGACCGC TTACGTCCGG GTGAATTACC TCGATCGCTT
541 CCTGGCCCAA CGGCCAGTCA ATAGGGAGCA

```

Figura 5. De la secuencia nucleotídica correspondiente al cDNA de la ciclina D5;3a. Quiroz eligió un fragmento de 383pb en base a su inmunogenicidad. Para amplificar este fragmento diseñó primers para amplificarlo mediante RT-PCR. Con el fragmento amplificado se continuó el proyecto

## **Sobreexpresión del péptido codificado en la secuencia seleccionada de la ciclina D5;3.**

El fragmento purificado se ligó al vector de expresión pGEX-4T2 (Figura 6). Este vector permite la sobreexpresión del péptido elegido de la ciclina D5;3a, fusionado en el extremo carboxilo terminal de la proteína Glutación S-Transferasa (GST) de 26kDa; la expresión de esta proteína fusionada se encuentra bajo el control del promotor trp-lac, el cual es inducible mediante Isopropil-D-β-tiogalactopiranosido (IPTG) en células de *Escherichia coli*.

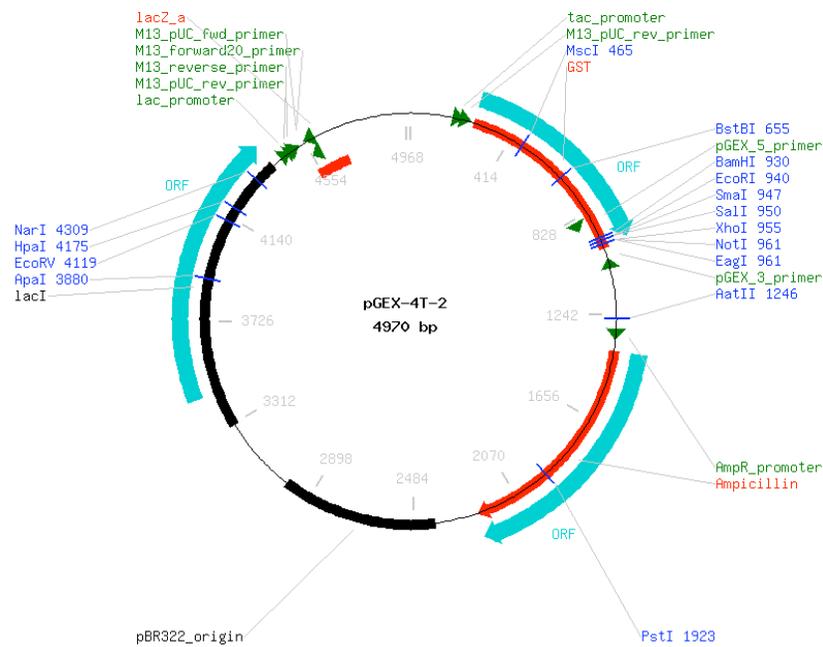


Figura 6: Mapa del vector de sobreexpresión (GE Healthcare).

Con dicho vector se transformaron células competentes de *E. coli*; las colonias exitosamente transformadas se seleccionaron mediante la adición del antibiótico ampicilina debido a que el plásmido empleado

contiene el gen AmpR que confiere resistencia al antibiótico. En la selección, se encontraron 4 colonias resistentes. Se continuó el trabajo con la colonia identificada con el número 1.

Para verificar que la colonia contenía el inserto, se realizó una digestión con las enzimas Not I y Bam HI a modo de cortar específicamente el fragmento correspondiente al inserto.

En la figura 7 se muestra que la colonia elegida contiene el vector pGEX 4T2 que consta de 4970pb, banda que observamos cercana al marcador de 5 000pb. El vector también contiene el fragmento seleccionado de la ciclina D5;3a, que consta de 383pb y se observa en la banda cercana al marcador de 400pb.

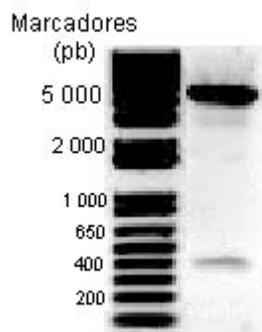


Figura 7: Para corroborar la inserción del fragmento nucleotídico de CycD5;3 en el vector de sobreexpresión (pGEX4T2) se realizó una doble digestión del vector con las enzimas de restricción BamHI y NotI. El producto se visualizó en un Gel de Agarosa al 1.2% (p/v).

Una vez corroborada la presencia del inserto, se prosiguió con la sobreexpresión del péptido codificado por el fragmento seleccionado de la ciclina D5;3a. De acuerdo al análisis *in silico* (Traducción por medio de ExPASy Proteomics Tools), el fragmento seleccionado codifica para

123 aminoácidos, mismos que se resaltan en color rojo en la figura 8, de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Secuencia de aminoácidos Ciclina D5; 3a (AF351190)

```
1  MGDAAASTSA PTTPTSILIC LEDGSDLLAD ADDGAGTDLV VARDERLLVW DQDEEYVALL
61  LSKESASGGC GPVEEMEDWM KAARSGCVFW IIKTTAMFRF GCKTAYVAVN YLDRFLAQR
121 VNREHAWGLQ LLMVACMSLA TKLEEHHAPR LSELPLDACE FAFDRASVLR MELLVLCTLE
181 WRMVAVTPFP YISCFAARFR QDERRAVLVR AVECVAAIR AMSSVEYQPS TIAVASILVA
241 RGRETPAGNL DALKAILGSS FPQLDTGHVY SCYSAMIREK DKSPTQSTST STGVASSCVS
301 VAAHAGGSGS PSPPGASVSV GANNAAGTAP PATTDNRNKR RRLRSPQRQ
```

Figura 8.

Se indica con rojo la secuencia empleada para la producción de anticuerpos.

De acuerdo al número de aminoácidos, el péptido resultante tendrá un peso molecular aproximado de 13kDa.

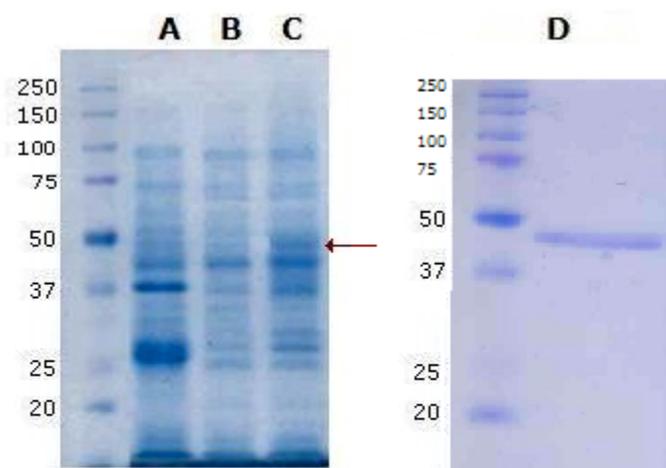
Como se mencionó anteriormente, el vector pGEX 4T2 añade una molécula de Glutación S transferasa de 26kDa, resultando la sobreexpresión de una proteína de fusión (péptido-GST) con un peso molecular aproximado de 39kDa.

Para la sobreexpresión se inoculó una alícuota de 1ml de un cultivo de 12h de bacterias recombinantes a 250ml de medio Luria con ampicilina (concentración final 100mg/ml) y se incubó a 37°C en agitación continua hasta que la densidad óptica (a 595nm) llegó a 0.5 unidades. En ese momento, se agregó IPTG (concentración final de 0.6mM) y se incubó la mezcla durante 2h más bajo las mismas condiciones. Al término se tomó una alícuota para compararla, por un lado con células que sobreexpresaron solo la proteína GST y, por otro, con células del mismo cultivo no expuestas a IPTG.

Las células expuestas a IPTG mostraron la expresión de una proteína ubicada entre los marcadores de 37 y 50kDa, señal que coincide con el peso de la proteína recombinante (40kDa). Las células no expuestas a

IPTG no mostraron la presencia de este péptido, como tampoco se observó en las células que sobreexpresaron sólo GST (Figura 9).

Las células que mostraron sobreexpresión de la proteína de fusión se lisaron mediante sonicación y se hicieron pasar por una columna de Glutación unido a Sefarosa, con el fin de unir la porción correspondiente a GST de la proteína recombinante a la columna de afinidad; una vez que se eliminaron las proteínas no unidas a la columna, por medio de lavados con Tris-HCl 50mM pH 8.0, se recuperó la proteína recombinante eluyendo con una solución de Glutación reducido (250mM), ya que este sustrato desplaza a la proteína fusionada. Para corroborar la pureza del extracto se corrió un gel SDS-PAGE al 12%, en el cual, se encontró una sola banda con el mismo peso molecular que anteriormente (40kDa); (Figura 9D).



A: Expresión del vector pGEX4T2 sin inserto.  
B: Vector pGEX4T2 con inserto.  
C: Expresión del vector con la proteína recombinante.  
D: Purificación de la proteína recombinante.

Figura 9: Sobreexpresión y purificación del péptido CycD5;3 extremo amino fusionado a Glutación S-Transferasa (GST). Los extractos proteicos se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de Poliacrilamida al 12% y para su visualización se tiñó con colorante Azul de Coomassie. De cada muestra se emplearon 20µg.

### **Obtención de anticuerpos contra la ciclina D5;3.**

La proteína recombinante se empleó para la inmunización de conejos a una dosis semanal de 200 $\mu$ g, administrada por vía intramuscular durante 7 semanas, transcurridas las cuales se extrajo el suero total por punción cardiaca. El suero recolectado antes de comenzar la inmunización no reconoció banda alguna ni en lisados de la bacteria empleada para la producción de la proteína, ni tampoco en extracto crudo de maíz (No se muestra).

Los anticuerpos obtenidos mostraron un fuerte reconocimiento de la proteína recombinante, por lo que para emplearla como control positivo para la titulación del anticuerpo, se usó 1 $\mu$ g de proteína recombinante a modo de atenuar la señal en la membrana luminiscente (Figura 10A). Al probarlos con extracto crudo de maíz se encontró una banda de señal intensa ligeramente por arriba del marcador de 37kDa, lo cual sugiere que los anticuerpos generados son capaces de reconocer a la ciclina D5;3, con un peso molecular de 38kDa (Figura 10).

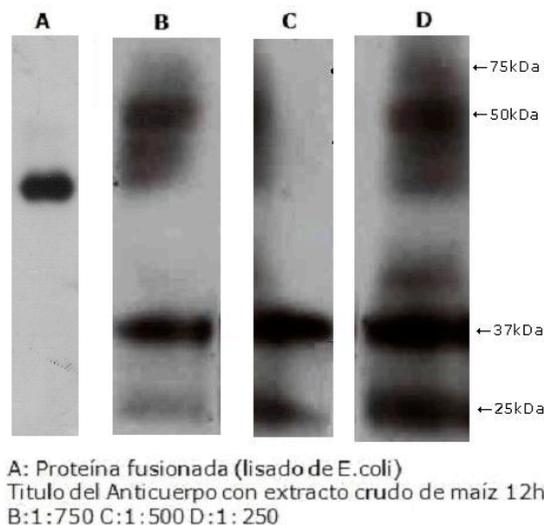


Figura 10: Titulación y validación del anticuerpo contra CycD5;3.

## **Estudio de la estabilidad de la ciclina D5;3 y otras proteínas del ciclo celular.**

Contando con el anticuerpo anti ciclina D5;3 y el ensayo de seguimiento (Western Blot) establecido, se realizaron los ensayos para la determinación de la estabilidad de proteínas de ciclo celular durante las primeras horas de la germinación de maíz. Para lograr la inhibición de la síntesis de proteínas se empleó 1ml de buffer de imbibición (ver Materiales y Métodos) conteniendo cicloheximida a una concentración final de 50 $\mu$ g/ml. El buffer se agregó a 15 ejes embrionarios obtenidos de semillas de maíz secas y se aplicó vacío durante 5min para permitir una imbibición completa. Al concluir el tratamiento, los ejes se colocaron en una caja Petri con 1mL de buffer de imbibición y se incubaron a 25°C durante 3 y 6h.

Para corroborar que los efectos observados durante el ensayo eran provocados por la adición de cicloheximida (CHX), se contó con un grupo control sometido al tratamiento con vacío previo a la imbibición (sin cicloheximida) y otro grupo control que no recibió ningún tratamiento. Posteriormente se extrajeron las proteínas solubles de los ejes embrionarios para determinar la estabilidad de las proteínas durante la germinación por medio de Western Blot.

Para la ciclina D5;3 se encontró, en varios ensayos independientes, que esta proteína desaparece a las 6h al tratarse los ejes con CHX, lo cual no sucede en las muestras que no recibieron tratamiento, ni en aquellas que sólo se trataron con vacío (Figura 11) Lo cual sugiere que la presencia de esta proteína durante las primeras horas de germinación es producto de la síntesis *de novo* y no de la estabilidad de la proteína almacenada durante la formación de la semilla. En todo caso, aún en

condiciones control (sin tratamiento, carriles 2 y 3), la proteína tiende a desaparecer.

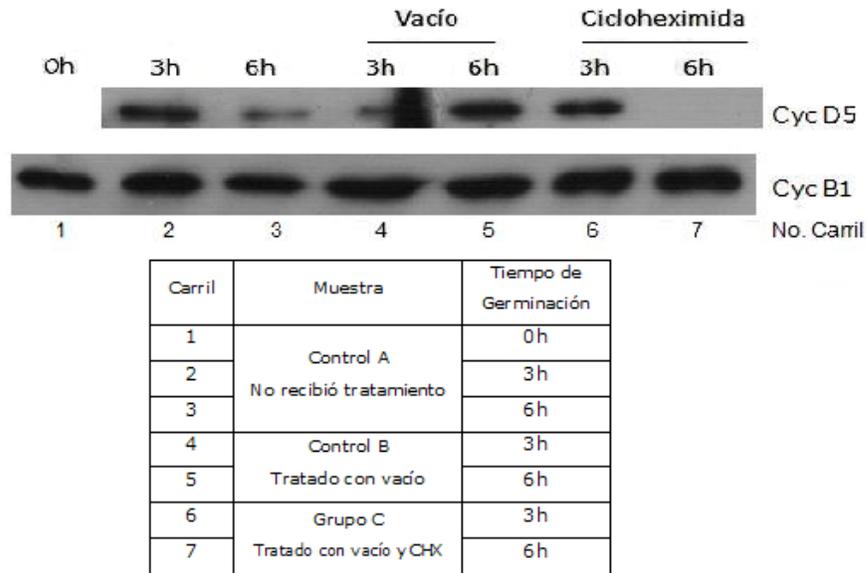


Figura 11: Estabilidad de la ciclina D5;3.

Los anticuerpos empleados para detectar a la ciclina A1;2 reconocieron una banda de aproximadamente 50kDa, que coincide con el peso molecular de dicha ciclina. Al igual que la ciclina D5;3, la ciclina A1;2 desapareció a las 6h en presencia de CHX, lo cual no se observó en el tratamiento con vacío ni en el control sin tratamiento (Figura 12).

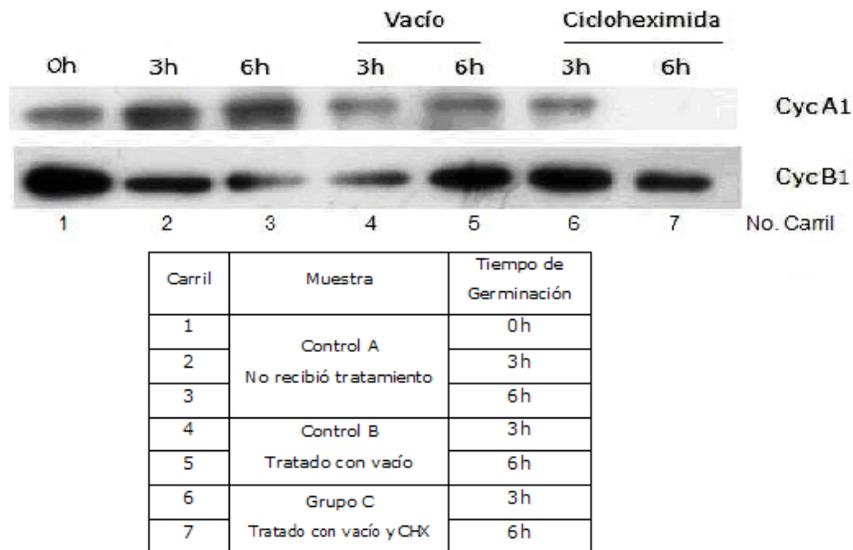
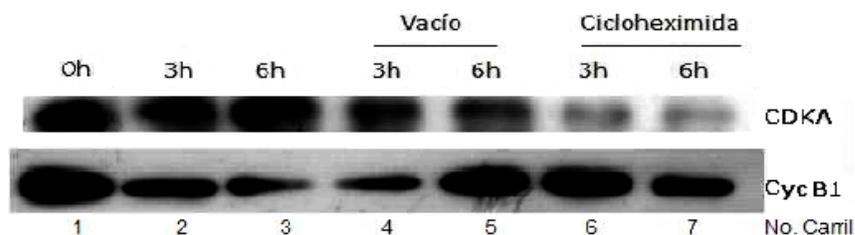


Figura 12: Estabilidad de la ciclina A1;2

Para detectar a la CDKA se emplearon anticuerpos homólogos que reconocen una banda alrededor de los 34kDa; el ensayo mostró una importante disminución de CDKA en presencia de CHX, a las tres horas de imbibición, que no se observa durante los otros tratamientos (Figura 13). Esto indica que la CDKA, al igual que las ciclinas analizadas, depende también de la síntesis *de novo* para mantener el nivel constante de proteína que se observa en ausencia de CHX, durante etapas tempranas de la germinación. Interesantemente, no hay una desaparición total de CDKA, lo que se puede observar comparando las muestras a 3 y 6h, evidenciando una diferencia entre la estabilidad de la cinasa y la de las ciclinas A1 y D5.



Carril	Muestra	Tiempo de Germinación
1	Control A No recibió tratamiento	0h
2		3h
3		6h
4	Control B Tratado con vacío	3h
5		6h
6	Grupo C Tratado con vacío y CHX	3h
7		6h

Figura 13: Estabilidad de CDKA.

## VII. Discusión.

### Generación de Anticuerpos contra ciclina D5;3.

La sobreexpresión de la proteína recombinante empleada para generar los anticuerpos provocó un crecimiento lento de las bacterias transformadas, además, la cantidad de proteína obtenida fue menor que la que se generaba en trabajos previos realizados en el mismo grupo (aproximadamente  $0.19\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); (Lara-Núñez, 2008). La proteína recombinante purificada mostró una sola banda en el gel de poliacrilamida, lo cual indica que el método de purificación empleado nos permitió eliminar el resto de las proteínas contenidas en los extractos crudos bacterianos. Comparando con los resultados previamente obtenidos, la evidencia sugiere que tanto el fragmento elegido, como la proteína completa son tóxicas para *Escherichia coli*. Aún así, los anticuerpos obtenidos fueron capaces de reconocer a la proteína recombinante contra la cual fueron generados y también a la proteína D5;3 de extractos de maíz; cabe mencionar que hubo también reconocimiento de otras proteínas que podrían estar relacionadas antigénicamente con esta ciclina.

### Ensayos de estabilidad.

Existen evidencias que sugieren que la regulación del ciclo celular involucra la proteólisis de diferentes conjuntos de reguladores del ciclo celular. Dichas ondas de proteólisis dependen de la conjugación de varias moléculas de ubiquitina y se realizan en puntos específicos del ciclo celular (Pines, 1995).

Todas las ciclinas conocidas son blanco del proteosoma por medio de la adición de varias ubiquitinas en cadena (Murray, 2004). Se conoce que las ciclinas de G1 son degradadas por un complejo denominado SCF

(Cinasa de fase S asociada a proteína de caja F); (Jackson, et al., 2000). Para que dicho complejo reconozca a su sustrato, éste debe estar fosforilado. Se ha propuesto que la fosforilación es realizada por CDKs, sin embargo se sospecha que hay otras cinasas involucradas (Planchais, et al., 2004). La función que desempeñan las CDKs dentro de la degradación podría explicar su mayor estabilidad en las primeras horas de germinación, donde llevarían a cabo la fosforilación de proteínas no funcionales.

El proyecto se planteó como principal objetivo estudiar la estabilidad de proteínas relacionadas con el control de la progresión del ciclo celular: Ciclina D5;3, Ciclina A1;2 y CDKA. Estas proteínas se encuentran en semilla seca, lo cual sugiere que permanecen estables durante la maduración de la semilla de maíz (lo cual toma semanas). Sin embargo, al imbibir la semilla, su estabilidad cambia dramáticamente durante las primeras horas de germinación.

En la germinación de ejes embrionarios de maíz la fase G1 comienza alrededor de las 6h de iniciada la imbibición (Baiza, et al., 1989). A dicho tiempo, se observó la desaparición total de las ciclinas CycD5;3 y CycA1;2, lo cual sugiere que estas ciclinas, que se encontraban presentes en semilla seca, no participan en la germinación, y que debe sintetizarse nueva proteína para que ocurra una progresión eficiente del ciclo celular. Una explicación a lo anterior podría ser que las proteínas presentes durante el proceso de maduración de la semilla pudieron sufrir daños durante la desecación y almacenaje, lo que provocaría que no realicen su función adecuadamente, por lo que, en esta primera etapa de la germinación, no sólo se reparan daños en el

DNA (Baiza et al., 1989), sino que también se eliminan las proteínas no funcionales.

Las CycDs estudiadas pudieran ser más estables que los correspondientes ortólogos en otro tipo de semillas, por ejemplo, en *Arabidopsis* se ha reportado una vida media muy corta para AtCycD3;1 (aproximadamente de 7min); (Planchais et al., 2004), lo que posiblemente se relacione con la ausencia de una secuencia PEST en la CycD5;3 de maíz, responsable de la degradación de este tipo de proteínas. Sin embargo, CycD5;3 debe tener alguna secuencia de destrucción capaz de alterar su estabilidad dentro de las primeras horas de germinación como aquí se muestra. Debe hacerse notar que en este trabajo no se hizo un estudio formal de los tiempos de vida media.

La CDKA también mostró inestabilidad, sin embargo, a diferencia de las ciclinas estudiadas, una parte de la CDKA permaneció estable en el periodo estudiado, lo cual sugiere que no toda la enzima es degradada en las primeras horas de imbibición, por lo cual, parte de la CDKA remanente en semilla seca podría, quizás, emplearse durante la germinación. Este comportamiento no había sido observado en CDKAs de otras especies, como en *Arabidopsis thaliana*, cuya enzima permanece estable hasta las 24h de germinación (Planchais, 2004). En maíz, se han encontrado más subtipos de CDKA que en plantas dicotiledóneas; por lo cual, habría que considerar que estas enzimas también podrían mostrar una estabilidad diferencial.

## VIII. Conclusiones.

1. Se obtuvo un anticuerpo capaz de reconocer a CycD5;3 en extracto crudo de maíz. El anticuerpo, sin embargo no fue mucho mejor que el obtenido en estudios previos.
2. Las ciclinas estudiadas se encontraron en semilla seca y al inhibir la síntesis de proteínas, desaparecieron a las 6h de germinación. Lo anterior sugiere que las proteínas remanentes de la maduración de la semilla no se encargan de la progresión del ciclo celular.
3. Los resultados obtenidos apoyan la propuesta de que la progresión del ciclo celular requiere de proteínas sintetizadas *de novo* dentro de las primeras horas de germinación.

## IX. Referencias.

- Baiza** A.M., Vázquez-Ramos J.M. and Sánchez de Jiménez E. (1989) DNA Synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135:416-421.
- Bewley** J.D. (1997) Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066.
- Bewley** J.D. (1982) Protein and nucleic acid synthesis during germination and early seedling growth. In *Encyclopaedia of Plant Physiology* (New York: Springer-Verlag) vol. 14(A), pp. 61-81.
- Bewley** J.D. and Black, M. (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination.* (New York: Plenum Press) pp. 221-230.
- Cruz-García** F., Zúñiga-Aguilar J.J. and Vázquez-Ramos J.M. (1998) Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant* 102:573-581.
- De Jager** S., Maughan S., Dewitte W., Scofield S., Murray J.A.H. (2005) The developmental context of cell-cycle control in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16:385-396.
- De Veylder** L., Joubès J. and Inzé D. (2003) Plant cell cycle progressions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:536-543.
- Duli** V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tisty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J. and Reed S.I (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76:1013-1023.
- Fowler** M.R., Eyre S., Scott N.W., Slater A., Elliott M.C. (1998) The plant cell cycle in context. *Mol Biotechnol.* 10:123-153.
- Gigot** N.C. (2000) Plant A-type cyclins. *Plant Mol. Biol.* 43: 659-675
- Healy** J.M.S., Menges M., Dooman J.H. and Murray J.A.H. (2001) The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with

the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J. Biol Chem.* 2776:7041-7

**Hemerly** A.S., de Almedia Engler J., Bergounioux C., Van Montagu M., Engler G., Inzé D. and Ferreira P. (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* 14:3925-3936

**Herrera** I., Sanchez M.D., Molina J., Plasencia J. and Vázquez-Ramos J.M. (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum* 110:127–134.

**Herrera-Teigeiro** I., Jiménez-García L.F., Vázquez-Ramos J.M. (1999) Benzyladenine promotes early activation of p34cdc2-like kinase(s) during maize germination. *Seed Science Research* 9:55-62.

**Hunt** T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* 2 (4):213-222.

**Huntley** R.P. and Murray J. (1999) The plant cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* 2:440–446

**Jackson** J.P., Eldridge A.G., Freed E., Furstenthal L., Hsu J.Y., Kaise B.K. and Reiman J.D. (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10:429-439.

**Lara-Núñez** A., De Jesús N. and Vázquez-Ramos J.M., (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum.* 132:79-88.

**Mironov** V., De Veylder L., Van Montagu M., and Inzé D. (1999) Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants—The Nexus. *The Plant Cell* 11:509–521.

- Mews** M., Sek F., Moore R., Volkman D., Gunning B.E.S. and John P.C.L. (1997) Mitotic cyclin distribution during maize cell division: implications for the sequence diversity and functions of cyclins in plants. *Protoplasma* 200:128-145.
- Morgan** D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261–291
- Murray** A.W. (2004) Recycling the Cell Cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234
- Nurse** P. (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547–550
- Pines** J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J.* 308:697-711
- Planchais** S., Glab N., Inzé D. and Bergounioux C. (2000) Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett.* 476:78-83.
- Planchais** S., Samland A.K., Murray J.A.H. (2004) Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein by proteasome-dependent mechanism. *The Plant J.* 38:616-625.
- Quiroz-Figueroa** F. and Vázquez-Ramos J.M. (2006) Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiologia Plantarum* 128:556–568.
- Ramírez-Parra** E., Frundt C. and Gutierrez C. (2003) A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant J.* 33:801-11.
- Renaudin** J.P., Doonan J.H., Freeman D., Hashimoto J., Hirt H., Inzé D., Jacobs T., Kouchi H., Rouzé P., Sauter M. et al.(1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organisation. *Plant Mol Biol.* 32:1003-1018.

- Salama** S.R., Henoricks K.B. and Thorner J. (1994) G1 cyclin degradation: The PEST motif of Yeast Cln2 is necessary but not sufficient for a rapid protein turnover. *Mol. Cell Biol.* 14:7953-7960.
- Sánchez de Jiménez** E., Aguilar R. and López S. (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 99:445-450.
- Sánchez de Jiménez** E. and Aguilar R. (1984) Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiology* 75:231-234.
- Spiegel** S. and Marcus A. (1975) Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature* 256:228-230.
- Srivastava** L.M. (2002) *Plant Growth and Development*. (USA:Elsevier Science Academic Press) pp. 50-57.
- Umeda** M., Iwamoto N., Umeda-Hara C., Yamaguchi M., Hashimoto J. and Uchimiya H. (1999) Molecular characterization of mitotic cyclins in rice plants. *Mol Gen Genet.* 262(2):230-8.
- Vázquez-Ramos** J.M. and Sánchez M.P. (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* 13:113-130.
- Vanderpoole** K., Raes J., De Veylder I., Rouzé P., Rombauls S. and Inzé D. (2002) Genome-wide análisis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14:903-16.
- Verkest** A., Weini C., Inzé D., De Veylder L., and Schnittger A. (2005) Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiol.* 139(3):1099-1106.