



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ACTIVIDAD DE CINASA DEL COMPLEJO  
PCNA-CDK-CYCD ASOCIADO A CROMATINA  
DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**VERÓNICA LÓPEZ PERRUSQUÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos  
**VOCAL:** Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares  
**SECRETARIO:** Dr. Felipe Cruz García  
**1er. SUPLENTE:** Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig  
**2° SUPLENTE:** Dra. Tzventanka Dimitrova Dinkova

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**ASESOR DEL TEMA:**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

---

Dr. Elpidio García Ramírez

**SUSTENTANTE:**

---

Verónica López Perrusquía

# ÍNDICE

## RESUMEN

## ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 El maíz.....	1
1.1.1. Origen del maíz .....	1
1.1.2. Morfología.....	2
1.1.2.1. Planta de maíz.....	2
1.1.2.2. Semilla de maíz .....	3
1.2. Germinación .....	5
1.3. Ciclo Celular .....	7
1.3.1. Regulación del ciclo celular.....	9
1.3.1.1. Cinasas dependientes de ciclinas.....	10
1.3.1.2. Ciclinas .....	11
1.3.1.3. Transición G1/S.....	13
1.4. Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) .....	14
1.4.1. PCNA en el ciclo celular .....	17
1.5. Técnica de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).....	18
1.5.1. Entrecruzamiento o Fijación.....	19
1.5.2. Fragmentación.....	20
1.5.3. Inmunoprecipitación.....	20
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	22
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	23
4.1. Objetivo General.....	23
4.2. Objetivos particulares .....	23
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	24
5.1. Material Biológico .....	24
5.1.1. Semillas de maíz .....	24
5.2. Métodos experimentales.....	24
5.2.1. Proceso de extracción de la cromatina .....	24
5.2.1.1. Obtención de ejes embrionarios de maíz.....	24
5.2.1.2. Germinación de ejes embrionarios de maíz .....	24

5.2.1.3.	Entrecruzamiento.....	25
5.2.1.4.	Extracción de la cromatina.....	25
5.2.1.5.	Fragmentación de la cromatina.....	26
5.2.2.	Cuantificación de proteínas y DNA .....	27
5.2.2.1.	Determinación de la concentración de proteína .....	27
5.2.2.2.	Determinación de DNA en fracciones de cromatina.....	28
5.2.3.	Ensayos de Inmunoprecipitación .....	28
5.2.3.1.	Formación del complejo de inmunoprecipitado .....	28
5.2.3.2.	Elución del complejo de inmunoprecipitado .....	29
5.2.3.3.	Reversión del entrecruzamiento .....	29
5.2.4.	Extracción e identificación de DNA .....	30
5.2.5.	Preparación de muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	31
5.2.6.	Electroforesis de proteínas SDS-PAGE .....	32
5.2.7.	Western-Blot.....	33
5.2.8.	Ensayos de actividad de cinasa .....	35
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
6.1.	Validación de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	36
6.1.1.	Eficiencia del entrecruzamiento y la reversión .....	36
6.1.2.	Extracción y fragmentación de la cromatina.....	39
6.1.3.	Detección de PCNA y DNA en los inmunoprecipitados de PCNA en fracción nuclear .....	41
6.2.	Ensayos de inmunoprecipitación.....	44
6.3.	Ensayos de actividad de cinasa .....	46
6.3.1.	Presencia de actividad de los complejos con PCNA en las fracciones de ChIP ...	46
6.3.2.	Actividad de cinasa asociada a los complejos de PCNA durante la germinación de maíz .....	50
6.4.	Modelo teórico de la función del complejo DNA-PCNA-CDKA-CycD .....	54
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO</b>	<b>.....</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

El maíz es una de las plantas de cultivos más valiosas e importante a nivel mundial, de manera que es necesario conocer y comprender los procesos celulares que están involucrados en el desarrollo de la planta, para posteriormente aplicarlos en el mejoramiento de la misma.

Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado al estudio de la germinación de la semilla del maíz, que consiste en la reactivación metabólica de la semilla, culminando con la primera ronda exitosa de divisiones celulares. Este proyecto está enfocado en el análisis y asociación de proteínas de la fase G1 del ciclo celular, principalmente ciclinas D (CycD) y cinasas dependientes de ciclina (CDK), con una proteína fundamental de la fase S, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) sobre ejes embrionarios de maíz.

En trabajos previos se ha observado que PCNA co-inmunoprecipita con proteínas tipo CDKA, y este complejo presenta mayor actividad de cinasa a las primeras horas de germinación (fase G1). Adicionalmente, se ha visto que PCNA se asocia con las proteínas CycD2, D4, y D5 y recientemente se demostró que los complejos formados entre PCNA, CDKA y CycD4 sólo están presentes en cromatina.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en resolver la interrogante de si los complejos asociados a PCNA poseen actividad de cinasa cuando PCNA está asociado a cromatina, o presente en citoplasma, utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), dado que esta técnica nos ayuda a estudiar interacciones proteína-DNA *in vivo*.

Los resultados obtenidos indican que los complejos asociados a PCNA están activos sólo cuando PCNA se encuentra asociado a cromatina y que presentan una mayor actividad en las primeras horas de la germinación. Este hallazgo sugiere que PCNA desempeña un papel de mediador para estos complejos con su sustrato. Se sugiere que esta función la desempeña principalmente con los complejos CDKA-CycD, que son los encargados de la transición de G1 a S, como otra manera más de regular el progreso del ciclo celular.

## ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>C1</b>	Fracción citoplásmica
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>CAK</b>	Cinasa activadora de CDK
<b>CDK</b>	Cinasa dependiente de ciclina
<b>CF</b>	Cromatina fragmentada
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de la cromatina
<b>CIn</b>	Cromatina intacta purificada
<b>Cu<sup>+</sup></b>	Ion cuproso
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Ion cúprico
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de cúprico
<b>Cyc</b>	Ciclina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EP</b>	Extracto proteico (no entrecruzado)
<b>ET</b>	Extracto total (entrecruzado)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamin tetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil) tetraacético
<b>F1</b>	Fracción nuclear
<b>F2</b>	Fracción de cromatina
<b>Fc</b>	Fracción cristalizable de un anticuerpo
<b>IDCL</b>	Asa conectora de interdominios

<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato monoácido de potasio
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato diácido de potasio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub></b>	Orto-vanadato de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaF</b>	Fluoruro de sodio
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular
<b>PIP</b>	Motivo de interacción de proteínas con PCNA
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
<b>PVDF</b>	Polivinil difluoruro
<b>RBR</b>	Proteína relacionada al retinoblastoma
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>S2</b>	Fracción soluble
<b>S3</b>	Fracción con proteínas inespecíficas a cromatina
<b>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup></b>	Ion persulfato
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'- tetrametiletenodiamina
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil-aminometano



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El maíz

El maíz, junto con el arroz y el trigo, es una de las plantas de cultivo más valiosas a nivel mundial, no sólo por ser una fuente abundante nutricional para la gente y el ganado, sino también por ser una materia prima indispensable en la fabricación de productos alimenticios, farmacéuticos y de uso industrial; recientemente se ha empleado para la producción de etanol como combustible alternativo.

Dado a su importancia, el maíz ha sido objeto de estudio desde hace mucho tiempo. Hoy en día es considerado un sistema botánico ideal en diversas áreas de investigación, de las cuales se incluye el análisis de genes, mapeo de fenotipos y germinación.

### 1.1.1. Origen del maíz

La palabra maíz proviene del arahuaco (extenso pueblo indígena que habitaba las Antillas y el norte de América del sur) y significa “lo que sustenta la vida”. De acuerdo con las investigaciones de Nikolai Vavilov (1951), el maíz se originó en la parte sur de México y América Central; posteriormente el maíz fue difundido por toda América, Europa y Asia, dando como resultado la gran diversidad de razas, variedades, colores y tamaños que actualmente conocemos.

A pesar de que morfológicamente el maíz es diferente, existe evidencia genética de que es la forma domesticada del teosinte, específicamente del *Zea mays ssp. Parviglumis* (conocido también como el teosinte de Balsas). Estos estudios muestran que ambos poseen una estrecha relación genética, donde son 5 regiones dentro del genoma las que se vieron afectadas por la domesticación, provocando las diferencias morfológicas observadas entre estas plantas (Doebly y Stec, 1993).

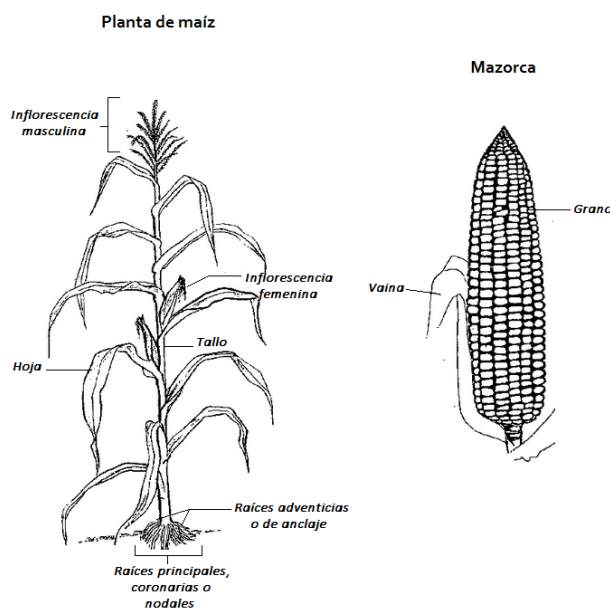
Filogenéticamente, se observó que el maíz es producto único derivado del *Zea mays ssp. Parviglumis* y que la domesticación comenzó hace 9, 000 A.C. (Matsuoka *et al.*, 2002), tiempo que es consistente con el último hallazgo arqueológico encontrado en la cuenca del río Balsas, al suroeste de México (lugar nativo del *Zea mays ssp.*

*Parviglumis*). Este hallazgo, el cual consiste de fitolitos y granos de almidón de maíz más antiguos encontrados hasta la fecha, sugiere que la domesticación del maíz inició hace 8 700 A.C., siendo la intervención humana un factor importante, dado que el maíz no se le puede encontrar como planta silvestre (Piperno *et al.*, 2009).

## **1.1.2. Morfología**

### **1.1.2.1. Planta de maíz**

El maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays*, es una planta monocotiledónea anual perteneciente a la familia de las poáceas (gramíneas). Su altura va desde los 0.5 m hasta los 4 m. Sus raíces principales son del tipo fibroso que llegan a profundizar de 20 hasta 50 cm. También posee raíces adventicias que crecen a partir del cuello del tallo y que ayudan al sostén de la planta. A diferencia de los demás cereales, el maíz es una especie monoica (sus inflorescencias masculinas y femeninas están separadas dentro de la misma planta), por lo que es una planta alógama (su polinización la efectúa el viento), de polinización abierta. En la parte superior se encuentra la inflorescencia masculina que forma las espigas, y en la parte media se encuentra la inflorescencia femenina que forma las mazorcas. En la mazorca, cada grano o semilla es un fruto independiente llamado cariósido, el cual está insertado en el olote y la cantidad de grano producido por mazorca se encuentra limitada por el número de granos por hilera, y de hileras por mazorca. El color de la semilla es muy variado, pero el más común es amarillo; con respecto a su forma, esta puede ser prismática, ovoide, lisa,... (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquemas de la planta y mazorca de maíz

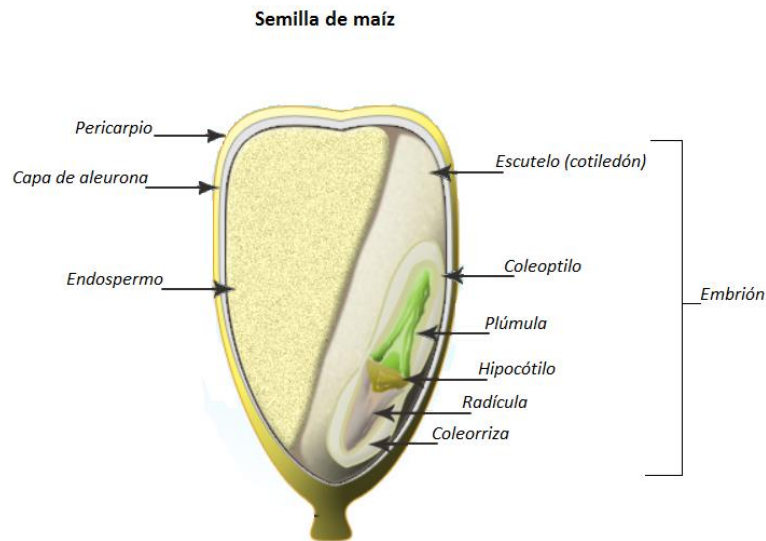
(Modificado de Bergmann y Butler, 1985)

### 1.1.2.2. Semilla de maíz

La semilla está constituida principalmente por tres estructuras:

- **Pericarpio:** Es la cubierta, generalmente dura, que cubre y protege a la semilla del medio exterior. Es resistente al agua, y una lesión en ésta puede inutilizar a la semilla.
- **Endospermo:** Es la reserva alimenticia de la semilla, está compuesta por un 80% de almidón, 10% de proteína y el resto son aceites minerales. Su función principal consiste en proporcionar alimento energético a la planta joven hasta que sus raíces estén bien desarrolladas y las hojas puedan elaborar sustancias energéticas en cantidades suficientes para satisfacer sus necesidades. La capa más externa del endospermo se le conoce como capa de aleuronas y su función es la de ayudar a mantener un desarrollo adecuado al embrión (regulando el pH, liberación de amilasas para la hidrólisis del almidón, proteasas, etc.).
- **Embrión:** Contiene la información genética, enzimas, lípidos, vitaminas y minerales esenciales para el crecimiento de la semilla a la plántula. Está

formado por el eje embrionario, integrado a su vez por la plúmula y la radícula (esbozos embrionarios de tallo y hojas, y de la raíz de la nueva planta); y por el escutelo o cotiledón, cuya función es la de servir de reserva a la semilla y la plántula en sus primeras etapas de desarrollo. El escutelo es rico en aceites y otros productos necesarios para la activación y crecimiento de la semilla y la plántula. El coleoptilo es la primera hoja que sirve de protección a la plúmula, mientras que la coleorriza es una capa protectora de la radícula.



**Figura 2.** Diagrama de la semilla del maíz

(Obtenido de [biochembio.com](http://biochembio.com), 2013)

La función de la semilla es la de multiplicar y perpetuar la especie, siendo uno de los elementos más eficaces para que la especie se disperse, tanto en el tiempo como en el espacio. Para que la semilla cumpla con su objetivo, es necesario que el embrión se transforme en una plántula capaz de valerse por sí misma y se convierta en una planta adulta, y para esto, es indispensable que se lleve a cabo una serie de procesos metabólicos y morfogénéticos cuyo resultado final es la germinación de la semilla.

## 1.2. Germinación

La germinación de la semilla es una fase crítica en el ciclo de vida de la planta y el primer paso para el establecimiento exitoso de la misma, por lo que este proceso fisiológico ha sido analizado ampliamente en diversos campos de estudio, dando como resultado un gran número de definiciones al término de germinación. Por ejemplo, para los agrónomos, la germinación abarca desde el periodo de imbibición de la semilla hasta cuando la plántula ha emergido a la superficie; mientras que para los fisiólogos vegetales, la germinación termina cuando protruye la radícula (a veces también referido como germinación visible) aun cuando los procesos de proliferación celular pudieran no haber comenzado, dado que el inicio de la protrusión radicular ocurre por elongación celular causada por el potencial hídrico del medio (Bewley, 1997).

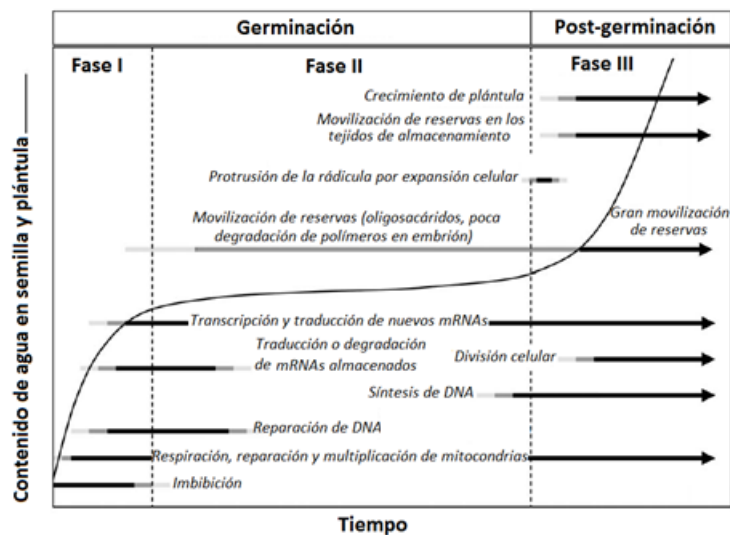
Analizando los diversos significados que le han atribuido al término de germinación, podemos observar que todas coinciden en que la germinación inicia con la imbibición de la semilla, mas difieren en la culminación. Es por esto que nuestro grupo de investigación ha adoptado una definición propia de germinación dándole un enfoque bioquímico, con el objetivo de limitar y enfocar nuestra comprensión del término de germinación a nivel molecular. Basándonos en el hecho de que uno de los principales eventos de la germinación es la de restablecer las condiciones óptimas para el reinicio de la proliferación celular, que subsecuentemente junto con la elongación y diferenciación celular llevará al desarrollo de la plántula, la germinación es un conjunto de procesos bioquímicos y moleculares que comienzan con la entrada de agua a la semilla y culmina con el término de la primera ronda de divisiones celulares exitosas (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la germinación de la semilla inicia cuando entra en contacto con el agua bajo condiciones favorables. Este proceso consta de tres fases: fase de hidratación (Fase I), de germinación (Fase II) y fase de crecimiento (Fase III). La Fase I corresponde al ingreso rápido del agua al interior de las semillas secas (imbibición). La entrada de agua se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea; en condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior (McDonald y

Kwong, 2005). Dado que el secado y la rehidratación de la semilla imponen un considerable daño a los componentes celulares, esta fase consiste principalmente en mecanismos de reparación celular, entre los cuales está la reparación de DNA, mitocondrias y membranas (Bewley, 1997; Weitbrecht *et al.*, 2011).

En la Fase II, son los factores ambientales y la fisiología de la semilla los que determinan si se continúa con el proceso de germinación. En esta fase se llevan a cabo diversos eventos metabólicos, como la transcripción de nuevos genes, la síntesis de enzimas relacionados con el crecimiento del embrión, el inicio de la movilización de las reservas del endospermo, la síntesis de DNA, entre otros. Durante esta fase se observa que la cantidad de agua permanece o incrementa muy poco en el interior de la semilla (Bradford y Nonogaki, 2007).

La Fase III presenta un incremento en la absorción de agua, así como cambios morfológicos visibles en la semilla. Esta fase se caracteriza por la protrusión de la radícula previo a la división celular, y a la movilización de las reservas nutritivas de la semilla que mantendrán, energéticamente, las primeras etapas del desarrollo de la plántula (Bradford y Nonogaki, 2007).



**Figura 3.** Curso temporal de los procesos celulares realizados durante la germinación de semillas.

(Modificado de Nonogaki *et al.*, 2010)

Una vez que se ha reactivado metabólicamente la semilla y restablecido las condiciones óptimas dentro de ésta, el siguiente paso para la culminación de la germinación de la semilla y el establecimiento exitoso de la plántula es la proliferación celular, la cual consiste en la formación de nuevas células hijas a partir de la división de material celular proveniente de células preexistentes. La coordinación de los eventos que permiten una proliferación ordenada está dada por el proceso conocido como ciclo celular.

### **1.3. Ciclo Celular**

El ciclo celular es uno de los procesos biológicos fundamentales relacionados con el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares que, al ser conjuntado de manera continua con la diferenciación celular, dará lugar a la formación y crecimiento, en este caso, de la planta. Este proceso está conformado por una serie de eventos moleculares coordinados de manera temporal y espacial que permite a las células duplicar y segregarse sus cromosomas para producir nuevas células.

Tradicionalmente, el ciclo celular ha sido dividido en 4 fases: G1, S, G2 (colectivamente conocidas como interfase), y M (la cual se compone de dos procesos estrechamente acoplados: la mitosis y la citocinesis). La activación de cada fase es dependiente de la progresión y terminación adecuada de la anterior.

La fase G1 (de gap o espacio), que sigue a la citocinesis y precede a la fase S, es un periodo de actividad bioquímica intensa. La célula incrementa el material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número, dando como resultado un incremento en el tamaño celular. En esta fase la célula queda habilitada para producir todas las proteínas necesarias para la replicación del DNA. Durante la etapa temprana de la fase G1, la célula percibe las condiciones medio-ambientales y revisa su estado metabólico antes de avanzar hasta una etapa de compromiso en el ciclo, definida por un punto en el que la célula decide si se compromete o no a completar el ciclo celular.

Habiendo condiciones adecuadas para la proliferación, la replicación del DNA se realiza en la fase S (de síntesis), en donde, además de la replicación de los cromosomas, las histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y otras proteínas asociadas al DNA son sintetizadas (DNA polimerasa, ligasas, topoisomerasas,...).

La fase G2 (gap 2), que separa la fase S de la subsecuente fase M, tendrá como principal función el asegurarse que el material genético ha sido correctamente duplicado y que existen las condiciones necesarias para entrar a la última fase. Todos los organelos y la maquinaria necesaria esencial para la división de la célula progenitora se adquieren en esta etapa.

Finalmente, durante la fase M (mitosis), los cromosomas duplicados son compactados, alineados en el plano de metafase y cada copia de los cromosomas es movilizad hacia extremos opuestos de la célula, lo que permitirá la formación de dos núcleos con idéntica información genética. La segregación cromosómica es seguida, usualmente, por la división celular, denominada citocinesis.

Durante la citocinesis, el citoplasma se divide mediante un proceso llamado segmentación, el cual es dirigido por el huso mitótico. La partición en dos células hijas se da gracias a movimientos contráctiles producidos por los filamentos de actina y miosina presentes en el momento de la citocinesis (Lomanto Díaz *et al.*, 2003; Nasmyth, 1996; Vázquez-Ramos, 2006; Godínez-Palma y Vázquez-Ramos, 2013).

Dado que es un ciclo, a la salida de la fase M las células se encontrarán nuevamente en G1, y, si las condiciones ambientales son óptimas, una nueva ronda de eventos moleculares dará origen a un nuevo ciclo, promoviendo así la proliferación celular.

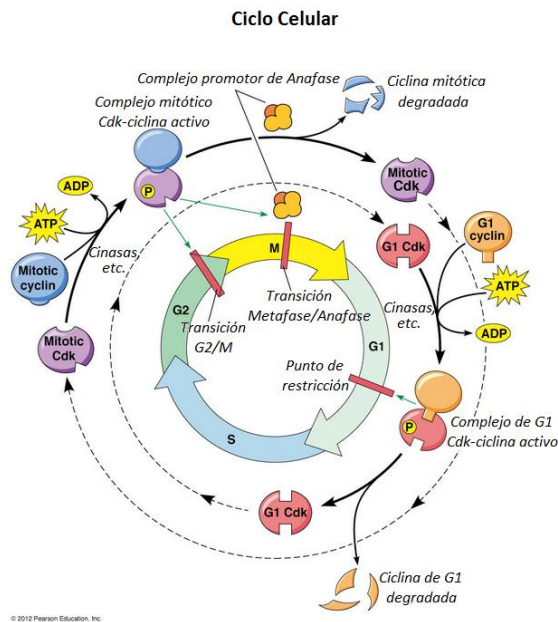


### 1.3.1. Regulación del ciclo celular

Dado que la regulación de los eventos que constituyen el ciclo celular es muy estricta y las diferentes fases que lo conforman siguen un determinado orden, la célula ha evolucionado puntos de control (checkpoints) sofisticados para asegurar que los eventos críticos, como la replicación de DNA y la división celular, ocurran en el correcto orden y que cada paso requerido sea completado antes de seguir a la siguiente fase. Hay dos principales puntos en el ciclo celular que son regulados por los puntos de control: la transición de G1/S, y la de G2/M. Otro punto fundamental de control es durante la mitosis, en la transición de metafase a anafase, donde la célula verifica que todos los cromosomas estén unidos correctamente a los microtúbulos del huso mitótico y estén alineados en el plano de metafase (Godínez-Palma y Vázquez-Ramos, 2013).

La transición de G1/S es vital, dado que una vez que la célula se compromete a dividirse y empieza a replicar su DNA debe completar el ciclo, de lo contrario morirá. Una vez que el DNA ha sido replicado completamente, la transición de G2/M es importante para la célula, pues se asegura que todo el DNA ha sido copiado correctamente, o las células hijas no poseerán todo el material genético derivada de su antecesora.

Siendo que la división celular es una de las características esenciales de la vida, el mecanismo general de regulación del proceso de las células a través de su ciclo celular está muy conservado en la evolución, y las plantas han mantenido los componentes básicos de este mecanismo. Dicho mecanismo involucra la activación de una clase especial de proteínas cinasas de serina y treonina, cuya actividad funcional depende de la unión de proteínas reguladoras conocidas como ciclinas (Cyc), y por tanto se les denomina cinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Dewitte y Murray, 2003). Diferentes complejos de CDK-Cyc fosforilan una vasta cantidad de sustratos en los puntos de transición de G1/S y G2/M, iniciando así la replicación del DNA y la mitosis, respectivamente. La subunidad catalítica de la CDK es la responsable de reconocer el motivo blanco de fosforilación (una serina o treonina seguida de una prolina) presente en la proteína sustrato, mientras que la ciclina regulatoria juega un papel importante en la especificidad del mismo (De Veylder e Inzé, 2006).



**Figura 4.** Progresión del ciclo celular mediado por los distintos complejos de CDK-Cyc  
(Modificado de Pearson Education, 2012)

### 1.3.1.1. Cinasas dependientes de ciclinas

Las CDKs de plantas son enzimas que transfieren un fosfato del ATP a un residuo de serina o treonina específico de proteínas estructurales regulatorias, causando un cambio conformacional en su estructura tridimensional (Srivastava, 2002). Estos cambios conformacionales son los responsables de llevar a la célula a través de los puntos de control, por lo que a las CDKs se les considera como los reguladores centrales del ciclo celular. A pesar de que hasta la fecha se han clasificado a las CDKs en 7 grupos (de A a G) usando como criterio su motivo de unión a ciclinas, sólo los grupos de CDKA y CDKB se han identificado como mediadores directos del ciclo celular (Pereira *et al.*, 2012; De Veylder *et al.*, 2007).

Las CDKs de tipo A presentan el motivo de unión a ciclina PSTAIRE, y su transcrito y niveles de proteínas son constantes a través del ciclo celular, lo que indica que interactúan con distintas ciclinas en cada fase del ciclo celular. Por ende, estarían involucradas en la proliferación celular y en el mantenimiento de una adecuada división celular en tejidos diferenciados durante el desarrollo de la planta (De Veylder e Inzé, 2006).

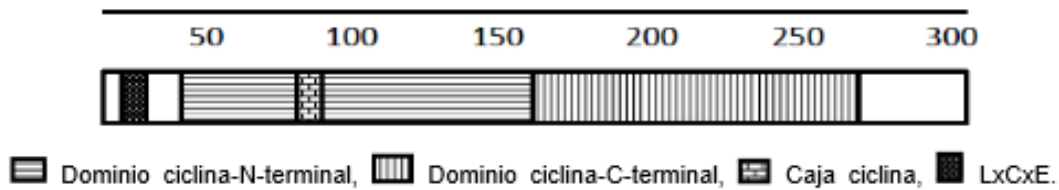
El segundo miembro de la familia de CDKs, CDKB, posee secuencias de unión a las ciclinas PPTALRE o PPTTLRE, según si es CDKB1 o CDKB2 respectivamente, las cuales son exclusivas de plantas. La expresión de estas CDKs es dependiente del ciclo celular, acumulándose principalmente en la transición de G2/M, por lo que estarían interaccionando con las ciclinas mitóticas (Mironov *et al.*, 1999; Lapidot-Lifson *et al.*, 1992).

Para que las CDKs se activen totalmente es necesaria la fosforilación de un residuo de aminoácido clave en la proteína CDK mediada por la cinasa activadora de CDK (CAK), posterior a la asociación de la CDK con una ciclina, dado que esta asociación sólo activa a la cinasa parcialmente. Adicionalmente, las ciclinas tienen la función de discriminar a distintas proteínas como sustratos para las CDKs (Pereira *et al.*, 2012).

#### 1.3.1.2. Ciclinas

El nombre de ciclina proviene del comportamiento transitorio y cíclico que presenta a lo largo del ciclo celular. El genoma de plantas codifica para un vasto número de ciclinas en comparación de otros organismos, esto puede deberse a que la planta haya desarrollado una maquinaria rigurosa pero a la vez flexible del ciclo celular para responder eficazmente a las fluctuaciones ambientales que pudieran alterar su crecimiento meristemático y desarrollo post-embriionario (Pereira *et al.*, 2012).

Las ciclinas presentan una región conservada de 250 aminoácidos, llamado centro de ciclina, la cual consiste de dos dominios llamados amino (N) y carboxilo (C) terminal. El dominio carboxilo terminal está presente en muchas pero no en todas las ciclinas, lo que sugiere que provee una función específica o adicional, pero quizá no crítica. El dominio amino terminal tiene una longitud aproximada de 120 aminoácidos y dentro de esta región se encuentra una secuencia conservada de 8 aminoácidos llamada caja de ciclina, que sirve de sitio de unión a CDK (Menges *et al.*, 2007) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Representación esquemática de los dominios característicos de las ciclinas.  
(Modificado de Buendía-Monreal, 2008)

Utilizando esta secuencia conservada, las ciclinas se clasifican en 8 grupos (A, B, C, D, H, L, P y T). También han sido clasificadas como mitóticas o de G1, dependiendo de la fase en la que activan a la CDK a la cual están asociadas. Hasta el momento, las ciclinas mejor descritas en relación al ciclo celular son los tipos A, B y D (Pereira *et al.*, 2012; Srivastava, 2002).

Las ciclinas tipo A y B son consideradas como ciclinas mitóticas. La ciclina A aparece en la fase S y es funcional en S y durante la transición G2/M, mientras que la ciclina B se acumula durante la fase G2 y al inicio de la fase M, siendo fundamental en el proceso mitótico (Doerner *et al.*, 1996; Magnard *et al.*, 2001). Estas ciclinas forman complejos activos con CDKA y CDKB, y presentan en su lado amino del centro de ciclina secuencias requeridas para su degradación mediada por el proteasoma, llamada caja de destrucción (Srivastava, 2002).

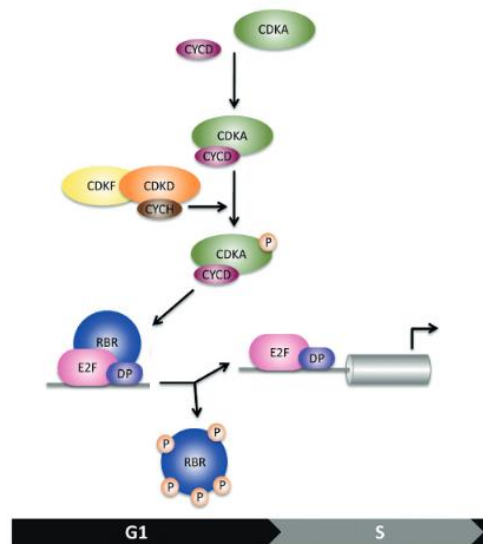
Las ciclinas tipo D (o ciclinas de G1) actúan como sensores de los estímulos externos, por lo que su presencia es un factor regulatorio fundamental para el inicio del ciclo celular. Estas ciclinas muestran una expresión dependiente del ciclo y, dependiendo de su mecanismo de destrucción, pueden ser inestables a lo largo del ciclo o sólo en determinadas fases del mismo. Su degradación todavía no está bien estudiada; sin embargo, hay evidencia de degradación mediante el sistema de ubiquitinación-proteasoma y la mayoría de estas ciclinas poseen regiones ricas con la secuencia prolina-glutámico-serina-treonina (PEST) en el extremo carboxilo del centro de ciclina. Esta secuencia PEST ha sido vinculada con la rápida degradación de proteínas de vida media corta (Godínez-Palma *et al.*, 2013; Srivastava, 2002).

Otra característica de las ciclinas tipo D es que controlan la ruta en la que están involucradas la proteína RBR (proteína relacionada al retinoblastoma) y los factores de

transcripción E2F/DP, gracias a que en su extremo amino terminal presentan el motivo LxCxE, el cual les permite unirse a la proteína RBR. De manera que estas ciclinas son los mediadores primarios de la activación de la transición G1/S y tienen la responsabilidad de estimular el avance del ciclo celular (Gódinez Palma *et al.*, 2013; Colli-Mull *et al.*, 2007).

### 1.3.1.3. Transición G1/S

En células arrestadas en G1, el factor E2F/DP está unido a la proteína RBR (un factor antiproliferativo), la cual recluta desacetilasas de histonas las que, al promover la compactación de la cromatina, impiden la expresión génica y consecuentemente la progresión de la fase G1 a S. En presencia de señales extracelulares (hormonas y factores de crecimiento), la transcripción de las ciclinas tipo D es activada, ocasionando un aumento de niveles de proteína presente en la célula y favoreciendo de esta forma la formación de complejos inactivos con CDKA. Una vez que los complejos CDKA-CycD se vuelven activos por la fosforilación mediada por CAK, estos son capaces de fosforilar y desactivar a RBR, liberando el complejo E2F/DP, que funciona como activador transcripcional, lo que permite la expresión de genes requeridos para la transición G1/S (Nakagami *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2007; Boniotti y Gutierrez, 2001) (Figura 6).



**Figura 6.** Mecanismo molecular propuesto para la transición G1/S en plantas.

(Modificado de Pereira *et al.*, 2012)

Dentro de los genes regulados por esta vía podemos encontrar a los de ciclina A, los de histonas, y los involucrados en la síntesis de DNA, como la DNA polimerasa  $\delta$  y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Ramirez-Parra *et al.*, 2003). PCNA es una proteína importante durante la progresión del ciclo celular dado que, aparte de ser un factor de procesividad para la DNA polimerasa  $\delta$  durante la replicación del DNA, también se le ha encontrado asociada a distintas proteínas que participan en la proliferación celular, entre las cuales se incluye a los complejos CDK-Cyc.

#### **1.4. Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)**

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es un miembro de la familia proteica de tenazas deslizantes el cual contiene miembros en eubacterias, arqueobacterias y eucariotas (Zhuang y Ai, 2010). A pesar de que no hay homología en las secuencias entre varias tenazas pertenecientes a estos 3 dominios de vida, estudios cristalográficos han mostrado que hay una similitud estructural entre ellos. Todos adquieren una estructura anular con una gran cavidad central en donde pueden acomodar el DNA. Interesantemente, todas las tenazas desarrollan funciones similares como proteínas de andamiaje, factores de procesividad, y estaciones de unión (docking) durante múltiples procesos celulares (Naryzhny, 2008).

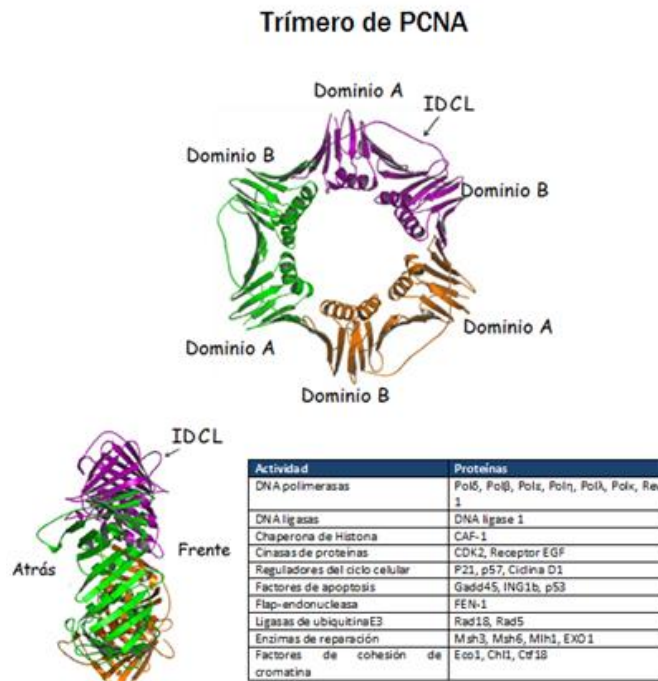
PCNA es una proteína nuclear y su transporte al núcleo es mediada por la importina  $\beta$  (Kim y Lee, 2008). Esta proteína es detectable durante todo el ciclo celular y fue originalmente identificada hace 30 años como un antígeno de una enfermedad autoinmune en pacientes que padecían lupus eritematoso sistémico. Por ese tiempo se observó que PCNA se expresaba diferencialmente durante el ciclo celular, mostrando un máximo en la fase S y que co-localizaba con DNA. Posteriormente con ensayos *in vitro* se confirmó su papel en la replicación de DNA como un factor esencial para la replicación. Ahora se conoce que PCNA participa en varios procesos aparte de la replicación, como la reparación de DNA, remodelación y ensamblaje cromosómico, cohesión de cromátidas y regulación de los puntos de control del ciclo celular (Naryzhny, 2008). La función de PCNA como proteína de andamiaje o estación de unión (docking) en todos estos procesos es mediada a través de interacciones proteína-proteína.

Estudios de cristalografía revelaron que PCNA forma un anillo homotrimérico. Cada monómero consiste de 2 dominios independientes, con el dominio N-terminal referido como dominio A y el extremo C-terminal como el dominio B. Cada dominio está unido a través de un conector flexible, llamado asa conectora de interdominios (IDCL), que actúa como un sitio de unión para varias proteínas (Sakurai *et al.*, 2005; Hishiki *et al.*, 2009). Para formar la estructura final de anillo, 3 monómeros se organizan en forma de cabeza-cola, con el dominio A de una subunidad interactuando con el dominio B de la subunidad adyacente. Mientras que el potencial electrostático general de PCNA es negativo, la superficie interna del anillo está cargada positivamente dada la presencia de varios residuos de lisina y arginina. Estas cargas positivas localizadas facilitan el paso de DNA cargado negativamente a través de PCNA y permite subsecuentemente el deslizamiento de la tenaza a lo largo del DNA (Moldovan *et al.*, 2007; Stzalka y Ziemienowicz, 2011).

El anillo de PCNA posee un frente y reverso distintivos. El frente de PCNA está involucrado en interacciones proteína-proteína y contiene el IDCL (Jonsson *et al.*, 1998). La función celular de PCNA es completamente dependiente de estas interacciones y hay una lista creciente de proteínas que se unen al frente de PCNA. Esta lista incluye proteínas involucradas en la replicación de DNA, reparación, control del ciclo celular, remodelación de cromatina, transcripción. PCNA interacciona con casi todas estas proteínas a través de un surco hidrofóbico localizado en la parte delantera de PCNA en el IDCL. Es importante mencionar que cada monómero contiene un sitio equivalente de unión y esto permite que 3 proteínas se unan al trímero de PCNA simultáneamente.

El análisis de proteínas unidas a PCNA ha revelado un motivo conservado de interacción peptídica-PCNA (PIP) que está definido como Qxx(M/L/I)xxF(Y/F) donde x es cualquier residuo. Este motivo PIP está localizado frecuentemente en el extremo C-terminal o en una región flexible del compañero que interacciona con PCNA. Esto permite a la proteína una interacción estable con PCNA, mas no restringe el movimiento, permitiendo cierta flexibilidad con respecto a su orientación en el anillo. Mutaciones en PIP de diversas proteínas resulta en la pérdida de su función *in vivo*, resaltando su importancia en las interacciones PIP-PCNA. Se cree que la unión de las

proteínas a PCNA ocurre de manera competitiva y es dependiente de la concentración local de la proteína y la afinidad del motivo PIP de las distintas proteínas para PCNA (Maga *et al.*, 2003; Moldovan *et al.*, 2007).



**Figura 7.** Estructura de PCNA y algunas proteínas que interactúan con él.  
(Modificado a partir de Moldovan *et al.*, 2007)

Con respecto a la parte reversa del anillo, no existe aún evidencia de unión con alguna proteína. Esto podría deberse a que PCNA utiliza la parte posterior de su anillo para juntarse con otro anillo de PCNA, formando así el doble trímero. Este doble trímero se ha observado en humanos y maíz, más no se descarta su presencia en otros organismos dado que su presencia parece ser clave para que se lleve a cabo la replicación y reparación del DNA, debido a que pueden unirse varias proteínas esenciales a la vez para estos procesos. Por ejemplo, la DNA polimerasa  $\delta$  y CAF-1 son necesarias para la replicación, y siendo que la DNA polimerasa, por su tamaño, abarca todo el frente del anillo, es muy difícil que CAF-1 se uniera, a menos que PCNA tuviera otro frente en donde pueda asociarse. Adicionalmente, las mutantes que no pueden formar el doble trímero de PCNA activan la señalización de muerte celular (Kim y Lee, 2008; Naryzhny *et al.*, 2005).



### 1.4.1. PCNA en el ciclo celular

PCNA interactúa con diversas proteínas eucariotas del ciclo celular. Análisis bioquímicos de PCNA de animal mostraron interacción de esta proteína con los complejos CDK2-CycA. La unión de CDK2 a la región C-terminal del trímero PCNA produce un complejo ternario activo PCNA-CDK2-CycA. Por lo que PCNA pareciera actuar como un conector entre CDK2 y sus sustratos, estimulando su fosforilación. Esto podría representar un importante mecanismo de regulación para el reclutamiento de proteínas específicas a los sitios de replicación de DNA (Koundrioukoff *et al.*, 2000).

Por otro lado se observó que cuando hay daño en el DNA o las células van a diferenciarse, PCNA se encuentra formando un complejo cuaternario entre p21 y el complejo CDK-Cyc. Este complejo impide la progresión de la fase G1 a S. *In vitro* la unión de PCNA con p21 resulta en la inhibición de la replicación de DNA. Una posible explicación es que p21 previene a PCNA de unirse a la maquinaria del ciclo celular como la de replicación (Maga *et al.*, 2003).

Este esquema nos permite visualizar un escenario en donde PCNA es un transductor así como un blanco de señales positivas y negativas. La unión de PCNA con los complejos CDK-Cyc ayuda a llevar estas proteínas regulatorias hacia sus sustratos, mientras que el rompimiento de estas interacciones por la unión competitiva de p21 es una señal de arresto del ciclo. Además, se ha visto que el reclutamiento de PCNA a los sitios de replicación es regulado por fosforilación dependiente del ciclo celular (Maga *et al.*, 2003; Strzalka y Ziemienowicz, 2011).

## 1.5. Técnica de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

Siendo que las interacciones proteína-DNA desempeñan un papel importante en la regulación de diversas funciones celulares (como la transcripción, replicación del DNA y progresión del ciclo celular), surge la necesidad de conocer como estas uniones afectan el funcionamiento de los genes e identificar que proteína en particular se une a determinada secuencia de DNA.

Anteriormente, se utilizaban métodos *in vitro* para estudiar las asociaciones de las proteínas con el DNA; sin embargo, estos ensayos no tomaban en cuenta el contexto fisiológico de la célula y tenían una utilidad limitada. Hoy en día, la técnica de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP) es ampliamente empleada para determinar *in vivo* la localización de los sitios de unión de varios factores de transcripción, histonas y otras proteínas. Dado que la proteína es capturada en el sitio donde se une al DNA, la ChIP ayuda a detectar, y dar un panorama, de las interacciones proteína-DNA que ocurren dentro del núcleo de las células. Además, puede acoplarse a otras técnicas de biología molecular como PCR, Western-blot, Southern-blot, entre otros (Shengxi, 2006; Haring *et al.*, 2007).

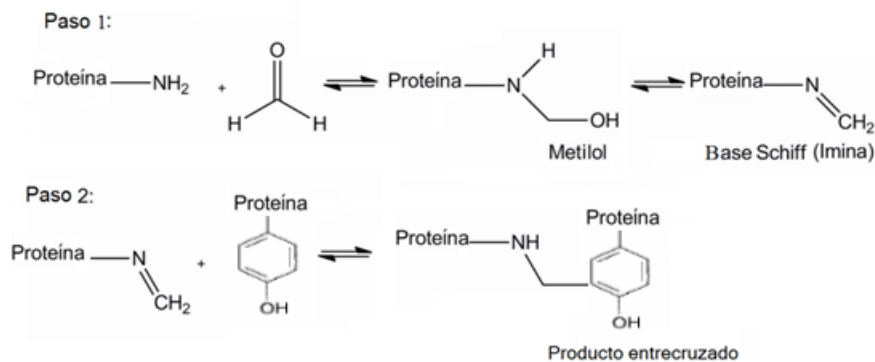
Existen dos aproximaciones para esta técnica: una en donde se usa la cromatina en su estado nativo (nChIP) y es empleada para el estudio de proteínas que tienen gran afinidad por el DNA como las histonas; otra que utiliza un agente entrecruzante para fijar a la cromatina (xChIP) y sirve para analizar proteínas que no interactúan fuertemente con el DNA, entre ellas las proteínas no histónicas (Das *et al.*, 2004).

A pesar de que la técnica es muy versátil, tiene diversas limitaciones y requiere la optimización de las condiciones para una extracción exitosa del DNA.

La ChIP usualmente consta de 3 pasos: la fijación *in vivo* de las proteínas unidas al DNA mediante la utilización de un agente entrecruzante (sólo para xChIP) sobre células intactas, obtención y fragmentación de cromatina, y la inmunoprecipitación selectiva de complejos proteína-DNA en cromatina.

### 1.5.1. Entrecruzamiento o Fijación

El primer paso de la técnica (para xChIP) es el entrecruzamiento del DNA y las proteínas. El formaldehído es el agente entrecruzante más empleado debido a que es más fácil revertir su efecto y a su habilidad de formar uniones entre moléculas que tienen una asociación muy estrecha entre ellas (con una separación máxima de 2 Å). El formaldehído entra a las células a través de la membrana celular y fija las proteínas a la cromatina. Los grupos amino de los aminoácidos (lisinas, histidinas, argininas) y los de DNA (principalmente adeninas y citosinas) reaccionan con el formaldehído formando las bases de Schiff. Este intermediario reacciona con otro grupo amino, dando los complejos finales (Orlando V., 2000) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Entrecruzamiento de proteínas.

(Modificado de Wu *et al.*, 2011)

Este agente provoca la unión proteína-DNA, proteína-RNA, proteína-proteína y preserva intacta la estructura de la cromatina. Adicionalmente, inactiva todas las enzimas celulares esenciales en el momento de su adición, por lo que proporciona una imagen instantánea de las interacciones proteína-DNA/RNA/proteína en un momento determinado del ciclo celular (Das *et al.*, 2004; Shengxi, 2006).

La fijación puede revertirse al calentar a 65 °C, pero el tiempo así como el tiempo de entrecruzamiento deben ser determinados experimentalmente. Un entrecruzamiento excesivo puede dificultar la fragmentación, así como la pérdida de material para inmunoprecipitar (Das *et al.*, 2004).

### **1.5.2. Fragmentación**

La resolución obtenida por la ChIP está determinada por el tamaño de los fragmentos de cromatina. Reduciendo el tamaño de los complejos proteína-DNA en la población de la cromatina, la fragmentación permite a la ChIP precipitar tamaños pequeños de DNA que son más cercanos a los sitios de unión de la proteína de interés. También sirve para solubilizar las muestras de cromatina y por lo tanto hace accesible los epítopos de los complejos proteína-DNA a los anticuerpos usados para inmunoprecipitar. Dependiendo del objetivo del estudio será el tamaño del fragmento, pero generalmente se utilizan fragmentos de 250-750 pb, debido a que en este intervalo se disminuye la probabilidad de perder la interacción de la proteína con su sitio de unión al DNA, y a que se facilite la inmunoprecipitación del complejo con el anticuerpo empleado (Das *et al.*, 2004; Haring *et al.*, 2007).

La digestión del DNA por enzimas nucleasas es uno de los métodos más utilizados para la fragmentación de la cromatina; el otro es la sonicación. La digestión enzimática usando la nucleasa micrococcal es más específica, rápida y reproducible, debido a que se tiene un mejor control en el proceso a comparación de la sonicación (donde se puede calentar y formar espuma a la muestra, afectando su integridad) (Das *et al.*, 2004; Meyers, 2012). La enzima, al ser una nucleasa no específica, digiere zonas del material genético en donde tiene acceso (principalmente en las regiones de unión entre nucleosomas), por lo que los fragmentos resultantes son alrededor de 146 pb. Sin embargo, esto puede controlarse al variar la cantidad y el tiempo de acción de la enzima utilizada (Bryant, 1997).

### **1.5.3. Inmunoprecipitación**

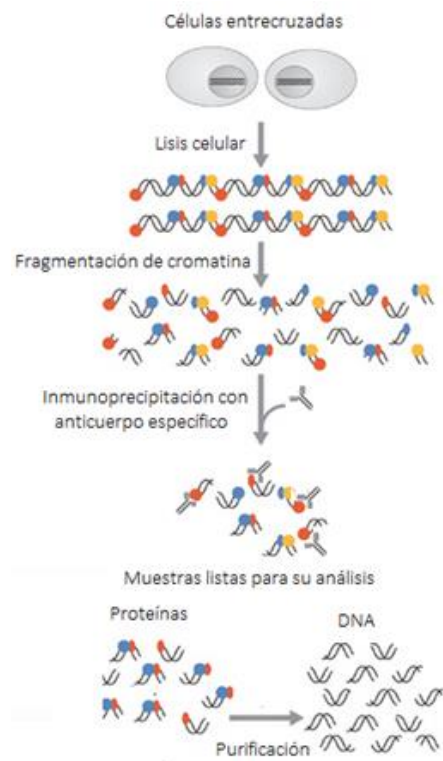
La inmunoprecipitación es el paso más importante de la técnica y depende de varios factores importantes, los cuales incluyen la calidad y cantidad de anticuerpo, las soluciones y los inhibidores de proteasas.

Los anticuerpos deben tener una alta afinidad y especificidad por su epítipo en proteínas entrecruzadas con formaldehído. Adicionalmente es preferible el uso de anticuerpos policlonales sobre los monoclonales debido a que los primeros pueden

reconocer más epítopes, superando así el posible enmascaramiento de estas zonas ocasionado por la fijación con el formaldehído o su unión con el DNA (Das *et al.*, 2004; Shengxi, 2006).

Las soluciones y los inhibidores tienen la función de favorecer el inmunoreconocimiento entre el anticuerpo y el complejo proteína-DNA/proteína. Las soluciones, que contienen detergente, ayudan a incrementar la solubilidad de los fragmentos de cromatina para que el anticuerpo tenga un fácil acceso a su epítopo, mientras que los inhibidores mantienen la integridad del complejo al inhibir las proteasas presentes en el medio (Shengxi, 2006).

Posteriormente, el DNA es liberado de las proteínas y puede ser analizado por distintos métodos (PCR, Southern-blot, técnicas de microarreglos,...). Las proteínas, por su parte, pueden ser analizadas empleando técnicas como el Western-blot.



**Figura 9.** Técnica de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)  
(Modificado de Massie *et al.*, 2008)

## 2. ANTECEDENTES

En maíz, se ha observado que los niveles de proteína de PCNA van aumentando conforme avanza la germinación. Interesantemente, en núcleo se ve un incremento progresivo de la concentración de PCNA, mientras que en el citoplasma va disminuyendo (Martínez-Mata, 2011).

Por otro lado, se ha reportado que en extracto totales de ejes embrionarios de maíz los inmunoprecipitados de PCNA co-inmunoprecipitan con proteínas tipo CDKA, y este complejo presenta actividad de cinasa, siendo más relevante en las primeras horas de germinación (0-6h), que corresponden a la fase G1 del ciclo celular (Sánchez *et al.*, 2002). Conforme transcurre el tiempo de germinación, esta actividad se va debilitando. Adicionalmente, se ha demostrado que PCNA se asocia con las proteínas CycD2, D4, y D5 (Lara-Nuñez *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2000).

También se demostró que los complejos formados entre PCNA, CDKA y CycD4 sólo están presentes en cromatina, es decir, el complejo PCNA-CDKA-CycD4 únicamente se forma cuando PCNA está asociado al DNA (Martínez-Mata, 2011).

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en responder la interrogante de si los complejos asociados a PCNA poseen actividad de cinasa cuando PCNA está asociado a cromatina, utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), dado que esta técnica nos ayuda a estudiar interacciones proteína-DNA “*in vivo*”, proporcionando información valiosa sobre los procesos celulares que se llevan a cabo durante la progresión del ciclo celular asociados a cromatina.

De ser afirmativo, esto podría significar que PCNA funciona como una deslizadera para que estos complejos localicen a sus proteínas blanco y las fosforilen, promoviendo el avance del ciclo celular; y representando de esta forma otro mecanismo de regulación involucrado en la proliferación celular, el cual es mediado por PCNA.

### **3. HIPÓTESIS**

La actividad de cinasa del complejo PCNA-CDKA-CycD sólo existirá cuando el complejo esté asociado a cromatina.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo General**

Determinar si el complejo PCNA-CDKA-CycD posee actividad de cinasa sólo en la fracción de cromatina. Y en caso de ser activo, ver su comportamiento a lo largo de la germinación de ejes embrionarios de maíz.

#### **4.2. Objetivos particulares**

- Validar la técnica de ChIP
- Inmunoprecipitar el complejo proteico PCNA-CDKA-CycD de las fracciones de citoplasma y cromatina y determinar si este complejo está activo en las respectivas fracciones.
- Evaluar la actividad de cinasa del complejo anterior a distintos tiempos de germinación.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Material Biológico**

#### **5.1.1. Semillas de maíz**

Se utilizaron ejes embrionarios de semilla de maíz *Zea mays* Variedad Chalqueño obtenidas del Valle de Chalco, Estado de México, pertenecientes a la recolecta del 2012.

### **5.2. Métodos experimentales**

#### **5.2.1. Proceso de extracción de la cromatina**

##### **5.2.1.1. Obtención de ejes embrionarios de maíz**

Los ejes embrionarios se extrajeron cuidadosamente de la semilla de maíz utilizando una navaja con filo, tratando de remover la mayor cantidad de endospermo y escutelo sin dañar el eje embrionario. El material biológico obtenido se almacenó a 4 °C en un desecador hasta su empleo.

##### **5.2.1.2. Germinación de ejes embrionarios de maíz**

Para cada tratamiento se utilizaron 100 ejes embrionarios. Los ejes embrionarios se colocaron en un tubo Falcon de 50 mL, donde fueron desinfectados utilizando 10 mL de solución de hipoclorito de sodio al 0.1% (v/v) por 40 segundos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se empleó papel absorbente estéril para secarlos.

En cajas Petri estériles se colocaron papeles filtro estériles y se le adicionó 5 mL de solución de imbibición (*Tris-HCl* 50 mM, *KCl* 50 mM, *MgCl<sub>2</sub>* 10 mM y *sacarosa* 2% (m/v)), después, se colocaron los ejes embrionarios sobre el papel filtro de tal forma que cada eje estuviera en contacto con la solución y separado de los demás. El tiempo de inicio de la imbibición empezó una vez terminado el acomodamiento de los ejes



embrionarios sobre el papel filtro. Finalmente, la caja Petri fue sellada con papel Parafilm e incubada a 25°C por el tiempo de germinación establecido.

#### **5.2.1.3. Entrecruzamiento**

Una vez terminado el tiempo de germinación establecido, el material biológico se lavó 3 veces con agua destilada estéril y se secó usando papel absorbente estéril. Para el entrecruzamiento, el material fue sumergido en una solución de formaldehído al 1% (v/v) durante 2 horas, aplicándole vacío.

El tiempo de sumersión en formaldehído fue elegido basándose en la evidencia de que a este tiempo el trímero de PCNA se encuentra estable y hay suficiente cantidad de proteína en la fracción de cromatina que nos permite proseguir con los experimentos subsecuentes.

Al finalizar las 2 horas de entrecruzamiento, se le adicionó a la reacción glicina hasta alcanzar una concentración final de 0.2 M, esto con el propósito de neutralizar el formaldehído restante del medio, deteniendo así la reacción. Para favorecer la detención del entrecruzamiento se le aplicó nuevamente vacío por un lapso de 15 minutos. Después, los ejes embrionarios se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril.

#### **5.2.1.4. Extracción de la cromatina**

Estos ejes embrionarios, germinados y entrecruzados, se colocaron en un mortero (previamente enfriado a – 70 °C) y con la ayuda de nitrógeno líquido se trituraron y molieron hasta la obtención de un polvo muy fino. Luego, el polvo fue resuspendido en 20 mL de Solución de Extracción 1 (*sacarosa 0.4 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1x*) y se siguió mezclando. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 800 g durante 3 minutos, realizando después una filtración del sobrenadante para retener el material grueso y obtener un extracto total de la muestra (ET).

Se continuó con la centrifugación del extracto total, a una velocidad de 3, 000 g durante 30 minutos, con la finalidad de separar y precipitar el núcleo (junto con restos celulares)

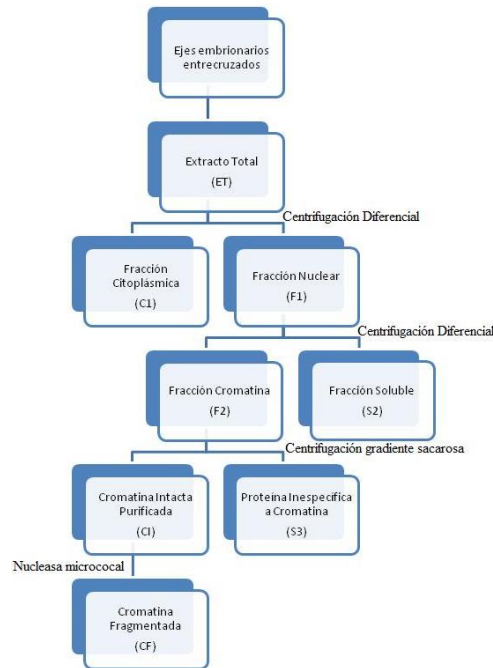
del citoplasma (C1). Este precipitado se resuspendió en 1 mL de Solución de Extracción 2 (*sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, Tritón X-100 2% (v/v), PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1x*), amortiguador cuya característica es su alta concentración de detergente que permite disociar las membranas de organelos como el núcleo. Al centrifugarlo a 20, 000 g por 30 minutos, se separan las proteínas que se encontraban dentro del núcleo, así como la cromatina (F2), mientras que en el sobrenadante se encuentran los restos celulares solubles (S2). El nuevo pellet fue resuspendido en 0.5 mL de Solución de Extracción 3 (*sacarosa 1.7 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, Tritón X-100 0.15% (v/v), PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1x*). Esta suspensión fue transferida cuidadosamente a otro tubo Eppendorf que contenía 0.75 mL de la misma solución de extracción, formándose dos fases en el tubo. Esta solución posee una alta concentración de sacarosa que por su alta densidad permite separar las proteínas que se encuentran unidas inespecíficamente a la cromatina. Centrifugando a 20, 000 g por 1.5 horas, se obtuvo la fracción soluble inespecífica a cromatina (S3) y la fracción de cromatina purificada (CIn).

Finalmente, se le adicionó a la fracción de cromatina 0.5 mL de Solución de Fragmentación (*Tris-HCl 10 mM pH 8, Tritón X-100 0.15 % (v/v), NaCl 10 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1x*), previo al proceso de fragmentación.

#### **5.2.1.5. Fragmentación de la cromatina**

La fragmentación se llevó a cabo por digestión enzimática, utilizando 5 unidades de nucleasa micrococcal de *Staphylococcus aureus* (SIGMA) para cada muestra. Para activar a la enzima, se le adicionó CaCl<sub>2</sub> a la reacción hasta una concentración final de 0.0025 M, incubándola a 37 °C por 30 minutos con agitación constante. Para detener la reacción, se agregó EGTA hasta una concentración final de 0.005 M, además de EDTA y PMSF hasta una concentración final de 0.001 M. La muestra obtenida corresponde a la fracción de cromatina fragmentada (CF).

## Proceso de Extracción de Cromatina



**Figura 10.** Diagrama de flujo utilizado para la realización de ChIP

## 5.2.2. Cuantificación de proteínas y DNA

### 5.2.2.1. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteínas en cada fracción obtenida se determinó mediante la técnica espectrofotométrica del ácido bicinonínico (BCA).

El ácido bicinonínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino. Primero, las proteínas reducen el ión  $\text{Cu}^{2+}$  del  $\text{CuSO}_4$  a  $\text{Cu}^+$  de forma concentración dependiente; este último luego es quelado por dos moléculas de ácido bicinonínico, formando un complejo púrpura soluble en agua cuya absorbancia puede medirse en un intervalo de longitud de onda de 550 a 570 nm, presentando una máxima a 562 nm.

Para realizar la cuantificación proteica, se preparó, por duplicado, una curva de calibrado usando albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como proteína patrón, en concentraciones de: 0, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ ; se agregó

a cada dilución 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de BCA preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, SIGMA-ALDRICH). Para las muestras, se realizaron duplicados y en cada uno se empleó 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra y 24  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, seguido de la adición de 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de BCA. Tanto la curva como las muestras se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Pasado este tiempo, se dejaron enfriar por un lapso de 15 minutos previo a la lectura de absorbancia.

La lectura se realizó empleando un espectrofotómetro Microplate Reader (Bio-Rad). Con las mediciones de la curva patrón se obtuvo una gráfica de una función lineal, la cual nos permitió conocer la concentración de proteínas en las muestras analizadas cuando se interpolaban sus valores en esta gráfica.

#### **5.2.2.2. Determinación de DNA en fracciones de cromatina**

Para la cuantificación de DNA se empleó un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies). Este equipo es de espectro total (220-750 nm, en donde a 260 nm el DNA muestra una absorbancia máxima), y nos permite cuantificar al DNA empleando solo 1  $\mu\text{L}$  de muestra. El proceso de medida se realizó por duplicado con cada muestra, esto con el fin de comprobar que la muestra estaba bien resuspendida. Si entre las dos medidas existía una variación superior a 10 ng/ $\mu\text{L}$ , la muestra se resuspendía de nuevo. La concentración final de DNA se obtuvo calculando la media aritmética de los datos de ambas medidas.

### **5.2.3. Ensayos de Inmunoprecipitación**

#### **5.2.3.1. Formación del complejo de inmunoprecipitado**

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de proteína A-agarosa imantada PureProteome (Millipore), 250  $\mu\text{L}$  de Solución de Inmunoprecipitación (Solución IP: *Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 2.5 mM y Tritón X-100 0.1% (v/v)*) y 7  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-PCNA de maíz. Se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente manteniendo agitación constante en un roscicero. Se eligió esta resina debido a que posee una gran afinidad por la región Fc

de las inmunoglobulinas IgG de conejos, así como es estable al calor y retiene su conformación nativa ante la presencia de agentes desnaturalizantes.

Después de la incubación, se lavó 3 veces la resina con 200  $\mu$ L de Solución IP, con la finalidad de retirar el anticuerpo que no se unió a ésta. Posteriormente, se agregó 200  $\mu$ g de proteína de la fracción de extracto total (ET), cromatina fragmentada (CF) o citoplasma (C1) para ser inmunoprecipitada, y se llevó a un volumen final de 500  $\mu$ L. Se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación constante en un roscicero. En este paso el antígeno presente en la muestra interacciona con el anticuerpo unido a la resina. A la mezcla incubada, se le realizaron 3 lavados de 5 minutos con 500  $\mu$ L de Solución de lavado IP (*Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 2.5 mM y Tritón X-100 0.5% (v/v)*) en agitación con roscicero.

#### **5.2.3.2. Elución del complejo de inmunoprecipitado**

Una vez terminados los lavados, la resina (que contiene al anticuerpo unido con su antígeno) se trató con 450  $\mu$ L de Solución de reversión (*Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 2 mM y SDS 0.1% (m/v)*) e inhibidor de proteasas; fue colocada en un termoblock a una temperatura de 65 °C durante 30 minutos para separar al anticuerpo de la resina. Finalizado este tiempo, el sobrenadante contiene al complejo inmune.

#### **5.2.3.3. Reversión del entrecruzamiento**

Para el estudio de las proteínas mediante la técnica de Western-Blot, las muestras empleadas tuvieron que ser revertidas (a excepción de aquellas en donde se quería ver la eficacia del entrecruzamiento), esto con el propósito de favorecer la entrada y separación de las proteínas durante el proceso de electroforesis, así como facilitar la inmunodetección de las proteínas en el Western-Blot.

En los ensayos, para ver la efectividad del entrecruzamiento así como de la reversión, se empleó 80  $\mu$ g de proteína de las fracciones de ET, CF y C1. Cada una se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se les añadió inhibidor de proteasas y se llevaron a un volumen final de 500  $\mu$ L con Solución de reversión. Sólo se revirtieron aquellas destinadas al ensayo del mismo nombre. En el caso de los inmunoprecipitados, el sobrenadante obtenido directamente pasó al proceso de reversión.

La reversión consiste en someter las muestras entrecruzadas a una determinada temperatura por cierto tiempo, donde el calor estimula la reversión de los enlaces de Schiff formados por el entrecruzamiento con el formaldehído. Siendo que este proceso es dependiente de la cantidad y tiempo de entrecruzamiento, las condiciones óptimas de reversión sólo pueden obtenerse de forma experimental.

En trabajos previos se determinó que la temperatura y tiempo óptimo de reversión son de 65 °C por 24 horas. Bajo estas condiciones se observó una completa reversión de las bases de Schiff. Por esta razón se decidió emplear las mismas condiciones para las distintas muestras destinadas a su estudio por Western-Blot.

#### **5.2.4. Extracción e identificación de DNA**

Para evaluar la eficacia de la fragmentación por parte de la nucleasa micrococcal, se utilizaron 20 µg de DNA de las fracciones de cromatina intacta (CIn) y cromatina fragmentada (CF). Con respecto a la observación de la presencia de DNA en los inmunoprecipitados de CF, se utilizó el equivalente de 100 y 200 µg de DNA de esta fracción celular.

Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL, llevándolas a un volumen final de 500 µL con Solución de reversión, y se revirtieron. Una vez revertidas, se agregó 50 µg de la enzima proteinasa K (FLUKA) para degradar las proteínas presentes, incubándolas a una temperatura de 60°C durante 1 hora. Después se le añadieron 500 µL de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó durante 30 segundos en vortex y se dejó reposar hasta la separación completa de fases.

Posteriormente se centrifugaron a una velocidad de 12 000 g durante 10 minutos, en donde los ácidos nucleicos se quedan en la fase acuosa (fenol), mientras que las proteínas degradadas se quedan en la fase orgánica (cloroformo). Se extrajo la fase acuosa y a cada muestra se le agregó 50 µL de acetato de sodio 3 M, 1 mL de etanol 100% (v/v) y se dejaron reposar toda la noche a -20°C, favoreciendo así la precipitación del DNA.

Se centrifugaron a una velocidad de 20 000 g durante 30 minutos. El pellet se lavó con 500 µL de etanol 70% (v/v) a una velocidad de 20 000 g durante 15 minutos. Finalmente los ácidos nucleicos fueron resuspendidos en 10 µL de Solución amortiguadora TE (*Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM*) y se le añadieron 0.5 µL de Solución de cargado (Azul de Bromofenol 0.025% (m/v), glicerol 60% (v/v)). Esta solución le confiere densidad a la muestra y permite visualizar el frente de corrida.

Para la identificación de DNA, se realizaron electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v). El gel se preparó con 50 mL de solución amortiguadora TBE (*Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 1 mM pH 8*) y 0.5 g de agarosa (Invitrogen). La mezcla se calentó y agitó hasta la incorporación total de la agarosa al medio. Posteriormente se agregaron 2 µL de bromuro de etidio. Se dejó enfriar un poco la solución, previo al vertido a la cámara electroforética. Se colocó el peine y se dejó gelificar durante 30 minutos. El gel fue sumergido en solución amortiguadora TBE.

Las muestras fueron cargadas en cada pozo y se corrió a una intensidad de 85 V durante 30 minutos. Se utilizó el equipo de detección de fluorescencia Digital Science Image Station 440CF (Kodak) para la toma de las fotografías.

#### **5.2.5. Preparación de muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

Las muestras utilizadas para el Western-Blot fueron concentradas mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA), agregando 125 µL de TCA 100% (v/v) al volumen de la muestra utilizado. Se incubaron en hielo por 15 minutos y se centrifugaron a una velocidad de 12 000 g durante otros 15 minutos. El pellet se lavó 2 veces con 200 µL de acetona fría a una velocidad de 12 000 g por un lapso de 10 minutos. Se secó el pellet a temperatura ambiente y se le agregó 10 µL de Solución de Tris-HCl 1 M pH 8 y 5 µL de Solución de cargado (*Tris-HCl 50 mM pH 6.8, DTT 1% (v/v), SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (m/v)*).

El SDS contenido en la Solución de cargado es el responsable de conferirles carga negativa a las proteínas así como desnaturalizarlas, este último auxiliado por la presencia del DTT, el cual es el responsable de romper los puentes disulfuro formados

entre los aminoácidos de cisteína presente en las proteínas. El glicerol hace más densa la muestra, evitando que ésta se salga de los pozos del gel, mientras que el azul de bromofenol nos ayuda a visualizar el frente de corrida.

Para acelerar el proceso de desnaturalización, las muestras se calentaron a 87 °C por 8 minutos. En este paso también se inactivan proteasas que pudieran estar presentes en las muestras.

### 5.2.6. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es una técnica la cual separa las proteínas exclusivamente en función de su masa molecular, debido a que todas las proteínas están desnaturalizadas y cargadas negativamente de manera uniforme debido a su interacción con el SDS. A menor masa molecular, mayor será la movilidad de la proteína y viceversa.

Esta técnica consiste en hacer pasar una mezcla de proteínas a través de un soporte sólido formado por una malla de moléculas de acrilamida entrecruzada con bisacrilamida, utilizando TEMED como agente iniciador y el ión persulfato ( $S_2O_8^-$ ) como catalizador. La energía que dirige a las proteínas por la malla es un campo eléctrico.

En todos los experimentos se utilizaron geles de poliacrilamida a una concentración del 11% (m/v). Las cantidades de reactivos utilizados se muestran a continuación:

<b>Gel Separador</b>		<b>Gel Apilador</b>	
Acrilamida:Bis-acrilamida (29.2:0.8)	5.7 mL	Acrilamida:Bis-acrilamida (29.2:0.8)	1.5 mL
Tris-HCl 0.75 M pH 8.8, SDS 10% (m/v)	4.0 mL	Tris-HCl 0.75 M pH 6.8, SDS 10% (m/v)	1.3 mL
Persulfato de amonio 10% (m/v)	180 µL	Persulfato de amonio 10% (m/v)	60 µL
TEMED	14 µL	TEMED	10 µL
Agua destilada	6.3 mL	Agua destilada	5.2 mL

Cantidad calculada para dos geles

**Tabla 1** Composición de las soluciones para preparar el gel de poliacrilamida 11% (m/v)

En un tubo Falcon para 50 mL se colocaron los reactivos indicados en la **Tabla 1** para la preparación del gel separador, se mezclaron y vertieron sobre los vidrios alineados en un soporte. Se le adicionó isopropanol para evitar la formación de burbujas en la superficie del gel y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Finalizada la



polimerización, se retiró el isopropanol y se vertió la mezcla del gel apilador. Se colocó el peine separador de carriles y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Finalmente se retiró el peine y se eliminaron los residuos de poliacrilamida de los pozos usando una aguja.

Los geles ya preparados se colocaron en un equipo de electroforesis Bio-Rad y se agregaron 500 mL de Solución amortiguadora de electrodos (*Tris-HCl 25 mM pH 8, glicina 200 mM y SDS 0.1% (m/v)*). Posteriormente se cargaron las muestras resultantes del apartado **5.2.5.** en los pozos y se hizo pasar una corriente de 100 V durante 1.5 horas.

Finalizada la corrida, los geles fueron extraídos de la cámara electroforética. Se separaron los vidrios que cubren el gel y con ayuda de una espátula se cortó la porción correspondiente al gel de apilamiento. Los geles se equilibraron en 25 mL de Solución de transferencia (Solución de Towbin: *Tris-base 25 mM, glicina 192 mM; metanol 20% (v/v)*) por 15 minutos.

### **5.2.7. Western-Blot**

La técnica de Western-Blot hace referencia a la transferencia de proteínas desde un gel a una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma.

Primero se realiza la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE. Luego, las bandas proteicas del gel son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (aplicando un campo eléctrico). Después se bloquea la membrana para prevenir la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se emplearán posteriormente para la detección de la proteína de interés. Luego, esta membrana es puesta en contacto con un anticuerpo específico. Dicho anticuerpo (referido como anticuerpo primario) reconoce epítopes presentes en la proteína de interés. Finalmente se agrega otro anticuerpo (llamado anticuerpo secundario), marcado con un enzima, que sea capaz de reconocer la fracción Fc de las inmunoglobulinas del primario. El anticuerpo secundario se emplea para localizar donde se formaron los complejo antígeno-anticuerpo y dar una aproximación de la cantidad de antígeno presente en la superficie de la membrana.

En la actualidad, los métodos más sensibles emplean sustratos quimioluminiscentes que al entrar en contacto con la enzima correspondiente producen luz como producto final, la que puede detectarse mediante una película radiográfica.

Una vez equilibrados los geles, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-PSQ (0.2µm) Transfer Membrane (Millipore) en el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) durante 30 minutos a 75 mA por membrana; al término de la transferencia las membranas se bloquearon con Solución de bloqueo (*leche en polvo sin grasa 7% (m/v) (Nestlé Svelty), NaCl 0.5% (m/v), Tween 0.5% (v/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM*), durante 1 hora. Posterior al bloqueo, se agregó el primer anticuerpo y se dejó durante toda la noche, a 4°C con agitación constante. Después se realizaron 3 lavados con Solución de lavado (*NaCl 0.5% (m/v), Tween 0.5% (v/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM*) de 15 minutos cada uno. Al término de los lavados se le agregó el anticuerpo secundario anti-conejo durante 1.5 horas bajo agitación constante a temperatura ambiente. Luego se realizaron otros 3 lavados empleando la Solución de lavado durante 15 minutos cada uno. Finalmente se adicionó 0.5 mL de la solución de detección del kit Western Blotting Detection Reagents (Millipore) y se dejó incubar por un minuto. Las condiciones así como los anticuerpos empleados se especifican en la siguiente tabla.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-PCNA de maíz	1:1000	Cabra Anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz)	1:20000
Anti-Histona H3 de humano*	1:1000		
Anti-CDKA de maíz	1:1000	Cabra Anti-conejo IgG-HRP (Invitrogen)	1:5000
Anti-Ciclina D4;2 de maíz	1:1000	Agente de detección Clean-Blot IP HPR (Thermo Scientific)	1:500

\*Identidad del 97% respecto a la proteína de maíz (**Anexo: Figura 1**)

**Tabla 2.** Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos empleados en el Western-Blot

El revelado de las placas se realizó usando placas de autoradiografía Hiperfilm ECL (Kodak), de 18 x 24 cm, revelador GBX developer (Kodak) y fijador GBX fixer (Kodak). Las placas fueron expuestas el tiempo necesario para su visualización.

### 5.2.8. Ensayos de actividad de cinasa

Los ensayos de actividad de cinasa radioactivos *in vitro* consisten en la transferencia de un grupo fosfato del ATP marcado radioactivamente en la posición gamma ( $\gamma$ ), o fosfato terminal, a un sustrato, mediado por la enzima de estudio. Para estos ensayos se emplea usualmente técnicas de electroforesis, cromatografía o filtración para separar el ATP marcado del sustrato marcado radioactivamente. Posteriormente, la cantidad de sustrato fosforilado es detectado usando varios métodos, entre los cuales está la autorradiografía, fosfoimagen, y centelleo líquido.

Las muestras a analizar fueron inmunoprecipitadas de acuerdo a lo descrito en el apartado **5.2.3.1**, y sólo se prosiguió con los apartados **5.2.3.2** y **5.2.3.3** para aquellas muestras destinadas al estudio del efecto del calor sobre la actividad de cinasa. Estas últimas se concentraron de manera similar a las muestras empleadas para SDS-PAGE, sólo que al pellet seco únicamente se le añadió 10  $\mu$ L de Tris-HCl 1 M pH 8.

A los inmunoprecipitados se les agregó 10  $\mu$ L de Solución de cinasa (*Tris-HCl 70 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, EGTA 5 mM pH 8,  $\beta$ -glicerolfosfato 60 mM, NaF 25 mM, Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub> 1 mM*) junto con 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] y 40  $\mu$ g de histona H1 como sustrato. Se incubaron a 30 °C por 1 hora para dejar que tuviera lugar la reacción y posteriormente, se detuvo la reacción agregando 10  $\mu$ L de Solución de cargado y calentando las muestras a 90 °C durante 8 minutos. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE. El resultado se reveló mediante autorradiografía.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

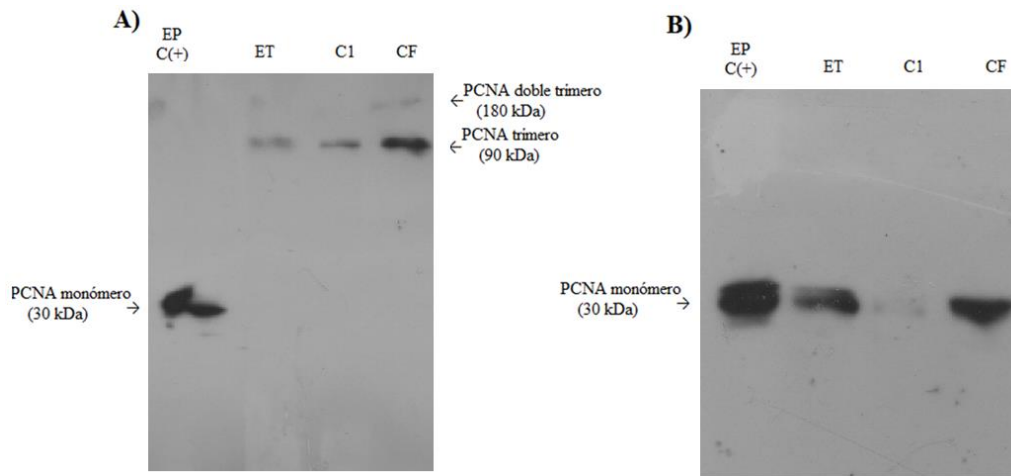
### **6.1. Validación de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

La ChIP es una poderosa técnica utilizada para analizar interacciones proteína-DNA “*in vivo*”. Provee de información valiosa sobre procesos asociados a la cromatina, y por lo tanto requiere que su realización sea ejecutada adecuadamente para obtener resultados confiables.

En esta sección se probaron las condiciones previamente establecidas para asegurarnos que las muestras obtenidas fueran de calidad ChIP y que nos permitieran, posteriormente, estudiar lo que se desea, sin tener falsos positivos o muy poco material con el cual trabajar.

#### **6.1.1. Eficiencia del entrecruzamiento y la reversión**

Siendo que el objetivo de este trabajo fue el de determinar si los inmunocomplejos de PCNA presentaban actividad de cinasa cuando esta última proteína está asociado a cromatina, es indispensable asegurarnos que estamos obteniendo el anillo de PCNA. Dado que es esta estructura la que utiliza PCNA para deslizarse sobre el DNA, al obtener esta estructura, estaríamos aumentando las probabilidades de obtener PCNA asociado al DNA. De manera que el empleo de un agente entrecruzante (en este caso el formaldehído) fue necesario, debido a que nos ayudó a preservar el anillo de PCNA durante todo el proceso de extracción de cromatina y los subsecuentes análisis de proteínas (como la inmunoprecipitación).



**Figura 11.** Inmunodetección de PCNA en las diferentes fracciones obtenidas durante la ChIP de ejes embrionarios de maíz germinados a 24h. Electroforesis SDS-PAGE. Panel A) Efecto del formaldehído sobre PCNA en las fracciones de ChIP. Panel B) Efecto del calor sobre PCNA en las fracciones de la ChIP. EP:extracto proteico (C(+): control positivo), ET: extracto total, C1: fracción citoplasmática, CF: cromatina fragmentada.

En la **Figura 11** panel A se observa la presencia del trímero de PCNA en aquellas fracciones que fueron entrecruzadas (ET, C1, CF), mientras que sólo se aprecia el monómero de PCNA en la que no fue entrecruzada (EP). Este resultado muestra que con 2h de entrecruzamiento con 1% (v/v) de formaldehído es suficiente para obtener el anillo de PCNA. Incluso puede verse que el complejo trimérico de PCNA no se vió afectado por las condiciones desnaturizantes de la electroforesis, lo que indica que los enlaces covalentes formados por el formaldehído le confirieron una gran estabilidad a esta estructura. Por lo que en los ensayos subsecuentes, podemos asegurar que lo que se estará aislando del medio será el anillo de PCNA.

Interesantemente, bajo estas condiciones también se pudo detectar el doble trímero de PCNA. El ditrímero de PCNA es un complejo bastante dinámico y débil, lo que lo hace una estructura inestable. Esta es la razón por la cual, hasta el momento, no existen estudios cristalográficos de este complejo y es muy difícil detectarlo en distintos análisis proteicos, a menos de que se usen agentes entrecruzantes. Sin embargo, se cree que esta forma dinámica y débil de interacción proteína-proteína pueda ser importante en la regulación de diversos procesos celulares, como la replicación (Naryhny *et al.*, 2005).

Si bien el empleo del formaldehído es esencial para la obtención del anillo de PCNA durante la extracción de cromatina, también es importante revertir su efecto. Una de las ventajas que nos da la ChIP, es la de poder estudiar tanto las proteínas como el DNA de manera independiente una vez obtenidas las muestras con calidad ChIP, por lo que la reversión de los enlaces generados por las bases de Schiff es un punto crítico en esta técnica. Adicionalmente, al revertir el efecto del formaldehído, se evitará que las proteínas inmunoprecipitadas para su análisis por Western-blot migren en pesos que no les corresponden, y que no se pierda material genético durante el proceso de aislamiento debido a los fuertes enlaces covalentes que se generaron para su fijación con proteínas.

Uno de los métodos más empleados para la reversión es utilizando calor. La aplicación de energía calórica ocasiona que el pH del medio disminuya, provocando la protonación de los grupos amino, y forzando de esta forma el equilibrio a la dirección contraria (Orlando *et al.*, 1997). El inconveniente con este método es que el calor puede estar afectando la integridad de nuestras muestras, por lo que es importante determinar las condiciones en donde se pueda revertir los enlaces originados por el formaldehído y al mismo tiempo las proteínas no estén siendo afectadas. Empleando la condición descrita anteriormente para este tipo de experimento (65 °C por 24h), se sometieron las distintas muestras obtenidas por la ChIP para corroborar la reversión completa del entrecruzamiento, además de observar la estabilidad de las proteínas.

En la **Figura 11** panel B se aprecia el efecto del calor sobre las muestras entrecruzadas. Se observa la completa desaparición del trímero y del doble trímero, detectando únicamente la presencia del monómero de PCNA en todas las muestras, indicando de esta manera una reversión total de las bases de Schiff. Asimismo, sólo se detecta una banda de PCNA en la masa esperada (30 kDa), lo que sugiere que a esta temperatura y por este tiempo, las proteínas aún son estables y se puede proseguir con los análisis correspondientes.

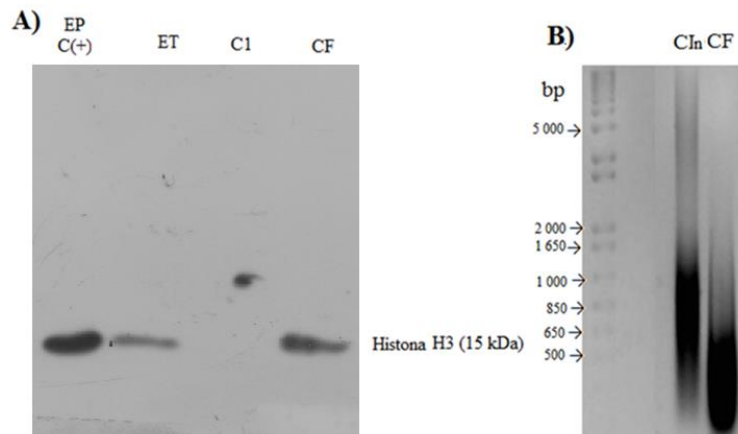
Para este primer paso de la ChIP, las condiciones empleadas para el entrecruzamiento fueron las adecuadas, pues nos permitieron obtener tanto el trímero como el doble

trímero de PCNA en todas las fracciones de la ChIP, por lo que cuando se realicen los ensayos de inmunoprecipitación estaremos seguros de inmunoprecipitar al trímero de PCNA. Por otro lado, el calor y el tiempo empleado para la reversión nos permiten obtener un monómero íntegro de PCNA y una desaparición completa de los enlaces formados por las bases de Schiff.

### 6.1.2. Extracción y fragmentación de la cromatina

Una de las propiedades de la técnica de ChIP es la posibilidad de estudiar procesos celulares que sólo se dan a nivel nuclear; nos permite analizar proteínas asociadas al DNA o secuencias específicas relacionadas con estas proteínas. Por lo que la extracción total de cromatina es un paso esencial en esta técnica.

Para evaluar la eficiencia de la extracción, se realizó un Western-blot de las 3 fracciones contra la proteína histona H3, que es una de las responsables de ensamblar cromatina y se encuentra principalmente en núcleo, razón por la cual se le considera como un marcador nuclear específico de cromatina. El anticuerpo empleado está dirigido contra la histona H3 de humano; sin embargo, presenta un 97% de similitud con la de plantas (**Anexo: Figura 1**).



**Figura 12.** Panel A) Inmunodetección de la histona H3 en las diferentes fracciones obtenidas durante la ChIP de ejes embrionarios de maíz germinados a 24h. Electroforesis SDS-PAGE. Panel B) Fragmentación de la cromatina íntegra utilizando nucleasa micrococcal de *Staphylococcus aureus*. Electroforesis de DNA en gel de agarosa 1% (m/v).CIn: cromatina íntegra, CF: cromatina fragmentada, EP:extracto proteico (C(+): control positivo), ET: extracto total, C1: fracción citoplasmática, CF: cromatina fragmentada.

En la **Figura 12** panel A se aprecia la ausencia de la histona H3 únicamente en la fracción citoplásmica (C1), demostrando que la extracción de la cromatina de las células fue exitosa (CF). Con este resultado podemos asegurar que se cuenta con dos tipos de muestras de composición distinta: una que contiene exclusivamente proteínas del citoplasma (C1) y otra que sólo contiene proteínas asociadas a la cromatina (CF).

Si bien la adecuada extracción de la cromatina es importante para estudiar los procesos que se llevan a cabo en el núcleo, es necesario tratar la cromatina para que pueda ser empleada para la ChIP. Uno de los principales objetivos de la técnica de ChIP es la de poder inmunoprecipitar la cromatina que está asociada a proteínas, y para conseguirlo es necesario que la cromatina tenga determinadas características para facilitar su precipitación en los siguientes pasos.

Para la obtención de los complejos proteína-DNA es importante que los tamaños de los fragmentos de DNA sean adecuados, debido a que esto influenciará la formación y estabilidad de los complejos asociados con el anticuerpo empleado para los ensayos de inmunoprecipitación. Es por esto que la fragmentación de la cromatina representa otro punto crítico en la técnica de la ChIP. Generalmente se recomienda que el tamaño de DNA sea menor a 750 bp, esto con el fin de facilitar la unión del anticuerpo al complejo proteína-DNA, y que esta interacción sea estable durante todo el proceso. Igualmente no se recomiendan fragmentos muy pequeños (<250 pb), dado que podría perderse la interacción de la proteína con el DNA.

En la **Figura 12** panel B se observa que en la muestra entrecruzada de cromatina obtenida por la ChIP (CIn), la mayoría de los fragmentos de DNA son de alto peso molecular (>750 pb), por lo que fue necesario digerir la muestra hasta alcanzar los tamaños recomendados. La fragmentación se llevó a cabo empleando la nucleasa micrococcal derivada de *Staphylococcus aureus*, debido a que se tiene un mejor control durante el proceso, además de que es rápida, reproducible y hay un menor riesgo de afectar la integridad de la cromatina (Das *et al.*, 2004).

Con sólo incubar esta reacción a una temperatura de 37 °C por 30 minutos, fue suficiente para disminuir los fragmentos de DNA al tamaño deseado. Como puede observarse en la **Figura 12** panel B, la muestra CF, que corresponde a la muestra



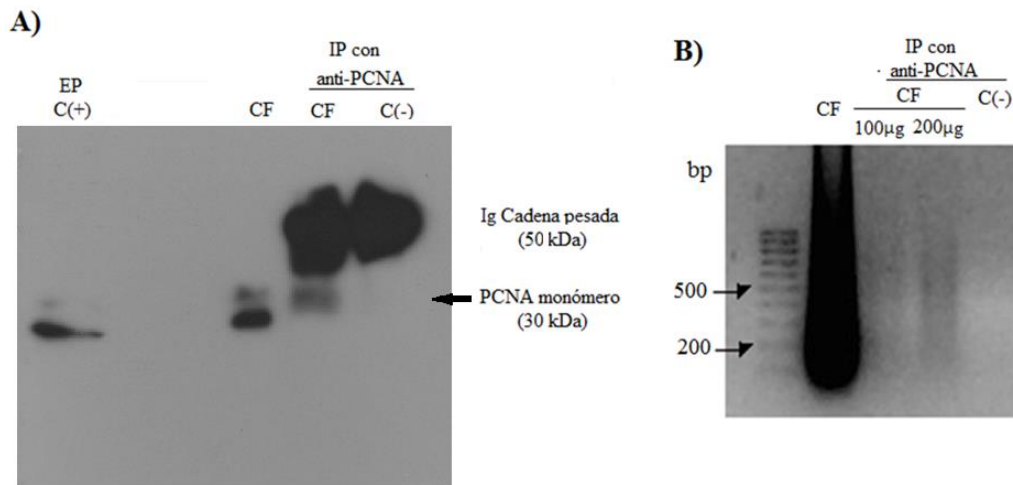
digerida, tiene una mayor cantidad de fragmentos de DNA de menor tamaño (<750 pb), por lo que esta muestra está lista para emplearse como sustrato para los ensayos de inmunoprecipitación.

En esta sección se observó que las condiciones empleadas a lo largo de la técnica de ChIP fueron las adecuadas para lograr una extracción total de la cromatina de las células, de manera que las interacciones que se observen en las fracciones C1 y CF, sólo corresponderán a citoplasma y cromatina respectivamente. Adicionalmente, los tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos durante la digestión son los adecuados para llevar a cabo los ensayos de inmunoprecipitación, por las razones antes mencionadas.

### **6.1.3. Detección de PCNA y DNA en los inmunoprecipitados de PCNA en fracción nuclear**

El último paso para la validación de la técnica corresponde a la inmunoprecipitación selectiva de la cromatina. En esta parte es indispensable conocer si el anticuerpo empleado es capaz de reconocer a su epítipo bajo condiciones entrecruzantes y precipitarlo. El anticuerpo debe ser específico por la proteína así como tener una gran afinidad por ésta. También se recomienda que sea policlonal, debido a que las proteínas unidas entre sí por puentes de carbono inducido pueden formar complejos que oculten los epítopes de la proteína contra la cual está dirigido el anticuerpo, además de que el DNA asociado a la proteína también puede enmascararlos. Para este trabajo nos interesa conocer si PCNA puede ser inmunoprecipitado cuando está unido al DNA, por lo que el anticuerpo a emplear es clave para poder precipitar exitosamente a PCNA de la fracción de cromatina.

En la primera parte de esta etapa se mostró la presencia del trímero y del ditrímero de PCNA en las fracciones obtenidas por la ChIP (C1 y CF), sin embargo aún se desconoce si estos complejos vienen asociados a cromatina. Con el objetivo de determinar si PCNA puede precipitarse con el anticuerpo y los amortiguadores empleados, además de observar si viene asociado a cromatina, se realizaron inmunoprecipitaciones de la fracción de cromatina (CF) usando el anticuerpo anti-PCNA previo a la reversión, y posteriormente se analizó la presencia de PCNA y DNA.



**Figura 13.** Panel A) Inmunodetección de PCNA en inmunoprecipitados usando anticuerpos contra PCNA. Electroforesis SDS-PAGE. Panel B) Detección de DNA en los inmunoprecipitados de PCNA. Electroforesis de DNA en gel de agarosa 1% (m/v). EP:extracto proteico (C(+): control positivo), IP: inmunoprecipitado, CF: cromatina fragmentada, C (-): control negativo (sin sustrato de cromatina fragmentada).

En la **Figura 13**, panel A, se inmunodetecta a PCNA en el inmunoprecipitado de la fracción de cromatina. Este resultado muestra que PCNA puede precipitarse bajo las condiciones empleadas para este ensayo, y que el anticuerpo utilizado es capaz no sólo de reconocer a la proteína entrecruzada (como se observó en la primera parte de esta etapa y la muestra CF del panel A, **Figura 13**), sino también puede aislarla del medio (IP CF). De manera que este anticuerpo es capaz de superar los enmascaramientos ocasionados por los agrupamientos de las proteínas junto con el DNA u otras proteínas, y es el ideal para realizar los inmunoprecipitados destinados para la actividad de cinasa, pues con este resultado estamos confirmando que se está inmunoprecipitando a PCNA.

Una vez que se estableció la presencia de PCNA en el inmunoprecipitado, lo siguiente era determinar si venía asociado a cromatina. Como el anillo de PCNA se desliza a lo largo del DNA, es imposible obtener una secuencia en específico, y por lo tanto no pueden llevarse a cabo técnicas que nos permitan la amplificación de DNA. Por este motivo es necesario que el DNA obtenido en los inmunoprecipitados de PCNA deba ser el suficiente como para ser detectado directamente en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

En el panel B de la **Figura 13** se detecta DNA en los inmunoprecipitados contra PCNA en la fracción de cromatina (IP CF). Esta presencia de material genético se debe exclusivamente al que está asociado a PCNA, y no a un reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo empleado (IP C (-)). También se observa que la mayoría de los tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos en los inmunoprecipitados están comprendidos en el intervalo de 200-800 pb (IP CF), lo que sugiere que, en este intervalo, el anticuerpo puede reconocer a su proteína y tener la capacidad para precipitarla, y que PCNA viene asociado al DNA. Fuera de este intervalo, los epítopes pueden estar enmascarados o la interacción PCNA-DNA se ha perdido.

En esta tercera parte de la primera etapa, se muestra que el anticuerpo empleado, además de que reconoce a PCNA entrecruzado, puede aislar al complejo PCNA-DNA, preferentemente aquellos cuyo tamaño de DNA este dentro del intervalo de 200-800 pb. Esto quiere decir que, además de los tamaños de DNA obtenidos en el paso anterior, la cantidad de formaldehído y tiempo de entrecruzamiento empleados son los adecuados, pues no enmascararon todos los epítopes de PCNA y permitieron que el anticuerpo pudiera interaccionar con su blanco.

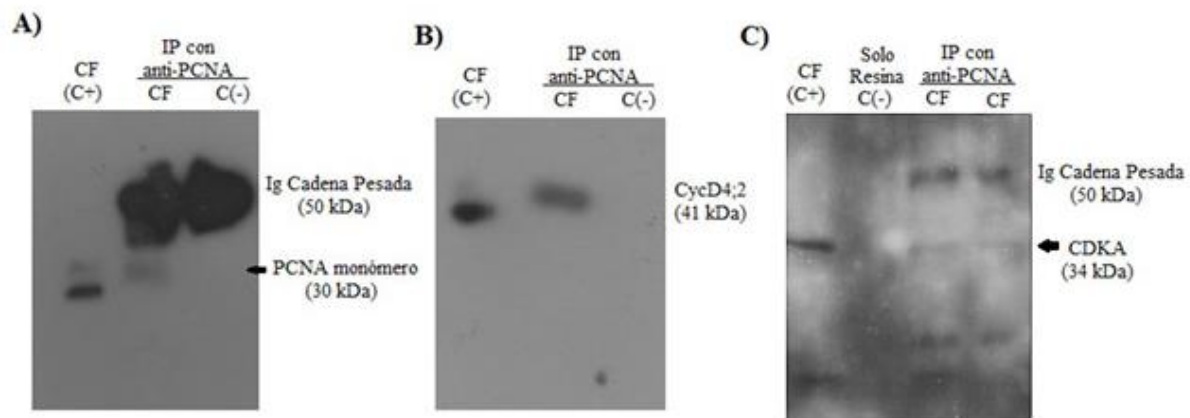
Con los resultados obtenidos hasta este momento, puede concluirse que las condiciones previamente reportadas son las adecuadas para llevar a cabo de forma exitosa la técnica de ChIP. Empleando estas condiciones se preservaron las estructuras formadas por PCNA *in vivo* (trímero y doble trímero); se pudo extraer totalmente la cromatina, dando como resultado una fracción cuyo contenido es citoplásmico (C1) y la otra fracción que corresponde a cromatina (CF); y se conservó la asociación de PCNA-DNA *in vivo*, la cual fue posible inmunoprecipitar. Gracias a esto, puede tenerse la certeza que cuando estemos inmunoprecipitando a PCNA en los subsecuentes ensayos, estaremos precipitando al trímero, o ditrímero, de PCNA, y que vendrá asociado al DNA. Además de que las interacciones o funciones que se observen en las fracciones C1 y CF corresponderán sólo a citoplasma o cromatina respectivamente.

Con esto, se concluye que la técnica ha sido validada, y por lo tanto se puede continuar con la siguiente etapa del trabajo.

## 6.2. Ensayos de inmunoprecipitación

Los experimentos realizados en este trabajo tienen la finalidad de responder la interrogante de si la actividad de cinasa de PCNA previamente reportada se encontraba en el núcleo y/o citoplasma. Por lo que era importante asegurarse de la presencia de otras proteínas (especialmente cinasas) asociadas a PCNA en los inmunoprecipitados realizados contra esta última.

En maíz, se conoce que PCNA interacciona con CDKA, CycD2, 4, y 5 (Sánchez *et al.*, 2002; Lara-Nuñez *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2000), sin embargo estos experimentos se hicieron en extracto proteico de eje embrionario. No fue hasta que Martínez-Mata (2011) observó que PCNA interaccionaba con CDKA y CycD4 sólo en el núcleo, formando el complejo PCNA-CDKA-CycD4 cuando PCNA estaba unido a cromatina. Por lo que prosiguió la detección de CDKA y CycD4 en los inmunoprecipitados con PCNA utilizando la fracción de cromatina de ejes germinados por 24h como sustrato, dado que en ese tiempo se detectó la mayor cantidad de complejos formados.



**Figura 14.** Inmunodetección de proteínas en inmunoprecipitados de PCNA en muestra de cromatina fragmentada obtenida a partir de ejes embrionarios de maíz germinados 24h. Electroforesis SDS-PAGE. Panel A) Inmunodetección de PCNA. Panel B) Inmunodetección de CycD4;2. Panel C) Inmunodetección de CDKA. CF: cromatina fragmentada (C(+): control positivo), IP: inmunoprecipitado, C (-): control negativo (sin sustrato de cromatina fragmentada/ sólo resina).

En la **Figura 14** se observa que las proteínas CDKA y CycD4 co-inmunoprecipitan con PCNA. Esto indica que se están obteniendo los complejos PCNA-CDKA-CycD4-DNA en las muestras de cromatina, por lo que las asociaciones con PCNA no se vieron afectadas a lo largo de la técnica de ChIP. Este resultado era de esperarse dado que anteriormente se había detectado la interacción con DNA, y una de las ventajas de la ChIP es la de preservar las interacciones que se llevan a cabo en la célula en el tiempo exacto que se agregó el agente entrecruzante.

Cabe resaltar que los complejos de PCNA obtenidos a partir de la fracción de cromatina (y en las demás fracciones) contienen una gran diversidad de proteínas que se asocian a PCNA, de las cuales pueden incluirse cinasas distintas a las CDKs. Por ejemplo, en mamíferos se observó que PCNA se asocia a la cinasa ATM, la cual es una proteína que participa en la inducción de la respuesta celular ante un daño en el DNA. También se ha visto interacción con una cinasa llamada Chk 1, la cual está involucrada en los puntos de control del ciclo celular y coordinación de la síntesis de DNA (Scorah *et al.*, 2008; Gamper *et al.*, 2012).

De manera que en esta etapa se corroboró la presencia del complejo CDKA-CycD4;2 en los inmunocomplejos de PCNA obtenidos a partir de la fracción de cromatina, y por lo tanto la actividad de cinasa que pudiera detectarse en esta fracción, correspondería, en parte, a la función de este complejo.

### 6.3. Ensayos de actividad de cinasa

#### 6.3.1. Presencia de actividad de los complejos con PCNA en las fracciones de ChIP

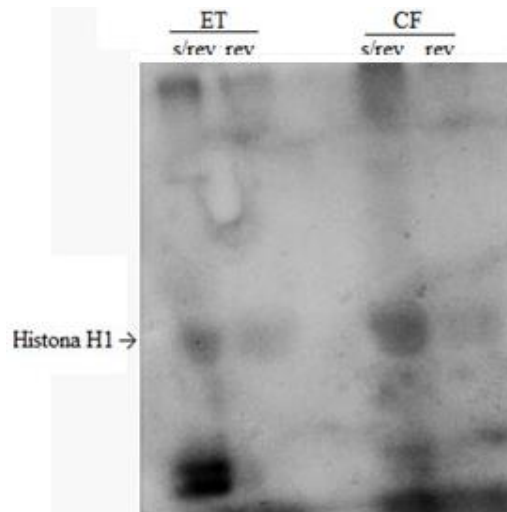
Actualmente se posee una vasta información sobre las diversas funciones y asociaciones de PCNA a nivel nuclear, sin embargo, es necesario recordar que no toda la proteína se encuentra localizada en núcleo. Para maíz se ha observado que la cantidad de PCNA aumenta conforme progresa en ciclo celular (Sánchez *et al.*, 2002), y Martínez-Mata (2011) encontró que la mayoría de PCNA es dirigida al núcleo, sin embargo aún queda un remanente en citoplasma. Si este PCNA citoplasmático posee alguna función relevante aún no se sabe, por lo menos en plantas. Con respecto a mamíferos, se ha reportado que PCNA interactúa con proteínas involucradas en el proceso de la glucólisis, así como también interactúa con la malato deshidrogenasa, enzima que participa en la generación de energía en la mitocondria. También se ha visto que PCNA citoplasmático participa en la integridad del citoesqueleto y su posible participación en otras vías de señalización celular mediante su unión con proteínas membranales y citoplasmáticas (anexina A2, sarcolectina, factor de elongación 1) (Naryzhny y Lee, 2010). Por lo consiguiente, se sugiere que PCNA también posee una función biológica importante en el citoplasma. Con esto podría considerarse la posibilidad de que cinasas citoplasmáticas también empleen a PCNA para encontrar su blanco.

El objetivo principal de este trabajo fue el de determinar si la actividad de cinasa de los complejos inmunoprecipitados con PCNA obtenidos de extracto totales de ejes de maíz, se presentaba tanto en núcleo como en citoplasma, o sólo en un compartimento. Anteriormente se reportó que PCNA interacciona con una CDKA, y este complejo era capaz de fosforilar a la histona H1 y a RBR. Interesantemente, los inmunoprecipitados con PCNA mostraban una máxima actividad a las primeras horas de germinación, correspondientes a la fase G1, y luego decaían durante el transcurso del ciclo celular (Sánchez *et al.*, 2002). Adicionalmente, se observó que, al menos, los complejos CDKA-CycD4 sólo pueden encontrarse cuando PCNA está asociado a la cromatina, aún si las 3 proteínas también están presentes en el citoplasma (Martinez-Mata, 2011).

Basándonos en lo anterior, se sugeriría que la actividad de cinasa presentada en los inmunoprecipitados de PCNA sólo ocurre en la cromatina y no en citoplasma, por lo menos, así sería para los complejos relacionados con el inicio del ciclo celular (complejos CDKA-CycD), sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que PCNA pueda estar asociado a otras cinasas citoplasmáticas, o a otras CDKs presentes en citoplasma, y que pudieran ser activos y pudieran reconocer el sustrato a emplear.

Por otro lado, surgió la duda de si la técnica de ChIP afectaba los complejos activos presentes en las muestras. Dado que hasta el día de hoy no se han reportado ensayos de actividad de cinasa utilizando muestras de calidad ChIP, era necesario considerar todas las variables que pudieran interferir con la actividad biológica de estos complejos. Se determinaron dos variables importantes: el uso del formaldehído y el calor empleado para la reversión. La función del formaldehído es la de fijar las proteínas en el momento de su adición, preservando de esta forma las interacciones proteicas de la célula a ese determinado tiempo, por lo que los enlaces covalentes ocasionados por el formaldehído podrían afectar el movimiento intermolecular de las proteínas, y en consecuencia su función; esto es, que pudieran restringir el re-acomodo de las proteínas del complejo PCNA-CycD-CDKA que ocurre al momento de reconocer al sustrato, y en consecuencia, impedir su fosforilación. En el caso de la energía calórica, se observó en la primera parte de este trabajo que 65°C por 24 h era suficiente para remover las bases de Schiff sin afectar la integridad de las proteínas; sin embargo, se desconoce si a esta temperatura la actividad de los complejos, o inclusive la interacción entre ellos, es afectada.

Razón por la que la primera parte de esta tercera etapa consistió en determinar la presencia de actividad de cinasa en las fracciones obtenidas por la ChIP, y al mismo tiempo observar si la técnica interfería con dicha actividad. Para esto, se realizaron dos series de inmunoprecipitados contra PCNA con las muestras de 24h de germinación de ET, CF y C1, donde una serie fue revertida y concentrada, mientras que la otra no. Posteriormente se realizó el ensayo de actividad de cinasa.



**Figura 15.** Fosforilación de la histona H1 en inmunoprecipitados de PCNA de ejes embrionarios germinados a 24h. Efecto de calor empleado para la reversión sobre la actividad de cinasa. Ensayo de actividad en geles SDS-PAGE. ET: extracto total, CF: cromatina fragmentada, s/rev: sin revertir, rev: revertidas.

La **Figura 15** muestra que los inmunoprecipitados de PCNA de las fracciones de ET y CF son activos, a diferencia de la fracción de citoplasma (dato no incluido). Interesantemente, puede apreciarse una disminución en la presencia de histona H1 fosforilada en las muestras que fueron revertidas (ET: rev, CF: rev).

Con respecto al efecto que pueda tener la técnica sobre la actividad de los complejos con PCNA, al parecer el formaldehído no está interfiriendo con la actividad de los complejos. Esto puede explicarse si consideramos que a ese tiempo empleado, el formaldehído solo fue capaz de mantener la estructura del trímero de PCNA sin afectar las uniones resultantes con otras proteínas presentes en el anillo. Naryzhny y colaboradores (2005) observaron que PCNA no se entrecruzaba con otras proteínas debido a que estas interacciones no presentaban las condiciones necesarias para la formación de las bases de Schiff. Lo mismo podría aplicarse en este caso, pues todo parece indicar que los sitios necesarios para la incorporación de ATP y reconocimiento del sustrato por parte del complejo CDKA-CycD no fueron afectados. Otra posible explicación puede ser que el formaldehído, a este tiempo y concentración, permite cierta flexibilidad a las proteínas presentes, es decir, es capaz de mantener las interacciones pero no lo suficiente para restringirlas.



El calor, sin embargo, está afectando la fosforilación de la histona H1 mediada por las proteínas presentes en las muestras. Esta energía calórica no está afectando la integridad de la proteína, pero si está disminuyendo la función de la misma. Probablemente el calor este afectando las interacciones proteicas de los complejos involucrados en la actividad de cinasa. Siendo que la función del calor es la de deshacerse de las bases de Schiff para que se pueda hacer un análisis individual de las proteínas, en el caso de las muestras revertidas, puede ser que el calor, aparte de separarlas del anillo de PCNA, pueda también estar separando los complejos CDKA-CycD que están presentes en el anillo, y en consecuencia disminuir la actividad como se puede observar en la **Figura 15**. También está la posibilidad de que esté afectando la conformación de las proteínas, haciéndolas incapaces de desempeñar su función adecuadamente. Al someter las muestras a 65 °C por 24h, se estaría favoreciendo su desnaturalización, y por consiguiente, modificando su acción o inactivándolas. Si bien existe la posibilidad de que puedan formarse nuevamente complejos activos una vez que la temperatura de la muestra haya disminuido, el haber sufrido un daño a nivel conformacional, estaría afectando el desempeño de estos complejos, probablemente en la especificidad por el sustrato, la incorporación de ATP, o que su interacción sea muy inestable, dando como resultado la disminución de la cantidad de histona H1 fosforilada en la muestras revertidas (ET:rev, CF:rev) observada en la **Figura 15**.

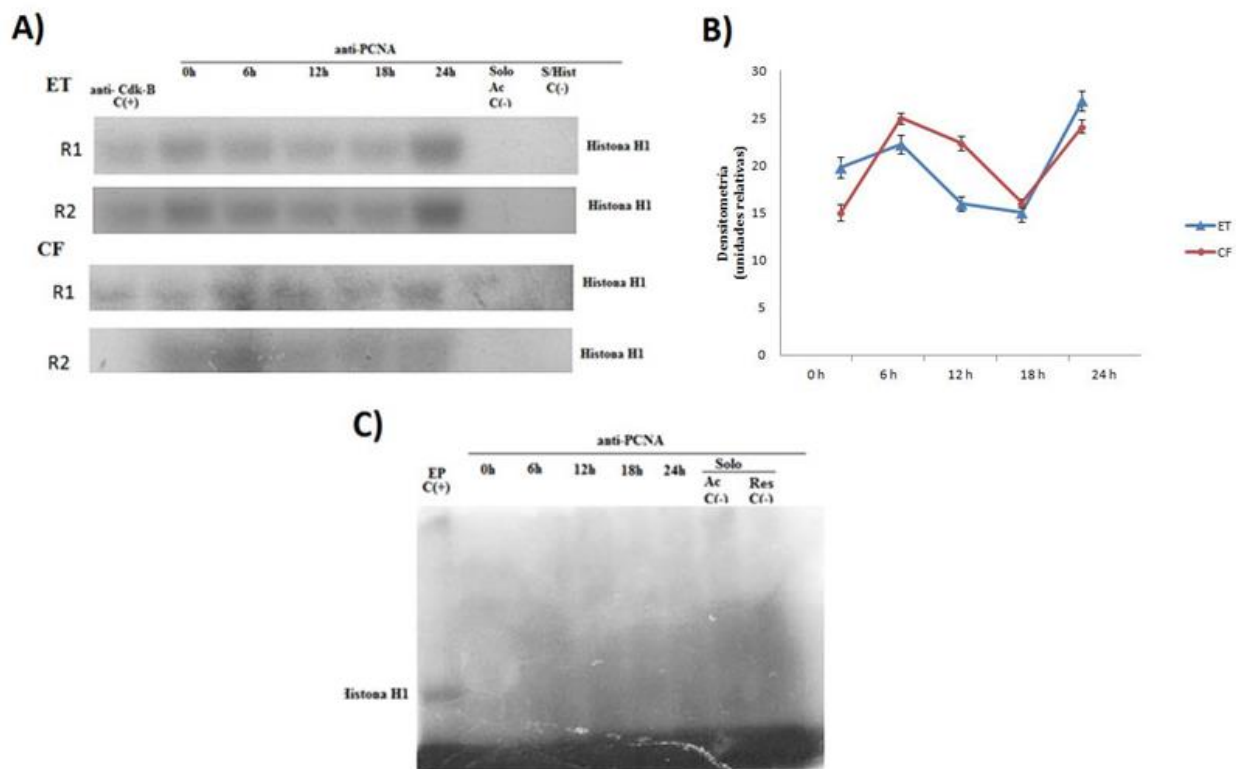
Desde el punto de vista biológico, este resultado indica que los complejos de PCNA son sólo activos al estar asociados a cromatina; por lo menos así es al emplear la histona H1 como sustrato. Esto reforzaría la idea de que PCNA es empleado como un presentador sobre el DNA para que estos complejos localicen a sus sustratos asociados a la cromatina, como en el caso de los complejos CDKA-CycD, los cuales son auxiliados por PCNA para que lleguen a su sustrato (como RBR) ubicado sobre el DNA y lo fosforilen, permitiendo de esta forma la progresión del ciclo celular. Estos complejos no necesariamente necesitan estar asociados a PCNA para que puedan fosforilar a RBR, pero al utilizarlo como mediador sobre el DNA, su eficiencia se vería ampliamente incrementada.

Basándonos en la información obtenida en esta primera parte de la tercera etapa, las muestras con calidad CHIP pueden emplearse para los ensayos de actividad de cinasa, siempre y cuando no se reviertan, por las razones antes mencionadas. De igual forma, todo parece indicar que los inmunoprecipitados con PCNA sólo son activos cuando están asociados a cromatina; sin embargo, este resultado sólo representa un tiempo, que corresponde a 24h de germinación, por lo que aún no se puede descartar la posibilidad de que los inmunoprecipitados con PCNA sean activos también en citoplasma. De manera que ahora se estudiará el comportamiento de la actividad de los inmunocomplejos de PCNA, tanto nucleares como citoplasmáticos, durante el transcurso de la germinación.

### **6.3.2 Actividad de cinasa asociada a los complejos de PCNA durante la germinación de maíz**

En la parte previa se llegó a la conclusión de que las muestras con calidad CHIP pueden emplearse para este ensayo, siempre y cuando se omita el paso de reversión. También se observó que posiblemente la actividad de los inmunocomplejos de PCNA sea exclusivamente nuclear, por lo menos así es para 24h de germinación.

En base a lo anterior, en esta segunda parte se estudió la fluctuación de la actividad de cinasa asociada a los inmunoprecipitados con PCNA en las muestras de ET y CF a lo largo de la germinación, mientras que las muestras de C1 se emplearon para ver si los complejos presentaban actividad a nivel de citoplasma a otros tiempos, y en caso de presentarla, cómo variaba.



**Figura 16.** Fosforilación de la histona H1 en inmunoprecipitados de PCNA a distintos tiempos de germinación. Ensayo de actividad en geles SDS-PAGE. Panel A) Detección de histona H1 fosforilada en los inmunoprecipitados de PCNA de las muestras de extracto total y cromatina fragmentada. Panel B) Gráfica de densitometría de la actividad de cinasa de los inmunoprecipitados de PCNA de las muestras de extracto total y cromatina fragmentada (n=2). Panel C) Actividad de cinasa de los inmunocomplejos de PCNA citoplasmático. EP:extracto proteico (C(+): control positivo), ET: extracto total, CF: cromatina fragmentada, C (-): control negativo, Ac: anticuerpo, Res: resina, s/Hist.: sin histona, R1: repetición 1, R2: repetición 2.

En la **Figura 16** se observa que los inmunoprecipitados de PCNA pertenecientes a ET y CF son activos en todos los tiempos de germinación empleados, a diferencia de aquellos obtenidos con C1, en donde no se detectó señal alguna (**Figura 16**, panel C). Interesantemente, en ambas muestras, a las 6h se detecta una mayor actividad de cinasa, la cual va disminuyendo conforme avanza la germinación, y vuelve a incrementar a las 24h (**Figura 16**, panel B).

Siendo que sólo se detectó actividad en la fracción de cromatina, este resultado indica que los complejos con PCNA sólo son activos cuando están asociados al DNA, y por lo tanto apoyaría fuertemente la hipótesis de que estos complejos emplean a PCNA como un mediador sobre el DNA para realizar su función eficazmente.

La cromatina está compuesta por material genético y una abundante diversidad de proteínas asociadas, de manera que es necesaria la presencia de ciertas señales, secuencias o presencia de determinadas proteínas, para que las enzimas, factores de transcripción, polimerasas, entre otras, localicen su sitio de acción y puedan desempeñar su papel biológico. En el caso de los complejos CDKA-CycD, que son los encargados de fosforilar a RBR para que se lleve a cabo la transcripción de genes que ayudaran a la transición de G1 a S, les sería muy difícil encontrar a RBR dentro de este mar proteico y genético que conforma a la cromatina, aunado a que estos complejos son incapaces de deslizarse a lo largo del DNA. Por lo que la asociación con otra proteína sería necesaria para poder recorrer las cadenas de DNA y localizar a su blanco. Y esta proteína es PCNA.

Como se mencionó anteriormente, PCNA es una proteína que forma un anillo alrededor de las cadenas de DNA y es capaz de deslizarse a través de éste. El hecho de que los complejos CDKA-CycD sólo se asocien con PCNA en el núcleo a pesar de que los 3 están presentes también en citoplasma (Martinez-Mata, 2011), es una clara demostración de que PCNA, si no indispensable, es muy importante para que estos complejos desempeñen su función óptimamente sobre el DNA, de manera que PCNA estaría, en cierta forma, participando en la coordinación de la función de estos complejos a lo largo del ciclo celular. La manera de cómo pueda estar coordinándolos podría ser por competición con otras proteínas por su sitio de unión (afinidad de PIP), interacción con otras proteínas las cuales afecten su actividad (como p21, el cual inactiva al complejo), o la disociación del DNA por parte de PCNA.

Otro dato que nos arroja este resultado es que los complejos de PCNA presentan una mayor actividad en las primeras horas de germinación, que corresponden a la fase G1 (**Figura 15**, panel B), indicando que probablemente PCNA es utilizado al inicio del ciclo celular principalmente como presentador sobre el DNA para otras proteínas, esto con el fin de reparar los daños causados por la desecación/rehidratación de la semilla, y la

preparación de la célula para iniciar el ciclo celular. Y una vez iniciado el ciclo, empezando la fase S, PCNA es empleado principalmente como factor de replicación de DNA, mientras que, en menor medida, sigue desempeñando el papel de mediador, posiblemente para los otros complejos de CDK-Cyc involucrados en las siguientes fases del ciclo celular.

La actividad encontrada en los inmunoprecipitados de PCNA en este ensayo incluye la acción de diversas cinasas y complejos de cinasas que fueron capaces de identificar y fosforilar a la histona H1, por lo que esta actividad no se le puede atribuir exclusivamente a los complejos de CDKA-CycD identificados en la segunda etapa de este trabajo. Si bien el empleo de los complejos de CDK-Cyc es uno de los principales mecanismos de regulación en el ciclo celular, no se descarta la posible presencia de otras cinasas que puedan interactuar con PCNA al mismo tiempo que estos complejos. Las únicas cinasas que pueden descartarse son aquellas que necesitan de un ión divalente (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) para activarse, dado que las condiciones empleadas para el ensayo de actividad incluyen EDTA, un agente que secuestra estos iones del medio, provocando la inactivación de estas cinasas.

De la misma manera, bajo estas condiciones no se detectó señal alguna en la fracción de citoplasma, sin embargo no se descarta la posibilidad de que PCNA este desempeñando una función importante en este compartimento, como aquellas encontradas en mamíferos.

Con la información adquirida en esta tercera etapa puede concluirse que los inmunoprecipitados de PCNA sólo son activos cuando están asociados a cromatina (con las condiciones utilizadas en este trabajo), en donde PCNA juega un papel importante en la función de estos complejos al actuar como una deslizadera que los llevará hasta sus blancos ubicados sobre el DNA. En consecuencia, esto podría representar otro mecanismo de regulación para estos complejos proteicos, dado que necesitan de un intermediario que los lleve a través del DNA para ubicar a su blanco, y de esta forma realizar su función, debido a que ellos son incapaces de interactuar con el DNA por sí mismos.

Igualmente, se observó que los inmunoprecipitados de PCNA son más activos en la fase G1, la cual correlaciona con lo previamente reportado. De manera que durante las primeras horas de germinación, PCNA participa ampliamente en la regulación del ciclo que abarca desde la fase G1 hasta la transición a S, en donde, junto con los complejos CDKA-CycD, determinaran si continúa el ciclo o se detiene. Una vez entrada la fase S, PCNA será empleado principalmente en el proceso de replicación del DNA.

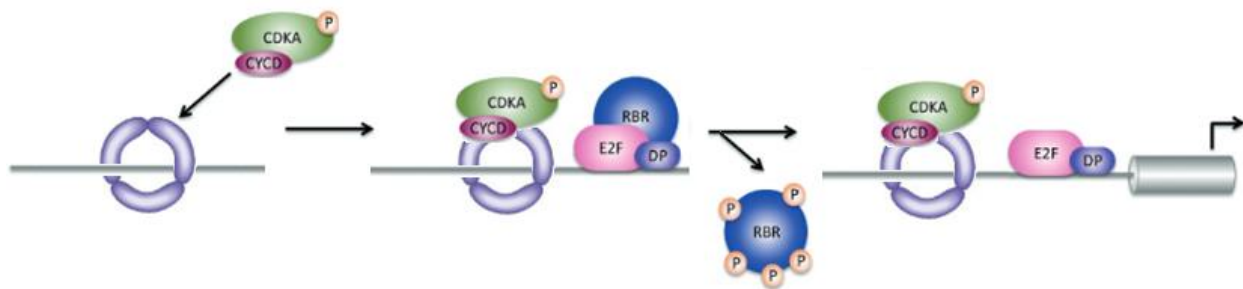
Como dato adicional, es posible emplear las muestras con calidad ChIP para los ensayos de actividad de cinasa, siempre y cuando se omita el proceso de reversión, debido a que altera la actividad biológica que pudiera presentar la muestra.

#### **6.4. Modelo teórico de la función del complejo DNA-PCNA-CDKA-CycD**

PCNA es una proteína que se le ha descrito como una proteína multifuncional, dada la inmensa variedad de proteínas con las cuales puede asociarse. Sin embargo, a pesar de que se le ha mencionado como una proteína presentadora para otras proteínas con su sustrato ubicado sobre el DNA, no existe información experimental sobre dicha función.

Este trabajo muestra, experimentalmente, que sólo los inmunoprecipitados de PCNA asociados a cromatina son activos (bajo estas condiciones experimentales), y esta actividad está dada, en parte, por los complejos de CDKA-CycD que únicamente interaccionan con PCNA en núcleo. Por lo que sugeriría fuertemente que PCNA actúa como una plataforma que anilla al DNA, la cual ayuda a que diversas proteínas puedan localizar y ejercer su función sobre sus blancos que están asociados al material genético, de manera controlada y eficiente.

Basándonos en la información obtenida a lo largo de este proyecto, se llegó a la propuesta del siguiente modelo, en donde se plantea un mecanismo de cómo PCNA pueda estar ejerciendo esta función mediadora con los complejos CDKA-CycD, que participan en el punto de control de la transición G1 a S, y su sustrato RBR.



**Figura 17.** Modelo teórico de PCNA como mediador de los complejos de CDKA-CycD con RBR sobre el DNA

El modelo propone que para que PCNA pueda actuar como presentador, primero el tríplice de PCNA debe estar montado sobre el DNA, siendo que sólo con esta estructura, PCNA puede asociarse y deslizarse a lo largo del DNA. Una vez que el tríplice este asociado al material genético, el complejo CDKA-CyD interactuará con PCNA, el cual los guiará hasta donde esté ubicado RBR para que el complejo pueda fosforilarlo y liberen de esta manera al factor E2F/DP, dando como resultado el inicio de la transcripción de aquellos genes dependientes de E2F/DP, y por lo tanto que continúe el ciclo celular.

Interesantemente, los complejos con CDKA de las ciclinas identificadas que se asocian con PCNA (D2, D4 y D5), presentan una mayor actividad de cinasa en las primeras horas de germinación (Godínez-Palma *et al.*, 2013). Lo anterior apoyaría más la idea de que PCNA principalmente es empleado como plataforma sobre el DNA al inicio de la germinación, y posteriormente es empleado para otras funciones celulares, como la replicación.

Sin embargo, también existe la posibilidad de que los complejos obtenidos sean activos a otros tiempos con otros sustratos. Dado que PCNA está participando en diversos procesos celulares, no sería inesperado que, por ejemplo, mostrara asociación con CDKB y otras ciclinas mitóticas, a las que guiará a través del DNA para que fosforilen a sus blancos, y por consiguiente, permitiera a la célula entrar a la fase de mitosis.

En este trabajo, además de la detección del tríplice de PCNA, también pudo observarse la presencia del ditrímero. Con respecto a que estructura PCNA pueda estar utilizando cuando participa en diversas funciones celulares, como presentador sobre DNA o factor de replicación, es muy probable que sea el tríplice de PCNA el que

participa como mediador entre los complejos y sus blanco. Esto podría deberse a que PCNA necesita libertad de movimiento para recorrer el DNA, y siendo que la estructura trimérica es la más estable, no presentaría algún problema al deslizarse sobre el DNA. Otra razón podría ser que, debido a que PCNA debe recorrer el DNA con cierta movilidad, las proteínas asociadas en ese momento no son muchas, permitiendo de esta manera la flexibilidad requerida para que estos complejos formados con PCNA puedan ubicar y ejercer su función sobre el DNA. Adicionalmente, se ha reportado que p21 se une a PCNA con una estequiometría de 3:1, el cual previene que otras proteínas interaccionen con PCNA, como los complejos de CDKA-CycD (Maga y Hübscher, 2003).

Con respecto al doble trímero de PCNA, es posible que esté involucrado principalmente en la replicación y reparación del DNA, debido a la presencia de diversas proteínas esenciales que participan a la vez durante estos procesos, y curiosamente, todas emplean la misma cara del anillo para asociarse con PCNA, de manera que sólo pueden formarse estos complejos replicativos/reparativos si la estructura de PCNA muestra dos caras idénticas en ambos lados. Además de que mutantes de doble trímero de PCNA activan la cascada de señalización apoptótica, indicando un daño irreparable dentro de la célula (Kim y Lee, 2008; Naryzhny *et al.*, 2005). Recientemente se descubrió que el doble trímero de PCNA va aumentando conforme progresa la germinación (García, S.M., dato no publicado), lo que indica que la presencia del ditrímero empieza a ser necesario una vez comenzado el ciclo celular.

A pesar de que a PCNA se le considera como una proteína nuclear, también se le ha visto involucrada en procesos citoplasmáticos. Con respecto a maíz, lo único que se sabe es que la cantidad de PCNA citoplasmático va disminuyendo conforme avanza el ciclo celular, y con la información obtenida en este trabajo, parecería indicar que no hay actividad de cinasa (empleando a la histona H1 como sustrato, y muy probablemente con RBR, dado que esta última participa exclusivamente a nivel nuclear). Sin embargo, también se observó que la ciclina D4 interacciona con PCNA cuando están en citoplasma, principalmente en las fases tardías del ciclo celular (Martínez-Mata, 2011), y los complejos CDKB-CycD4 son activos a partir de las 24h de germinación (Godínez-Palma *et al.*, 2013). Esto sugeriría que PCNA puede presentar complejos activos en



citoplasma, puede que sea que se una con otra ciclina diferente a la D (como cyc A o B), o a una cycD pero con distinta cinasa (CDKB u otra cinasa que no esté involucrada con el ciclo celular), y explicaría la razón por la cual no se detectó señal bajo estas condiciones, dado que su especificidad por el sustrato sería distinta.

Con la información adquirida en este trabajo, se propone que PCNA actúa como una plataforma deslizante que ayuda a diversas proteínas, principalmente a los complejos CDKA-CycD, a ubicar sus sustratos en el DNA durante las primeras horas de germinación. Esto representaría otra forma de regulación que ocurre a lo largo del proceso del ciclo celular, la cual involucra la participación de PCNA. Si no es indispensable, es necesaria su presencia para que los complejos CDKA-CycD puedan fosforilar a RBR con mayor rapidez y eficacia. Adicionalmente, estos complejos están en competencia con otras proteínas por los sitios de unión presentes en PCNA, por lo tanto, dependiendo de las condiciones y señales intercelulares, serán las proteínas que estarán interactuando con PCNA asociado a cromatina.

## **7. CONCLUSIONES**

- Las muestras con calidad CHIP pueden emplearse para realizar ensayos de actividad de cinasa, sólo debe omitirse el paso de reversión.
- Los inmunoprecipitados de PCNA sólo son activos cuando están asociados a cromatina (bajo las condiciones empleadas en este trabajo).
- Los inmunocomplejos con PCNA obtenidos poseen principalmente una actividad de cinasa de fase G1.
- PCNA desempeña un papel de presentador para estos complejos con sus blancos sobre el DNA.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Mediante esta técnica estudiar otras proteínas reguladoras del ciclo celular (CDKB, CycA, D6, etc.). Observar su distribución y asociación con PCNA en los distintos compartimentos celulares (citoplasma y núcleo) a lo largo de la germinación.
- Realizar ensayos de inmunoprecipitación secuencial para precisar la actividad de cinasa asociada a los inmunocomplejos de PCNA obtenidos en este trabajo. O utilizar inhibidores específicos (roscovitina y olomoucina, inhibidores específicos para CDKA).
- Realizar la identificación de E2F/DP en los inmunoprecipitados de PCNA de la fracción de cromatina.

## 9. REFERENCIAS

- **Bewley, J.D.** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- **Boniotti, M.B. y 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.
- **Bradford, K.B. y Nonogaki, H.** (2007) Seed development, dormancy and germination. *Annu. Plant Rev.*, Vol. 27. Wiley-Blackwell. 264-295.
- **Bryant J.** (1997) *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology.* Acad. Press. 10b. USA: 17-18.
- **Carey, M.F., Peterson, C.L. y Smale, S.T.** (2009) Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harb. Protoc.* 4: 1-8.
- **Colli-Mull, J.G., Rodríguez-Zapata, L.C. y Castaño de Serna, E.** (2007) El control del ciclo celular en plantas. *Ciencia* 58 num. 4: 67-71.
- **Das, P.M., Ramachandran, K., vanWert, J. y Singal, R.** (2004) Chromatin immunoprecipitation assay. *BioTech.* 37: 961-969.
- **Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator, Australia.** (2008) The Biology of *Zea mays* L. ssp. *Mays*. [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/maize3/\\$FILE/biology\\_maize08\\_2.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/maize3/$FILE/biology_maize08_2.pdf).
- **De Veylder, L., Joubés J. e Inzé, D.** (2003) Plant cell cycle transitions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 536-543.
- **De Veylder, L., Beeckman, T. e Inzé, D.** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 655-665.
- **De Veylder, L. e Inzé, D.** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40: 77-105.
- **Dewitte, W. y Murray, J.A.** (2003) The plant Cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 235-264.
- **Dirección de Economía Ambiental, INE, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad, CONABIO y Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, SAGARPA.**

(2008) Agrodiversidad en México: el caso del maíz. <http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgipea/agrodiversidad.pdf> Consultado en octubre 2012.

- **Doerner, P., Jorgensen, J.E., You, R., Steppuhn, J. y Lamb, C.** (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nat.* 380: 520-523.
- **Doebley, J. y Stec, A.** (1993) Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F2 populations. *Genet.* 134: 559-570.
- **Doebley, J.** (2004) The genetics of Maize Evolution. *Annu. Rev. Genet.* 38:37-57.
- **Francis, D.** (2007) The plant cell cycle—15 years on. *New Phytol.* 174: 261-278.
- **Francis, D.** (2009) What's new in the plant cell cycle? *Prog. in Bot.* 70: 33-49.
- **Gamper, A.M., Choi, S., Matsumoto, Y., Banerjee, D., Tomkinson, A.E. y Bakkenist, C.J.** (2012) ATM protein physically and functionally interacts with proliferating cell nuclear antigen to regulate DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 287: 12445-12454.
- **García-Quintana, C. de T.** (2009) "Aceleración y frenado de la proliferación celular" *Ana.Real.Acad.Nac.Farm.* 71: 535-569.
- **Godínez-Palma, S.K. y Vázquez-Ramos, J.M.** (2013) Ciclinas D y CDKs en el inicio de la germinación de maíz. *Mens. Bioq. Vol. XXXVIII:* 160-183.
- **Godínez-Palma, S.K., García, E., Sánchez, M. de L., Rosas, F. y Vázquez-Ramos, J.M.** (2013) Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J. Exp. Bot.* 64: 5661-5671.
- **Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Peterhansel, C. y Stam, M.** (2007) Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Met.* 3: 1-16.
- **Herrera I. Sánchez M.P., Molina J., Plasencia J., Vazquez-Ramos J.M.** (2000) Proliferating cell nuclear antigen expresión in maize seed development and germination: regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant* 100, 127-134.

- **Hishiki, A., Hashimoto, H., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohashi, E., Shimizu, T., Ohmori, H. y Sato, M.** (2009) Structural Basis for Novel Interactions between human translesion Synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 284:10552-10560.
- **Inagaki, S. y Umeda, M.** (2011) Cell-cycle control and plant development. *Int. Rev. Cell Mol. Bio.* 291: 227-261.
- **Inzé, D.** (2007) *Cell Cycle Control and Plant Development.* Blackwell Publishing Ltd. 31-53.
- **Ivanov, I., Chapados, B.R., McCammon, J.A. y Tainer, J.A.** (2006) Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions and functional implications. *Nuc. Acids Res.* 34: 6023-6033.
- **Jonsson, Z.O., Hindges, R. y Hübscher, U.** (1998) Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO J.* 17: 2412-2425.
- **Kim, B.J. y Lee, H.** (2008) Lys-110 is essential for targeting PCNA to replication and repair foci, and the K110A mutant activates apoptosis. *Biol. Cell* 100: 675-686.
- **Koundrioukoff, S., Jonsson, Z.O., Hasan, S., de Jong, R.N., van der Vliet, P.C., Hottiger, M.O. y Hübscher, U.** (2000) A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275:22882–22887.
- **Lapidot-Lifson, Y., Patinkin, D., Prody, C.A., Ehrlich, G., Seidman, S., Ben-Aziz, R., Benseler, F., Eckstein, F., Zakut, H. y Soreg, H.** (1992) Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of cdc2 required in hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 579-583.
- **Lara-Nuñez A., Vazqu ez-Ramos J.M.** (2008) Cyclins D, phytohormones and cell cycle onset in germinating maize. *Plant Signal Behav.* 3: 578-579.
- **Lomanto-D az, L.D., Ortiz-Cala, O.L., G omez-Lizcano, A.I., Bret n-Pinto, C.O., Mesa-Cornejo, V.M.** (2003) El ciclo celular. *MedUNAB.* 6: 21-29.

- **Maga, G. y Hübscher, U.** (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 116: 3051-3061.
- **Magnard, J.L., Yang, M., Chen, Y.C., Leary, M. y McCormick, S.** (2001) The Arabidopsis gene tardy asynchronous meiosis is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiol.* 127: 1157-1166.
- **Martínez-Mata, M.A.** (2011) Asociación de PCNA con proteínas del ciclo celular durante la germinación de maíz. *Tesis Licenciatura UNAM.* México.
- **Massie C.E. y Mills, I.G.** (2008) ChIPping away at gene regulation. *EMBO Rep.* 9: 337-343.
- **Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman M.M., Sanchez, G.J., Buckler, E. y Doebley J.** (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 6080-6084.
- **Mayers, R.A.** (2012) Epigenetic Regulation and Epigenomics: advances in Molecular Biology and Medicine. Wiley-Blackwell. USA: 43-55.
- **McDonald, M.B. y Kwong, F.Y.** (2005). Flower Seeds: Biology and technology. CABI publishing.UK: 145-150.
- **Menges, M., Pavesi, G., Morandini, P., Bögre, L. y Murray, J.A.** (2007) Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins. *Plant Physiol.* 145:1558-1576.
- **Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. e Inzé, D.** (1999) Cyclin-dependent kinases and cell división in plants: the nexus. *Plant Cell* 11: 509-521.
- **Moldovan, G.L., Pfander, B. y Jentsch, S.** (2007) PCNA, the maestro of replication fork. *Cell* 129: 665-79.
- **Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. y Shinmyo, A.** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J.* 18: 243–252.
- **Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M. y Shinmyo, A.** (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 14: 1847–1857.

- **Nasmyth, K.** (1996) Putting the cell cycle in order. *Sci.* 274: 1643-1645.
- **Naryzhny, S.N., Zhao, H. y Lee, H.** (2005) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. *J. Biol. Chem.* 280: 13888-13894.
- **Naryzhny, S.N.** (2008) Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3789-3808.
- **Naryzhny, S.N. y Lee, H.** (2010). Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Lett.* 584: 4292-4298.
- **Nonogaki, H., Bassel, G.W., Bewley, J.D.** (2010) Germination-Still a mystery. *Plant Science* 179: 574-581.
- **Orlando V., Strutt, H. y Paro, R.** (1997) Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Meth.* 11: 205-214.
- **Orlando, V.** (2000) Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.* 25: 99-104.
- **Pereira, P.A., Sousa, F.V. y Becker, J.D.** (2012) Decision –Making in the plant cell cycle. *Canal BQ.* 9: 48-62.
- **Piperno, D.R., Ranere, A.J., Holst, I., Iriarte, J. y Dickau, R.** (2009) Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the central Balsas River Valley, Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 5019-5024.
- **Punchihewa, C., Inoue, A., Hishiki, A., Fujikawa, Y., Connelly, M., Evison, B., Shao, Y., Heath, R., Kuraoka, I., Rodrigues, P., Hashimoto, H., Kawanishi, M., Sato, M., Yagi, T. y Fujii, N.** (2012) Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *J. Biol. Chem.* 287: 14289-14300.
- **Ramirez-Parra, E., Fründt, C. y Gutierrez, C.** (2003) A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33: 801-811.
- **Sakurai, S., Kitano, K., Yamaguchi, H., Hamada, K., Okada, K., Fukuda, K., Uchida, M., Ohtsuka, E., Morioka, H. y Hakoshima, T.** (2005) Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. *EMBO J.* 24: 683-693.

- **Sánchez, M.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. y Vázquez-Ramos, J.M.** (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* 50: 167-175.
- **Sawers, R.J. y Sánchez-León, N.L.** (2011) Origins of maize: a further paradox resolved. *Front Genet.* 2:53.
- **Scorah, J., Dong, M.Q., Yates, J.R., Scott, M., Gillespie, D. y McGowan, C.H.** (2008) A conserved proliferating cell nuclear antigen-interacting protein sequence in Chk1 is required for checkpoint function. *J. Biol. Chem.* 283: 17250-17259.
- **Serratos-Hernández, J.A.** (2009) The origin and diversity of maize in the American continent. [www.greenpeace.org.mx](http://www.greenpeace.org.mx).
- **Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) – SAGARPA.** Situación actual y perspectiva del maíz en México 1996-2012. [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/PublicaDinamica/Estadistica/E\\_Derivada/maiz96-12.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/PublicaDinamica/Estadistica/E_Derivada/maiz96-12.pdf).
- **Shengxi, L.** (2006) Applications of the Chromatin Immunoprecipitation Assay for studying mechanisms of the receptor-mediated Transcription. *Proquest. USA:* 48-58.
- **Srivastava, L.M.** (2002) *Plant Growth and Development: Hormones and Environment.* Acad. Press USA: 50-59.
- **Stals, H. e Inzé, D.** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6: 359-364.
- **Strable, J. y Scanlon, M.J.** (2009) Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harb. Protoc.* 4: 1-9.
- **Struhl K.** (2007) Interpreting Chromatin Immunoprecipitation Experiments. In evaluating techniques in biochemical research. *Cell Press UK:* 29-33.
- **Strzalka, W. y Ziemienowicz, A.** (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann. Bot.* 107: 1127-1140.
- **Vázquez-Ramos, J.M. y Sánchez, M.P.** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* 13, 113-130.



- **Vázquez-Ramos, J.M.** (2006) El ciclo celular: Modelos animales y vegetales. Mensaje Bioq. Vol. XXX: 57-64.
- **Verma, D.P.S. y Hong, Z.** (2008) Cell Division Control in Plants. Springer USA: 59-67.
- **Weitbrecht, K., Müller, K., Leubner-Metzger, G.** (2011) First off the mark: early seed germination. J. Exp. Bot. 62: 3289-3309.
- **Wu, C.H., Chen, S., Shortreed, M.R., Kreitinger, G.M., Yuan, Y., Frey, B.L., Zhang, Y., Mirza, S., Cirillo, L.A., Olivier, M. y Smith, L.M.** (2011) Sequence-specific capture of protein-DNA complexes for mass spectrometric protein identification. Plos One. 6:e26217.
- **Zhuang, Z. y Ai, Y.** (2010) Processivity factor of DNA polymerase and its expanding role in normal and translesion DNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1804: 1081-1093.

## ANEXO

Query: P69246 (H32\_Maize)

Sbjct: P68431 (H31\_Human)

		<b>Identidad</b>	<b>Positivos</b>	<b>Espacios</b>		
		132/136(97%)	134/136(98%)	0/136(0%)		
Query	1	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRFRPGTVALREIRKYQKSTE			60	
Sbjct	1	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHR+RPGTVALREIR+YQKSTE			60	
Query	61	LLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVAALQEAAEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTI			120	
Sbjct	61	LLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAV ALQEA EAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTI			120	
Query	121	MPKDIQLARRIRGERA	136			
Sbjct	121	MPKDIQLARRIRGERA	136			

**Figura 1.** Comparación de la histona H3 de maíz con la histona H3 de humano.