

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

CARACTERIZACION MOLECULAR Y BIOQUIMICA DE
LA CICLINA D DE MAIZ

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)
P R E S E N T A :
RUTH GUTIERREZ AGUILAR

TUTOR: DR. JORGE VAZQUEZ RAMOS



MEXICO, D. F.

ENERO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Jorge Vázquez Ramos en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Jorge Vázquez Ramos

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Dr. Ignacio Camacho

El Jurado de Examen para obtener el Grado de la Maestría en Ciencias Bioquímicas estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Alejandro García Carrancá
VOCAL	Dra. Alejandra Covarrubias Robles
SECRETARIO	Dr. Eleazar Martínez Barajas
SUPLENTE	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
SUPLENTE	Dra. Patricia Ostrosky Shejet

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por la dirección de esta tesis y su apoyo.

A la Dra. Alejandra Covarrubias y al Dr. Ignacio Camacho por ser parte del comité tutorial.

A los miembros del jurado por la revisión de la tesis.

Al Dr. Javier Plascencia por las críticas hechas a este trabajo.

Muy especialmente al Dr. Felipe Cruz y a la Dra. Patricia Coello por su apoyo y sugerencias para la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS

- ❖ A mis padres, Margarita y Rafael, por el amor que siempre me han dado y por apoyarme en todas las decisiones que he tomado.
- ❖ A mis hermanos (Rafael, Judith, José, Carlos, María, Antonio y Gerardo) por darme un muy buen ejemplo a seguir y enseñarme a que uno puede triunfar si se lo propone. A mis cuñadas (Mónica, Lorraine, Hilda, Rosa Ma. y Elsa) por brindarme su ayuda y compañía. A mis sobrinos (Sofía, Ixchell, Isabel, Alfonso, Paola, Andrea y Clara) por enseñarme que todos los días se aprende algo nuevo.
- ❖ A mi Miño, Tío Memo, Tía Marta, Memo y fam., Alex y fam. y Daniel por ser parte importante de mi familia.
- ❖ A Arantza y Coco por ser mis padres adoptivos.
- ❖ A todos los miembros del laboratorio 114: Mary Paz, Sobeida, Dairo, Pilo, Darío, Paco, Sonia, Naty.
- ❖ A Edurne y Luz María por compartir tanto tiempo en el laboratorio, pero sobre todo retos de altura.
- ❖ A Javier, Lilia y Daniel por brindarme su amistad y compartir vivencias inolvidables.
- ❖ A Doña Licha y a la comadre, por escucharme y aconsejarme en todo momento.
- ❖ A Lety García y a Rocío por toda la ayuda que me brindaron.
- ❖ A todos los miembros del Departamento de bioquímica: Marianita, Nahieli, Jiro, Manuela, Maru, Lluvia, Andrea, Gretel, Goyo, Yuridia, Vanesa, Adriana, Caty, Martín, Carmen, Selene, Lorena y todos aquellos que han estado conmigo en estos últimos años.
- ❖ A los doctores del Departamento de Bioquímica que me apoyaron: Dr. Javier Plascencia, Dra. Irma Bernal, Dra. Herminia Loza. Muy especialmente al Dr. Felipe Cruz, Dra. Paty Coello y Dr. Eleazar Martínez por abrirme las puertas y ayudarme a solucionar problemas.
- ❖ A cada una de mis amigas del softball, Lolita y César.
- ❖ A Nuri, Viris, Fernanda, Rocio, Heidi, Tere, Mary, Dorian, María, Santos, Sophie, Vincent, Mathilde, Cecile, Julien, Juliette por su amistad.

INDICE

Resumen

Abreviaturas

I. Introducción	1
1.1 Germinación	1
1.2 Fitohormonas	2
1.3 Ciclo celular	3
1.3.1 Fase G1/S en mamíferos	4
1.3.2 Fase G2/M en mamíferos	6
1.4 Ciclo celular en plantas	8
1.5 Ciclina D en plantas	11
1.5.1 Influencia de fitohormonas sobre la ciclina D	13
II. Antecedentes	14
III. Hipótesis	16
IV. Objetivos	16
V. Materiales y Métodos	17
VI. Resultados	26
VII. Discusión	49
VIII. Conclusión	57
IX. Apéndice	58
X. Referencias	64

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
1) Amplificación del cDNA de la ciclina D2 de maíz por PCR	28
2) Digestión de clonas recombinantes portadoras del cDNA de ciclina D2	29
3) Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante GST-ciclina D2	31
4) Purificación y proteólisis de la proteína recombinante GST-Ciclina D2	33
5) Título de anticuerpos contra la ciclina D2	35
6) Ensayo de competencia	37
7) Inmunodetección de la ciclina D2 durante la germinación de maíz y el efecto de fitohormonas	38
8) Inmunodetección de la ciclina D2 en diferentes tejidos	39
9) Número de ciclos necesarios para la amplificación del cDNA de la ciclina D2 por RT-PCR semicuantitativo	41
10) Concentración necesaria de cDNA para la amplificación de la ciclina D2 por RT-PCR semicuantitativo	42
11) Número de ciclos necesarios para la amplificación del cDNA de la ubiquitina por RT-PCR semicuantitativo	43
12) Concentración de oligonucleótidos necesaria para la amplificación del cDNA de la ubiquitina por RT-PCR semicuantitativo	44
13) Concentración necesaria de cDNA para la amplificación de la ubiquitina por RT-PCR semicuantitativo	45
14) Expresión del transcrito de la ciclina D2 y de la ubiquitina durante la germinación y el efecto de fitohormonas	46
15) Expresión del transcrito de la ciclina D2 durante la germinación de maíz y el efecto de fitohormonas	48

RESUMEN

El estudio de la germinación de maíz es importante, ya que nos ha permitido conocer cómo la semilla reactiva su metabolismo, provocando el establecimiento de una nueva planta. La mayoría de las células meristemáticas del embrión sin germinar o no embebido se encuentran en la fase G1 del ciclo celular y una vez que es embebido comienza el ciclo celular y la división celular.

Una de las proteínas que ejerce el control de la entrada del ciclo celular es la ciclina D, la cual es la integradora de señales de desarrollo y del ciclo celular. Las ciclinas D forman un complejo de cinasa junto con las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que al fosforilar a la proteína del retinoblastoma (Rb), permiten la transición de la fase G1 a la S. En mamíferos, las ciclinas D sólo se encuentran en G1/S, pero en plantas se ha demostrado que no es así.

La ciclina D2 es una proteína que se encuentra presente en tejidos proliferativos y diferenciados y durante la germinación del maíz se acumula en las primeras horas de imbibición, alcanzando un pico hacia las 6 horas y posteriormente decae. Este comportamiento es similar al de una hormona que inhibe el ciclo celular como es el ácido abscísico (ABA), a pesar de que desaparece totalmente hacia las 24 horas de germinación. Sin embargo, al ser germinados los ejes embrionarios en presencia de una citocinina como es la benziladenina (BA), promotora del ciclo celular, observamos que el acúmulo de la ciclina D2 se lleva a cabo a las 3 horas de germinación.

También se analizó el comportamiento del transcrito de la ciclina D2 durante la germinación y se observó que este se incrementa hacia las 6 horas de germinación, manteniéndose constante posteriormente. Esta misma tendencia se observó también con ABA. Al emplearse BA, se encontró una fuerte inducción de mRNA de la ciclina D2 después de las 15 horas de germinación. El adelanto del ciclo celular provocado por la adición de BA, puede estar mediado por la ciclina D2, debido a su clara inducción.

La ciclina D2 se encuentra presente a todo lo largo del ciclo celular, aunque primordialmente en la fase G1, lo cual sugiere que pudiera ser la responsable del

establecimiento de las primeras fases del ciclo celular, si bien también podría jugar un papel importante en el desarrollo de la planta.

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
BA	benziladenina
Cdk	cinasa dependiente de ciclina
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular0000
ICK	inhibidor de cinasa dependiente de ciclina
kDa	kilodalton
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RT	transcriptasa reversa
GST	glutación S-transferasa
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosida
DEPC	dietil pirocarbonato
LB	Luria Broth

I. INTRODUCCIÓN

1.1 GERMINACIÓN

La semilla es de gran importancia para la planta, ya que es una forma de reproducción y de sobrevivencia. Una semilla madura contiene sólo de un 5 al 15% de humedad y una actividad metabólica casi imperceptible.

Para que una semilla germine y de lugar a una nueva planta es necesario que se hidrate en condiciones que favorezcan la reorganización de sus estructuras y el restablecimiento de su metabolismo (temperatura adecuada, suficiente cantidad de agua, presencia de oxígeno). La germinación de la semilla, que comienza con su imbibición en agua, provoca que el metabolismo se reestablezca y se lleven a cabo diferentes eventos que se dividen en: a) eventos tempranos como son la hidratación, la síntesis de proteínas, la síntesis de ATP, la síntesis de RNA y la reparación de DNA; b) eventos tardíos, dentro de los cuales se encuentran la movilización de reservas, la expansión celular y la replicación del DNA (Bewley y Black, 1994).

La síntesis de proteínas durante las primeras horas de germinación se debe a la presencia de transcritos preformados durante la maduración de la semilla, así como a transcritos sintetizados *de novo*. Al utilizarse inhibidores de la síntesis de proteínas y de RNA se provoca que la germinación sea también inhibida, lo cual demuestra que durante la imbibición existe síntesis *de novo* de proteínas y de RNA esenciales para la germinación (Sánchez de Jiménez et al., 1984; Datta et al., 1983). Por otra parte, por medio de un análisis proteómico se observó el aumento o la disminución de 74 proteínas diferentes durante la germinación, las cuales podrían ser consideradas como asociadas a este proceso (Gallardo et al., 2001).

En la semilla seca, el DNA nuclear va acumulando de manera progresiva rupturas de cadena sencilla al paso del tiempo, es por esto que la reparación del DNA es uno de los procesos de gran importancia en las primeras horas de germinación (Osborne, 1983), además de ser un evento que sucede continuamente. Una vez que el DNA ha sido reparado y no presenta mayores

problemas, puede servir como molde para la síntesis replicativa del DNA y en maíz específicamente se ha observado que esto sucede hacia las 12 y 15 horas de imbibición, lo que constituye la entrada a la fase S del ciclo celular (Zlatanova et al., 1987; Baiza et al., 1989).

Se ha reportado que durante la maduración de las semillas de maíz la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular y que al germinar se reactiva el ciclo celular dando origen a la replicación del DNA y la división celular (Deltour y Jacmard, 1974).

Con todo lo anterior y de una forma simplista, la germinación abarca desde que la semilla se embebe y termina con la iniciación de la elongación del eje embrionario incluyendo la protusión de la radícula. Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha adoptado la siguiente definición operacional: "la germinación de una semilla es un conjunto de procesos bioquímicos y moleculares que permiten al embrión estar en condiciones de reiniciar la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas. Los eventos propios de la germinación conducirán al metabolismo a un punto de compromiso metabólico partiendo de un estado de quiescencia (falta de agua) hasta llegar a la primera división celular, la cual en nuestro concepto marca el inicio del proceso de desarrollo (Vázquez-Ramos, 2000)".

1.2 FITOHORMONAS

Para que una semilla germine, además de todos los procesos que se mencionaron anteriormente, existen factores intrínsecos que le indican el momento preciso para germinar. Algunos de estos factores intrínsecos son las hormonas vegetales (ácido abscísico, giberelina, citocinina, entre otras), las cuales al actuar en forma balanceada son capaces de controlar el desarrollo de la planta.

Una hormona que permite el desarrollo de la semilla y su dormancia es el ácido abscísico (ABA) (Seo et al., 2002). Esta hormona dependiendo de su

concentración induce la síntesis de proteínas de reserva y lípidos; permite también la tolerancia de estreses como la desecación o la alta salinidad, señalización a través de azúcares (glucosa). Así como el ABA es capaz de promover la maduración de la semilla, por el contrario puede inhibir la germinación, al igual que la síntesis del DNA (Roberston et al., 1990).

La hormona que es la contraparte del ABA es el ácido giberélico (GA), el cual estimula la germinación mediante la expresión de genes que codifican enzimas hidrolíticas capaces de degradar las reservas almacenadas en el endospermo para que puedan ser utilizadas por las semillas (Bewley y Black, 1994).

Las citocininas son hormonas que promueven la germinación, ayudan al crecimiento de la planta y estimulan la división celular (Binns, 1994). Durante la germinación se ha descrito que las citocininas inducen la activación de proteínas que participan en la regulación del ciclo celular (Cruz-García et al., 1998) y en la replicación del DNA (Vazquez-Ramos y Reyes, 1990).

1.3 CICLO CELULAR

El ciclo celular se ha descrito como el mecanismo por el cual una célula es capaz de producir dos células hijas que mantienen la información genética. El ciclo celular se ha dividido en cuatro fases: a) fase G1, b) fase S, c) fase G2, d) fase M. En la fase G1 la célula adquiere todos los nutrientes y maquinaria necesarios para poder llevar a cabo la replicación del DNA en la fase S. Una vez duplicado todo el material genético, la célula verifica que se haya logrado este objetivo exitosamente en la fase G2 y se prepara para dividirse en la fase M, donde una célula da, como resultado de la división, dos células hijas con información genética idéntica.

Un mecanismo que participa en la regulación del ciclo celular es la fosforilación y desfosforilación de proteínas claves. Existen diversos complejos

con actividad de cinasa, los cuales se encargan de fosforilar a sus proteínas blanco permitiendo que el ciclo celular avance. Estos complejos de cinasas están formados por una ciclina y una cinasa dependiente de ciclina (Cdk).

Las ciclinas son las proteínas capaces de activar a las Cdk, ya que al formarse el complejo ciclina / Cdk se logra la estabilización del mismo, se define su localización celular y la selección de sustratos específicos (Pines, 1995). Las ciclinas reciben este nombre porque son capaces de modificar su cantidad y/o su actividad y así regular el ciclo celular. La regulación temporal de las ciclinas se logra gracias a una secuencia de degradación que presentan en su estructura primaria, la cual puede ser reconocida por un complejo encargado de la degradación de proteínas conocido como el proteasoma (Koepp et al., 1999; Schwab et al., 2001).

Otra forma de regular el complejo de ciclina/cinasa es por medio del meticuloso control que se lleva a cabo sobre la Cdk. La Cdk es activa cuando es fosforilada en la posición Thr 160 ó 161 por medio de una CAK (cinasa activadora de Cdk), que en mamíferos está formada por la ciclina H y la Cdk7 (Krek et al., 1991). Por el contrario, puede ser inhibida al ser fosforilada en las posiciones Thr14 y Tyr15 por la cinasa Wee1 (Gould et al., 1989). Otra proteína que vuelve activa a la Cdk es la fosfatasa Cdc25, la cual se ha encontrado presente en levaduras y mamíferos. La proteína Cdc25 es capaz de remover los fosfatos inhibitorios del producto de la acción de Wee1 (Russell et al., 1986). Por otra parte, existen proteínas que se unen al complejo de ciclina/cinasa para inhibirlo y son los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) (Sherr y Roberts, 1999).

1.3.1 FASE G1 / S EN MAMÍFEROS

En mamíferos, durante la fase G1 el complejo que presenta actividad de cinasa está conformado por la ciclina D y la Cdk4/6, el cual es regulado por estímulos externos como son los nutrientes, hormonas, factores de crecimiento,

así como por señales internas que indican que el ciclo celular debe comenzar (Sherr, 1993). El complejo de ciclina D y Cdk4/6 es capaz de fosforilar a la proteína del retinoblastoma (Rb), la cual se encuentra secuestrando al factor transcripcional E2F. La proteína Rb es considerada un inhibidor del ciclo celular, ya que al estar unida a E2F impide que el ciclo celular avance de la fase G1 a la fase S. La célula debe estar segura de tener todo lo necesario para avanzar a la fase S y de que la fase G1 haya terminado exitosamente, lo cual es conocido como un punto de control (Johnson et al., 1999).

Una vez hiperfosforilada Rb se permite la entrada a la fase S, ya que E2F ejerce su función de factor transcripcional junto con la proteína DP, apoyando la transcripción de los genes cuyos productos son necesarios para dicha fase como son PCNA, DNA polimerasa α , DNA ligasa, ciclina E entre otros (Black et al., 1999).

Hacia el final de la fase G1 y al inicio de la fase S, la ciclina D es degradada; mientras tanto, la ciclina E forma un complejo con la Cdk2, el cual tiene como fin seguir fosforilando a Rb para liberarla de E2F y que la fase S se pueda establecer en su totalidad. En este punto existe un retroalimentación positiva, ya que el gen codificante para la ciclina E contiene en su promotor secuencias de unión para E2F (Sherr, 1994).

En la fase S es en donde se lleva a cabo la replicación del DNA, siendo algunos de los principales actores la DNA polimerasa δ , PCNA, DNA ligasa, etc. En este momento, el complejo ciclina E / Cdk2 ejerce su función sobre proteínas que reconocen los orígenes de replicación provocando la activación de los mismos y permitiendo la entrada de toda la maquinaria replicativa. Las DNA helicasas se encargan de desenrollar la doble cadena de DNA, permitiendo que RPA (Proteína de Replicación A) se una a cadena sencilla e impidiendo que se vuelva a formar la doble cadena de DNA. Posteriormente, la DNA polimerasa α sintetiza cebadores de RNA para que, sucesivamente, las cadenas sean enlongadas por la DNA polimerasa δ (o ϵ) con ayuda de PCNA, proteína que actúa como una pinza deslizante de la DNA polimerasa δ , provocando que la polimerasa sea más procesiva (Kelman, 1997). El factor de replicación C (RFC) es la proteína

encargada de montar a PCNA en la horquilla de replicación y una vez que ésta ha terminado su función como factor de elongación de la polimerasa, RFC la remueve de la horquilla. Una vez replicadas la cadena continua y la discontinua, la RNasa H y la proteína FEN 1 remueven los cebadores de RNA de la cadena discontinua (fragmentos de Okazaki) y se sugiere que la DNA polimerasa ϵ ó la δ rellenan estos huecos para que posteriormente la DNA ligasa una los fragmentos resultantes (Blow, 1996; Waga, 1998).

La ciclina A empieza a ser sintetizada en la fase S, acumulándose conforme avanza el ciclo celular y la ciclina E comienza a ser degradada en S tardía. La ciclina A forma un complejo junto con la Cdk2, el cual tiene como objetivo fosforilar diferentes proteínas involucradas en la replicación del DNA como la RPA, la RFC, probablemente las MCMs y las DNA polimerasas (Schub et al., 2001). Se ha sugerido que la fosforilación de estas proteínas por el complejo ciclina A / Cdk2 es una forma de regular la replicación, una vez por ciclo celular.

1.3.2 FASE G2 / M EN MAMÍFEROS

Al final de la fase S, la ciclina B empieza a ser sintetizada y forma un complejo con la Cdk1, el cual se encuentra inactivo debido a fosforilaciones inhibitorias en los residuos Thr14 y Tyr15 de la Cdk1, llevadas a cabo por las proteínas Wee / Myt1. Este complejo se volverá activo una vez que la replicación del DNA haya terminado y la fosfatasa Cdc25 desfosforile a la Cdk1; por otra parte, se necesita de una fosforilación activadora por CAK en el residuo Thr 160 de la Cdk1 (Morgan, 1997). Cuando el complejo ciclina B / Cdk1 se encuentra activo se dice que la fase G2 se ha establecido.

Hacia la fase M, el complejo ciclina B / Cdk1 activo es capaz de fosforilar proteínas que regulan la arquitectura de la célula como son las lamininas y proteínas del citoesqueleto. Al ser fosforiladas las subunidades de la lámina nuclear se provoca el desensamblaje de la membrana nuclear y el citoesqueleto

se reorganiza formando el huso mitótico. La actividad de cinasa de ciclina B / Cdk1 es necesaria para que las cromátidas hermanas se puedan disociar y migren a polos opuestos (Smits et al., 2001). También se encuentra presente el complejo promotor de anafase (APC) que ayuda a la citocinesis degradando al final de M a las ciclinas A y B, lo que permite que el ciclo celular pueda empezar otra ronda (Page et al, 1999). Las ciclinas A y B contienen una secuencia conocida como la caja de destrucción que participa en el mecanismo de degradación.

Como se mencionó anteriormente, los complejos de cinasas pueden ser inhibidos por fosforilaciones en las Cdks, o bien, reguladas por su localización subcelular. Sin embargo, no solamente estos factores son los que impiden al complejo de cinasa ejercer su función, sino que también existen los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs).

Estos inhibidores se han dividido en dos familias:

- a) La familia de las Cip / Kip compuesta por p21, p27 y p57. Se ha reportado que estas proteínas, dependiendo de su estequiometría, sirven como estabilizadores o como inhibidores de los complejos ciclinas / Cdks (Zhang et al., 1994). Se tiene evidencia de que estas proteínas son inhibidoras de los complejos de cinasas formados durante la fase G1, ciclina D / Cdk4,6 y ciclina E / Cdk2, impidiendo así la fosforilación de Rb (Harper et al., 1995).
- b) La familia de las INK4 está formada por las proteínas p15, p16, p18 y p19, y son capaces de inhibir también a los complejos de cinasas de G1, ciclina D / Cdk4,6 (Sherr et al., 1999).

1.4 CICLO CELULAR DE PLANTAS

En la última década el estudio del ciclo celular en plantas ha tenido gran auge y se ha demostrado que se conservan muchos de los mecanismos básicos de la regulación del ciclo celular presentes en mamíferos (Jacobs, 1995; Inze et al., 1999).

Debido al gran impacto que ha tenido la secuenciación de diversos genomas de plantas, últimamente se ha hecho un extenso análisis del genoma de *Arabidopsis* y se han encontrado las secuencias de genes cuyos productos están involucrados en el ciclo celular y que han sido conservados durante la evolución entre los mamíferos y las plantas (Potuschak et al., 2001; Vandepoele et al., 2002).

El desarrollo de una planta se caracteriza por una continua división celular meristemática seguida por la expansión celular y diferenciación, formando los órganos de la planta. Es aquí donde se ve una fuerte interrelación entre el ciclo celular y el desarrollo de la planta, ya que la planta responde a estímulos del medio ambiente por medio del ciclo celular y al no existir las condiciones ideales, no se lleva a cabo un buen desarrollo de la planta (den Boer et al., 2000; Meijer et al., 2001).

Las ciclinas mitóticas A y B de plantas han conservado una discreta homología con las de mamíferos y se les ha encontrado presentes durante las fases G2 / M. Se han reportado ciclinas A y B de *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, entre otras (Renaudin et al., 1996). Al igual que en mamíferos, estas ciclinas son degradadas debido al reconocimiento de la secuencia de la caja de destrucción. El análisis de la expresión de estas ciclinas muestra que la ciclina A se presenta antes que la ciclina B. Al contrario de mamíferos, se ha visto que la ciclina A se expresa durante G1 / S y actúa junto con la Cdk-A para permitir la transición a S (Rossi et al., 2002).

En plantas se ha identificado una familia de Cdks (A-E) que se diferencian por el dominio de unión a las ciclinas. Se ha descrito que la Cdk-A, cuyo motivo

de unión a ciclinas es PSTAIRE, es constante tanto en su transcrito como la proteína, pero la actividad de cinasa va aumentando desde G1 hacia S y tiene otro pico en la transición G2 / M (Mironov et al., 1999). Las Cdk-B (subgrupos 1 y 2) son exclusivas de plantas y la expresión de éstas es regulada por el ciclo celular. El transcrito de la CDK-B1 se expresa en S-G2-M, pero el de la CDK-B2 sólo en G2-M. Por otra parte, la actividad de la CDK-B1 aparece hacia G2 y decae en M, por lo tanto la actividad de cinasa de la CDK-B1 es necesaria en la transición G2-M junto a la CDK-A, pero la CDK-B2 lleva el control en mitosis tardía (Sorrell et al., 2001).

El mecanismo por el cual Rb es fosforilado ha sido también conservado en plantas (Soni et al., 1995; Huntley et al., 1998). Las ciclinas D se han clasificado en cuatro tipos (1-4) y son las que se unen a la Cdk-A para fosforilar a Rb. En plantas no se ha logrado identificar el equivalente a la ciclina E que en mamíferos forma complejo con Cdk2 para fosforilar a Rb. En maíz se observó que Rb se expresa mayoritariamente en tejidos diferenciados y minoritariamente en las zonas proliferativas, lo cual sugiere que pueda estar involucrado en procesos de diferenciación (Huntley et al., 1998).

Por medio de un sistema de doble híbrido se demostró que Rb se une a E2F. Se han descrito 6 E2F y dos DP (proteína acompañante de E2F) en *Arabidopsis* y también se han aislado estos genes de arroz. Algunos E2F en asociación con DP funcionan como factores transcripcionales; sin embargo, se ha visto que también pueden funcionar como represores de la transcripción (Mariconti et al., 2002; Kosugi et al., 2002).

Al igual que en mamíferos, las plantas poseen inhibidores de CDKs (ICKs) que impiden la actividad del complejo de ciclina/cinasa formado por la CDK-A / ciclina D. Estos inhibidores poseen regiones homólogas con la familia Cip de inhibidores en mamíferos. Hasta el momento se han clasificado dos grupos de inhibidores de Cdk. El grupo A que comprende a ICK1, ICK2, ICK6 e ICK7, los cuales se asocian a Cdk-A y con las ciclinas D1, D2 y D3. Las proteínas del grupo B, formado por ICK4, ICK5 e ICKcr son capaces de asociarse a la ciclina D más no a la Cdk-A (Zhou et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, una forma de regulación de la actividad de ciclina / Cdk es por medio de las fosforilaciones que se llevan a cabo sobre la Cdk. Para que esta proteína pueda formar un complejo activo junto con la cinasa debe estar desfosforilada en Thr 14 y Tyr 15, lo cual realiza la fosfatasa Cdc25. En plantas no se ha encontrado un homólogo directo de ésta, pero es probable que exista una proteína que ejerza esta misma función (Dewitte et al., 2003)

1.5 CICLINA D EN PLANTAS

En la fase G1, la célula percibe su entorno y decide si es capaz de avanzar a la siguiente fase. Entre las proteínas que se han identificado como las primeras en percibir el medio ambiente se encuentran las ciclinas D. A diferencia de mamíferos, en plantas se ha observado que las ciclinas D pueden ser estables a lo largo de todo el ciclo celular y por lo tanto no parecieran específicas de la fase G1 (Sorrell et al. 1999).

La homología que presentan las ciclinas D de plantas con las de mamíferos es del 20-25%; a pesar de esta baja homología, las ciclinas D tienen secuencias muy conservadas entre las cuales tenemos: a) consenso LXCXE de unión a la proteína de retinoblastoma (Rb), b) caja de ciclinas, formada por alrededor de 100 aminoácidos, donde ocurre la unión a las CDKs, c) una región rica en los aminoácidos PEST (Rechsteiner et al., 1996), la cual es blanco de fosforilación para posteriormente ser ubiquitinada y degradada por el proteasoma 26S (Yanagawa et al., 2002).

En la literatura se han reportado diversos cDNAs codificantes para ciclinas D de plantas como *A. thaliana*, *N. Tabacum* y *Antirrhinum* (Potuschak et al., 2001; Sorrell et al., 1999; Gaudin et al. 2000) y se han clasificado como ciclinas D1, D2, D3 y D4. Al analizar el genoma de *A. thaliana* se encontró una familia de 11 genes que codifican para ciclinas D, pero no todas han sido caracterizadas (Vandepoele et al. 2002). Es posible que tantas ciclinas lleven a cabo funciones redundantes debido a la gran importancia que éstas tienen para el mantenimiento de un ciclo celular exitoso, de tal forma que si una de las ciclinas es mutada, otra la pueda sustituir.

Al igual que en mamíferos, las ciclinas D de plantas muestran una expresión dependiente del ciclo celular y participan en su inicio respondiendo a nutrientes y factores de crecimiento. Estudios llevados a cabo en células BY-2 de tabaco, demostraron que la ciclina D3.2 se induce en G1 en células sincronizadas.

Con respecto a la ciclina D2.1 y D3.1, ambas muestran una acumulación hacia la fase M (Sorrell et al., 1999).

La sacarosa es el principal metabolito que se obtiene de la fotosíntesis y es capaz de inducir a las ciclinas D2 y D4 en cultivos celulares de *Arabidopsis* (Soni et al., 1995; De Veylder et al., 1999). Por otra parte, se demostró que al agregar al medio de cultivo la sacarosa y a pesar de inhibir el ciclo celular y la síntesis de proteínas, los transcritos de las ciclinas D2 y D3 aumentan, sugiriendo que la sacarosa ejerce una regulación de la expresión de estos genes (Riou-Khamlichi et al., 2000).

En la fase G1 del ciclo celular en plantas, el complejo de ciclina/cinasa de G1, formado por una ciclina D y la Cdk-A, se encarga de fosforilar a la proteína retinoblastoma (Rb) (Nakagami et al. 2002). Se demostró que el complejo formado por la ciclina D2 y la Cdk-A de *Arabidopsis* es capaz de fosforilar a Rb de *Zea mays* y que la actividad de este complejo es mayor en la transición G1 / S, decayendo hacia G2 (Boniotti et al., 2001).

En cultivos celulares BY-2 de tabaco, se ha demostrado que los niveles de tanto el transcrito como la proteína de la Cdk-A se mantienen constantes, pero la actividad de cinasa sobre histona H1 aumenta hacia el final de G1 y tiene su pico en la transición G1/S, decayendo hacia M. Esto es consistente con que la CDK-A se une a una ciclina D para ejercer su actividad en la transición G1-S y que la proteína reguladora es la ciclina D (Sorrell et al., 2001). Las ciclinas D además de la unión que presentan con Cdk-A y Rb, se pueden unir a los inhibidores ICKs. Wang et al. (1998) encontró un complejo formado por ciclina D3 / Cdk-A / ICK1, el cual no presentaba actividad de cinasa, debido a la presencia de ICK1.

La sobreexpresión de la ciclina D2 induce un acortamiento de la fase G1 y un incremento de la división celular (Cockcroft et al., 2000), en tanto que la sobreexpresión de la ciclina D3.1 provoca endoreduplicación y también división celular (Schnittger et al., 2002). También se ha observado en *Arabidopsis* que la sobreexpresión de la ciclina D3.1 causa alteraciones en el desarrollo (Dewitte et al., 2003).

Zhou demostró que la coexpresión de la ciclina D3.1 y la ICK1 puede modificar el crecimiento y la arquitectura de la planta (Zhou et al., 2003).

1.5.1 INFLUENCIA DE LAS FITOHORMONAS SOBRE LA CICLINA D

Las ciclinas D son reguladas por nutrientes como la sacarosa, o bien por hormonas como las citocininas (mitógenos) y auxinas, entre otras. Es por esto que se les ha asignado el papel de reguladoras y receptoras del medio exterior (Meijer et al., 2000).

Las citocininas son hormonas mitogénicas que son capaces de promover y regular la división celular a través de activar la transcripción de las ciclinas D. Esto se demostró en cultivos celulares de *Arabidopsis*, al agregar extracelularmente citocininas y observar que el transcrito de ciclina D3 se incrementa, pero sólo en presencia de sacarosa (Riou-Khamlichi et al., 1999). En tejidos de hojas de plantas transgénicas que expresan constitutivamente a la ciclina D3, se observó la generación de callos donde no era necesaria la presencia de citocininas- Esto sugiere que la división celular es activada por la inducción de citocininas sobre la ciclina D3 (Riou-Khamlichi et al., 1999).

El ácido abscísico (ABA) es una hormona que se presenta en condiciones de estrés e inhibe el ciclo celular. Se ha comprobado que el ácido abscísico induce la transcripción de las ICKs inhibiendo de esta forma el ciclo celular (Wang et al., 1998). ABA previene la replicación del DNA, ya que mantiene a las células en la fase G1. En células sincronizadas BY-2 se observó que ABA detiene a las células en G1 si se administra en G1, pero si es administrada posteriormente, no tiene efecto en el ciclo celular (Swiatek et al. 2002).

II. ANTECEDENTES

En la etapa final de la formación de semilla el 80% de las células se encuentran en la fase G1 (Daltour y Jacquard, 1974). Al inicio de la germinación, las células se encuentran en una fase semejante a G0 y eventualmente entran a la fase G1, la cual puede tener una duración variable y, eventualmente, ocurre la síntesis de DNA de tipo replicativo, marcando el inicio de la fase S (Baiza et al., 1989).

Es de nuestro interés estudiar las fases G1 y S del ciclo celular durante la germinación, ya que es en estas fases donde ocurre un control más metódico en el avance del ciclo celular. Se ha observado que la fase G1 es una de las más largas, ya que la célula debe estar completamente segura que tiene todo lo necesario para sobrevivir y poder duplicarse. Es aquí donde ocurren una serie de mecanismos de verificación, después de los cuales la célula se ve obligada a replicar el DNA.

En horas tempranas de la germinación de maíz, se ha encontrado a un complejo ternario formado por ciclina D / Cdk-A y PCNA (Sánchez et al., 2002). Se propone que PCNA es una proteína que sirve como plataforma de muchas proteínas dentro de las cuales está el complejo de ciclina D/ Cdk-A (Xiong et al., 1992). De esta forma el complejo de ciclina/cinasa podría estabilizarse y actuar sobre proteínas blanco que se encuentran en la cromatina, como por ejemplo RB (Vázquez-Ramos, comunicación personal).

En nuestro grupo de trabajo, se estudió a PCNA de maíz y se determinó que existen dos genes (López et al., 1997). El cDNA de uno de estos genes ha sido sobreexpresado en bacterias y la proteína recombinante se usó para obtener anticuerpos.

Utilizando anticuerpos homólogos a PCNA de maíz se observó que esta proteína aumenta gradualmente y llega a un máximo entre las 15 y 20 horas de germinación. La Cdk-A fue detectada con un anticuerpo anti-PSTAIRE, secuencia de aminoácidos que sirve de unión con la ciclina D. De hecho, este anticuerpo reconoció dos proteínas de 36 y de 32 kDa. La proteína de mayor peso va

aumentando conforme la germinación avanza; en cambio, la proteína de menor peso llega a su máximo a las 6 horas y posteriormente desaparece (Sánchez et al., 2002)

Por otra parte, la putativa ciclina D, detectada con un anticuerpo heterólogo, está presente desde las primeras horas de la germinación y alcanza el máximo de acumulación a las 6 horas, después de las cuales disminuye para no ser detectable a las 24 horas. La proteína inmunodetectada con el anticuerpo heterólogo tiene un peso aproximado de 52 kDa (Herrera et al., 2000).

El complejo ternario formado por PCNA, Cdk-A y la ciclina D se caracterizó durante la germinación de maíz, por inmunoprecipitación con el anticuerpo homólogo contra PCNA. La actividad de cinasa asociada a este complejo muestra la mayor actividad a las 6 horas, disminuyendo gradualmente hasta que totalmente se pierde hacia las 24 horas de germinación (Sánchez et al, 2002), lo que coincide con la presencia de la Cdk-A de 32 kDa.

En presencia de citocininas, la germinación se acelera y se observa que la putativa ciclina D desaparece más rápido y existe un adelanto del inicio de la replicación del DNA. La actividad de cinasa asociada al complejo ternario de PCNA / Cdk-A / Ciclina D se observa hasta antes del inicio de la replicación y esto probablemente se debe a la pronta desaparición de la ciclina D.

En el caso de la germinación en presencia de ABA, se observó una detención del ciclo celular en la fase G1. Evidentemente no se observó replicación del DNA y la degradación de la ciclina D se retrasó, lo que ocasionó que la actividad de cinasa asociada a PCNA se mantuviera estable durante las primeras 24 horas (Sánchez et al., 2002; Sánchez et al., sometido).

Es de nuestro interés obtener los anticuerpos homólogos de las proteínas del complejo ternario formado por PCNA / ciclina D / Cdk-A para poder hacer un estudio más meticuloso de las interacciones que existen en el mismo. Finalmente, apareció en las bases de datos parte del genoma de maíz, encontrándose reportadas tres secuencias que codifican para ciclinas D. La identidad entre estas tres ciclinas de tipo D1, D2, y D4 es del 17.5%; entre las ciclinas D2 y D4 es del 43%, entre las ciclinas D1 y D2 es del 25% y entre D1 y D4 es del 28%.

III. HIPÓTESIS

La ciclinas D de maíz, como las ya caracterizadas en otras especies vegetales, son inducibles por condiciones que estimulan el ciclo celular y esta inducción ocurre en la fase G1, concurrente con la inducción del proceso germinativo.

IV. OBJETIVOS

- Obtener las secuencias parciales de ciclinas D de maíz.
- Determinar la expresión de los transcritos de las ciclinas D durante la germinación de maíz.
- Obtener las proteínas recombinantes de las ciclinas y sus correspondientes anticuerpos.
- Caracterización de los patrones de acumulación de las ciclinas D durante la germinación de maíz.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1) MATERIAL BIOLÓGICO:

Las semillas de maíz variedad chalqueño fueron obtenidas de un proveedor del Valle de Chalco, Edo. de México. De estas semillas se obtuvieron los ejes embrionarios y se guardaron a 4°C hasta su utilización.

2) IMBIBICION DE LOS EJES EMBRIONARIOS

Se desinfectan 15 ejes embrionarios en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 3 minutos. Se enjuagan con agua destilada estéril, poniéndose posteriormente en la caja petri, la cual contiene papel filtro Whatman #2 y se le añaden 750 μ L de la solución de imbibición en condiciones de esterilidad. Se germinan los ejes por 3, 6, 15 y 24 horas en presencia o ausencia de benziladenina (1 μ M) o ácido abscísico (20 μ M). En el caso del ácido abscísico la solución debe ser reemplazada cada 10 horas.

3) EXTRACCION DE RNA

Todo el proceso de extracción de RNA se realiza en condiciones de esterilidad y manteniendo siempre la muestra a 4°C. Se colocan los ejes embrionarios en un mortero, añadiéndoles 1 mL de Trizol y 10 μ L de DEPC concentrado. Se muelen los ejes embrionarios y se les agrega el N₂ líquido. Este homogeneizado se transfiere a un tubo "eppendorf" y se incuba por 2.5 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min. El sobrenadante es transferido a otro tubo "eppendorf" y se le adicionan 200 μ L de cloroformo. Las muestras se agitan vigorosamente y se centrifugan a 12,000 rpm por 15 min. La fase acuosa se transfiere a un tubo "eppendorf" limpio y el RNA es precipitado con 500 μ L de isopropanol, se incuba por 10 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min. Se elimina el sobrenadante por decantación y la pastilla contiene el RNA total. Para obtener un RNA de mejor calidad es recomendable lavarlo con 1 mL de etanol al 75% y agitar por inversión hasta resuspender la pastilla. Se centrifuga a 6,000 rpm por 5 min. Se elimina el etanol por decantación y se deja que se evapore totalmente. Finalmente se añaden 100 μ L de H₂O-DEPC y se almacena a -20°C.

4) REACCIÓN DE TRANSCRIPTASA REVERSA (RT)

Para un volumen final de reacción de 20 μ L, a 5 μ g de RNA se le añaden 1 μ L de oligo dT (500 μ g / mL), 1 μ L de 10 mM dNTPs, lo cual se calienta a 65°C por 5 min. Pasado este tiempo se pone en hielo y se le agrega 4 μ L del buffer de la primera cadena 5X y 2 μ L de 0.1M DTT. Esto se incuba a 42°C por 2 min y

finalmente se centrifuga para recuperar toda la mezcla y se le añade 1 μ L (200 U) de SuperScript II RT. La reacción se incuba por 50 min a 42°C, inactivándola a 70°C por 15 min. Esta reacción se realizó como indica el protocolo de la enzima "SuperScript™ I Rnase H⁻ Reverse Transcriptase" (Invitrogen).

5) AMPLIFICACIÓN DE cDNA POR LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción de PCR se realizó utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Ciclina D1 "Forward" 5' AAA GGA TCC GCG GCC TCC ACG TCC GCT CCC 3'
"Reverse" 5' AAA GCG GCC GCG ACG CAT CCG GAG CGC GC 3'

Ciclina D2 "Forward" 5'AAA GGA TCC ATG GTG CCG GGC TAT GAC TGC 3'
"Reverse" 5' AAA CCC GGG ATC GAT GGC GTC CTT CCT GAC 3'

Ubiquitina "Forward" 5' GTT CTC CGC CTC AGG GGA GGC 3'
"Reverse" 5' GCT TAA ATG AAC CAT GGC TTA 3'

Estos oligonucleótidos se diseñaron flanqueando el extremo amino terminal de las ciclinas y se añadieron las bases necesarias para el reconocimiento de enzimas de restricción.

A 200 ng de cDNA utilizados como molde se le agregó 0.1 μ M de cada uno de los oligonucleótidos, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1.5 mM de MgCl₂, amortiguador de PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.5 U de la Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron 35 ciclos a: 1 min a 94°C, 1 min a 65°C y 1 min a 72°C.

6) ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GEL DE AGAROSA

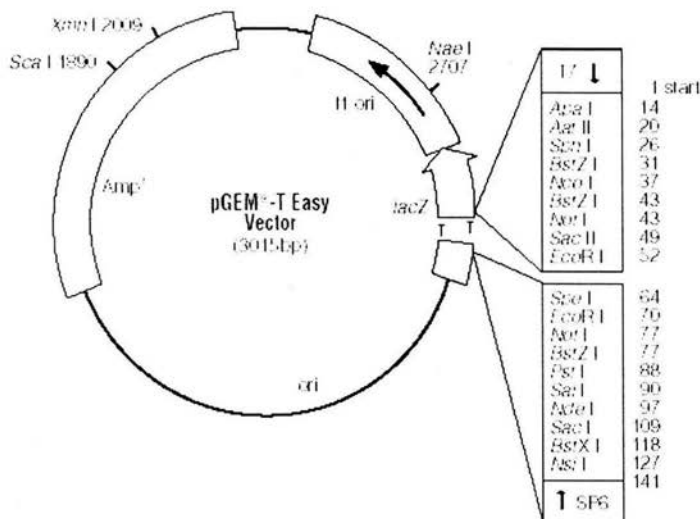
Los geles de agarosa fueron preparados al 1.5% (0.45 gramos de agarosa), TAE 1X (0.6 mL del stock 50X) en un volumen final de 30 mL (29.4 mL H₂O estéril). Se agrega bromuro de etidio para visualizar los ácidos nucleicos.

7) CLONACION EN EL VECTOR pGEM-T-EASY

Después que el cDNA de interés se reamplifica por PCR, se corre en un gel de agarosa y se corta la banda correspondiente al cDNA. Esta se purifica utilizando el kit de extracción de gel (Rapid Gel Extraction System, Marligen Biosciences), como se indica en el protocolo del kit. Se toman 50 ng del cDNA purificado y se liga en el vector pGEM T-easy (Promega) dejándose toda la noche a 4°C.

La transformación se hace en bacterias competentes DH5 α dejándolas en contacto con el producto de la reacción de ligación por 30 min a 4°C, después se incuban por 40 seg a 42°C y finalmente 2 min a 4°C. Se les agrega 1 mL de medio LB y se incuba a 37°C por una hora. Se centrifuga por 3 min a 2000 rpm y a la pastilla se le agregan 200 μ L de LB para resuspender las bacterias y sembrarlas en placa, la cual contiene ampicilina, X-Gal e IPTG.

A continuación se muestra el vector pGEM T-easy:



Este vector permite seleccionar las clonas que contienen el cDNA de interés, debido a que las bacterias transformadas crecen en un medio selectivo con ampicilina, ya que el plásmido le da a la bacteria resistencia a este antibiótico.

Por otra parte, el plásmido contiene el extremo amino de la β -galactosidasa (gen lac Z) y se utiliza en células hospederas que contienen una región que codifica el extremo carboxilo de la β -galactosidasa; de esta forma se obtiene la α -complementación logrando que la enzima se vuelva activa. Dentro de la secuencia que codifica a la región amino de la enzima se encuentra el sitio múltiple de clonación, por lo que al insertar un cDNA en esta región, la enzima será inactiva y las clonas positivas pueden ser seleccionadas debido a que presentan un color blanco. Aquellas colonias que presentan una coloración azul no contienen el inserto, ya que no se interrumpió el gen lac Z y la β -galactosidasa producida puede hidrolizar al análogo de la lactosa, X-gal, que al precipitarse da una coloración azul. Esto se lleva a cabo en presencia de IPTG, que induce la expresión del gen.

8) DIGESTIÓN DE PLASMIDO

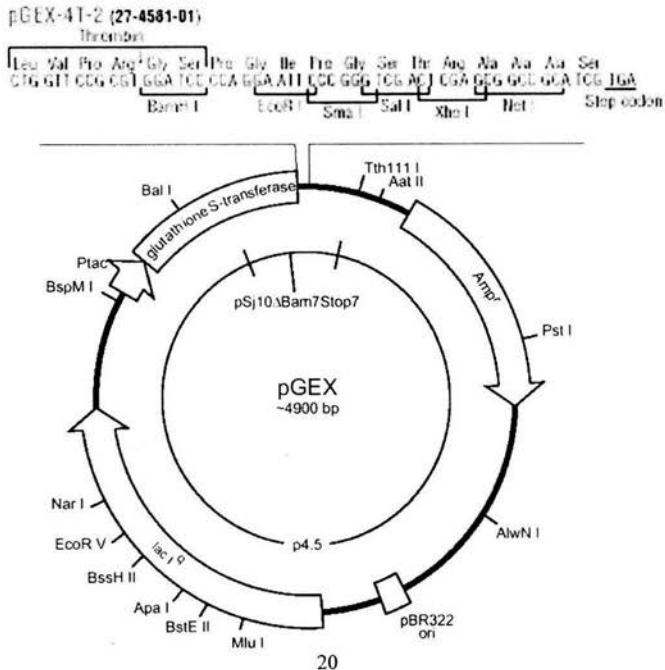
Las bacterias que contienen el plásmido se crecen durante toda la noche en 6 mL de medio LB y ampicilina (100 µg /µL). Se centrifuga todo el cultivo celular y para aislar plásmido se utiliza el Kit Wizard Plus Miniprep Promega siguiendo las indicaciones del protocolo.

Una vez purificado el plásmido se toma 1 µg y se añade el buffer correspondiente a cada enzima de digestión. Posteriormente, se añade 1 µL de la enzima (10 U / µL) y se incuba por 3 horas a 37°C.

La digestión con *EcoR1* permite liberar el inserto del vector pGEM. Por otra parte, los oligonucleótidos "forward" y "reverse" contenían secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *BamH1* y *SmaI* (respectivamente), que también permiten que el inserto se libere al llevarse a cabo la digestión con estas enzimas de restricción.

9) CLONACION EN EL VECTOR DE EXPRESION pGEX-4T2

Como se mencionó anteriormente, los oligonucleótidos contienen secuencias de reconocimiento para Bam H1 y Sma I, lo cual permite que la clonación que se lleva a cabo en el vector de expresión pGEX-4T2 se haga en el marco de lectura del mismo. La transformación del plásmido se hizo en bacterias BL21.



10) INDUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE Y PROTEOLISIS

Para sobreexpresar a la ciclina D2 recombinante de maíz, las células transformadas con el pGEX-4T2 conteniendo el inserto del cDNA de ciclina D2 se cultivaron en medio LB con ampicilina (100 µg / µL) en agitación constante durante toda la noche a 37°C. De este precultivo se tomó una alícuota y se transfirió a medio LB fresco con ampicilina y se dejó en incubación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 (595 nm). Posteriormente se añadió IPTG (1mM) para inducir la expresión del promotor lacZ, y se dejó por 4 horas. Se centrifugaron las bacterias; se les agregó PBS 1X con 1% de Tritón y se lisaron utilizando el sonicador.

El vector pGEX-4T2 facilita la purificación de la proteína de interés, ya que añade en el extremo amino a la proteína glutatión S-transferasa (GST). Esta proteína es capaz de unirse a la Glutatión Sefarosa 4B (Amersham Biosciences), permitiendo separar la proteína GST-ciclina D2 del resto de las proteínas de la bacteria.

El lisado se pasó por la glutatión-sefarosa incubándose por 2 horas. La sefarosa que tiene unida a la proteína recombinante se lava 3 veces con PBS 1X y se adiciona el buffer de elución, obteniendo a GST-ciclina D2.

En el caso de querer obtener sólo a la ciclina D2, se lleva a cabo un paso proteolítico. La proteína GST puede ser separada de la ciclina D2 utilizando la trombina, una enzima proteolítica. Después de que la sefarosa ha sido lavada 3 veces, se agrega PBS 1X en la relación 1:1 con la resina y se añade la trombina (50 µL / mL de resina). Se deja toda la noche a temperatura ambiente y en rotación. Se centrifuga y el sobrenadante corresponde a la ciclina D2.

11) ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Se toman 1.25 mL de la solución patrón de gel separador y se mezcla con persulfato de amonio 0.2%, acrilamida 14%, TEMED 0.1% y agua hasta completar un volumen de 10 mL. Esta solución se vierte en el molde y se deja polimerizar. Por otra parte, se prepara el gel apilador que contiene 750 µL de la solución patrón de gel apilador, acrilamida al 4%, persulfato de amonio 0.1%, TEMED 0.1% y agua hasta completar un volumen de 3 mL. Se vierte el gel apilador sobre el gel separador previamente polimerizado y se coloca el peine con los pozos requeridos. Al término de la polimerización, se coloca el gel en la cámara de electroforesis y se agregan 50 mL del amortiguador de electrodos más 600 mL de agua. La electroforesis se corre a 80 V por 20 min, se sube el voltaje a 120 V por 40 min y finalmente a 240 V por 40 min.

12) TINCIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA

Para la tinción de geles se utiliza la solución de azul de Coomassie (Coomassie G25 0.05%, HClO_4 5.18%), la cual se deja en contacto con el gel por 10 min. Posteriormente se enjuaga el gel con etanol al 50% y se deja destiñendo con agua hasta que se observen las bandas de interés.

13) OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS

Para obtener una mejor respuesta inmune, los antígenos se acoplan a hemocianina. La hemocianina (0.002g, 0.002%) se deja toda la noche a temperatura ambiente y en rotación con 10 μL de glutaraldehído, 190 μL de PBS 1X y agua hasta completar un volumen de 1 mL. Posteriormente, se elimina el exceso de glutaraldehído por centrifugación en tubos centrífuga corte 50. Se le agrega el antígeno (500 μg) y se deja acoplando por 12 horas a temperatura ambiente y en rotación. Después se hace una emulsión añadiendo a lo anterior el adyuvante completo o incompleto de Freund, lo cual se inyecta de forma subcutánea en la espalda del conejo. Este procedimiento se realiza cuatro veces, donde la primera y tercera inmunización se hacen con el adyuvante incompleto y la segunda y cuarta con el completo de Freund. Después de la tercera inmunización, se toma una muestra de prueba y se verifica el título que tienen los sueros. Si el título es bueno, después de la cuarta inmunización se hace la punción cardíaca. Los antígenos que se utilizaron fueron ciclina D2 para un conejo y para el otro GST-ciclina D2.

14) INMUNOPURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

Se prepara un gel para SDS-PAGE donde se corre un total de 1 mg de antígeno; se transfiere a una membrana de Immobilon y se tiñe con Rojo de Ponceau. Se corta solamente la banda correspondiente al antígeno. Se bloquea la membrana con solución de bloqueo (PBS 1X, leche en polvo 5%, Tween 20 1.2%) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se toma 1 mL de suero, se le agrega sulfato de amonio al 25%, lo cual permite que se eliminen otras inmunoglobulinas. Se centrifuga, se toma el sobrenadante, al cual se le añade sulfato de amonio al 30% para precipitar a las IgGs. Se resuspende el pellet en 1mL de PBS 1X, se dializa y se centrifuga hasta obtener un volumen final de 500 μL del anticuerpo.

15) WESTERN BLOT

Se hace un gel para SDS-PAGE con las muestras seleccionadas para transferirlas a una membrana Immobilon. La electrotransferencia se lleva a cabo poniendo sobre la parte inferior (ánodo) 6 papeles Whatman 3MM del tamaño del gel, después se pone la membrana Immobilon (hidratada con metanol al 50%),

posteriormente el gel y finalmente 3 papeles Whatman 3MM. Todo esto se humedece previamente con la solución de transferencia. Se coloca el cátodo y se transfiere por una hora a 75V.

La membrana se incuba con la solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Se desecha esta solución y se agrega nueva solución de bloqueo con el primer anticuerpo (1:2000) y se deja por 3 horas a temperatura ambiente. En seguida se lava la membrana con PBS 1X, 3 veces por 10 minutos.

Se agrega nueva solución de bloqueo con el segundo anticuerpo (anti-conejo conjugado con peroxidasa alcalina), se incuba por una hora a temperatura ambiente. Se lava tres veces por 10 minutos con PBS 1X.

Para la identificación de las proteínas se utiliza el sistema de quimioluminiscencia (Amersham). Se incuba la membrana con el sustrato luminol por 2 minutos; después se coloca entre dos acetatos y en obscuridad se expone la película de rayos X sobre la membrana. El segundo anticuerpo es capaz de hidrolizar el sustrato y producir luminiscencia provocando que la película de rayos X se vea en el lugar donde hay reconocimiento y posteriormente sea visto al ser revelada la película

16) ENSAYO DE COMPETENCIA

El primer anticuerpo en una dilución 1:2000 se deja incubando por 1.5 horas con el antígeno (40 µg) y se completa un volumen de 100 µL con PBS 1X. Posteriormente se realiza un Western blot, utilizando esta mezcla como primer anticuerpo.

17) EXTRACCION DE PROTEINAS DE EXTRACTOS DE MAIZ

Se colocan 15 ejes embrionarios embebidos en un mortero a 4°C, se les agrega 1 mL de la solución de extracción y se homogenizan. Se ultracentrifugan por 30 min a 30,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf y se almacena a -70°C.

18) CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

Para la identificación de la ciclina D en extractos de maíz se parte de 25 µg de proteína total. La cuantificación de la misma se hace por el método de Bradford y para asegurarnos de que cada muestra tuviera la misma cantidad se corren geles de acrilamida, los cuales se tiñen por Coomassie y se observa que el cargado sea el mismo.

En el caso de la cuantificación de la proteína recombinante GST-ciclina D, se mide por espectrometría a una absorbancia de A280, donde 1 unidad de absorbancia equivale a 0.5 mg/mL de GST.

19) RT-PCR SEMICUANTITATIVO

La reacción de transcriptasa reversa (RT) se realiza como se ha descrito anteriormente a partir de 5 µg de RNA total utilizando oligo dT. En cuanto a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se establecieron las condiciones de amplificación tanto para la ciclina D2 como para ubiquitina. Con base en estos resultados el ensayo final se hizo con las siguientes condiciones: 27 ciclos a 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C. La concentración de oligonucleótidos para la ciclina D2 es de 0.1 µM y para ubiquitina de 0.05 µM. Se utilizan 3 µL (150 ng) de la reacción de RT para una reacción de 25 µL de PCR. La reamplificación de ambos genes se realiza en reacciones por separado.

20) MARCAJE DE LA Sonda POR "RANDOM PRIMER"

Se utilizó el Kit comercial de Invitrogen y se siguió el protocolo del mismo. Se desnaturalizan 25 ng del DNA que servirá como sonda, disueltos en 20 µL por 5 min a 95°C y se ponen en hielo. Se adicionan 2 µL de los dNTPs (dATP, dGTP, dTTP), 15 µL del buffer de "random primer" y agua hasta completar un volumen final de 44 µL. En el área de radioactividad se agregan 5 µL de [α -³²P] dCTP (50µCi) y 1 µL del fragmento Klenow. Se incuba por 1 hora a 25°C. Se adicionan 5 µL del buffer para detener la reacción.

Para purificar la sonda a un tubo "eppendorf" de 500 µL se le hace un pequeño orificio en el fondo; se rellena con fibra sintética y se le añade 400 µL de Sephadex G-25 y se centrifuga para que se compacte. Este tubo se introduce en un "eppendorf" de 1.5 mL y se añade la reacción de "random primer" al tubo pequeño. Se centrifuga y lo que se recupera en el tubo grande corresponde a la sonda marcada.

21) HIBRIDACIÓN

Se realiza una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% y se corre a 100 V. El gel se trata con HCl 0.2N por 10 min, NaCl 1.5M / NaOH 0.5 M por 10 min, NaCl 1.5 M /Tris 1M por 10 min y SSC 20X 10 min.

El gel es transferido poniéndolo sobre dos tiras de papel Whatman 3MM, que se encuentran en contacto con la solución SSC 20X y que están arriba de una caja petri. Se recorta una membrana de Hybond N+ del tamaño del gel y se coloca encima del mismo, previamente hidratada con agua. Se colocan 3 papeles Whatman del tamaño del gel seguido de gran cantidad de papel periódico de las dimensiones del gel y finalmente se pone peso. Este dispositivo se encuentra en un recipiente que contiene la solución SSC 20X y es cubierto por un plástico para que no se evapore la solución y permita que la transferencia se lleve a cabo por capilaridad. Esto se deja por 18 horas.

Transcurrido el tiempo, la membrana se enjuaga con agua y se deja secar. Se fijan los ácidos nucleicos con luz UV en el aparato UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HS1 aplicando dos ciclos de "Optimal crosslink".

La membrana se pone a prehibridar por 2 horas a 60°C con 15 mL de la solución de hibridación. Se tira esta solución y se agrega nueva solución añadiendo aquí la sonda radiactiva. Se deja hibridando por 15 horas a 60°C.

Para evitar inespecificidades se hacen los siguientes lavados:

- a) 15 mL de una solución de SSC 2X, SDS 0.1% por 15 min a 60°C.
- b) Dos lavados con 15 mL de una solución de SSC 0.1X, SDS 0.1% por 15 min a 60°C

La membrana se coloca entre dos acetatos y se deja exponiendo por 2 horas en el Exposure Cassette-K y se digitaliza la imagen por el aparato Phosphoimager (Biorad).

La membrana se deja exponiendo en película de rayos X por 15 días y se revela.

22) BACTERIAS COMPETENTES

Se inocula una colonia de *E. coli* en 10 mL de LB contenido en un matraz de 50 mL. Se incuba durante toda la noche en agitación a 250 rpm a 37 °C. Se toman 4 mL del precultivo y se añaden a 200 mL de medio LB en un matraz de 1L. Se dejan crecer a 250 rpm a 37 °C hasta alcanzar una D.O. de 0.375 a 590 nm. Posteriormente, se vacía el cultivo en 4 tubos de polipropileno de 250 mL estériles y se dejan en hielo de 5 a 10 minutos. Se centrifuga a 3000 rpm durante 7 min a 4°C. Se resuspende cuidadosamente cada botón celular en 10 mL de solución de CaCl₂ 60 mM fría. Se centrifuga a 3000 rpm por 5 min a 4 °C. Se vuelve a resuspender cada botón celular en 10 mL de solución de CaCl₂ fría. Las células resuspendidas se mantienen en hielo por 30 min. Se juntan todas las células y se centrifugan a 3000 rpm por 7 min a 4 °C. Por último se resuspende el botón celular en 2.5 mL de la solución de CaCl₂ fría y se divide en alícuotas de 100 µL. Las células se guardan a -70 °C hasta su uso.

VI. RESULTADOS

El complejo ternario de PCNA / Cdk-A y ciclina D, el cual tiene actividad de cinasa en las primeras horas de germinación de maíz, fue caracterizado en nuestro laboratorio (Sánchez et al., 2002). En ese estudio el anticuerpo que se utilizó para identificar a la ciclina D unida a PCNA es heterólogo, por lo que se decidió clonar cDNAs codificantes de ciclinas D para poder sobreexpresar la(s) correspondientes proteínas y posteriormente obtener anticuerpos homólogos. La estrategia que se siguió para lograr este objetivo fue, primeramente, tratar de purificar a la ciclina D por medio de una columna de afinidad de PCNA, por la cual se pasaban extractos proteicos de maíz, cuyas proteínas con afinidad por PCNA eran eluidas a diferentes concentraciones de NaCl. Posteriormente, se identificaba a la ciclina D por medio del anticuerpo heterólogo. Una ciclina D putativa fue identificada y microsecuenciada, pero desafortunadamente la proteína purificada estaba bloqueada por el extremo amino terminal, por lo que no se pudo determinar si realmente era una ciclina. Muchas otras proteínas purificadas por este método que se intentaron microsecuenciar estaban también bloqueadas en el extremo amino terminal y sólo una de un peso aproximado de 35 kDa pudo ser microsecuenciada. La secuencia obtenida fue DINGGGATLPQQAY. A partir de esta secuencia de aminoácidos se diseñó un oligonucleótido degenerado que abarcaba a los primeros 6 aminoácidos y este oligonucleótido fue el "forward" 5'. Como oligo "reverse" 3' se utilizó oligo dT. Se reamplificó un cDNA de 1500 pb, el cual se clonó en el vector pGEM y se secuenció, dando como resultado la secuencia para una proteína hipotética de *Xylella fastidiosa*, la cual es una bacteria fitopatógena Gram negativa, que se encuentra en el xilema de las plantas.

Por otra parte, se realizó una comparación de las diferentes ciclinas D reportadas para plantas hasta ese momento y se observó que la parte central era la más conservada. Esta región corresponde a la caja de ciclinas, común a todas las proteínas de la familia, la cual está formada por 100 aminoácidos y es donde las CDKs se unen a las ciclinas. Se diseñaron oligonucleótidos degenerados que flanqueaban a esta región y se trató de reamplificar los cDNAs de las ciclinas de

maíz. En esta ocasión, aunque se obtuvieron varios cDNAs, sus secuencias no correspondían al de ciclinas tipo D; los cDNAs codificaban con una alta similitud a una histidil tRNA sintetasa de *T. aestivum*, una histidina descarboxilasa de *B. napus* y una RNasa H putativa de *A. thaliana*.

Como ya se estableció en la introducción, las ciclinas D contienen una estructura primaria conservada en donde, en la región amino terminal, se encuentra una secuencia formada por los aminoácidos LXCXE, la cual es un dominio de unión con la proteína de retinoblastoma. En la región central se localiza la caja de ciclinas, anteriormente mencionada, donde las CDKs se unen a las ciclinas y en el carboxilo terminal se encuentra una región denominada PEST, rica en dichos aminoácidos, que al ser fosforilada en la serina o treonina permiten la degradación de la proteína.

Uno de nuestros objetivos era obtener anticuerpos que nos permitieran diferenciar a cada una de las ciclinas, debido a la alta identidad que presentan. Teniendo en mente que estas proteínas contienen regiones altamente conservadas, se observó que es en el extremo amino terminal de cada proteína donde más difieren, por lo que se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan dicha región (forward y reverse). El porcentaje de identidad en esta región entre las ciclinas D2 y D4 es de 34%; en cambio, la ciclina D1 no muestra una identidad significativa al compararse con las otras dos proteínas.

A continuación se muestra la comparación de la región de interés y los sitios que sirvieron de base para diseñar los oligonucleótidos.

	1		70
Cyc D 1	(1)	MGDA AASTSAE TTPTSILICLEDGSDLLADADD-----GAGTDLVVARDERLLVVDQ	
Cyc D 2	(1)	----- AVFGYDC AAASVLLCAEDNAAILGLDDGGESSWAAAAATPPRDTVAAAAATGVAVDGILTEFPLL	
Cyc D 4	(1)	-----MAPSCYDAAASMLLCAEEHSSILWYDEE-EEE-----LEAVGRRR--GRSP-GYGDGADLFPPQ	
Consensus	(1)	A SAYD AASILLCAED SAILA DDD EE R GAA GVA D LFP Q	
		FORWARD	
	71		140
Cyc D 1	(53)	DEEYVALLSKE-SASGGGPVEEMED----WMKA ARSCCV RWIIKTTAMFRFGKTAYVAVNYLDRFL	
Cyc D 2	(65)	SDDCVATLVEKEVEHMPAEGYLQKLQRRHGDLDLAA VRKDAVD WIWKVIEHYNFAPLTAVLVSVNYLDRFL	
Cyc D 4	(58)	SEECVAGLVERERDHPGPCYGDRLR---GGGGCLVRRREAVDWIWKAYTHHRFRPLTAYLAVNYLDRFL	
Consensus	(71)	SEECVA LVEKE DHMPG GYLDKL G L AVRKDAVDWINK HHRFAPLTAYLAVNYLDRFL	
		REVERSE	

Los oligonucleótidos se diseñaron solamente para las ciclinas D1 y D2 y por medio de RT-PCRs se aislaron los cDNAs, partiendo de RNA total de 6 horas de germinación de ejes embrionarios de maíz (fig. 1).

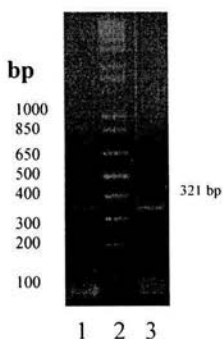


Fig.1 Amplificación del cDNA de la ciclina D2 de maíz por PCR. Condiciones: 35 ciclos a 68°C. Carriles 1 y 3, productos de PCR a partir de RNA de 6 horas de germinación.

El cDNA esperado para la ciclina D2 era de 321 pb, que corresponden a la región 5' codificante del extremo amino terminal y un cDNA de ese tamaño puede observarse en la figura 1 en los carriles 1 y 3. Con respecto a la ciclina D1, el producto de PCR que se obtuvo fue de 252 pb correspondiente al tamaño del cDNA esperado (figura no mostrada).

Estos cDNAs se clonaron en el vector pGEM y se seleccionaron colonias de color blanco (ver materiales y métodos) para comprobar que el inserto se encontraba clonado en el vector y que correspondía al tamaño indicado para cada cDNA. En la figura 2 carril 5, se muestra la digestión del plásmido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sma*I, liberando un inserto con un tamaño de 321 pb que correspondería al cDNA para la ciclina D2 y el vector pGEM con un tamaño de alrededor de 3000 pb. Esto mismo se realizó para el inserto de la ciclina D1 putativa, obteniéndose un cDNA de 252 pb. Estos cDNAs se secuenciaron para verificar que efectivamente correspondían a las ciclinas D1 y D2 de maíz. La secuenciación obtenida del fragmento de la ciclina D1 resultó ser un factor de elongación y no se trabajó más con este.

En cuanto a la ciclina D2, se obtuvo una secuencia virtualmente idéntica a la reportada, con sólo los siguientes cambios de bases: G160T, C204T y C297T. Con la certeza de tener un fragmento de la ciclina D2 de maíz, el cDNA se clonó en el vector de expresión pGEX4T-2.

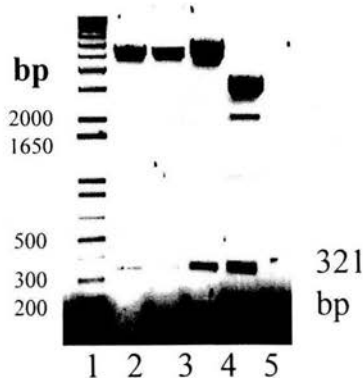


Fig. 2. Digestión de clonas recombinantes portadoras del cDNA de ciclina D2. Carriles 2,3,4 digestión del vector pGEX4T-2 con *Bam*HI y *Sma*I; carril 5 digestión del vector pGEM con *Bam*HI y *Sma*I.

Los carriles 2, 3 y 4 de la figura 2 muestran la digestión del plásmido pGEX4T-2 por medio de las enzimas de restricción *BamHI* y *SmaI*. En estos carriles se observa la banda de 321 pb correspondiente a la ciclina D2 y otra banda alrededor de 5000 pb que corresponde al tamaño del vector pGEX4T-2.

Se intentó clonar toda la región codificante de la ciclina D2 (1077pb), pero no se tuvo éxito.

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEINA RECOMBINANTE

El fragmento de la ciclina D2, clonado en el vector de expresión pGEX4T-2, fue secuenciado para comprobar que la secuencia se encontrara en marco de lectura. Esta secuencia en efecto se encontraba en marco de lectura y los cambios de bases que se mencionaron anteriormente no producen cambio en la codificación de los aminoácidos y sólo el cambio de nucleótido de G160T da como resultado Val54Phe.

Los péptidos que se expresan utilizando este vector están fusionados al extremo carboxilo de la glutatión S-transferasa (GST), que por sí sola tiene un corrimiento de alrededor de 26 kDa. Esta proteína de fusión nos permite purificar a la proteína recombinante, ya que se hace pasar el extracto proteico de la bacteria transformada, donde se sobreexpresó la proteína recombinante, por una columna de Glutatión Sefarosa 4B a la que se unirá la GST. Posteriormente, la proteína fusionada se eluye utilizando un buffer que contiene glutatión reducido.

Para sobreexpresar la proteína recombinante es necesario añadir IPTG al cultivo celular y dejarlo en incubación a 37°C durante 4 horas. En la figura 3 se muestra la inducción de la proteína recombinante. El panel A representa el gel de acrilamida teñido con Coomassie y el B es un experimento tipo Western utilizando anticuerpos contra GST.

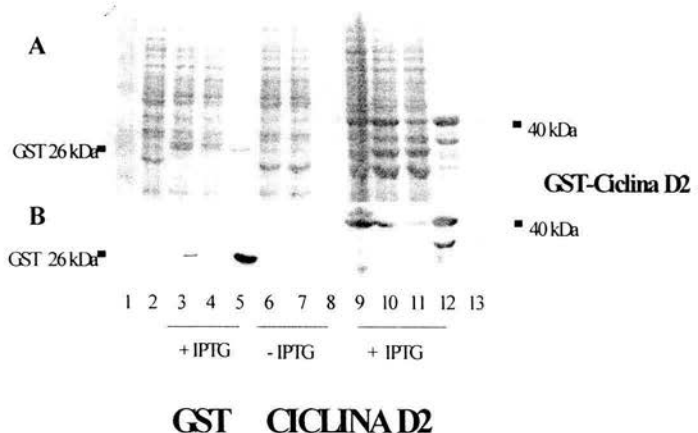


Figura 3. Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante GST-ciclina D2. A) Gel de acrilamida al 14% teñido con azul de Coomasie. B) Western blot α -GST. 1) Marcadores moleculares. 2) *E. coli* BL21 sin plásmido. 3) Sobrenadante de la lisis de bacterias sobreexpresando a GST inducida con IPTG. 4) Proteínas no unidas a la glutatión sefarosa de la sobreexpresión de GST inducida. 5) Fracción eluída de la sobreexpresión de GST inducida. 6) Sobrenadante de la lisis de bacterias sobreexpresando GST-ciclina D2 sin inducir. 7) Proteínas no unidas a la glutatión sefarosa de la sobreexpresión de GST-ciclina D2 no inducida. 8) Fracción eluída de la sobreexpresión de GST-ciclina D2 no inducida. 9) Pellet de la sobreexpresión de GST-ciclina D2 inducida por 4 horas con IPTG 10) Sobrenadante de la lisis de bacterias sobreexpresando GST-ciclina D2 inducida. 11) Proteínas no unidas a la glutatión sefarosa de la sobreexpresión de GST-ciclina D2 inducida. 12) Fracción eluída de la sobreexpresión de GST-ciclina D2 inducida. 13) Resina de sefarosa con GST-ciclina D2.

En el primer carril se muestran los marcadores de peso molecular y en el segundo, proteína de una cepa silvestre de *E. coli* BL21 sin el plásmido. En los carriles 3-5 se observa la inducción proteica de una clona que contiene el plásmido pGEX 4T2 sin inserto inducida durante 4 horas con IPTG. Del carril 6 al 8 se muestran los extractos proteicos de clonas conteniendo el inserto de la ciclina D2 sin inducir y del carril 9 al 12 inducidas con IPTG. Al observar la inducción del plásmido que no contiene a la ciclina D2, se reconoce en el Western blot a la proteína GST en el sobrenadante y en el eluato (panel B, carriles 3 y 5

respectivamente) con un peso molecular de 26 kDa. En el caso de la inducción de ciclina D2, se observa que cuando no se agregó IPTG, la proteína recombinante no se sobreexpresó (carriles 6-8); en cambio, en el panel B en los carriles 9 al 12 se observa la inducción de la proteína recombinante GST-Ciclina D2 en un peso de 40 kDa y es reconocida por el anticuerpo α -GST.

Una vez que se comprobó la inducción de la proteína, se purificó y separó la proteína recombinante ciclina D2 de la proteína de fusión GST utilizando la proteasa trombina. En la figura 4, panel A, se muestra un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie en donde se observan las fracciones de la purificación de la proteína recombinante GST- Ciclina D2. El carril 2 muestra la proteína del precipitado, el carril 3 la fracción soluble y en el 4 las proteínas no unidas a la resina glutatión sefarosa; en estos tres carriles observamos que una proteína de alrededor de 40 kDa está representada en mayor cantidad comparada con el resto de las proteínas. El carril 5 representa los lavados a la resina y la proteína GST- Ciclina D2 purificada se observa en el carril 6. En este último carril, la proteína recombinante se obtiene pura en un peso de 40 kDa; con esta proteína se realizó la proteólisis con trombina. En los carriles 7 y 10 se ven las bandas que corresponden a GST de 26 kDa y una banda de 16 kDa correspondiente a ciclina D2. En el carril 8 se muestra la resina que tiene unida a GST-Ciclina D2 y en el 9 la resina donde se llevó a cabo la proteólisis, por lo que se observan las bandas correspondientes a GST-Ciclina D2, GST y Ciclina D2. En el panel B de esta misma figura, se muestra un Western blot usando el anticuerpo dirigido contra GST, donde se observa el reconocimiento de las proteínas recombinantes GST- Ciclina D2 y GST, pero no así de la ciclina D2.

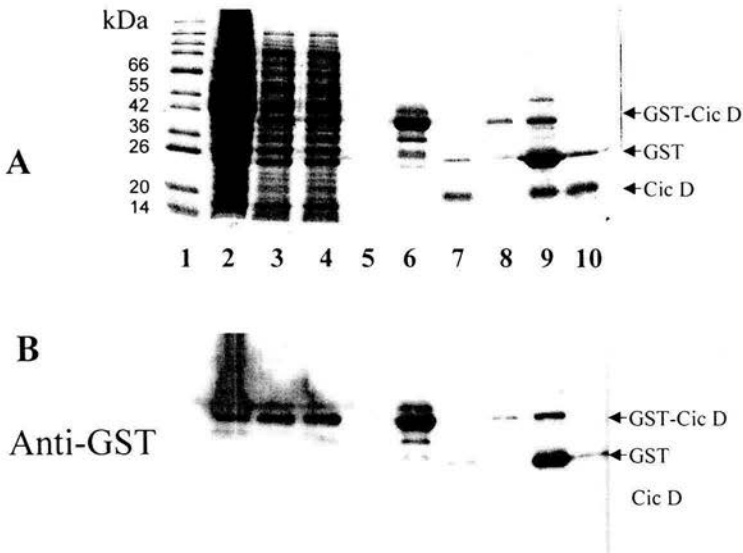


Figura 4. Purificación y proteólisis de la proteína recombinante GST-Ciclina D2. A) Gel de acrilamida al 14% teñido con azul de Coomassie. B) Western blot α -GST. 1) Marcadores de peso molecular. 2) Pellet. 3) Proteínas solubles. 4) Proteínas no unidas a la resina glutatión sefarosa. 5) Lavados. 6) GST-Ciclina D2. 7 y 10) GST y Ciclina D2. 8) Resina con GST-Ciclina D2. 9) Resina donde se hizo la proteólisis con tripsina.

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

Una vez que se obtuvo la proteína recombinante purificada, se prosiguió a la generación de anticuerpos contra la misma. Se inyectaron dos conejos con las siguientes proteínas:

- a) ciclina D2 procesada.
- b) GST- ciclina D2 recombinante.

Para cada inmunización se utilizaron cuando menos 500 μ g de la proteína y se hicieron cuatro de éstas. La proteína se acopló a hemocianina y se

homogenizó con adyuvante de Freund. Para la primera y tercera inmunizaciones se utilizó el adyuvante de Freund completo; para la segunda y cuarta inmunización el adyuvante incompleto de Freund.

Después de la tercera inmunización se tomó una muestra de sangre para analizar el título de los anticuerpos. El resultado de esta muestra fue óptimo y con base en esto se decidió sangrar a los conejos 4 días después de la cuarta inmunización. Se probaron varios títulos del anticuerpo: 1:500, 1:1000, 1:2500 y 1:5000. Donde se obtuvieron los mejores resultados fue alrededor del título de 1:3000 (fig. 5). También se realizó la inmunodetección utilizando el suero preinmune con un título 1:500.

Los anticuerpos reconocieron muy bien a la proteína recombinante ciclina D2, tanto la que se encuentra fusionada a GST (carriles 1, 4, 7, 10 y 13) como la proteolizada (carriles 2, 5, 8, 11 y 14). En extracto crudo de maíz de 3 horas de germinación (panel B carriles 3, 6, 9, 12 y 15), las proteínas que se logran identificar son de alrededor de 38 y 42 kDa en el caso del anticuerpo generado contra GST-ciclina D2; para el caso del anticuerpo contra ciclina D2 (panel A carriles 3, 6, 9, 12 y 15), sólo se observa una banda de 38 kDa. El peso de 38 kDa es el sugerido para la ciclina D2. El suero preinmune del conejo donde sólo se inyectó la ciclina D2 procesada (A) reconoce a una proteína que se encuentra en el peso de la proteína recombinante fusionada con GST, pero no a la proteína proteolizada. En cambio, el suero preinmune del conejo inyectado con GST-ciclina D2 (B) no reconoce a ninguna de las proteínas recombinantes. Ambos sueros preinmunes identifican otras proteínas en los extractos crudos de maíz (fig. 5).

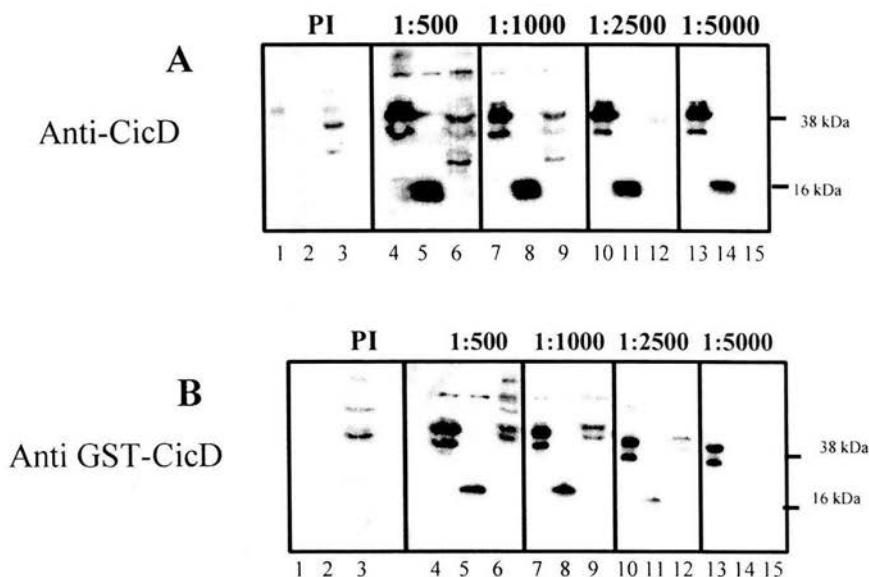


Figura 5. Título de anticuerpos contra la ciclina D2. PI= suero preinmune 1:500. Diferentes títulos para los anticuerpos 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000. A) Anticuerpo dirigido contra la ciclina D2 recombinante. B) Anticuerpo dirigido contra GST-Ciclina D2. Carriles 1, 4, 7, 10 y 13 proteína GST-ciclina D2 recombinante. Carriles 2, 5, 8, 11 y 14 proteína Ciclina D2. Carriles 3, 6, 9, 12 y 15 extracto de maíz germinado por 3 horas.

Para obtener una especificidad mayor fue necesario purificar los anticuerpos para que sólo reconocieron a la ciclina D2. Esto se realizó haciendo un gel SDS-PAGE y corriendo la muestra de la ciclina D2 pura. Posteriormente se transfirió a una membrana PVDF, se bloqueó y se incubó por toda la noche con el suero donde se encontraba el anticuerpo al igual que el preinmune. Se eliminó todo el suero no unido y el anticuerpo unido a la membrana se despegó con una solución de glicina pH=2 y después se neutralizó.

Teniendo el anticuerpo inmunopurificado era necesario realizar ensayos de competencia para tener la certeza que la proteína que se reconoce en maíz corresponde efectivamente a una ciclina D2. Se hicieron tres membranas idénticas donde los carriles 1, 4 y 7 contenían GST- ciclina D2; en los carriles 2, 5 y 8 se identifica a la ciclina D2 procesada y en los carriles 3, 6 y 9 se corrieron extractos crudos de maíz germinado por 3 horas. En la parte inferior de la figura 6, se muestra la tinción con azul de Coomassie del gel de acrilamida donde se observa que los extractos de maíz se hicieron por triplicado como control de cargado. En la parte superior de la figura 6 se muestra el tratamiento que se hizo a cada membrana. En el panel A se realizó una inmunodetección con el suero preinmune y no se observa reconocimiento alguno, como era de esperarse. En el panel B, se realizó el ensayo tipo Western utilizando el anticuerpo α -ciclina D2, el cual es capaz de reconocer a las proteínas recombinantes (40 kDa, carril 4 y 16 kDa, carril 5), así como a la proteína en maíz (38 kDa carril 6). Para el panel C, se incubó el anticuerpo α -ciclina D2 con la proteína recombinante procesada de ciclina D2 por 1.5 horas, posteriormente se añadió esto a la membrana y se realizó el ensayo tipo Western normalmente. Se observa que el reconocimiento de las proteínas recombinantes es menor al observado en el panel B (carriles 7 y 8) y que en maíz desaparecen las bandas (carril 9) que se reconocían en el panel B. Todo esto nos indicaba que la proteína recombinante que se preincubaba con el anticuerpo competía con la que estaba presente en la membrana.

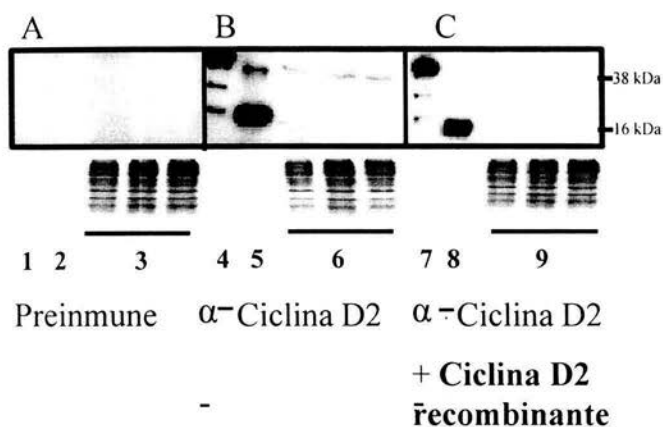


Figura 6. Ensayo de competencia. A) Western blot con suero preimmune. B) Western blot con el anticuerpo α -Ciclina D2. C) Western blot con el anticuerpo α -Ciclina D2 + Ciclina D2 recombinante. Carriles 1, 4 y 7 GST-Ciclina D2. Carriles 2, 5 y 8 ciclina D2. Carriles 3, 6 y 9 extracto crudo de maíz germinado por 3 horas.

Teniendo la certeza de que el anticuerpo sólo reconoce a una proteína en maíz y que se trata de la ciclina D2, se decidió analizar su comportamiento durante la germinación de maíz, para lo cual se obtuvieron extractos proteicos de diferentes horas de germinación de ejes embrionarios. En la figura 7, panel A, se presenta la inmunodetección de la ciclina D2 observándose un incremento en sus niveles hacia las 6 horas de germinación y una posterior disminución hacia las 24 horas. Como control de cargado se utilizó la inmunodetección de una ciclina B putativa y el cargado por tinción del gel con azul de Coomasie.

Se sabe que las ciclinas D son proteínas capaces de percibir condiciones del medio ambiente y se ha reportado que pueden ser reguladas por mitógenos. Por esto, se decidió ver el comportamiento de la ciclina D2 de maíz en presencia de una citocinina como es la benziladenina (BA). En el panel B, se observa que el comportamiento de la ciclina D2 en presencia de BA es similar al control, aunque

hubo un pequeño acúmulo de la proteína en 3 horas de germinación con respecto al control y que posteriormente los niveles decayeron hacia las 24 horas.

Por otra parte, se analizó a la ciclina D2 en presencia de ácido abscísico (ABA) y se observó el mismo patrón que en el control, pero presentando mayor cantidad de la proteína en 3 y 6 horas de germinación y hacia las 24 horas no se detectó la proteína.

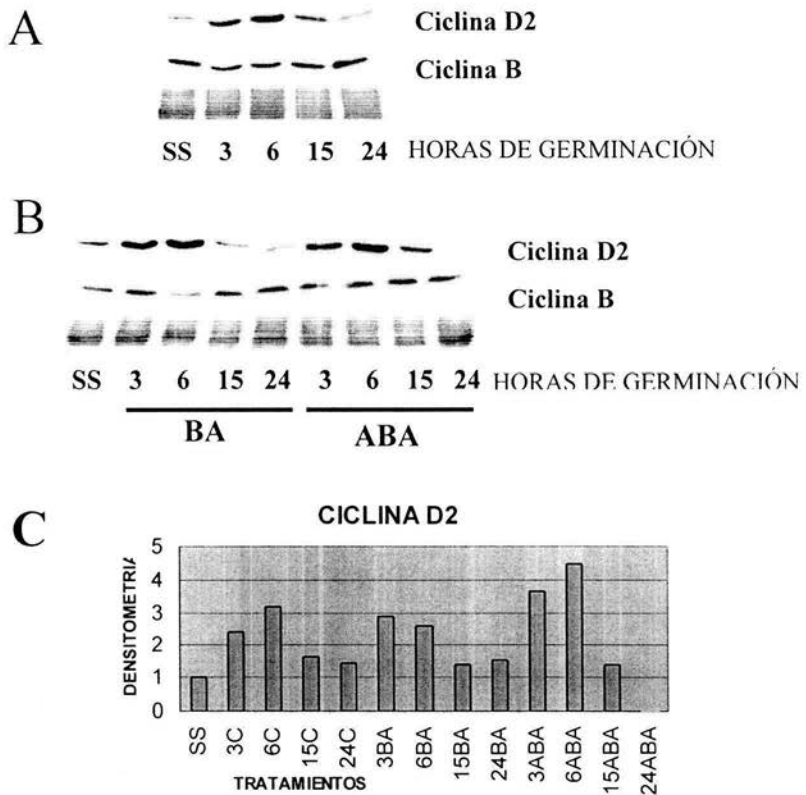


Figura 7. Inmunodetección de la ciclina D2 durante la germinación de maíz y el efecto de fitohormonas. A) Germinación control. B) Germinación con fitohormonas. BA= benziladenina, ABA= ácido abscísico. C) Gráfico de la densitometría. Los ejes embrionarios se embebieron en presencia / ausencia de fitohormonas por 3, 6, 15 y 24 horas. En todos los casos se muestra la inmunodetección de una ciclina B como control de cargado al igual que el gel teñido con azul de Coomassie.

Una vez conocido el patrón de expresión de la proteína ciclina D2 en ejes embrionarios, se determinó su presencia en diferentes tejidos (fig. 8). Se seleccionaron tejidos proliferativos como el meristemo radicular y la raíz total, donde el ciclo celular es muy activo y la presencia de la ciclina D2 sería indispensable. Por otra parte, también se analizaron tejidos diferenciados como son tallo y hoja, donde la división celular es menor comparado con los meristemas. Se observó que la ciclina D2 se encuentra presente en todos los tejidos que se analizaron, aunque no se determinó la abundancia de la proteína en cada tejido.

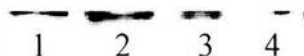


Figura 8. Inmunodetección de la ciclina D2 en diferentes tejidos.

1) Meristemo radicular. 2) Raíz total. 3) Tallo. 4) Hoja.

EXPRESIÓN DEL mRNA DE LA CICLINA D2

Conociendo el comportamiento de la proteína ciclina D2 durante la germinación de maíz en presencia o en ausencia de fitohormonas, se estudió también la expresión del transcrito, detectándose inicialmente por medio de experimentos tipo Northern. Desafortunadamente, los resultados no fueron muy alentadores, ya que el tamaño del transcrito de la ciclina D2 coincide con el tamaño del RNA ribosomal pequeño, por lo que no había la certeza de que la señal fuera la del mensajero, ya que pudiera deberse a una hibridación inespecífica. Se realizaron también otros experimentos del tipo Northern con fracciones de mRNA purificadas de para evitar la presencia de los ribosomales, pero la señal obtenida fue muy débil.

Otra forma de abordar el estudio de la expresión de un gen es por medio de RT-PCR semicuantitativo, para lo cual es necesario establecer las condiciones ideales en donde la cantidad del transcrito sea reamplificada linealmente sin llegar a la saturación de la reacción de PCR. Esta estrategia se probó con el mRNA de la ciclina D2.

A partir de 5 μ g de RNA total se realizó la reacción de RT con un volumen final de 20 μ L y de ahí se partió para montar las condiciones del número de ciclos y concentración de cDNA necesarios para reamplificar el transcrito por PCR. Se realizó una cinética a partir de 15 ciclos, aumentando 5 ciclos para cada reacción hasta completar 35 ciclos. De cada una de estas reacciones se cargaron 15 μ L y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de Hybond N+ y se hibridaron con la sonda de la ciclina D2 marcada radiactivamente. En la figura 9 se muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde a partir de los 30 ciclos y en 35 ciclos se observa la banda correspondiente a la ciclina D2. Sin embargo, en la autoradiografía se muestra que a partir de los 25 y hasta los 35 ciclos hay señal de la amplificación del mensajero. En base al gráfico que se obtuvo al hacer las densitometrías de estas figuras, se decidió trabajar con 27 ciclos, el cual se muestra en la parte lineal de la curva.

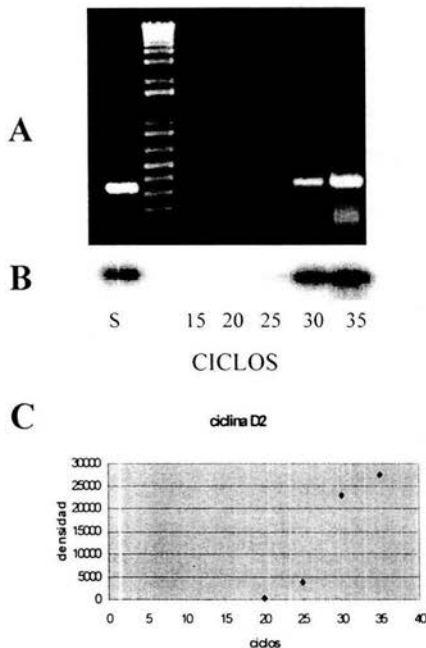


Figura 9. Número de ciclos necesarios para la amplificación del cDNA de la ciclina D2 por RT-PCR semicuantitativo. A) Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. B) Autoradiografía. C) Gráfico de la densitometría. Ciclos realizados en el PCR 15, 20, 25, 30, 35. S= sonda.

Una vez establecido el número de ciclos necesarios para reamplificar el transcrito, se necesitaba saber la cantidad de cDNA que se emplearía en cada reacción. A partir de la reacción de RT de 20 μ L totales, se tomaron 2 μ L, 3 μ L y 4 μ L (aproximadamente 100 ng, 150 ng y 200 ng respectivamente). En todas las reacciones hubo señal de la hibridación con el producto de reamplificación y conservaron una tendencia lineal (figura 10), por lo que se decidió trabajar con 3 μ L. La concentración de oligos específicos para reamplificar a la ciclina D2 se había establecido desde el principio del trabajo y se conservó la misma concentración, que fue de 0.1 μ M. Las condiciones elegidas para la reamplificación del transcrito fueron de 27 ciclos, tomando 3 μ L de la reacción de RT y una concentración de 0.1 μ M de oligos específicos.

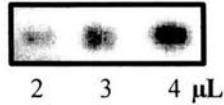
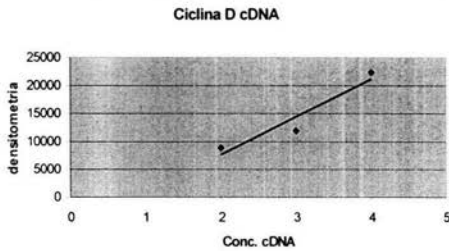
A**B**

Figura 10. Concentración necesaria de cDNA para la amplificación de la ciclina D2 por RT-PCR semicuantitativo. A) Autoradiografía. B) Gráfico de la densitometría. Microlitros del RT utilizados para cada reacción de PCR 2, 3 y 4 µL equivalentes a 100, 150 y 200ng de cDNA.

Por otra parte, se necesitaba conocer la expresión de un gen que fuera constitutivo durante la germinación de maíz, para que sirviera como control interno del experimento. En primera instancia se trató de aislar el gen de la actina 2 de maíz, cuyo mensajero había sido reportado como de permanencia estable, pero no se tuvo éxito en la clonación. Posteriormente, se encontró reportado que la expresión del gen de la ubiquitina de maíz era constitutivo, por lo que se clonó un fragmento de 476 pb del gen de ubiquitina. Su secuencia indicó que efectivamente se trataba del cDNA de la ubiquitina, por lo que se prosiguió a establecer las condiciones necesarias para el RT-PCR semicuantitativo. Al igual que para la ciclina D2, se establecieron el número de ciclos necesarios para la reamplificación del transcrito. En este caso, a partir de los 25 y hasta los 35 ciclos se observó el producto de PCR en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, y a partir de los 20 ciclos se detecta con una sonda radioactiva (figura 11). Teniendo en cuenta el resultado obtenido con la ciclina D2 y en base a estos resultados, se decidió trabajar a 27 ciclos, dado que en ambos casos se encontraba en la parte lineal de la reamplificación.

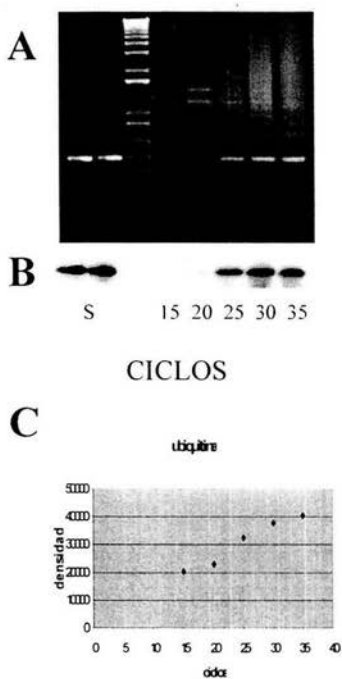


Figura 11. Número de ciclos necesarios para la amplificación del cDNA de la ubiquitina por RT-PCR semicuantitativo. A) Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. B) Autoradiografía. C) Gráfico de la densitometría. Ciclos realizados en el PCR 15, 20, 25, 30, 35. S= sonda.

Posteriormente se probó la concentración de oligos adecuada para este experimento. Las concentraciones que se probaron fueron 0.01, 0.03, 0.05 y 0.1 μM . En el gel de agarosa se ve el producto de la reamplificación a partir de una concentración de 0.05 μM y en 0.1 μM , pero en la autoradiografía se observa a partir de 0.03 μM y hasta 0.1 μM , conservando la linealidad (figura 12). Se eligió trabajar con una concentración de 0.05 μM .

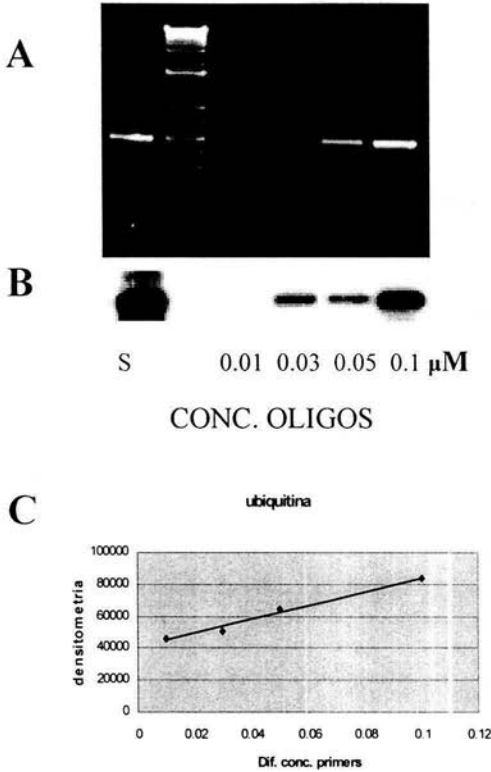


Figura 12. Concentración de oligonucleótidos necesaria para la amplificación del cDNA de la ubiquitina por RT-PCR semicuantitativo. A) Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. B) Autoradiografía. C) Gráfico de la densitometría. Concentración de oligonucleótidos de 0.01, 0.03, 0.05 y 0.1 μM . S= sonda.

Para conocer la concentración necesaria de cDNA para reamplificar el transcrito de la ubiquitina, se utilizaron las mismas concentraciones que para la ciclina D2 y en estos experimentos la linealidad se conservó, por lo que teniendo en cuenta los resultados de ciclina D2 y los mostrados en la figura 13 se escogió trabajar con $3 \mu\text{L} = 150\text{ng}$ de cDNA.

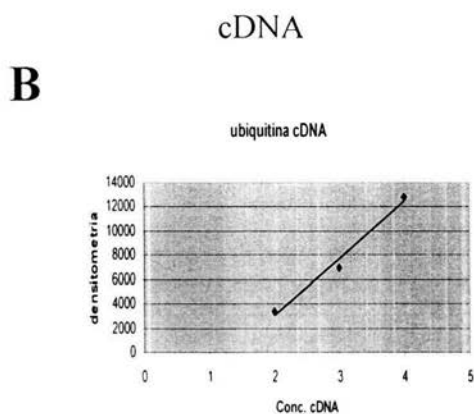
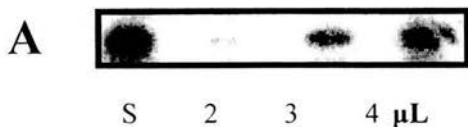


Figura 13. Concentración necesaria de cDNA para la amplificación de la ubiquitina por RT-PCR semicuantitativo. A) Autoradiografía. B) Gráfico de la densitometría. Microlitros del RT utilizados para cada reacción de PCR 2, 3 v 4 μ L

Finalmente, teniendo todas las condiciones para cuantificar los transcritos de ciclina D2 y de ubiquitina se realizó el experimento para conocer la expresión del transcrito de ciclina D2 a diferentes horas de germinación y el efecto que tendrían las fitohormonas.

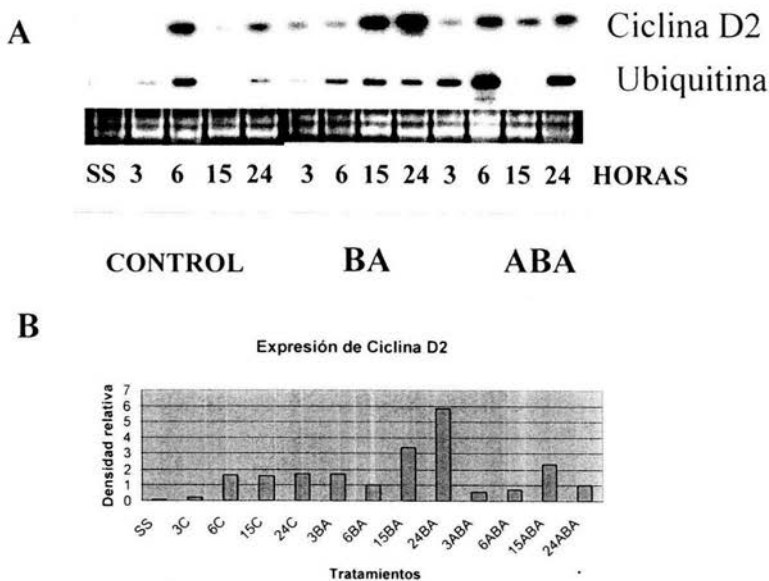


Figura 14. Expresión del transcrito de la ciclina D2 y de la ubiquitina durante la germinación y el efecto de fitohormonas. A) Autoradiografías de la Ciclina D2 y de la ubiquitina; RNA ribosomal como control de cargado. B) Gráfico de la densitometría de ciclina D2 vs el promedio de la ubiquitina y RNAr. Los ejes embrionarios fueron imbibidos por 3, 6, 15 y 24 horas en ausencia de hormonas= control o con hormonas BA= benziladenina, ABA= ácido abscísico. SS= semilla seca.

En la figura 14, panel A, se muestra que el transcrito de la ciclina D2 muestra una conducta fluctuante; no está presente en semilla seca y aumenta hasta las 6 horas de germinación, disminuye la cantidad a las 15 horas y se incrementa nuevamente hacia las 24 horas de la germinación control. Cuando los ejes embrionarios se tratan con benziladenina, se ve una clara inducción del transcrito hacia las 15 y 24 horas de germinación. En cambio, en presencia de ABA el mensajero tiene un comportamiento similar al control. Con respecto al transcrito de la ubiquitina, se observa que tiene notables fluctuaciones tanto en

control como con ejes tratados con ABA, no así a los tratados con BA, donde se mantiene relativamente estable. El gráfico que se presenta en el panel B es el promedio hecho entre la densitometría del transcrito de la ciclina D2 con respecto a la cantidad de RNA de ubiquitina. La tendencia de este gráfico muestra que en el control el mensaje se induce después de las 6 horas y permanece constante. Con respecto a BA, tiene una clara inducción a las 15 y 24 horas. Finalmente con ABA, permanece constante excepto en 15 horas que se ve un aumento.

Al ver que el transcrito de la ubiquitina presenta grandes fluctuaciones durante la germinación de maíz, se decidió hacer la densitometría sólo con respecto al RNAr como referencia(figura 15).

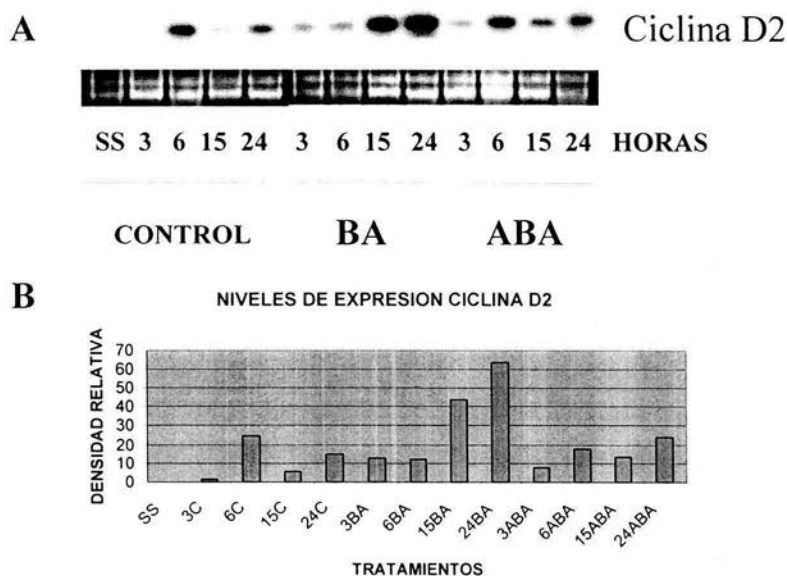


Figura 15. Expresión del transcrito de la ciclina D2 durante la germinación de maíz y el efecto de fitohormonas. A) Autoradiografía de la Ciclina D2; RNA ribosomal como control de cargado. B) Gráfico de la densitometría de ciclina D2 vs el RNAr. Los ejes embrionarios fueron imbibidos por 3, 6, 15 y 24 horas en ausencia de hormonas= control o con hormonas BA= benziladelina, ABA= ácido abscísico. SS= semilla seca.

En el gráfico de la figura 15, panel B, se observa como en el control, que el transcrito aumenta a las 6 horas de germinación y después decae. Este comportamiento se presenta también con ABA; por lo tanto, con BA se reitera la clara inducción del transcrito de las 15 horas en adelante.

VII. DISCUSIÓN

El complejo ternario formado por PCNA / Cdk-A / Ciclina D en maíz, el cual se había caracterizado mediante ensayos de inmunoprecipitación con ayuda del anticuerpo α - PCNA, se identificó también mediante ensayos de cinasa sobre Rb, utilizando las proteína unidas a una columna de afinidad de PCNA (Gutiérrez-Aguilar, 2001). Diversos estudios demuestran que PCNA es una proteína multifuncional que se puede unir a diferentes proteínas. Dentro de las proteínas que se lograron identificar se encuentran Cdk-A, por medio de un anticuerpo dirigido contra el dominio PSTAIRE y ciclina D con un anticuerpo heterólogo. Con el fin de obtener los cDNAs codificantes para estas proteínas se utilizó la microsecuenciación. Desafortunadamente, las proteínas aisladas se encontraban bloqueadas por el extremo amino, regulación postraducciona muy común en proteínas de plantas. La única microsecuenciación que fue posible correspondió a una proteína que no fue de interés para el trabajo que se realiza en el laboratorio sobre ciclo celular, por lo que se decidió cambiar de estrategia.

La siguiente estrategia fue la de comparar las secuencias reportadas de las ciclinas D de plantas y sintetizar oligonucleótidos flanqueando una región conservada, la caja de ciclinas, para amplificar cDNAs, los cuales sin embargo no correspondieron a las ciclinas D. Esto se pudo deber a que los oligonucleótidos utilizados eran degenerados, por lo que la especificidad disminuye provocando la amplificación de cDNAs no relacionados. Los problemas que se tuvieron anteriormente se pudieron solucionar al publicarse en las bases de datos las secuencias de 3 ciclinas D de maíz. Debido a la similitud que presentan dichas ciclinas se decidió trabajar solamente con las ciclinas D1 y D2.

No se obtuvieron resultados positivos al tratar de clonar la ciclina D1 de maíz, lo cual fue sorprendente, ya que los oligos diseñados eran específicos y no formaban enlaces intercatenarios. En cuanto a la ciclina D2, se obtuvo un fragmento de 321 pb, tamaño esperado para la reamplificación del extremo 5' codificante del amino terminal. Por debajo de la banda de 321 bp se observó otra banda de alrededor de 283 pb (fig. 1). La secuenciación de la banda de 321 pb

correspondía efectivamente a la ciclina D2, pero la de menor tamaño era también ciclina D2, aunque le faltaba un segmento. Analizando la secuencia faltante de esta última nos dimos cuenta que el cDNA de esta ciclina es muy rico en GC, lo cual probablemente inducía la formación de una horquilla interna originando un fragmento de menor tamaño.

Una vez que se hubo clonado el cDNA, expresado y purificado la proteína recombinante GST-ciclina D2, se separó a la GST de la ciclina D2 por medio de proteólisis con trombina. El polipéptido que se produjo correspondió únicamente a la ciclina D2; el peso esperado para este péptido era de 13 kDa, pero el corrimiento que se presentó fue de 16 kDa, lo cual pudo deberse a que la proteína no se desnaturalizaba totalmente y la conformación que adquiría permitía una menor migración en la electroforesis.

Las proteínas recombinantes GST-ciclina D2 y ciclina D2 se emplearon para inmunizar conejos y los anticuerpos que se obtuvieron se utilizaron a diferentes diluciones. De igual forma se probaron los sueros preinmunes, en los cuales observamos reconocimiento de proteínas en los extractos de maíz (fig. 5 carril 3). Esta inmunogenicidad al maíz presentada por los sueros preinmunes puede deberse a que la fórmula que se les da a los conejos para su alimentación contiene maíz, por lo que generan anticuerpos contra diferentes proteínas de maíz.

Se observó un buen reconocimiento para las proteínas recombinantes en todas las diluciones probadas para ambos anticuerpos; sin embargo, para los extractos de maíz el título de 1:2500 fue una buena dilución (fig. 5 A, B). La inmunodetección en extractos de maíz hecha por el anticuerpo anti-GST-ciclina D2 (carril 12 panel B) detectó una banda de 42 kDa, la cual es una banda inespecífica, pero la banda de 38 kDa es la banda correspondiente a la ciclina D2, la cual coincide con la detectada con el anticuerpo anti-ciclina D2 (carril 12 panel A).

Para tener la certeza de que esa banda se trataba de la ciclina D2 se realizó un ensayo de competencia, donde se muestra que las bandas que se reconocían en maíz (figura 6 panel B, carril 6), no se reconocen debido a que el

anticuerpo fue bloqueado con la proteína recombinante (carril 9); en cambio, en los carriles 7 y 8 se reconocen las proteínas recombinantes, ya que estas proteínas se encuentran en exceso y el reconocimiento de las mismas es más sensible. Esto nos sugiere que la proteína recombinante compitió y bloqueó al anticuerpo disponible en solución, impidiendo que se una a las proteínas presentes en la membrana.

El resultado de la inmunodetección de ciclina D2 durante diferentes horas de germinación (figura 7A) muestra el patrón de acumulación de esta proteína durante la fase G1 con un incremento notable a las 6 horas de imbibición, donde el 77% de las células tienen un contenido de DNA 2C (Sánchez et al., sometido). Posteriormente, esta proteína decae en la germinación tardía, hacia la fase G2, resultado que coincide con lo antes publicado por Boniotti (2001), donde observa el mismo comportamiento con la ciclina D2 de *Arabidopsis* en cultivos celulares. Esto nos sugiere que durante la germinación, las células meristemáticas se comportan de una forma relativamente sincronizada. Se había reportado que el complejo formado por la ciclina D2 y la Cdk-A1 tiene actividad de cinasa capaz de fosforilar a Rb (Boniotti et al., 2001). Todo esto nos sugiere que la ciclina D2 de maíz, al acumularse en las primeras horas de germinación, puede realizar su función principalmente en la fase G1, sin descartar que pudiera también participar durante la fase G2. Es posible que la actividad de cinasa sobre ZmRb que se observa en los inmunoprecipitados de PCNA (Sánchez et al., 2002), se deba a la presencia de la Cdk-A unida a la ciclina D2 en las primeras horas de germinación. Posteriormente, a pesar de que la ciclina D2 está presente en una menor proporción, el complejo se disocia y ya no es capaz de fosforilar a ZmRb.

Para conocer la expresión del gen de la ciclina D2 durante la germinación de maíz se realizó RT-PCR semicuantitativo, dado que fue difícil su seguimiento por ensayos tipo Northern, debido a la escasa abundancia del mensajero. Las condiciones que se buscaron tanto para el gen de la ciclina D2 como para un gen control (ubiquitina) para realizar estos experimentos fue trabajar siempre en la parte lineal de la reamplificación por PCR para no llegar a la saturación de la

reacción, lo cual podía ocultar el resultado real de la expresión del mensajero (figuras 9-13).

En cultivos celulares de *Arabidopsis* se observó que el mRNA de la ciclina D1 se expresa en muy bajos niveles y que la cantidad del mensajero de la ciclina D2 permanecía constante a lo largo del ciclo celular. Los niveles del transcrito de la ciclina D3 se incrementan hacia G1 / S y posteriormente se estabilizan (Fuerst et al., 1996), comportamiento que también presenta la ciclina D1 de mamíferos. En la figura 14B, observamos que el patrón antes descrito para la ciclina D3 de *Arabidopsis* se obtiene para la ciclina D2 de maíz.

Al igual que en mamíferos, en plantas se ha observado que las ciclinas son capaces de responder a factores de crecimiento como son las fitohormonas. Un estudio realizado en células en suspensión de *Arabidopsis* demostró que esta estimulación se debe a que las citocininas activan la expresión del gen de la ciclina D3 y adelantan la actividad de cinasa asociada en la fase G1 (Riou-Khamlichí et al., 1999). Nuestros resultados demuestran que al llevarse a cabo la germinación en presencia de benziladenina, existe un patrón similar al control, pero existe un pequeño aumento en la acumulación del transcrito de la ciclina D2 a 3 horas de la germinación (fase G1), comparado con el control (figura 7 B). Las citocininas provocan que la actividad de cinasa que presenta el complejo, inmunoprecipitado con anticuerpos α -PCNA se incremente en horas más tempranas que en el control, promoviendo la replicación del DNA (Sánchez et al., 2002). Esto nos sugiere que al haber una pequeña acumulación de la ciclina D2 a partir de las 3 horas de germinación, a pesar de no ser estadísticamente significativo, es posible que la célula sea capaz de percibirlo y pudiera provocar que el complejo de cinasa-ciclina se active y así hacer que la fase G1 se acorte, permitiendo a las células entrar a la fase S. Anteriormente se había observado que al sobreexpresar a la ciclina D2 en plantas transgénicas de tabaco, la fase G1 se acortaba y se incrementaba la división celular (Cockcroft et al., 2000).

La ciclina D parece tener una función importante como receptora final de las señales de transducción desde el exterior celular que promueven proliferación. Los transcritos de las ciclinas D2 y D4 de *Arabidopsis* pueden ser inducidos en

presencia de sacarosa y la inducción del transcrito de la ciclina D3 por citocininas necesita de la presencia de sacarosa (De Veylder et al., 1999; Riou-Khamlichi et al., 2000). Nuestros resultados demuestran una clara inducción de la expresión del gen de la ciclina D2 desde las 15 horas de tratamiento con citocinina (figura 14B y 15B). Ignoramos si en este caso la presencia de la sacarosa es importante, aunque sería un experimento interesante de realizar.

Por el contrario, el ABA inhibe la germinación por acción directa sobre el ciclo celular, ya que es capaz de inducir la expresión de ICK1, un inhibidor de la Cdk-A (Wang et al., 1998). Observamos que la proteína ciclina D2, en presencia de ABA, tiene un comportamiento muy similar al control, aunque presenta mayor cantidad de proteína en las horas tempranas de la germinación y desaparece totalmente hacia las 24 horas (figura 7 B). La citometría de flujo muestra como las células permanecen en la fase G1, pero la actividad de cinasa asociada a PCNA se encuentra activa hasta las 24 horas de germinación (Sánchez et al., sometido). Esto nos sugiere que la Cdk-A unida a PCNA cambia de ciclina hacia las etapas tardías de la germinación en presencia de ABA, ya que la ciclina D2 no se encuentra presente en estos tiempos.

No se tienen reportes de cómo afecta ABA a la expresión del gen de la ciclina D2 en otros sistemas vegetales. Nuestros resultados muestran que la expresión del gen de la ciclina D2 de maíz en presencia de ABA conserva una tendencia similar a la observada en el control, por lo que no existe un efecto hormonal en la regulación del transcrito.

En los últimos años se ha visto que existe una gran interacción entre el ciclo celular de plantas y el desarrollo de las mismas, ya que al modular el ciclo celular se ha logrado manipular la arquitectura y modificar el tamaño de las células de las plantas (Den Boer, 2000). Una de las proteínas que se cree que está implicada en el desarrollo de las plantas es la ciclina D, ya que se ha visto que se encuentra diferencialmente expresada en diferentes tejidos de *Antirrhinum*. Las ciclinas D2 y D3b se expresan en los meristemas y la ciclina D3a sólo en la región meristemática periférica (Guadin et al., 2000). Es por esto nuestro interés en

analizar el comportamiento de la ciclina D2 en los diferentes tejidos de la planta de maíz. Se observó que la ciclina D2 está presente, tanto en tejidos proliferativos (meristemo radicular, raíz total), como en tejidos diferenciados (tallo y hoja) (figura 8). Anteriormente, se había reportado que la sobreexpresión de la ciclina D2 y de CdkA1 en *Arabidopsis* no afectaba el patrón normal de la planta, pero al sobreexpresar a la ciclina D3, a E2F/DP y a ICKs se afectó la morfología de la planta (Meijer et al., 2001). Al no tener evidencia de que exista una ciclina D3 en maíz, es posible que la ciclina D2 pudiera estar presente en tejidos altamente diferenciados, ya que pudiera estar ejerciendo la función de modificadora de la estructura celular; por otra parte, está presente en tejidos proliferativos, participando en la mecánica de la división celular.

Finalmente, observamos que no existe una correlación entre la cantidad de transcrito y la proteína presente a diferentes horas de la germinación, con o sin fitohormonas. En el caso de los tratamientos control y con ABA, el comportamiento de la proteína, así como el del transcrito son similares entre ambos tratamientos. En ambos casos el transcrito es perceptible a las 3 horas y aumenta hacia las 6 horas, tiempo en que la proteína alcanza un pico; posteriormente, el transcrito disminuye y después aumenta; en cambio, la proteína disminuye o desaparece entre las 15 y 24 horas. Esto nos sugiere que debe haber control post-transcripcional ya que a pesar de los bajos niveles del transcrito, la proteína se encuentra bien representada en las primeras horas de germinación. Posteriormente, el control podría ser post-traducciona, ya que se observa como la proteína decae hasta desaparecer conforme avanza la germinación (control y ABA) aun en presencia del mensajero. Con respecto a BA, la acumulación de la proteína es similar al control, aunque a 3 horas de germinación se incrementa en muy poca cantidad y la acumulación del transcrito ocurre en las últimas horas. Los controles post-transcripcional y post-traducciona se han estudiado para las ciclinas D de mamíferos, involucrando la vía de AKT (Muise-Helmericks et al., 1998; Ramljak et al., 2000). La proteína AKT (proteína cinasa B) forma parte de la

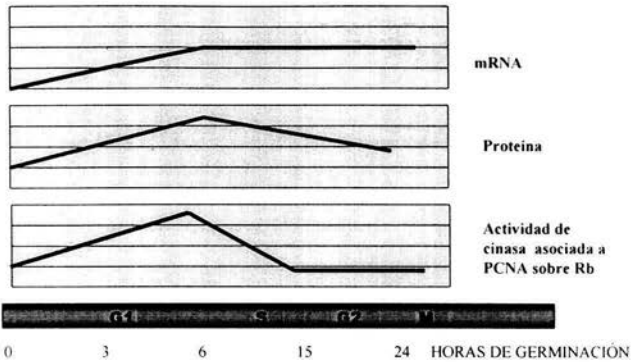
señalización del mecanismo anti-apoptótico promovido por la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) (Franke et al., 1997). Esta vía puede ser estimulada por suero, factores de crecimiento o citocinas. La PI3K activa por fosforilación a la AKT y ésta a su vez puede fosforilar a la glicógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β) inhibiendo su función. La GSK-3 β en su estado no fosforilado es capaz de fosforilar a la ciclina D1 en el residuo Thr-286, provocando su salida del núcleo hacia citoplasma y con esto su posterior degradación por medio del proteasoma (Diehl et al, 1998). Una regulación semejante podría ocurrir en plantas, y en particular en la germinación, aunque no existe aún evidencia de la existencia de estas proteínas.

Nuestros resultados, utilizando citocininas y ácido abscísico, demuestran que en horas tempranas de la germinación el transcrito de la ciclina D2 es traducido provocando que la proteína se acumule en mayor cantidad que en el control. Si es que en plantas existe la vía de AKT, el comportamiento antes descrito podría deberse a que la AKT es activada, provocando la inhibición de la GSK-3 β y evitando la degradación de la ciclina D. En las últimas horas en presencia de BA, se observa que el transcrito de la ciclina D2 se acumula, pero que la proteína comienza a ser degradada. En otro sistema, como es en humanos, se había reportado que al activarse la vía de la AKT se provocaba la estabilización de la proteína ciclina D1. Sin embargo, en plantas no se tiene conocimiento sobre el mecanismo que regula la transcripción y la traducción de las ciclinas D, el cual podría estar interconectado con la necesidad que la célula tenga por utilizar a las ciclinas y de esta forma evitar un descontrol en el ciclo celular, o bien, alteraciones a nivel morfológico.

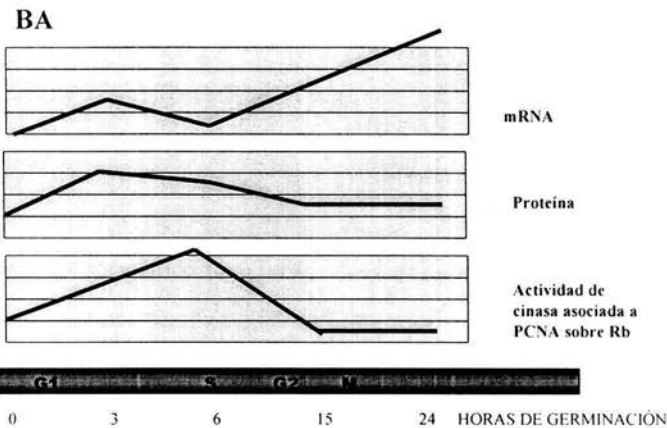
Por otra parte, es posible que las fitohormonas no tengan ninguna influencia directa sobre la expresión de la ciclina D2, y que la regulación del ciclo celular en el caso de maíz no ocurra por esta ciclina. Sin embargo, se observa que la citocinina es capaz de inducir el transcrito de la ciclina D2 durante la germinación tardía, en etapas del ciclo que corresponderían a G2/M. Es entonces posible que la nueva producción de ciclina D se destine al proceso de desarrollo de plántula, el cual requiere de una proliferación celular muy dinámica.

CONTROL

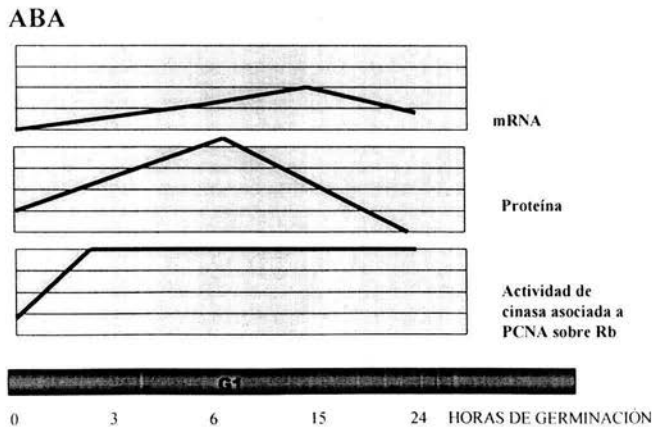
A



B



C



Curso temporal de la expresión del mRNA y de la proteína de la ciclina D2 de maíz durante la germinación. Efecto de las fitohormonas sobre la ciclina D2 y la actividad de cinasa asociada a PCNA.

- A) Germinación control.
- B) Germinación con BA.
- C) Germinación con ABA

VIII. CONCLUSIONES

- Se logró aislar un fragmento del cDNA que corresponde a la ciclina D2 de maíz. Se obtuvieron la proteína recombinante y los anticuerpos policlonales correspondientes.
- Los anticuerpos reconocen a la ciclina D2 de maíz en un peso de 38 kDa.
- Durante la germinación de maíz, la ciclina D2 se acumula durante la fase G1 teniendo un pico a las 6 horas de germinación, decayendo después de las 15 horas, lo cual corresponde a la fase G2. Este comportamiento es similar al que se observa con BA y con ABA.
- Es posible que las fitohormonas no tengan ninguna influencia directa sobre la expresión de la ciclina D2, y que la regulación del ciclo celular en el caso de maíz no ocurra por esta ciclina
- La ciclina D2 se encuentra presente en tejidos proliferativos y en tejidos diferenciados.
- El nivel del transcrito de la ciclina D2 se incrementa ligeramente hacia la transición G1/S y posteriormente se estabiliza. Un comportamiento semejante se observa con ABA.
- El transcrito de la ciclina D2 se induce fuertemente hacia las 15 horas de germinación al embeberse los ejes embrionarios en presencia de BA.

IX. APÉNDICE

SOLUCIÓN DE IMBIBICIÓN:

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

BUFFER DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Tris-HCl	70 mM	pH 7.5
MgCl ₂	1.0 mM	
KCl	25 mM	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5.0 mM	pH 8.0
Sacarosa	0.25 mM	
DTT	7.5 mM	
Tritón X-100	0.1 %	
NaF	50mM	
Na ₃ VO ₄	1mM	
β-glicerolfosfato	80mM	

1 tableta del cocktail de inhibidores de proteasas Complete™ (Boehringer) por cada 10 ml de amortiguador).

SDS-PAGE.

Acrilamida 30%

Acrilamida	29.2g
Bisacrilamida	0.8g
H ₂ O cbp	100ml

Amortiguador del gel apilador 2X (pH 6.8)

Tris-HCl	7.88g
SDS	0.4g
H ₂ O c.b.p	100ml

Amortiguador del gel separador 2X (pH 8.8):

Tris-HCl	23.64g
SDS	0.4g
H ₂ O c.b. p.	100 ml

PREPARACION DE LOS GELES

<u>Gel separador:</u>	14%
Amortiguador del gel separador 2X	1.25 ml
Acrilamida/bisacrilamida al 30 %	4.33 ml
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ al 20 %	25µl
TEMED	10µl
H ₂ O	4.77 ml

Gel apilador:

Amortiguador del gel apilador 2X	0.750 ml
Acrilamida/bisacrilamida al 30 %	0.500 ml
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ al 20 %	7.5 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O	1.83 ml

BUFFER DE CARGA 4X

Tris-HCl	200 mM pH 6.8
DTT	400Mm
SDS	8%
Glicerol	40%

Azul de bromofenol. Adicionar la mínima cantidad posible.

AMORTIGUADOR DE ELECTRODOS 10X (PH 8.3)

Tris-HCl 250 mM	30.32g
Glicina 1.92 M	144g
SDS al 1%.	10g
H ₂ O	1000ml

TINCIONES DE GELES

SOLUCION DE AZUL DE COOMASIE

Coomasie G25	0.05%
HClO ₄ (70%)	5.18%

WESTERN BLOT

Solución de transferencia

Glicina	1.44%
Tris-HCl 1M (pH=8.3)	2.5%
Metanol	4%
H ₂ O	1000ml

PBS 10X (pH=7.4)

NaCl	8%
KCl	0.2%
Na ₂ HP0 ₄ .7H ₂ O	2.72%
NaH ₂ P0 ₄ .H ₂ O	0.28%
H ₂ O	

Solución de bloqueo

PBS 1x	
Leche en polvo	5%
Tween 20	1.2%

Anticuerpos

Primer anticuerpo:

α-Cyc D ₂	1:2000
α-GST	1:3000

Segundo anticuerpo:

α-conejo	1:10,000
----------	----------

Sol. de lavado para membranas de proteínas

EDTA 0.5mM pH=8	200 μ l
SDS	2 g
NaCl	2.9g
PBS 1X cbp	100ml

TAE 50x

Tris Base	121 g	(0.04 M)
Acido acético glacial	28.55 mL	
EDTA 0.5 M pH 8	50 mL	(0.01 M)
H ₂ O	cbp	500 mL

BUFFER DE CARGA (geles de agarosa)

Glicerol	50%
TAE	2X
Azul de bromofenol	0.25%

GLUTATIÓN SEFAROSA 4B

Se toma 1.33 mL de la resina glutatión sefarosa 4B y se centrifuga a 500rpm por 5 min. Se decanta el sobrenadante y se añade 10 mL de PBS 1X a la resina, se agita y se vuelve a centrifugar. Finalmente, se adiciona 1 mL de PBS 1X y la resina se puede utilizar. Por cada 100 mL de medio LB se utilizan 100 μ L de resina.

BUFFER DE ELUCIÓN

Glutación reducido	10 mM
Tris-HCl pH 8.0	50 mM

SOLUCION DE HIBRIDACIÓN

Na ₂ HPO ₄	0.5M
NaH ₂ PO ₄	0.5M
SDS	7%
EDTA	10mM
BSA	1%
H ₂ O	cbp 15 mL

SSC 20X

NaCl	87.65 g
Citrato de sodio	44.1 g
H ₂ O	cbp 500 mL

Esterilizar por 20 min.

X. REFERENCIAS

- 1) Baiza, A., Vázquez-Ramos, J., Sánchez de Jiménez, E., (1989), *DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination*, J. Plant Phys., 135: 416-421.
- 2) Bewley, J.D., Black, M., (1994), Physiology and Biochemistry of seeds in relation to Germination, Germany, 1:106-131.
- 3) Binns, A., (1994), *Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches*, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 45:173-196.
- 4) Black, A., Azizkhan-Clifford, J., (1999), *Regulation of E2F: a family of transcriptional factor involved in proliferation control*, Gene, 237: 281-302.
- 5) Blow, J., (1996), Eukaryotic DNA Replication, Frontiers in Molecular Biology, IRL Press, Oxford, Inglaterra, pp. 1-19.
- 6) Boniotti, M., Gutiérrez, C., (2001), *A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA / cyclin D complex*, Plant J., 28(3): 341-350.
- 7) Cockcroft, C., Boer, B., Healy, J., Murray, J., (2000), *Cyclin D control of growth rate in plants*, Nature, 405:575-579.
- 8) Cruz-García, F., Zúñiga, J.J., Vázquez, J., (1998), *Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins*, Physiol. Plant., 102: 573-581.
- 9) Datta, K., Marsu, L., Marcus, A., (1983), *Early growth of wheat axes and the synthesis of RNA and DNA*, Plant Phys., 72:394-397.
- 10) Deltour, R., Jacquard, M., (1974), *Relation between water stress and DNA synthesis during germination of Zea mays*, L. Ann. Bot. 38: 329-334.
- 11) Den Boer, B., Murray, J., (2000), *Control of plant growth and development through manipulation of cell-cycle genes*, Curr. Op. Biotech., 11:138-145.
- 12) De Veylder, L., de Almeida Enler, J., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D., (1999), *A new D-type cyclin of*

- Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation, *Planta*, 208: 453-462.
- 13) Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy J., Jacquard, A., Kilby, N., Murray, J., (2003), *Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin Cyc D3*, *Plant cell*, 15: 79-92.
 - 14) Dewitte, W., Murray, J., (2003), *The plant cell cycle*, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54:235-264.
 - 15) Diehl, J., Cheng, M., Roussel, M., Sherr, C., (1998), *Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*, *Genes Dev.*, 12:3499-3511.
 - 16) Franke, T., Kaplan, D., Cantley, L., (1997), *PI3K, downstream AKTion blocks apoptosis*, *Cell*, 88:435-437.
 - 17) Fuerst, R., Soni, R., Murray, J., Lindsey, K., (1996), *Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 112: 1023-1033.
 - 18) Gallardo K., Job, C., Groot, S., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove JI, Job, D., (2001), *Proteomic Analysis of Arabidopsis Seed Germination and Priming*, *Plant Phys.*, 126: 835-848.
 - 19) Gaudin, V., Lunness, P., Fobert, P., Towers, M., Riou-Khamlichi, C., Murray, J., Coen, E., Doonan, J., (2000), *The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene*, *Plant Physiol.*, 122: 1137-1148.
 - 20) Gould, K., Nurse, P., (1989), *Protein tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis*, *Nature*, 342: 39-45.
 - 21) Gutiérrez-Aguilar, R., (2001), *Proteínas que se asocian a PCNA durante el ciclo celular en la germinación de maíz*, Tesis de Licenciatura.
 - 22) Harper, J., Elledge, S., Keyomarsi, K., (1995), *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21*, *Mol., Biol. Cell*, 6: 387-400.
 - 23) 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 putative cell cycle proteins.*, *Physiol. Plant.*, 110:127-134.
- 24) Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A., Kouzarides, T., Gutiérrez, C., Doonan, J., Murray, J., (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 (CycD) proteins*, *Plant Mol. Biol.*, 37:155-169
 - 25) Inze, D., Gutiérrez, C., Chua, N., (1999), *Trends in plant cell cycle research*, Meeting report, *Plant Cell*, 11: 1-4.
 - 26) Jacobs, T., (1995), *Cell cycle control*, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 317-339.
 - 27) Johnson, D., Walker, C., (1999), *Cyclins and cell cycle checkpoints*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39:295-312.
 - 28) Kelman, Z., (1997), *PCNA: structure, functions and interactions*, *Oncogene*, 14: 629- 640.
 - 29) Koepp, D., Harper, W., Elledge, S., (1999), *How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle*. Minireview, *Cell*, 97: 431-434.
 - 30) Kosugi, S., Ohashi, Y., (2002), *Interaction of the Arabidopsis E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation*, *Plant Phys.*, 128:833-843.
 - 31) Krek, M., Nigg, E., (1991), *Mutations of p34 cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34 cdc2 kinase activation in vertebrates*, *EMBO J.*, 10: 3331-3341.
 - 32) López I., Vázquez, J., Hussey, P., (1997), *The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in Zea mays is composed of two members that have similar expression programmes*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1353:1-6.
 - 33) Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R., Albani, D., (2002), *The E2F family of transcription factors from Arabidopsis thaliana. Novel and conserved components of the retinoblastoma/ E2F pathway in plants*, *J. Biol. Chem*, 277:9911-9919.

- 34) Meijer, M., Murray, J., (2000), *The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle*, Plant Mol. Biol., 43: 621-633.
- 35) Meijer, M., Murray, J., (2001), *Cell cycle controls and the development of plant form*, Curr. Op., Plant Biol., 4:44-49.
- 36) Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., Inzé, D., (1999), *Cyclin dependent kinases and cell division in plants: the nexus*, Plant Cell, 11: 509-521.
- 37) Morgan, O., (1997), *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors*, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 13: 261-291.
- 38) Muise-Helmericks, R., Grimes H., Bellacosa, A., Malstrom, S., Tschlis, P., Rosen, N., (1998), *Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent pathway*, J. Biol. Chem., 273(45):29864-29872.
- 39) Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., Shinmyo, A., (2002), *Phosphorylation of Retinoblastoma related protein by the cyclin D / cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco*, Plant Cell., 14:1847-1857.
- 40) Osborne, D., (1983), *Biochemical control systems operating in the early hours of germination*, Can. J. Bot., 61:3568-3577.
- 41) Page, A., Hieter, P., (1999), *The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators*, Annu. Rev. Bioch., 68: 583-609.
- 42) Pines, J., (1995), *Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations*, Adv. Cancer Res., 66:181-212.
- 43) Potuschak, T., Doerner, P., (2001), *Cell cycle controls: genome-wide analysis in Arabidopsis*, Curr. Op. Plant Biol., 4:501-506.
- 44) Ramljak, D., Calvert, R., Wiesenfeld, P., Diwan, B., Catipovic, B., Marasas, W., Victor, T., Anderson, L., Gelderblom, W., (2000), *A potential mechanism for fumonisin B1-mediated hepatocarcinogenesis: cyclin D1 stabilization associated with activation of Akt and inhibition of GSK-3B activity*, Carcinogenesis, 21(8):1537-1546.

- 45) Rechsteiner, M., Rogers, S., (1996), *PEST sequences and regulation by proteolysis*, Trends Biochem. Sci, 21: 267-271.
- 46) Renaudin, J.P., Doonan, J., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D., Sundaresan, V., Murray, J., (1996), *Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organisation*, Plant Mol. Biol., 32:1003-1018.
- 47) Riou-Khamlichi C., Menges M., Healy S., Murray J., (2000), *Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression*, Molecular and Cellular Biology, pp:4513-4521.
- 48) Riou-Khamlichi, C., Huntle, R., Jacquemard, A., Muray, J., (1999), *Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin*, Science, 283:1541-1544.
- 49) Roberston, J., Yeung, E., Reid, D., Hubick, K., (1990), *Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. Mitotic activity*, J. Exp. Bot, 42: 339-350.
- 50) Rossi, V., Varotto, S., (2002), *Insights into the G1/S transition in plants*, Planta, 215:345-356.
- 51) Russell, P., Nurse, P., (1986), *cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast*, Cell, 45: 145-153.
- 52) Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., (1984), *Protein synthesis patterns*, Plant Physiology, 75:231-234.
- 53) Sánchez, M., Gurusinge, S., Bradford, K., Vázquez-Ramos, J., *Differential response of PCNA-associated CDK activity to phytohormones during maize germination*, (en prensa).
- 54) Sánchez, M.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutiérrez, C., Vázquez-Ramos, J.M., (2002), *PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize*, Plant Mol. Biol., 50:167-175.
- 55) Schwab, M., Tyers, M., (2001), *Archipelago of destruction*, Nature, 413: 268-269

- 56) Schittger A., Scchobinger U., Bouyer D., Wein C., Stierhof Y., Hulskamp M., *Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in Arabidopsis trichomes*, PNAS, 2002, vol. 99:9, pp.6410-6415.
- 57) Schub, O., Rohaly, G., Smith, R., Schneider, A., Dehde, S., Dornreiter, I., Nasheuer, H., (2001), *Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase α -primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro*. J. Biol. Chem., 276: 38076-38083.
- 58) Seo, M., Koshiba, T., (2002) *Complex regulation of ABA biosynthesis in plants*, Plants Trends, 7: 41-48.
- 59) Sherr, C., (1993), *Mammalian G1 cyclins*, Cell, 73: 1059-1065.
- 60) Sherr, C., (1994), *G1 phase progression: cycling on cue*, Cell, 79: 551-555.
- 61) Sherr, C., Roberts, J., (1999), *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*, Genes Dev., 13:1501-1512.
- 62) Smits, V., Medema, R., (2001), *Checking out the G2 / M transition*. Bioch. Et Biophys. Acta, 1519: 1-12.
- 63) Soni, R., Carmichael, J., Shah, Z., Murray, J., (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.
- 64) Sorrell, D, Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C., Murray, J., (1999) *Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells*, Plant Phys., 119: 343-351.
- 65) Sorrell, D., Menges M. Healy S., Deveaux Y., Amano C. Su Y., Nakagami H, Shinmyo A., Doonan J, Sekine M, Murray J., (2001), *Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow -2 cells*, Plant Physiol., vol. 126 pp. 1214-1223.
- 66) Swiatek A., Lenjou M., Van Bockstaele D., Inze D., Van Onckelen H., (2002), *Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells*, Plant Physiol., Vol. 128, pp. 201-211

- 67) Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., Inzé, D., (2002), *Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis*, *Plant Cell*, 14: 903-916.
- 68) Vazquez-Ramos, J., Reyes, J., (1990), *Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination of maize axes*, *Can. J. Bot.*, 68: 2590-2594.
- 69) Vázquez-Ramos, J., (2000), "Cell cycle control during maize germination.", *Seed Biology: Advances and Applications*, Vázquez-Ramos, J., Black, M., Bradford, K., Eds. CAB International, Oxford, Inglaterra, pp. 261-270.
- 70) Waga, S., Stillman, B., (1998), *The DNA replication fork in eukaryotic cells*, *Ann. Rev., Bioch.*, 67: 721-751.
- 71) Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W., Fowke L., (1998), *ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid*, *Plant J.*, 15:501-510.
- 72) Xiong, Y., Zhang, H., Beach, D., (1992), *D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA*, *Cell*, 71: 505-514.
- 73) Yanagawa, Y., Hasezawa, S., Kumagai, F., Oka, M., Fujimuro, M., Naito, T., Makino, T., Yokosawa, H., Tanaka, K., Komamine, A., Hashimoto, J., Sato, T., Nakagawa, H., (2002), *Cell-cycle dependent dynamic change of 26S proteasome distribution in tobacco BY-2 cells*, *Plant Cell Physiol.*, 43: 604-613.
- 74) Zhang, H., Hannon G., Beach, D., (1994), *p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states*, *Genes Dev.*, 8: 1750-1758.
- 75) Zhou, Fowke, L., Wang, H., (2002), *Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic Arabidopsis plants*, *Plant Cell Rep.*, 20:967-975.
- 76) Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whetwill, S., Fowke, L., (2003), *Effectos of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 216: 604-613.

Zlatanova, J., Ivanov, P., Stoilov, L., Chimshirova K., Stanchev, B., (1987), *DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize*, Plant Mol. Biol., 10: 139-144.