



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CLONACIÓN DE LA Zeama;KRP1 DE MAÍZ Y
ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DURANTE LA
GERMINACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALFREDO FERNÁN MANCILLA FLORES



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Jorge Manuel Vázquez Ramos
Vocal	Prof. Homero Hernández Montes
Secretario	Prof. Felipe Cruz García
1er. Suplente	Prof. Francisco Javier Plasencia de La Parra
2do. Suplente	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 114
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas
Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Supervisor técnico:

Dr. Elpidio García Ramírez

Sustentante:

Alfredo Fernán Mancilla Flores

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESOR

EL Dr. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS :

POR LA DIRECCIÓN DE ESTA TESIS, ASÍ
COMO POR EL HECHO DE HABERME
BRINDADO LA OPORTUNIDAD DE FORMAR
PARTE DE SU GRUPO DE TRABAJO DURANTE
LA REALIZACIÓN DE LA MISMA.

A ESE GRAN AMIGO (HERMANO)

EL Dr. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

QUIEN SIEMPRE HA ESTADO
CUANDO LO HE NECESITADO
Y CUANDO NO, TAMBIÉN.

A QUIEN CONSIDERO UN AMIGO TOTAL

EL Dr. OCTAVIO GUERRERO ANDRADE

QUIEN BAJO CUALQUIER CIRCUNSTANCIA,
MOTIVO, CAUSA Ó RAZÓN HA SIDO UN GRAN
AMIGO Y COMPLICE...

A MIS COLEGAS Y AMIGOS, Y A LOS QUE NO SON MIS COLEGAS, PERO DE IGUAL FORMA SON MIS AMIGOS.

Minerva A, Natividad J, Daniel L, Minerva C, Eduardo G. M., Carlos Everardo, Manuel, Yaddyth Miguel, Ivon, Mari, Araceli, Luís, Jorge, Silvioux, Lupioux, Lupita, Sergio, El Ernesto, El Erick, Mario, Norma, Erika, Alejandra T. Raquel G. Sandra Z., Citlalli, Ana Lilia, Marianita, Liliana, Gabriela H., Silvia, Dona, Germán, Enrique, Kharla Gú, Javier R., Jorge, Adrián, Rogelio R., Osiris, Miguel C., y a unos tantos más que si bien no aparecen aquí, no están exentos de ocupar un lugar en mi memoria y de gozar de mi gratitud por el hecho de haber dejado algo en mí.

A aquellos que de forma desinteresada me apoyaron, en su medida.

A el profesor Raúl Garza, Ing. Federico Galdeano., Dr. Alejandro Baeza, Ing. Guillermo S., Ángel Meléndez, Carlos Cosió, Rodrigo Montoya, Dr. Pérez da la Mora, a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dr. Felipe Cruz y, a el profesor Homero Hernández. A estos últimos por la revisión del escrito.

A el año de 1999...

**A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
MADRE PÍA
DEDICO
CON
FILIAL GRATITUD**

**Y
A LA
FACULTAD DE QUÍMICA**

QUE NUNCA ME PIDIERON NADA A CAMBIO

A el sistema Nacional de Investigadores, nivel III, CONACYT.

DEDICATORIA

A DOÑA ALTAGRACIA ISABEL FLORES CAMARGO

***Vda* DE MANCILLA**

MI MADRE

QUIEN EN TODO MOMENTO HA CREÍDO EN MÍ Y ME HA BRINDADO TODO SU APOYO, COMPRENSIÓN Y AMOR DE MANERA INCONDICIONAL.

A MIS HERMANOS

NADIA, VÍCTOR, SAÚL, KATYA , ARTURO Y PATRICIA.

A MIS CUÑADAS (O), RAQUEL, MERCEDES, RICARDO, ROSA Y MANUEL.

A MIS SOBRINAS (O), OSCAR, YUSSEL, RAMSES, MONTSERRAT, DARIÁN KARÉN, PAULA, ABIGAIL, DULCE, GABRIELA, OLINKA, ALEJANDRA Y AXEL.

A LA MEMORIA DE DON REFUGÍO ENOC MANCILLA URBAN

MI PADRE

A MIRIAM

Con quien quiero pasar el resto de mi vida...

A DIOS.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	6
I.1. Ciclo de vida del maíz.....	6
I.2. Formación de la semilla de maíz.....	8
I.3. Anatomía de la semilla de maíz.....	8
I.4. Germinación de la semilla de maíz.....	10
I.5. Imbibición.....	11
I.6. Respiración y síntesis de ATP	12
I.7. Síntesis de RNA y proteínas	12
I.8. Síntesis de DNA.....	12
II. CICLO CELULAR.....	13
II.1. CICLO CELULAR EN MAMÍFEROS.....	16
II.1.1. Transición G1/S.....	16
II.1.2. Transición G2/M.....	18
II.2. INHIBIDORES DE CDKs EN MAMÍFEROS.....	19
II.3. CICLO CELULAR EN PLANTAS.....	22
II.3.1. INHIBIDORES DE CDKs EN PLANTAS.....	26
III. ANTECEDENTES.....	29
IV. HIPOTESIS	31
V. OBJETIVOS... ..	31
V.1. Objetivo general.....	31
V.2. Objetivos específicos.....	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
VI.1. Material biológico.....	32
VI.2. Tratamiento de los ejes embrionarios.....	32
VI.2.1. Ensayo de germinación.....	32
VI.2.2. Obtención de ARN total.....	32
VI.2.3. Aislamiento del cDNA de ZmKRP1 de maíz.....	33

VI.2.4. Reacción de la transcriptasa reversa (RT) y análisis del transcrito de ARN.....	34
VI.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa del cDNA (PCR).....	35
VI.2.6. RT-PCR semi-cuantitativo.....	37
VI.2.7. RACE.....	38
VII. RESULTADOS.....	39
VII.1 Expresión de ICK/KRP1 de maíz durante La germinación.....	49
VIII. DISCUSIÓN.....	51
VIII.1. Inhibidores de CDKs en plantas.....	51
VIII.2. Estructura y función de las ICKs/KRPs.....	52
VIII.3. Proteínas tipo ICK/KRP.....	53
IX. CONCLUSIONES.....	55
X. PERSPECTIVAS.....	55
XI. ANEXO I.....	56
ANEXO II.....	58
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59

RESUMEN

En mamíferos, la actividad de los complejos ciclina/CDK se regula negativamente por pequeños polipéptidos, llamados inhibidores de CDKs (CKIs), los cuales inducen el arresto del ciclo celular o retrasan la progresión del ciclo celular en respuesta a señales intracelulares o extracelulares. En plantas, también se han encontrado proteínas inhibitorias de los complejos ciclina/CDK. Debido a que la expresión de los genes de tipo ICK/KRP es consistente con un papel en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo y en respuesta a señales ambientales.

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar molecularmente el gen de una proteína de tipo ICK/KRP en ejes embrionarios de maíz, con la finalidad de monitorear los niveles del transcrito en diferentes tiempos de la germinación.

Para ésto, se contaba con la secuencia parcial del extremo 3' del gen de una proteína de tipo ICK/KRP, previamente caracterizada en nuestro laboratorio. La cual tiene un alto porcentaje de identidad con el extremo 3' de otras ICKs/KRPs de plantas como; *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* y *Zea mays*.

Por medio de un análisis *in silico* de comparación múltiple de secuencias, se determinaron las regiones a considerar para el diseño de oligonucleótidos que permitiera obtener por medio de la reacción de la transcriptasa reversa (RT) y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el extremo restante del gen (5') de la proteína de tipo ICK/KRP, y con ello monitorear los niveles expresión de su transcrito durante la germinación.

Como resultado de la investigación se obtuvo la secuencia completa del cDNA de la proteína de tipo ICK/KRP de maíz. El análisis de los niveles de expresión del transcrito a diferentes tiempos de germinación (0, 6, 12, 18, y 24 horas), reveló que los niveles del transcrito no varían durante las primeras 24 horas de germinación de los ejes embrionarios de maíz.

ABREVIATURAS

aa	Amino ácido
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BA	Benciladenina
CAK	Cinasa activadora de CDKs
CAKAKs	Cinasa activadora de CAKs
CDK-A	Cinasa dependiente de ciclina
Cyc o CYC	Ciclina
DP	Dimerization Partner (Compañera de dimerización)
E2F	Factor transcripcional
GST	Glutación S-transferasa
G0	Estado quiescente
G1	Gap 1
G2	Gap 2
ICK	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina
IAA	Ácido indol acético
kDa	kiloDalton
KRP	Kip related proteins
LB	Luria Broth (medio luria)
M	Fase de Mitosis
MPF	(Maturation Promoting Factor)
NLS	Secuencia de localización nuclear
pBR	Proteína retinoblastoma
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
R	Punto de restricción

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ciclo de vida de la planta de maíz. La meiosis, seguida de las divisiones mitóticas produce dos tipos de organismos haploides que son genéticamente activos, el megagametofito femenino y la microespora masculina (grano de polen). La división mitótica en los microgametofitos resulta en un par de células hermanas que se diferencian en esperma. En el megagametofito una ovocélula haploide se diferencia y es fecundada por una célula espermática para producir un embrión y dos núcleos haploides se fusionan para formar una célula central que es fecundada por otra célula espermática para formar el endospermo triploide (modificado a partir de Walbot y Evans 2003). (pag.7)

Figura 2. Estructura de una semilla de maíz madura: 1 y 2 son cortes de secciones verticales en dos planos de una semilla madura que muestran en detalle el arreglo de órganos y tejidos. **a**, hilio; **b**, pericarpio; **c**, aleurona; **d**, endospermo; **e**, escutelo; **f**, capa glandular del escutelo; **g**, coleoptilo; **h**, plúmula con tallo y hojas; **i**, primer internodo; **j**, raíz lateral adventicia; **k**, nodo escutelar; **l**, raíz primaria; **m**, coleorriza; **n**, conducto basal de células del endospermo; **o**, capa de absición (separación) café; **p**, pedicelo, (modificado a partir de Vincent, 2002). (pag.9)

Figura 3. Curso temporal de eventos asociados a la germinación y post-germinación de semillas. El tiempo requerido para que los eventos sean completados varía desde algunas horas a muchas semanas, dependiendo de factores genéticos inherentes y de factores ambientales prevalecientes, particularmente, temperatura y disponibilidad de agua (modificado a partir de Bewley , 1997). (pag.11)

Figura 4. (A) Vector de clonación pGEM®-T Easy y su sitio de clonación múltiple, que se utilizó para la clonación del fragmento de ZmKRP1E; (B) Sitios de corte de las enzimas *EcoR1/ Not1*. (pag. 38)

Figura 5. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las diferentes ICKs/KRPs, en verde se encuentra marcada la secuencia WASTCAS. Así como se encuentran sombreadas de color amarillo y verde las regiones más conservadas, dentro de las cuales se encuentran las posiciones de los oligonucleótidos específicos (*primers*) que se ocuparán para llevar a cabo el aislamiento, de color azul *forward* 30nt y la sombra de color rojo *reverse* 24 nt (detalles, ver figura 6). (pag.40)

Figura 6 . Alineamiento parcial de Zeama;KRP1 e ICK1Zm. Se señalo la region que se consideró para llevar a cabo el diseño del oligonucleótido antisentido.Region **AMERITRE** que aparece en ambas secuencias de maíz. Se considero conservar el oligonucleótido sentido **MGKYMRKAKA** de Zeama;KRP1 de maíz. (pag.42)

Figura 7. Productos de amplificación por RT-PCR de ZmKRP1E de maíz. (A) Reacción de RT-PCR a partir de mRNA total del cual se obtiene una banda de \approx 350pb, dando como resultado su respectivo cDNA, carriles: 1PM, 2 ZmKRP1B, 3 control, 4 ZmKRP1E, 5 control. Condiciones: 35 ciclos/60°; (B) Reamplificación del cDNA de ZmKRP1E, a partir de la reacción de PCR, carriles: 1PM, 2 ZmKRP1B, 3 control., 4 ZmKRP1E, 5 control. Condiciones: 35 ciclos/60°, [los controles constan de todo el medio de reacción para RT-PCR, PCR exceptuando el templado RNAm o cDNA respectivamente, se señala el producto esperado. (pag.43)

Figura 8. Purificación del cDNA de ZmKRP1E y reacción de digestión del plásmido que tiene contenido a ZmKRP1E; (A) producto de PCR de \approx 350pb, carriles: 1 PM, 2 ZmKRP1E, 3 control; (B) reacción de digestion del cDNA de ZmKRP1E, con las enzimas de restricción *EcoR1/Not1* carriles: 1PM, 2 ZmKRP1B, 3 control (plásmido sin digerir PGEM T-EASY), 4 ZmKRP1E, 5 control (plásmido sin digerir PGEM T-EASY). (pag. 44)

Figura 9. (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de ZmKRP1E con polipéptidos deducidos de las secuencias de cDNAs de las Zeama;KRP1 (AY986792) y Zeama;KRP2 (AY986793) de maíz, así como de las KRPs de arroz (OsKRP1-OsKRP5). (pag.46)

Figura 10. Alineamiento de la secuencia múltiple complementada *ZmKRP1com*. Está consta de la secuencia ZmKRP1E (N-terminal) y la secuencia parcial ICK1Zm (extremo C-terminal) de maíz (*ZmKRP1com*), con la secuencia completa de la Zeama;KRP1 de maíz (AY986792), más el extremo de ZmKRP1E de maíz. (pag. 47)

Figura 11.(A) Reacción de RT-PCR de los transcritos de **Zeama;KRP1de maíz: 567 pb** (carril 2 y su control carril 3); **ZmKRP1 327 pb** (antes ZmKRP1E) (carril 4 y su control carril 5); Actina1 como control de carga (carril 6 y su control carril 7); pesos moleculares (carriles 1 y 8); (B) Reacción de PCR de los transcritos de ZeamaKRP1(carril 2 y su control carril 3); ZmKRP1 (carril 4 y su control carril 5); Actina1 como control de carga (carril 6 y su control carril 7) de maíz y pesos moleculares (carril 1), los controles constan de toda la mezcla de reacción, a excepción del molde (según sea el caso). (pag.48)

Figura 12. Nivel de transcripción de la Actina1 y ZmKRP1 (antes ZmKRP1E), a diferentes tiempos de germinación(0,6,12,18, y 24 horas), y ciclos de reacción por RT-PCR semicuantitativo. **(pag. 49)**

Figura 13. (A) niveles del transcrito de ZmKRP1 durante la germinación de ejes embrionarios; (B) ciclos a los cuales se llevo acabo el análisis densitometrico (se realizaron por triplicado). De los cuales posteriormente se llevo acabo el análisis estadístico (ANOVA de dos vías). **(pag. 50)**

Tabla1. Porcentaje de identidad entre las distintas secuencias de aminoácidos, deducidas de las secuencias de cDNA de las ICKs/KRPs reportadas. En negritas se encuentra, Zeama;KRP1(AY986792), OsKRP4 de arroz y ICK1Zm de maíz. **(pag. 39)**

Tabla 2. Comparación de las secuencias de aminoácidos, y sus respectivos porcentajes de identidad. **(pag. 45)**

Tabla 3. Comparación de la secuencia complementada, porcentaje de identidad Zeama;KRP1 de maíz (AY986792) y la secuencia completa de la ICK/KRP de maíz ZmKRP1com, que no es más que la fusión de las secuencias ZmKRP1E (N-terminal) y la secuencia parcial ICK1Zm (extremo C-terminal) de maíz. **(pag. 46)**

I. INTRODUCCIÓN

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

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

Tomando en cuenta lo anterior, surge la inquietud de emplear esta planta como modelo de estudio y enfocar su investigación a diversos procesos en su producción, entre los que se encuentra el proceso de germinación su estudio permitirá el mejoramiento de la planta mediante la obtención de tiempos más cortos de cosecha, condiciones de siembra menos exigentes, mejoras en el contenido nutricional de la semilla y una mayor disposición de la semilla a la población.

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

I.1. CICLO DE VIDA DEL MAÍZ

El maíz, como la gran mayoría de las plantas con semilla, tiene dos fases en su ciclo de vida, la etapa diploide esporofítica que termina en la meiosis para producir células haploides, las cuales a su vez se dividen mitóticamente para generar y la fase haploide gametofítica, en la cual la proliferación mitótica produce una planta haploide que incluye la diferenciación de un subconjunto de células a gametos. Tanto la ovocélula (megagametofito) como la célula espermática (microgametofito) que produce la planta son genéticamente activas; por ello, el genotipo refleja el fenotipo y ambos se desarrollan en inflorescencias separadas (figura 1, Walbot y Evans, 2003).

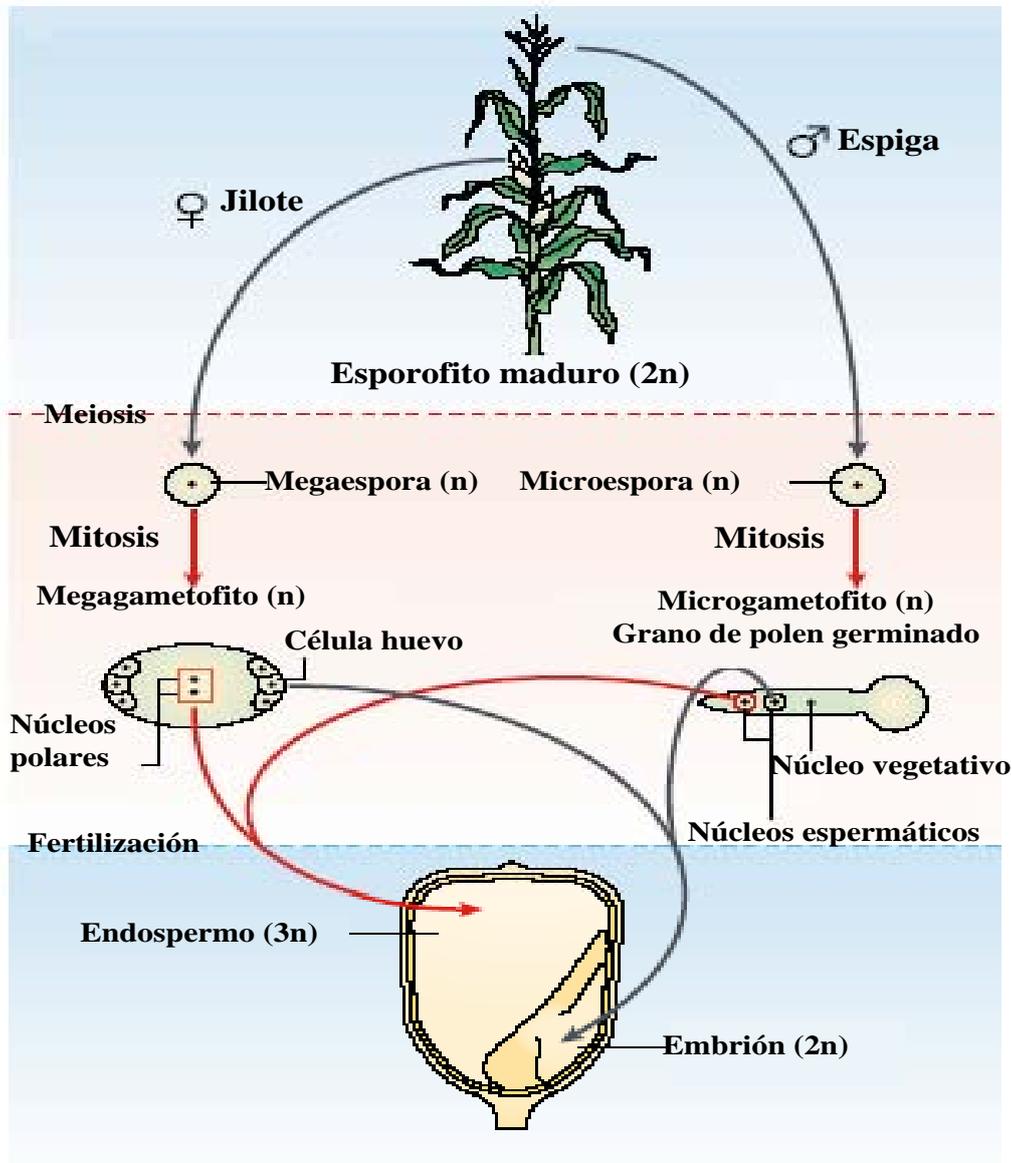


Figura 1. Ciclo de vida de la planta de maíz. La meiosis, seguida de las divisiones mitóticas produce dos tipos de organismos haploides que son genéticamente activos, el megagametofito femenino y la microespora masculina (grano de polen). La división mitótica en los microgametofitos resulta en un par de células hermanas que se diferencian en esperma. En el megagametofito una ovocélula haploide se diferencia y es fecundada por una célula espermática para producir un embrión y dos núcleos haploides se fusionan para formar una célula central que es fecundada por otra célula espermática para formar el endospermo triploide (modificado a partir de Walbot y Evans 2003).

I.2. FORMACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ

La reproducción sexual en maíz se caracteriza por un evento de doble fecundación. Una célula espermática se fusiona con la ovocélula para formar al embrión diploide, mientras que una segunda célula espermática se fusiona con una célula central binucleada para dar origen al endospermo triploide (Randolph,1936). Aunque genéticamente las contribuciones materna y paterna no son iguales, por lo que los programas de desarrollo del embrión y del endospermo difieren de manera considerable (figura1). Después del evento de doble fecundación, el proceso de formación del embrión se completa aproximadamente al día cuarenta y en los siguientes 10 a 20 días llega a la madurez, con el consecuente secado del grano (Vincent, 2002).

I.3. ANATOMÍA DE LA SEMILLA DE MAÍZ

Un grano maduro de maíz (cariopsis) está conformado por tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión. El pericarpio es la capa externa transparente del grano, deriva de la pared del óvulo y por ello es genéticamente idéntico a la línea materna; está impregnado de ceras y grasas así como de células mucilaginosas que revientan al contacto con el agua, proveyendo así una barrera que retiene el agua alrededor de la semilla. En el pericarpio se distinguen el hilio y el micrópilo. El hilio es la cicatriz que corresponde a la inserción del funículo con la semilla. El micrópilo es un diminuto orificio, cerca del hilio o en otra zona según sea la posición del óvulo con respecto al funículo y la forma de la semilla. El micrópilo permite el acceso al oxígeno y del agua al embrión y es el orificio por donde sale la radícula al germinar la semilla. Adyacente al pericarpio se localiza la capa de la aleurona, que consiste en una capa de células vivas que rodea al endospermo y sintetiza α -amilasa y otras enzimas hidrolíticas que degradan el almidón durante la germinación. La capa de la aleurona es la única parte del endospermo que puede estar intensamente pigmentada (que da una coloración de azul o rojo). La pigmentación es visible a través del pericarpio transparente. El endospermo puede ser de color amarillo o blanco, constituyendo del 85% al 90% del peso de la semilla y contiene la fuente de reserva energética (en forma de carbohidratos y proteínas), la cual se utiliza durante la germinación y en la formación de la plántula.

El escutelo es una estructura discoide gruesa que se localiza entre el endospermo y el embrión, representa el cotiledón único, el cual actúa como órgano que asimila y nutre al embrión durante la germinación. El embrión contiene un eje embrionario y en éste se distinguen las siguientes estructuras: el coleoptilo que es el recubrimiento de protección de los primordios de hoja del eje embrionario, protege a la plúmula durante el brote de la misma durante la germinación; la plúmula es la yema del embrión en una semilla que dará origen a la parte aérea de la plántula; el nudo cotiledonar se conoce también como corona y se encuentra entre la plúmula y la radícula y en esta estructura se localizan los primordios de raíces laterales. La radícula es el extremo del hipocotilo del cual se desarrolla la raíz primaria y esta a su vez es protegida por la coleorriza (figura 2; Vincent, 2002).

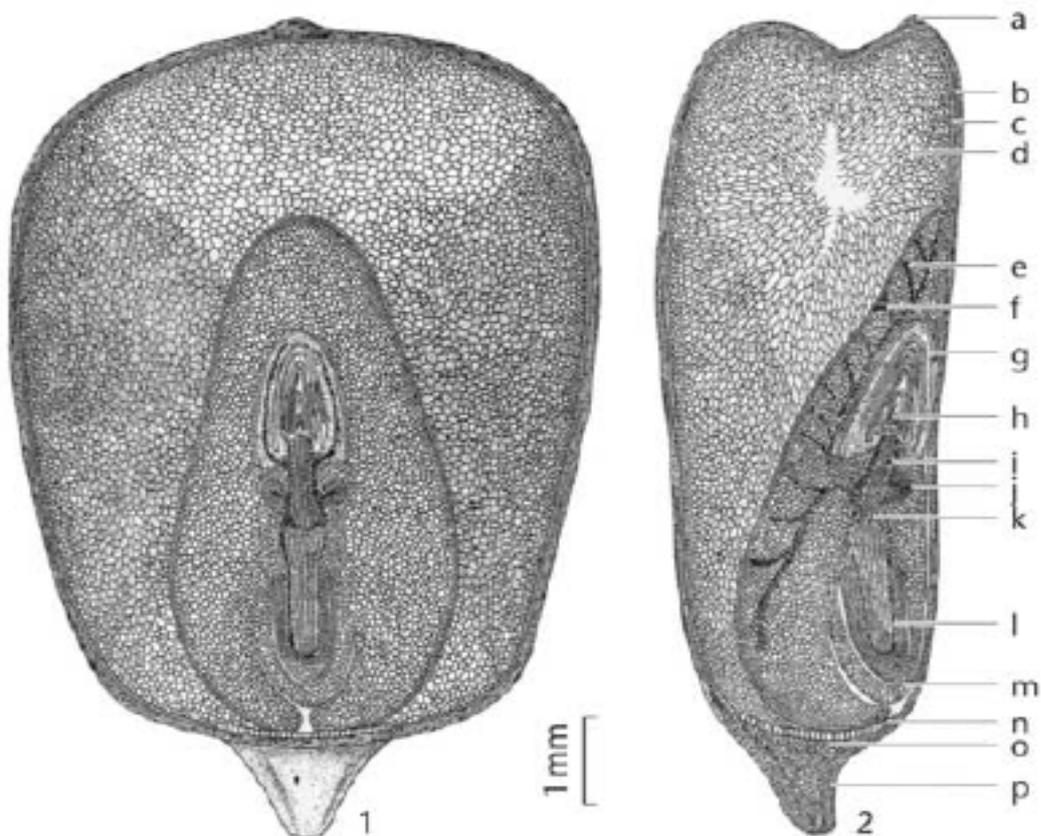


Figura 2. Estructura de una semilla de maíz madura: 1 y 2 son cortes de secciones verticales en dos planos de una semilla madura que muestran en detalle el arreglo de órganos y tejidos. **a**, hilio; **b**, pericarpio; **c**, aleurona; **d**, endospermo; **e**, escutelo; **f**, capa glandular del escutelo; **g**, coleoptilo; **h**, plúmula con tallo y hojas; **i**, primer internodo; **j**, raíz lateral adventicia; **k**, nodo escutelar; **l**, raíz primaria; **m**, coleorriza; **n**, conducto basal de células del endospermo; **o**, capa de abscisión (separación) café; **p**, pedicelo, (modificado a partir de Vincent, 2002).

I.4. GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ

La germinación comienza con la entrada de agua a la semilla quiescente (imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, generalmente la radícula (potrusión radicular) (Bewley y Black,1994). Este evento involucra la activación de procesos físicos, químicos, bioquímicos y genéticos coordinados tanto anatómica como temporalmente. Desde un punto de vista bioquímico, se puede decir que la germinación es la reiniciación de la actividad metabólica y el crecimiento por parte de los tejidos que constituyen a la semilla; esto involucra la rehidratación, la utilización de reservas y el desarrollo gradual de sistemas sintéticos que transforman al embrión en una planta joven y que la capacitan para asumir una existencia autótrofa.

Durante la germinación, la secuencia de eventos fisiológicos y bioquímicos que parecen ser comunes a un gran número de semillas de gramíneas puede dividirse en i) eventos tempranos, los cuales incluyen: hidratación, síntesis de proteínas, síntesis reparativa de DNA y síntesis de RNA; ii) eventos tardíos: expansión celular, movilización de reservas y síntesis replicativa de DNA. En cada evento se presenta un sistema de control del avance germinativo (Bewley y Black, 1994). Antes de la germinación de las semillas, las células de los embriones están detenidas en la fase G1 y al germinar se reactiva el ciclo celular dando origen a la replicación del DNA y a la división celular. Cabe destacar que nuestro laboratorio dedicado al estudio de las fases del ciclo celular ha adoptado la siguiente definición operacional de la germinación: la germinación de la 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 hasta llegar a la primera división celular, la cual en nuestro concepto marca el inicio del proceso de desarrollo (Vázquez-Ramos, J.M y Sánchez, M.P. 2003).

I.5. IMBIBICIÓN

La toma de agua por la semilla madura es trifásica (figura 3). El influjo inicial de agua (**fase I de imbibición**), es el resultado del bajo potencial matricial de la semilla seca (de las paredes celulares y de los componentes almacenados), los cuales rápidamente llegan a ser hidratados alcanzando el equilibrio o *plateau* al alcanzar entre el 70% y 80 % de contenido de humedad (**Fase II**). Un mayor incremento en la toma de agua ocurre solo después de que la germinación ha terminado y comienza la formación de plántula (**fase III**). El influjo de agua hacia las células de la semilla seca durante la fase I causa temporalmente alteraciones estructurales, particularmente a las membranas, lo cual resulta en una rápida y corta salida de iones y metabolitos de bajo peso molecular de la semilla. La salida de solutos de las células de las semillas embebidas es indicativa de la transición de los componentes fosfolipídicos de la membrana durante la fase de gel que se originó durante la maduración y el secado de la semilla, al estado de fase I que da cristalina. Muy probablemente, en esta transición ocurre el proceso de reparación de las membranas celulares (Bewley, 1997).

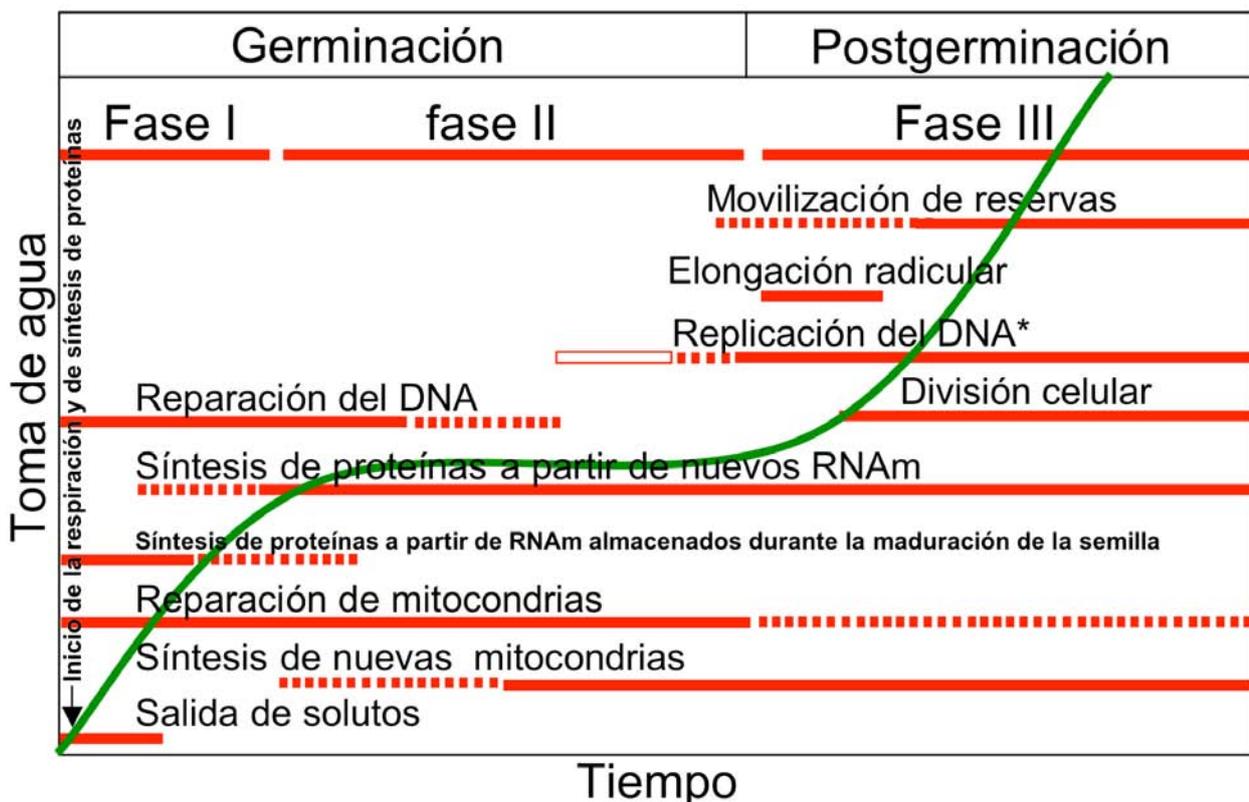


Figura 3. Curso temporal de eventos asociados a la germinación y post-germinación de semillas. El tiempo requerido para que los eventos sean completados varía desde algunas horas a muchas semanas, dependiendo de factores genéticos inherentes y de factores ambientales prevalecientes, particularmente, temperatura y disponibilidad de agua (modificado a partir de Bewley, 1997).

I.6. RESPIRACIÓN Y SÍNTESIS DE ATP

Las semillas embebidas reinician rápidamente la actividad metabólica. Las enzimas y estructuras celulares esenciales para ello se establecieron durante la maduración de la semilla. Una de las primeras actividades que se reinician es la respiración, la cual puede ser detectada a los pocos minutos después de iniciada la imbibición (figura 3). Las rutas glicolítica y de la vía oxidativa de las pentosas fosfato, así como del ciclo de Krebs se reinicia durante la fase I (Botha *et al.*, 1992). Los tejidos de las semillas secas contienen mitocondrias y, aunque pobremente diferenciadas, contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales para sintetizar cantidades adecuadas de ATP para mantener el metabolismo durante varias horas durante la fase I de la germinación.

I.7. SÍNTESIS DE RNA Y PROTEÍNAS

La síntesis de RNA es un evento temprano en la germinación (Datta *et al.*, 1983). Las RNA polimerasas DNA dependientes no son enzimas limitantes, ya que se han encontrado en trigo, cebada y soya en cantidades suficientes para catalizar la síntesis de RNAm tan pronto como se inicia la germinación (Bewley y Black, 1994). Sin embargo, el rápido aumento de la síntesis de proteínas durante las primeras etapas de la germinación es un evento independiente de la síntesis *de novo* de RNA mensajero (Spiegel y Marcus, 1975). En semillas de cereales se ha descrito la existencia de RNAm almacenados de dos tipos, aquellos que se traduciran en proteínas *housekeeping* y otras propias de la fase germinativa.

I.8. SÍNTESIS DE DNA

Al igual, la síntesis de proteínas y de RNA se reinicia tan pronto como los tejidos se embeben, la síntesis replicativa del DNA comienza más tarde. Este hecho se hace más evidente para la mayoría de las gramíneas; sin embargo, en el centeno existe desde los quince minutos de embibición un bajo nivel de síntesis de DNA que precede a la síntesis replicativa, la cual se sugiere puede ser de tipo reparativo (Osborne *et al.*, 1980;1981).

Se ha sugerido también que la síntesis de DNA en etapas tempranas de la germinación en semillas del centeno y el maíz es el resultado de la replicación organelar (Melendez *et al.*, 1990) y/o de la síntesis reparativa del DNA nuclear (Osborne *et al.*, 1984; Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Zaráin *et al.*, 1987).

La expansión de la radícula en la semilla ocurre inicialmente por elongación de las células y su salida subsecuente podría o no estar acompañada por división celular. La replicación del DNA celular es un requisito indispensable para que la división celular proceda (Bewley y Black, 1994).

II. CICLO CELULAR

El ciclo celular tiene como finalidad la división de la célula para dar origen a dos células hijas, genéticamente idénticas a la progenitora. En eucariontes, el ciclo celular está definido por cuatro fases, que bien podrían considerarse como una fase de duplicación del material genético (**fase S**) y una fase de repartición equitativa de éste entre las dos células hijas (**fase M**), separadas ambas por dos fases, **G1** y **G2**, en las que se regulan los tiempos y el orden de estos procesos. En ocasiones, cuando en una célula ha iniciado el camino hacia la proliferación, la entrada a la fase G1 se da a partir de un estadio celular denominado **G0**, en el cual la célula no se divide. Dentro de la fase G1 se encuentra una etapa temprana en la que se revisa el estado metabólico general de la célula, antes de avanzar a una etapa tardía, donde se presentan mecanismos reguladores que permitirán el inicio de la duplicación del ADN, o fase S. En la fase G1, los eventos tempranos están separados de los tardíos por un punto de restricción (**R**); este punto marca el límite después del cual la célula está comprometida a completar íntegramente el ciclo celular. Una vez que se completa la síntesis del ADN, se presenta otra fase de revisión (G2), donde los controles moleculares aseguran que el contenido duplicado de ADN se encuentre intacto antes de entrar a la fase de división cromosómica, o fase M. Finalmente, tras la citocinesis las células hijas se encuentran nuevamente en la fase G1 temprana, donde se decidirá si se inicia una nueva ronda de división o se toma el camino hacia una fase G1 no comprometida con el ciclo celular.

Una célula en proliferación puede abandonar el ciclo celular hacia un estado de desarrollo vegetativo o de diferenciación, y las decisiones para ello ocurren en la fase G1; al parecer, el punto de restricción en esta fase funciona como un punto de bifurcación: antes de consumir la ejecución de R la célula puede emprender el camino hacia diferentes estados celulares como la quiescencia, la diferenciación o la meiosis (o la vía de apareo en levaduras), mientras que la conclusión de R obliga a la célula a cumplir un riguroso programa de división celular.

La decisión de la vía a tomar está regulada en parte por diversos factores externos como las hormonas, el estado nutricional y por diferentes tipos de estrés; sin embargo, estos factores solo afectan a la fase G1 antes del punto R pero no cuando la fase G1 ha sido completado (Zuñiga-Aguilar, 1998).

Diversos estudios indican claramente que, tanto los controles moleculares que regulan el avance sobre R como aquellos que regulan los tiempos de duración de las otras fases del ciclo, están mediados por cascadas de fosforilación de proteínas. Estos sistemas de control del ciclo celular convergen en complejos clave formados por una ciclina y una cinasa dependiente de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés), los complejos ciclina/CDK (Pines, 1993), los cuales serán descritos a continuación.

Las ciclinas fueron inicialmente descubiertas en invertebrados marinos como proteínas que se acumulan en puntos y momentos específicos del ciclo celular y son subsecuentemente degradadas rápidamente (Evans *et al.*, 1983), aunque no todas tienen la característica de oscilar (Dewitte y Muray, 2003). Desde los años 90's del siglo pasado, se ha demostrado su presencia en todas las especies; en animales hay al menos 14 clases de ciclinas nombradas de la A a la L y T (Pines, 1995a; 1995b; Wang *et al.*, 2004), y especies semejantes existen en eucariotes inferiores y plantas, aunque la nomenclatura varía de acuerdo a la especie. Todas ellas tienen en común una secuencia peptídica bien conservada conocida como la "caja de ciclina", región que está relacionada con la unión a las CDKs (Lees y Harlow, 1993; De Veylder *et al.*, 1997), y una caja de degradación, la cual es susceptible a ubiquitinación lo que permite la rápida destrucción proteolítica por el proteosoma. Las ciclinas de la fase G1 tienen secuencias ricas en prolina, glutamato/aspartato y serina/treonina (PEST) en el extremo C-terminal, el cual es un marcador de recambio en proteínas (Francis, 2007).

Las ciclinas pueden ser divididas en dos grandes tipos o familias: las ciclinas de mitosis, en donde se agrupan las ciclinas A y B, y las ciclinas de G1 en donde se agrupan las ciclinas C, D y E.

Las cinasas dependientes de ciclina son un grupo de proteínas involucradas en la regulación de diferentes puntos de control en el ciclo celular. Todas ellas tienen en común una secuencia peptídica con un alto grado de similitud, así como de su capacidad de unirse y de ser activadas por las ciclinas, por lo que se conocen como CDKs.

La mayor parte de las CDKs han sido aisladas por reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican una región altamente conservada, la secuencia PSTAIRE región presente en el producto del gen *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe*. Así, se han identificado las CDKs de la 1 a la 7 (Hutchinson y Glover, 1995).

La actividad de las CDKs es regulada de una manera compleja, incluyendo eventos de fosforilación/desfosforilación por cinasas/fosfatasaes específicas. Uno de estos eventos es llevado a cabo por la cinasa activadora de CDK (CAK). Esta enzima, compuesta de la ciclina H, la cinasa CDK7 y una proteína de ensamblaje, Mat1, activa al complejo ciclina/CDK por fosforilación en el residuo Thr-161 (Ciemerych y Sicinski, 2005). La fosforilación de los residuos Thr-14 y Tyr-15 por la cinasa Wee1 interfiere con la correcta unión de ATP y, por lo tanto, inhibe la actividad de las CDKs. Estas fosforilaciones inhibitorias son eliminadas por la acción de la fosfatasa Cdc25 (Larkins *et al.*, 2001).

Por otra parte, también existen otras proteínas que se unen al complejo ciclina/CDK para regular negativamente su actividad en la fase G1 como lo son los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (ICK/KRP; De Veylder *et al.*, 2001). La fosforilación y desfosforilación es un mecanismo fundamental para la regulación del avance del ciclo celular. Los complejos ciclina/CDK son las moléculas que conducen la progresión del ciclo celular, regulando las diferentes transiciones, así como la salida del ciclo celular (Boniotti y Griffith, 2002). Se propone que la regulación de la expresión de genes en diferentes fases, específicamente en los puntos de control críticos en donde las células pasan de la fase G1 a S y de G2 a M, es un mecanismo importante para controlar la progresión del ciclo celular. Estos genes frecuentemente muestran una regulación dependiente de la posición del ciclo celular (Zhang *et al.*, 2005).

II.1. CICLO CELULAR EN MAMÍFEROS

II.1.1. Transición G1/S

El ciclo celular en mamíferos es un proceso altamente regulado, influido por señales regulatorias de crecimiento tanto positivas como negativas durante la etapa G1 del ciclo celular (Sheer y Roberts,1999).

Diferentes evidencias indican el papel crucial de los complejos ciclina/CDK para superar el punto de restricción y comprometer a la célula hacia el avance y conclusión del ciclo celular. Existen tres isóformas de las ciclinas D (D1, D2 y D3), cuya cantidad puede variar en diferentes tejidos y tipos celulares (Lew *et al.*,1991), y no son redundantes (Matsushime *et al.*,1994). Las ciclinas D forman complejos con las CDKs 4 y 6 (Xiong *et al.*,1992; Bates *et al.*,1994), aunque, la más importante al nivel del reinicio de la proliferación parece ser CDK4.

La restricción del ciclo celular en la fase G1 antes del punto de restricción está determinada por el secuestro del factor transcripcional E2F por el producto del gen de retinoblastoma, pRB (Weintraub *et al.*,1992). Esta es una fosfoproteína que regula negativamente el avance del ciclo celular en la fase G1 antes del punto R, uniendo a miembros de la familia de factores transcripcionales E2F impidiendo su actividad; la regulación de esta interacción está determinada por los niveles de fosforilación de pRB; sólo en su forma hipofosforilada es activa y puede unir a E2F (Ikeda *et al.*, 1996). Bajo condiciones aptas para la proliferación, el complejo de la ciclina D1/CDK4 se une a pRB y lo fosforila (Kato *et al.*,1993), reduciendo su afinidad por E2F y liberándolo, el cual en forma libre actúa promoviendo la transcripción de genes relacionados con la síntesis de nucleótidos y del DNA, como la timidilato cinasa, timidilato sintetasa, ribonucleótido reductasa, dihidrofolato reductasa, cdc2, DNA polimerasa α , DNA ligasa (Dalton,1992; Means *et al.*,1992), requeridos para la entrada y mantenimiento de la fase S. Bajo condiciones adversas para la proliferación, por ejemplo bajo limitación de nutrientes o cuando existe daño en el DNA, la actividad del complejo ciclina D1 /CDK4 es inhibida por la acción de una proteína conocida como p53, a través de la transcripción de productos génicos como el inhibidor específico de complejos ciclina/CDK, la proteína p21^{cip1} (Xiong *et al.*,1993; Dulic *et al.*, 1994).

Este inhibidor es miembro de una familia que contiene también a p27^{Kip1} (Polyak *et al.*,1994b) y a p57^{Kip2} (Lee *et al.*,1995; Matsuoka *et al.*,1995). La forma de actuar de todos ellos parece tener un mecanismo común: los complejos ciclina/CDK actúan como molde induciendo en el inhibidor una reordenación estructural en el extremo N-terminal (altamente conservado en todos los miembros), lo que les permite unirse fuertemente dentro de la interfase ciclina-CDK interfiriendo con el dominio de unión al ATP del complejo ciclina/CDK (Russo *et al.*,1996). De esta manera, la proteína p53 opera la detención del ciclo celular antes del punto de restricción hasta que las condiciones metabólicas normales son restablecidas. Debido a esta función de revisión de la integridad del DNA, función que no es la única, p53 es conocida como el guardian del genoma (Lane, 1992).

Una vez que se sobrepasa el punto R, la actividad del complejo ciclina E/CDK2 es esencial para la entrada a la fase S (Knoblich *et al.*,1994). Esta actividad tiene un pico máximo en la transición G1/S y disminuye rápidamente conforme el ciclo avanza hacia la parte media y final de la fase S (Dulic *et al.*1992). La relevancia de la ciclina E para la entrada a la fase S probablemente esté relacionada con la formación de un complejo en asociación con pBR y E2F (Lees *et al.*,1992). Debe de recordarse que E2F promueve la transcripción de genes relacionados con la replicación del DNA.

También el control de la replicación en la fase S está altamente regulado; las células eucarióticas han desarrollado estrategias para asegurar tanto la integridad del DNA antes y después de su replicación, como la prevención de la re-replicación del genoma antes de la conclusión de la mitosis.

Complejos ciclina E/CDK o ciclina A/CDK se requieren para la iniciación de la replicación semiconservativa del DNA *in vitro* (Krude *et al.*,1997). Por otro lado, se ha detectado la citolocalización del complejo ciclina A/CDK2 en los focos activos de replicación, lo que sugiere un papel de este complejo en la replicación del DNA (Cardoso *et al.*,1992).

De manera similar, se ha demostrado la citolocalización del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) junto a complejos ciclina/CDK en los focos de replicación (Xiong *et al.*,1992). PCNA es una proteína que se une al DNA en forma circular, sujetando a la DNA polimerasa δ al DNA, aumentando su procesividad (Kelman, 1997).

En condiciones de daño al DNA, la proteína inhibidora de complejos ciclina /CDK, p21^{WAF1/cip1} se une fuertemente por su extremo carboxilo a PCNA, bloqueando la interacción de éste con proteínas del replisoma, como la DNA Polimerasa δ (Gulbis *et al.*,1996), inhibiendo directamente la replicación.

II.1.2.Transición G2/M

En esta transición se encuentra otro de los puntos de retención del ciclo celular (Hutchison y Glover,1995). Nuevamente, el papel regulador final está sustentado por un complejo ciclina /CDK. La transición G2/M está universalmente regulada por el complejo ciclina B/p34^{cdc2} (originalmente MPF; Nurse, 1990). MPF se acumula durante las fases S y G2 en el citoplasma, pero se mueve al núcleo al comienzo de la profase (Pines y Hunter,1991), localizándose en la lamina nuclear, en el huso mitótico y otras estructuras. La actividad de MPF se elimina por destrucción de la ciclina al final de la fase M, permitiendo el reingreso de las células a la fase G1.

Durante la fase G2, la actividad del complejo está regulada diferencialmente por fosforilación:

a) Una actividad reguladora positiva (CDK Activating Kinase, CAK) fosforila a p34^{cdc2} en residuos de treonina (Kaldis *et al.*,1996). La purificación de CAK en mamíferos, estrella de mar y *Xenopus* ha identificado un complejo trimérico compuesto por una subunidad catalítica, p40MO15/CDK, una subunidad reguladora, la ciclina H, y un factor de ensamblaje, Mat1. CAK fosforila no solo a p34^{cdc2}, sino a otras CDK, incluyendo a CDK4 y CDK6; b) Una actividad reguladora negativa fosforila en residuos Thr 14 y Tyr 15 a p34^{cdc2} (Norbury *et al.*, 1991). La transición hacia la fase M se logra con la desfosforilación de los residuos Thr 14 y Tyr 15, por medio de la proteína fosfatasa específica cdc25 (Russell y Nurse, 1986). En mamíferos existen tres fosfatasas Cdc25, codificadas por tres genes relacionados, *Cdc25A*, *Cdc25B* y *Cdc25C*. Cdc25A regula principalmente la transición G1/S, mientras que Cdc25B y Cdc25C controlan la transición G2/M (Ciemerych y Sicinski, 2005).

II.2. INHIBIDORES DE CDKs EN MAMÍFEROS

La actividad de los complejos ciclina/CDK es negativamente regulada por pequeños polipéptidos, los llamados inhibidores de CDKs (CKIs) (Cánepa *et al.*, 2007), los cuales inducen el arresto del ciclo celular o retrasan la progresión del ciclo celular en respuesta a señales intracelulares o extracelulares (Verkest *et al.*, 2005).

En mamíferos existen dos familias de CKIs que se han caracterizado de acuerdo a su estructura y a su CDK blanco. La familia INK4 consiste de cuatro proteínas: p16^{INK4a} (Serrano *et al.*, 1993), p15^{INK4b} (Hannon y Beach, 1994), p18^{INK4c} (Guan *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 1995), y p19^{INK4d} (Chan *et al.*, 1995; Hirai *et al.*, 1995), las cuales son exclusivas de la fase G1. Las proteínas INK4 contienen múltiples repeticiones de ankirina y sólo se unen para inhibir a los complejos con CDK4 y CDK6. Generalmente, las proteínas INK4 compiten con las ciclinas de tipo D para unirse a CDK4 o a CDK6 (Parry *et al.*, 1995; 1999; McConnell *et al.*, 1999) y estas proteínas son producidas en la célula de manera tipo dependiente. p16^{INK4a} se acumula progresivamente en senescencia, posiblemente inducido por un temporizador de la senescencia (Alcorta *et al.*, 1996; Zindy *et al.*, 1997), y es el principal supresor de tumores. p15^{INK4b} es estimulada por TGF- β para inducir el arresto del ciclo en la fase G1 (Hannon y Beach, 1994; Reynisdóttir *et al.*, 1995; Reynisdóttir y Massagué, 1997). Las proteínas p18^{INK4c} y p19^{INK4d} son producidas durante el desarrollo embriogénico en forma tejido-específico y permanecen en niveles altos en muchos tejidos adultos (Morse *et al.*, 1997; Zindy *et al.*, 1997; Phelps *et al.*, 1998; De Clercq *et al.*, 2006).

La familia de inhibidores de CDKs, la llamada Cip/Kip consiste de tres miembros: p21^{cip1} (Xiong *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994), p27^{kip1} (Polyak *et al.*, 1994^a; 1994^b; Toyoshima y Hunter, 1994) y p57^{kip2} (Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995) e inhiben un amplio espectro de complejos ciclina/CDK de la transición G1/S (Stals y Inzé, 2001; Leibovitch *et al.*, 2003). Los inhibidores Cip/Kip también funcionan como ensambladores y estabilizadores de los complejos ciclina D/CDK4/6 en el citoplasma. Aparentemente, estas proteínas son requeridas en bajas concentraciones para la formación del complejo ciclina/CDK y a altas concentraciones para inhibir la actividad de la CDK (Zhou *et al.*, 2003). Estas proteínas contienen motivos característicos dentro de su secuencia N-terminal que permiten su enlace e inhibición a los complejos ciclina/CDK (Chen *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996).

Varias proteínas Cip/Kip son reguladas diferencialmente a través de factores externos e internos, tienen diferente expresión en el tejido y tienen una función diferente en el desarrollo (Todd *et al.*, 2001).

Todas las proteínas Cip/Kip muestran una homología significativa. p21^{cip1} es una proteína de 164 aminoácidos y es la más pequeña del grupo, mientras que p27^{kip1} y p57^{kip2} están compuestas de 198 y 316 aminoácidos respectivamente (Todd *et al.*, 2001). El extremo N-terminal de las tres proteínas contiene un dominio con alta homología y es el responsable de la unión a las CDKs y de su función inhibitoria. Este dominio tan estrecho (60 aminoácidos) es suficiente para inhibir a las CDK (Toyoshima y Hunter, 1994; Luo *et al.*, 1995). Ya que estas proteínas desempeñan muchas de sus funciones en el núcleo, todas ellas tienen una secuencia de localización nuclear (NLS) al final del extremo C-terminal. p21^{cip1}, a diferencia de p27^{kip1} y p57^{kip2}, contiene un dominio de unión a PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), el cual es un factor de procesividad para la DNA polimerasa δ y la interacción entre PCNA y p21^{cip1} bloquea la síntesis de DNA sin afectar la reparación del DNA (Zhang *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995). Así, la interacción de p21^{cip1} con PCNA puede coordinar la replicación y la reparación a lo largo del ciclo celular. Por otra parte, se ha demostrado que p21^{cip1} inhibe la proliferación celular, y la expresión ectópica de p21^{cip1} da como resultado en el arresto del ciclo celular en la fase G1 (Harper *et al.*, 1995). Tanto p21^{cip1} como p27^{kip1} regulan la proliferación celular a través de sus interacciones físicas en el núcleo con las CDKs (Coqueret, 2003; Lacy *et al.*, 2004; Leibovitch *et al.*, 2003). A diferencia de p21^{cip1}, p27^{kip1} y p57^{kip2} contienen un dominio QT al final del extremo C-terminal el cual es importante para regular la vía de transducción de señales (Chang *et al.*, 2003). En contraste al inhibidor de CDKs, INK4a, que se une a la CDK y bloquea la habilidad de la ciclina para activar la cinasa, p27^{kip1} se une a ambas, a la ciclina y a la CDK.

Las proteínas Cip/Kip son reguladores tanto positivos como negativos del ciclo celular (Sherr y Roberts, 1999). Se ha demostrado que estas proteínas inhiben la actividad de cinasa asociado a las ciclinas D y E. El extremo N-terminal de p27^{kip1} contiene un dominio de unión a CDK con una homología del 42% con p21^{cip1} (Lloyd *et al.*, 1999).

Por otra parte, se conocen varios factores que regulan la expresión y la función de $p27^{kip1}$. $p27^{kip1}$ fue primeramente descrita en células tratadas con TGF- β . En estas células, $p27^{kip1}$ forma un complejo con ciclina E/CDK2, inactivando la cinasa y causando el arresto de la fase G1 (Polyak *et al.*, 1994).

Además, cuando $p27^{kip1}$ forma complejo con la ciclina E/CDK2, puede bloquear la fosforilación del complejo por una cinasa activadora de CDK (CAK). Adicionalmente, a $p27^{kip1}$ se le ha implicado como el mediador de estímulos antimitogénicos y tiene una función importante a la hora de tomar la decisión de si la célula se compromete a seguir por el ciclo celular o retirarse de él (Kato *et al.*, 1994; Nourse *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994a).

Como los otros miembros de la familia Cip/Kip, $p57^{kip2}$ es un potente inhibidor de CDKs de la transición G1/S (Todd *et al.*, 2001). $p57^{kip2}$ contiene dos dominios adicionales, uno rico en prolina y un dominio ácido, de los cuales se piensa que median interacciones proteína-proteína (Suzuki *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995).

Lo mismo que $p21^{cip1}$, $p57^{kip2}$ contiene un dominio de unión a PCNA en el extremo C-terminal y la interacción entre $p57^{kip2}$ y PCNA previene la síntesis de DNA dependiente de PCNA (Watanabe *et al.*, 1998). Por otra parte, los niveles de la proteína $p57^{kip2}$ son regulados por la degradación proteolítica mediada por el complejo ubiquitina/SCF^{Skp2} (Kamura *et al.*, 2003). Varios estudios han establecido recientemente que las proteínas Cip/Kip podrían desempeñar funciones adicionales como factores potenciales de ensamblamiento, reguladores de apoptosis o en la migración celular, y como cofactores transcripcionales (Coqueret, 2003). La expresión de estas dos grandes familias de inhibidores depende del estado metabólico o del desarrollo de las células, o aún, de la integridad del genoma, implicando que diferentes efectores controlan su presencia y acumulación (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Por último, se sabe que ambas familias proteicas, las INK4 y las Cip/Kip juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer (Hirama y Koeffler, 1995; Kamb, 1998; Roussel, 1999; Ortega *et al.*, 2002; Coqueret, 2003).

II.3. CICLO CELULAR EN PLANTAS

El mecanismo básico de la regulación del ciclo celular está conservado entre todos los eucariontes, y muchos de estos componentes se han identificado en plantas (Stals y Inzé, 2001), a pesar de que éstas tienen características únicas de desarrollo, y numerosos aspectos del ciclo celular en plantas son específicos.

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

El ciclo celular es controlado por CDKs, y su activación requiere de la unión con una ciclina (Pines, 1999); la actividad de este complejo ciclina/CDK es regulado por la fosforilación y la desfosforilación de las CDKs (Dunphy, 1994) y por proteínas reguladoras de la degradación proteolítica de las ciclinas dependiente del ciclo celular (King *et al.*, 1996; Peters, 1998). En la regulación también participa la localización subcelular de los complejos ciclina/CDK (Ohi y Gould, 1999), así como la existencia de inhibidores de las CDKs, los ICKs ya que éstos pueden inhibir la actividad de los complejos ciclina/CDK (Sherr y Roberts, 1995; 1999). Cabe mencionar que las proteínas homólogas de ICKs en plantas llevan por nombre KRP (Kip Related Protein, por sus siglas en inglés), (De Veylder *et al.*, 2001; Weinl *et al.*, 2005; Verkest *et al.*, 2005) ya que en plantas estos inhibidores presentan similitud con el inhibidor $p27^{Kip1}$ de mamíferos, como se describirá más adelante.

Varias clases de CDKs se han identificado en plantas: CDKA, CDKB, CDKC, CDKD, CDKE, y CDKF (Joubés *et al.*, 2000; Vandepoele *et al.*, 2002).

La primera clase, CDKA, está estrechamente relacionada con las CDKs de levaduras Cdc2 y Cdc28 y en mamíferos con CDK1 y CDK2, y contiene el motivo *PSTAIRE*, el cual es esencial para la unión a las ciclinas. A nivel de transcrito y a nivel de proteína, la CDKA de plantas está constantemente presente a lo largo del ciclo celular (Hemerly *et al.*, 1993; Porceddu *et al.*, 2001) y esta involucrada en la transición de ambas fases G1/S y G2/M (Hemerly *et al.*, 1995; Porceddu *et al.*, 2001).

La segunda clase, CDKB, es única de plantas y a diferencia de CDKA, su expresión está estrictamente controlada por el ciclo celular. Además, CDKB se clasifica en dos subgrupos: CDKB1, con el motivo *PPTALRE*, presente de la fase S a la mitosis, y CDKB2 con el motivo *PPTTLRE* la cual es producida en un periodo más restrictivo de la fase G2 a M (Fobert *et al.*, 1996; Magyar *et al.*, 1997; Umeda *et al.*, 1999; Porceddu *et al.*, 2001). Las CDKs tipo C y E se caracterizan por su respectivo motivo *PITAIRES* y *SPTAIRES* en su dominio de unión a ciclina (Joubés *et al.*, 2000); sin embargo, poco se sabe de sus funciones (De Clercq *et al.*, 2006). Por otra parte, las CDKs D y F forman parte de la cinasa activadora de CDK (CAKs) y de la cinasa activadora de CAK (CAKAKs) (Umeda *et al.*, 1998; Shimotohno *et al.*, 2004).

Las CDKs por si solas no tienen actividad de cinasa y por lo tanto deben de asociarse con proteínas ciclinas para ser activadas. Al igual que en mamíferos, en plantas, la unión de la ciclina no sólo activa las CDKs por la inducción de una alteración en los sitios catalíticos, sino que también contribuye a la localización subcelular y a la especificidad del sustrato del complejo, así como a la regulación de la estabilidad de la proteína (Mironov *et al.*, 1997; Potuschak y Doerner 2001; Criqui y Genschik 2002; Pines, 1995a). La fluctuación periódica de las ciclinas a niveles transcripcional y transduccional es consistente con la actividad celular estadio-específica de la CDK. Generalmente, cada CDK interactúa con un subconjunto específico de ciclinas para participar en una fase específica del ciclo celular (Nigg, 1995; Pines 1996; Umeda *et al.*, 1999). Las ciclinas de plantas forman grupos filogenéticamente distintos a las ciclinas de mamíferos, sugiriendo que la función de las ciclinas no se especificó antes de la divergencia evolucionaría de los linajes de plantas y animales. Además, cada grupo de ciclinas de plantas tiene más miembros que el equivalente al grupo en animales.

Esta observación probablemente refleja la habilidad de las plantas a responder a señales ambientales y de desarrollo de manera planta-específica (De Clercq *et al.*, 2006). Por ejemplo, a pesar del tamaño pequeño del genoma de *Arabidopsis thaliana* éste contiene al menos 32 ciclinas con un papel potencial en la progresión del ciclo celular. No obstante, la nomenclatura de las ciclinas de plantas esta basada en la similitud funcional con su contraparte en mamíferos (De Clercq *et al.*, 2006), y se ha clasificado en tres principales grupos: CYCA, CYCB y CYCD (Renaudin *et al.*, 1996).

Las ciclinas de tipo D regulan la aduana de la transición G1/S, trabajando de manera mitógeno-dependiente en asociación con la CDKA (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999, 2000; Healy *et al.*, 2001), y están posiblemente involucradas en el control de la transición de G2/M (Schnittger *et al.*, 2002; Kono *et al.*, 2003; Koreleva *et al.*, 2004).

Las ciclinas de tipo A participan en el control de las fases S y M y estan asociadas con la CDKA o con CDKB (Roudier *et al.*, 2000). Las ciclinas de tipo B afectan la transición G2/M y la progresión del ciclo celular intra-mitótico en conjunción con ambos miembros CDKA y CDKB (Weingartner *et al.*, 2003, 2004). Debido a que los niveles de las ciclinas fluctúan en el ciclo celular, las ciclinas de plantas son los principales factores que determinan el momento de activación de las CDKs.

En la entrada a G1 y durante la transición G1/S, el mecanismo pRB/E2F es el blanco de los complejos ciclina/CDK, semejante a como ocurre en células animales. La proteína relacionada a pRB de plantas, o RBR y las proteínas E2F/DP son reguladores claves para controlar el comienzo de la replicación al estimular la transcripción de genes necesarios para la progresión de la fase G1 hacia S, de manera similar a como ocurre en animales (Vandepole *et al.*, 2002; Rossi y Varotto, 2002). La presencia de un mecanismo mediado por pRB para la regulación del ciclo celular en plantas fue evidenciada por dos líneas de investigación: la existencia de ciclinas de tipo D que contienen el motivo LxCxE (el cual media la unión de la ciclina con pRB en células humanas) y la identificación de proteínas en geminivirus que también contienen el motivo LxCxE y que es requerido para la eficiente replicación viral en células en cultivo (Xie *et al.*, 1995).

Los genes codificantes de pRB fueron descubiertos por primera vez en maíz y después en otras especies de plantas. La proteína pRB es fosforilada por complejos ciclina D/CDKA y la fosforilación ocurre de manera dependiente del ciclo celular, produciendo su máximo en la transición G1/S; esta fosforilación inactiva a RBR y provoca la subsecuente liberación del factor de transcripción E2F/DP en su forma activa (De Veylder *et al.*, 2003). Los genes codificantes de E2F y DP también se han identificado en plantas.

En el genoma de *Arabidopsis* están presentes seis genes E2F y dos genes DP (DPa y DPb). E2F a/b/c tienen una organización típica al unirse al DNA, en su heterodimerización con DP (a ó b), y en su interacción con los dominios de transactivación de RBR (de Jager *et al.*, 2001; Mariconti *et al.*, 2002; Kosugi y Ohashi, 2002a). Además, E2Fa y E2Fb son potentes activadores transcripcionales; mientras que E2Fc carece de un dominio de transactivación y por lo tanto actúa como represor (Joules, 2003; Del Veylder *et al.*, 2003; De Jager *et al.*, 2005).

Los otros tres miembros, E2F d/e/f, son típicos en tener por duplicado el dominio de unión al DNA y por no dimerizarse con DP (de Jager *et al.*, 2001; Mariconti *et al.*, 2002; Kosugi y Ohashi, 2002a). Por lo anterior, es asombroso que se observe que, a pesar de un billón de años de evolución separando animales y plantas, ambos tipos de organismos usen la misma ruta RB/E2F/DP para controlar la transición G1/S. Aún la secuencia canónica de DNA (TTTCCCGC) reconocida por el factor de transcripción E2F de animales es idéntica en plantas (Ramírez-Parra y Gutierrez, 2000; de Jager *et al.*, 2001). Esta identidad sugiere a favor de la hipótesis de que la ruta RB/E2F/DP ya se había desarrollado en organismos primitivos, antes de la brecha entre animales y plantas (Inzé, 2005). Por lo anterior, cabe mencionar que una de las distintas formas de controlar la actividad de las CDKs es mediante los inhibidores de CDKs (ICKs) que estequiométricamente se unen a las CDKs e inhiben su actividad de cinasa. En plantas también se han encontrado estos inhibidores (Wang *et al.*, 1998; De Veylder *et al.*, 2001; Jasinski *et al.*, 2002; Weinl *et al.*, 2005).

II.3.1 INHIBIDORES DE CDKs EN PLANTAS

Las plantas también contienen proteínas inhibitorias de complejos ciclina/CDK con una estructura un poco peculiar. Todos los inhibidores de CDK comparten un dominio de 31 amino ácidos con p27^{Kip1}, un miembro de la familia Cip/Kip de inhibidores de CDK en mamíferos. Este dominio conservado es esencial para la interacción entre CDKs y ciclinas y está localizado en el extremo N-terminal de las proteínas Cip/Kip y en el extremo C-terminal de los inhibidores de plantas (Wang *et al.*, 1997; De Veylder *et al.*, 2001). Basada en esta similitud, los inhibidores de CDK de plantas fueron designados Kip Related Proteins (KRPs; De Veylder *et al.*, 2001).

La expresión de los genes KRP es consistente con su papel en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo y en respuesta a señales ambientales (Inzé, 2005).

En *Arabidopsis* se caracterizaron 7 ICKs/KRPs, (ICK1/KRP1, ICK2/KRP2, KRP3, KRP4, KRP5, KRP6, y KRP7), que sólo muestran una secuencia similar limitada con el inhibidor Cip/Kip de mamíferos (Wang *et al.*, 1997; Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001). Las KRPs interactúan con CDKA;1 y con ciclinas tipo D (Schnittger *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003b), pero no con las CDKs tipo B (Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001). Las funciones de los dominios C-terminal y N-terminal se han determinado para KRP1. Mediante análisis por remoción de secuencias se sugiere que el dominio conservado C-terminal es esencial para la interacción con CDKA;1 y CYCD3;1 (Wang *et al.*, 1998) y además confirma la unión a los complejos ciclina /CDK y su papel en la regulación de la actividad de CDK. Además de esto, la región N-terminal causa un incremento en la estabilidad de KRP1 (Schnittger *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003a). Mientras que, el dominio central es responsable de la localización nuclear (Zhou *et al.*, 2003a).

La expresión de los genes KRP de *Arabidopsis* se regula por fitohormonas y éstos muestran un patrón de expresión tejido-específico y de desarrollo. La expresión de KRP1 es relativamente baja en todos los tejidos de las plantas, pero se sobre-expresa en presencia de ácido abscísico y por tratamientos a baja temperatura (Wang *et al.*, 1998).

Diferentes perfiles de expresión de los genes KRP de *Arabidopsis* se han observado en diferentes órganos y en cultivos de células en suspensión (Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Richard *et al.*, 2001; Menges *et al.*, 2005). KRP2 es regulada transcripcionalmente por auxinas y puede funcionar en la prevención de la iniciación del crecimiento de las raíces laterales (Himanen *et al.*, 2002).

Los genes de KRP se dividen en tres grupos de acuerdo a sus diferentes patrones de expresión: la expresión de KRP1 y KRP2 se restringe a tejidos en endoreduplicación; KRP4 y KRP5 se expresan en células en división mitótica y KRP3, KRP6 y KRP7 cumplen ambas funciones, en células en endoreduplicación y en células en división mitótica (De Clercq *et al.*, 2006).

Poco se sabe de como estas proteínas son reguladas a los niveles traduccional y postraduccional. Sólo KRP2 se ha mostrado que es controlada en el nivel postraduccional por la degradación dependiente del proteosoma, *in vitro* e *in vivo* (Verkest *et al.*, 2005). Además, el análisis *in vitro* muestra que la proteólisis de KRP2 depende de la fosforilación por las CDKs.

Se han identificado KRPs en otras especies de plantas, además de *Arabidopsis*: *Chenopodium rubrum*, chícharo (*Pisum sativum*), algodón (*Gossypium hirsutum*), tabaco (*Nicotiana tomentosiformis*) y maíz (*Zea mays*); en las dos últimas, una (*NtKIS1a*) y dos ICKs/KRPs (KRP1 y KRP2) han sido identificadas respectivamente (Jesinski *et al.*, 2002a, 2002b; Coelho *et al.*, 2005). Todas ellas muestran una secuencia homóloga con las KRPs de *Arabidopsis* y con los inhibidores Cip/Kip de mamíferos. Todas las KRPs interactúan con ciclinas de tipo D pero no con CDKs de tipo B. Además, algunas de las KRPs interactúan con CDKs de tipo A, mientras que otras no (Jesinski *et al.*, 2002; De Clercq *et al.*, 2006).

La primera ICK de tabaco identificada (*NtKIS1a*) inhibe la actividad de cinasa de los complejos ciclina/CDK en células de tabaco BY-2. En un sistema de doble híbrido, *NtKIS1a* mostró interacción tanto con CDK como con ciclinas D, pero no con PCNA, sugiriendo que está más estrechamente relacionada a p27^{Kip1} que a p21^{Cip1} (Jesinski *et al.*, 2002). Las KRPs de maíz inhiben los complejos ciclina D/CDK y Ciclina A/CDK. La expresión de los genes *Zeam1*;KRP resulta en la reducción del crecimiento en callos embriogénicos de maíz (Coelho *et al.*, 2005).

También en tomate (*Lycopersicon esculentum*) se sabe que la KRP1 (*LeKRP1*), inhibe la actividad de cinasa de los complejos ciclina/CDK en células endoreduplicando en el tejido locular (Bisbis *et al.*, 2006).

En plantas monocotiledoneas, se han estudiado las características estructurales y funcionales de las KRPs. Recientemente Coelho *et al.*, (2005) reportó la caracterización de dos genes de maíz, *Zeama;KRP1* y *Zeama;KRP2*, los cuales son expresados durante el desarrollo del endospermo. Las proteínas codificantes inhiben la actividad de CDK en planta, y *Zeama;KRP1* parece funcionar durante el proceso de endoreduplicación, en la formación del endospermo (Coelho *et al.*, 2005).

Por otra parte, en arroz (*Oryza sativa*) se identificaron cinco genes de KRP (*Oryza;KRP1* - *Oryza;KRP5*) con secuencias similares con respecto a otros genes de plantas, y para la ICK de mamíferos p27^{Kip1}. Se ha visto que la relación entre las secuencias de las KRPs de arroz y las de otras plantas es más fuerte en una región de 40 amino ácidos que esta localizada en el extremo C-terminal de cada proteína KRP, la cual se cree esta involucrada en la interacción con ambas, con la ciclina D y con los complejos ciclina D /CDK (Wang *et al.*, 1998). Además, las dos KRPs reportadas recientemente en maíz (Coelho *et al.*, 2005) están relacionadas estrechamente con las KRPs de arroz. Cada KRP de maíz se agrupa con dos o tres miembros de las KRPs de arroz formando dos subgrupos de KRPs de monocotiledoneas. Basado en sus secuencias, el grupo de KRPs de arroz se queda alineado en dos grupos que vienen de un ancestro común (clades). El análisis filogenético sugiere que las monocotiledoneas poseen esencialmente dos diferentes clases de KRPs.

III. ANTECEDENTES

En plantas, la maquinaria básica que controla el ciclo celular es semejante a la de mamíferos, además de que se han reportado proteínas y actividades enzimáticas similares (Mironov *et al.*, 1999). En los últimos años, nuestro grupo de trabajo se ha centrado principalmente en la fase G1 del ciclo celular y su relación con la entrada a la fase S en un proceso de desarrollo como lo es la germinación de semillas de maíz. Para este propósito, nos hemos enfocado al estudio y comprensión de las proteínas que determinan la entrada a la fase G1 del ciclo celular, como lo son las ciclinas de tipo D y la cinasa CDK-A (Nakagami *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2002) y en una proteína fundamental para la fase S, PCNA. Independientemente de la función propuesta en la fase S, y a semejanza de lo que se ha encontrado en células de mamíferos, durante la germinación de maíz, PCNA también se asocia simultáneamente a ciclinas tipo D y a CDK-A (Sánchez *et al.*, 2002). Estos complejos ternarios muestran actividad de cinasa tipo CDK-A y esta actividad parece ser más relevante en las etapas iniciales de la germinación, precisamente cuando se desarrolla la fase G1 del ciclo celular. Además, la composición de los complejos ternarios y la actividad de cinasa, parecen ser reguladas por fitohormonas durante la germinación (Sánchez *et al.*, 2002), tales como citocininas (BA) y ácido abscísico (ABA) (Sánchez *et al.*, 2005). Hemos reportado la expresión de cuatro diferentes ciclinas de maíz durante la germinación y mostrado que las citocininas y las auxinas estimulan la expresión de cada ciclina de forma diferente (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Se ha monitoreado la expresión de la ciclina D2;1 de maíz, a nivel de proteína y el efecto de BA y ABA durante la germinación (Gutiérrez *et al.*, 2005). También se ha caracterizado el comportamiento de otras dos ciclinas a nivel de proteína, Cyc D5 y Cyc 4;1 y se ha demostrado que ni la BA ni el ácido indol acético (IAA) estimulan la acumulación de las ciclinas durante la germinación. Sin embargo, las fitohormonas, particularmente IAA, incrementan la actividad de cinasa asociada, preferencialmente en horas tempranas de la germinación; esta actividad de cinasa es fuertemente inhibida tanto por olomoucina (Inhibidor específico de CDKs), como por un péptido de 118 aa que corresponde al extremo carboxilo terminal de una proteína de tipo ICK/KRP de maíz (Lara-Nuñez *et al.*, 2008).

Tomando en cuenta lo anterior, el estudio de las proteínas de tipo ICK/KRP es de interés para la comprensión de la regulación del ciclo celular durante la germinación del maíz. La descripción de la expresión del gen tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína durante la germinación (de Jesús Juárez *et al.*, 2008), así como también la influencia de fitohormonas tales como BA y ABA pueden sugerir la forma en que es controlada la fase G1 del ciclo celular durante germinación de semillas.

IV. HIPOTESIS:

Dado que las cantidades de la proteína ZmKRP1 de maíz fluctúan durante el ciclo celular, se esperaría que su transcrito presente diferentes niveles de expresión a lo largo del ciclo celular.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

- ▶ Caracterizar molecularmente a ZmKRP1 durante la germinación de maíz

V.2 Objetivos particulares

- ▶ Clonar el cDNA completo de la proteína ZmKRP1 de maíz.
- ▶ Evaluar el patrón de expresión de ZmKRP1 en ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de germinación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los ejes embrionarios se obtuvieron de semillas de maíz de la variedad Chalqueño, proveniente del Valle de Chalco, Edo. de México.

VI.2. TRATAMIENTO DE LOS EJES EMBRIONARIOS

VI.2.1. ENSAYO DE GERMINACIÓN

Se desinfectaron lotes de 10 ejes embrionarios con NaClO al 0,1 % durante 30 segundos. Se lavaron 5 veces con agua estéril durante 30 segundos por vez y se dejaron secar sobre papel filtro estéril por 15 minutos. Posteriormente se colocaron en cajas petri a las cuales se les había colocado con anterioridad papel filtro al cual se adicionó el amortiguador de imbibición (Tris HCl 50 mM pH 7.6, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y sacarosa al 2%), y se pusieron a germinar por un periodo de 0, 6, 12, 18 y 24 horas. Conforme se fueron cumpliendo los tiempos de germinación, se obtuvo el ARN total por el método de TRIZOL® (Invitrogen TRizol® Reagent), ver más adelante.

V.2.2. OBTENCIÓN DE ARN TOTAL

El ARN total fue obtenido a partir de 10 ejes embrionarios de maíz utilizando el reactivo TRIZOL®, siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen), de acuerdo al método descrito por Chomczynski (1993), con ligeras modificaciones. Brevemente, se tomaron 10 ejes embrionarios, se colocaron dentro de un mortero, al cual se le agregó nitrógeno líquido, se trituraron hasta obtener un polvo fino de aspecto y forma homogénea, se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 mL al cual se le adicionó Trizol (1,5mL/100mg de tejido), se agitó vigorosamente, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 11,600 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó la pastilla y se pasó el sobrenadante a otro tubo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente; se le agregó 0,3 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 11,600 rpm por 15 min a 4°C, se colectó la fase acuosa y se le añadió isopropanol frío (0,5mL/ mL de trizol). Se mezcló por inversión (4 o 5 veces), y se incubó por 1 hora a -20°C; se centrifugó a 11,600 rpm por 10 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante, y se lavó la pastilla con 1,0 mL de etanol al 70%, se agitó vigorosamente hasta que la pastilla se removió del fondo del tubo, enseguida se centrifugó a 7,500 x g por 5 minutos a 4°C, se dejó secar la pastilla de ARN con vacío o al aire libre por 5 ó 10 minutos, se resuspendió la pastilla en agua libre de ARNasas y se almacenó a -70 °C. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm, y se evaluó su pureza usando la relación entre las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, ya que este valor debe encontrarse entre 1.8 y 2.0 para que pueda considerarse aceptable la extracción. Adicionalmente, se corrió una muestra en un gel de agarosa al 1%, se consideró que el ARN está íntegro cuando las bandas correspondientes a los ARN ribosomales presentaron aproximadamente una intensidad 2/1 en la proporción 28S/18S.

VI.2.3. AISLAMIENTO DEL cDNA DE ZmKRP1 DE MAÍZ

Para el aislamiento del cDNA que codifica a la proteína ICK/KRP de maíz, se llevó a cabo un análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones codificantes de diversas KRPs de arroz (*Oriza Sativa*, KRP1-KRP5), de la secuencia ICK1Zm obtenida en el laboratorio, así como de las secuencias *Zeama;KRP1* (**AY986792**) y *Zeama;KRP2* (**AY986793**) de maíz reportadas por otros grupos. Con base en este análisis, se consideraron regiones que hipotéticamente podrían servir a nuestro fines, esto es, obtener la secuencia completa de la ICK1Zm. Se consideraron regiones conservadas hacia el extremo N-terminal de los genes completos para obtener los oligonucleótidos sentido, y hacia el extremo N-terminal de la secuencia parcial ICK1Zm, de donde se diseñaron los oligonucleótidos antisentido (**reverse**) [en marco de lectura].

VI.2.4. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (RT) Y ANÁLISIS DEL TRANSCRITO DE ARN

La reacción de RT-PCR se realizó con los siguientes oligonucleótidos:

Sentido	Nombre
5'-ATG/GGC/AAG/TAC/ATG/CGC/AAG/GCC-3'	(Zeama;KRP1Forw)
5'-GCC/ATG/GAG/AGG/ATT/ACC/AGG/GAG-3'	(ZmKRP1F Forw)
5'-ATT/CAG/GTG/ATG/GTG/TGA/GCC/ACA/C-3'	(Actin1 Forw)
Antisentido	
5'-CTC/CCT/GGT/AAT/CCT/CTC/CAT/GGC-3'	(ZmKRP1F Rev)
5'-GCT/TAC/CCC/ACT/CAA/ACC/TGC/CTG/GG-3'	(Zeama;KRP1 Rev)
5'-GCC/ACC/GAT/CCA/GAC/ACT/GTA/CTT/CC-3'	(Actin1 rev)

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se realizó la reacción de RT-PCR con el Kit OneStep RT-PCR (QIAGEN[®]), como indica el protocolo del kit. Para una reacción de 50 μ L de volumen total, agregar: 10 μ L de 5x QIAGEN OneStep RT-PCR buffer (que contiene 12,5 mM MgCl₂); 2 μ L de la mezcla de dNTPs ; 1 μ L del primer A (sentido); 1 μ L del primer B (antisentido), la concentración de ambos primers es 0,6 μ M; 2 μ L de QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix; inhibidor de ARNasas (la adición de éste es opcional); 350 ng RNA como templado y agua libre de ARNasas, la temperatura de alineamiento se realizó a 60° C / 1minuto, 72° C / 1 minuto y 35 ciclos.

Una vez que la reacción se llevó a cabo bajo estas condiciones, se obtuvo el producto de RT-PCR. El cDNA respectivo se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE y bromuro de etidio, se observaron las bandas correspondientes al cDNA de interés.

VI.2.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DEL cDNA (PCR)

Se realizó la reacción de PCR con el Kit AccuPrime™ SuperMix II (Invitrogen), como indica el protocolo del kit. Para una reacción de 25 µL de volumen total, agregar: 12,5 µL AccuPrime™ SuperMix II, el cual contiene en su formulación 40mM TrisHCl pH 8,4; 100mM KCl; 2mM MgCl₂; 400µM de cada uno de los desoxinucleótidos dGTP, dATP, dTTP, dCTP; AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, (thermostable AccuPrime™ protein stabilizers); 0,5 µL del primer A (sentido); 0,5 µL del primer B (antisentido), a una concentración final de 0,2 µM para ambos primers; 250 ng de DNA como templado; agua destilada (libre de DNAsas), cuanto baste para 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron 60 °C/1min, 72°C /1 min y 35 ciclos.

El producto de PCR se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con amortiguador TAE 1X. Se observó una banda de aproximadamente 350 pb, la cual se cortó y se purificó con la ayuda del Kit de Invitrogen Pure Link™ Quick Gel Extracción Kit (ver protocolo).

El cDNA purificado se clonó en el vector pGEM-T EASY® vector System de Promega; el producto de la ligación se utilizó para llevar a cabo la transformación de células competentes de la cepa *DH5-α* (ver protocolo), posteriormente con este producto se procedió a plaquear cajas petri con medio LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal.

Una de las bondades de este vector es que permitió seleccionar las clonas que contienen el cDNA de interés (inserto) ya que incluye un sitio múltiple de clonación y el gen que codifica para la β-Galactosidasa (*Lac Z*), por lo que al insertar el cDNA en esta región la enzima se inactivó y las colonias positivas pudieron ser seleccionadas debido a que presentaron un color blanco translúcido. Las colonias que presentaron una coloración azul carecen del cDNA de interés (inserto), ya que no se interrumpió el gen *Lac Z* y la β-Galactosidasa producida puede hidrolizar el análogo de la lactosa, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-tiogalactopiranosido), que al precipitarse da una coloración azul. Esto se llevó a cabo en presencia de IPTG, que induce la expresión del gen.

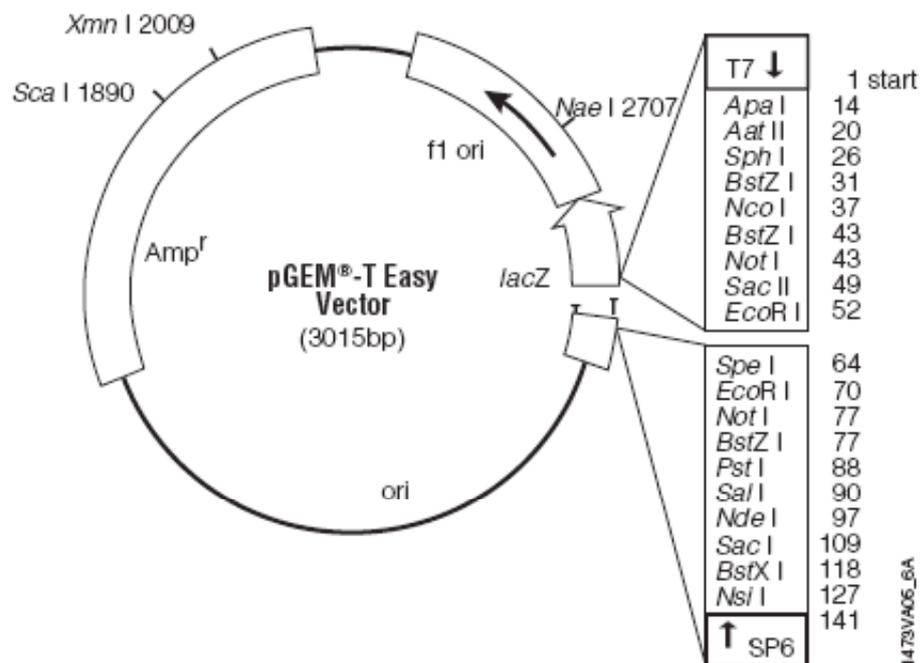
En base a este resultado se procedió a muestrear las colonias bacterianas que presuntamente contienen el plásmido con el inserto en cuestión, se sembraron en cajas petri con medio LB/ampicilina y en tubos de ensayo con medio LB/Ampicilina (líquido)

por 12 horas a 37°C, después de este tiempo se observó el crecimiento de las colonias, tanto en la caja petri (placa), como en tubo.

El contenido de los tubos (extracto celular) se centrifugó y se recuperó la pastilla celular (pellet) y se llevó a cabo la extracción del plásmido, conforme lo indica el protocolo del sistema Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep kit; una vez que obtuvimos el plásmido, se realizó una reacción de digestión con las enzimas de restricción *EcoR1/Not1* (Invitrogen), con el fin de liberar el inserto del vector de clonación pGEM-T EASY (figura 4 A y B), una vez que se corroboró este dato, el cDNA se secuenció para así inferir la secuencia de aminoácidos. A su vez se realizó un análisis con el programa computacional BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST/) a partir de la secuencia traducida del cDNA del producto de la reacción de PCR.

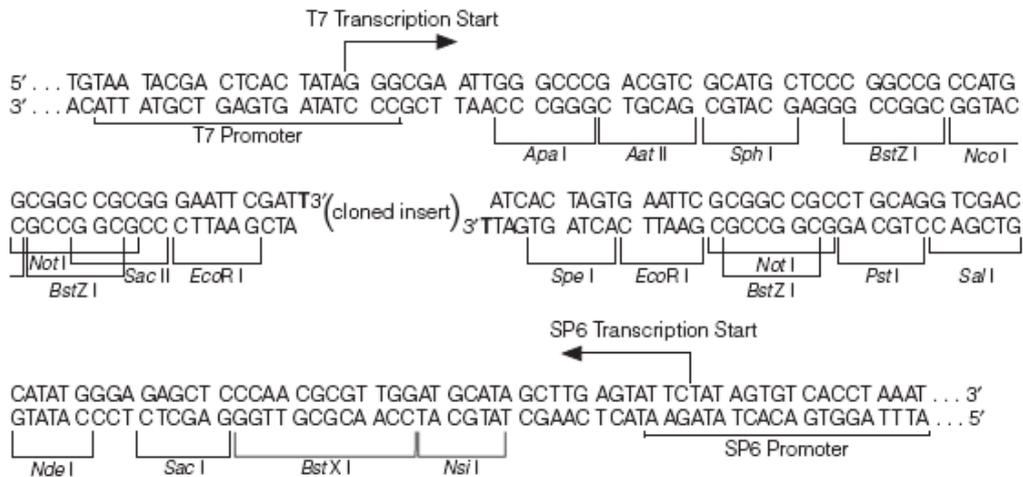
(A)

Vector pGEM® - T Easy



(B)

pGEM®-T Easy Vector



1517MA

Figura 4. (A) Vector de clonación pGEM®-T Easy y su sitio de clonación múltiple, que se utilizó para la clonación del fragmento de ZmKRP1E; (B) Sitios de corte de las enzimas *EcoR1/Not1*.

VI.2.6. RT-PCR SEMI-CUANTITATIVO

Para cuantificar el ARNm de las distintas muestras iniciales, se utilizó como control interno el gen de la actina 1, el cual muestra una expresión constitutiva. Utilizando oligonucleótidos específicos para el ARNm de interés y el de la Actina 1, en reacciones paralelas, se extrajeron muestras de 10 µL de la mezcla de reacción a distintos tiempos del proceso de amplificación antes de alcanzarse la saturación. Se comenzó el muestreo a partir de 23 ciclos, para ambas reacciones, tomando muestras cada 3 ciclos. El uso de oligonucleótidos para el gen de Actina 1 como transcrito control permite comprobar que cada muestra ha sido retrotranscrita a cDNA de forma equivalente y la amplificación por PCR ha sido también equivalente.

Los productos de cada reacción se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,5% con un amortiguador TAE 1X (tris acetato), y se tiñó con Bromuro de Etidio.

VI.2.7. RACE

En breve, el método RACE[®] (rapid amplification of cDNAs ends, por sus siglas en inglés), consistió en reacciones de transcriptasa reversa (RT) para obtener la síntesis de la primera cadena, y reacciones de PCR para la amplificación del producto. Para la obtención del cDNA completo, se partió de un solo extremo, sea este el 3' o el 5'; en nuestro caso fue el 5', ya que contabamos con el extremo 3' de la secuencia parcial de ICK1Zm. Se puede comenzar a partir de RNA total o se le puede poner una cola de poli-A; se llevó a cabo la síntesis de la primera cadena, en donde se usó un primer específico (*specific primer 1*, SP1, ver anexo II), que ha sido diseñado previamente, transcriptor de transcriptasa reversa y una mezcla de desoxinucleótidos; esto nos dio el cDNA. Posteriormente por acción de una RNAsa se degradó el molde de RNAm y se purificó el producto con la ayuda de un kit (*high pure PCR product purification kit*), en seguida se le pegó el extremo 3' del cDNA una cola de poli-A con dATP y TdT; se llevó a cabo la primera amplificación por PCR, la cola de cDNA es amplificada usando un SP2 anidado (*specific primer nested 2*, SP2), y el oligo *dT-primer de anclaje*; en seguida se llevó a cabo la segunda reacción de PCR, usando el SP3 anidado (*specific primer nested 3*, SP3), y el primer de anclaje de PCR. Una vez terminada la segunda reacción, el producto de PCR está listo para observarse mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (ver protocolo, *5'3'RACE kit, 2nd Generation, Roche, CAT.No. 03 353 621 001*).

VII. RESULTADOS

Se tiene como antecedente la secuencia parcial de un cDNA ICK/KRP de maíz, originalmente nombrado ICK1Zm con un tamaño de 355 pb, la cual corresponde al extremo 3' del gen. Esta secuencia mostraba un 61% de identidad a nivel de aminoácidos con respecto a una ICK de arroz y un 88% con respecto a Zeama;KRP1 de maíz (ver anexo I). Aunado a ello, ICK1Zm muestra una alta semejanza con respecto al extremo 3' de ICKs/KRPs de otras especies de plantas, como *Arabidopsis thaliana* y *Oriza sativa* (ver anexo I); (de Jesús Juárez *et al.*, 2008). Por otra parte, un nuevo análisis de alineamiento múltiple de secuencias reveló que ICK1Zm muestra un 90% de identidad con respecto a la Zeama;KRP1 de maíz y un 60% de identidad con la OsKRP4 de arroz (tabla1, figura 5). Sin embargo, ICK1Zm mostraba una región hacia su extremo N-terminal que diverge de manera sustancial con respecto a las ICKs/KRPs reportadas, particularmente la presencia de la secuencia de aminoácidos **WASTCAS** (figura 5 y anexo I).

Secuencia A	Nombre	#(aa)	Secuencia B	Nombre	# (aa)	identidad (%)
1	ZeamaKRP1	190	2	ZeamaKRP2	256	30
1	ZeamaKRP1	190	3	OsKRP5	221	59
1	ZeamaKRP1	190	4	OsKRP4	194	61
1	ZeamaKRP1	190	5	OsKRP3	225	20
1	ZeamaKRP1	190	6	OsKRP2	249	22
1	ZeamaKRP1	190	7	OsKRP1	262	31
1	ZeamaKRP1	190	8	ICK1Zm	117	90
1	ZeamaKRP1	190	9	EST	93	86
2	ZeamaKRP2	256	3	OsKRP5	221	31
2	ZeamaKRP2	256	4	OsKRP4	194	35
2	ZeamaKRP2	256	5	OsKRP3	225	28
2	ZeamaKRP2	256	6	OsKRP2	249	31
2	ZeamaKRP2	256	7	OsKRP1	262	58
2	ZeamaKRP2	256	8	ICK1Zm	117	25
2	ZeamaKRP2	256	9	EST	93	33
3	OsKRP5	221	4	OsKRP4	194	56
3	OsKRP5	221	5	OsKRP3	225	20
3	OsKRP5	221	6	OsKRP2	249	27
3	OsKRP5	221	7	OsKRP1	262	32
3	OsKRP5	221	8	ICK1Zm	117	51
3	OsKRP5	221	9	EST	93	62
4	OsKRP4	194	5	OsKRP3	225	26
4	OsKRP4	194	6	OsKRP2	249	23
4	OsKRP4	194	7	OsKRP1	262	39
4	OsKRP4	194	8	ICK1Zm	117	60
4	OsKRP4	194	9	EST	93	73
5	OsKRP3	225	6	OsKRP2	249	21
5	OsKRP3	225	7	OsKRP1	262	29
5	OsKRP3	225	8	ICK1Zm	117	20
5	OsKRP3	225	9	EST	93	23
6	OsKRP2	249	7	OsKRP1	262	30
6	OsKRP2	249	8	ICK1Zm	117	20
6	OsKRP2	249	9	EST	93	24
7	OsKRP1	262	8	ICK1Zm	117	25
7	OsKRP1	262	9	EST	93	33
8	ICK1Zm	117	9	EST	93	86

Tabla1. Porcentaje de identidad entre las distintas secuencias de aminoácidos, deducidas de las secuencias de cDNA de las ICKs/KRPs reportadas. En negritas se encuentra, Zeama;KRP1 (AY986792), OsKRP4 de arroz y ICK1Zm de maíz.

	<u>Forward</u>	
OskRP2	----MGKKKKRDGAAARRQARVVVGGVTR---AAVTAR-----RVVASAEEGCGLVGR	47
ZeamaKRP2	MGKYMRKCRGAAGAEVAAEVVTQVVGVRTRSRSAATGG-----VAKVAPRRKRAPAGE	54
OskRP1	MGKYMRKFRGATGEELAAMEVVTQVVGVRTRSRSAAGATTTKKAASAASTRRRKALLP	60
ZeamaKRP1	MGKYMRKAKASS-----EVVIMDVAAAPLG---VRTRAR-----ALALQRLQEQQTQWE	46
ICK1Zm	-----	
EST	-----	
OskRP4	MGKYMRKAKVVVSGEVVAAMMELAAAPLG---VRTRAR-----SLALQ-----	41
OskRP5	MGKYMRKGVSG-----EVAVMEVGGALLG---VRTRSR-----TLALQRTTSSQKPE	46
OskRP3	MGKYLRSSCKQQQPSSPAVASVAAAASVSS-----YSYLTLRSGRRVPAA	46
OskRP2	GGGGSGGGDDGEGGCYLRLRSRRLPFVAAAVVSSRREEALGDSVAEAASS--SSRAVEL	105
ZeamaKRP2	PAAAVSAGGDG-GSCYIHLRSRMLFMAPPQPQPSVDSVPTPVEAADGAAGQQGAALAGL	113
OskRP1	TAVVGTTRRDG-GSCYLQLRSRMLFMAPPRPAPAAR-APVVAEAGSGNG-AAAAHAAAGL	117
ZeamaKRP1	EGAGG-----EYLELRNRRLLEKL---PPPPATRRSGGRKAAEAATK-----	87
ICK1Zm	-----WASTCAS-----TAEATATK-----	15
EST	-----	
OskRP4	KRQGG-----EYLELRNRRLLEKLPPPPPPRRRATAAAAATADATAAES-----	85
OskRP5	KGEGDPGAGAGAGAAYLELRNRRLLEKPPHTPPAKEKETARRASAAAAAVRMPAAPQAA	106
OskRP3	AAAAGG-----SACRRRHRRGRRGCAKNGAGSARACGARSPTSSASSGQRRRCEAVEC	100
OskRP2	LGCSGEEEEAMA EKVCTQAGEDHDEESSVGDSGCGRERSATTPSSRRPPG-DADSSDAESN	164
ZeamaKRP2	SRCSSSTASSVNLGLGGQRGSHTCRSYDAAEAGGDHVLVDVSAANSNGSGPDRERRETTPS	173
OskRP1	SRCSSSTASSVDA--AAQDRSLACRS-DVAEAGSEHVPE--GSASDSASGRDRERRETTPS	172
ZeamaKRP1	----EAEASYG-ENMLELE--AMERITRETPCSLIN-TQMTSTPGS-TRSSH-CHRR	136
ICK1Zm	----EADASYG-ENMFELE--AMERITRETPCSLIN-TQMTSTPGS-TRSSH-RHRR	64
EST	-----ESE--AMGRNTRETPCSLIN-SEMISTPGSTTRSSH-SHRR	39
OskRP4	----AEAEVSFGGENVLELE--AMERNTRETPCSLIRDPDTISTPGSTTRSSHSSSHCK	139
OskRP5	EEFEAEVEVSFG-DNVLDLDGDAMERSTRETPCSLIRSEMISTPGSTTKINTSISRR	165
OskRP3	SHGGGRAELSRSPPLGNSVVVSGDVVSGERKSLKPNSCSREVAEEHAGEHKHNPAAAAA	160
: : .		
OskRP2	QEAKQQMCRRSSTTSAAAFHAG-----ATTRSFRMMAPPAAAAEIEEFLLAAERSEA	216
ZeamaKRP2	SRAHGELSDLES DLAG-HKTGPSLP----AATPAELIVPP--AHEIQEFFAAAEAAQA	225
OskRP1	SFLPGEVSDLES DLAGGQKRSRPLPSAATASAQQATRPKIPP--AAEIEAFFAAAEAAEA	230
ZeamaKRP1	V-----NAPPVH-AVPSS--REMNEYFAAEQRRQQ	163
ICK1Zm	V-----NAPPVH-AVPSS--REMNEYFAAEQRRQQ	91
EST	V-----KAPPVH-AIPSS--TEMNEYFAAEQRRQQ	66
OskRP4	V-----QTPVRHNIPAS--AELEAFFAAAEQRQR	167
OskRP5	R-----METSVCRYVPSS--LEMEEFFAAAEQQQH	193
OskRP3	AG-----RRPPLSPPE--AEIEAFFAAAE LAER	186
* . * : : : * : :		
OskRP2	ERFAAKYNFDVVRGVPLDAGGAGRFEWTA VGS-----	249
ZeamaKRP2	KRFASKYNFDVVRGVPLDAGG--RFEWAPVVISI-----	256
OskRP1	KRFASKYNFDVVRGVPLDAG--RFEWTPVVSRS-----	262
ZeamaKRP1	QDFIDKYNFDPANDCPLPGR---FEWVKLD-----	190
ICK1Zm	QDFIDKYNFDPANDCPLPGR---FEWVKLD-----	118
EST	QAFIDKYNFDPVND CPLPGR---FEWVKLD-----	93
OskRP4	QAFIDKYNFDPVND CPLPGR---FEWVKLD-----	194
OskRP5	QAFRERYNFCPVND CPLPGR---YEWTRLDC-----	221
OskRP3	RRFAEKYNYDIALDRPLQGR---YEWPTVPNFDVAKDVTDM	225
. * : * : . . * . : * :		
	<u>Reverse</u>	

Figura 5. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las diferentes ICKs/KRPs, en verde se encuentra marcada la secuencia **WASTCAS**. Así como se encuentran sombreadas de color amarillo y verde las regiones más conservadas, dentro de las cuales se encuentran las posiciones de los oligonucleótidos específicos (*primers*) que se ocuparán para llevar a cabo el aislamiento, de color azul *forward* 30nt y la sombra de color rojo *reverse* 24 nt (detalles, ver figura 6).

Con el fin de obtener la secuencia completa, se diseñaron oligonucleótidos antisentido (*reverse*) a partir de los primeros 24 nucleótidos (nt) del extremo 5' de ICK1Zm, y a su vez se diseñó un oligonucleótido sentido (*forward*) que se tomó de los primeros 30 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia de la Zeama;KRP1 de maíz (AY986792) (figura 6) [ver materiales y métodos]. Utilizando este juego de oligonucleótidos, se llevaron a cabo experimentos con el fin de obtener el cDNA respectivo, a partir de reacciones de transcriptasa reversa y de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se amplificó un transcrito de baja expresión de aproximadamente 350 pb (figuras 7A y B, carril 2), cuya secuencia no correspondía a la esperada.

Se optó por probar la metodología de RACE[®], que tiene como ventaja amplificar secuencias completas a partir de un solo extremo, sea este el extremo 5' o el 3'.

Los resultados obtenidos bajo este protocolo fueron en principio alentadores, ya que se amplificó un transcrito de un tamaño aproximado de 650 pb, el cual podría ser el esperado para nuestra proteína, ya que las secuencias para Zeama;KRP1 y Zeama;KRP2 tienen tamaños de 567 y 771 pb, respectivamente (Coelho *et al*, 2005). Sin embargo, al secuenciar el cDNA se obtuvieron resultados negativos (datos no mostrados). Por lo tanto, y reconsiderando la estrategia usada en un principio, se tomó la decisión de usar cebadores río abajo de la secuencia WASTCAS.

Como estrategia para lograr esto, se realizó un nuevo alineamiento múltiple de las secuencias deducidas (reportadas en la literatura) de las proteínas tipo KRPs de distintas especies, como maíz (2 KRPs), arroz (5 KRPs), un EST (Expressed Sequence Tag) reportado de maíz (AW267370), así como de la secuencia parcial ICK1Zm de maíz obtenida en nuestro laboratorio (de Jesús Juárez *et al.*, 2008). Este análisis indicó que la secuencia ICK1Zm tenía la mayor identidad con Zeama;KRP1 de maíz (tabla 1 y figura 5); con las mayores diferencias hacia el extremo N-terminal (figura 5).

Se realizó entonces una nueva comparación de secuencias de Zeama;KRP1 e ICK1Zm, con el fin de visualizar las secuencias a elegir, para así diseñar y sintetizar nuevos oligonucleótidos desde la región C-terminal (figura 6). Se conservó el oligonucleótido sentido desde el extremo 5' de Zeama;KRP1, y se optó por una secuencia de aminoácidos **AMERITRE**, que es idéntica en ambas secuencias, para el diseño del oligonucleótido antisentido (figura 6, anexo II).

```

ZeamaKRP1      MGKYMRKAKASSEVVIMDVAAAPLGVRTRARALALQRLQEQQTQWEEGAGGEYLELRNR 60
ICK1Zm      -----

ZeamaKRP1      LEKLPPPPATRRSGGRKAAAEAAATKEAEASYGENMLELEAMERITRETTPCSLINTQM 120
ICK1Zm      -----WASTCAS-----TAEATATKEADASYGENMFELEAMERITRETTPCSLINTQM 48
              *:* *      :***:****:*****:*****:*****

ZeamaKRP1      TSTPGSTRSSHRSCHRRVNAPPVHAVPSSREMNEYFAAEQRRQQQDFIDKYNFDPANDCPL 180
ICK1Zm      TSTPGSTRSSHRSRHRVNAPPVHAVPSSREMNEYFAAEQRRQQQDFIDKYNFDPANDCPL 108
              *****

ZeamaKRP1      PGRFEWKLD 190
ICK1Zm      PGRFEWKLD 118
              *****

```

Figura 6 . Alineamiento parcial de Zeama;KRP1 e ICK1Zm. Se señalo la region que se consideró para llevar a cabo el diseño del oligonucleótido antisentido.Region **AMERITRE** que aparece en ambas secuencias de maíz. Se considero conservar el oligonucleótido sentido **MGKYMRKAKA** de Zeama;KRP1 de maíz.

Los resultados de las reacciones de RT-PCR y PCR mostraron la amplificación de una banda de \approx 350 pb, a la cual se le asignó el nombre de ZmKRP1E (figuras 7 A y B, carril 4). El producto de la reacción de PCR se reamplificó y se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (figura 8 A). Por otra parte, se clonó el inserto de aproximadamente 350 pb en el vector de clonación pGEM-T Easy, se purificó el plásmido, al cual se le realizó una reacción de digestión con las enzimas *EcoR1/Not1*, para liberar el inserto del plásmido (figura 8 B). Posteriormente, el inserto de 327 pb se secuenció y de su análisis se encontró que correspondía a una ICK/KRP, con un 99% de identidad en términos de aminoácidos con Zeama;KRP1, hacia el extremo N-terminal, esto es, el extremo N-terminal de ZmKRP1E tenía una identidad de 99% con el extremo N-terminal de Zeama;KRP1 de maíz (tabla 2 y figura 9).

**(A) RT-PCR
DE ZmKRP1E DE MAÍZ**

(B) REAMPLIFICACIÓN

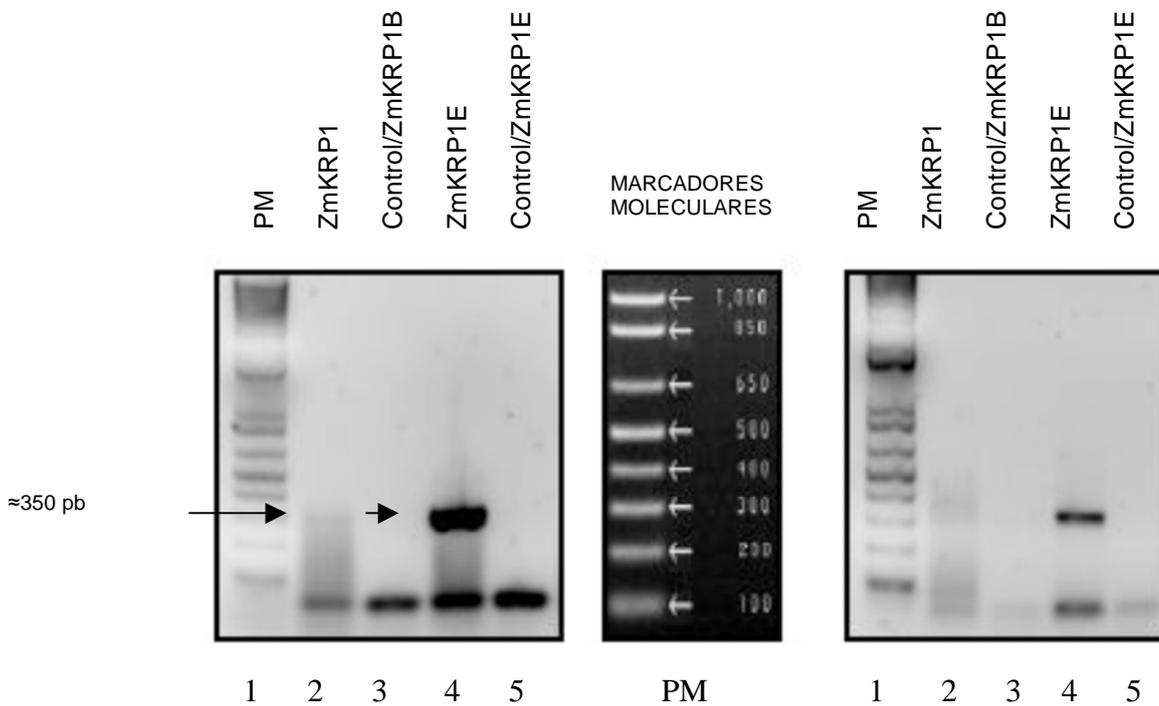
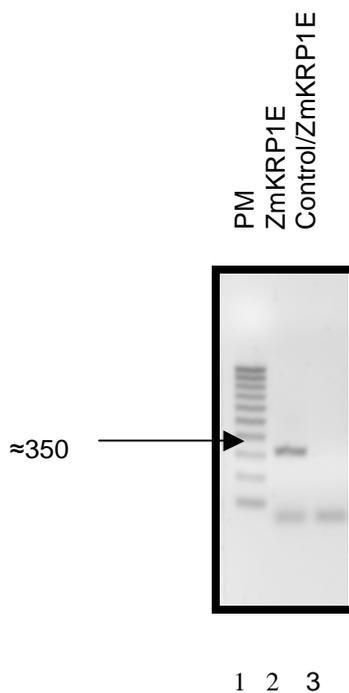


Figura 7. Productos de amplificación por RT-PCR de ZmKRP1E de maíz. (A) Reacción de RT-PCR a partir de mRNA total del cual se obtiene una banda de ≈ 350 pb, dando como resultado su respectivo cDNA, carriles: 1PM, 2 ZmKRP1B, 3 control, 4 ZmKRP1E, 5 control. Condiciones: 35 ciclos/60°; (B) Reamplificación del cDNA de ZmKRP1E, a partir de la reacción de PCR, carriles: 1PM, 2 ZmKRP1B, 3 control., 4 ZmKRP1E, 5 control. Condiciones: 35 ciclos/60°, [los controles constan de todo el medio de reacción para RT-PCR, PCR exceptuando el templado RNAm o cDNA respectivamente, se señala el producto esperado.

**(A) PURIFICACIÓN DEL cDNA
DEL cDNA DE ZmKRP1E**



**(B) REACCIÓN DE DIGESTIÓN
DEL PLÁSMIDO QUE CONTIENE
A ZmKRP1E**

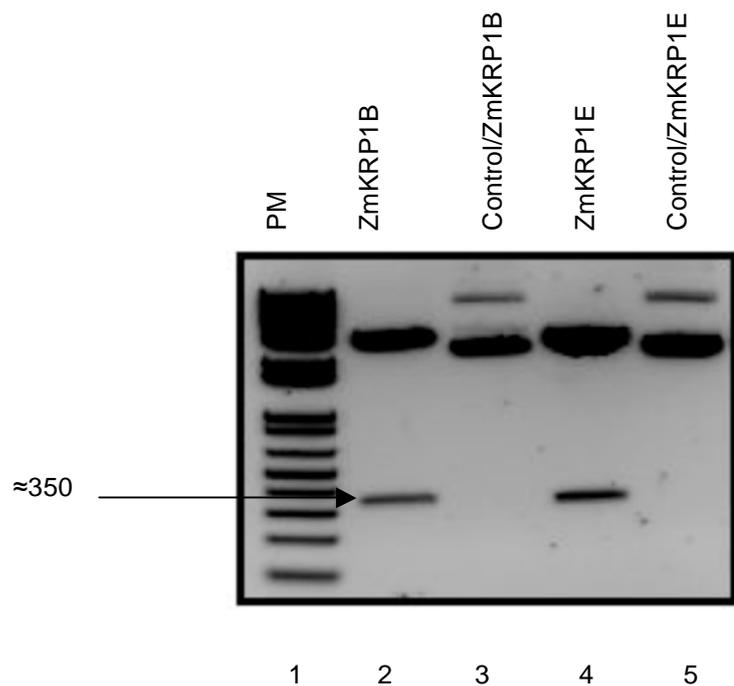


Figura 8. Purificación del cDNA de ZmKRP1E y reacción de digestión del plásmido que tiene contenido a ZmKRP1E; (A) producto de PCR de ≈ 350 pb, carriles: 1 PM, 2 ZmKRP1E, 3 control; (B) reacción de digestión del cDNA de ZmKRP1E, con las enzimas de restricción *EcoR1/Not1* carriles: 1PM, 2 ZmKRP1B, 3 control (plásmido sin digerir PGEM T-EASY), 4 ZmKRP1E, 5 control (plásmido sin digerir PGEM T-EASY).

Un análisis múltiple de secuencias también mostró que el extremo N-terminal de ZmKRP1E es 99% idéntico al extremo N-terminal de Zeama;KRP1 de maíz y comparte un 61% de identidad con OsKRP4 de *Oriza sativa*, que a su vez comparte el 61% de identidad con Zeama;KRP1 de maíz (tabla 3, figura 9).

Secuencia A	Nombre	#(aa)	Secuencia B	Nombre	#(aa)	identidad(%)
1	ZeamaKRP1	190	2	ZeamaKRP2	256	30
1	ZeamaKRP1	190	3	ZmKRP1E	109	99
1	ZeamaKRP1	190	4	OsKRP5	221	59
1	ZeamaKRP1	190	5	OsKRP4	194	61
1	ZeamaKRP1	190	6	OsKRP3	225	20
1	ZeamaKRP1	190	7	OsKRP2	249	22
1	ZeamaKRP1	190	8	OsKRP1	262	31
2	ZeamaKRP2	256	3	ZmKRP1E	109	30
2	ZeamaKRP2	256	4	OsKRP5	221	31
2	ZeamaKRP2	256	5	OsKRP4	194	35
2	ZeamaKRP2	256	6	OsKRP3	225	28
2	ZeamaKRP2	256	7	OsKRP2	249	31
2	ZeamaKRP2	256	8	OsKRP1	262	58
3	ZmKRP1E	109	4	OsKRP5	221	55
3	ZmKRP1E	109	5	OsKRP4	194	61
3	ZmKRP1E	109	6	OsKRP3	225	10
3	ZmKRP1E	109	7	OsKRP2	249	12
3	ZmKRP1E	109	8	OsKRP1	262	29
4	OsKRP5	221	5	OsKRP4	194	56
4	OsKRP5	221	6	OsKRP3	225	20
4	OsKRP5	221	7	OsKRP2	249	27
4	OsKRP5	221	8	OsKRP1	262	32
5	OsKRP4	194	6	OsKRP3	225	26
5	OsKRP4	194	7	OsKRP2	249	23
5	OsKRP4	194	8	OsKRP1	262	39
6	OsKRP3	225	7	OsKRP2	249	21
6	OsKRP3	225	8	OsKRP1	262	29
7	OsKRP2	249	8	OsKRP1	262	30

Tabla 2. Comparación de las secuencias de aminoácidos, y sus respectivos porcentajes de identidad.

OsKRP2	----MGKKKKRDGAAARRQARVVVGGVTR---AAVTAR-----RVVASAEEGCGLVGR	47
ZeamaKRP2	MGKYMRCRGAAGAEEVAAVEVTQVVGVRTRSRSAAATGG-----VAKVAPRRKRAPAGE	54
OsKRP1	MGKYMRFKRGATGEEELAAMEVTQVVGVRTRSRSAAAAGATTTKVKAASAASRRRKRALLP	60
ZeamaKRP1	MGKYMRAK--ASSEVV---IMDVAAAPLGVRTRARALA-----LQRLQEQQTQWE	46
ZmKRP1E	MGKYMRAK--ASSEVV---IMDVAAAPLGVRTRARALA-----LQRLQEQQAQWE	46
OsKRP4	MGKYMRAKVVVSGEVVAAAVMELAAAPLGVRTRARSLA-----LQKRQ-----	44
OsKRP5	MGKYMRAK--VSGEVA---VMEVGGALLGVRTRSRSLA-----LQRTTSSQKPE	46
OsKRP3	MGKYLRSCKQQQPSSPAVAASVAAAASVSSSYLTLRS-----GRRVPAAAAAA	50
	: . : ..	
OsKRP2	GGGGSGGDDGEGGCYLRLRSRRLPFVAAAVVSSRREEALGDSVAEAASS--SSRAVEL	105
ZeamaKRP2	PAAAVSAGGDG-GSCYIHLRSRMLFMAPPQPQPSVDSVPTPVEAADGAAGQQAALAAAGL	113
OsKRP1	TAVVGTTRRDG-GSCYLQLRSRMLFMAPPAPAPAAR-APVVAEAAAGSGNG-AAAHAAAGL	117
ZeamaKRP1	EG-----AGGEYLELRNRRLEKLPP--PPA----TTRR----SGGRK---AAAEAA	84
ZmKRP1E	EG-----AGGEYLELRNRRLEKLPP--PPA----TTRR----SGGRK---AAAEAA	84
OsKRP4	-----GGEYLELRNRRLEKLPP--PPP----PPRRRATAAAAT--ADATAA	83
OsKRP5	KGEGDPGAGAGAGAEYLELRNRRLEKPPPHTPPAKEKETARRASAAAAAVRMPAAPQAA	106
OsKRP3	GG-----SACRRRHRGGRRGCAKNGAGSARACGARSPSSASSGQRRRCEAVEC	100
	. . . *	
OsKRP2	LGCSGEEEMAIEKVTQAGEDHDEESSVGDGCGRERSATTPSSRRPPG-DADSSDAESN	164
ZeamaKRP2	SRCSSSTASSVNLGLGGQGRSHTCRSYDAEAGGDHVLVDVSAANSNGSGPDRERRETTPS	173
OsKRP1	SRCSSSTASSVDA--AAQDRSLACRS-DVAEAGSEHVE--GSASDSASGRDRERRETTPS	172
ZeamaKRP1	AT--KEAEASYG-ENMLELE-- AMERITRE TTPCSLIN-TQMTSTPGST--RSSHSCHRR	136
ZmKRP1E	AT--KEAEASYG-ENMLELE-- AMERITRE TTPCSLIN-TQMTSTPGST--RSSHSCHRR	109
OsKRP4	ES--AEAEVSVFGGENVLELE--AMERNRETTPCCLIRDPDTISTPGSTTRRSHSSSHCK	139
OsKRP5	EEFEAEVEVSVFG-DNVLDLDGDAMERSTRETTPCCLIRSEMISTPGSTTKTNTSISRR	165
OsKRP3	SHGGRAELSRSPPLGNVSVVSGDGVVSGERKSLKPNCSREVAEAEHAGEHKHNPAAAAA	160
	
OsKRP2	QEAQQMCRSSSTTSAAAFHAG-----ATTRSFRMMAPAAAAEIEEFLAAERSEA	216

```

ZeamaKRP2      SRAHGELSDLESFLAG-HKTGPSLP-----AATPAAELIVPP--AHEIQEFFAAAEAAQA 225
OsKRP1         SFLPGEVSDLESFLAGGQKRSRPLPSAATASAQQATRPKIPP--AAEIEAFFAAAEAEAE 230
ZeamaKRP1      V-----NAPPVH-AVPSS--REMNEYFAAEQRRQQ 163
ZmKRP1E       -----
OsKRP4         V-----QTPVRHNIIPAS--AELEAFFAAEEQRQR 167
OsKRP5         R-----METSVCRYVPSS--LEMEEFFAAAEQQQH 193
OsKRP3         AG-----RRPPLSPPE--AEIEAFFAAAECLAER 186

```

```

OsKRP2         ERFAAKYNFDDVVRGVPLDAGGAGRFEWTAVGSG----- 249
ZeamaKRP2      KRFAAKYNFDFVRGVPLDAGG--RFEWAPVVSI----- 256
OsKRP1         KRFAAKYNFDDVVRGVPLDAG---RFEWTPVVSSRS----- 262
ZeamaKRP1      QDFIDKYNFDPANDCPLPGR---FEWKLD----- 190
ZmKRP1E       -----
OsKRP4         QAFIDKYNFDPVNDPPLPGR---FEWKLD----- 194
OsKRP5         QAFRERYNFCPVNDPPLPGR---YEWTRLDC----- 221
OsKRP3         RRFAEKYNYDIALDRPLQGR---YEWPTVVPNFDVAKDVTDM 225

```

Figura 9. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de ZmKRP1E con polipéptidos deducidos de las secuencias de cDNAs de las Zeama;KRP1 (AY986792) y Zeama;KRP2 (AY986793) de maíz, así como de las KRPs de arroz (OsKRP1-OsKRP5).

Habiendo una relación muy estrecha entre la secuencia de Zeama;KRP1 y la secuencia parcial ICK1Zm, y sabiendo que la identidad es también muy alta hacia el extremo C-terminal (tabla 1, figura 5), se complementan las secuencias de los extremos N-terminal (ZmKRP1E) y C-terminal (ICK1Zm) de maíz, para así obtener la secuencia completa del gen, a la cual se le asignó el nombre de *ZmKRP1com*; al comparar con la secuencia de Zeama;KRP1 previamente descrita (Coelho *et al.*, 2005), el porcentaje de identidad fue del 98% en lo que respecta a la secuencia de aminoácidos (tabla 3, figura 10). No apareció la región WASTCAS, la que seguramente se debió a un artefacto en la secuenciación original de este gen.

Secuencia A	Nombre	#(aa)	Secuencia B	Nombre	#(aa)	identidad(%)
1	ZeamaKRP1	190	2	ZmKRP1com	190	98
1	ZeamaKRP1	190	3	ZmKRP1E	109	99
2	ZmKRP1com	190	3	ZmKRP1E	109	100

Tabla 3. Comparación de la secuencia complementada, porcentaje de identidad Zeama;KRP1 de maíz (AY986792) y la secuencia completa de la ICK/KRP de maíz ZmKRP1com, que no es más que la fusión de las secuencias ZmKRP1E (N-terminal) y la secuencia parcial ICK1Zm (extremo C-terminal) de maíz.

```

ZmKRP1.com      MGKYMRKAKASSEVVIMDVAAAPLGVRTRARALALQRLQEQQAQWEEGAGGEYLELRNRR 60
ZmKRP1E        MGKYMRKAKASSEVVIMDVAAAPLGVRTRARALALQRLQEQQAQWEEGAGGEYLELRNRR 60
ZeamaKRP1      MGKYMRKAKASSEVVIMDVAAAPLGVRTRARALALQRLQEQQAQWEEGAGGEYLELRNRR 60
                *****;*****

ZmKRP1.com      LEKLPPPPATRRSGGRKAAAEAAATKEAEASYGENMLELEAMERITRETTPCSLINTQM 120
ZmKRP1E        LEKLPPPPATRRSGGRKAAAEAAATKEAEASYGENMLELEAMERITRE----- 109
ZeamaKRP1      LEKLPPPPATRRSGGRKAAAEAAATKEAEASYGENMLELEAMERITRETTPCSLINTQM 120
                *****

ZmKRP1.com      TSTPGSTRSSHSRHRVNAPPVHAVPSSREMNEYFAAEQRRQQDFIDKYNFDPANDCPL 180
ZmKRP1E        -----
ZeamaKRP1      TSTPGSTRSSHSCHRRVNAPPVHAVPSSREMNEYFAAEQRRQQDFIDKYNFDPANDCPL 180

ZmKRP1.com      PGRFEWVKLD 190
ZmKRP1E        -----
ZeamaKRP1      PGRFEWVKLD 190

```

Figura 10. Alineamiento de la secuencia múltiple complementada *ZmKRP1.com*. Está consta de la secuencia ZmKRP1E (N-terminal) y la secuencia parcial ICK1Zm (extremo C-terminal) de maíz (*ZmKRP1.com*), con la secuencia completa de la Zeama;KRP1 de maíz (**AY986792**), más el extremo de ZmKRP1E de maíz.

Las figuras 11 A y B, muestran reacciones de RT-PCR y PCR de la secuencia completa de Zeama;KRP1 de maíz, añadiendo las secuencias de ZmKRP1E y Actina 1 como control de carga, realizadas a partir de RNA total de 0 horas (t_0) de ejes embrionarios de maíz. Es de notarse que en el carril 2, que corresponde a Zeama;KRP1 de maíz, se amplifica una banda extra de aproximadamente 200 pb cuya identidad se ignora (figura 11 A y B). Dado que nuestro gene es idéntico al ya reportado (Coelho *et al.*, 2005), en lo sucesivo se llamará a esta secuencia ZmKRP1 (**antes ZmKRP1E**).

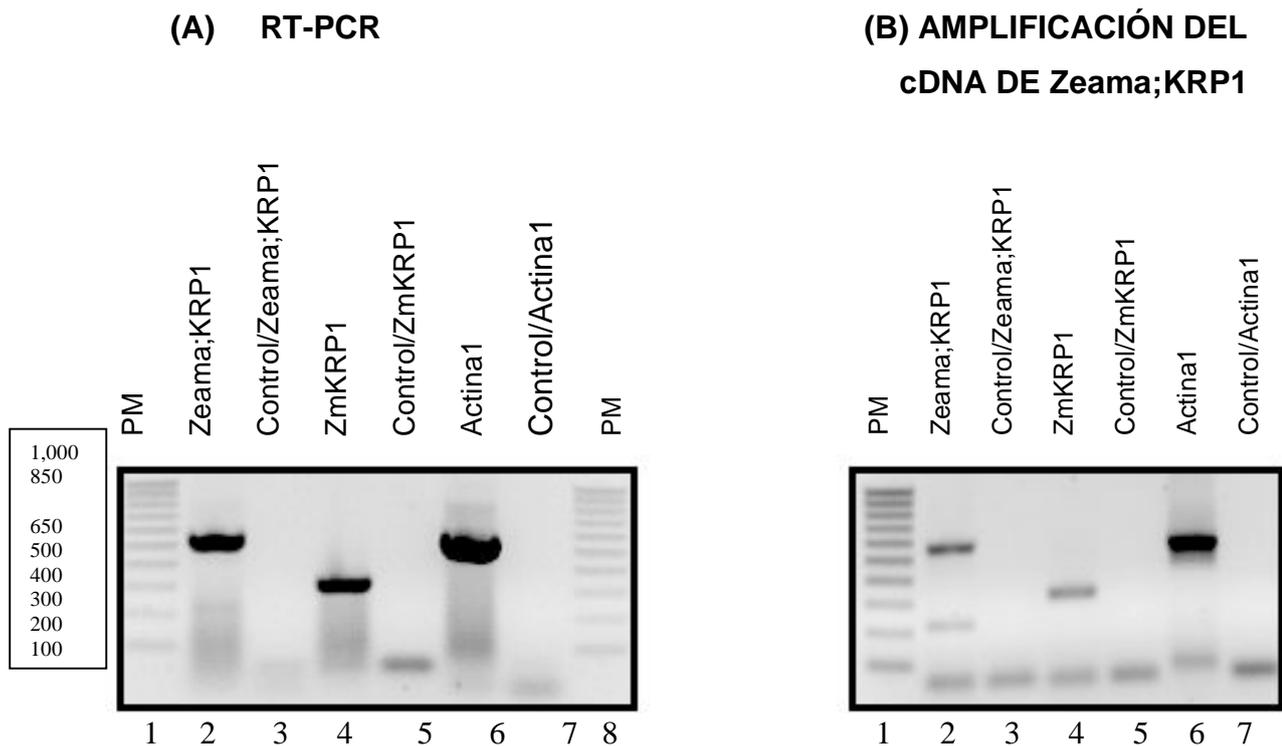


Figura 11.(A) Reacción de RT-PCR de los transcritos de **Zeama;KRP1** de maíz: **567 pb** (carril 2 y su control carril 3); **ZmKRP1 327 pb** (antes ZmKRP1E) (carril 4 y su control carril 5); Actina1 como control de carga (carril 6 y su control carril 7); pesos moleculares (carriles 1 y 8); (B) Reacción de PCR de los transcritos de ZeamaKRP1(carril 2 y su control carril 3); ZmKRP1 (carril 4 y su control carril 5); Actina1 como control de carga (carril 6 y su control carril 7) de maíz y pesos moleculares (carril 1), los controles constan de toda la mezcla de reacción, a excepción del molde (según sea el caso).

VII.1. EXPRESIÓN DE ZmKRP1 DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN

Con el fin de estudiar la expresión de ZmKRP1 durante la germinación de maíz, se implementó un ensayo, el cual consistió en incubar por 0, 6, 12, 18 y 24 horas a ejes embrionarios en amortiguador de imbibición, para posteriormente obtener el ARN total de cada uno de los tiempos establecidos y así llevar a cabo reacciones de RT-PCRs semicuantitativas.

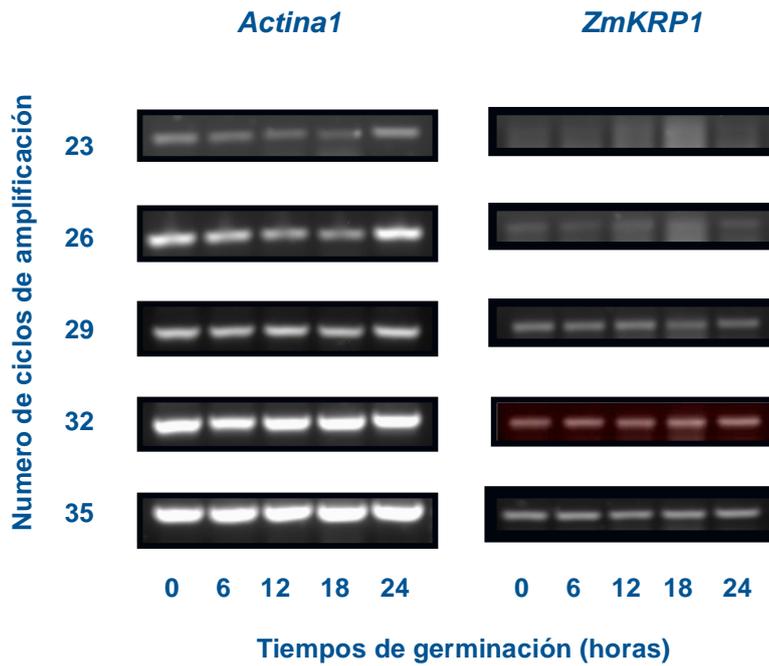
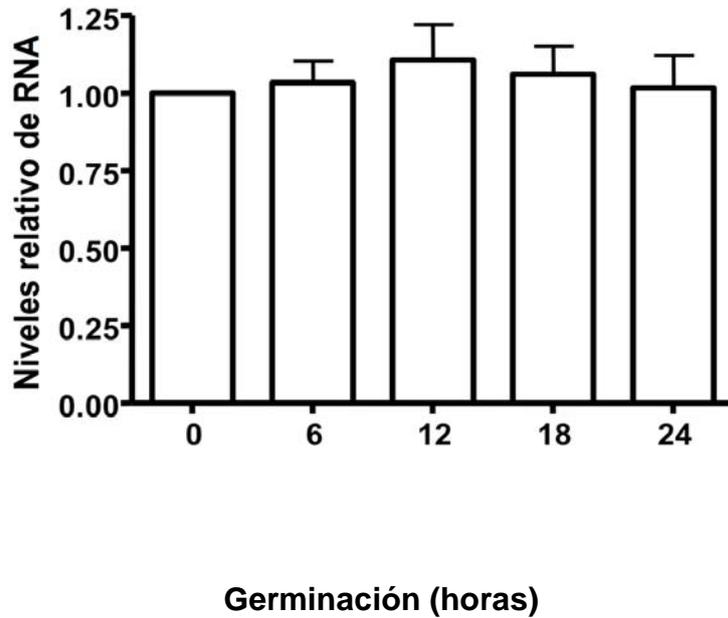


Figura 12. Nivel de transcripción de la Actina1 y ZmKRP1 (antes ZmKRP1E), a diferentes tiempos de germinación(0,6,12,18, y 24 horas), y ciclos de reacción por RT-PCR semicuantitativo.

Inicialmente la reacción de RT-PCR se realizó por 23 ciclos (figura 8), pero se obtuvo una baja expresión desde 0 hasta 24 horas de germinación, por lo que se incrementó el número de ciclos a 32, (29 ciclos para amplificar al gen control, actina1). De esta manera se pudo observar una mejor señal de transcripción; al ciclo 35 se llegó a la saturación de la reacción de RT-PCR semicuantitativo (figura 12).

(A)

Niveles de RNA de ZmKRP1 durante la germinación



(B)

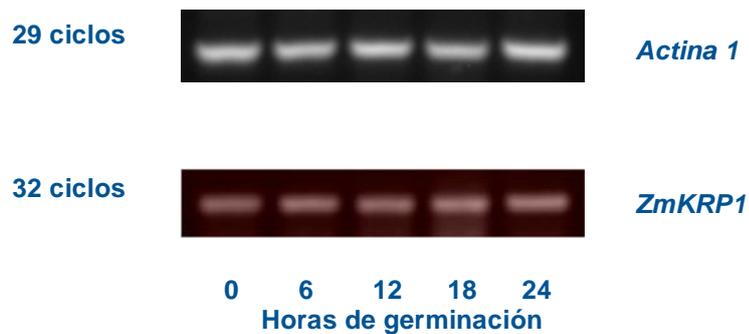


Figura 13. (A) niveles del transcrito de ZmKRP1 durante la germinación de ejes embrionarios; (B) ciclos a los cuales se llevo acabo el análisis densitometrico (se realizaron por triplicado). De los cuales posteriormente se llevo acabo el análisis estadístico (ANOVA de dos vías).

Como se puede observar en la figura 13 A y B, no parece existir una diferencia sustancial en los niveles del RNAm de ZmKRP1 (antes, ZmKRP1E) durante la germinación.

VIII. DISCUSIÓN

Los inhibidores de las cinasas-dependiente de ciclinas, ó CKIs, como se conocen en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y en mamíferos, regulan la progresión del ciclo celular por la unión a complejos ciclina/CDK e inhiben la actividad de las CDKs en la fase G1/S (Morgan,1997). En levaduras, tres ICKs han sido identificadas: Far1 inhibe las CDKs de la fase G1; Sic1 participa en la sincronización de la fase S por la inhibición de los complejos CDK de las fases G1 y S y Ph081 que inactiva un complejo ciclina/CDK y que funciona en el control de la expresión de genes bajo condiciones de niveles bajos de fosfato. Las siete ICKs descritas en mamíferos son clasificadas en dos familias de proteínas de acuerdo a sus similitudes estructurales y funcionales, las INK4 y las Cip/Kip, las cuales tienen un dominio inhibitorio conservado en el extremo N-terminal. Miembros de la familia Cip/Kip muestran un amplio espectro de efectos inhibitorios en complejos ciclina/CDK comparado con la familia INK4. Importantemente, ambas familias la INK4 y la Cip/Kip inhiben las CDKs involucradas en la transición G1/S; en miembros de la familia INK4, inhibidores de CDKs se unen a ciclinas de tipo D; mientras que los miembros de la familia de inhibidores de CDKs Cip/Kip se unen a las ciclinas de tipo E, D y a las ciclinas de tipo A (revisado en, Sherr y Roberts,1999).

VIII.1. *Inhibidores de CDKs en plantas*

Recientemente, secuencias similares de la familia Cip/Kip fueron identificadas en plantas. Siete genes que codifican proteínas con algún grado de homología con p^{27 Kip1} (miembro de la familia Cip/Kip en mamíferos), también llamados Kip-related proteins (KRPs), fueron clonados de Arabidopsis (Wang *et al.*,1998; De Veylder *et al.*,2001; Zhou *et al.*, 2002a). Dos de estas, KRP1 y KRP2, inhiben la actividad de CDK *in vitro* e *in vivo* (Wang *et al.*, 1998; 2000; Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001).

Estos inhibidores de ciclinas/CDK interaccionan con distintos complejos de ciclinas/CDKs en las distintas fases del ciclo celular. Plantas como *Oriza sativa* y *Zea maíz* cuentan con más de una en su genoma. Conocer acerca de su patrón de expresión en la germinación y en el ciclo celular, ha sido parte del presente trabajo.

VIII.2. Estructura y función de las ICKs/KRPs

Las diferentes variantes de ICKs/KRPs han conservado los principales dominios de unión a CDKs y a ciclinas, sitios que han sido localizados en el dominio C-terminal de las KRPs (Wang *et al.*, 1998). La región N-terminal, no conservada, podría determinar la especificidad hacia diferentes complejos ciclina/CDK. Alternativamente, estos dominios podrían interactuar con proteínas aún no descritas (De Veylder *et al.*, 2001).

Como se observó en los alineamientos múltiples, tanto de las secuencias parciales ICK1Zm (extremo C-terminal) y ZmKRP1(antes ZmKRP1E) [extremo N-terminal], como de la secuencia ZmKRP1com obtenida a partir de ejes embrionarios de maíz, la identidad es muy alta, 99%, comparada con Zeama;KRP1, gen aislado y caracterizado en endospermo de maíz (Coelho *et al.*, 2005), lo que nos indica que es la misma proteína. Esto es importante dadas las múltiples dificultades que inicialmente se tuvieron para aislar el gen completo de esta ICK/KRP. Todos los intentos realizados para obtener el extremo N-terminal del fragmento de la ICK originalmente aislada fueron poco alentadores. Esto fue debido a que en el extremo amino de la secuencia parcial ICK1Zm existía una secuencia, WASTCAS, no presente en ninguna ICK reportada hasta la fecha, y que hacía a nuestra secuencia parcial muy interesante. Esta secuencia se tomó como base para diseñar y sintetizar los oligonucleótidos que serían utilizados para obtener el fragmento restante (extremo N-terminal) de la secuencia parcial ICK1Zm de maíz, y así tener el gen completo. Aun que parece ser que la secuencia WASTCAS que no se logró amplificar con los oligonucleótidos diseñados para esta región, se debiese a un artefacto experimental o a un error de secuenciación de origen, cosa que no se puede aseverar de forma categórica, ya que se tendría que agotar la posibilidad de forma experimental para concluir esto. Una opción, sería que a partir de una biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz se pudiese rescatar un cDNA con la secuencia de interés. No fue sino hasta que se utilizó un oligonucleótido río abajo (más distante, anexo II) de la secuencia WASTCAS que se pudo amplificar toda la región 5' del gen y corroborar que se trataba del gen Zeama;KRP1 previamente reportado (Coelho *et al.*, 2005).

La regulación de los complejos ciclinas/CDKs por ICKs/KRPs permite ajustar los tiempos del ciclo celular y su sobre-expresión inhibe tanto el número, como el crecimiento de las células y altera la morfología de las hojas, lo que indica que las ICKs/KRPs participan en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang *et al.*, 2000). El análisis de la expresión de ZmKRP1 durante el transcurso de la germinación muestra que existen niveles constantes del transcrito, con lo que podría considerarse que, al menos a este nivel no existe un control de la expresión de este gen que pudiera afectar los tiempos del ciclo celular en la germinación. Tampoco los niveles de la proteína ZmKRP1 se modifican durante la germinación, aún bajo la influencia de fitohormonas tales como ABA (de Jesús Juárez *et al.*, 2008), lo que si se observa en la proteína KRP1 de *A.thaliana*, que interactúa e inhibe el complejo ciclina D/CDKA en cultivos celulares (Wang *et al.*, 1998), sugiriendo un posible mecanismo por el cual esta fitohormona pueda inhibir la proliferación celular.

La expresión de estos inhibidores depende del estado metabólico y de desarrollo de las células o el balance en la integridad del DNA, implicando que diferentes efectores controlan su presencia y acumulación. La amplia variedad de proteínas inhibitorias afectan los complejos ciclina/CDK en G1, claramente indicando el control de la regulación que modula el compromiso para completar el ciclo celular (Vázquez y Sánchez, 2003).

VIII.3. Proteínas tipo ICK/KRP

Así como las proteínas de tipo ICKs/KRPs que regulan la progresión del ciclo celular, existen otras con funciones similares, en diferentes estadios, tales como ACK1 de *Arabidopsis thaliana*, cuya sobre-expresión altera la morfología y retarda el crecimiento y el desarrollo, ya que es homóloga a las KRP, aun cuando ocupa un lugar diferente en la filogenia de las ICKs/KRPs (Han *et al.*, 2005). Por otra parte, también se tiene el antecedente del gen *SIM* (SIAMESE), de *Arabidopsis thaliana*, que codifica a una proteína de 14 kD que contiene un motivo de unión a ciclinas y un motivo que se encuentra en ICK/KRP que interacciona con CDK2/KRP. *SIM* fue hallado en asociación con ciclinas tipo D y CDKA;1.

La sobre-expresión de *SIM* en plantas, resulta en un bajo crecimiento, hojas estrechas, alargamiento de células epidermales con un incremento en el contenido de DNA. Se hipotetiza que *SIM* codifica para un inhibidor de CDK específico de plantas con una función clave en la transición de la mitosis a la endoreduplicación (Churchman *et al.*, 2006).

Aunado a esto, también se cuenta con el antecedente del gen *EL2* de *Oriza sativa*, que fue identificado como un nuevo regulador del ciclo celular, gen relacionado con el gen *SIM* de *Arabidopsis thaliana*. *EL2* se enlaza a CDKA1;1 y a la ciclina tipo D, y no se observa interacción con la CDK específica de plantas de tipo B. Se sugiere que *Oriza;EL2* codifica un nuevo inhibidor de CDKs de plantas, que se relaciona a la progresión del ciclo celular con respuesta a estrés biótico y abiótico (Peres *et al.*, 2007). Lo mencionado anteriormente tiene como fin exhibir que diferentes especies de plantas cuentan con una variedad amplia de proteínas de tipo ICKs/KRPs, así como de distintas proteínas relacionadas en la progresión del ciclo celular.

IX. CONCLUSIONES

- La secuencia completa de ZmKRP1 muestra que es 99% idéntica a la proteína Zeama;KRP1 obtenida de endospermo de maíz reportada (Coelho *et al*, 2005).
- La secuencia de aminoácidos WASTCAS, podría ser producto de un error de secuenciación, a menos que se compruebe lo contrario experimentalmente.
- El análisis de la expresión de ZmKRP1 durante el transcurso de la germinación muestra que los niveles de su transcrito no se afectan.

X. PERSPECTIVAS

Probar si bajo la influencia de fitohormonas, se observan fluctuaciones en los niveles de las proteínas de tipo ICKs/KRPs durante la germinación.

Determinar la capacidad inhibitoria de la ICK/KRP sobre complejos ciclina/CDK durante la germinación.

Detectar la posible existencia de otras proteínas ICKs/KRPs en maíz.

XI. ANEXOS I y II

Alineamiento múltiple de secuencias (de Jesús Juárez, 2008)

ICK1Zm	-----	
Zeama_KRP_1	-MGKYMRKAKASS-----EVMIMDVAAAP---LGVTRRARALALQRL	38
ICKZm_Est_	-----	
ICKOs	-MGKYMRKAKVVVSGE-----VVAAVMELAAAP---LGVTRRARSLALQ--	41
ICK4At	-MGKYIRKSKIDGAGAGAGGGGGGGGGESSIALMDVVPSSSSSLGVLTRAKSLALQQQ	59
ICK3At	-MGKYMKSKITG-----DISVMEVSKATAPSPGVRTRAAKTLALKRL	42
ICK5At	-MGKYIKKSKVAG-----AVSVKDKSHPPALGFRTRAAAKNLALHRL	42
Zeama_KRP_2	-MGKYMRKCRGAAG-----AEVAAVEVTQVVGVRTRRSAAATGGVAKVA	44
ICK6At	-MSERKRELAEEAS-----STSFSPK	
KTCLNDSDDSSPDSDHVDIVFAV	43	
ICK7At	-MSETK---PKRDS-----EYEGSNIKRMLDDDDD-VLRSPTRTLSSS	39
ICK1At	-MVRKYRKAKGIVEAG-----VSSYMQLRSSRIVYVREKSSSVVVDNG	46
ICK2At	-MAAVRRRERDVVEEN-----GVTTTTVKRRKMEEVDLIVESRIILSPCVQ	45
ICK1Zm	-----W	1
Zeama_KRP_1	QE-----QQTQWEEGAGGEYLELRNRLEKL--PPPP	68
ICKZm_Est_	-----	
ICKOs	-----KRQGGEYLELRSRLEKLPPPPPP	65
ICK4At	QQRCLLQKPSPPSLPPTSASPNPPSKQKMKKKQQMNDGCSYLQLRSRRLQKPPPIVVI	119
ICK3At	NS-----SAADSALPNDSSCYLQLRSRRLKPKPSLIEP	75
ICK5At	RS-----HSDEADSFN---YLQLRSRRLVKLPLLTNT	71
Zeama_KRP_2	PRR-----KRAPAGEPAAAVSAGGDGGSYIHLRSRMLFMAPPQPQP	86
ICK6At	SSS-----SVASSAALASDECSVTIGGEESDQ-SSSIS	76
ICK7At	SSS-----SLAYSVSDSGGFCVVALSEEDDHRSSSIS	73
ICK1At	VSS-----SCSGSNEYKKKELIHLEEDKDGDTETSTY	79
ICK2At	ATN-----RGGIVARNSAGASETSVVIVRRRDSPPVEEQCI	82
ICK1Zm	AST-----CAS-----TAEATATK-----EADASY	21
Zeama_KRP_1	ATT-----RRSGGRKAAEAATK-----EAEASY	93
ICKZm_Est_	-----	
ICKOs	PPR-----RRATAAATADATAAESA-----EAEVSF	92
ICK4At	RSTKRRKQRRNETCGRNPNSNLDNIRGDGSRSDSVSESVFGKDKDLISEINKDPTF	179
ICK3At	KQPPRVHRSGIKESGSRSRVDSVNSVPAQSSNEDECFDN-----FVSVQVSC	123
ICK5At	RKQ---QKQQLIPS---VNQCQTKNPRASSGPAKKLEP-----DTTTEEAC	111
Zeama_KRP_2	SVDSVPTPVEAADG-AAGQQAALAGLSRCSSTASSVNLGLGGQGRSHTCRSVDAAEAG	145
ICK6At	GCF-----TSEKETAKNSSSGV-----DLEDHQIET	104
ICK7At	GCS-----SSETNEIATRLPFS-----DLEAHEIS-	98
ICK1At	RRG-----TKRKLFFENLREEE-----KEELSK	101
ICK2At	EEE-----DSSVSCCSTSEEKSKRR-----IEFVDLEENN	112
ICK1Zm	GENMETFELEAMERIT-----	37
Zeama_KRP_1	GENM--LELEAMERIT-----	107
ICKZm_Est_	-----ESEAMGRNT-----	9
ICKOs	GGEN-VLELEAMERIAPFVSLNCKNTWVAPSPKYPRVGATCLQGTGKVPYERDEQVLRH	151
ICK4At	GQNFDFLEEEHTQRTT-----	195
ICK3At	GENSLGFESRHSTRES-----	139
ICK5At	GDN----ERISRS-----	121
Zeama_KRP_2	GDHVLVDVSAASNSGS-----GP	163
ICK6At	ETETSTFITSNFRKET-----	120
ICK7At	ETEISTLLTNNFRKQG-----	114
ICK1At	SMENYSSEFESAVKES-----	117
ICK2At	GDDRETETSWIYDDLN-----	128
ICK1Zm	----RETTPCSLIN-TQMTSTPGS-TRSSH-----RHRRVNAPPVH-AVPSSREMNEYFA	86
Zeama_KRP_1	----RETTPCSLIN-TQMTSTPGS-TRSSH-----CHRRVNAPPVH-AVPSSREMNEYFA	156
ICKZm_Est_	----RETTPCSLIN-SEMISTPGSTTRSSH-----SHRRVKAPPVH-AIPSSTEMNEYFA	59
ICKOs	FWNTRRETTPCSLIRDPTISTPGSTTRSSH-----SHCKVQTPVRHNIIPASAELEAFFA	208
ICK4At	----RESTPCSLIRPEIMTTPGSSTKLNICVSESNOQREDSLSRSRHRRTTPMEMDEFFS	251
ICK3At	-----TPCNFVEDMEIMVTPGSSTRSMCR-----ATKEYTREQDNVIPTTSEMEEFFA	187
ICK5At	-----CNFGD---KGFDLSENRSMIS-----DSKS-----IQSEIEDFFA	154
Zeama_KRP_2	DRERRETTSPSSRAHGELSDLESDLAGHKTGP-----SLPAATPAAELIVPPAHEIQEFA	218
ICK6At	-----SPVSEGLGETTEMESSTTKR-----KQPGVRKTPAAEIEDLFS	161
ICK7At	-----ISSSENLGET-AEMDSATTEMRDQR-----KTEKKKKMEKSPTQAELEDFFS	160
ICK1At	-----LDCCSGRKTMEETVTAEEEEKAK-----LMTEMPTESEIEDFFV	157
ICK2At	-----KSEESNMNDSSSVAVEDVESRRLR-----KSLHETVKEAELEDFFQ	170

*:: *

```

ICK1Zm      AEQRRQQQD---FIDKYNFDPANDCPLPG--RFEWVKLD-- 120
Zeama_KRP_1 AEQRRQQQD---FIDKYNFDPANDCPLPG--RFEWVKLD-- 190
ICKZm_Est_  AEQRRQQQA---FIDKYNFDPVND CPLPG--RFEWVKLD-- 93
ICKOs       AEEQRQQA---FIDKYNFDPVND CPLPG--RFEWVKLD-- 242
ICK4At      GAEEEEQKQ---FIEKYNFDPVNEQPLPG--RFEWTKVDD- 286
ICK3At      YAEQQQQR---FMEKYNFDIVNDIPLSG--RYEWVQVKP- 222
ICK5At      SAEQQQQR---FIQKYNFDIVSDNPLPG--RYEWVKVMP- 189
Zeama_KRP_2 AAEEAAQAKR---FASKYNFDFVRGVPLDAGGRFEWAPVVS I 256
ICK6At      ELESQDDKKK-QFIEKYNFDIVNDEPLEG--RYKWDR L--- 196
ICK7At      AAERYEQKR---FTEKYNFDIVNDTPLEG--RYQVSLKP- 195
ICK1At      EAEKQLKEK---FKKYNFDFEKEKPLEG--RYEWVKLE-- 191
ICK2At      VAEKDLRNKLL ECSMKYNFDFEKDEPLGGG-RYEWVKLNP- 209
          : .          ***:*      ** . *:* :

```

Fig. 5 Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos deducida de ICK1Zm con polipéptidos deducidos de las secuencias de cDNAs de las KRPs de maíz (Zeama;KRP;1 y Zeama;KRP;2), Arabidopsis (ICK1-ICK7), Arroz (ICKOs) y un EST de maíz (ICKZm_Est_).

Secuencia	#(aa)	Secuencia	#(aa)	Similitud (%)
ICK1Zm	120	Zeama_KRP_1	190	88
ICK1Zm	120	ICKZm_Est_	93	86
ICK1Zm	120	ICKOs	242	61
ICK1Zm	120	ICK4At	286	38
ICK1Zm	120	zeama_KRP_2	256	25
ICK1Zm	120	ICK3At	222	28
ICK1Zm	120	ICK6At	196	26
ICK1Zm	120	ICK7At	195	23
ICK1Zm	120	ICK5At	189	22
ICK1Zm	120	ICK1At	191	20
ICK1Zm	120	ICK2At	209	20

Tabla 1. % de identidad de la secuencia de aminoácidos comparada.

ANEXO II

UBICACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

-Reacción de RT-PCR y PCR (*)

-Reacción de RACE (+)

>ICK1Zm(118aa)

>atgggcaagtacatgCGCAAGTACAGCCGAAGCCACCgcaaccaaggaggctgatgCGTCG

> W A S T C A S T A E A T A T K E A D A S

* ZmKRP1rev *

* ZmKRPA rev *

ZmKRP1Brev

ZmKRP1B2rev (SP3, RACE)+

>tacggggagaacatgttcgagttggaggccatggagaggattaccagggagacgacgcct

> Y G E N M F E L E A M E R I T R E T T P

ZmKRP1F(SP2,RACE)+

>tgcagcttgattaacaccagatgactagcactcctgggtccacgagatccagccactct

> C S L I N T Q M T S T P G S T R S S H S

>cgccaccgcaggggtgaacgctcctccgggtgcacgccgtccaagtctagggagatgaat

> R H R R V N A P P V H A V P S S R E M N

>gagtactcgctgccgaacagcgacggcaacagcaggatttcattgacaagtacaacttc

> E Y F A A E Q R R Q Q Q D F I D K Y N F

>gatcctgcaaacgactgccctctcccaggcaggttgatgggtgaagctagac

> D P A N D C P L P G R F E W V K L D

* ICK (SP1, RACE) + *

rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
S	Fase de Síntesis
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., Barrett, J. C. (1996). involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 26;93(24):13742-7.
- 2 Bates, S., Bonetta, L., Mac Allan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C. and Peters, G. (1994). Cdk6 (PLSTIRE) and cdk4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinase that asóciate with cyclin D1, Oncogene 9, 71.
- 3 Bisbis, B., Delmas, F., Joubés, J., Sicard, A., Hernould, M., Inzé, D., Mouras, A. and chevalier, C. (2006). Cyclin-dependent Kinase (CDK) Inhibitors Regulated the CDK-Cyclin Complex Activities in Endoreduplicating Cells of Developing tomato Fruit. Journal of Biological Chemistry 281: 7374- 7383.
- 4 Boniotti, M. B. and Griffith, M. E. (2002). "Cross-Talk" between cell division cycle and development in plant. The Plant Cell 14, 11-16.
- 5 Bewley J.D. (1997). Seed germination and dormancy. Plant cell 9: 1055- 1066.
- 6 Bewley J.D. and Black M. (1994). In Seeds, physiology of development and germination. Ed. Plenum Press, N. y. Plenum Press.
- 7 Botha F.C. Poteiter, G.P. y Botha, A.M. (1992). Respiration metabolism and gene expression during seed germination. J. Plant Growth Reg. 11: 212-224.
- 8 Cánepa, E.T. Scassa, M.E. Ceruti, J.M. Marazita, M.C. Carcagno, A.L.sirkin, P.F. and Ogara, M.F. (2007). *INK4 Proteins, a Family of Mammalian CDK Inhibitors with Novel biological functions*. IUBMB Life, 59(7): 419-426., July.
- 9 Cardoso, M. C., Leonhardt, H., and Nadal_ginard, B. (1992). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. Cell 74, 979.
- 10Chang, T.-S., Kim, M. J., Ryoo, K., Park, J., Eom, S. J., Shim, J., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Tomita, M., Takahashi, K., Lee, M. J., Choi, E. J. (2003). p57KIP2 modulates stress-activated signaling by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein Kinase. J Biol Chem. 2003 Nov 28;278(48):48092-8. Epub 2003 Sep 8.

- 11** Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5): 2682-8.
- 12** Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993 Sep;15(3):532-4, 536-7.
- 13** Churchman, M.L. et al., (2006). SIAMESE, a novel plant-specific cell cycle regulators controls endoreduplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18, 3145-3157.
- 14** Ciemerych, M. A. and Sicinski, P. (2005). Cell cycle in mouse development. *Oncogene* 24, 2877-2898.
- 15** Coelho, C. M., Dante, R. A., Sabelli, P. A., Sun, Y., Dilkes, B. P., Gordon-Kamm, W. J. and Larkins, A. (2005). *Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potencial role in endoreduplication.* *Plant Physiology* 238, 2323-2336.
- 16** Coenen, C. and Lomax, T. L. (1997). Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci.* 1997 Sep;2(9):351-6. Review.
- 17** Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment. *Trend in Cell Biology* 13(2), 65-70.
- 18** Criqui, M. C., and Genschik, P. (2002). Mitosis in plants: How far we have come at the molecular level? *Curr. Opin. Plant boil.* 2002 5: 487-493.
- 19** Datta, K. Marsh, L. y Marcus, A. (1983). Early growth of wheat embryonic axes and the syntesis of RNA and DNA. *Plant Physiol.* 72: 394-397.
- 20** Dalton, S. (1992). Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J.* 11(5)1797.
- 21** De Clercq, A. and Inzé, D. (2006). *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Yeats, Animals, and Plants: A Functional Comparison.* *Critical Review in biochemistry and Molecular Biology* 41: 263-313.
- 22** de Jager, S. M., Menges, M., Bauer, U. M., Murray, J. A. (2001). *Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities.* *Plant Mol Biol.* 2001 Nov;47(4):555-68.

- 23** de Jager, S. M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S. and Murray, J. A. H. (2005). *The developmental context of cell-cycle control in plant*. Seminars in Cell & Developmental Biology 16, 385-396.
- 24** De Jesus J, N., Mancilla A. García E. Vázquez-Ramos, JM. (2008). Expression and activity of a Kip-related protein, Zeama;KRP1, during maize germination. Seed Science Research. 18, 67-75.
- 25** De Veylder, L., Seger., G., Glab, N., Van Montagu, M. And Inzé, D. (1997^a). Identification of proteins interacting with the Arabidopsis Cdc 2aAt protein. J. Exp. Bot. 48: 2113-2114.
- 26** De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. and Inzé, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 13, 1653 -1667.
- 27** De Veylder, L., Joubés, J. and Inzé D. (2003). Plant cell cycle transitions. Current Opinion in Plant Biology 6, 536-543.
- 28** Dewitte, W. And Murray, J.A.H. (2003). The plant cell cycle. Annu. Rev. Plant biol. 54: 235-264.
- 29** Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofiel, S., Healy, J.M., Jacquard, A., Kilby, N.J., and Murriay, J.A. (2003). Altered cells cycle distribution, hyperplasia and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. Plant Cell 15: 79-92.
- 30** Dulić, V., Lees, E., Reed S. I., (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. Science. 1992 Sep 25;257(5078):1958-61.
- 31** Dulić, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I. (1994). p53-dependent inhibition of of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induce G1 arrest. Cell 76: 1013- 1023.
- 32** Dunphy, W.G. (1994). The decision to enter mitosis. Trends Cell Biol 4: 202-207.
- 33** Evans, T. Rosenthal, E., T., Youngblom, J., Distel, D and Hunt, T. (1983 Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at the end cleavage division). Cell 33,389.
- 34** Fobert, P. R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E. S., Doonan, J. H. (1996). Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. Plant Cell. 1996 Sep;8(9):1465-76.

- 35** Fowler, J. E., Quatrano, R. S. (1997). Plant cell morphogenesis: plasma membrane interactions with the cytoskeleton and cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:697-743. Review.
- 36** Francis, D. (2007). The plant cell cycle – 15 years on. *Tansley review. New Phytologist* 174:
- 37** Garcia Ramirez Elpidio 2006. Caracterización de las DNA polimerasas α y δ de maíz durante la germinación. Tesis de doctorado en ciencias bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- 38** Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* 1994 Dec 15;8(24):2939-52.
- 39** Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz. J., O'Donnell, M., Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):297-306.
- 40** Gutiérrez, C., Ramírez-Parra, E., Castellano, M. M. and Del Pozo, C. (2002). *G1 to S transition than a cell cycle engine switch.* *Current Opinion in Plant Biology* 5, 480- 486.
- 41** Gutiérrez, C. (2005). *Coupling cell proliferation and development in plants.* *Nature Cell Biology* 7, 535-541.
- 42** Gutiérrez, R. Quiroz, F. F. and Vázquez-Ramos, J. M. (2005). Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiology* 46(1), 166-173.
- 43** Han,W., Rhee, H. I., Cho, J. W., Ku, M.S. B., Song, P. S., Wang, M. H. (2005). Overexpression of *Arabidopsis* ACK1 alters leaf morphology and retards growth and development. *Biochemical and Biophysical Research communications (BBRC)*, 330 887-890.
- 44** Hannon, G. J., Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994 Sep 15;371(6494): 257-61.
- 45** Healy, J. M., Menges, M., Doonan, J. H., Murray, J. A. (2001). The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;276(10):7041-7. Epub 2000 Nov 28.
- 46** Heese, M., Mayer, U., Jürgens, G. (1998). Cytokinesis in flowering plants: cellular process and developmental integration. *Curr Opin Plant Biol.* 1998 Dec;1(6):486-91. Review.

- 47** Hemerly, A. S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D. (1993). *cdc2a* expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell*. 1993 Dec;5(12):1711-23.
- 48** Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inzé, D., Beeckman, T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*. 2002 Oct;14(10):2339-51.
- 49** Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A., Sherr, C. J. (1994). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*. 1995 May;15(5):2672-81.
- 50** Hirama, T., and Koeffler, H. P. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*. 1995 Aug 1;86(3):841-54. Review.
- 51** Hutchinson, C. and Glover, D.M. (eds) *Cell cycle control*, first ed. Oxford university Press. England. 1995.
- 52** Ikeda, M., Jakoi, L., and Nevins, J. (1996). A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (08). 3215.
- 53** Inzé, D. (2005). Green light for the cell cycle. *European Molecular Biology Organization Journal*. 24, 657-662.
- 54** Jacobs, T. (1995). *Cell cycle control*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*.46: 317-339.
- 55** Jasinski, S., Riou-Khamlichi, R., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C. and Glab, N. (2002a). The CDK inhibitor *NtKIS1a* is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *Journal Cell Science* 115(5), 973 - 982.
- 56** Jasinski, S., Perennes, C. Bergounioux, C. and Glab, N. (2002b). Comparative Molecular and Functional Analyses of the Tobacco Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor *NtKIS1a* and Its Spliced Variant *NtKIS1b*. *Plant Physiology* 130(4), 1871 - 1882.
- 57** Joubés, J. and Chevalier, C. (2000). Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* 43, 735-745.
- 58** Kaldis, P., Sutton, A. and Solomon, M.J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* 86, 553.
- 59** Kamb, A. (1998). Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998;227:139-48. Review.

- 60**Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 2;100(18):10231-6. Epub 2003 Aug 18.
- 61**Kato, J.-Y., (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK 4, *Genes dev.* 7, 331.
- 62**Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massagué J, Sherr CJ. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):487-96.
- 63**Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, function and interactions. *Oncogene* 14: 629-640.
- 64**King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M., Kirschner, M. W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1652-9. Review.
- 65**Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., and Lehner, C.F. (1994). Cyclin e controls S phase progression and its down-regulation during drosophila embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77: 107- 120.
- 66**Kono, A., Umeda-Hara, C., Lee, J., Ito, M., Ichimiya, H., Umeda, M. (2003). Arabidopsis D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol.* 132: 1315-21.
- 67**Koroleva, O. A., Tomlinson, M., Parinyapong, P., Sakvarelidze, L., Leader, D., Shaw, P., Doonan, J. H. (2004). CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. *Plant Cell.* 2004 Sep;16(9):2364-79. Epub 2004 Aug 17.
- 68**Kosugi, S. and Ohashi, Y. (2002a). E2Ls, E2F-like repressor of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *F. Biol. Chem.* 277: 16553- 58.
- 69**Krude, T., Jackman, M., Pines, J., Laskey, R. A. (1997). Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell.* 1997 Jan 10;88(1):109-19.
- 70**Lacy, E. R., Filippov I., Lewis W. S., Oieno S., Xiao L., Hengst L. and Kriwacki R. W. (2004). *Nature Structural & Molecular Biology* 11(4), 358-367.

- 71** Lane, D.P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15.
- 72** Lane, M. E., Sauer, K., Wallace. K., Jan, Y. N., Lehner, C. F., and Vaessin, H. (1996). Decapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* developmental. *Cell* 87: 1225- 1235.
- 73** Lara-Nuñez, A. de Jesús, N. and Vázquez-Ramos, JM. (2008). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum* 132; 79-88.
- 74** Larkins, B. A., Dilkes, B. P., Dante, R. A., Coelho, C. M., Woo, Y-m. and Liu, Y. (2001). Investigating the how and why of DNA endoreduplication. *Journal of Exerimental Botany* 52, 183-192.
- 75** Lee, M.-H., Reynisdóttir, I., and Massagué, J. (1995). Cloning of p27^{Kip2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9: 639- 649.
- 76** Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed S. I., Harlow, E. Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev.* 1992 Oct;6(10):1874-85.
- 77** Lees, E. M. and Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A is sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase, *Mol. Cell* 13. 1194.
- 78** Leibovitch M. P., Kannengiesser C., Leibovitch S. A. (2003). Signal-induced ubiquitination of p57^{Kip2} is independent of the C-terminal consensus Cdk phosphorylation site. *FEBS Letters* 543, 125-128.
- 79** Lew, D.J., Dulic, V., and Reed, S.I. (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin Cln function in yeast. *Cell* 66: 1197-1206.
- 80** Lloyd, R. V., Ericsson, L. A., Yin, L., Kulig, E., Qiang, X., Cheville, J. C., Scheithauer, B. W : p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol.* 1999 Feb;154(2):313-23. Review.
- 81** Lui, H., Wang, H., DeLong, C., Fowke, L. C., Crosby, W. L., Fobert, P. R. (2000). The *Arabidopsis* Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant Journal* 21, 379-385.

- 82**Luo, Y., Hurwitz, J., and Massagué, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21^{Cip1}. *Nature* 375, 159–161.
- 83**Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Déak, M., Fehér, A., Brown, s., Kondorosi, E., Athanasiadis, a., Pongor, S., Bilgin, M. (1997). Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*. 1997. 9: 223- 235
- 84**Mariconti, L., Pllegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C. (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: 911- 19.
- 85**Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., and Kato, J.-Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 14: 2066-2076.
- 86**Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p57^{Kip2}, a structurally distinct member of the p21^{Cip1}, cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*. 9: 650- 662.
- 87**McConnell, B. B., Gregory, F. J., Stott, F. J., Hara, E., Peters, G. (1999). Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1981-9.
- 88**Means, A.L., Slansky, J.E., McMahon, S. L., Knuth, M. W. and Farnham, P. J. (1992). The HIP1 binding site is required for growth regulation of the dihydrofolate reductase gene promoter. *Mol. Cell. Biol*. 12, 1054.
- 89**Melendez-López, S. Ortega, R. López, R. y Vázquez-Ramos, J.M. (1990). Estudios sobre la naturaleza y localización de la síntesis de ADN durante las etapas iniciales de la germinación de maíz. *Rev. Soc. Quím Méx.* 34: 354-359.
- 90**Menges, M., de Jager , S. M., Gruissem, W. Murria, J. A. H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expresión and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plann J.* 41: 546- 566.
- 91**Meyerowitz, E. M. (1997). Genetic control of cell division patterns in developing plants.*Cell*. 1997 Feb 7;88(3):299-308. Review.
- 92**Mironov, V., Van Montagu, M., and Inzé, D. (1997). Regulation of cell division in plants: an *Arabidopsis* perspective. *Prog Cell Cycle Res*. 1997;3:29-41. Review.

- 93** Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. and Inze, D. (1999). *Cyclin-dependent kinases and cell division in plants the nexus*. Plant Cell 11, 509–521.
- 94** Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annu Rev Cell Dev Biol. 1997;13:261-91. Review.
- 95** Morse, L., Chen, D., Franklin, D., Xiong, Y., Chen-Kiang, S. (1997). Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. Immunity. 1997 Jan;6(1):47-56.
- 96** Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. and Shinmyo, A. (1999). Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated. By a distinct cyclin-dependent kinase complex with cdc2/cyclin D in vitro. Plant journal. 18, 243- 252.
- 97** Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinase: key regulators of the eukaryotic cell cycle. BioEssays 17:471-480.
- 98** Norbury, C., Blow, J. and Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of p34cdc2 protein kinase in invertebrates, EMBO J. 10, 3321.
- 99** Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W. M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M. H., Massagué, J., Crabtree, G. R., Roberts, J. M. (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. Nature. 1994 Dec 8;372(6506):570-3.
- 100** Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase, Nature 344- 503.
- 101** Ohi, R. and Gould, K.L. (1999). *Regulating the onset of mitosis*. Curr Opin Cell Biol. 11:267-273.
- 102** Ortega, S., Malumbres, M., Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Biochim Biophys Acta. 2002 Mar 14;1602(1):73-87. Review.
- 103** Osborne, D.J. Sharon, R. y Ben-Ishai, R. (19980/81). Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*). Israel J. Bot. 29: 259-272.
- 104** Osborne, D.J. Dell'Aquila, A. y Elder, R.H. (1984). DNA repair in plant cells. As essential event of early embryo germination in seeds. Folia Biologica. Proc. FEBS symposium on DNA. Spe Pub. 155-156 pp.

- 105** Parry, D., Bates, S., Mann, D. J., Peters, G. (1995). Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J.* 1995 Feb 1;14(3): 503-11.
- 106** Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E. (1999). Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1775-83.
- 107** Peres, A., Churchman, M. L., Hariharan, S., Himanen, K., Verkest, A., Vandepoele, K., Magyar, Z., Hatzfeld, Y., Van Der Schueren, E., Beemster, G.T., Frankard, V., Larkin, J. C., Inzé, D., De Veylder, L. (2007). Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J Biol Chem.* 2007 Aug 31;282(35):25588-96. Epub 2007 Jun 28.
- 108** Peters, J. M. (1998). SCF and APC: The yin and yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 759- 768.
- 109** Phelps, D. E., Hsiao, K. M., Li, Y., Hu, N., Franklin, D. S., Westphal, E., Lee, E. Y., Xiong, Y. (1998). Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c expression during myogenesis. *Mol Cell Biol.* 1998 Apr;18(4):2334-43.
- 110** Pines, J., and Hunter, T. (1991). Human cyclin A and B are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol.* 115, 1.
- 111** Pines, J. (1993). Cyclins and cyclin-dependent kinase: take your partner, *Trends Biochem. Sci.* 18, 195.
- 112** Pines, J. (1995a). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research* 66, 181-212.
- 113** Pines, J. (1995b). Cyclins and cyclin-dependent kinase: a biochemical view. *Biochem J.* 308: 697-711.
- 114** Pines, J. (1996a). Cyclin from sea urchins to HeLas: making the human cell cycle. *Biochem Soc Trans.* 1996 Feb;24(1):15-33. Review.
- 115** Pines, J. (1996b). Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol.* 1996 Nov 1;6(11):1399-402. Review.
- 116** Pines, J. (1999). *Four-dimensional control of the cell.* *Nat Cell Biol* 1:E73-E79.

- 117** Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massagué, J., Roberts, J. M., Koff, A. (1994a). p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994 Jan;8(1):9-22.
- 118** Polyak, K., Lee, M.-H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., and Massagué, J. (1994b). Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59- 66.
- 119** Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J. P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R. P., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., Mironov, V. A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J Biol Chem.* 2001 Sep 28;276(39):36354-60. Epub 2001 Jul 26.
- 120** Potuschak, T., and Doerner, P. (2001). Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol.* 2001 Dec;4(6):501-6. Review.
- 121** Quiroz-Figueroa, F. and Vázquez-Ramos, J. M. (2006). Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant.* 128: 556- 568.
- 122** Ramirez-Parra, E. and Gutierrez, C. (2000). Characterization of wheat DP, heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS. Lett.* 486: 73- 78.
- 123** Randolph L.F. (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J. Agric.* 53; 881-916.
- 124** Renaudin, J-P., Donan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J. Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Sauré, A., Sorrell, D. A., Sundaresan, and Murray, J. A. H. (1996). *Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization.* *Plant Molecular Biology* 32, 1003-1018.
- 125** Reynisdóttir, I., Polyak, K., Iavarone, A., Massagué, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 1995 Aug 1;9(15):1831-45.

- 126** Reynisdóttir, I., and Massagué, J. (1997). The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* 1997 Feb 15;11(4):492-503.
- 127** Richard, C., Granier, C., Inzé, D., De Veylder, L. (2001). Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *J Exp Bot.* 2001 Aug;52(361):1625-33.
- 128** Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., Murray, J. A. (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science.* 1999 Mar 5;283(5407):1541-4.
- 129** Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M., Murray, J. A. (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(13):4513-21.
- 130** Rossi, V., Varotto, S. (2002). *Insights into the G1-S transition in plants.* *Planta* 215, 345-356.
- 131** Roudier, F., Fedorova, E., Györgyey, J., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (2000). Cell cycle function of a Medicago sativa A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J.* 2000 Jul;23(1):73-83.
- 132** Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 1999 Sep 20;18(38):5311-7. Review.
- 133** Rusell, P., and Nurse, P. (1986). Cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145.
- 134** Russo, A. A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struc boil.* 3: 696- 700.
- 135** Sánchez, M. D.P., Torres, A., Boniotti, M. B., Gutierrez, C. and Vázquez-Ramos, J. M. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A ty e protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biology* 50, 167-175.
- 136** Sánchez Mde L, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM. (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J Exp Bot.* 2005 Feb;56(412):515-23. Epub 2004 Nov 15.

- 137** Schnittger, A., Schöbinger, U., Stierhof, Y. D., Hülskamp, M. (2002). Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes. *Curr Biol.* 2002 Mar 5;12(5):415-20.
- 138** Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schobinger, U. and Hülskamp, M. (2003). Misexpression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1/KRP1 in Single-Celled *Arabidopsis* Trichomes Reduces Endoreduplication and Cell Size and Induces Cell Death. *Plant cell* 15, 303 - 315.
- 139** Serrano, M., Hannon, G. J., Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):704-7.
- 140** Shaul, O., Van Mantagu, M., and Inzé, D. (1996). Regulation of cell division in *Arabidopsis*. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 15: 97- 112.
- 141** Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995 May 15;9(10):1149-63. Review.
- 142** Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Development* 13, 1501–1512.
- 143** Shimotohno, A., Umeda-hara, C., Bisova, K., Uchimiya, H., and Umeda, M. (2004) *Plant Cell* 16:2964- 2966
- 144** Stals, H. and Inze, D. (2001). When plant cells decide to divide. *Trends in Plant. Science* 6, 359-364.
- 145** Spiegel, S. Marcus, A. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination is independent of Esther transcription or polyadenylation. *Nature.* 256: 228-230.
- 146** Suzuki. K., Nishihata, J., Arai, Y., Honma, N., Yamamoto, K., Irimura, T., Toyoshima, S. (1995). Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif. *FEBS Lett.* 1995 May 15;364(3):283-8.
- 147** Todd, G. Mainprize, M.D. Taylor, J.T. Rutka and P.B. Dirks. (2001). *Cip/Kip cell-cycle inhibitors: a Neuro-oncological perspective.* *Journal of Neuro-oncology* 51: 205-218.
- 148** Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 1994 Jul 15;78(1): 67-74.

- 149** Umeda, M. Bhalerao, R. P., Schell, J., Uchimiya, H., Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5021-6.
- 150** Umeda, M., Umeda-Hara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Uchimiya, H. (1999). Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol.* 1999 Jan;119(1):31-40.
- 151** Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S. and Inzé D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14, 903-916.
- 152** Vázquez-Ramos, J.M. y Osborne, D. (1986). Analysis of the DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutat. Res.* 166:39-49
- 153** Vázquez-Ramos, J. M. and Sánchez, M. P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* 13, 113-130.
- 154** Verkest, A.; Manes C-L de O.; Vercruysse, S., Maes S.; Van Der Schueren, E.; Beeckman, T.; Genschik, P.; Kuiper, M.; Inés, D. And De Veylder, L. (2005). The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *The Plant Cell* 17, 1723-1736.
- 155** Verkest, A., Weinl, C., Inzé, D., De Veylder, L. and Schnittger, A. (2005). Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiology* 139, 1099-1106.
- 156** Vincent P.L.D. (2002). *Zea mays* (maize, corn). In *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley and Sons. 1-7.
- 157** Walbot, V. and Evans, M.M.S. (2003). UNIQUE FEATURES OF THE PLANT LIFE CYCLE AND THEIR CONSEQUENCES. *NATURE REVIEWS/ GENETICS*. Volume 4:May 2003/369-379.
- 158** Wang, G., Kong, h., Sun, Y., Zhang, X., Zhang W., Atman, N., de Pamphilis, C. W. and Ma, H. (2004). Genome-Wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of the plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology* 135, 1084-1099.
- 159** Wang, H., Fowke, L.C. and Crosby, W.L. (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 386, 451-452.

- 160** Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. and Fowke, L.C. (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 Journal* 15, 501–510.
- 161** Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L.C. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant Journal* 24, 613–623.
- 162** Watanabe, H., Pan, Z. Q., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., Hurwitz, J., Xiong, Y. (1998). Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 17;95(4):1392-7.
- 163** Weingartner, M., Pelayo, H. R., Binarova, P., Zwerger, K., Melikant, B., de la Torre, C., Heberle-Bors, E., Bögre, L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J Cell Sci.* 2003 Feb 1;116(Pt 3):487-98.
- 164** Weingartner, M., Criqui, M. C., Mészáros, T., Binarova, P., Schmit, A. C., Helfer, A., Derevier, A., Erhardt, M., Bögre, L., Genschik, P. (2004). Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell.* 2004 Mar;16(3):643-57.
- 165** Weinl, C., Marquart, S., Kuijt, S. J. H., Nowack, M.K., Jakoby, M. J., Hülskamp, M. and Schnittger, A. (2005). Novel Functions of Plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *The Plant Cell.* 1-19.
- 166** Weintraub, S.J., Prater, C. A. and Dean, D. C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element, *Nature* 358, 259.
- 167** Xie, Q., Suárez-López, P., Gutiérrez, C. (1995). Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J.* 1995 Aug 15;14(16):4073-82.
- 168** Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. (1992). D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA, *Cell* 71, 504.
- 169** Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* 366: 701- 704.

- 170** Zaráin, M. Bernal-Lugo y Vázquez-Ramos, J.M. (1987). Effect of benzyl adenine on DNA synthesis during early germination of maize embryos axes. *Mutat. Res.* 181: 103-110.
- 171** Zhang, H. Xwiong Y. and O'Donnell, M. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Molecular Biology Cell* 4, 897-906.
- 172** Zhang, W-K.; Shen, Y-G.; He, X-J.; Du, B-X.; Xie, Z-M.; Luo, G-Z.; Zhang, J-S. and Chen, S-Y. (2005). Characterization of a novel cell cycle-related gene from *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 1-10.
- 173** Zindy, F., Soares, H., Herzog, K. H., Morgan, J., Sherr, C. J., Roussel, M. F. (1997). Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Differ.* 1997 Nov;8(11):1139-50.
- 174** Zhou, Y., Fowke, L.C., and Wang, H. (2002a). Plant CDK inhibitors: Studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparison in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Report* 20, 967–975.
- 175** Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S., Keller, W., and Fowke, L. C. (2002b). Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 in transgenic *Brassica* plants. *Planta* 215, 248–257.
- 176** Zhou, Y., Wang H., Gilmer S., Whitwill S., Fowke L. C. (2003a). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitors ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 604-613.
- 177** Zhou, Y.; Li, G.; Brandizzi, F.; Fowke, L. C. and Wang, H. (2003b). The plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 has distinct functional domains for in vivo kinase inhibition, protein instability and nuclear localization. *The Plant Journal* 35, 476-489.
- 178** Zuñiga-Aguilar, J.J. (1998). Efecto de citicininas a niveles transcripcional y traduccional durante la germinación de maíz. Tesis de doctorado en ciencias químicas (Bioquímica). Facultad de Química, UNAM.