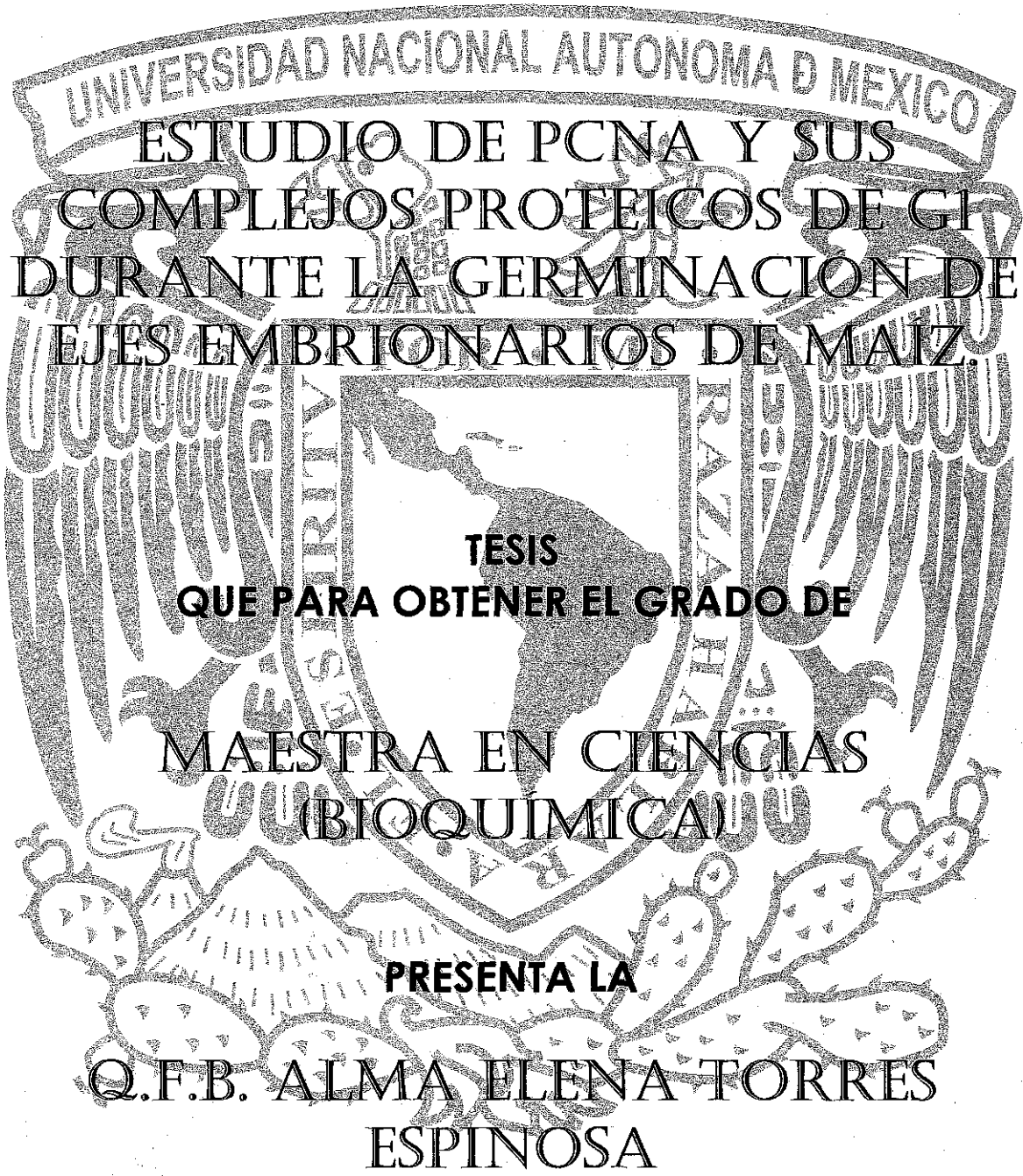


00551

19

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ESTUDIO DE PCNA Y SUS
COMPLEJOS PROTEICOS DE GI
DURANTE LA GERMINACION DE
EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICA)

PRESENTA LA

Q.F.B. ALMA ELENA TORRES
ESPINOSA

México D.F., Mayo del 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA
EN CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA
EN CIENCIAS QUÍMICAS

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	I
JURADO DE EXÁMEN	III
AGRADECIMIENTOS	VII
DEDICATORIAS	IX
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
SISTEMA BIOLÓGICO: LA SEMILLA DE MAÍZ	3
LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	5
MODELO DE INVESTIGACIÓN : EL CICLO CELULAR.....	7
LA FASE G1	8
ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR	10
LA FASE G1 DEL CICLO CELULAR EN PLANTAS.	13
ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	17
PROPÓSITO PRINCIPAL	21
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS	23
GENERAL	23
PARTICULARES	23
DISEÑO EXPERIMENTAL	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
MATERIALES.....	27
BIOLÓGICO.....	27
REACTIVOS QUÍMICOS	27
EQUIPO.....	28
MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	35
CULTIVOS CELULARES	35
FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DURANTE LA GERMINACIÓN	37
COMPORTAMIENTO DE PCNA	38
COMPORTAMIENTO DE LA PROTEÍNA TIPO CICLINA D	43
COMPORTAMIENTO DE LA CDK	45
COMPORTAMIENTO DE ZmRBR.....	47
FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DURANTE LA GERMINACIÓN ESTIMULADA CON BENCILADENINA	51
COMPORTAMIENTO DE PCNA	52
COMPORTAMIENTO DE LA CDK A.....	53
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS.....	65
APÉNDICE.....	A
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	A
MEDIO DE CULTIVO N ₆ MODIFICADO (Inducción de callo).....	A
MEDIO DE CULTIVO N ₆ MODIFICADO(Medio líquido).....	A
MICRODYN	B
SOLUCIÓN DE IMBIBICIÓN	B
AMORIGUADOR DE EXTRACCIÓN	B
REACTIVO DE BRADFORD.....	B

AMORTIGUADOR DE ÉLUSIÓN.....	C
SDS PAGE.....	C
AMORTIGUADOR DE CARGA (Reactivo de Laemmli).....	C
AMORTIGUADOR DE TRASFÉRENCIA.....	C
SOLUCIÓN BLOQUEADORA.....	D
SOLUCIÓN PBS 10 x.....	D
AMORTIGUADOR A.....	D
AMORTIGUADOR DE CINASAS.....	D
AMORTIGUADOR DE REACCIÓN.....	D
SOLUCIÓN DE BA 1×10^{-3} M.....	D
SOLUCIÓN CONTROL PARA BA.....	D
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LISIS.....	E
BIBLIOGRAFÍA.....	G

JURADO DE EXÁMEN

En el oficio PMDCB/094/2002 del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, fue nombrado el siguiente jurado de examen:

Presidente	Dra. Irma Bernal Lugo
Vocal	Dr. Mario Rocha Sosa
Secretario	Dr. José Pedraza Chaverri
Suplente	Dr. Roberto Còria Ortega
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 114 del edificio "E" de posgrado del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, U.N.A.M.; bajo la dirección del Dr. Jorge M. Vázquez Ramos.

A un joven científico mexicano:

Tu obligación como hombre de ciencia es decir la verdad sin que te importen ni los prejuicios religiosos, ni los prejuicios políticos, ni los prejuicios sentimentales.

Alfonso Caso

CHAPTER 1

AGRADECIMIENTOS

Detrás de todo logro siempre existe un sinnúmero de personas involucradas que participaron de manera directa o indirecta en la culminación de este. La mejor manera de darle las gracias es mediante el reconocimiento de este apoyo.

Los principales responsables de este hecho son dos personas, Carmen y Rafael, sin los cuales no existiría y sin su apoyo no sería lo que soy.

Junto a ellos, Leonardo y Jorge, que han sido un apoyo incondicional durante toda mi vida.

Agradezco muy especialmente a Alberto, por su amistad, su apoyo incondicional en todo momento y sobre todo por su cariño.

Agradezco a DGAPA a través del proyecto IN-206799 y a CONACYT el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

Finalmente al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos, por la paciencia, el apoyo, la confianza y por ser mi guía en este tránsito por el mundo de la ciencia.

DEDICATORIAS

A mis padres, con respeto y admiración.

A Leonardo y a Jorge, por compartir conmigo este gran reto que es la vida.

A mi familia, cuyo apoyo siempre ha estado presente.

A Alberto, por ser él y compartir mis ideales.

A mis amigos y compañeros en el Departamento de Bioquímica, que de una u otra forma me auxiliaron en la elaboración de esta investigación, en especial a: Dairo, Doña Chuy, Doña Licha, Félix, Erick, Lety, Luz Ma y en particular a Pilo y a Mayte.

A mis entrañables amigos de hoy y siempre: Andrea, Carlitos, Cexi, Cristina, Dioel, Goyito, Guada, Homero, José Juan, José Luis, Martín, Nora, Pablín y Sergio

A ellas, siempre ignoradas, que donaron su eje embrionario en apoyo a la ciencia: las semillas de maíz.

1912

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
Amp	Amperes.
ARN m	Ácido ribonucleico mensajero.
ARN r	Ácido ribonucleico ribosomal.
ARN t	Ácido ribonucleico de transferencia.
ATP	Adenosina trifosfato.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
BA	Benciladenina.
Ci	Curie, 1 Ci = 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo.
CAK	Cinasa activadora de cdk.
cdk	Ciclina dependiente de cinasa.
CKI	Inhibidor de cdk.
cm	Centímetros.
cpm	Cuentas por minuto.
Da	Daltons.
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
dCTP	Desoxicitosina trifosfato.
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato.
dTTP	Desoxitimidina trifosfato.
DTT	Ditiotreitol.
E2F, DP1	Familia de factores de transcripción derivados del factor E2 de adenovirus.
ECL	Método de incremento de la quimioluminiscencia.
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético.
EGTA	Etilénglicol bis(β -aminoetiléter)-N,N,N',N', ácido tetraacético.
Fen1	5',3' flap exo-/endo-nucleasa.
Gadd45	Proteína de detención del crecimiento celular y de respuesta al daño al ADN.
°C	Grados celsius.
g	Gramos.
g	Gravedades.
h	Horas.
M	Concentración molar.
mg	Miligramo.
min	Minuto.
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar.
μ g	Microgramos.
μ m	Micrómetros.
μ L	Microlitros.
N	Concentración normal.
nm	Nanómetros.

p21 ^{CIP1}	Inhibidor de cdk
p27 ^{KIP}	Inhibidor de cdk
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonato.
pRb	Proteína del retinoblastoma.
RFC	Factor de replicación C.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamina.
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad enzimática.
U.A.	Unidad de absorbencia.
V	Volts.
ZmRBR	Proteína del retinoblastona homóloga en maíz.

RESUMEN

Se ha demostrado que durante las primeras horas de germinación en semillas existe una red de señalización que permite a las células de la semilla el reconocimiento de las condiciones ambientales, con el fin de establecer el inicio de la proliferación. Este proceso es semejante al que ocurre cuando las células animales se encuentran en la fase G1 temprana del ciclo celular.

El interés del grupo de trabajo desde hace tiempo es el estudio de las proteínas que controlan la entrada al ciclo celular durante la germinación de maíz, como una forma de conocer los factores bioquímicos y moleculares que regulan el proceso germinativo. En particular, se ha puesto especial interés en un complejo formado por al menos dos proteínas: una tipo ciclina D y una cdk (cinasa dependiente de ciclina, cdk-A). Estas proteínas se asocian a su vez a la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), factor esencial para la replicación del ADN, por lo que se sugiere que la entrada a la fase S podría ser controlada desde la fase G1 a partir de estas asociaciones.

Bajo la idea de que en células animales se tienen evidencias de que PCNA es una proteína que se asocia a una gran variedad de proteínas involucradas en el ciclo celular; se esperaba que PCNA de maíz tendiera a formar complejos semejantes, los cuales se verían modificados conforme la germinación avanzara y dichos complejos, por evidencias en corrimiento en geles nativos, tendrían un tamaño alrededor de 200 kDa.

En el presente trabajo se pretendió definir el tamaño aproximado de los complejos proteicos que PCNA forma tanto en cultivos celulares como durante la germinación de maíz, e identificar proteínas de la fase G1 que se asocian a PCNA en estos complejos. Para lograr lo anterior se trató de establecer un sistema de cultivos celulares de plantas y sincronizar células, con lo cual se tendrían tiempos y comportamientos más homogéneos, empleando como un parámetro comparativo las fluctuaciones de estos complejos a lo largo de la germinación. Desafortunadamente esto no pudo lograrse debido a la dificultad inherente al sistema biológico.

Conjuntamente, se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular y ensayos de Western-blot, que PCNA se encontraba presente durante las primeras horas de germinación en complejos proteicos que van desde 203 hasta 450 kDa y tamaños mayores exclusivamente y en donde también, mediante ensayos de actividad, se buscó la presencia de la

ADN polimerasa, sin que fuera posible detectarla. Se determinó que PCNA permanece desde las 3 h hasta las 15 h de germinación en los complejos de alrededor de 59 a 170 kDa, en los cuales se encuentra asociada con proteínas tipo ciclina D y cdk A, y utilizando ensayos de actividad de cinasa se estableció que ciclina D-cdk A es capaz de fosforilar a su sustrato natural, ZmRBR.

Cuando la germinación es estimulada con benciladenina, un fitorregulador que promueve la división celular, PCNA se presenta en complejos alrededor de 105 a 252 kDa, en los cuales se asocia únicamente a la proteína cdk A de mayor tamaño.

Se concluye que PCNA, durante las primeras horas de la germinación está presente en un complejo con ciclina D-cdk-A, además dichos complejos están activos y son capaces de actuar sobre su blanco natural para dar lugar a la fase S de ciclo celular. Además de que la formación de este complejo se ve adelantada, con respecto a la germinación normal, con la adición de hormonas.

INTRODUCCIÓN

El maíz es el único cereal originario de América. El origen exacto del maíz aún es debatido, la mayoría de los investigadores señalan que el maíz se derivó de una hierba nativa del Valle de Tehuacán, al sur de México, hace aproximadamente 4,600 años, y la cosecha de este grano hizo posible el florecimiento de las grandes civilizaciones mesoamericanas.

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

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

Para iniciar el estudio del maíz se precisa conocer más acerca de la planta y sobre todo de la semilla y así poder entender a esta última como un modelo biológico viable.

SISTEMA BIOLÓGICO: LA SEMILLA DE MAÍZ

El maíz es una planta fanerógama del subtipo de las angiospermas monocotiledóneas, perteneciente a la familia de las poáceas (gramíneas), es un integrante de la tribu Maydæ, específicamente del género *Zea* y cuya especie *mays*, es la de mayor importancia nutricional. Como se mencionó anteriormente, es una especie monoica, lo que significa que sus inflorescencias, masculina y femenina, se ubican separadas dentro de una misma planta.

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

Morfológicamente una semilla de maíz (figura 1), está constituida principalmente por tres estructuras básicas: el embrión, el endospermo y la cubierta seminal o pericarpio. El tejido que formará la planta adulta es el eje embrionario, que se compone por, la radícula (raíz rudimentaria), la caliptra (tejido que recubre al meristemo radicular), la coleorriza (tejido que cubre la caliptra, raíz primaria suprimida), la plúmula (tejido que se convertirá en el tallo y las hojas de la planta) y, finalmente, el coleoptilo, que en el eje embrionario es el sitio al que se une el cotiledón. El embrión está conformado por el eje embrionario junto con su cotiledón. El endospermo es la capa que rodea al embrión y funciona como la reserva energética de la semilla debido a su alto contenido de carbohidratos. Finalmente, se encuentra la cubierta seminal, que se considera una de las estructuras más importantes de la semilla, ya que de su composición y permeabilidad depende la interacción de la semilla con el medio ambiente y la conclusión de la germinación con éxito (Bidwell, 1979; Steeves, 1983; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984; Bewley y Black, 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

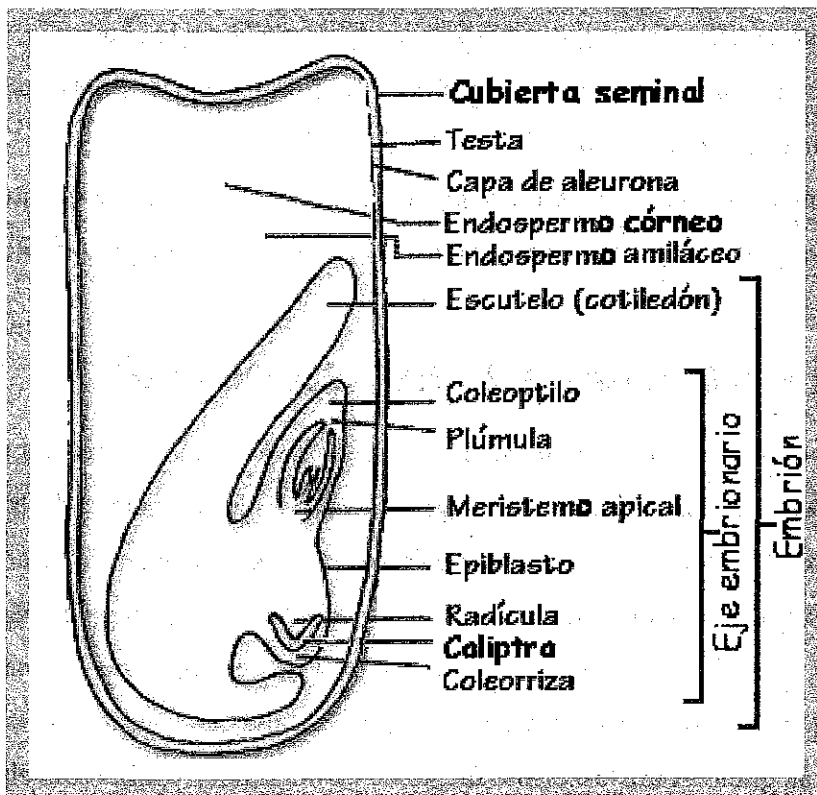
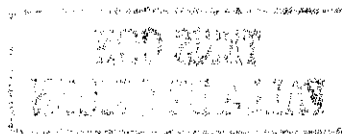


Figura 1. Estructura de la semilla de maíz. Modificado de Bidwell, 1979.



Importante de mencionar es el proceso de la germinación, fenómeno mediante el cual se trata de explicar cómo un individuo prácticamente inerte como una semilla es capaz de llegar a formar un sistema metabólico activo y altamente complejo como una planta.

LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

El término germinación involucra una gran variedad de procesos, que dependen en particular del organismo en estudio. En las plantas la germinación tiene como común denominador el inicio de procesos de desarrollo y crecimiento suspendidos durante la formación de semilla, mediante la imbibición o entrada de agua a la semilla, difiriendo sólo el concepto de su conclusión. Por ejemplo, para la agronomía la germinación culmina con la emergencia de la plántula del suelo, lo que implica un tiempo en que ya habrán ocurrido múltiples procesos que involucran el crecimiento de todas las estructuras de la plántula; para la fisiología vegetal, la germinación se termina con la elongación inicial y la protrusión de la radícula, aún cuando en este momento no necesariamente se han presentado indicios de proliferación celular en los tejidos.

Para nuestro grupo, la germinación es el proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla y que culmina con la consumación de la primera ronda de divisiones celulares, siendo la germinación un proceso preparativo para el posterior desarrollo y proliferación de las células en los tejidos que más adelante formarán la planta.

En realidad, la germinación consiste en la reanudación de un número muy grande de procesos metabólicos que son activados por la entrada de agua a la semilla, fenómeno que presenta tres fases: la fase inicial (I) que se caracteriza por la entrada rápida de agua de una manera física, produciendo rupturas en las membranas internas por el cambio estructural de los lípidos en las membranas y, por ende, escape de solutos al medio; pero al mismo tiempo se empiezan a reestructurar y reparar tanto las membranas, como otros componentes celulares, ADN, mitocondrias, ribosomas y se comienzan a sintetizar proteínas, a partir de los ARNms preexistentes. También se reanudan procesos de respiración para la producción de ATP, al mismo tiempo que se comienzan a sintetizar nuevos ARNms, ARNts y ARNrs (Ching, 1972; Sen *et al*, 1974; Osborne *et al*, 1980). En la fase II se observa una reducción casi total en la entrada de agua a la semilla; durante esta fase disminuyen los procesos de reorganización celular y se incrementa el número de mitocondrias. A partir de este momento las proteínas

sintetizadas derivan de los nuevos ARNms. Muchos autores dan por terminada la germinación al final de esta fase, ya que es aquí donde se produce la protrusión de la radícula, pero como se mencionó previamente, nuestro parámetro de término de la germinación es diferente. La fase III coincide con una nueva entrada de agua relacionada con el aumento de tamaño que sufren las células de la radícula; es hasta esta fase donde comienzan a moverse las reservas de la semilla, en el caso particular de maíz, los carbohidratos en forma de almidón. El comienzo de la duplicación del ADN (fase S del ciclo celular) se ubica entre las fases II y III (Osborne, *et al*, 1980, 1983; Bewley, 1997).

Todos estos procesos deben estar fuertemente regulados, por su importancia en la subsistencia de la especie. Existen controles sobre el desarrollo y proliferación a varios niveles, en cualquier etapa de la vida de una planta, desde la formación de la semilla hasta la culminación del crecimiento y desarrollo de la planta adulta (Bidwell, 1979). Específicamente, en el ámbito germinativo, se especula que el primer nivel llamado genético, dependerá de la estimulación de la expresión específica de genes relacionados con la reanudación de actividades metabólicas, proliferativas y de desarrollo. De la misma manera, el control a nivel de los tejidos, comprende la modificación del desarrollo por medio de la síntesis o degradación de hormonas vegetales, para activar o desactivar programas de desarrollo y diferenciación, tanto en una acción individual, como en una acción conjunta o modificada al asociarse con otras sustancias celulares (Sembdner *et al*, 1994). El último nivel de control produce una respuesta en la semilla; se trata de las condiciones ambientales que conducen a la conclusión de la germinación, como la luz disponible, la humedad y el pH del medio, la presencia de nutrimentos, etc. En condiciones adversas de estos factores la semilla puede morir o entrar en un estado denominado dormancia; es decir, la germinación se interrumpe hasta que existan las condiciones óptimas para concluirla (Bewley, 1997).

Lo anterior sugiere que existe toda una red de señalización celular que permite a la semilla el reconocimiento de que las condiciones hídricas están cambiando y de que las estructuras celulares deben reconstituirse, señales que indican que la proliferación es posible. Cabría pensar que durante las primeras horas de la germinación de semillas, las células mantuvieran un estado semejante a la fase G1 temprana del ciclo celular, ya que los diferentes tejidos se están hidratando y activando su metabolismo, además de que las células están desarrollando procesos reparativos y de reintegración membranal y organelar, recolectando

información y percibiendo su entorno con el fin de determinar, bioquímicamente, que tan conveniente es que inicie la proliferación.

Por lo anterior surge el deseo de estudiar a la germinación desde una nueva perspectiva: el ciclo celular.

MODELO DE INVESTIGACIÓN : EL CICLO CELULAR

Todos los seres vivos tienen como misión fundamental el preservar sus características esenciales de generación en generación, asegurando que todo su material genético se reparta en forma equitativa entre las células hijas resultantes. Para ello, existe una molécula, el ADN que debe ser duplicada exactamente, ya que es la molécula responsable de la herencia.

El ciclo celular es el proceso en el cual se encuentran comprendidos los eventos que ocurren durante la reproducción celular. Este proceso está determinado por cuatro fases diferentes, las cuales tienen como objetivo primordial asegurar que el ADN se duplique (fase S o síntesis), se reparta adecuadamente entre dos núcleos o mitosis (fase M) y que dichos núcleos formen posteriormente parte de dos células diferentes, al dividirse la célula madre (citocinesis). Las dos fases restantes, denominadas G1 y G2 (gap, espacio o hueco) ocurren antes de la fase de síntesis o de mitosis, respectivamente y en ellas se llevan a cabo una serie de eventos metabólicos que tienen como fin establecer si las condiciones ambientales y de nutrimentos son propicias para que ocurra el ciclo celular (G1) o bien, si el ADN ha sido replicado adecuadamente para que pueda segregarse (G2). En un sentido más estricto, puede definirse al ciclo celular como una sucesión de interfase y mitosis, es decir, un conjunto de eventos metabólicos y regulatorios necesarios para la continuidad del ciclo acompañados de rearrreglos citoplasmáticos y nucleares que permitan la repartición exacta del material genético (Howard, 1953; Hartwell, 1989, figura 2).

Con el fin de asegurar una replicación exacta y unitaria del ADN, el ciclo celular se encuentra regulado principalmente en dos puntos de control ("check points") que se localizan en la fase G1 tardía, justo antes de la replicación del ADN y en el límite de la fase G2/M previo a la mitosis (M). El desarrollo del ciclo celular depende de la actividad de diferentes complejos formados por proteínas cinasas dependientes de ciclinas (cdk) y de ciclinas como subunidades regulatorias, las cuales fluctúan en cantidad a lo largo del ciclo acumulándose en etapas específicas. El control más fino del ciclo celular está basado en la regulación de la

actividad de estos complejos e involucra diferentes niveles incluyendo transcripción, interacción proteína-proteína y fosforilación/desfosforilación (Jacobs, 1995; Hutchison y Glover, 1995).

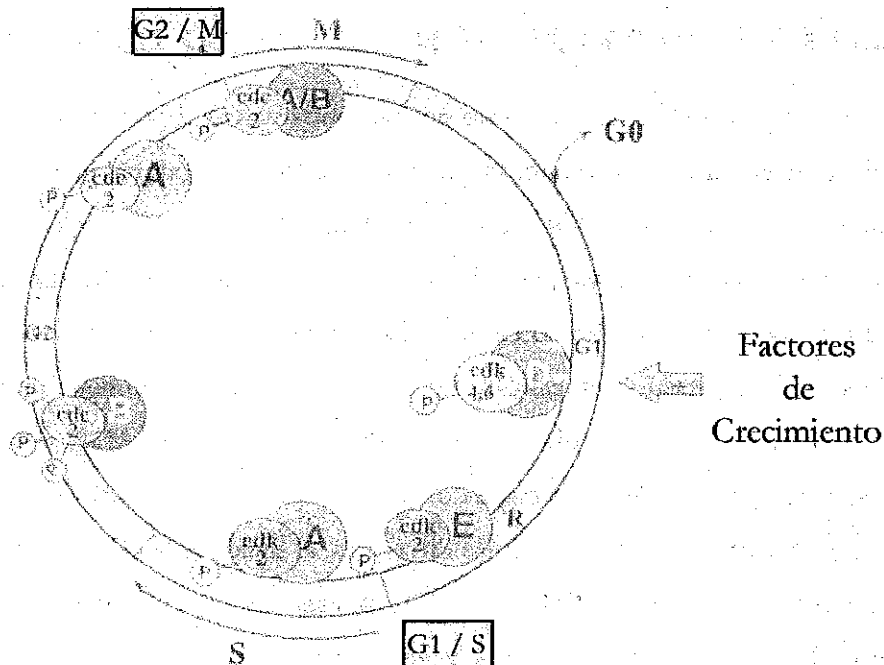


Figura 2. Esquema del ciclo celular en células de mamíferos. El ciclo celular en mamíferos consiste básicamente de cuatro fases: la fase G1, la síntesis de ADN (S), la fase G2 y la mitosis (M). La transición entre las diferentes fases es regulada por complejos ciclina/cdk. Diferentes ciclinas (A, B, D y E) están presentes durante las diferentes fases del ciclo e interactúan con diferentes cdks (cdk4/6, cdk2 y cdc2^{cdk1}). En ausencia de factores de crecimiento las células detendrán su división y entrarán a un estado quiescente (G0). Modificado de Hulleman y Boonstra, 2001.

Dada la complejidad que presenta el ciclo celular completo, nuestro estudio sólo se concentrará en la fase G1 ya que los eventos fisiológicos presentes en esta fase son los que ocurren en las etapas iniciales de la germinación, nuestro modelo de estudio.

LA FASE G1

En eucariontes, el ciclo celular se inicia cuando las células salen de la etapa conocida como G0, en la cual han permanecido latentes, como consecuencia de una cascada de señalización generada en el interior celular, por factores de crecimiento y de nutrientes

presentes en el medio circundante, lo que, finalmente, se traduce en una señal de proliferación. El complejo proteico encargado de interpretar estas señales es la pareja formada por una proteína llamada ciclina D y una proteína cinasa, que puede ser la cdk4 o la cdk6; a este heterodímero se le conoce como la puerta de entrada al ciclo celular y es quien regula el punto R (restricción) o punto de compromiso situado hacia el final de la fase G1 y partir del cual las células serán conducidas irreversiblemente a duplicar su genoma (Hutchison and Glover, 1995). La tarea principal de este complejo ciclina-cinasa es la de fosforilar a la proteína del retinoblastoma (pRB) lo que permite el avance del ciclo hacia la fase S (figura 3). pRB es una proteína que se une a una serie de proteínas que participan en la regulación de la transcripción y de esta manera influye tanto positiva, como negativamente en la expresión de genes involucrados en el ciclo. En particular, pRB secuestra un tipo de factores transcripcionales pertenecientes a la familia E2F-DP1, lo que inhibe la progresión a la fase S (regulación negativa). La fosforilación de pRB provoca la liberación de E2F-DP1, lo que le permite funcionar como factor transcripcional. Entre los genes que son expresados como resultado de la acción del factor E2F-DP1 se encuentran varios que participan directamente en el metabolismo del ADN, como son los de la ADN polimerasa α (la enzima con actividad de polimerasa-primasa), la ADN ligasa, la timidina cinasa y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, proteína accesoria de la ADN polimerasa replicativa δ). También se estimula la expresión de los genes que codifican para otras ciclinas, como son las ciclinas E y A; estas ciclinas, junto con sus respectivas cinasas del tipo cdk2, participan de manera importante en la regulación de la entrada de las células a la fase S (Hutchison y Glover, 1995).

Pero no solo la proteína pRB participa regulando negativamente el ciclo celular. Existe una variedad de proteínas cuya misión es inhibir la actividad de los complejos ciclina-cinasa y detener el avance del ciclo. De estas proteínas existen dos familias de inhibidores, la familia de las proteínas CKI, cuyos representantes son las proteínas p21Cip1, p27Kip1 y p57Kip2, que tienen como blanco a los complejos de ciclina D-cdk 4/6 y de ciclina E-cdk2. La otra familia es la de las cuatro proteínas INK 4 (p15, p16, p18 y p19), cuyo objetivo central es el complejo ciclina D-cdk 4/6 (Hutchison y Glover, 1995).

Adicionalmente, se ha propuesto que el complejo ciclina D-cdk 4/6 cumple otra función básica para el ciclo, que es la de secuestrar a una proteína importante para el control del ciclo celular, PCNA, ya que se especula que la interacción PCNA-ciclina D impide que se lleve a cabo la síntesis prematura del ADN durante la fase G1 (Pagano *et al*, 1994). Durante la

transición G1/S, los niveles de ciclina D disminuyen considerablemente, lo que permite la liberación de PCNA y con ello su incorporación al complejo de duplicación.

PCNA es una proteína clave del ciclo celular y por ello conocer más acerca de su función y regulación se vuelve fundamental.

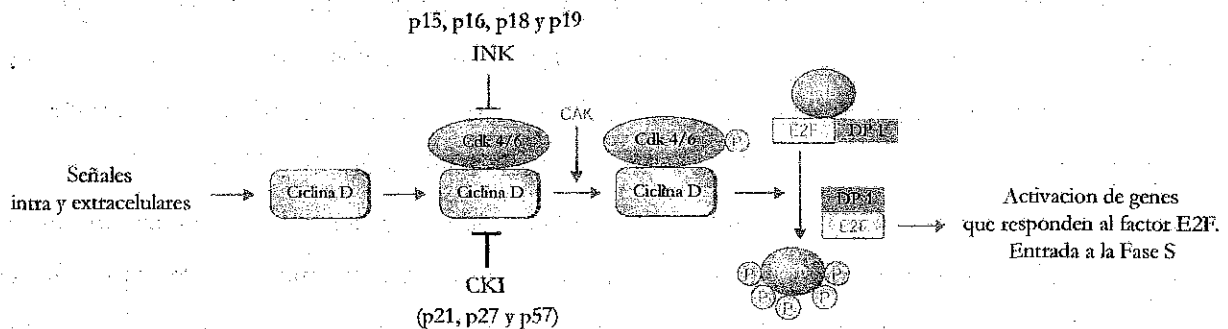


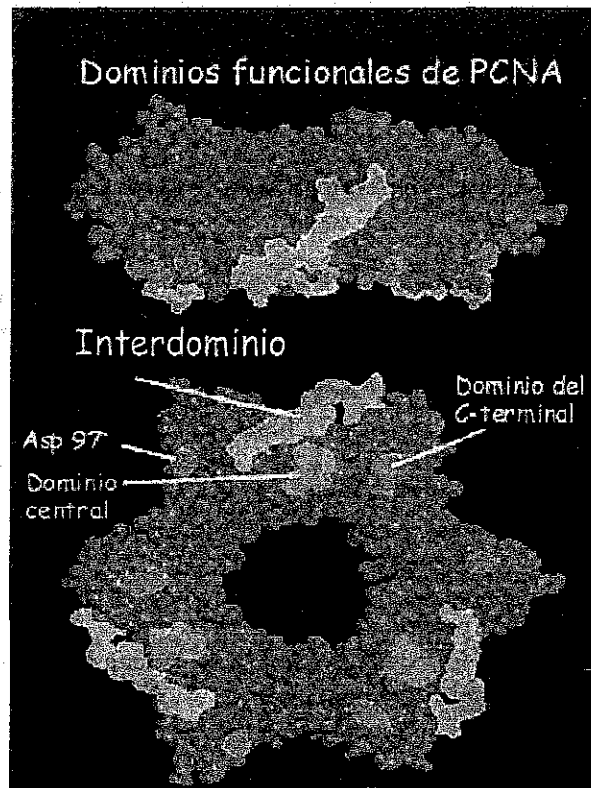
Figura 3. Mecanismos de control de la fase G1 del ciclo celular. En el punto de restricción (R), el complejo ciclina/cinasa de G1 (ciclina D-cdk4/6) se mantiene inhibido por la presencia de proteínas CKI o INK. Cuando las condiciones ambientales son propicias para la proliferación, ciclina D-cdk 4/6 fosforila a pRb y elimina la inhibición sobre el factor transcripcional E2F. Se inicia así, una regulación por retroalimentación positiva que incrementará los niveles de las ciclinas/cinasas de las fases G1/S y S, a la vez que permitirá la acumulación de proteínas propias de la fase S. Modificado de Meijer y Murray, 2001.

ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Esta proteína conocida como PCNA, fue originalmente identificado como un auto-antígeno en la enfermedad autoinmune lupus eritematoso sistémico (Miyachi, 1978). Su aparición periódica en núcleos durante la fase S, co-localizando con la incorporación de bromodesoxiuridina, sugirió su papel en la replicación del ADN (Bravo, 1987).

PCNA es una proteína homotrimérica (figura 4) que funciona como una abrazadera móvil en el ADN. Este tipo de factores existen comúnmente en todos los sistemas biológicos y su función es ayudar a las ADN polimerasas (enzimas replicativas) a sintetizar cadenas de ADN largas. Las abrazaderas móviles tienen en común una forma de anillo que es capaz de colocarse alrededor del ADN, en el límite de la región de doble cadena con cadena sencilla (Kelman, 1997) y el poder deslizarse libremente a lo largo de la doble hélice del ADN en ambas direcciones (Kong, 1992; Krishna, 1994; Gulbis, 1996), por lo que su interacción con las ADN polimerasas las estabiliza en el molde. Considerando su estructura cerrada de anillo, el problema topológico de como la abrazadera móvil es cerrada alrededor del ADN se explica mediante la presencia de factores conocidos como abrazaderas cargadoras que son necesarias

para abrir los anillos cerrados. El factor de replicación C (RFC) tiene esta función para PCNA, a través de su unión específica y su actividad de ATPasa (Tsurimoto, 1990; Lee, 1991).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Estructura tridimensional de PCNA. PCNA es un homotrímero en forma de anillo esencial para la replicación del ADN. Contiene tres sitios principales de interacción con otras proteínas. El primero de ellos se localiza en el centro del monómero (Asp 41-His 44) y es llamado dominio central; a él se unen proteínas como RFC, la polimerasa delta, p21 y Fen 1. Hacia la región de Lys 254-Glu 256 se localiza el dominio C-terminal, donde se unen proteínas como RFC, Fen 1, Gadd45, p21 y polimerasa epsilon. Finalmente, en la región correspondiente a los residuos Leu 121-Glu 132 se localiza el interdominio, en donde se une la polimerasa delta. Adicionalmente a estos dominios existen otros sitios de interacción como el Asp 97 necesario para unión a RFC y Ala 231-Val 233 implicados en la unión a p21. Modificado de Oku, 1998.

Adicionalmente a su función como factor accesorio de las ADN polimerasas procesivas, PCNA interactúa con otras proteínas, algunas de ellas involucradas en el procesamiento de los fragmentos de Okasaki, reparación de ADN, reorganización de la cromatina y en recombinación. Además, en los últimos años, se ha determinado que esta proteína es capaz de interactuar con otras proteínas que se encuentran involucradas en el metabolismo del ADN y en el control del ciclo celular, tales como Fen 1, ADN ligasa, ADN topoisomerasa, ADN metil transferasa, uracil-ADN glicosilasa, proteínas de reparación (MLH1, MSH2, XP-G) e inhibidores de cinasas como p21, por lo que se ha propuesto que

puede tener un papel central, funcionando como una plataforma para el reclutamiento de proteínas a la cromatina.

La tabla 1 resume las proteínas identificadas en relación a PCNA, las funciones propuestas para ellas y el posible significado de su unión a PCNA.

Tabla 1. Proteínas que interactúan con PCNA (Modificado de Kelman, Z., 1997)

PCNA interactúa con	Función de la proteína	Papel que desempeña al interactuar con PCNA
Factor de Replicación C (RFC)	Cargado y descargado de la pinza móvil (PCNA).	Cargado/descargado de PCNA
ADN polimerasa δ	La unidad catalítica de la ADN polimerasa δ holoenzima (replicación y reparación del ADN)	Requerida para la síntesis procesiva de ADN
ADN polimerasa ϵ	ADN polimerasa que se ha sugerido se encarga de la síntesis de la cadena discontinua, reparación de ADN y control "check point".	Requerida para la síntesis procesiva de ADN
Fen 1	Maduración de los fragmentos de Okasaki (Flap endonucleasa)	Estimula la actividad de Fen 1
Gadd45	Se induce por daño a ADN indicando un posible papel en la reparación de ADN	Desconocido
XP-G	Proteína G de <i>Xeroderma pigmentosum</i> , importante en la reparación por escisión de nucleótidos	Desconocido
MSH2 / MLH1	Proteínas del "mismatch" de reparación	Desconocido
Ciclinas tipo D	Ciclinas de G1	Inhibe la replicación del ADN
p21	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, estabiliza el complejo ciclina-cinasa, y ayuda a su internalización al núcleo.	Inhibe la síntesis procesiva del ADN
ARN polimerasa (baculovirus)	ARN polimerasa	Requerida para la transcripción genética

LA FASE G1 DEL CICLO CELULAR EN PLANTAS.

En la búsqueda de los elementos que regulan el ciclo celular en plantas se han descrito una serie de genes homólogos. Los resultados obtenidos son indicativos de la existencia de presuntas proteínas relacionadas a las descritas para mamíferos. Los genes que codifican para las ciclinas de mitosis y las cdks fueron los primeros genes de ciclo celular caracterizados en plantas. Sin embargo, aunque las ciclinas y las cdks están notablemente conservadas, la semejanza estructural con proteínas existentes en levaduras y animales no es suficiente para asignarles un papel a estas proteínas, ya que el ciclo celular en plantas muestra varias peculiaridades relacionadas con la organización del citoesqueleto, la citocinesis (Fowles y Quatrano, 1997; Heese *et al.*, 1998), la reversión aún después de la diferenciación y las respuestas al control hormonal (Jacobs, 1995; Shaul *et al.*, 1996; Coenen y Lomax, 1997; Meyerowitz, 1997).

Las ciclinas D fueron primeramente aisladas de *Arabidopsis* y alfalfa dada su habilidad para complementar las mutantes correspondientes en levaduras (Dahl *et al.*, 1995; Soni *et al.*, 1995). Basados en el análisis de la secuencia, este tipo de ciclinas han sido clasificadas en cuatro distintos grupos: ciclina D1 (cyc D1), ciclina D2 (cyc D2), ciclina D3 (cyc D3) y ciclina D4 (cyc D4), siendo la última considerada como un posible miembro del grupo de cyc D2 (Soni, *et al.*, 1995; Renaudin, *et al.*, 1996; Murray, *et al.*, 1998; De Veylder, *et al.*, 1999; Sorrell, 1999a).

De manera similar a las ciclinas D de animales, estas ciclinas contienen el motivo LxCxE de unión a la proteína Rb; además, presentan un patrón de expresión estimulado por fitoreguladores, sugiriendo que controlan la progresión de la fase G1 en respuesta a señales extracelulares (Dahl *et al.*, 1995; Soni *et al.*, 1995; Doonan, 1998; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Sorrell, 1999). Se ha observado que la activación del ciclo celular por citocininas ocasiona la inducción de cyc D3 en la transición G1/S. Sin embargo, las cyc D2 no son inducidas por fitoreguladores, en cambio, se inducen en respuesta a la disponibilidad de sacarosa en el medio (Soni, *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1998). Lo anterior concuerda con lo observado en cultivos celulares donde la sacarosa induce la rápida aparición de cyc D2, estimulando con ello la transición G0/G1 (Soni, *et al.*, 1995; Sorrell, *et al.*, 1999). Cabe mencionar que cyc D4 también se induce por sacarosa, sugiriendo que la inducción por sacarosa es una característica general de las ciclinas D del grupo 2 (De Veylder, *et al.*, 1999).

Adicionalmente, las ciclinas D de plantas muestran interacción con proteínas tipo Rb, también descritas en plantas (Ach *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 1998), las cuales interactúa con una proteína homologa a E2F, recientemente identificada en plantas (Ramírez-Parra *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 1999). Lo anterior confirma su papel en la regulación de la fase G1 vía un mecanismo basado en Rb-E2F, aunque los detalles de este mecanismo aún deben ser determinados (figura 5).

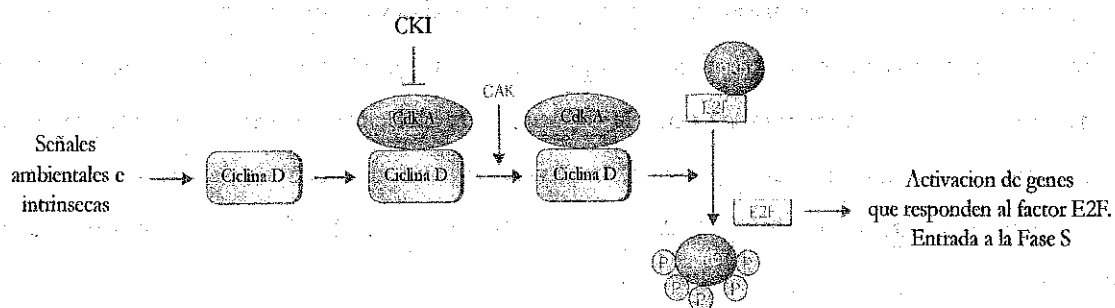


Figura 5. Modelo de la fase G1 del ciclo celular en plantas. Las señales ambientales e intrínsecas promueven un incremento en la ciclina D, la cual está asociada a la cdk A. La actividad del complejo se encuentra regulada por proteínas tipo CKI y cinasas activadoras de cdk (CAK). Al final de G1, los niveles de la ciclina-cdk se incrementan y entonces el complejo fosforila a pRb liberando con ello al factor transcripcional E2F de su represión por pRb. La activación de los genes que responden a E2F provoca la entrada a la fase S. Modificado de Meijer y Murray, 2001.

Cabe resaltar que las proteínas tipo cdk4 (la cinasa acompañante de ciclina D) y la proteína p53 aún no se han descrito para este reino (Joubès, *et al.*, 2000; Walbot, 2000).

Lo que se conoce, hasta la fecha, acerca de las cdk en plantas difiere en grado de homología, estructura y funcionalidad a lo que se ha descrito para levaduras y animales (Jacobs, 1995; Mironov, *et al.*, 1999; Umeda, *et al.*, 1999). Han sido descritas 46 probables cdk en más de 23 especies incluyendo algas, angiospermas y gimnospermas, agrupadas en forma de cinco clases (nombradas como cdk A, cdk B, cdk C, cdk D y cdk E) evolutivamente conservadas, lo cual indica un alto nivel de complejidad en esta súper familia de cinasas (Mironov, *et al.*, 1999).

Las cdk tipo A presentan una secuencia de aminoácidos conservada, PSTAIRE, la cual se encuentra en el sitio en donde se unen las ciclinas a la cinasa, siendo la responsable de dar nombre a esta familia (Burssens, *et al.*, 1998; Mironov, *et al.*, 1999). Este tipo de cdk complementan mutantes temperatura sensible en levaduras, lo cual fue la primera evidencia de la funcionalidad de las cdk en plantas (Colasanti, *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1991; Hirt, *et al.*, 1993). En este grupo de cdk, el transcrito y los niveles de proteína no muestran una expresión

preferencial por una fase del ciclo celular y además son detectadas, aunque en bajos niveles, en tejidos diferenciados (Martinez, *et al.*, 1992; Hemerly, *et al.*, 1993). Estos resultados sugieren una función dual de las cdk tipo A en plantas, lo que implica que actúan tanto en la progresión a S como en el paso a M (Colasanti, *et al.*, 1991; Ferreira, *et al.*, 1991; Hirt, *et al.*, 1993), sugiriendo que están involucradas en la proliferación celular y el mantenimiento de una adecuada división celular en tejidos diferenciados durante el desarrollo de la planta (Martinez, *et al.*, 1992; Hemerly, *et al.*, 1993). Recientemente se demostró que las cdk A pueden unirse a las ciclinas tipo D de plantas (De Veylder *et al.*, 1997; Nakagami *et al.*, 1999) y que este complejo cdk A-ciclina D es capaz de fosforilar, *in vitro*, a la proteína homóloga a Rb de tabaco y esto concuerda con el tiempo en que ocurre la transición de G1 a S (Nakagami, *et al.*, 1999).

Las cdk B poseen el motivo PPTALRE (cdk B1) o PPTTLRE (cdk B2; Burssens, *et al.*, 1998; Mironov, *et al.*, 1999). Estas cinasas son incapaces de complementar mutantes de levadura (Imajuku, *et al.*, 1992; Fobert, *et al.*, 1996) y su patrón de expresión a nivel traduccional como transcripcional si depende de la fase del ciclo celular; por ejemplo, el transcrito de cdk B1 se acumula durante las fases S, G2 y M, mientras que cdk B2, es específico de las fases G2 y M y su máximo de actividad de cinasa se obtiene durante la fase M (Fobert, *et al.*, 1996; Segers, *et al.*, 1996; Magyar, *et al.*, 1997; Umeda, *et al.*, 1999). El análisis más en detalle de la secuencia de las cdk B de plantas revela la presencia de 18-28 residuos de aminoácidos presentes en la cdk 2 de humanos, lo cual sugiere que tenderá a unirse preferentemente a las ciclinas B de plantas (De Bondt, *et al.*, 1993; Hanks, *et al.*, 1988).

Las cdk C se caracterizan por la presencia del motivo PPTAIRE, el cual también esta presente en la cdk 9 (Defalco y Giordano, 1998). No se conoce aún su función, pero tomando en cuenta su relación con la cdk 9, podría estar involucrada en el control de la transcripción (Defalco y Giordano, 1998).

Se ha propuesto que los genes de plantas relacionados con cdk 7 sean llamados cdk D. Estas cinasas tienen el motivo conservado N(I/F)TALRE. Las cinasas cdk 7 están consideradas como proteínas bifuncionales involucradas en la activación dependiente de fosforilación de otras cdk durante el ciclo celular (por ejemplo, función CAK) y la regulación dependiente de fosforilación de la actividad de la ARN polimerasa II (Harper y Elledge, 1998).

Finalmente, las cdk tipo E, poseen la secuencia conservada SPTAIRE y se ha visto que estas cinasas presentan una señal débil constitutiva durante la sincronización del ciclo celular (Magyar, *et al.*, 1997).

En lo que se refiere a la unión de las cdk's de plantas a los inhibidores de cinasas, tales como los de la familia Kip/Cip entre los que se encuentra p27^{Kip1}, se ha observado que poseen 10-12 residuos conservados (Russo, *et al.*, 1996) que están involucrados en la unión con el inhibidor, sugiriendo que las cinasas encontradas en plantas pueden unirse a los inhibidores homólogos en plantas de esta familia. Por otro lado, la familia INK 4, que corresponde a otro tipo de inhibidores de cinasas, está ausente en plantas, ya que este tipo de proteínas son específicas para cdk 4 y cdk 6 de animales. (Brotherton, *et al.*, 1998; Russo, *et al.*, 1998).

En maíz, aún no se han identificado las proteínas equivalentes a la ciclina D y al factor transcripcional E2F. Sin embargo ya se cuenta con los genes homólogos de PCNA (López *et al.*, 1995) y de pRB, ZmRBR (Xie *et al.*, 1996; Gutiérrez, 1998).

ANTECEDENTES INMEDIATOS

Nuestro interés desde hace varios años ha sido el identificar y definir a las proteínas del ciclo celular en plantas, tratando de entender su patrón de expresión, actividad y asociaciones durante un evento de desarrollo particular como es la germinación.

Partiendo de la idea de que en una semilla seca no deberían estar presentes proteínas propias de la proliferación celular, debido a que éstas debieron ser degradadas durante el largo proceso de maduración y posterior proceso de latencia de la semilla, se podría suponer que las proteínas que controlan el ciclo celular aparecen durante las primeras horas de la germinación. Sin embargo, en semillas no germinadas se ha detectado la presencia de proteínas de la fase G1 como son proteínas tipo ciclina D, cdk de G1, E2F, pRB y p53; proteínas de la fase S como PCNA, ADN polimerasa α -primasa y ADN polimerasa δ y de la transición G2/M como cdc2 y ciclina B, lo que resultó sorprendente ya que implicaba que las células embrionarias se encuentran preparadas para proliferar (Coello y Vázquez-Ramos, 1995; García *et al.*, 1997; Cruz-García *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2000).

Sin embargo, durante la germinación cada una de estas proteínas presenta un comportamiento diferente. Por ejemplo, proteínas como las tipo cdk de G1, E2F, ciclina B, la ADN polimerasa α -primasa y la proteína tipo cdc2, no varían importantemente durante las primeras 24 horas de germinación, o como en el caso de la ADN polimerasa δ su actividad es constante. La cantidad de otras proteínas como las presuntas ciclina D o su actividad (ciclina D/ckd de G1), p53, o bien de la proteína tipo pRB, decae importantemente conforme la germinación avanza. Para otras proteínas, su cantidad (PCNA) o su actividad (ADN polimerasa α -primasa, cdc2/ciclina B) se incrementa (Coello y Vázquez-Ramos, 1995; García *et al.*, 1997; Cruz-García *et al.*, 1998; Herrera-Teijeiro *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2000).

Refiriéndonos específicamente a las proteínas presentes en las primeras horas de la germinación, se sabe que la ciclina tipo D es una proteína relativamente inestable, de tal forma que una vez que comienza la fase S, hacia las 15 horas de germinación, la proteína tiende a ser degradada (Cruz-García *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2001). Al no estar presente ciclina D, la actividad de la cinasa asociada decae con la misma cinética. Dado que la proteína tipo pRB desaparece también durante las primeras horas de la germinación, el factor E2F se libera y puede entonces actuar para permitir la entrada a la fase S. Es importante señalar que la cinasa

asociada a la ciclina tipo D de plantas presenta una secuencia de aminoácidos PSTAIRE en el sitio de unión a la ciclina (Mironov *et al.*, 1999). Las proteínas cinasas de G1 presentes en animales no contienen esta secuencia; sin embargo, en maíz, la cinasa que se asocia a la ciclina tipo D contiene PSTAIRE y, adicionalmente, se ha encontrado que no es una, sino dos proteínas de diferente peso molecular, ambas conteniendo la secuencia PSTAIRE (Sánchez *et al.*, 2001). En plantas, este tipo de cinasas han sido clasificadas como de tipo cdk-A (Mironov *et al.*, 1999).

Durante la germinación de maíz, la fase S del ciclo comienza entre las 12 y 15 horas (Reyes-Jiménez, *et al.*, 1991) y es en este momento en que se requerirá la acción de las ADN polimerasas y sus proteínas accesorias. PCNA incrementa gradualmente su cantidad de tal forma que llega a un máximo hacia las 20 horas de germinación (Herrera *et al.*, 2000).

Por otro lado, la incubación en presencia de fitorreguladores como las citocininas, provoca un acortamiento importante de la fase G1 del ciclo, de tal forma que la fase S comenzará hacia las 4 horas de germinación, en lugar de las 12-15 horas que normalmente tarda en comenzar. La ciclina tipo D, que comienza a desaparecer hacia las 15 horas de germinación normal; en presencia de las citocininas, lo hace entre las 6 y las 15 horas de germinación, mientras que la actividad de la cinasa acompañante decrece en forma proporcional a la desaparición de la ciclina D. Lo anterior es congruente con la rápida entrada de las células a la fase S. El metabolismo del ADN se adelanta de tal forma que las células entran a la fase S del ciclo hacia las 4 horas de germinación. La cantidad de la proteína PCNA llega a un máximo hacia las 6 horas de germinación estimulada y a estos mismos tiempos la actividad de las ADN polimerasas α y δ se incrementa varias veces, efecto debido aparentemente a modificaciones proteicas post-traduccionales (Cruz-García *et al.*, 1998; Gómez-Roig, datos no publicados).

Adicionalmente, PCNA ha sido clonada, secuenciada y sobreexpresada en el laboratorio (López *et al.*, 1995, 1997; Herrera *et al.*, 2000) demostrando que es una proteína altamente conservada entre especies; tiene un peso molecular de 29 kDa y su gen se expresa en tejidos proliferativos como espigas, meristemos de tallo y raíz, y durante la embriogénesis temprana (López *et al.*, 1997; Herrera *et al.*, 2000). No es evidente su expresión en embriogénesis tardía o durante germinación. No obstante, la obtención de anticuerpos homólogos ha permitido conocer que la proteína se encuentra durante la mayor parte del proceso de formación de la semilla y sólo decae, a niveles muy bajos, hacia las etapas finales de

este proceso; durante la germinación, como ya se mencionó, se incrementa conforme ésta transcurre hasta alcanzar un pico máximo durante la fase S.

Por otro lado, la asociación de PCNA al dímero ciclina D/cdk-A implica la formación de dos tipos de complejos, cada uno conteniendo una diferente cdk-A. Estos complejos ternarios contienen actividad de cinasa que fosforilan no solamente a la histona H1, un substrato característico para estas cinasas, sino también a la proteína de maíz ZmRBR. La actividad de cinasa asociada a PCNA alcanza máximos niveles hacia las 6 horas de germinación y decae posteriormente (Sánchez et al., 2001). Esta caída en actividad coincide con la desaparición gradual de la isoforma de cdk-A de menor peso molecular, por lo que se infiere que la actividad de cinasa asociada a PCNA durante la germinación temprana es debida a esta proteína. En general y como se había mencionado anteriormente, PCNA se mantiene asociada en los complejos con las cinasas y la ciclina hasta las 15 horas de germinación, cuando la cantidad de ciclina D disminuye notablemente dada su degradación (Cruz-García et al., 1998; Sánchez et al., 2001). Es interesante que sea aproximadamente a estas horas cuando PCNA se hace más visible dentro del núcleo celular, sugiriendo que al ser liberado de su asociación con la ciclina, puede ahora actuar en el núcleo con el aparato de duplicación. Con excepción de lo expuesto en los párrafos anteriores, la función de PCNA en plantas, así como de las proteínas a las cuales se asocia, aún es desconocida.

Dados los antecedentes anteriores, surgía la necesidad de contar con un sistema en el cual se pudiera monitorear de manera más clara el comportamiento de PCNA a lo largo del ciclo celular y determinar que proteínas lo acompañan, a fin de comparar las fluctuaciones de estos complejos a lo largo de la germinación. Lo anterior llevó a la idea de emplear cultivos celulares de plantas y tratar de sincronizar células, con lo cual se tendrían comportamientos más homogéneos. Aunado a lo antes mencionado, se había determinado que PCNA se encuentra presente formando parte de complejos de alrededor de 200 kDa (Sánchez, *et al.*, 2001), así que resultaba factible recurrir a la cromatografía de exclusión molecular para fraccionar extractos proteicos de diferentes momentos de la germinación.

De esta manera, el proyecto de investigación se dividió en dos partes, la primera encaminada al estudio del comportamiento de PCNA dependiente del ciclo celular y la segunda enfocada a determinar el tamaño de los complejos en los cuales se haya presente PCNA empleando a la germinación como modelo.

PROPÓSITO PRINCIPAL

Definir el tamaño de los complejos proteicos que forma PCNA tanto en cultivos celulares como durante la germinación de maíz e identificar proteínas de la fase G1 que se asocian a PCNA en estos complejos.

HIPÓTESIS

En células animales se tiene la evidencia de que PCNA es una proteína que se asocia a una gran variedad de proteínas vinculadas en el ciclo celular; por lo tanto, PCNA tenderá a formar complejos equivalentes en maíz, los cuales modificarán su composición conforme la germinación transcurra.

PROPÓSITO PRINCIPAL

Definir el tamaño de los complejos proteicos que forma PCNA tanto en cultivos celulares como durante la germinación de maíz e identificar proteínas de la fase G1 que se asocian a PCNA en estos complejos.

HIPÓTESIS

En células animales se tiene la evidencia de que PCNA es una proteína que se asocia a una gran variedad de proteínas vinculadas en el ciclo celular; por lo tanto, PCNA tenderá a formar complejos equivalentes en maíz, los cuales modificarán su composición conforme la germinación transcurra.

OBJETIVOS

Con el fin de comprobar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos :

GENERAL.

- ⌚ Determinar el tamaño de los complejos proteicos de la fase G1 del ciclo celular a los que se asocia PCNA tanto en cultivos celulares como durante la germinación de maíz.

PARTICULARES.

- ⌚ Establecer un cultivo sincrónico de células que permita determinar los tiempos en los cuales ocurren las diferentes fases del ciclo celular y así determinar como se modifican los complejos asociados a PCNA.
- ⌚ Determinar mediante cromatografía de exclusión molecular, el tamaño de los complejos de los cuales forma parte PCNA.
- ⌚ Esclarecer la identidad de las proteínas que co-eluyen con PCNA, buscando específicamente complejos tipo ciclina D-cdk.
- ⌚ Estudiar el comportamiento del complejo ciclina D-cdk-PCNA durante la germinación, monitoreando la presencia de la proteína y correlacionándola con la actividad de cinasa asociada a este complejo.
- ⌚ Determinar la variación de estos complejos durante la germinación estimulada con un fitorregulador como benciladenina (BA).

DISEÑO EXPERIMENTAL.

El propósito inicial fue establecer cultivos celulares líquidos, creciendo embriones inmaduros de maíz en medio N₆. Se tomaron muestras del cultivo cada tercer día y se determinaron el peso seco, el peso fresco y la cantidad de proteína. Los problemas que surgieron aquí hicieron que el trabajo se enfocara al modelo de la germinación.

Así, partiendo de extractos proteicos crudos de diferentes horas de germinación (semilla seca, 3 h, 6 h y 15 h), se llevó a cabo el fraccionamiento de las proteínas mediante una cromatografía de exclusión molecular usando una columna de Superdex 200.

Una vez fraccionadas las proteínas, dichas fracciones se concentraron, ya sea por precipitación o eliminación de agua y a continuación se cargaron en geles de poliacrilamida al 11% y se transfirieron a membranas de inmobilon, para, posteriormente, ser empleadas para ensayos de Western-blot.

Los ensayos de Western-blot permitieron detectar la presencia de proteínas tales como PCNA, ciclina D, pRB y la cinasa asociada a ciclina D (cdk-A).

Después de los ensayos anteriores, se realizó inmunoprecipitación de las fracciones para determinar asociación entre las proteínas detectadas y PCNA. Dicha asociación nuevamente se determinó mediante anticuerpos.

Adicionalmente, a estos ensayos se efectuaron ensayos de actividad, tanto para polimerasa, como para cinasa. El primero con el fin de detectar la posible presencia de la ADN polimerasa en los complejos de alto peso molecular en los que se encontró a PCNA. Los ensayos de actividad de cinasa se efectuaron para determinar si el complejo ciclina D-cdk-A asociado a PCNA se hallaba activo en los periodos muestreados.

MATERIALES Y MÉTODOS.

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

MATERIALES.

BIOLÓGICO

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

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

REACTIVOS QUÍMICOS

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

El cloruro de sodio, el cloruro de magnesio, el ácido etilén-diamino-tetra-acético, el fosfato mono-hidrogenado de sodio, el fosfato di-hidrogenado de sodio, el hidróxido de sodio y la sacarosa se adquirieron de J.T. Baker o MERCK.

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

El β -mercaptoetanol, la benciladenina y el TEMED se adquirieron de SIGMA-ALDRICH Chemicals.

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

El paquete ECL Western-blotting, la película fotográfica Hyperfilm, el anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa y el [γ -³²P]ATP fueron de Amersham Pharmacia Biotech.

Los marcadores de peso molecular para la columna de Superdex 200 fueron adquiridos de Boehringer Mannheim.

Las membranas de immobilon PVDF fueron adquiridas de Millipore.

Los anticuerpos policlonales anti-PSTAIRES y anti-ciclina D fueron de Santa Cruz Biotech.

Los microtubos tipo Eppendorf y las puntas de plástico para micropipeta, se adquirieron de RAININ Instrument Co.

EQUIPO

Se usaron los siguientes equipos: el autoclave, vortex y horno de marca ADEA. Las micropipetas de marca RAININ Instrument Co.; la centrífuga de velocidad media y la microcentrífuga, ambas de marca Sorvall-Dupont; los aparatos de electroforesis vertical, las fuentes de poder y el secador de geles, de marca GIBCO-BRL Life Technologies, Inc.; la incubadora digital de marca Thermoline; la campana de flujo laminar horizontal, de marca NuAire, el FPLC y la columna Superdex 200 de la marca Amersham Pharmacia Biotech.

MÉTODOS.

Establecimiento de Cultivos Celulares de maíz.

Los cultivos de callos embriogénicos fueron establecidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de maíz, cosechados 15-18 días después de polinización, proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatepec.

a) Desinfección del material.

Primeramente, las mazorcas de maíz se desgranaron y desinfectaron con etanol al 70 % por 1 minuto, se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y en seguida los granos se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 3% final (ingrediente activo al 6%) junto con 5 gotas de Tween 20 y 15 gotas de Microdyn por cada 250 mL durante 15 min con agitación constante. Finalmente, se enjuagaron cuatro veces con agua desionizada estéril.

b) Establecimiento del cultivo de callos.

Una vez desinfectados los granos, se extrajeron los embriones inmaduros y posteriormente se colocaron en frascos de vidrio que contenían 20 mL de medio nutritivo N6 modificado (*ver apéndice*). Se colocaron de 4-5 embriones sobre el cultivo sólido procurando que el eje embrionario estuviera en contacto con medio. Se dejaron crecer por 21 días en condiciones de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, revisándolos continuamente.

Una vez que se obtuvo el callo, éste se separó del tejido madre para resembrarlo en el medio de proliferación, en el cual permaneció durante dos semanas más, después de las cuales fue necesario otro subcultivo para renovar el medio y depurar al callo de raíces y otras estructuras diferenciadas.

c) Establecimiento de cultivos en suspensión.

El establecimiento de los cultivos en suspensión se efectuó inoculando 1, 2 o 3 g de callo de embriones inmaduros de maíz en 30 mL de medio de cultivo líquido N6 modificado (*ver apéndice*). Estos cultivos (cultivos madre), se mantuvieron en agitación constante en un agitador orbital (Lab-Line) a 100 rpm durante 4 días. Transcurrido este tiempo, las suspensiones debieron ser subcultivadas. Durante el subcultivo, las suspensiones deben ser tamizadas para desbaratar los agregados celulares y homogenizar los cultivos. A continuación la suspensión se distribuyó en matraces conteniendo medio N₆ líquido. Posteriormente, se incubaron a 28 °C en oscuridad y con agitación constante por 1 semana (Mórocz *et al.*, 1990).

d) Evaluación de los cultivos celulares en suspensión

Para establecer el comportamiento de los cultivos en suspensión se consideró el crecimiento de dichos cultivos y la eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas. Los cultivos en suspensión fueron evaluados después del primer subcultivo, determinando peso seco, peso fresco y cantidad de proteínas, tomando como tiempo inicial (T_0) el momento del subcultivo. El peso fresco se determinó tomando alícuotas de 1.5 mL del cultivo para cada repetición, se colocaron en tubos Eppendorf estériles de peso conocido y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se determinó el peso de la muestra inmediatamente. El peso seco se obtuvo de la misma muestra tomada para peso fresco, con la diferencia de que los tubos se dejaron secar por dos días a 54 °C. La cantidad de proteínas se determinó a partir de otra alícuota de 1.5 mL, se lisaron las células y se extrajeron las proteínas (*ver más adelante*) y finalmente se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Estos parámetros de crecimiento se tomaron por triplicado en tres de las cinco repeticiones para cada tratamiento, dejando las otras dos como respaldo en caso de contaminación. Las curvas de crecimiento se obtuvieron del promedio de estas repeticiones graficando los datos con respecto al tiempo.

Obtención de Ejes Embrionarios de maíz.

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

Imbibición de Ejes embrionarios de Maíz con o sin BA.

Se desinfectaron los ejes embrionarios utilizando hipoclorito de sodio 0.5% por 1 min. Se enjuagaron con agua estéril bidestilada/desionizada por 3-4 veces, dejándolos secar completamente al aire estéril de la campana de flujo laminar. En cajas petri estériles se pusieron papeles filtro estériles con suficiente solución de imbibición con o sin BA (*ver apéndice*) para saturar el papel filtro y, sobre dicho papel, se colocaron los ejes embrionarios tomando como tiempo de inicio de la imbibición el término de la colocación de dichos ejes en el papel. Se tapó y selló cada caja petri con parafilm. A continuación, se incubaron a 25° C en oscuridad, por el tiempo deseado (3, 6, y 15 h para germinación normal, 3 h para germinación estimulada con BA).

Extracción de Proteínas.

Los ejes embrionarios (~ 1 g) se homogeneizaron exhaustivamente en un mortero con 5 mL de amortiguador de extracción (*ver apéndice*). Inmediatamente, se procedió a centrifugar el homogenado a 150 000 g por 30 min a 4° C y se retiró la fase acuosa que es la enriquecida en proteínas.

Cuantificación de proteínas.

Utilizando un método espectrofotométrico, se midió la absorbencia de 1 µL del extracto proteico crudo en una celda de cuarzo de 1 mL a 280 nm de longitud de onda, para cuantificar proteínas, aforando el volumen de la celda con agua bidestilada. Se determinaron las lecturas tomadas restando el correspondiente blanco, y considerando que 0.8 mg/mL de proteína = 1 U.A. a 280 nm. Con este dato se determinó la concentración en mg/mL de la proteína presente en la muestra original.

Las mediciones anteriores se confirmaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). En este caso, se tomaron 5 µL del extracto proteico crudo, 25 µL de NaOH 1N y 200 µL de reactivo de Bradford y se aforaron a un volumen de 1 mL con agua

bidestilada. A continuación se efectuaron las lecturas a 595 nm en celdas de plástico. Previamente, se efectuó una curva patrón con un estándar de albúmina, la cual nos permitió establecer posteriormente la cantidad de proteína presente en la muestra original.

Fraccionamiento de proteínas. Cromatografía de exclusión molecular: Superdex 200.

El extracto proteico ya cuantificado (1 mL) se cargó a una columna de 120 mL para filtración en resina de gel Superdex 200, la cual está compuesta por un gel de agarosa y dextran covalentemente unidos lo que le proporciona un rango de tamaño de poro de 24-44 μm y le permite separar proteínas en un rango de peso molecular de 10 000-600 000 Da. La fase móvil de la cromatografía fue el amortiguador de elusión (*ver apéndice*), el cual se adicionaba a la columna a una velocidad de 0.75 mL/min y las fracciones recolectadas contenían un volumen de 1.1 mL. La proteína se cuantificó mediante espectrofotometría a 280 nm. Los estándares de peso molecular empleados fueron: ferritina (450 kDa), catalasa (240 kDa), aldolasa (158 kDa), albúmina sérica bovina (68 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

Concentrado de proteínas.

Dado que las fracciones derivadas de la cromatografía de filtración en gel contenían bajas cantidades de proteína, se decidió concentrarlas empleando para ello dos métodos: uno de ellos fue la precipitación por pH, empleando ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 10%, y para redissolver en con NaOH 0.1 N. El otro método y que fue el que se usó preferentemente, fue concentrando el extracto proteico por medio de un equipo de concentración con vacío, "*Speed vac*", el cual evapora el agua presente en la muestra.

Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot).

Se tomó una cantidad equivalente a 30 μg (~10 μL) de proteína concentrada de cada una de las fracciones y se les adicionó amortiguador de carga (Laemmli, 1970). A continuación, dichas muestras se calentaron a 95 °C por 5 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 11% (SDS-PAGE). El gel se desarrolló con una diferencia de potencial eléctrico de 83 V hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzara aproximadamente 0.5 cm antes del final del gel. Hecho lo anterior, el gel se transfirió a una membrana de Immobilon (0.2 μm de poro), mediante un sistema de transferencia en seco (LKB "*Transblot apparatus*") por 1.5 h empleando para ello una intensidad de corriente de 0.075 Amp por membrana.

A continuación, las membranas se trataron con solución de bloqueo (*ver apéndice*) por 1 h. Transcurrido el tiempo se les adicionó el primer anticuerpo [anti-PCNA policlonal (dilución 1:1500), anti-Ciclina D policlonal (dilución 1:1000), anti-PSTAIRE policlonal (dilución 1:1500), anti-pRb policlonal (dilución 1:1500)] y se dejaron incubando con este anticuerpo por 12 h a 4° C. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución de PBS 1x (*ver apéndice*) y un tercero con PBS junto con NaCl 0.5 M de 15 min cada uno a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se incubó a las membranas con el segundo anticuerpo [anti-conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:10 000)]. Las membranas se lavaron 3 veces con amortiguador PBS 1x nuevamente. La detección se llevó a cabo colocando a la peroxidasa en contacto con el reactivo ECL (sustrato) y exponiendo la membrana a una película fotográfica.

Ensayos de inmunoprecipitación.

Con las fracciones en las cuales se determinó la presencia de PCNA se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación para determinar su asociación con otras proteínas.

Primeramente el anticuerpo anti-PCNA de maíz se incubó con la proteína A agarosa (dilución 1:5) a temperatura ambiente por 2 h empleando el amortiguador A (*ver apéndice*). A continuación, al conjugado anterior se le añadió el extracto proteico o fracción proteica (200 µg) y esta mezcla se incubó por 12 h a 4° C con agitación constante. Subsecuentemente, la mezcla se centrifugó en una microfuga (12 000 rpm) y el precipitado se lavó 5 veces con el amortiguador A. La elusión de las proteínas unidas a la agarosa se efectuó adicionando amortiguador de carga (Laemmli, 1970). Los inmunoprecipitados se separaron mediante SDS-PAGE y posteriormente se analizaron por Western blot.

Ensayo de actividad de cinasa.

Los inmunoprecipitados se resuspendieron en 15 µL de amortiguador de cinasa (*ver apéndice*) junto con 5 µCi [γ -³²P]ATP y 4 µg de GST-ZmRBR-C (dominio carboxilo terminal de la proteína RBR de maíz) como sustrato. Se incubaron a 30°C por 30 min para dejar que tuviera lugar la reacción y posteriormente, se detuvo la reacción con amortiguador de carga (Laemmli, 1970). Después las muestras se calentaron por 5 min y se separaron por SDS-PAGE. El resultado se reveló mediante autorradiografía.

Ensayo de actividad de polimerasa.

El ensayo consiste en la medición de la incorporación de timidina- $[^3\text{H}]$ en una cadena de ADN por acción de la ADN polimerasa que se desea probar. A los extractos proteicos a ensayar se adicionaron 40 μL de amortiguador de reacción (*ver apéndice*) se incubaron a 37° C por 30 min con agitación y a continuación, se adicionaron 5 mL de TCA al 10%. Posteriormente, se filtraron al vacío, lavando con 10 mL de TCA al 10 %, después con 10 mL de TCA al 5% y, finalmente, con 10 mL de etanol grado industrial, dejando evaporar casi a sequedad. Los filtros se terminaron de secar en un horno a 54° C por 30-60 min. Se agregaron 2 mL de solución de centelleo por cada filtro a un frasco vial leyéndose las cpm por 3 min.

Prueba de estimulación de la síntesis de ADN por BA en ejes embrionarios de maíz.

Se imbibieron 3 series de 10 ejes embrionarios con solución de imbibición con BA (10^{-6} M) y 3 series de 10 ejes embrionarios con solución de imbibición sin BA por 24 h, adicionando en todos los casos 20 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[^3\text{H}]$ -timidina. Al finalizar el tiempo se eliminó la solución de imbibición residual lavando, por cada 10 ejes embrionarios, con 5 mL de citrato de sodio al 5 % estéril, separándose como material radiactivo. Se agregaron 2 mL de solución amortiguadora de lisis por cada 10 ejes embrionarios, homogenando perfectamente en un politrón utilizando un vástago adecuado, procurando que no quedaran residuos de ejes embrionarios.

Las macromoléculas se precipitaron con 1 mL de TCA al 20 % por cada 2 mL de homogenado, reposando en hielo por 15 min. Se filtró al vacío, lavando con 10 mL de TCA al 10 %, después con 10 mL de TCA al 5 % y, finalmente, con 10 mL de etanol grado industrial, dejando evaporar casi a sequedad. Los filtros se terminaron de secar en un horno a 54 °C por 30 min-1 hora. Se agregaron 2 mL de solución de centelleo por cada filtro a un frasco vial leyéndose las cpm. durante 1 min.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The document outlines the various methods and procedures that should be followed to ensure the accuracy and reliability of the records.

The second part of the document provides a detailed overview of the accounting process, from the initial recording of transactions to the final preparation of financial statements. It covers the various steps involved in the accounting cycle, including the identification of transactions, the recording of transactions in the journal, the posting of transactions to the ledger, and the preparation of trial balances and financial statements.

The third part of the document discusses the various methods and techniques used in accounting to ensure the accuracy and reliability of the records. It covers the various methods of recording transactions, the various methods of posting transactions to the ledger, and the various methods of preparing financial statements. It also discusses the various techniques used to verify the accuracy of the records, such as the use of trial balances and the use of internal controls.

RESULTADOS.

CULTIVOS CELULARES.

Con el fin de determinar el comportamiento de PCNA y los complejos que forma durante la fase G1 en un sistema de células homogéneas, era necesario contar con un sistema en el que se pudieran sincronizar células, por lo que la tarea consistía en establecer cultivos de células en suspensión y comparar dichos resultados con los observados para una población de células heterogéneas como las presentes en el eje embrionario.

Para cumplir con este objetivo, se partió de cultivos de callos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de maíz para poder establecer los cultivos, ya que los embriones inmaduros presentan una elevada actividad metabólica.

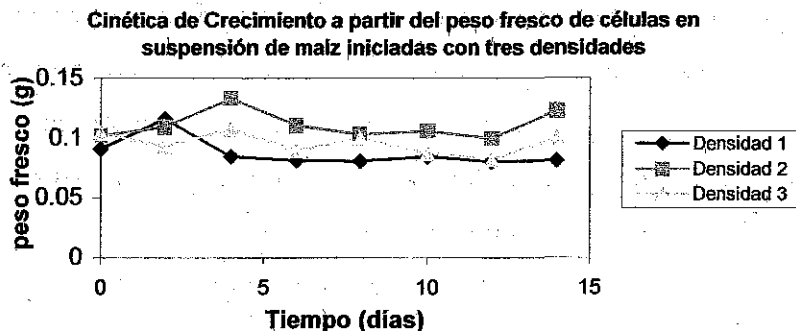
Los callos observados en estos experimentos presentaron consistencia friable, textura granular, color blanquecino a amarillento y presentaron una alta tasa de crecimiento, descripción que corresponde con observaciones previas (Green y Rhodes, 1982; Morrish, 1987, Vasil, 1988) y los coloca como cultivos de callos embriogénicos de maíz tipo II.

Los callos tipo II son suaves, friables, crecen rápidamente y pueden mantener su capacidad embriogénica durante largos períodos (Green, 1982; Tomes y Smith, 1985; Vasil y Vasil, 1983), poseen agregados de células indiferenciadas algunas veces entremezcladas con células vasculares y grupos de pequeñas células meristemáticas isodiamétricas en la superficie de los agregados (Emons y Kieft, 1991), se presentan como células pequeñas, que se encuentran densamente empacadas, con paredes delgadas, citoplasma abundante y basofílico que contiene muchas vacuolas pequeñas, gotas de lípidos y granos de almidón (Fransz y Schel, 1991; 1994). Por lo tanto, resultaban ser un buen candidato para ser empleados en el establecimiento de cultivos en suspensión.

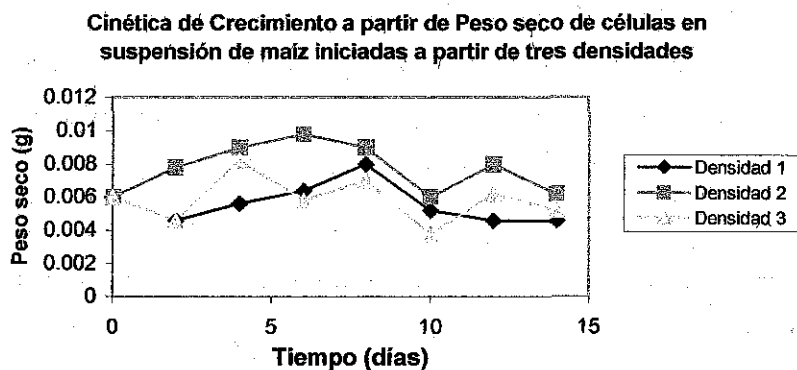
Desafortunadamente, en contraste con el crecimiento observado para los cultivos de callos, las células en suspensión no mostraron una capacidad de crecimiento. Es importante mencionar que para obtener una suspensión celular mucho más homogénea es necesario partir de un subcultivo, lo que implica que debe eliminarse el cultivo madre. Las evaluaciones de los parámetros de crecimiento se hacen por lo tanto a partir del primer subcultivo, por lo cual no se evaluó el comportamiento del cultivo durante el primer período de incubación.

Los parámetros de crecimiento utilizados para evaluar los cultivos celulares en suspensión son el peso seco, el peso fresco y la cantidad de proteína, los cuales se emplearon en este trabajo para determinar la respuesta de los cultivos a diferente cantidad de inóculo (figura 6).

A



B



C

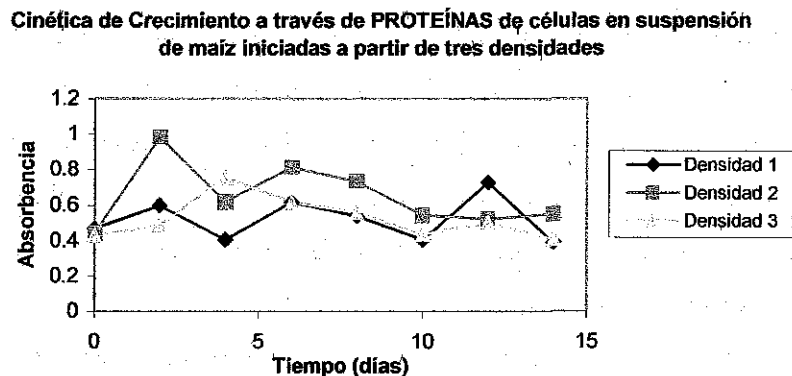


Figura 6. Cinética de crecimiento de las células de maíz en suspensión. A: determinación de peso fresco, B: determinación de peso seco y C: determinación de cantidad de proteínas. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado tomando alícuotas cada tercer día y ensayando tres cantidades diferentes de inóculo inicial. La densidad 1, 2 y 3 corresponden a 1, 2 y 3 g de callo.

Las curvas de crecimiento obtenidas de acuerdo a cada uno de los parámetros medidos representan el promedio de tres repeticiones para cada punto de la curva. Cada muestra fue tomada cada tercer día después del primer subcultivo para cada densidad.

Como se muestra en la figura 6, se probaron diferentes cantidades de inóculo (1, 2 y 3 g de callo) en los cultivos, con el fin de establecer las condiciones de células iniciales de las cuales partiría el cultivo y el tiempo de crecimiento.

Sin embargo, al analizar cada uno de los parámetros (peso fresco, peso seco o proteínas) no se observa que la cantidad de células se duplique o incremente. Además, si se analizan cada una de las densidades por separado, se observa que no existe un pico máximo en el cual coincidan cada uno de los parámetros, lo cual indica que no existe repetibilidad entre los experimentos.

Dado lo anterior resultaba muy difícil emplear este tipo de cultivos para realizar un experimento subsecuente ya que, en primer lugar, no se tenía la certeza de que las células estuvieran proliferando y, además, para llevar a cabo la sincronización de células es necesario contar con células uniformes, es decir, de la misma edad (lo cual se determina por el tamaño de cada célula). Para lograr lo anterior, se requiere eliminar todos los aglomerados celulares presentes (células madres) de la suspensión, lo cual ocasiona, como ya se vio antes, que los cultivos dejen de crecer. Esto indica que, al menos para maíz, algunos componentes residentes en las células madres o nodrizas son necesarios para el adecuado crecimiento del cultivo.

Debido al fracaso obtenido con los cultivos celulares se decidió trabajar con el sistema de estudio que por años se ha seguido en el laboratorio, la germinación de maíz y el objetivo se enfocó no solo a los tiempos en los cuales se presenta PCNA durante el ciclo, sino principalmente al tamaño de los complejos en los cuales se halla presente.

FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DURANTE LA GERMINACIÓN

Hasta ahora el tamaño de PCNA y los complejos que forma durante la fase G1 del ciclo celular, se habían determinado mediante geles nativos de poliacrilamida. Se sabía que esta proteína se une a otras proteínas formando asociaciones de alrededor de 200 kDa (Sánchez, *et al.* 2001), por lo que resultaba interesante recurrir a una estrategia que permitiera conocer con

mayor precisión el tamaño y la composición de dichos complejos. Siguiendo con esta idea, se decidió emplear la cromatografía de exclusión molecular para lograr este fin.

COMPORTAMIENTO DE PCNA.

Lo primero que se requería era fraccionar por Superdex 200 extractos proteicos de diferentes horas de germinación y detectar la presencia de PCNA en estas fracciones. Para cumplir con este objetivo primeramente se detectó la presencia de PCNA por Western blot en extractos proteicos totales de ejes embrionarios de semilla seca y de extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6 y 15 h antes de ser fraccionados, con el fin de corroborar que en los extractos estuviera presente nuestra proteína de interés.

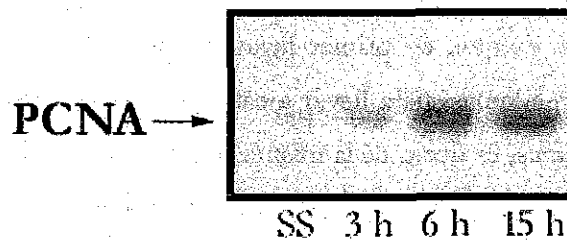
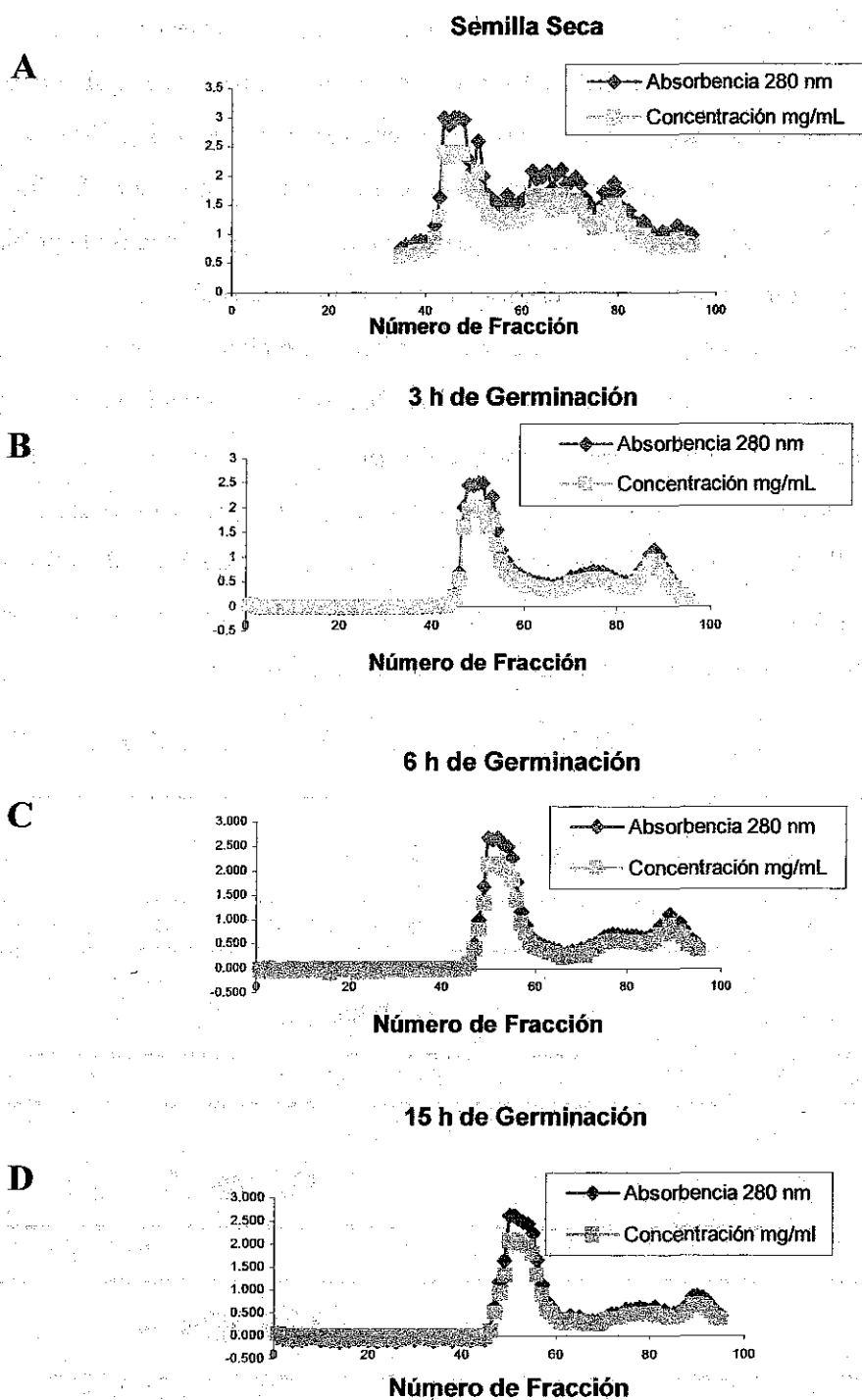


Figura 7. Inmunodetección de la proteína PCNA a lo largo de la germinación. Extractos proteicos de ejes embrionarios de semilla seca (SS) y extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6 y 15 h fueron separados por SDS-PAGE, electrotransferidos e inmunodetectados con anticuerpos anti-PCNA de maíz.

La figura 7 muestra el comportamiento de PCNA durante la germinación. Se observa que PCNA está presente desde semilla seca y su cantidad se va incrementando conforme avanza la germinación; lo anterior concuerda con lo ya reportado (Herrera *et al.*, 2000). El siguiente paso consistió en llevar a cabo el fraccionamiento de dichos extractos y detectar en esos fraccionados a la proteína.

En principio, los perfiles de elusión de las proteínas a través de la columna de exclusión molecular mostraron diferencias durante la germinación (figura 8).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 8. Perfil de elusión de extractos proteicos a diferentes tiempos de la germinación. A: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de semilla seca, B: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 3h de germinación, C: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 6h de germinación y D: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 15 h de germinación. La concentración en mg/mL fue obtenida mediante el método de Bradford (ver materiales y métodos).

En los cromatogramas (figuras 8B, C, y D), se observa que durante la germinación aparecen dos picos principales. El primero de estos picos se localiza entre las fracciones 40 – 60 (correspondientes a los pesos moleculares mayores a 450 000 Da) y el segundo pico se presenta entre las fracciones de menor peso molecular, 85–95 (que corresponden al tamaño de 35 000–11 000 Da). Al parecer durante la germinación la población proteica se presenta primordialmente en asociaciones de alto peso molecular.

Interesantemente, al comparar los resultados de semilla embebida con los mostrados para semilla seca, el patrón de elusión es relativamente diferente. En semilla seca (Figura 8A), las proteínas se presentan dispersas en tres grandes picos, el primero correspondiendo a proteínas o complejos de alto peso molecular (> 450 000 Da), un segundo localizado en un rango de 450 000–105 000 Da y el último involucrando a proteínas de 100 000–60 000. Lo anterior nos indica que el tipo de proteínas, en cuanto a peso molecular, presentes en semilla seca muestra diferencias con los que se presentan durante la germinación.

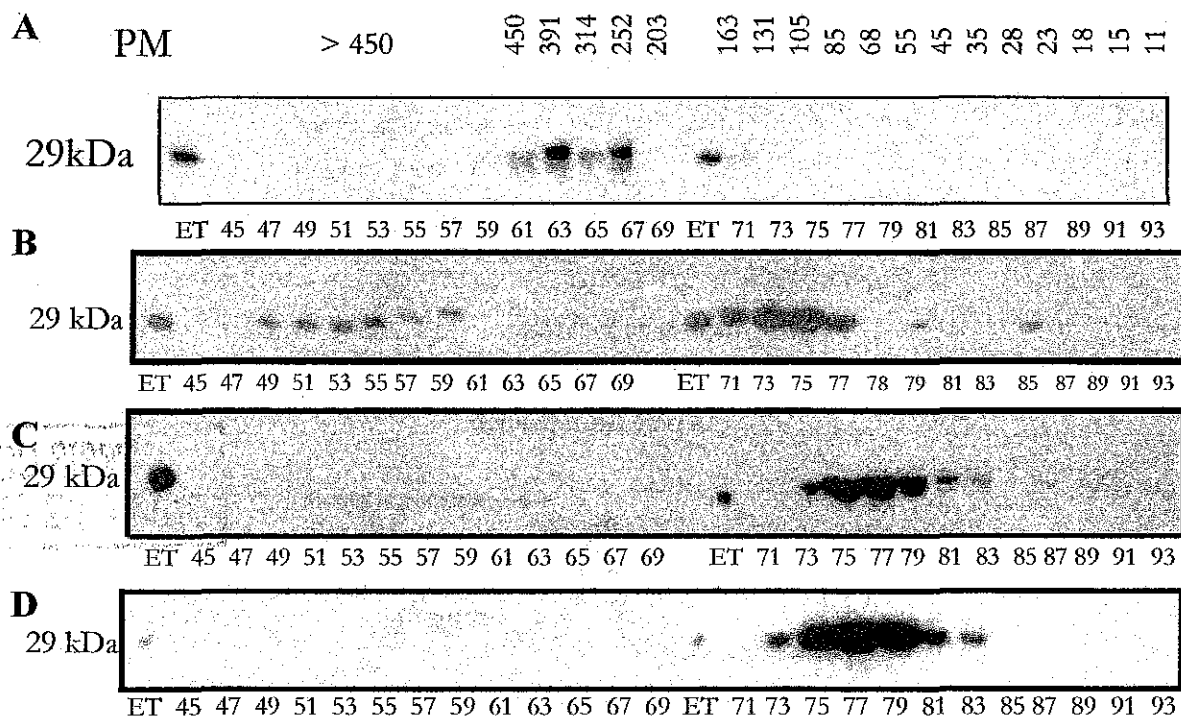


Figura 9. Fraccionamiento de proteínas de diferentes horas de germinación e inmunodetección usando anticuerpos anti-PCNA. A: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de semilla seca. B: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 3 h de germinación. C: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 6 h de germinación y D: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 15 h de germinación. ET indica el extracto proteico total.

Utilizando las fracciones proteicas de las diferentes horas de germinación, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se detectó la presencia de PCNA mediante Western blot (figura 9).

En la figura 9A, se analizan los extractos proteicos procedentes de semilla seca, en los cuales PCNA aparece entre las fracciones 61 a la 71, correspondientes a pesos moleculares entre 450 000 y 163 000 Da, que como se ve a continuación son complejos proteicos que desaparecen conforme la germinación avanza.

Hacia las 3 horas de germinación PCNA aparece en tres tipos de fracciones proteicas (figura 9B). La primera de ellas corresponde a complejos proteicos de muy alto peso molecular, es decir, aquellas proteínas o complejos cuyo tamaño es mayor al marcador de ferritina (450 kDa); en estos complejos PCNA tendrá que venir asociada a proteínas de muy alto peso molecular o estar formando complejos multiméricos entre ella y otras proteínas. El siguiente grupo corresponde a proteínas que aparecen entre 182 y 85 kDa; dentro de este rango de tamaño esperaríamos encontrar a la proteína formando su característico trímero (90 kDa) que se sabe es la forma más estable de la proteína y en la que se encuentra principalmente. También es en este rango donde esperaríamos encontrar a PCNA cuando se asocia con un complejo tipo ciclina-cdk (~ 170 000 Da). Cabe hacer notar que en estas fracciones se presenta la mayor a cantidad de la proteína (figura 9B). En el último rango de tamaños en el cual se presenta PCNA es en proteínas de bajo peso, las cuales están entre las fracciones 79 a la 87 y que corresponden a un peso molecular entre 68 y 23 kDa, rango en el cual, de acuerdo a su tamaño, estaría contenida la proteína en su forma dimérica (60 000 Da) y en su forma monomérica (30 000 Da). Aquí es donde se encuentra la menor cantidad de proteína.

Cuando se observan los complejos que forma PCNA hacia las 6 y 15 h de germinación, lo primero que salta a la vista es la desaparición de los complejos de muy alto peso molecular, sugiriendo que estos complejos son propios de las primeras horas de germinación. Por otro lado, los complejos comprendidos en el rango de 163–23 kDa persisten durante la germinación y además su concentración se incrementa al avanzar ésta, de manera semejante a lo que sucede cuando se monitorea a PCNA en los extractos proteicos de semilla germinada.

El tamaño de los complejos proteicos de muy alto peso molecular, (mayores a 450 kDa) en que se encuentra PCNA a las 3 h de germinación nos llevaron a preguntar si PCNA se encontraba asociada a proteínas como las ADN polimerasas, enzimas de alto peso

molecular. Por lo anterior, se decidió realizar ensayos de actividad de ADN polimerasa en estas fracciones. No obstante, los resultados, aún con las fracciones proteicas concentradas, nunca mostraron actividad de ADN polimerasa (figura 10). A pesar de lo antes mencionado, no se puede descartar la presencia de este tipo de proteínas asociadas a PCNA.

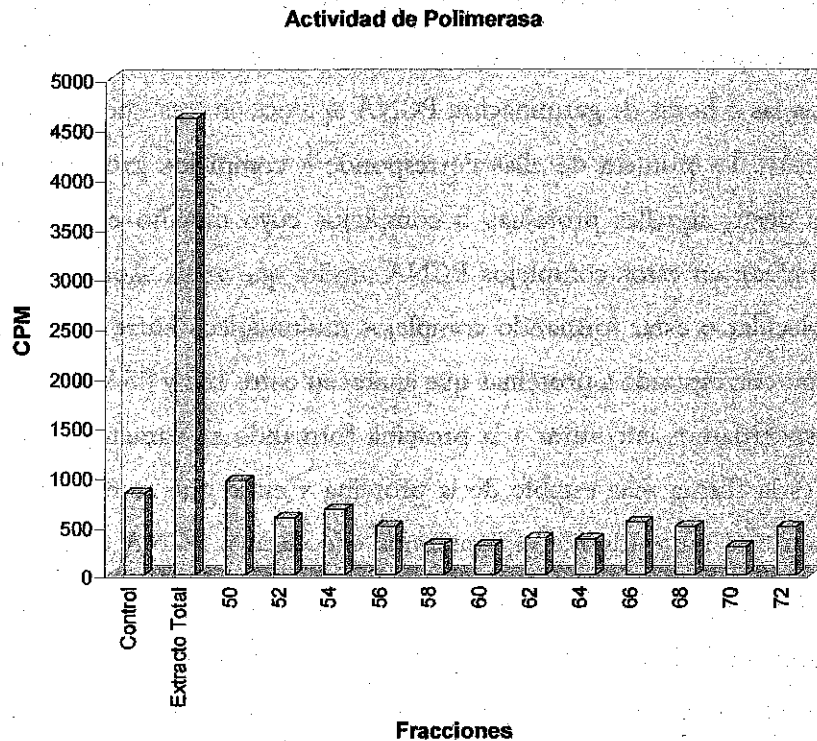


Figura 10. Ensayo de actividad de ADN polimerasa. Las barras corresponden a la timidina [^3H] incorporada al ADN molde ensayadas en los extractos proteicos fraccionados de 3h de germinación. El control contiene la mezcla de reacción y agua. Las fracciones de la 50 a la 60 contienen a los complejos proteicos mayores de 450 kDa, y las fracciones de la 62 a la 72 contienen proteínas entre 146 y 437 kDa.

El siguiente paso consistió en averiguar la identidad de los acompañantes de PCNA en los complejos presentes entre 200 y 100 kDa, para lo cual, como se mencionó anteriormente, un buen candidato resultaba ser el complejo sensor del ciclo celular: ciclina D-cdk, ya que en maíz ya se había reportado que existe una asociación entre una ciclina tipo D y PCNA (Herrera *et al.*, 2000).

COMPORTAMIENTO DE LA PROTEÍNA TIPO CICLINA D.

A continuación, se determinó la presencia de las proteínas que forman el complejo de ciclina/cinasa de la fase G1 mediante ensayos tipo Western blot en los extractos fraccionados de las diferentes horas de la germinación.

La primera proteína que se analizó fue la ciclina tipo D, para lo cual primeramente se analizó la presencia de la proteína en extractos totales de semilla seca y de 3, 6 y 15 h de germinación (figura 11).

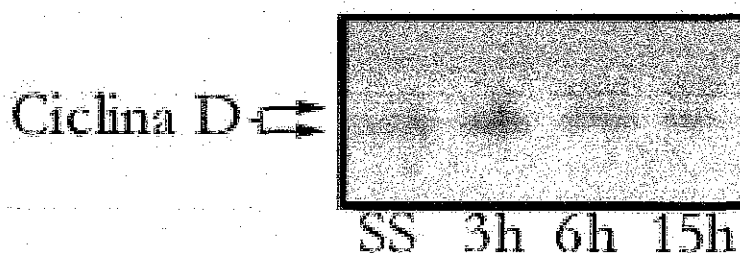


Figura 11. Inmunodetección de la proteína ciclina D a lo largo de la germinación. Extractos proteicos de ejes embrionarios de semilla seca (SS) y extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6 y 15 h fueron separados por SDS-PAGE, electrotransferidos e inmunodetectados con anticuerpos anti-ciclina D de humano.

La figura 11 nos muestra que la proteína se encuentra presente en semilla seca y durante la germinación, disminuyendo hacia las 15 h, tiempo en el cual se sabe que comienza a degradarse (Herrera *et al.*, 2000). El anticuerpo empleado detecta a la proteína ciclina tipo D en forma de un doblete durante todos los tiempos ensayados.

Una vez corroborado este comportamiento, el siguiente paso consistió en visualizar a ciclina D en los extractos fraccionados (figura 12).

Dado que en semilla seca no existen complejos alrededor del tamaño en que se espera que co-eluyan PCNA, ciclina D y cdk, para los posteriores experimentos solo se utilizaron los tiempos de germinación 3, 6 y 15 h.

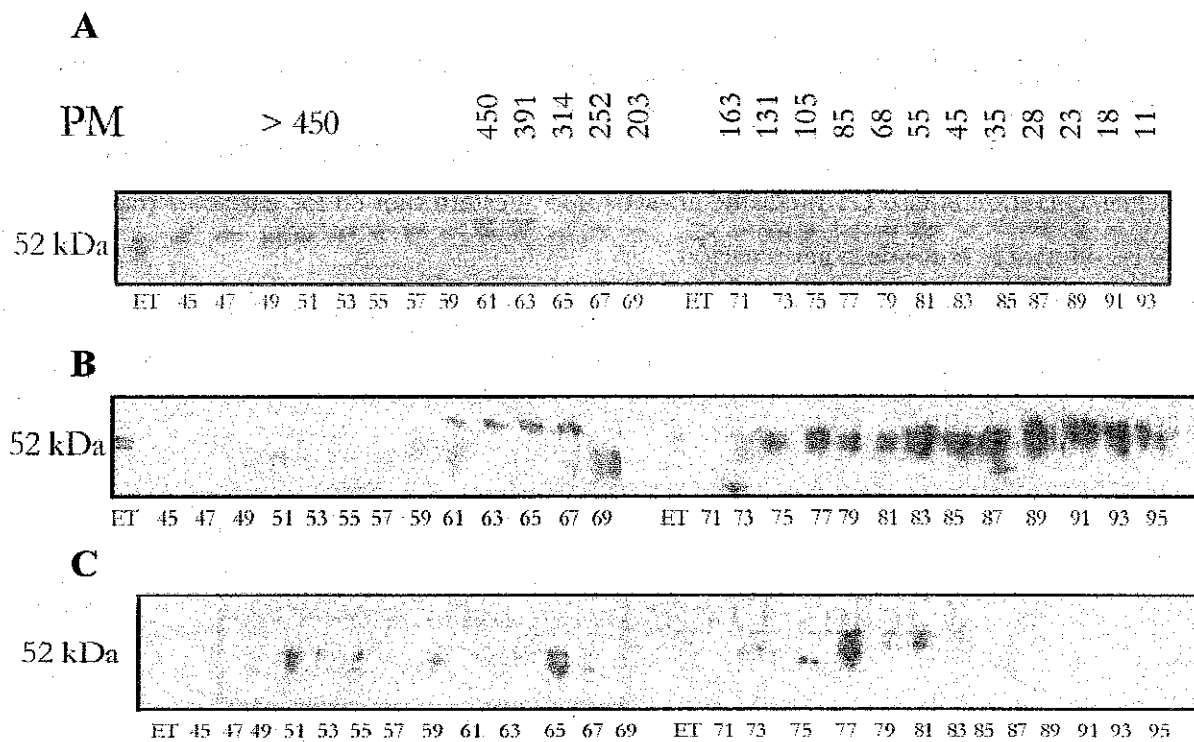


Figura 12. Fraccionamiento por exclusión molecular de proteínas de diferentes horas de germinación e inmunodetección usando anticuerpos anti-ciclina D. A: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 3 h de germinación. B: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 6 h de germinación y C: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 15 h de germinación. ET indica el extracto proteico total.

Para estos extractos, la detección de la proteína presentó algunos problemas metodológicos que impidieron una visualización nítida, además de que la proteína ciclina tipo D parece estar distribuida a lo largo de todas las fracciones obtenidas, principalmente en los extractos de 3 y, en cierta medida, también en los de 6 h de germinación. Es probable que la proteína que aparece en las fracciones en tamaños menores de 50 kDa represente degradación de la ciclina tipo D, la cual como se ha descrito, es muy inestable (Cruz-García *et al.*, 1998).

Por otro lado, el comportamiento en la proteína hacia las 15 h de germinación parece ser errático, la mayor presencia de la proteína se localiza en la región en que la probable ciclina D estaría como monómero (fracciones 75–81) y en aquella región de arriba de 200 kDa (fracciones 65-67). Para las 15 h de germinación la cantidad de la proteína disminuye notablemente, lo que concuerda con el hecho de que este es el tiempo en el que comienza la fase S y donde la proteína comienza a degradarse (Cruz-García *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2000). En todo caso, tanto a las 3 h como a las 6 h de germinación es evidente que existe una buena proporción de la proteína tipo ciclina D en los tamaños donde se esperaría que se encontrara en un complejo con PCNA.

El siguiente paso consistió en detectar a la proteína acompañante de la ciclina D, que para el caso de plantas es una cinasa conocida como cdk A, la cual contiene la secuencia PSTAIRE, propia de las cinasas tipo cdc2 y que se localiza en el dominio de unión a ciclinas. Justamente es esta secuencia la que nos permitió su detección, ya que se contaba con un anticuerpo dirigido contra dicha región.

COMPORTAMIENTO DE LA CDK.

Al igual que para las otras proteínas, primeramente se detectó a la cdk en extractos totales, para corroborar su presencia y comportamiento durante la germinación.

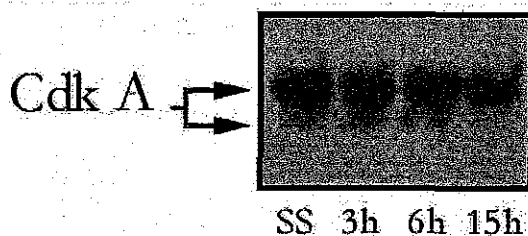


Figura 13. Inmunodetección de la proteína cdk A a lo largo de la germinación. Extractos proteicos de ejes embrionarios de semilla seca (SS) y extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6 y 15 h fueron separados por SDS-PAGE, electrotransferidos e inmunodetectados con anticuerpos anti-PSTAIRE.

Durante la germinación cdk A se presenta en forma de un doblete, en el cual la proteína de mayor peso molecular (36 kDa) permanece constante a lo largo de la germinación, mientras que la de menor peso (32 kDa) desaparece conforme la germinación avanza (Sánchez *et al.*, 2001), sugiriendo que esta proteína se encuentra regulada durante la fase G1. A la fecha se desconoce si se trata de dos proteínas o de la modificación post-traducciona de cdk A. Nuevamente, el siguiente paso consistió en verificar el comportamiento de esta proteína en extractos fraccionados de diferentes horas de germinación (figura 14).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

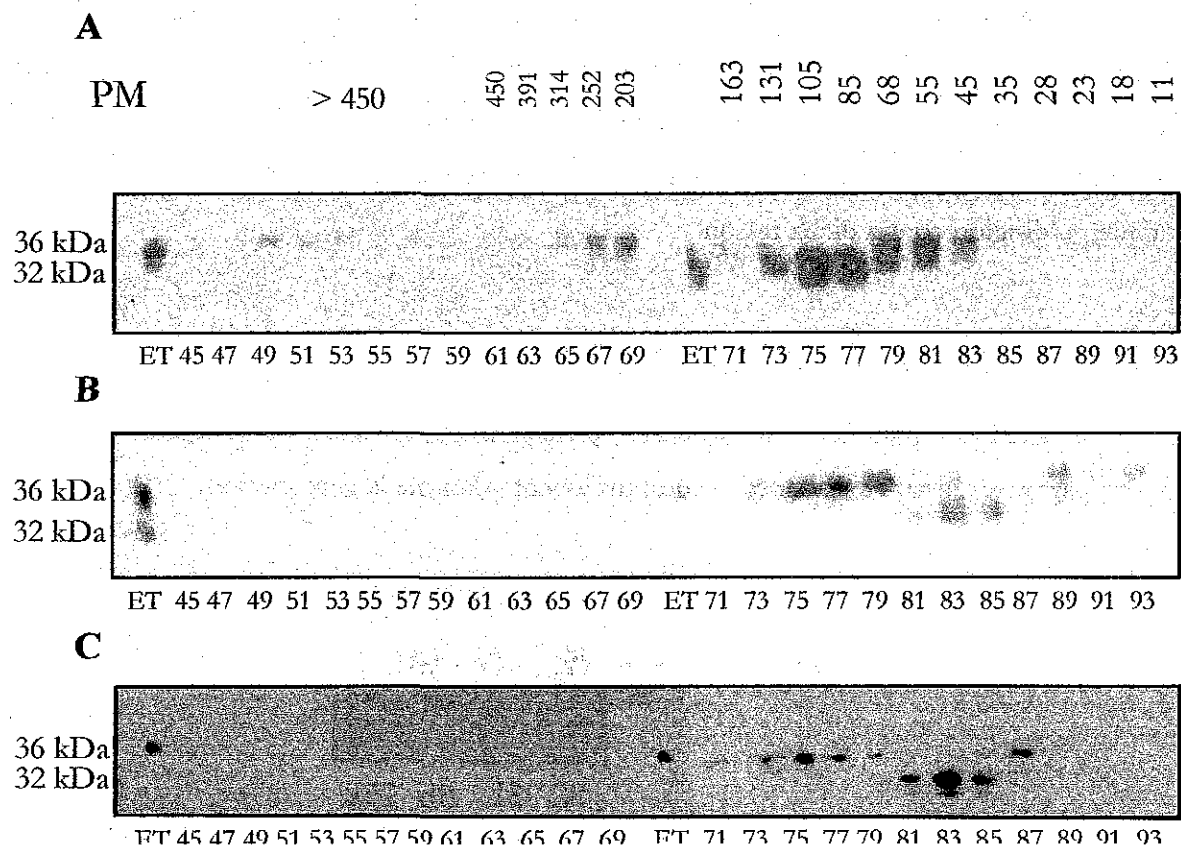


Figura 14. Fraccionamiento por exclusión molecular de proteínas de diferentes horas de germinación e inmunodetección usando anticuerpos anti-PSTAIR. A: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 3 h de germinación. B: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 6 h de germinación y C: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 15 h de germinación. ET indica el extracto proteico total.

Al observar el comportamiento de la proteína cdk A, se encuentra que ésta se comporta de manera semejante a PCNA, es decir, hacia las 3 h de germinación la proteína se presenta en complejos de alto peso molecular que van de las fracciones 49 a la 69 (correspondientes a los tamaños desde mayores de 450 000 a 203 000 Da), los que ya no están presentes cuando la germinación avanza (hacia las 6 y 15 h). Sin embargo, la proteína permanece a lo largo de la germinación (3, 6 y 15 h) en complejos que van de 170 000 Da a pesos menores de 45 kDa, que es en los tamaños en que también esta presente PCNA a estas horas. Es importante recordar, que hasta la fecha no se ha reportado la asociación directa entre PCNA y una cdk en plantas, por lo que para hablar de la formación de un complejo entre estas proteínas tendríamos en principio que estar pensando también en la presencia de ciclina D, la cual si se une directamente a PCNA.

Dado que la unión PCNA-cdk A debe ser indirecta y requiere de ciclina D, los complejos que esperaríamos para estas proteínas tendrían un tamaño entre 120 000 y 170 000 Da, dependiendo del estado en que se encontrara PCNA, por lo que podemos decir que existiría co-elusión entre estas tres proteínas solamente en este rango de tamaño.

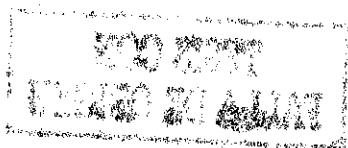
Cuando se analiza cuidadosamente el comportamiento de las dos bandas de cdk A reconocidas por el anticuerpo anti-PSTAIRE, se observa que pueden aparecer de manera separada en algunas fracciones a lo largo del fraccionamiento y durante los diferentes tiempos de germinación ensayados. Lo anterior resulta muy interesante si se sugiere que cada forma de cdk A puede estar formando asociaciones proteicas y además, estas fracciones diferenciales resultan una buena herramienta para monitorear la actividad de cinasa de cada una de las formas de la cdk A por separado y así establecer cual de las dos formas de la proteína es la responsable de la actividad de cinasa presente en la fase G1 del ciclo celular.

Cabe mencionar que existe gran cantidad de la cinasa en tamaños en los cuales no podría encontrarse asociada con PCNA como las presentes en las fracciones menores a 100 kDa, lo que también indica que esta proteína podría encontrarse asociada a otras proteínas, ya sea junto con su ciclina, o independiente.

COMPORTAMIENTO DE ZmRBR.

Finalmente, la última proteína que se decidió medir en estas fracciones fue ZmRBR, la proteína Rb homóloga en maíz, sobre la cual el complejo ciclina-cinasa de G1 lleva a cabo su función. Del mismo modo que las proteínas anteriores, se llevó a cabo el análisis de ZmRBR en extractos totales de diferentes horas de germinación (figura 15).

Se sabe que la proteína ZmRBR de maíz tiene un tamaño de aproximadamente 90 Da, y que esta proteína desaparece durante las primeras horas de la germinación, quizás debido a que la proteína es marcada por fosforilación por el complejo ciclina-cinasa para ser degradada. Se utilizó un anticuerpo homólogo, que es capaz de reconocer tres bandas; una de ellas, de un peso molecular de 60 kDa, que es la que se reconoce más intensamente, desaparece conforme la germinación avanza. Las otras dos bandas (90 y 30 kDa) son muy tenues y también desaparecen hacia las 15 h. La proteína de 90 debería representar a pRb completa y las otras dos proteínas posiblemente sean productos de degradación.



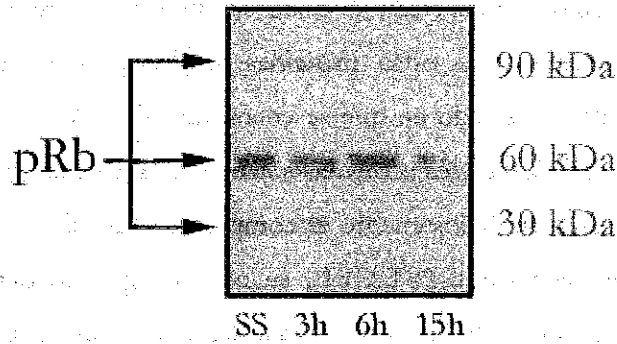


Figura 15. Inmunodetección de la proteína ZmRBR a lo largo de la germinación. Extractos proteicos de ejes embrionarios de semilla seca (SS) y extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6 y 15 h fueron separados por SDS-PAGE, electrotransferidos e inmunodetectados con anticuerpos anti-pRb de maíz.

Cuando se analiza el comportamiento de pRb en los extractos fraccionados se observa lo siguiente (figura 16).

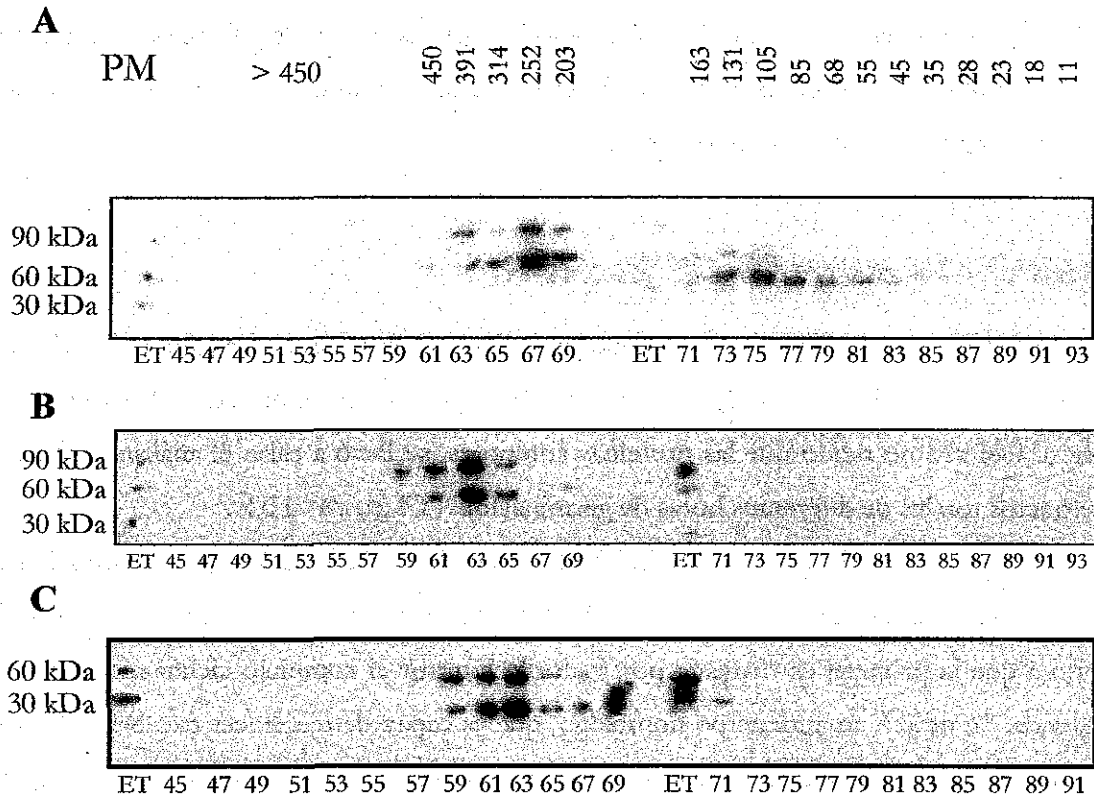


Figura 16. Fraccionamiento por exclusión molecular de proteínas de diferentes horas de germinación e inmunodetección usando anticuerpos anti-pRb. A: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 3 h de germinación. B: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 6 h de germinación y C: fraccionamiento de extractos proteicos de ejes embrionarios de 15 h de germinación. ET indica el extracto proteico total.

A las 3 h de germinación, la proteína pRB se localiza entre la fracción 61 y la fracción 83, las cuales corresponden a tamaños que van de proteínas mayores de 450 000 Da a proteínas con un tamaño de 45 000 Da. A las 6 y 15 h de germinación, esta proteína aparece en las fracciones cuyos tamaños van de 400 a 200 kDa. Mientras que a las 3 y 6 h de germinación la proteína aparece como bandas de 90 y 60 kDa, hacia las 15 h aparecen solo las bandas de 60 y 30 kDa, quizás indicando la degradación de pRB.

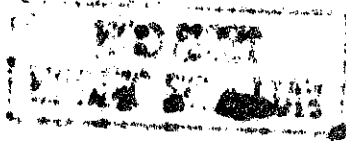
Dados estos resultados, se puede decir que esta proteína no co-eluye con PCNA, ya que su peso molecular (~90 kDa) haría que el complejo PCNA-ciclina-cdk-pRb tuviera un tamaño de alrededor de 270 000 Da, fracciones en las cuales PCNA no está presente durante la germinación.

La co-elución de PCNA con proteínas clave de la fase G1 no tiene *per se* un significado fisiológico, ya que sólo indica que las proteínas eluyen en las mismas fracciones; por lo que, para demostrar la presencia del complejo PCNA-ciclina-cdk en las fracciones en que co-eluyen las diferentes proteínas se emplearon dos estrategias. La primera consistió en realizar ensayos de inmunoprecipitación empleando para ello el anticuerpo homólogo a PCNA. La segunda estrategia consistió en determinar actividad de cinasa en estos inmunoprecipitados para corroborar no sólo la presencia del complejo asociado a PCNA, sino también si dicha asociación permitía que el complejo se encontrara activo.

Para llevar a cabo la primera estrategia se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-PCNA extractos proteicos totales de las diferentes horas de germinación, los que, posteriormente, se visualizaron mediante Western blot detectando con anticuerpos anti-PCNA (figura 17A).

La capacidad de inmunoprecipitación del anticuerpo anti-PCNA permite obtener una buena cantidad de PCNA precipitada; sin embargo, mucha de la proteína se queda en los lavados y en el sobrenadante. Aquí también es posible ver que la cantidad de PCNA presente durante la germinación aumenta hacia las 15 h, dato que es evidente al observar la cantidad de proteína que queda en los lavados y el sobrenadante.

A continuación se decidió buscar en estos precipitados, mediante ensayos de Western blot a las otras dos proteínas presentes en nuestro complejos de interés. Sin embargo, dados los problemas de inespecificidad mostrados por el anticuerpo anti-ciclina D, el ensayo se redujo a buscar sólo a la cdk (figura 17B).



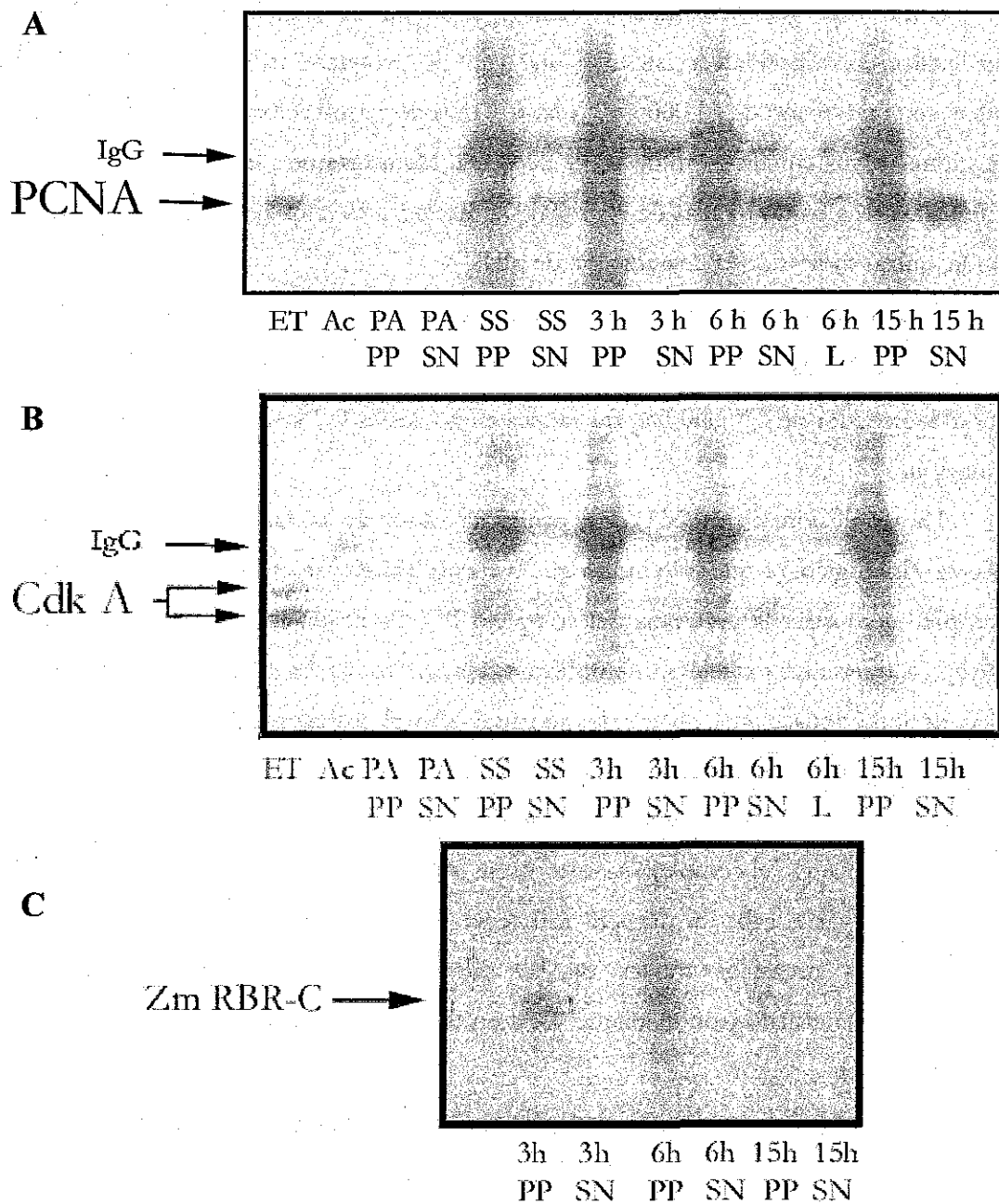


Figura 17. A: Inmunodetección usando anticuerpos anti-PCNA de los extractos proteicos totales inmunoprecipitados con anti-PCNA provenientes de diferentes horas de germinación: semilla seca (SS), 3, 6 y 15 h). **B:** Inmunodetección usando anticuerpos anti-PSTAIRE de los extractos proteicos totales inmunoprecipitados con anti-PCNA provenientes de diferentes horas de germinación: semilla seca (SS), 3, 6 y 15 h). **C:** Actividad de cinasa asociada a los inmunoprecipitados con anti-PCNA provenientes de diferentes horas de germinación (3, 6 y 15 h). ET es el extracto total de 3 y 6 h, Ac es anticuerpo (anti-PCNA o anti-PSTAIRE), PA proteína A agarosa, PP precipitado, SN sobrenadante y L lavado. IgG (inmunoglobulinas) corresponde al autoreconocimiento del anticuerpo.

Los resultados permitieron establecer que el anticuerpo anti-PCNA es capaz de inmunoprecipitar a las dos proteínas que detecta el anticuerpo anti-PSTAIRE, salvo hacia las 15 h donde sólo esta presente la banda de mayor peso molecular. Además se observa que existe una buena cantidad de cdk A que no se asocia a PCNA, lo que es evidente al detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante y en el lavado.

La presencia de la cdk A en los inmunoprecipitados con anti-PCNA de los diferentes extractos proteicos es una fuerte evidencia que indica que el complejo ciclina D-cdk A-PCNA se encuentra presente durante la germinación.

En los extractos inmunoprecipitados se determinó la actividad de cinasa asociada al complejo; el experimento se llevó a cabo en precipitados de 3, 6 y 15 h, empleando como sustrato a la proteína pRb homóloga de maíz (Zm RBR-C), la cual es el blanco del complejo ciclina D-cdk A durante la fase G1 del ciclo celular. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17C, donde se observa que existe fosforilación de la proteína pRB en todos los extractos inmunoprecipitados de la diferentes horas de germinación indicando que los complejos tipo ciclina D-cdk asociados a PCNA, aunque no muy abundantes, se encuentra activos, y tal como se esperaba, la actividad de cinasa presente hacia las 15 h de germinación disminuye con respecto a los tiempos anteriores, ya que es en este momento cuando la ciclina D comienza a degradarse y junto con ello el complejo comienza a desensamblarse.

FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DURANTE LA GERMINACIÓN ESTIMULADA CON BENCILADENINA.

Para llevar a cabo este estudio, se decidió emplear el tiempo de 3 h de germinación, dado que bajo este tratamiento la replicación del ADN tiene lugar hacia las 6 h, tiempo en el cual nuestro complejo de interés ya no se haya presente (Herrera *et al.*, 2000, Sánchez *et al.*, 2001).

De la misma forma que para los tiempos control, cuando se llevó a cabo el fraccionamiento de proteínas mediante la columna de Superdex 200, se encontró un perfil de elusión que se muestra en la figura 18.

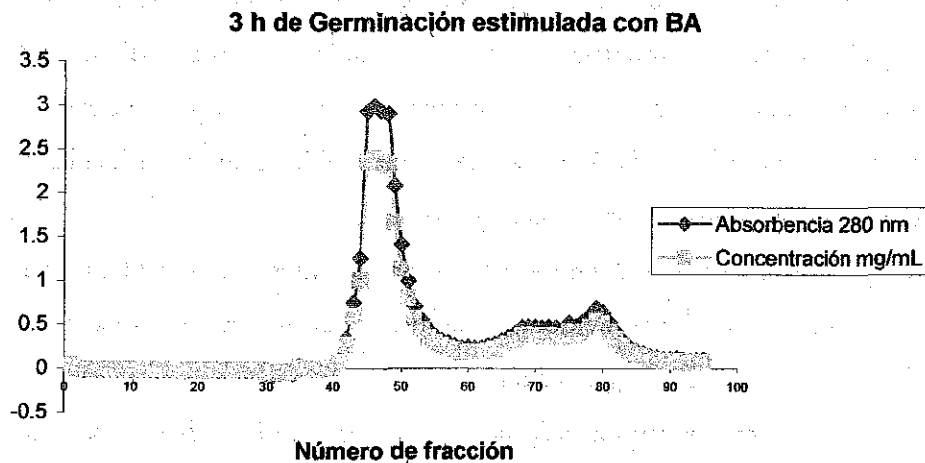


Figura 18. Perfil de elución de extracto proteico de ejes embrionarios de 3 h de germinación estimulados con benciladenina. La concentración en mg/mL fue obtenida mediante el método de Bradford (ver materiales y métodos)

Al observar el cromatograma (figura 18) se encuentran predominantemente dos picos, el primero de ellos correspondiente a los pesos moleculares mayores de 450 kDa, localizado entre las fracciones 40 a la 60, fracciones en las cuales también se presenta este pico durante la germinación no estimulada. El segundo pico se presenta entre las fracciones 75 a la 85 que corresponden a pesos moleculares de 105 a 35 kDa; este último pico durante germinación no estimulada se presenta en fracciones posteriores, lo que podría dar indicio de que cuando la germinación es estimulada, la presencia de proteínas de bajo peso molecular disminuye.

COMPORTAMIENTO DE PCNA.

A continuación, con los extractos proteicos fraccionados y separados por SDS-PAGE se procedió a detectar la presencia de PCNA mediante Western-blot (figura 19).

En esta figura, se observa que PCNA se localiza en las fracciones 67 a la 73, las cuales corresponden a los pesos moleculares de 252 a 131 kDa; en estos tamaños PCNA tendría que estar presente principalmente en forma de trímero, ya que no hay indicios de proteínas de menor tamaño que evidencien la presencia de las otras dos formas estequiométricas de PCNA o formando complejos con otras proteínas alrededor de estos tamaños.

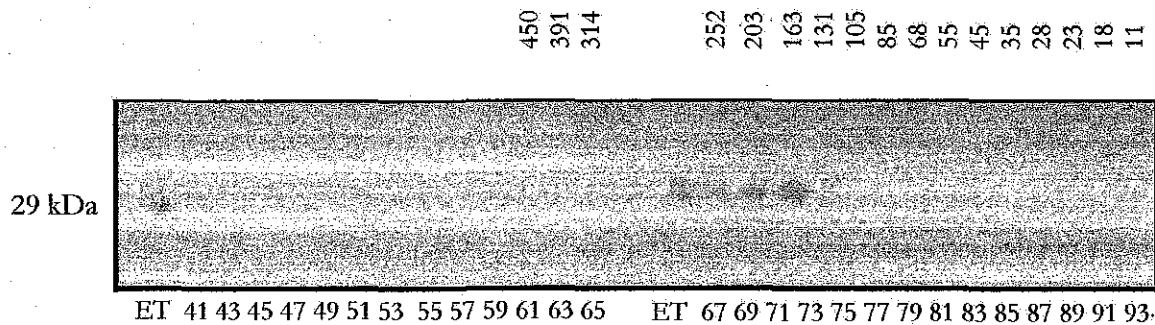


Figura 19. Fraccionamiento de proteínas de 3 h de horas de germinación estimulada con bencladenina e inmunodetección usando anticuerpos anti-PCNA. ET indica el extracto proteico total.

Cuando se compara este comportamiento con el que PCNA presenta durante la germinación no estimulada, se encuentran diferencias importantes. En primer lugar, los complejos de muy alto peso molecular presentes a las 3 h de germinación control, ya no están presentes, tal como ocurre conforme la germinación de semillas control avanza y, además, las proteínas de bajo peso molecular también desaparecen. Adicionalmente, PCNA se concentra en complejos de tamaños mayores a los que se encuentran a las 3 horas, e incluso a las 6 y 15 h de germinación normal (alrededor de 252 a 105 kDa).

COMPORTAMIENTO DE LA CDK A.

Para comprobar que efectivamente los complejos en los que se localiza PCNA correspondan al complejo ciclina D-cdk, se llevó a cabo la detección de la cdk A, participante en este complejo (figura 20).

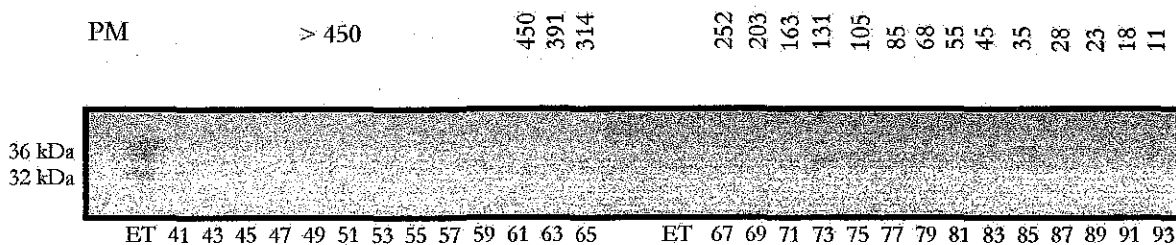


Figura 20. Fraccionamiento de proteínas de 3 h de horas de germinación estimulada con bencladenina e inmunodetección usando anticuerpos anti-PSTAIRE. ET indica el extracto proteico total.

Al analizar la figura 20 se encontró que la proteína cdk A aparece en las fracciones 67 a la 77 que corresponden a los pesos moleculares de 252 a 85 Da, tamaños que coinciden con las fracciones en las cuales se encuentra a PCNA; además, al igual que para PCNA, no hay presencia de proteínas de menor tamaño. Es importante notar que de las dos bandas que reconoce el anticuerpo anti-PSTAIRE, la proteína de mayor peso está presente en las fracciones antes mencionadas, mientras que la de menor tamaño, solo se presenta en las fracciones de la 71 a la 77 (de peso molecular de 163 a 85).

Cuando se compara este comportamiento con lo observado en la germinación control, al igual que para PCNA, los complejos de muy alto peso molecular desaparecen así como las proteínas de menor tamaño.

Dados los tamaños en los cuales la cdk A está co-eluyendo junto con PCNA, es posible su asociación, ya que recordemos que estas proteínas no se unen directamente, sino que requieren de ciclina D. Es importante hacer notar que existen dos fracciones en las cuales está presente la cdk A pero no PCNA, lo cual habla de que no todos los complejos formados por esta proteína durante la germinación estimulada con hormonas se tiene que encontrar a PCNA.

Para darle un valor más fisiológico a la co-elución de PCNA y cdk A se realizaron también ensayos de co-immunoprecipitación para establecer el comportamiento de las proteínas, tanto en el extracto no fraccionado como en aquellas fracciones en las cuales se presentó la co-elución de ambas proteínas. Los resultados se presentan en la figura 21.

Al analizar esta figura, se observa como PCNA se haya presente en todos los extractos inmunoprecipitados, tanto en el extracto total como en las fracciones 67, 69, 71 y 73 (correspondientes a los pesos moleculares de 252, 203, 163 y 131 respectivamente) en los cuales se esperaba y también puede observarse que el anticuerpo no es capaz de inmunoprecipitar totalmente a la proteína presente en el extracto ya que gran parte de esta aparece tanto en el sobrenadante como en el lavado. Cabe mencionar que en la fracción 45 (correspondiente a pesos moleculares superiores a 450 kDa) no se encuentra a PCNA tal y como se observa en el Western blot del barrido de fracciones.

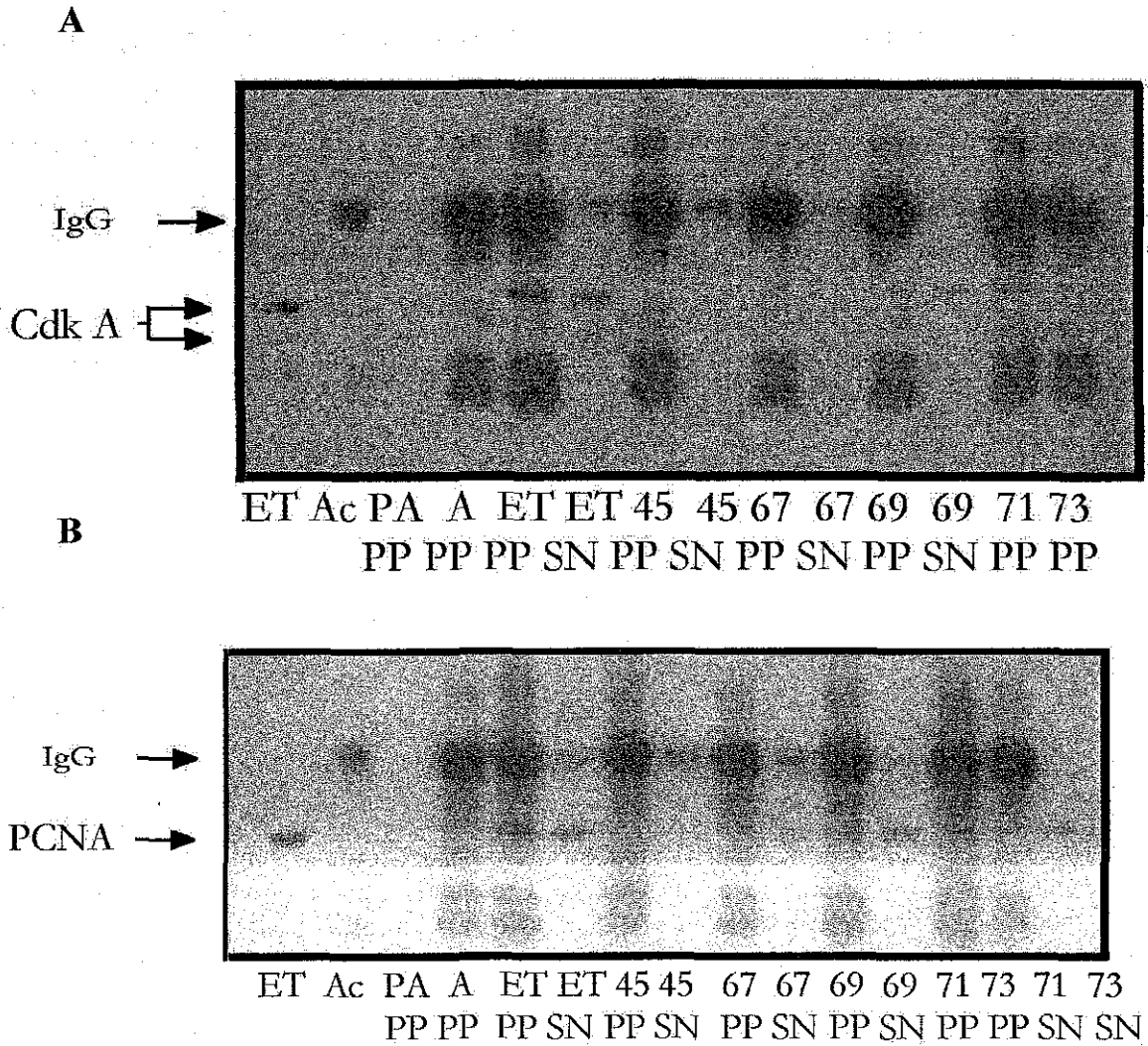
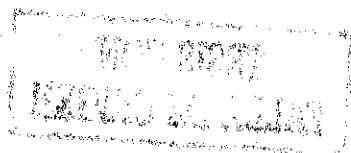


Figura 21. A. Inmunodetección usando anticuerpos anti-PCNA de los extractos proteicos totales y fraccionados inmunoprecipitados con anti-PCNA de 3 h de germinación estimulada con benciladenina. **B.** Inmunodetección con anticuerpos anti-PSTAIRE de los extractos proteicos totales y fraccionados e inmunoprecipitados de 3 h de germinación estimulada con benciladenina. ET es el extracto total de 3 h, Ac es anticuerpo (anti-PCNA o anti-PSTAIRE), PA proteína A agarosa, A agua, PP precipitado, SN sobrenadante y L lavado. 45 corresponde a la fracción de peso molecular mayor a 450 kDa, 67, 69, 71 y 73 corresponden a los tamaños de 252, 203, 163 y 131 respectivamente. IgG (inmunoglobulinas) corresponde al autoreconocimiento del anticuerpo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando se busca en estos precipitados la presencia de la cdk A se observa que el anticuerpo sólo es capaz de inmunoprecipitar la proteína de mayor peso molecular, pero no así a la de menor peso, tanto en el extracto total como en los extractos fraccionados, 67, 69, 71 y 73 (correspondientes a los pesos moleculares de 252, 203, 163 y 131 respectivamente), lo cual se hace evidente cuando se observan los sobrenadantes, lo cual coincide con lo observado en germinación no estimulada cuando las células se están preparando para la entrada a la fase S, hacia las 15 h y la cdk A de menor tamaño ya no está presente. Además, es claro que PCNA no es capaz de atrapar a toda la proteína cdk A presente en el extracto, tal y como sucede con los extractos proteicos de germinación no estimulada.



DISCUSIÓN.

El presente trabajo se había propuesto describir las asociaciones de la proteína PCNA de maíz con proteínas del ciclo celular, las cuales se presentan durante la germinación, y comparar estas asociaciones con lo que sucede en cultivos celulares sincrónicos. Para lograr esto se trató de establecer cultivos celulares de células en suspensión, lo que no fue posible debido a que no se observa incremento en el número de células con respecto al tiempo, lo cual podría deberse a tres causas: la primera es que se debiera a muerte celular, lo cual era difícil de demostrar ya que en el inóculo inicial no se determinó viabilidad en la células con lo cual no se sabría el número de células realmente vivas desde un inicio; por otro lado, la falta de crecimiento podría asociarse a la saturación del medio de cultivo debido a que la concentración de células iniciales haya sido muy grande, aún cuando se probaron tres cantidades diferentes de inóculo, y por último, se ha demostrado que las células de maíz requieren para su crecimiento de las células madres ó nodrizas, lo que complica no sólo la proliferación y el mantenimiento de las células sino también su posterior sincronización.

En cuanto a la asociación de PCNA con proteínas durante la germinación, se sabía por ensayos en geles nativos, que PCNA formaba complejos de alrededor de 200 kDa durante la germinación y dichos complejos desaparecían hacia las 15 h, prevaleciendo en tamaños de alrededor de 100 kDa (Sánchez *et al.*, 2001). Al observar los resultados generados por el fraccionamiento cromatográfico se encuentra que la proteína PCNA presente en semilla seca se asocia a complejos proteicos diferentes a los que va a formar durante la germinación. Lo anterior es muy interesante si se considera que muchas de las proteínas involucradas en la proliferación están presentes desde semilla seca (Coello y Vázquez-Ramos, 1995; García *et al.*, 1997; Cruz-García *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2000). Lo antes mencionado podría indicar que cuando se establece la germinación, PCNA se moviliza de complejos proteicos que se formaron durante la embriogénesis a otros que se requerirán durante la germinación.

Cuando se estudia a PCNA durante la germinación, a las 3 h se le encuentra en complejos de muy alto peso molecular (localizados en tamaños mayores de 450 kDa) los que desaparecen totalmente conforme las células entran a la fase G1 del ciclo celular durante la germinación (después de las 3 h). En estas fracciones de alto peso molecular se decidió buscar la presencia de ADN polimerasas, dado el tamaño de estas proteínas y a que a este tiempo se

esta presentando una reestructuración y reactivación celular debido a la entrada de agua que reactivará los sistemas de reparación del ADN (Ching, 1972; Osborne, *et al.*, 1980; Zarain, *et al.*, 1986). Desafortunadamente la presencia de la ADN polimerasa no se pudo demostrar, aunque de encontrarse se hallará inactiva.

Durante estas horas (3, 6 y 15 h) de germinación, predominan y persisten los complejos de 105 a 163 kDa en donde se determinó PCNA. Se ha demostrado, a partir de los estudios acerca de su estructura, que la conformación espacial más abundante, estable y conservada de anillo homotrimérico de PCNA, por lo que se puede sugerir que sea esta la estructura presente en estos tiempos de germinación (Kuriyan y O'Donnell, 1993; Krishna, *et al.*, 1994). Además, se ha determinado que la unión de proteínas, como p21, al interdominio de PCNA, parece preferir esta topología circular de PCNA unida al ADN (Knibiehler, 1996).

De acuerdo a lo que se conoce para células de mamíferos, durante la fase G1, PCNA se asocia a un heterodímero formado por ciclina D-cdk 4/6 (Xiong *et al.*, 1992), el cual en base a los pesos estimados para cada proteína tendría un tamaño aproximado de 170 kDa, considerando que PCNA está en su forma trimérica; pero si consideramos que fisiológicamente este complejo es un tetrámero que incluye a la proteína inhibidora de cdk, p21, el tamaño de este complejo podría ser de hasta 190 kDa. Es importante mencionar que no se conoce la estequiometría con la cual PCNA se encuentra formando este complejo, aunque se ha sugerido que el trímero puede tener 3 sitios potenciales de unión y por lo tanto puede unir 3 proteínas diferentes al mismo tiempo (Warbrick, 1998); además se ha determinado en células de fibroblastos humanos que p21 se une a PCNA en una relación molar de aproximadamente 1:1 (Li, *et al.*, 1996). Con base en lo anterior, para estimar el tamaño del complejo ciclina-cdk con PCNA tendríamos que considerar las fracciones presentes entre los tamaños de 120 hasta 200 kDa, donde el tamaño de este complejo dependerá del estado de asociación en el cual se presente PCNA. Los tamaños por debajo de 120 kDa podrían corresponder a los diferentes estados estequiométricos que presenta la proteína o a su asociación con otras proteínas del mismo complejo (p21, ciclina D, por ejemplo) pero de manera independiente (ver adelante).

Actualmente, pocos son los conocimientos que se tienen acerca de las proteínas que se asocian a PCNA en plantas. Trabajos previos a éste sugieren que PCNA se asocia a una ciclina tipo D durante las primeras horas de la germinación y que esta asociación desaparece hacia las 15 h, tiempo en el cual la ciclina es degradada (Cruz-García, *et al.*, 1998; Herrera *et al.*,

2000). En este trabajo se pudo demostrar un claro reconocimiento de una proteína tipo ciclina D, en forma de doblete (esta proteína es blanco de cinasas) en extractos proteicos totales; sin embargo, su inmunodetección en las fracciones después de Superdex 200, fue menos nítida, con presencia en la mayoría de las fracciones, al menos en muestras de 3 y 6 h de germinación. No obstante, la proteína co-eluye también en aquellas fracciones donde aparece PCNA y también cdk A. La inestabilidad de la putativa ciclina D se hace evidente al aparecer en fracciones donde estarían presentes proteínas de menos de 40 kDa, hecho que podría haber afectado la buena resolución en los ensayos de Western blot.

En cuanto a la pafeja de ciclina D, la cdk de plantas, esta posee la secuencia PSTAIRE, que caracteriza a las cdks tipo A. En los extractos proteicos de maíz están presentes dos cdks que contienen el motivo PSTAIRE y ambas son capaces de unirse a PCNA. Es importante resaltar que la cdk de menor tamaño desaparece hacia las 15 h de germinación, lo cual también es evidente en los extractos inmunoprecipitados a estos tiempos (Sánchez, *et al.*, 2001). El perfil de elusión en Superdex 200 de esta proteína presenta un comportamiento semejante al que presenta PCNA, lo cual resulta interesante porque no existe evidencia de una interacción directa entre PCNA y cdk A por lo que ha de considerarse que sólo en aquellas fracciones en las que también hubiese la presencia de ciclina D cabría postular un posible significado funcional. Por otro lado, se ha reportado que PCNA puede asociarse directamente a una cinasa tipo cdk 2 de humanos (Koundrioukoff, *et al.*, 2000).

En lo que se refiere a la actividad de cinasa asociada a estos complejos, se observa que está presente antes de que se inicie la fase S, desde las 3 h y también se han identificado las dos formas de la cinasa tipo PSTAIRE. Es relevante notar que la actividad de cinasa disminuye en relación con la cantidad de la cdk de menor peso molecular (32 kDa). Estos resultados sugieren que de las dos cdks que se unen a PCNA, es la de 32 kDa la principal responsable de la actividad de cinasa en estos complejos y sobre el sustrato ZmRBR (Sánchez, *et al.*, 2001).

En cuanto a la otra cdk (36 kDa) que se asocia a PCNA, ésta permanece constante y es activa *in vitro* hacia las 15 h de germinación (fase S), tiempo en el cual la ciclina tipo D ya no está presente y por tanto la actividad de cinasa asociada a esta cdk dependería de una ciclina diferente a la presente en G1 (Sánchez *et al.*, 2001).

Adicionalmente, se buscó a la proteína homóloga de maíz ZmRBR en los extractos fraccionados de diferentes horas de la germinación, encontrándose que pRb no co-eluye con PCNA, en las fracciones en las cuales de acuerdo a su peso se esperaría, alrededor de 270 kDa.

El anticuerpo homólogo utilizado reconoce tres proteínas de 90, 60 y 30 kDa y el peso esperado para ZmRBR es de alrededor de 90 kDa. Es interesante observar que hacia las 15 h de germinación, la proteína de 90 kDa desaparece, pero no así las otras dos (60 y 30 kDa), las cuales están presentes durante estas horas de germinación. Aunque no se conoce la naturaleza de estas proteínas, resulta interesante que siempre sean reconocidas por el anticuerpo anti-Rb de maíz (Nájera-Martínez y Sánchez-Jiménez, datos no publicados), principalmente la de 60 kDa, implicando tal vez que esta proteína sea producto de proteólisis de la de mayor peso molecular (90 kDa). Es importante mencionar que hacia las 15 h de germinación es cuando el ciclo celular avanza hacia la fase S, y para que esto ocurra es necesario que pRb sea fosforilada y así inhibida. A este tiempo sólo están presentes las formas de 30 y 60 kDa; parecería que la proteína de 60 kDa es la que es reconocida por el complejo con actividad de cinasa.

Por otro lado, la incubación en presencia de fitorreguladores como la benciladenina (BA), provoca un acortamiento importante de la fase G1 del ciclo, de tal forma que la fase S comenzará hacia las 4 horas de germinación, en lugar de las 12-15 horas que normalmente tarda en comenzar. Estudios en *Arabidopsis* (Soni, *et al.*, 1995), han demostrado que las citocininas regulan la progresión del ciclo celular en la transición G1/S por inducción de la transcripción del gen *cyc d3* (tipo ciclina D) y aumentan los niveles del transcrito de *cdc2a* (cdk A; Hemerly, *et al.*, 1993). En maíz la ciclina tipo D, que comienza a desaparecer hacia las 15 horas de germinación normal, en las nuevas condiciones lo hace entre las 6 y las 15 horas de germinación (Herrera *et al.*, 2000; Sánchez, *et al.*, 2001), mientras que la actividad de la cinasa acompañante decrece en forma proporcional a la desaparición de la ciclina D (Sánchez, *et al.*, 2001). Lo anterior es congruente con la rápida entrada de las células a la fase S. El metabolismo del DNA se adelanta de tal forma que las células entran a la fase S del ciclo hacia las 4 horas de germinación.

Cuando se analizan las proteínas de 3 h de germinación estimulada con BA, se observa que PCNA se localiza en fracciones de alrededor de 250-100 kDa; dicho rango sugiere que PCNA aparece preferentemente en forma de trímero, dado que la proteína no es detectada en tamaños menores que corresponderían al dímero y al monómero como sucede durante la germinación normal, lo que no es de extrañar tomando en cuenta que las células están próximas a entrar a la fase S y por tanto se requiere que PCNA adquiera esta conformación, para que durante la fase S pueda situarse sobre el ADN y servir como factor de procesividad de la ADN polimerasa replicativa. Adicionalmente, se conoce que la cantidad de PCNA llega a

un máximo hacia las 6 horas de germinación estimulada por BA y a estos mismos tiempos la actividad de las DNA polimerasas α y δ se incrementa varias veces, efecto debido aparentemente a modificaciones proteicas postraduccionales (Cruz-García et al., 1998, Sánchez, *et al.*, 2001, Gómez-Roig, datos no publicados).

En lo que se refiere al complejo tipo ciclina D/cdk-A, medido indirectamente a través de la cdk A, se encuentra que al estimular la germinación mediante la adición de citocininas, PCNA se disocia mucho antes de la proteína cdk A de 32 kDa y por ende del complejo Ciclina D-cdk A, ya que hacia las 3 h el anticuerpo anti-PCNA no es capaz de detectarla, por lo que puede inferirse que la actividad de cinasa medible a esos tiempos en el complejo debe relacionarse con la proteína de 36 kDa. Actualmente se conoce que esta proteína de 36 kDa es capaz de fosforilar a histona H1, un sustrato de cinasas, pero cuando se usa a ZmRBR, la cual como ya se mencionó, es el sustrato natural de las cinasas de G1, no existe fosforilación. Lo anterior confirma el hecho que la cdk A de 36 kDa se asocia a una ciclina diferente a la de G1, lo cual conlleva a la pérdida de especificidad sobre Rb y a una posible función diferencial aún por esclarecer.

Como parte final de la discusión y citando el artículo de Huntley *et al.* (1998), pareciera ser que la divergencia entre mamíferos y levaduras, en la regulación de la transición G1/S, ha hecho difícil la predicción de controles similares en plantas, aunque el descubrimiento de que en plantas existen proteínas relacionadas a pRb y ciclinas sugiere una mayor similitud con los puntos de control de G1/S en mamíferos, la estructura y conservación funcional de proteínas presentes en plantas y humanos en este punto de control, nos lleva a pensar que las plantas son significativamente más similares a mamíferos que a levaduras en el control de G1 y en la salida a la fase S.

CONCLUSIONES.

- Un complejo semejante al formado por ciclina D-cdk 4/6-PCNA, reportado en células de mamíferos, se encuentra presente en células de maíz durante la primeras horas de germinación.

- Este complejo encontrado en maíz incluye a las proteínas tipo ciclina D, a las dos proteínas cdk A (de 32 y 36 kDa) y PCNA, el cual presenta actividad durante la germinación ya que, *in vitro*, se detectó fosforilación sobre su sustrato natural, la proteína ZmRBR.

- Durante la germinación estimulada con benciladenina, la asociación de PCNA con el complejo ciclina D-cdk A, se ve adelantada con respecto a la germinación normal. Además de que en esta asociación sólo está presente la proteína cdk A de 36 kDa.

PERSPECTIVAS.

Con este estudio ya se tiene idea de los tamaños en los cuales se encuentra presente PCNA durante la germinación. El siguiente paso debe consistir en analizar con mayor detalle los complejos de muy alto peso molecular, para determinar que proteínas se encuentran asociadas con PCNA en estos complejos y cuya presencia sólo es visualizada durante los primeros momentos de la germinación.

Otro punto a enfocarse, es el de determinar que otras proteínas se hayan asociadas a PCNA durante la germinación, ya que existe gran cantidad de PCNA que no se encuentra asociada al complejo de cinasa de G1.

También es importante determinar si la actividad de cinasa asociada al complejo que se forma con PCNA durante la germinación estimulada, es diferencial en las diferentes fracciones debida a la presencia o no de alguna de las formas de la cdk A. Si esta actividad de cinasa esta relacionada con la cdk A de mayor peso molecular, cual es su función en estos tiempos, implicando con ello el conocimiento de los blancos sobre los que actúa y su modo de regulación.

Finalmente, dado que los cultivos celulares en suspensión de maíz no resultaron un buen modelo de experimentación, podría ser conveniente utilizar cultivos celulares de otras plantas como *Arabidopsis*, cuya manipulación experimental sea menos engorrosa y permita establecer un sistema celular que pueda ser sincronizado y en el cual se puedan determinar los tiempos en los cuales están ocurriendo los eventos del ciclo celular en plantas y, por supuesto, comparar dichos eventos con los que se presentan durante la germinación.

1911

The first part of the report deals with the general situation of the country. It is noted that the population is increasing rapidly, and that the government is making every effort to improve the conditions of life. The report also mentions the progress made in the various branches of industry and commerce.

In the second part of the report, the author discusses the financial situation of the country. It is stated that the government has succeeded in reducing the public debt, and that the budget is now in surplus. This is a significant achievement, and it shows that the government is managing the country's finances wisely.

The third part of the report deals with the social conditions of the country. It is noted that the government is making every effort to improve the living conditions of the people. This includes the construction of schools, hospitals, and other public buildings. The report also mentions the progress made in the various branches of industry and commerce.

In conclusion, the author expresses his confidence that the country is on a path of progress and prosperity. He believes that the government's policies are sound, and that the people are working hard to improve their lives.

APÉNDICE.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

MEDIO DE CULTIVO N₆ MODIFICADO (*Inducción de callo*).

Soluciones de Macro y Micronutrientes. Se prepara ajustando la concentración final a KNO₃ 18 mM, CaCl₂• 2H₂O 1.13 mM, MgSO₄• 7H₂O 0.75 mM, KH₂PO₄ 2.94 mM, (NH₄)₂SO₄ 3.50 mM, MnSO₄• H₂O 35.32 mM, ZnSO₄• 7H₂O 5.21 mM, H₃BO₃ 25.87 mM, KI 4.82 mM, FeSO₄• 7H₂O 100 mM y EDTA (C₁₄H₄N₂O₁₀Na₂• 2H₂O) 100 mM.

Mezcla de Aminoácidos y vitaminas (Cóctel 20): Se ajusta la concentración final a L-asparagina 66.62 µM, L-arginina 57.40 µM, L-ácido aspártico 56.35 µM, glicina 306.38 µM, glutamina 410.67 µM, ácido glutámico 51 µM, biotina (vitamina B₈) 4.10 µM, ácido fólico (vitamina B₉) 2.26 µM, ácido nicotínico (vitamina B₃) 12.18 µM, piridoxina (vitamina B₆) 7.30 µM, riboflavina (vitamina B₂) 0.26 µM, tiamina (vitamina B₁) 8.90 µM, myo-inositol 804.84 µM y urea 749.25 µM.

El medio se prepara mezclando las sales inorgánicas, cóctel 20, sacarosa 30 g/L como fuente de carbono, hidrolizado de caseína 200 mg/L, L-prolina 2.76 g/L, adenina sulfatada 10 mg/L, phytigel 2.7 g/L y como reguladores de crecimiento 2,4-D 2 mg/L y cinetina 0.05 mg/L. Se ajusta a pH 5.7 y se esteriliza en autoclave durante 18 min.

MEDIO DE CULTIVO N₆ MODIFICADO (*Medio líquido*).

Soluciones de Macro y Micronutrientes. Se prepara ajustando la concentración final a KNO₃ 18 mM, CaCl₂• 2H₂O 1.13 mM, MgSO₄• 7H₂O 0.75 mM, KH₂PO₄ 2.94 mM, (NH₄)₂SO₄ 3.50 mM, MnSO₄• H₂O 35.32 mM, ZnSO₄• 7H₂O 5.21 mM, H₃BO₃ 25.87 mM, KI 4.82 mM, FeSO₄• 7H₂O 100 mM y EDTA (C₁₄H₄N₂O₁₀Na₂• 2H₂O) 100 mM.

Mezcla de Aminoácidos y vitaminas (Cóctel 20): Se ajusta la concentración final a L-asparagina 66.62 µM, L-arginina 57.40 µM, L-ácido aspártico 56.35 µM, glicina 306.38 µM, glutamina 410.67 µM, ácido glutámico 51 µM, biotina (vitamina B₈) 4.10 µM, ácido fólico (vitamina B₉) 2.26 µM, ácido nicotínico (vitamina B₃) 12.18 µM, piridoxina (vitamina B₆)

7.30 μM , riboflavina (vitamina B₂) 0.26 μM , tiamina (vitamina B₁) 8.90 μM , myo-inositol 804.84 μM y urea 749.25 μM .

El medio se prepara mezclando las sales inorgánicas, cóctel 20, sacarosa 30 g/L como fuente de carbono, hidrolizado de caseína 200 mg/L, L-prolina 2.76 g/L, adenina sulfatada 10 mg/L y como reguladores de crecimiento 2,4-D 1 mg/L y cinetina 0.1 mg/L. Se ajusta a pH 5.7 y se esteriliza en autoclave durante 18 min.

MICRODYN.

Microcida encargado de eliminar bacterias, esporas, algas y parásitos. Contiene gnetinas de origen animal, plata coloidal y agua bidestilada. Es estable al 0.048 %.

SOLUCIÓN DE IMBIBICIÓN.

Previamente se preparan soluciones de cloranfericol 10 mg/mL, sacarosa al 20%, KCl 1 M, MgCl₂ 1 M y Tris-HCl 1M pH=7.5. A continuación la solución de imbibición se prepara ajustando las soluciones anteriores a las siguientes concentraciones: 0.05 M de Tris, 0.05 M de KCl, 0.01 M de MgCl₂ y 2% de sacarosa. Se esteriliza en autoclave, y una vez fría se agregan 10 $\mu\text{g/mL}$ de Cloranfericol en condiciones de esterilidad.

AMORIGUADOR DE EXTRACCIÓN.

Partiendo de soluciones stock de Tris-HCl 1 M pH=7.5, MgCl₂ 1 M, KCl 1 M, β -mercaptoetanol 14.3 M, tritón X-100, EDTA 0.5 M, se ajustan los componentes anteriores a las siguientes concentraciones: Tris-HCl 0.07 M pH=7.5, MgCl₂ 1 mM, KCl 0.025 M, β -mercaptoetanol 0.015 M, tritón 0.1 %, EDTA 5 mM y sacarosa 0.25 mM. A continuación se esteriliza en autoclave, y antes de usarla se añade una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas (CompleteTM) por cada 50 mL de amortiguador.

REACTIVO DE BRADFORD.

Se pesan 0.25 g de azul de Coomassie G, se le adicionan 25.9 mL de ácido perclórico (HClO₄) y se afora la solución a un volumen de 500 mL con agua bidestilada. Se filtra la solución de ser necesario.

AMORTIGUADOR DE ELUSIÓN.

Para la preparación de ésta solución se requiere contar previamente con los siguientes stocks: KH_2PO_4 1 M, K_2HPO_4 1 M, NaCl 5 M, β -mercaptoetanol 14.3 M y PMSF 100 mM. Las soluciones anteriores se ajustan a una concentración final de : KH_2PO_4 0.05 M, K_2HPO_4 0.05 M, NaCl 0.1 M, β -mercaptoetanol 0.1 mM y PMSF 0.1 mM. Se ajusta a un volumen de 5000 mL con agua bidestilada y a un pH = 7.6 y se esteriliza en autoclave.

SDS PAGE.

Para la elaboración de este tipo de electroforesis se requiere de la preparación de varias soluciones :

Solución stock del gel apilador 2x : Pesar 7.88 g de Tris base y 0.4 g de SDS; aforar a 100 mL con agua bidestilada y ajustar a un pH = 6.8.

Solución stock del gel separador 2x : Pesar 23.64 g de Tris base y 0.4 g de SDS; aforar a 100 mL con agua bidestilada y ajustar a un pH = 8.8.

Solución de acrilamida al 30% : Disolver 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de N,N'-metilén-bisacrilamida en un total de 60 mL de agua bidestilada. Calentar la solución a disolución. Ajustar el volumen a 100 mL de agua. Esterilizar la solución por filtración (0.45 μm de poro). Verificar que el pH sea de 7.0 y guardar en botella oscura a temperatura ambiente.

Amortiguador de electrodos 10x : Disolver 30.22 g de Tris base, 144 g de glicina y 10 g de SDS en 1 000 mL de agua bidestilada/desionizada. Ajustar a un pH = 8.3.

AMORTIGADOR DE CARGA (Reactivo de Laemmli).

Esta solución se prepara mezclando: Tris-HCl 0.1 M pH = 6.8, DTT 200 mM, SDS 4 %, azul de bromofenol 0.2 % y glicerol al 20 %. Se ajusta a un volumen de 5 mL.

AMORTIGUADOR DE TRASFÉRENCIA.

Se prepara ajustando la concentración final a glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM pH = 8.3 y metanol al 20 %.

SOLUCIÓN BLOQUEADORA.

Se prepara disolviendo 1 g de leche descremada junto con PBS 1x y Tween 20. La concentración del Tween 20 depende del anticuerpo que se use (0.6 % para el primer anticuerpo, 1.2 % para el segundo anticuerpo).

SOLUCIÓN PBS 10 x.

Pesar 40 g de NaCl, 1 g de KCl, 13.6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.4 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y disolver en agua bidestilada hasta un volumen final de 500 mL. Ajustar a pH = 7.4 y esterilizar en autoclave.

AMORTIGUADOR A.

Se prepara ajustando la concentración final a Tris-HCl 10 mM pH = 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM pH = 8.0, azida de sodio 0.02 % y el cóctel de inhibidores de proteasas (Complete™).

AMORTIGUADOR DE CINASAS.

Adicionar los componentes para llevar la concentración final a Tris-HCl 70 mM pH=7.5, EGTA 5mM pH= 8.0, β -mercaptoetanol 5 mM, NaCl 150 mM, β -glicerolfosfato 60 mM, α - Na_3VO_4 1 mM, NaF 25 mM y MgCl_2 10 mM.

AMORTIGUADOR DE REACCIÓN.

Se prepara ajustando la concentración final a Tris-HCl 50 mM, KCl 15 mM, MgCl_2 8 mM, dATP 0.001 mM, dCTP 0.001 mM, dGTP 0.001 mM, ATP 0.01 mM, glicerol 5%, β -mercaptoetanol 0.4 mM, ADN activado 10 μg y [^3H]-dTTP 5 $\mu\text{Ci/mL}$.

SOLUCIÓN DE BA 1 X 10⁻³ M.

Se disuelven 5.6 mg de BA (PM. 225.3 g/mol) con 1 mL de NaOH 0.1 N en 5 mL de agua bidestilada y desionizada, con aforo final de 25 mL.

SOLUCIÓN CONTROL PARA BA.

Se prepara de la misma forma que la BA 10⁻³ M pero sin agregar BA.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LISIS.

Se preparan soluciones de NaCl 3 M, Na₄-EDTA 0.5 M pH= 8.0 y SDS 20 %. La solución se prepara ajustando la concentración final a 0.15 M de NaCl, 0.01 M de Na₄-EDTA y 0.5 % de SDS con un pH= 8.0. Se prepara al momento.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

BIBLIOGRAFÍA

- Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P.C. and Grissem, W. 1997. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell Biol.* **17**: 5077-5086.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* **135**: 416-421.
- Bewley, J.D., Black, M., eds. 1994. Seeds. Physiology of Development and Germination, 2nd Ed, Plenum Press, New York NY ISBN 0-306-44748-7.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* **9**: 1055-1066.
- Bidwell, R.G.S. 1979. Fisiología Vegetal. A.G.T. Editor, México.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Bravo, R. and Macdonald-Bravo, H. 1987. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell Biol.* **105**, 1549-1554.
- Brotherton, D.H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P.J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B.O., Archer, S.J., Serrano, M., Brenner, S.L., Blundell, T.L. and Laue, E.D. 1998. Crystal structure of the complex of the cyclin D dependent kinase cdk 6 bound to the cell cycle inhibitor p19 (INK4d). *Nature.* **395**: 244-250.
- Burssens, S., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1998. The cell cycle in Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* **36**: 9-19.
- Coello, P., Vázquez-Ramos, J.M. 1995. Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem.* **231**: 99-103.
- Coenen, C. and Lomax, T.L. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci.* **2**: 351-356.
- Colasanti, J., Tyers, M. and Sundaresan, V. 1991. Identification and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from Zea mays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3377-3381.

- Cruz-García, F., Jiménez, L.F., Vázquez-Ramos, J.M. 1995. Biochemical and cytological studies in osmoprimered maize seeds. *Seed Sci. Res.* 5: 15-23.
- Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar, J.J., Vázquez-Ramos, J.M. 1998. Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 102: 573-581.
- Ching, T.M. 1972. Metabolism of germinating seeds. In: Vol 2. Germination control, metabolism, and physiology. Serie Seed biology: physiological ecology series. Academic Press, Inc., U.S.A.
- Dahl, M., Meskiene, I., Bögre, L., Ha, D. T. C., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H. and Heberle-Bors, E. 1995. The D-type alfalfa cyclin gene *ycMs4* complements G1 Cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell.* 7: 1847-1857.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. and Kim, S.H. 1993. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature.* 363: 595-602.
- Defalco, G. and Giordano, A. 1998. CDK 9 (PITALRE): a multifunctional cdc2-related kinase. *J. Cell. Physiol.* 177: 501-506.
- De Veylder, L., Almeida Engler, J. de, Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montague, M., Engler, G. and Inés, D. 1999. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordial formation. *Planta.* 208: 453-462.
- Doonan, J.H. 1998. Cell division during floral morphogenesis in *Antirrhinum majus*. In: Francis D. Dudits D. and Inzé D. (eds). Plant Cell Division. London: Portland Press. p. 207-222.
- Emons, A.M.C. and Kkieft, H. 1991. Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension culture with somatic embryos attached to callus cells. *Plant Cell Resp.* 10: 485-488.
- Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., Villaroel, R., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1991. The *Arabidopsis* functional homolog of the p34^{cdc2} protein kinase. *Plant Cell.* 3: 531-540.
- Fobert, P.R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E.S. and Doonan, J.H. 1996. Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell.* 8: 1465-1476.
- Fowler, J.E. and Quantrano, R.S. 1997. Plant cell morphogenesis: plasma membrane interactions with the cytoskeleton and the cell wall. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 697-743.

- Francis, D. and Sorrell, D.A. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation.* **33**: 1-12.
- Fransz, P.F. and Schel, J.H.N. 1991 b. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays* L.). *Can. J. Bot.* **69**: 26-33.
- Fransz, P.F. and Schel, J.H.N. 1994. Ultrastructural studies in callus development and somatic embryogenesis in *Zea mays* L. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Vol. 25. Maize. Y.P.S. Bajaj (ed.) Springer-Verlag; Berlin, Alemania. P. 50-65.
- García, E., Orjuela, D., Camacho, Y., Zúñiga, J.J., Plasencia, J., Vázquez-Ramos J.M. 1997. Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol. Biol.* **33**: 445-455.
- Gómez-Gutiérrez, A. 2000. Estudio de los cambios en la expresión genética durante la estimulación de la germinación de semillas de maíz, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Green, C.E. and Rhodes, C.A. 1982. Plant Regeneration in tissue cultures of Maize. In: *Maize for Biological Researchs,* Plant Molecular Biology Association. W.F. Sheridan (ed.). Virginia, USA. P. 367-372.
- Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. 1996. Structure of the C-terminal region of 21 (WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* **87**: 297-306.
- Gutiérrez, C. 1998. The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 492-497.
- Gutiérrez, G., Cruz, F., Moreno, J. González-Hernández, V., Vázquez-Ramos J. M. 1993. Natural and artificial seed ageing in maize: Germination and DNA metabolism. *Seed Sci. Res.* **3**: 279-285.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* **241**:42-52.
- Harper, J.W. and Elledge, S.J. 1998. The role of cdk 7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev.* **12**: 285-289.
- Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* **246**: 629-634.
- Heese, M., Mayer, U. and Jurgens, G. 1998. Cytokinesis in flowering plants: cellular process and developmental integration. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 486-491.

- Hemerly, A.S., Ferreira, P.J.E., Van Montagu, M., Engler, G. and Inzé, D. 1993. cdc2 expression in *Arabidopsis* is linked with the competence for cell division. *Plant Cell* 5:1711-1723.
- Herrera-Teigeiro, I., Jiménez García, L.F., Vázquez-Ramos, J.M. 1999. Benzyladenine promotes early activation of p34^{cdc2}-like kinase(s) during maize germination. *Seed Sci. Res.* 9: 55-62.
- Herrera, I., Sánchez, M.P., Molina, J., Plasencia, J., Vázquez-Ramos, J.M. 2000. Proliferating Cell Nuclear Antigen expression in maize seed development and germination. Regulation by phytohormones and its association with cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 110: 127-134.
- Heydecker, W., Coolbear, P. 1977. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. *Seed Sci. Technol.* 5: 353-425.
- Hirt, H., Pay, A., Bogre, L., Mesliene, I. and Heberle-Bors, E. 1993. Cdc2MsB a cognate cdc2 gene from alfalfa, complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast cdc28 mutants. *Plant J.* 4: 61-69.
- Howard, A., Pelc, S.R. 1953. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity.* 6 (suppl) : 216-273.
- Hulleman, E., Boonstra, J., 2001. Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 80-93.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Laverder, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makkerth, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutiérrez, C., Doonan, J.H. and Murray, J.A.H. 1998. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (cyc D) proteins. *Plant Mol. Biol.* 37: 155-169.
- Huntley, R.P., Murray, J.A.H. 1999. The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 440-446.
- Hutchison, C., Glover, D.M. Eds. 1995. Cell Cycle Control. IRL Press, New York, NY. ISBN 0 19 963410 6.
- Imajuku, Y., Hirayama, T., Endoh, H. and Oka, A. 1992. Exon-intron organization of the *Arabidopsis thaliana* protein kinase genes CDC2 and CDC2b. *FEBS Lett.* 304: 73-77.
- Jacobs, T. W. 1995. Cell cycle control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:317-339.
- Jager, S.D., Murray, J.A.H. 1999. Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* 41: 295-299.

- López, I., Khan, S., Vázquez, J., and Hussey, P.J. 1995. Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Bioch. Biophys. Acta* **1260**: 119-121.
- López, I., Khan, S., Vázquez, J., and Hussey, P.J. 1997. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in *Zea mays* is composed of two members that have similar expression programmes. *Bioch. Biophys. Acta* **1353**: 1-6.
- Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Koncz, C. and Dudits, D. 1997. Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*. **9**: 223-235.
- Martinez, M.C., Jorgensen, J.E., Lawton, M.A., Lamb, C.J. and Doerner, P.W. 1992. Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7360-7364.
- Mayer, A.M., Poljakoff-Mayber, A. 1984. The germination of seeds. 4th ed. Pergamon Press, Inglaterra.
- Meijer, m. and Murray, J.A.H. 2001. Cell cycle control and the development of plant form. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 44-49.
- Meyerowitz, E.M. 1997. Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell*. **88**: 299-308.
- Mironov, V., Lieven, De Veylder, L., Van Montagu, M., Inze, D. 1999. Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants-The Nexus. *Plant Cell*. **11**: 509-521.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J. and Tan, E.M. 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immun.* **121**: 2228-2234.
- Mórocz, S., Donn, G., Németh, J., Dudits, D. 1990. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theoretical and Applied Genetics*. **80**: 721-726.
- Morrish, F., Vasil, V. and Vasil, I.K. 1987. Developmental morphogenesis and Genetic manipulation in tissue and cell cultures of the Gramineae. *Adv. Genet.* **24**: 431-439.
- Murray, J.A.H., Freeman, D., Greenwood, J., Huntley, R., Makkerh, J., Riou-Khamlichi, C., Sorrell, D.A., Cockcroft, C., Carmichael, J.P., Soni, R., and Shah, Z.H. 1998. Plant D cyclins and retinoblastoma protein homologues. In: Francis D., Dudits, D. and Inzé, D. (eds). *Plant Cell Division*. London: Portland Press, p. 99-127.

- Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Herberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., Renaudin, J.P. 2000. CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**: 607-620.
- Jugenheimer, R.W. 1976. Corn. Improvement, seed production and uses. Wiley and Sons, U.S.A.
- Kelman, Z. 1997. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**: 629-640.
- Knibiehler, M., Goubin, F., Escas, N., Jonson, Z.O., Mazarguil, H., Hubscher, U., Ducommun, B. 1996. Interaction studies between the p21 Cip/Waf1 cyclin-dependent kinase inhibitor and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by surface plasmon resonance. *FEBS Lett.* **391**: 66-70.
- Kong, X. P., Onrust, R., O'Donnell, M. and Kuriyan J. 1992. Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell.* **69**: 425-437.
- Koundrioukoff, S., Jónsson, Z.O., Hasa, S., De Jong, R.N., Van der Vliet, P.C., Hottiger, M.O., and Hübscher, U. 2000. A direct interaction between Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **30**: 22882-22887.
- Kozłowski, T.T., Gunn, C.R. 1972. Importance and Characteristics of Seeds. In: Vol. 1. Importance and Characteristics, Seed Biology: Physiological Ecology Series, Academic Press, Inc., U.S.A., p. 1-7, 228-251.
- Krishna, T.S., Kong, X.P., Gary, S., Burgers, P.M.J. and Kuriyan, J. 1994. Crystal structure of the eucaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell.* **79**: 1233-3.
- Kuriyan, J. and O'Donnell, M. 1993. Sliding clamps of DNA polymerase. *J.Mol. Biol.* **234**: 915-925.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227** : 680-685.
- Lee, S. H., Kwong, A.D., Pan, Z.Q. and Hurwitz, J. 1991. Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* **266**: 594-602.
- Li, R., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. 1996. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair deficient cell following DNA damage. *Curr. Biol.* **6**: 189-199.

- Nakagami, H., Sékine, M., Murakami, H. and 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.
- Oku, T., Ikeda, S., Sasaki, H., Imajou, S., Ohtsuka, E. and Tsurimoto, T. 1998. Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C. *Genes Cells.* **3**: 357-369.
- Osborne, D. J., Sharon, R., Ben-Ishai, R. 1980. Studies on DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*). *Isr. J. Bot.* **29**: 259-279.
- Osborne, D.J. 1983. Biochemical control operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* **61**: 3568-3577.
- Pagano, M., Theodoras, A.M., Tam, S. W. and Draetta, G.F. 1994. Cyclin D1 mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Gene and Devel.* **8**: 1627-1639.
- Ramírez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B. and Gutiérrez, C. 1999. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acid Res.* **27**: 3527-3533.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., Murray, J.A.H. 1996. Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1003-1018.
- Reyes-Jiménez, J., Jiménez-García, L.F., Vázquez-Ramos, J. 1991. Benziladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci. Res.* **1**: 113-117.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A. and Murray, J.A.H., 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. 1996. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Struct. Biol.* **3**: 696-700.
- Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.O., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. 1998. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase cdk6 by the tumour suppressor p16 (INK4a). *Nature.* **395**: 237-243.
- Sánchez, M.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C., Vázquez-Ramos, J.M. 2001. PCNA protein associates to cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* Sometido.

- Segers, G., Gadisseur, I., Bergounioux, C., Engler, J.D., Jacquard, A., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1996. The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G(2) phases of the cell cycle. *Plant j.* **10**: 601-612.
- Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., and Shinmyo, A. 1999. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* **460**: 117-122.
- Sembdner, G., Atzorn, R., Schneider, G. 1994. Plant hormone conjugation. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1459-1481.
- Sen, S., Payne, P.J., Osborne, D.J. 1975. Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos and the relationship to early protein synthesis. *Biochem. J.* **148**: 381-387.
- Shaul, O., Van Montagu, M. And Inés, D. 1996. Regulation of cell división in *Arabidopsis*. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 97-115.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., and Murray, J. A.H. 1995. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell.* **7**: 85-103.
- Sorrell, D.A., Combettes, B., Chaubet-Gibot, N., Gigot, C. and Murray, J.A.H. 1999a. Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **119**: 343-351.
- Sorrell, D.A., Riou-Khamlichi, C., Chaubet-Gigot, N., Combettes, B., Gigot, C. and Murray, J.A.H. 1999b. Plant D-type (cyc D) cyclins and the regulation of the plant cell cycle. In: Altmann, A., Ziv M and Izhar, S. (eds). *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. P. 441-444.
- Steeves, T.A. 1983. The evolution and biological significance of seeds. *Can. J. Bot.* **61**: 3550-3560.
- Tomes, D.T. and Smith, O.S. 1985. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) Germplasm. *Theor. Applied Genet.* **70**: 505-509.
- Torres-Espinosa, A.E. 1999. Expresión de genes inducidos por cambios hídricos durante el osmoacondicionamiento de semillas de maíz. Tesis de Licenciatura, facultad de Química, UNAM.

- Tsurimoto, T and Stillman, B. 1990. Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1023-1027.
- Umeda, M., Umedahara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J. And Uchimiya, H. 1999. Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol.* **119**: 31-40.
- Vasil, I.K. 1988. Progress in the Regeneration and Genetic manipulation of cereal crops. *Biotec.* **6**: 397-402.
- Vasil, V., Lu, C.Y. and Vasil, I.K. 1983. Proliferation and plant regeneration from the Nodal region of Zea mays L. (Maize, Gramineae) Embryos. *Amer. J. Bot.* **70**: 951-954.
- Walbot, V. 2000. A green chapter in the book of life. *Nature.* **408**: 794-795.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., Gutierrez, C. 1996. Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* **15**: 4900-4908.
- Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. 1992. D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* **71**: 505-414.
- Zaraín, M., Bernal, I., Vázquez-Ramos, J.M. 1987. Effect of benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutat Res.* **181**: 103-110.
- Zúñiga-Aguilar, J.J., Gómez, A., López, I., Vázquez-Ramos, J.M. 1995. Does benzyl adenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination? *Seed Sci. Res.* **5**: 219-226.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial statements and for providing a clear audit trail. The records should be kept up-to-date and should be easily accessible to all relevant parties.

2. The second part of the document outlines the procedures for handling cash and other assets. It is important to ensure that all cash receipts are properly recorded and that all disbursements are supported by valid documentation. Regular reconciliations should be performed to ensure that the books are in balance.

3. The third part of the document discusses the requirements for financial reporting. It is important to ensure that all financial statements are prepared in accordance with the applicable accounting standards and are presented in a clear and concise manner. The reports should be reviewed and approved by the appropriate authorities.