



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA
DE LA CINASA DEPENDIENTE DE CICLINA (CKS) DE MAÍZ
DURANTE LA GERMINACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:

JOSÉ ENRIQUE MUÑOZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

MARZO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente **ELPIDIO GARCÍA RAMIREZ**

Vocal **EUCLIDES AVILA CHAVEZ**

Secretario **LEON PATRICIO MARTINEZ CASTILLA**

1er. suplente **NORA ANDREA GUTIERREZ NAJERA**

2° suplente **ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO**

Sitio donde se desarrolló el tema.

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

Asesor del tema:

Dr Elpidio García Ramirez

Supervisor técnico:

Dr. Jorge Manuel Vazquez Ramos

Sustentante:

José Enrique Muñoz Hernández

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AtCKS	Subunidad reguladora de la Cinasa dependiente de ciclina de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtCDC2	Cinasa dependiente de ciclina en <i>Arabidopsis thaliana</i>
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básica
CAK	Cinasa activadora de CDK
CAPS	Acido N-ciclohexyl-3-aminopropanosulfónico
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CKS	Subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina
CYC	Ciclina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G1	Interfase post-mitótica
G2	Interfase post-sintética
GmCKS	Subunidad de la cinasa dependiente de ciclina de Soya
GST	Glutación S-Transferasa
M	Fase de mitosis
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Ni-NTA	Resina de Níquel-nitriloacetato
OsCKS	Subunidad de la cinasa dependiente de ciclina de arroz
OsCKS1Fwd	Oligonucleótido <i>forward</i> OsCKS1
OsCKS1Rev	Oligonucleótido <i>reverse</i> OsCKS1
Pb	Pares de bases nitrogenadas
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pRB	Proteína retinoblastoma
PVDF	Membranas de Fluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
S	Fase de síntesis de DNA
Tris	Hidroximetil aminometano
VvCKS	Subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina de Uva
ZmCKS	Subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina de maíz
OsCKS1-GST	Subunidad de la cinasa dependiente de ciclina de arroz fusionada a la proteína Glutación S-Transferasa

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos

Por la confianza, paciencia, dirección y críticas del presente trabajo, por permitirme formar parte de este maravilloso equipo de trabajo.

Al Dr. Elpidio García Ramírez

Por la confianza, dedicación, paciencia, conocimientos, ayuda, dirección y amistad puestos en este trabajo.

A los doctores Euclides Ávila Chavez y León Patricio Martínez Castilla

Por su tiempo y sus acertados comentarios en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Octavio Guerrero Andrade

Por sus explicaciones y comentarios

A mis compañeros y amigos del laboratorio 114: Spin, Lili, Manuel, Yaddith, Silvia Karina, Paco Silvia, Paco Quiroz, Dago, Germán, Alfredo, Dona, Ilenia, Sara, Víctor, Lupita, Javo, Iván, Luís, Ara, Mary, Silvia, Jorge Velásquez; gracias por su ayuda, amista, apoyo, motivación, por aguantarme y pasar tantos momentos tan agradables todo este tiempo.

DEDICATORIA

Para Lulú Mi madre

Gracias por todo a lo largo de este camino, por todo tu amor, tiempo, paciencia, confianza, ayuda y dedicación, eres la mejor mamá del mundo, te amo.

Para Alejandro Mi padre

Gracias por cada una de las cosas que me has enseñado y brindado, la manera en que has formado de mí una buena persona, por todo tu amor demostrado muy a tu manera, te amo papa.

Sin ustedes este logro no hubiera sido posible, esto es de ustedes.

Para Renata Mi hermana y segunda madre

Por siempre estar ahí, por tus pocas pero siempre atinadas palabras, por todo tu apoyo, por enseñarme a luchar día a día, por ser mi amiga, hermana y madre, te amo hermanita.

Para Alejandro Mi hermano

Carnal, gracias por todo tu apoyo, tu amistad, tu cariño, por enseñarme que en la vida solo se sale adelante con mucho esfuerzo, no importando los problemas que se puedan tener, aunque no lo sepas eres mi mejor amigo, el que siempre estará ahí y sabes que siempre estaré aquí, te amo.

Para mis hermosas sobrinas: Sandra, Mariana, Romina y Abril

Son uno de los motores que me impulsan con mayor fuerza en esta vida, por ser alguien mejor, me motivan a despertar y esforzarme todos los días, por regalarme una hermosa sonrisa cada que las puedo ver, por recordarme que la inocencia es algo invaluable que jamás deberíamos perder, gracias por todo mis bebés, las amo

Para Jorge

Se pueden vencer muchos obstáculos y tú lo haz demostrado, por cuidar y querer a mis niñas y a mi hermana

Para Mitzi

Gracias por compartir este tiempo conmigo, por todo tu apoyo, por ser mi compañera y cómplice, por enseñarme que para superarse hay que recorrer un camino mas que complicado, lleno de sacrificios, pero que al final nos llevan a una gran recompensa. Sabes que siempre estaré aquí para ti Bonita.

Para El abuelo †

Mi segundo padre, mi amigo, mi ejemplo, sabes que aunque ya no estas aquí, todos los días te llevo dentro, recordando y disfrutando cada una de las cosas que me enseñaste y me permitiste vivir a tu lado, cosas que jamás podría enumerar, pero que sin duda han marcado el rumbo en mi vida, como me gustaría poder estar

disfrutando de todo esto contigo; donde quiera que estés algún día nos volveremos a encontrar.

Para La abuela

Madre, amiga, tía, abuela, maestra, gracias por enseñarme a ser fuerte aun en los peores momentos, sabe que todo esto también es de usted y del abuelo, gracias por cuidarme, apoyarme y enseñarme que la vida siempre se debe afrontar con entereza y valor, siempre seré su niño, "El niño".

Para Rodolfo Mi hermano

Carnal, esto es para ti, gracias por estar siempre a mi lado, siempre serás un ejemplo para mí, tu valor, inteligencia, perseverancia y demás virtudes son algo por lo cual estamos en esta meta alcanzada, yo solo jamás lo hubiera logrado, te amo carnal.

Para Diana Mi hermana

Gracias güanga por todo lo que has compartido conmigo, por tu amistad y apoyo, por enseñarme que no hay barreras, que las barreras se las pone uno mismo, que se puede vender hasta lo inimaginable jeje.

Para mis primos Iliana, Omar, Daniela, Miguel

Son como mis hermanitos, los quiero muchísimo, nunca se rindan ante nada, y saben que siempre que pueda los apoyare y cuidare.

Para mi mamis †

Se que siempre estas cuidándonos, gracias por todos los principios y buenas costumbres que directa e indirectamente me has dejado.

Para Alondra †

Prima, donde quiera que estés, sabes que siempre estarás en mi corazón.

Para toda mi familia, mis primos, mis tíos, si los enumero se que me faltara alguno, así que...., mejor se los dedico a todos ellos.

Para Richy

Mi carnal gracias por todos estos años, gracias por ser la bandota, te quiero un chingo hermano

Para el Spin

Carnal gracias por motivarme a entrarle a este proyecto, por toda tu ayuda, amistad y tiempo, sabes que tienes a un hermano en mí.

Para Yaddith

Gracias por ser una buena mika, por quererme y apoyarme, te quiero mucho.

Para el Aker

Tantos años y seguimos siendo tan amigos, gracias por todo este tiempo carnal

Para mis queridos amigos de la 68

Los 10: Richy, Marco, Jesse, Adair, Cano, Kissy, Tirado, Tocayo, Edson Paola, Nahiely, Adriana, Ana Laura, Brenda, Marlen, Mariela, Renne, Roxana, Lorena y a todos (as) aquellos que hicieron de la secundaria una de las mejores etapas en mi vida, siempre están en mis recuerdos, y afortunadamente a muchos los tengo en mi presente.

Para mis queridos amigos del árbol

Spin, Daniela, Perritos, Claudio, Erick, María, Miguis, Bengoa, Esaú, Alondra, Raquel, Flor, Alfred, Manuel, Arturo, Karla Chichifa, Ferchis, Karla ardilla, Profe, Javis, Meche, Jeza, Nancy, Gil, Picme, Susy, Norma, Victor, Pollote, Seldus, Skep. Gracias por todo lo que hemos pasado todos estos años, que seguramente seguirán siendo muchas mas experiencias juntos. Los quiero mucho

Para mis queridos amigos de la cancha (frodos y rogers)

Alesita, Mitzi, Javo, Juan, Ara, Frodo, Neto, Itzel, Iván, Paco, Roger, Chip, Maggie, Brenda, Anita, Tere, Deci, Hazael, Lalo, Pelos. Han sido innumerables los momentos vividos, las borracheras y demás cosas muy buenas, que se que seguirá creciendo la lista, gracias por todo su apoyo, amistad y cariño.

Para mis amigos de la prepa 6: Daniel, Osvaldo, Chiquis, Chente, Pikachu, Jirafa, Pepe, Goofy, Burro, Alu, Ala, Paulina, a todos, donde quiera que estén siempre formaran parte de mi vida.

Para mis queridísimas amigas Nantzin, Clara, Rosalía y Alicia, gracias por su motivación, amistad, cariño y demás cosas que me han permitido compartir con ustedes.

Para todas aquellas personas que han escrito parte de mi historia, gracias por todas las enseñanzas que me han dejado, por toda su paciencia y cariño, siempre estarán en mi corazón.

Para todos los que me hayan faltado, gracias amigos porque se que de alguna manera han estado conmigo y me han demostrado su cariño.

Para todos los profesores que a lo largo de mi vida me han formado profesional y humanamente, gracias por todos sus conocimientos compartidos.

A la maravillosa Facultad de Química, gracias por permitir formarme como profesionista, como ser humano, como amigo; por todas las experiencias vividas.

INDICE	Página
1.0 Resumen	1
2.0 Introducción	2
2.1 El maíz	2
2.1.1 Formación de la Semilla de Maíz	4
2.1.2 Anatomía de la Semilla de Maíz	5
2.1.3 Reproducción del Maíz	6
2.2 Germinación	7
2.3 Ciclo celular	9
2.4 Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs)	10
2.5 Ciclinas	13
2.6 Complejo CYC-CDK	15
2.7 Inhibidores de CDKs	16
2.8 CKS	17
3.0 Antecedentes	19
3.1 Estudio de proteínas del ciclo celular durante la germinación del maíz: Ciclinas D, CDKA, CDKB Y CKS	20
4.0 Hipótesis	22
5.0 Objetivos	22
5.1 Objetivo General	22
5.2 Objetivos específicos	22
6.0 Diagrama de flujo	23
7.0 Materiales y métodos	24
7.1 Material biológico	24
7.1.1 Semillas de maíz	24
7.2 Tratamiento De Ejes Embrionarios De Maíz	24
7.2.1 Obtención de Extracto Crudo Proteico de Ejes Embrionarios de Maíz	24
7.3 Obtención de RNA Total de Células en Suspensión de Arroz	25
7.4 Obtención del cDNA de OsCks1	25
7.5 Ligación del Producto de PCR a los Vectores de Expresión pGEX-4T-2 y pProEx HTb	27
7.6 Sobreexpresión de la Proteína OsCks1	29
7.7 Purificación de GST-OsCks1 a través de la Cromatografía en Glutathion-Sefarose	30
7.7.1 Purificación de Hist-Oscks1 a través de la Cromatografía de Afinidad en Ni-NTA	31
7.8 Esquema de Inmunización	31
7.9 Purificación de IgGs de conejo anti-OsCks1	32
7.10 Western Blot	32
7.11 Ensayo de Competencia	32

7.12 Ensayo de Pull-Down	34
8.0 Resultados	35
8.1 Identificación de Genes Codificantes de Cks de Maíz en Bancos de Datos.	35
8.2 Amplificación del cDNA de OsCKS1	39
8.3 Calidad e Integridad del RNA Total de Arroz	40
8.4 Obtención y Amplificación del cDNA de OsCks1 por PCR y Ligación en los Vectores de Expresión pGEX 4T2 y pProEx HTb	41
8.5 Sobreexpresión y Purificación de las Proteínas Recombinantes GST-OsCKS1e His-OsCKS1	44
8.6 Validación del anticuerpo anti-GSTOsCks1	47
8.7 Inmunorreconocimiento de ZmCkss con Anticuerpos anti OsCks1	49
8.7.1 Inmunorreconocimiento de ZmCKSs con anticuerpos anti CKS 1 y 2 de humano	51
8.8 Ensayos de Pull-Down de CDKs	52
9.0 Análisis de Resultados y Discusión	54
10.0 Conclusiones	57
11.0 Perspectivas	57
12.0 Bibliografía	58

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Estructura de una semilla de maíz madura	6
Figura 2. Fases del ciclo celular en células eucariotas	10
Figura 3. Proteínas que se asocian a CDK	12
Figura 4. Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas por parte del complejo CycD-CDKA	16
Figura 5. Mapa del del vector pGEM-T Easy	27
Figura 6. Mapa del plásmido pGEX 4T2	28
Figura 7. Mapa del plásmido pPROEX HTb	29
Figura 8. Comparación de las secuencias primaria de aminoácidos deducidas de cDNA de ZmCks1 y ZmCks2	35
Figura 9. Comparación de las secuencias primaria de aminoácidos deducidas de cDNA de ZmCks1 y ZmCks2 Vs OsCks	36
Figura 10. Comparación de las secuencias primaria de aminoácidos deducidos de cDNA de monocotiledoneas vs dicotiledoneas	37
Figura 11. Árbol filogenético de ZmCks 1 y 2, OsCks1, AtCks1 y 2, VvCks y GmCks	38
Figura 12. Comparación de las secuencias primaria de aminoácidos deducidas de cDNAs de ZmCks1, ZmCks2, HsCks1 HsCks2	39
Figura 13. Secuencia nucleotídica del cDNA codificante de la CKS de arroz y oligos utilizados para amplificar dicha secuencia	40
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de RNA total de arroz	41
Figura 15. Amplificación del cDNA DE OsCks1 de arroz por PCR	42
Figura 16. Purificación con kit ILLUSTRATM GFXTM	43
Figura 17. Digestión del plásmido pGEX 4T-2 con las enzimas de restricción BamH1 y Not1	44
Figura 18. Perfil de purificación en una resina de GLUTATHION SEPHAROSE	45
Figura 19. Perfil de purificación en una resina de Ni-NTA	46
Figura 20. Titulación del anti OsCKS1	47
Figura 21. Ensayo de competencia	48
Figura 22. Inmunodetección de ZmCKS con el anticuerpo OsCKS1 (A) Electroforesis, (B) Western Blot antiOsCKS1, (C) Western blot AntiCDKA (Control de carga)	50
Figura 23. Inmunodetección de ZmCKS con anticuerpos antiCKS 1 y 2 de humano. (A) Electroforesis, (B) Western Blot AntiHsCKS1/2	51
Figura 24. Ensayo de pull-down de CDKA (B), CDKB1 (C) y Ciclina A1 (D)	53
ÍNDICE DE TABLAS	
Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz	3
Tabla 2. Determinación de identidad entre ZmCKS1 y 2	36
Tabla 3. Determinación de identidad entre ZmCKS1 y 2 vs OsCKS1	36
Tabla 4. Porcentaje de Identidad de CKSs de monocotiledoneas vs dicotiledoneas	37
Tabla 5. Determinación de identidad entre ZmCKS1 y 2 vs HsCKS1 y 2	39

RESUMEN

En eucariotes, las proteínas Cinasas Dependientes de Ciclina (CDKs, por sus siglas en inglés) interaccionan con ciclinas para regular la progresión del ciclo celular, y este complejo, a su vez, interacciona con la subunidad reguladora de la CDK (CKS, por sus siglas en inglés), la cual es esencial para su función. En *S. pombe* y en *S. cerevisiae* solo existe una isoforma, mientras que en eucariotes superiores y plantas se conocen 2 isoformas altamente relacionadas. Debido a la gran afinidad de la CDK por la CKS, se ha utilizado a esta última para realizar ensayos de cromatografía de afinidad para purificar a la CDK y estudiar con que otras proteínas se asocia conforme progresa el ciclo celular.

Al inicio de este trabajo no se tenía ningún reporte de CKS en maíz, por lo cual se inició clonando el cDNA de la CKS de arroz (OsCKS1). La proteína OsCKS1 se sobreexpresó, se purificó y se generaron anticuerpos en conejo contra ésta. Los anticuerpos anti OsCKS1 reconocieron una proteína de aproximadamente 11 KDa en extractos crudos de maíz (tamaño esperado). Mediante ensayos de western blot utilizando el anticuerpo anti OsCKS1 se observó que CKS de maíz (ZmCKS) se encuentra presente en ejes embrionarios de semilla seca y su presencia oscila durante las primeras 24 horas de imbibición, disminuye a las 6 y tiene un pico de acumulación a las 18 horas. Mediante ensayos de Pull-Down se determinó que la asociación, a lo largo de las primeras 24 h de germinación de OsCKS1 con CDKA y CDKB1 no varía. La ciclina A, proteína que se une a las CDKA y CDKB, tampoco varía. GST-OsCKS1 servirá como una herramienta en la detección de posibles interacciones de CDKs con otras proteínas involucradas en el ciclo celular.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 EL MAÍZ

El cultivo del maíz es considerado uno de los principales rubros en la agricultura nacional y mundial, por la importancia que representa este cereal en la dieta de las personas y animales, las grandes extensiones de tierras cultivadas con esta planta, así como la gran cantidad de empleos directos e indirectos que genera en toda su cadena de producción, procesamiento industrial y su comercialización desde la siembra hasta que es consumido por las personas. Por tal razón es considerado un cultivo estratégico para el sector agrícola; por la importancia que reviste este cultivo, se hace necesario realizar buenas prácticas de manejo agronómico que permitan obtener productos de excelente calidad y que generen buenas ganancias a los agricultores (Cruz H. y Jeglay Y., 2006), ocupa el 38.5 por ciento del total de la superficie sembrada a nivel nacional.

El maíz constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo y está entre los alimentos que tienen aplicaciones más diversas. Su uso se centra no sólo en la alimentación humana, también forma parte de la alimentación animal por sí mismo o como ingrediente en la composición de piensos para aves, cerdos y vacas. Por otra parte, los tallos de maíz, una vez separada la mazorca, son utilizados como forraje.

Desde el punto de vista industrial, esta planta es interesante para la obtención de edulcorantes alimentarios, de almidón y de alcohol. También se ha utilizado el grano del maíz para la obtención de bebidas no alcohólicas.

A partir de las partes no comestibles como lo es el olote, se obtiene furfural, un compuesto utilizado en la industria del caucho, resinas, plásticos e insecticidas (Paliwal et al., 2001).

Zea es una voz de origen griego, derivada de *zeo* = *vivir*. Esta planta es conocida con el nombre común de maíz, derivado de la palabra taína *mahís* con la que los indígenas del Caribe la denominaban. Dependiendo de la región, *Zea mays* recibe también en español nombres como oroña, danza, zara, millo, mijo o panizo. En México, las mazorcas maduras, pero frescas reciben el nombre de elote que viene del nombre náhuatl *elotl*, éstas mazorcas reciben el nombre de *choclo* (del quechua *chujllu*) en países de Sudamérica.

El nombre náhuatl del maíz, *tlayoli*, todavía es de uso común en el estado mexicano de Oaxaca y se le encuentra ligado a numerosos mitos y leyendas autóctonas.

El maíz es una planta herbácea, monocotiledónea y anual de la familia de las gramíneas (Raven et al., 1992) de origen americano y de importancia fundamental en el desarrollo de las antiguas culturas de América, ya que constituyó su alimento básico y quizá uno de los primeros en ser cultivados.

Tabla 1.- Clasificación taxonómica del maíz.

La planta del maíz alcanza de 0.5 m a 6 m de alto. Forma un tallo erguido, hueco, robusto y sin ramificaciones. En las mazorca existen filas de granos, cuyo número puede variar de 8 a 30, y su color desde amarillo claro hasta verde pardo. En el extremo del tallo se encuentran pequeñas flores masculinas que se vuelven secas y pardas cuando se dispersa el polen.

2.1.1 FORMACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ

Las esporas femeninas quedan retenidas y protegidas en el interior del esporangio. En este sitio germina la espora y produce un pequeño gametofito

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Spermatophyta</i>
Subdivisión	<i>Angiospermeae</i>
Orden cereal	<i>Monocotiledoneae</i>
Familia	<i>Poaceae (Gramineae)</i>
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i>

femenino, protegido por el tegumento que lo envuelve completamente, excepto por una pequeña abertura en la parte superior, el micrópilo. Posteriormente, el tegumento se desarrolla para formar la testa de las semillas.

Los gametos o células sexuales femeninas y masculinas son haploides ($1n$) Los gametos de sexo opuesto se fusionan para formar un cigoto ($2n$).

El desarrollo del embrión, se inicia con la división del huevo fertilizado o cigoto. Una de las dos células formadas dará origen a la parte superior del embrión y la otra a la parte inferior. Por medio de una progresión ordenada de divisiones el embrión se va diferenciando, iniciándose así la formación de los meristemos primarios que son los precursores de los futuros tejidos de la planta. Al mismo tiempo se van formando los cotiledones. (Moreno, P., 1996).

2.1.2 ANATOMÍA DE LA SEMILLA DE MAÍZ

Un grano maduro de maíz (cariopsis) esta conformado por tres partes principales: Pericarpio, endospermo y embrión.

El pericarpio es la capa externa transparente del grano, deriva de la pared del ovario y por ello es genéticamente idéntico a la línea materna. En él 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 y permite el acceso del aire 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 aleurona, que consiste en una capa de células vivas que rodea al endospermo, sintetiza α -amilasa y otras enzimas hidrolíticas que degradan almidón durante la germinación.

El endospermo puede ser de color amarillo o blanco, constituye el 85-90% del peso de la semilla y contiene la fuente de reserva energética, 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 de succión a favor de la nutrición del embrión durante la germinación.

El embrión contiene un eje embrionario y en este se distinguen las siguientes estructuras: el coleoptilo que es la primera hoja del eje embrionario y sirve de protección a la plúmula durante el brote de la misma en 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. (Mancilla A., 2008).

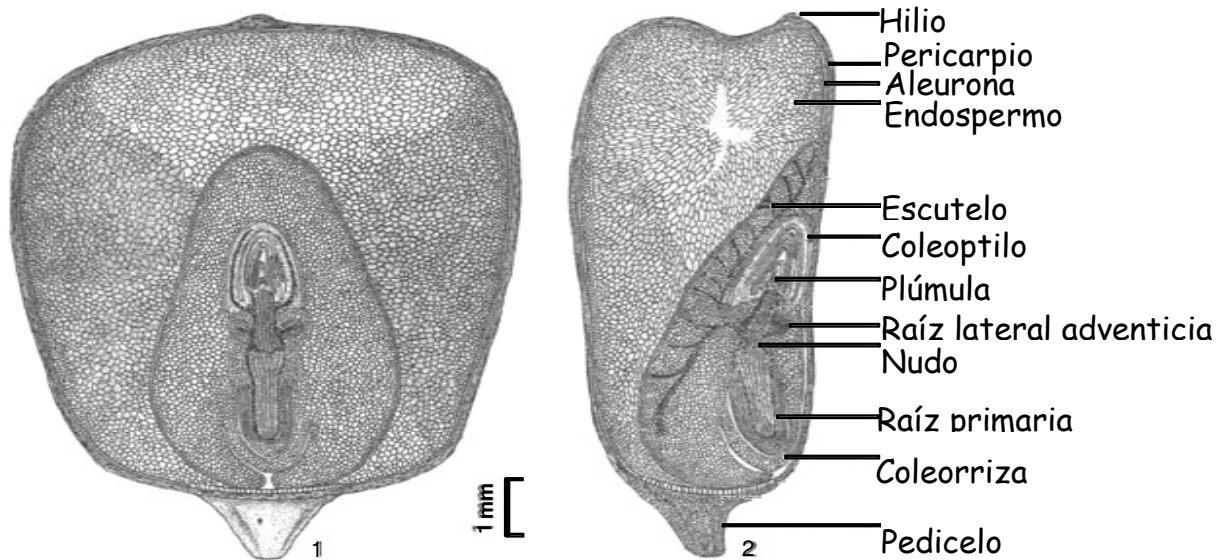


Figura 1. Estructura de una semilla de maíz madura: 1 y 2 son cortes de secciones verticales en dos planos de una semilla madura que muestran en detalle el arreglo de órganos y tejidos. (Modificado de Vincent, 2002).

2.1.3 REPRODUCCIÓN DEL MAÍZ

El maíz se reproduce de forma sexual, tiene espiga o inflorescencia masculina y mazorca o inflorescencia femenina. La polinización de las plantas se realiza con ayuda del viento, que transporta el polen de una planta a otra (polinización cruzada). El polen de la panícula masculina, arrastrado por el viento (polinización anemófila), cae sobre estos estilos, donde germina y avanza hasta llegar al ovario; cada ovario fecundado crece hasta transformarse en un grano de maíz.

La panícula es una inflorescencia compuesta de racimos que van decreciendo de tamaño hacia el ápice. En otras palabras, un racimo ramificado de flores, en el que las ramas son a su vez racimos.

Se denominan plantas monoicas aquellas que presentan los órganos donantes o dadores (masculinos) y los receptores (femeninos) en flores separadas pero situadas en la misma planta, como ocurre en el maíz. El tallo principal termina en una inflorescencia masculina; ésta es una panícula formada por numerosas flores pequeñas llamadas espículas, cada una con tres anteras pequeñas que producen los granos de polen o gametos masculinos. La inflorescencia femenina es una estructura única llamada mazorca, que agrupa hasta un millar de semillas dispuestas sobre un núcleo duro. La mazorca crece envuelta en unas hojas modificadas o brácteas; las fibras sedosas o pelos que brotan de la parte superior de la panocha o mazorca son los estilos prolongados, unidos cada uno de ellos a un ovario individual (Raven et al., 1992).

2.2 GERMINACIÓN

La germinación comienza con la entrada de agua a la semilla quiescente (imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, generalmente la radícula (protrusión radicular). 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 (Bewley y Black, 1994).

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 del ciclo celular y al germinar éste se reactiva 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).

Cuando entra agua a la semilla se desatan diversos procesos como la hidratación de las proteínas, cambios en la estructura subcelular, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular. Ninguno de los procesos anteriores es específico de la germinación, pero sus efectos combinados transforman a un embrión deshidratado, con un metabolismo apenas detectable, en uno que tiene

un metabolismo vigoroso y que culmina con el crecimiento de la radícula. La emergencia de la radícula se debe inicialmente a la elongación celular y posteriormente a la proliferación celular; para que esto último se lleve a cabo, las células deben pasar por un proceso que regula el ciclo celular.

2.3 CICLO CELULAR

El ciclo celular en eucariotes es un conjunto ordenado de eventos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas, cada una de las cuales deberá contener una copia completa del material genético, el cual se duplicó y se distribuyó equitativamente entre las dos nuevas células. Este conjunto de eventos se dividen en cuatro principales etapas, las cuales deberán llevarse a cabo de una forma continua y estricta;

Fase G1- Percepción de las condiciones medio-ambientales e iniciación del crecimiento celular, síntesis de proteínas y RNA.

Fase S -Replicación del DNA, el cual será posteriormente repartido en las 2 células hijas.

Fase G2 – Aseguramiento de la correcta replicación del material genético, así como la preparación para la división celular.

Fase M – Compactación del DNA replicado y posicionamiento en cada extremo de la célula para la formación de dos núcleos con idéntica información hereditaria.

G₀– Estado de reposo en el cual se mantiene la capacidad para reincorporarse en el ciclo celular en el momento en que las condiciones medioambientales sean las adecuadas.

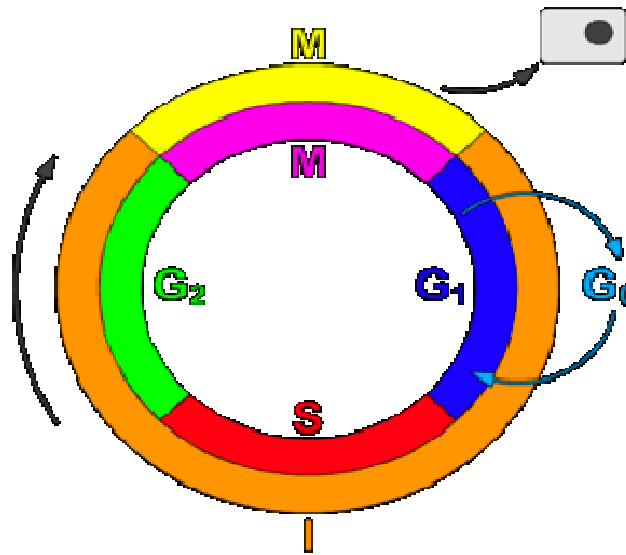


Figura 2.-Fases del ciclo celular en células eucariotas.

Al concluir la fase M, si las condiciones medio-ambientales son las adecuadas, un nuevo conjunto de eventos tendrá lugar.

La progresión del ciclo celular es controlada por una maquinaria molecular universalmente conservada y gobernada por una serie de proteínas cinasas de Ser/Thr, conocidas como Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs), las cuales se activan mediante su asociación con proteínas regulatorias conocidas como ciclinas.

2.4 CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDKs)

Las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), tienen funciones críticas en el control de la progresión del ciclo celular en eucariotes. Además de asociarse con ciclinas, las CDKs se asocian directamente con proteínas inhibitorias de la actividad de cinasa (Krps) y subunidades regulatorias de cinasas (CKS), las cuales pueden modular la actividad de las CDKs (ver figura 3). Al unirse a las ciclinas forman heterodímeros, lo que dota de especificidad a la CDK y permite la regulación de su actividad. Las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) en las plantas se han agrupado en 6 categorías diferentes A, B, C, D, E y F, dependiendo del tipo de secuencia de unión a las ciclinas que presentan, de las cuales las más estudiadas son las CDKA y CDKB. (Takatsuka, 2006). Las primeras descripciones de una CDK se realizaron en *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*; se describió como una proteína de 34 KDa (CDC2/CDC28 respectivamente), la cual presenta un motivo PSTAIRE en el sitio de unión a las ciclinas, éste motivo se ha encontrado también conservado en las Cdk1 y 2 de mamíferos. En plantas, la proteína CDKA es la CDK cuya estructura terciaria es semejante a la Cdk1 y también presenta el motivo PSTAIRE. A semejanza con las levaduras y a diferencia con las células de mamíferos, la CDKA regula la progresión de G1 a S y también de G2 a M (asociada a diferentes ciclinas conforme progresa el ciclo celular) (Vázquez-Ramos, J.M., 2006).

Dependiendo de la especie, puede haber de uno a tres diferentes genes codificando para CDKAs. Aparentemente *Arabidopsis* tiene sólo uno, pero en maíz existen tres genes.

CDKA se une a ciclinas de diferente tipo; por ejemplo, CycA2;1 de alfalfa se une a CDKA; las proteínas CycD2;1 y CycD3;1 de tabaco se unen a CDKA *in vivo*, y en estos complejos la cinasa fosforila a la proteína RBR endógena. En *Arabidopsis*, CycD2 y CycD3 interactúan con CDKA formando complejos con actividad de cinasa sobre la histona H1. (Vázquez-Ramos, J.M., 2006). La nomenclatura de las ciclinas se determina de acuerdo a la homología que se tiene con ciclinas de otros organismos, tales como es el caso con las ciclinas de mamíferos, dentro de las cuales las primeras en describirse fueron las ciclinas A.

El segundo miembro de la familia de las CDKs, CDKB, posee motivos de unión a las ciclinas PPTALRE ó PPTTLRE, según si es CDKB1 ó CDKB2 respectivamente, que difiere de la de CDKA. Es importante mencionar que esta secuencia es exclusiva de las CDKs de los vegetales. Las CDKBs difieren también de CDKA en que su expresión es dependiente del ciclo celular, por lo que se acumulan principalmente en la transición G2/M. Las ciclinas con las que CDKB se asocia son CycA y CycB (Vázquez-Ramos, J.M., 2006).

Las otras cuatro familias de las CDKs son CDKC, CDKD, CDKE y CDKF; ninguna de estas proteínas ha sido caracterizada formalmente. La secuencia de unión a las ciclinas de CDKC es PITAIRE, también presente en la Cdk9 de humanos. La cinasa CDKD ha sido clasificada como una CAK (CDK activating kinase) y tiene una secuencia de unión a las ciclinas N(I/F)TALRE; esta proteína tiene semejanza a la Cdk7 de humanos y se ha encontrado que, en arroz, CDKD puede fosforilar a CDKA. La secuencia de unión a las ciclinas de la CDKE es SPTAIRE y se desconoce su función (Takatsuka, 2006).

En la figura 3 se presenta la asociación de CDKs con distintas proteínas, teniendo presente tanto fosforilaciones activadoras como inhibitorias.

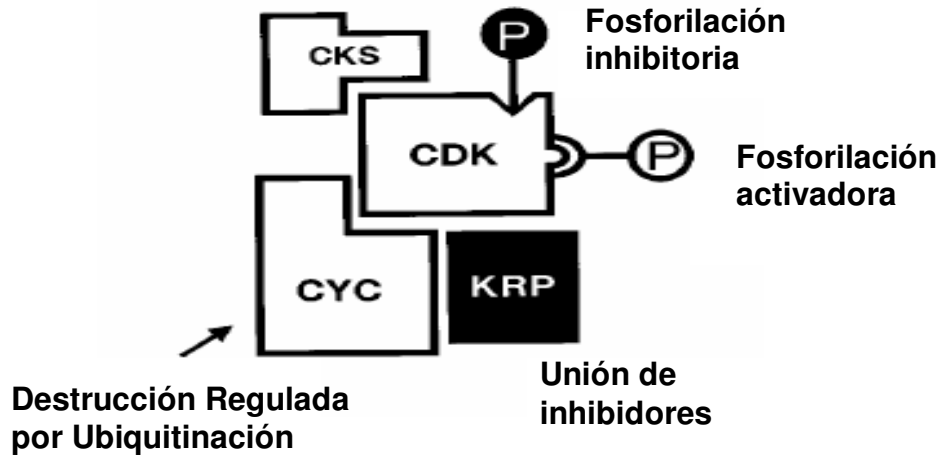


Figura 3. Proteínas que se asocian a CDK. La actividad de CDK es regulada a múltiples niveles, tanto por su asociación con otras proteínas como por su estado de fosforilación/desfosforilación (modificado de Dewitte and Murray, 2003).

2.5 CICLINAS

Las ciclinas son proteínas que se acumulan en momentos específicos del ciclo celular y posteriormente son degradadas.

Todos los organismos eucariotes cuentan con diferentes familias de ciclinas, cada una de ellas con funciones específicas. Por ejemplo, en animales las ciclinas tipo D tienen un rol especial en la reentrada al ciclo celular en respuesta a señales extracelulares y las ciclinas tipo E promueven la progresión G1 a S (Geng et al., 2003).

De acuerdo a su similitud con las ciclinas de animales, las ciclinas de plantas tales como *Arabidopsis thaliana*, tabaco y arroz, se han clasificado como tipos A, B, C, D, H y L (Barroco et al., 2003, Wang et al., 2004).

En general las ciclinas se distinguen por una secuencia conservada, conocida como caja de ciclinas, a la que se une la CDK. Dentro de las ciclinas A de *Arabidopsis thaliana* se pueden encontrar tres subtipos, CycA1, CycA2 y CycA3; también existen en *Arabidopsis* tres subgrupos de ciclinas B (B1 a B3) (Vázquez-Ramos, J.M., 2006).

Las ciclinas A y B se asocian a los procesos que ocurren entre la fase S y la fase M. Se ha demostrado mediante cultivos celulares de tabaco, *Arabidopsis*, *Catharanthus* y arroz), que la expresión y acumulación de los transcritos para las ciclinas tipo B ocurre en la fase G2 tardía y particularmente en la fase M.

Las ciclinas A y B presentan en su estructura secuencias requeridas para su degradación, llamadas cajas de destrucción, las que son fundamentales para que se dé el recambio de las ciclinas durante el ciclo y se permita la transición entre fases.

Las ciclinas D presentan una característica definida, que es la secuencia de los aminoácidos LXCXE (donde X representa a cualquier aminoácido) en su extremo amino terminal, por la que se unen a la proteína RB; esta secuencia está presente en el extremo amino de las ciclinas D de las plantas y se ha demostrado que se unen a la proteína RB (Vázquez-Ramos, J.M., 2006).

Al igual que todas las ciclinas, las tipo D deberían ser de una vida media relativamente corta; sin embargo, la vida media de las diferentes ciclinas D en las plantas varía; esto podría deberse a que no todas presentan la secuencia de degradación típica, o caja PEST (por la secuencia de aminoácidos presente), y no existe evidencia de otro tipo de secuencia involucrada en el recambio proteico. Diversos estudios han mostrado que las ciclinas D de las plantas muestran una

expresión dependiente del ciclo y responden a la acción de factores de crecimiento, nutrimentos y hormonas. Por ejemplo, en cultivos celulares de tabaco, la CycD3 se induce en G1 en cultivos sincronizados. En cultivos celulares de *Arabidopsis* la sacarosa, la cual es el metabolito más importante que se produce durante la fotosíntesis, induce la expresión tanto de CycD2 como de CycD4. En estos mismos cultivos, la expresión de CycD3 es inducida por la combinación de la sacarosa y de la hormona citocinina y en las plantas completas o sus explantes, la sobreexpresión de la CycD3 hará a las plantas independientes de la acción de citocininas para proliferar, lo que implica que el ciclo celular se activa a partir de la expresión de esta ciclina. Otro tipo de hormonas, los brasinosteroides, también inducen la expresión de CycD3, aunque se desconoce el mecanismo de estimulación, el cual podría estar ligado a la acción de otro tipo de hormonas, las auxinas. Sin embargo, habría que considerar que lo descrito para las ciclinas de *Arabidopsis* podría no ser idéntico en otros sistemas vegetales; por ejemplo, en maíz, la expresión de CycD2 responde a la acción conjunta de las citocininas y la sacarosa, semejante a como ocurre con CycD3 de *Arabidopsis*. Adicionalmente, la expresión de las CycD1, D2 y D4 de maíz se incrementa notablemente por acción de las auxinas, no así de las citocininas.

Probablemente los genes de las ciclinas D respondan diferencialmente a diversas condiciones ambientales y hormonas en cada tejido vegetal y, de una manera individual, en cada especie vegetal (Vázquez-Ramos, J.M., 2006).

2.6 COMPLEJO CYC-CDK

La función más relevante del complejo Ciclina-CDK es la fosforilación de proteínas blanco, y entre éstas se encuentra la proteína retinoblastoma (pRB, por haberse hallado originalmente en tumores de retina). La ciclina D se asocia a la proteína RB mediante una secuencia LXCXE, presente en el extremo amino terminal de las ciclinas D. El mecanismo por el cual pRB logra detener al ciclo celular, involucra el “secuestro” del factor transcripcional E2F-DP. La liberación de E2F-DP es esencial para la progresión de la fase G1 a S. Al ser blanco de fosforilación por un complejo Ciclina D-CDKA, pRB también resulta ser un factor proteico controlado por el entorno en el que se encuentran las células. En condiciones poco propicias para la proliferación, pRB (asociado a E2F-DP) inhibe el avance del ciclo y las células se mantienen en G1. Cuando el entorno cambia y las señales de proliferación son fuertes y predominantes, pRB es fosforilada por el complejo Ciclina D-CDKA y de esta manera se despega del complejo E2F-DP, esto se representa en la figura 4, lo que permite así el avance, ya irreversible, hacia la fase S. Este mecanismo es también un importante punto de control para evitar que las células que van saliendo de un ciclo anterior, prosigan hacia uno nuevo sin haberse percatado si las condiciones del entorno son las adecuadas; esto constituye lo que se conoce como un control tipo checkpoint, o de aduana (Vázquez Ramos, J.M., 2006).

Estos tipos de complejos son importantes no sólo porque le dan inicio y dirección al ciclo, sino porque también funcionan en el acoplamiento del ciclo con las condiciones medio-ambientales que determinan la iniciación de los eventos moleculares que permiten la proliferación.

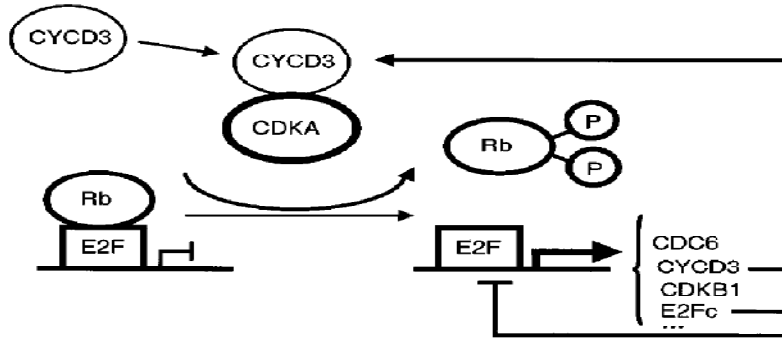


Figura 4. Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas por parte del complejo CycD-CDKA (Dewitte y Murray, 2003).

2.7 INHIBIDORES DE CDKs

La búsqueda de proteínas inhibidoras tipo Cip/Kip en plantas ha dado como resultado la descripción de al menos 7 diferentes tipos de proteínas con homología a p27 de los animales, las que se denominan KRPs (Kinase Regulatory Proteins) o ICKs (Inhibitor of Cyclin Dependent Kinases). Se ha demostrado que las 7 proteínas son capaces de unirse a las ciclinas tipo D y sólo algunas se unen directamente a CDKA, inhibiendo su actividad de cinasa. Existe evidencia en plantas de que la sobreexpresión de ICK1 provoca una reducción del número de células y del crecimiento celular *in vivo*, alterando la estructura de los tejidos tales como las hojas, lo que sugiere que ICK1 participa en el control del crecimiento y desarrollo tisular. De hecho, la sobreexpresión de todos los miembros de la familia ICK provoca, en mayor o menor medida, cambios en el crecimiento y morfogénesis tisular (Vázquez-Ramos, J.M., 2006).

2.8 CKS

Hayles y colaboradores (1986) describieron por primera vez a la proteína p13^{suc1+} de *Schizosaccharomyces pombe*, posteriormente se describió un gen ortólogo en *S. cerevisiae*; CKS1 (Hadwiger et al., 1989).

CKS fue identificada originalmente como un supresor de mutaciones en Cdk1 de levaduras de fisión y gemación. Experimentos bioquímicos revelaron que esta supresión refleja la asociación física de CKS1 (*S. cerevisiae*) y p13^{suc1+} con Cdk1 y con el complejo activo ciclina-Cdk1.

Aislamientos posteriores de CKS1 y CKS2 de humanos revelaron que estas proteínas son estructural y funcionalmente conservadas en los eucariotes, y que se asocian específicamente con Cdk1, Cdk2 y Cdk3. Ahora sabemos, por una serie de estudios, que tanto CKS como las ciclinas interactúan simultáneamente y de forma independiente con las Cdk.

¿Cómo controla CKS la función de Cdk? Gran parte de nuestra comprensión acerca de la función de CKS se ha dado del análisis de mutantes en levaduras y de experimentos bioquímicos en extractos de *Xenopus laevis* (rana). CKS, cuando se asocia con Cdk, no actúa como inhibidor o activador en el sentido clásico, sino que parece modular la elección del sustrato o el grado de fosforilación. Algunas mutaciones de CKS1 detienen el ciclo celular en G1, y esto parece reflejar defectos en la actividad en G1 del complejo ciclina-Cdk1. La eliminación de CKS1, ya sea en levaduras o en extractos de *Xenopus*, también puede dar lugar a defectos en la entrada, paso y la salida de la mitosis. En general, esto parece reflejar el hecho de que CKS1 aumenta la fosforilación de diversos sustratos mitóticos de Cdk1, incluyendo Cdc25, Wee1 y componentes del complejo promotor de la anafase.

No se conoce de forma precisa cómo CKS1 facilita la fosforilación por CDK de sus proteínas blanco, pero es concebible que ciertas proteínas fosforiladas puedan interactuar con una superficie de unión a fosfato en CKS1 y de esta manera las proteínas blanco son fosforiladas de manera más eficiente.

Por último, la inactivación de MPF (Factor Promotor de Mitosis) a través de la destrucción de la ciclina B es un factor limitante para la salida de la mitosis. Aquí, CKS1 también desempeña un papel importante ayudando a dirigir a la ciclina B ubiquitinada al proteasoma para su degradación, como se ha demostrado en levaduras de gemación. (Wade Harper, 2001).

Esta proteína está altamente conservada en organismos eucariotes a lo largo de la evolución. En células de animales se encuentran dos tipos de CKS (denominadas CKS1 y CKS2), las cuales tienen una alta identidad entre sí. En humanos la CKS1 tiene una identidad del 81% con respecto a CKS2.

Mutaciones en el gen que codifica para la proteína p13suc1 (CKS de *S. pombe*) o en el gen que codifica para la CKS1 de humano, detienen el ciclo celular en la fase G1 o en la fase G2, (Hadwiger et al., 1989) sugiriendo que esta proteína puede regular puntos críticos del ciclo celular. Al igual que se presenta en células animales, tanto en *Arabidopsis thaliana* como en maíz, se han detectado 2 genes de CKS.

Las CKS se asocian a muchos complejos Ciclina-CDK con una alta especificidad, lo cual ha sido explotado como una herramienta para purificar CDKs, y consecuentemente para determinar con que proteínas están asociadas en ese momento.

CKS también tiene la función de actuar como cofactor de Spk2 (E3 ligasa), presentando a las cajas F el sustrato a degradar vía proteasoma, pudiendo presentar tanto a activadores como inhibidores, un ejemplo de ello puede ser el inhibidor p27^{kip1} (Merav Slotky, 2005).

3.0 ANTECEDENTES

Distintos experimentos han indicado que, aunque la división celular no es necesaria para que ocurra una germinación visible, el establecimiento del ciclo celular durante la germinación es esencial. La germinación de una semilla tiene como propósito fundamental la reproducción de la planta. El proceso de germinación implica el despertar de la semilla en estado latente y la reanudación de los procesos de desarrollo; esto implica que la semilla contiene, o debe adquirir prontamente, la memoria biológica del programa morfogénico que reproduce a la planta. Como consecuencia de la entrada de agua, las células de los tejidos de las semillas se alargan y finalmente se dividen, un proceso que es seguido por la protrusión de la raíz, evento que define la terminación del proceso de germinación (Bewley y Black, 1994).

La germinación de semillas parece ser un excelente modelo para estudiar el ciclo celular en plantas. El desarrollo del embrión durante la formación de la semilla implica una alta velocidad de proliferación celular; este proceso puede tomar varias semanas, después del cual la semilla acumula material de reserva, madura y pierde agua. Las células en embriones de semillas secas de diferentes especies tienen mayoritariamente un contenido de DNA $2n$ (Deltour y Jacqmard, 1974). Al inicio de la germinación, las células se encuentran en una fase semejante a G_0 y eventualmente entran a la fase G_1 , la cual puede tener una duración variable y, después de la cual ocurre la síntesis de DNA de tipo replicativo, marcando el inicio de la fase S. (Baíza et al., 1989).

Es importante estudiar las fases G1 y S del ciclo celular durante la germinación, puesto que es en estas fases donde ocurre un control más meticuroso en el avance del ciclo celular. De hecho, se ha observado que la fase G1 puede ser la mas larga de las fases, ya que la célula debe asegurarse que tiene todo lo necesario para sobrevivir y es aquí donde ocurren una serie de mecanismos de verificación, después de los cuales se compromete a replicar su DNA (De Jesús-Juárez N., 2008).

3.1 ESTUDIO DE PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR DURANTE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ: CICLINAS D, CDKA, CDKB Y CKS

Una de las aproximaciones para definir el papel de las proteínas del ciclo celular en plantas, es el estudio de sus niveles de expresión, de actividad y de asociación con otras proteínas durante un evento de desarrollo particular como es la germinación.

Dentro de nuestro grupo de investigación se ha estudiado el comportamiento de varias proteínas de maíz que intervienen durante la progresión del ciclo celular, y que las utilizamos como marcadores del mismo. Entre las proteínas que hemos estudiado están PCNA, ciclina D2;1, ciclina D4;1, ciclina D5;1 y D5;2, proteína 1 inhibidora de CDK (KRP1), CDKA. De algunas de ellas hemos definido la tendencia de sus niveles cuando son influenciadas por diversos agentes externos, como pueden ser la presencia de hormonas (p.ej. benciladenina, auxinas o ácido abscísico) o bajo preacondicionamiento, sabiendo que este tipo de agentes pueden afectar la progresión natural del ciclo celular y como consecuencia

observar algún cambio durante la germinación de maíz. (Sánchez M. y Vázquez-Ramos J, 2002), (Quiroz-Figueroa F. y Vázquez-Ramos, 2006), (Gutierrez R., et al., 2005).

Se ha propuesto que las ciclinas tipo D son de las primeras proteínas que perciben el ambiente exterior y pueden actuar como sensores de factores de crecimiento integrando las señales externas con la maquinaria del ciclo celular (Sherr y Roberts, 1999). Siendo así, es natural que la expresión de las ciclinas tipo D sea activada por factores de crecimiento (Prober y Edgar, 2001, Dewitte et.al., 2003) que, al unirse a la CDK, hagan progresar el ciclo celular.

La subunidad proteica de CDK (CKS) se propone actúa como factor de acoplamiento que puede influir en las interacciones entre el complejo cinasa y el sustrato. Interacciones de CKS1 de *Arabidopsis*, CDKA y CDKB han sido demostradas en trabajos previos. La expresión de CKS1 está asociada con células de división así como con células de endorreducción. (Dewitte et.al., 2003); aunado a ello, en nuestro laboratorio se ha encontrado, en maíz, interacción entre la ciclina D2 y una proteína tipo CDKA mediante ensayos de *pull-down*, utilizando p13suc1 (ortólogo de CKS, Gutiérrez et al., 2005). Debido a la gran afinidad de la CDK por la CKS, se ha utilizado a esta última para realizar ensayos de cromatografía de afinidad para purificar a la CDK y estudiar con que otras proteínas se asocia conforme progresa el ciclo celular (Lieven De Veylder, 1997) por lo cual, uno de los objetivos de este trabajo es determinar los niveles de la proteína CKS de maíz (ZmCKS) durante la germinación, así como estudiar los niveles de asociación con las CDKs tipo A y tipo B.

4.0 HIPÓTESIS

La asociación de las proteínas ZmCKS-ZmCDKs será baja en semilla seca, y ésta se incrementara conforme avance la germinación.

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

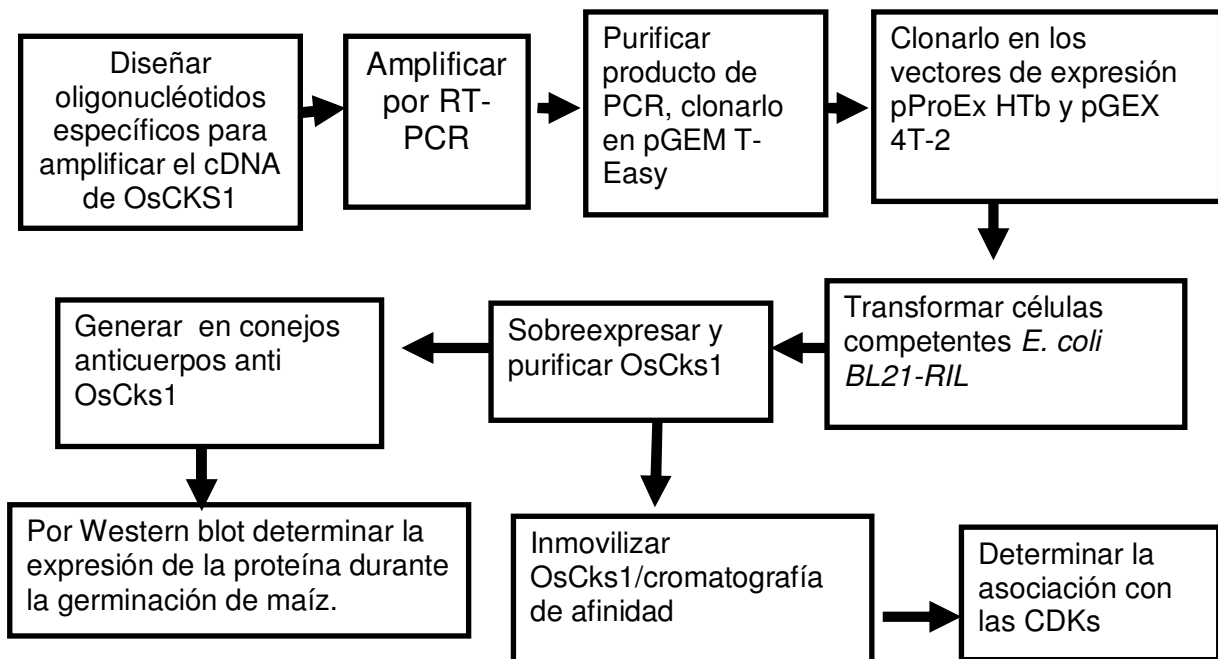
Determinar los niveles de proteína de ZmCKS durante la germinación y los de asociación con las CDKs tipo A y tipo B durante las primeras 24 h de imbibición.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✔ Amplificar por PCR el cDNA de la CKS1 de arroz (OsCKS1) y clonarlo en los vectores de expresión pProEx HTb y pGEX 4T-2.
- ✔ Sobreexpresar a CKS1 de arroz (OsCKS1) y purificarla por cromatografía de afinidad.
- ✔ Obtener y caracterizar anticuerpos anti-OsCKS1.

- ✓ Determinar la presencia de CKS durante la germinación de maíz mediante ensayos de Western Blot.
- ✓ Determinar mediante ensayos de *pull-down* los niveles de asociación de GST-OsCKS1 con CDKA y CDKB de maíz.

6.0 DIAGRAMA DE FLUJO



7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

7.1.1 SEMILLAS DE MAÍZ

Para el estudio se utilizaron semillas de maíz variedad Chalqueño provenientes de la cosecha 2008, Valle de Chalco, Edo. de México, con una viabilidad $\geq 95\%$. De estas semillas se obtuvieron los ejes embrionarios y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

7.2 TRATAMIENTO DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ

Se desinfectaron lotes de 50 ejes embrionarios con NaClO 0.1% de cloro activo por 30 s. Se lavaron 5 veces por 30 s con agua estéril y se dejaron secar sobre cajas petri con papel filtro (ambos estériles) por 10 min. Posteriormente se adicionó el buffer de imbibición (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y sacarosa 2%).

La incubación se llevó a cabo en una estufa regulada a 25 °C durante: 6, 12, 18 y 24 h.

7.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO PROTEICO DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ

Para extraer las proteínas se utilizaron 50 ejes embrionarios en 5 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 15 mM, NaCl 75 mM, KCl 25 mM, EDTA

5 mM pH 8.0, DTT 1 mM, Tritón X-100 0.2%, sacarosa 250 mM, β -glicerofosfato 60 mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 200 μM , EGTA 1 mM y una tableta de inhibidores de proteasas/50 mL de buffer (Roche) en semilla seca y a diferentes tiempos de imbibición (6, 12, 18 y 24 h) las células fueron lisadas por fricción mecánica con la ayuda de un pistilo. Los extractos se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y el pellet y la capa lipídica se eliminaron, la proteína se cuantificó por el método de Bradford y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

7.3 OBTENCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE ARROZ

2.5 mL de células en suspensión de arroz (donadas amablemente por la Ing. Agrónoma Ma. Teresa Olivera Flores), fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 3 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante y el paquete celular (aproximadamente 100 mg), se colocó en un mortero previamente enfriado, se agregó nitrógeno líquido y las células fueron lisadas por fricción mecánica con la ayuda de un pistilo; después de que la muestra lisada se descongeló, inmediatamente se agregó 1 mL de Trizol y se procesó de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Invitrogen).

7.4 OBTENCIÓN DEL cDNA DE OsCKS1

La obtención del cDNA de OsCKS se realizó a partir de una reacción de transcripción reversa utilizando la enzima transcriptasa reversa ThermoScript,

siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen) y utilizando las siguientes condiciones: 50 ng de RNA total de arroz, el oligonucléotido (0.6 μ M) 5'-aaagcgccgccttgggcagcatctgc, incubando a 55 °C durante 1 h. La reacción se detuvo calentando la mezcla durante 5 min a 85 °C.

Para amplificar el cDNA de OsCKS1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó el **kit AccuPrime™ SuperMix II**, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

se utilizaron 5 μ L de la reacción de transcriptasa reversa con los siguientes oligonucléotidos diseñados con el programa OligoPerfect Designer de Invitrogen

OsCKS1Fwd 5'-aaaggatccatgggccagatccagtactc 0.6 μ M

OsCKS1Rev 5'-aaagcgccgccttgggcagcatctgc 0.6 μ M

Las condiciones de amplificación fueron: 30 ciclos

Desnaturalización 94 °C 30 s

Alineamiento 60 °C 30 s

Extensión 68 °C 1 min

teniendo como volumen final 50 μ L.

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1.5%, se cortó la banda correspondiente a 270 pb, se purificó con el kit ILLUSTRATE™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) y se ligó al vector pGEM-T Easy (figura 5) de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Promega). Una de las ventajas de este vector es que permite seleccionar las clonas que contienen el cDNA de interés 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 se altera el marco de lectura y se pierde la actividad de β -galactosidasa. Con este plásmido recombinante se transformaron por choque térmico bacterias competentes *E. coli* *DH5 α* , se sembraron en cajas petri con medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal y se incubaron a 37°C, se seleccionaron 5 colonias de color blanco y se tomó una asada de estas y se inoculó a un tubo cada una con medio LB/ampicilina, se incubó a 37 °C/ 12 h a 150 rpm, posteriormente se realizó la extracción del plásmido, conforme lo indica el protocolo del sistema Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen). Una vez que se obtuvo el plásmido, se realizó una reacción de digestión con las enzimas de restricción *BamH1/Not1* (Invitrogen), con el fin de liberar el inserto del vector de clonación pGEM-T Easy.

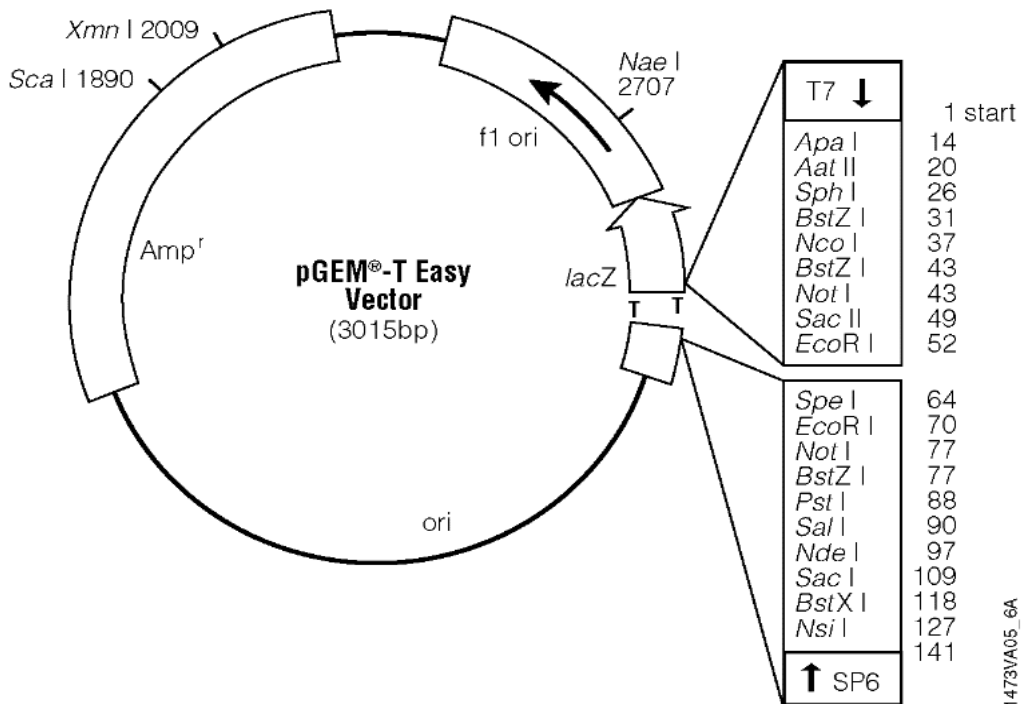


Figura 5. Mapa del vector pGEM-T Easy (Promega).

7.5 LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR A LOS VECTORES DE EXPRESIÓN pGEX-4T2 y pProEx HTb

Después de la digestión se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1.5%, se cortó la banda de 270 pb y se purificó con el kit ILLUSTRATE™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit.

9 ng del fragmento liberado del vector pGEM-T Easy se mezclaron con 54 ng del vector de expresión pGEX-4T2 (previamente digerido con 1 U de las enzimas de restricción BamH1 + Not1). La ligación se hizo con el kit Ligafast rapid DNA ligation system (GE healthcare). La figura 6 muestra el mapa del vector pGEX-4T2. Con este plásmido recombinante se transformaron células de *E. coli BL21-RIL*. La ventaja de usar el plásmido pGEX-4T2 es que facilita la purificación de proteínas recombinantes de interés porque codifica para la proteína Glutación S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, a la cual esta fusionada (en este caso), la proteína OsCKS1.

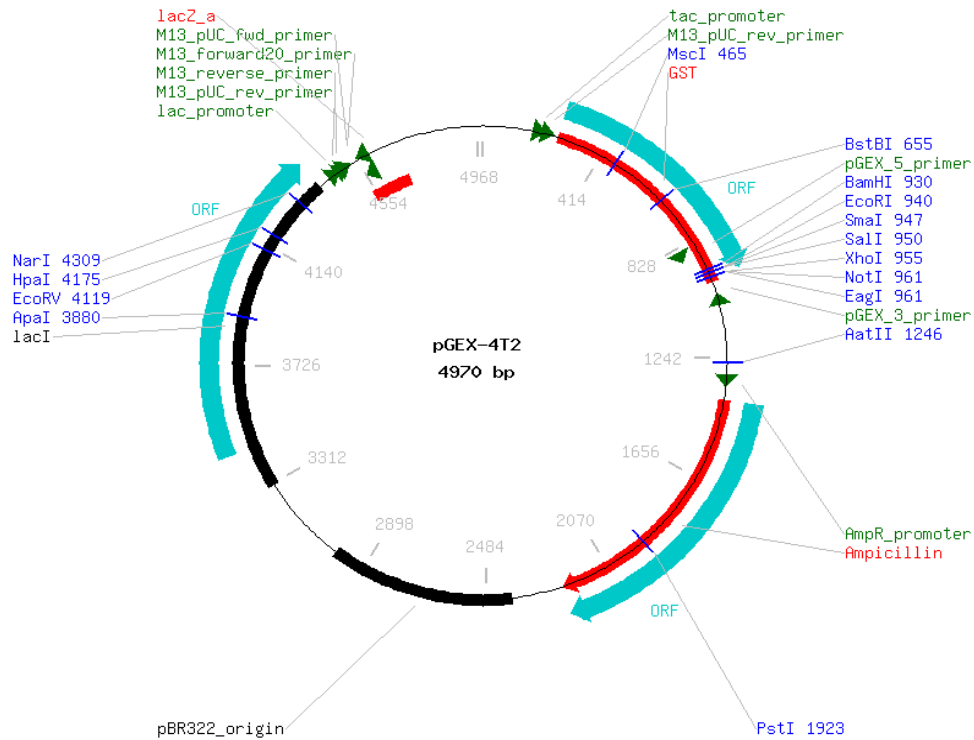


Figura 6. Mapa del plásmido pGEX 4T2 (Amersham Pharmacia-Biotech)

Para la ligación del cDNA de OsCKS1 en el vector pPROEX-HTb se realizó lo mismo que con el plásmido anterior, pero utilizando 50 ng del plásmido pPROEX-HTb. Este vector codifica para una cola de polihistidinas, lo cual facilita su posterior purificación en la resina Ni-NTA, ya que esta cola de polihistidinas se une fuertemente mediante enlaces de coordinación del anillo imidazol de las histidinas al Ni^{2+} de dicha resina. La figura 7 muestra el mapa del vector pPROEX-HTb, con éste vector de expresión se transformaron por choque térmico células competentes *E. coli BL21-RIL*.

Posteriormente, las células se plaquearon en cajas petri con agar LB + ampicilina (100 μ g/mL), incubando a 37 °C durante 12 h.

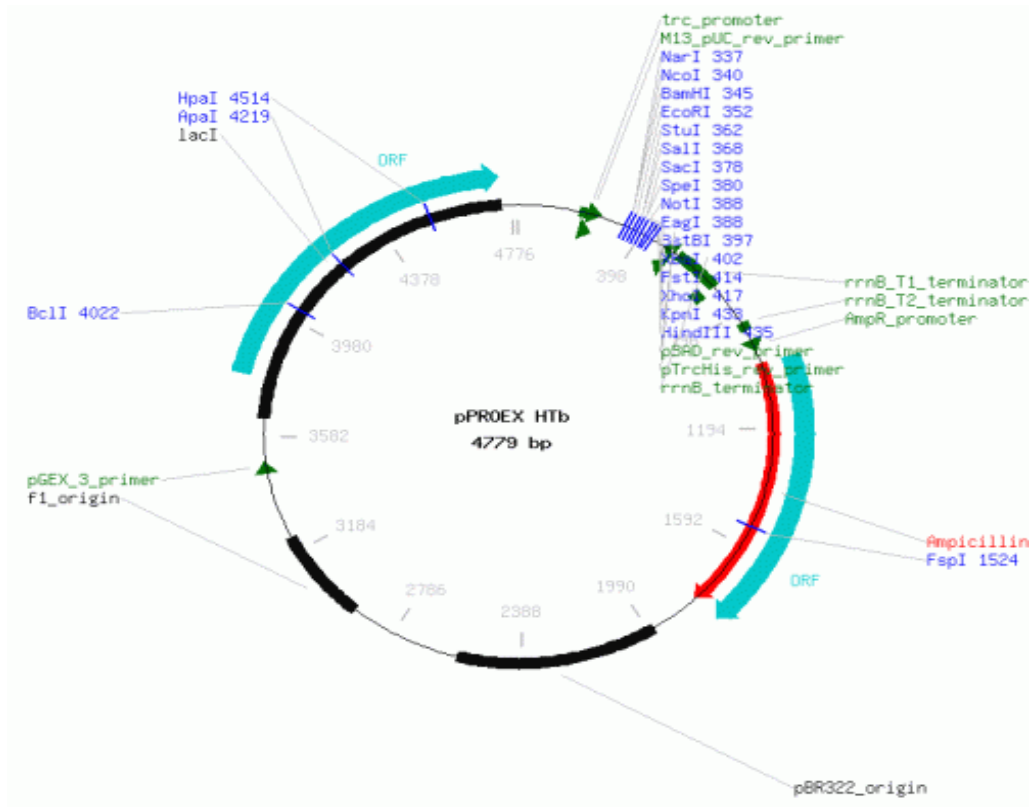


Figura 7. Mapa del plásmido pPROEX HTb (Invitrogen).

7.6 SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA OsCKS1

Se tomó una asada de una colonia aislada y se inoculó en 3 mL de medio LB líquido + ampicilina 100 µg/mL, se incubó por 12 h a 37 °C con agitación de 150 rpm (incubadora Lab Line Environ Shaker). Al término de este tiempo se tomó 1.5 mL de cultivo y se transfirió a un matraz de 500 mL de medio LB estéril con ampicilina 200 µg/mL. Se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO₅₉₅ nm de 0.5 y entonces se agregó IPTG a una concentración final de 0.6 mM. Se incubó el cultivo por otras 2 h más a la misma temperatura; una vez cumplido el tiempo de inducción, las células se transfirieron a botellas de centrifuga y se centrifugaron por 5 min a 6 000 rpm a 4 °C.

Las células concentradas en el pellet se resuspendieron en 20 mL de Buffer Salino de Fosfatos (PBS 1X; NaCl 1.368 M, KCl 0.026 M, Na₂HPO₄ 0.1 M, NaH₂PO₄·H₂O 0.025 M, H₂O) +Tritón X-100 0.2%. Posteriormente, las células se sonicaron a 25 Hz por 2 períodos de 59 s (Sonics Vibra Cell, Sonics and Materials INC.), dejando reposar 15 s entre cada tiempo. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. La proteína recombinante y sobreexpresada se localizó en la fracción soluble. Este procedimiento fue también aplicado para tratar las células transformadas con el plásmido pPROEX HTb.

7.7 PURIFICACIÓN DE GST-OsCKS1 A TRAVÉS DE LA CROMATOGRAFÍA EN GLUTATHIONE-SEFAROSE

La proteína quimérica (GST-OsCKS1) se asocia a la resina de “Glutathione Sepharose”, permitiendo separarla y purificarla en un solo paso cromatográfico.

La resina Glutathione Sepharose (1 mL, GE Healthcare), se equilibró con 10 mL de PBS 1X. Se tomaron los 20 mL del sobrenadante obtenido en el paso anterior, se filtró en poro de 0.45 µm (Filtros Millex de Millipore) y se adicionaron a la columna de glutathione-sepharose, posteriormente se lavó la resina tres veces con 10 mL de PBS 1X cada vez, para eliminar las proteínas inespecíficas; la proteína de interés se eluyó con 3 mL de Tris-HCl pH 8 + glutatión reducido 10 mM. Se cuantificó la proteína a 280 nm usando como blanco Tris-HCl pH 8 + glutatión reducido 10 mM. Para visualizar el perfil de purificación de OsCKS1 se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 14% utilizando el equipo MiniPROTEAN Tetra Cell (BioRad); después de que el frente

de corrida llego a 1 cm del final del gel, éste se tiño con solución de azul de Coomassie (ácido perclórico 30%, azul Coomassie 0.05%).

7.7.1 PURIFICACIÓN DE Hist-OsCKS1 A TRAVÉS DE LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN Ni-NTA

La resina de Ni-NTA (Qiagen, 2 mL), se equilibró con 20 mL de PBS 1X, tomando 20 mL del sobrenadante previamente filtrados en poro de 0.45 μm que contenía las proteínas solubles y se adicionaron a la columna. Las proteínas inespecíficas no retenidas en la columna se lavaron con 20 mL de PBS 1X+ NaCl 0.5 M. La elución de la proteína retenida se llevó a cabo con solución de elución (PBS 1X + NaCl 0.5 M+ imidazol 0.25 M).

La cuantificación de la proteína se determinó a 280 nm utilizando solución de elución como blanco. La proteína se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

7.8 ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

Para la generación de los anticuerpos anti OsCKS1 se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelanda, los cuales son muy usados como animales para investigación; se les inyectó dosis de proteína recombinante OsCKS1-GST previamente purificada. Para la primera inyección, se le aplicó una cantidad de 200 μg de proteína pura con 200 μL de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich), el cual mejora la inmunogenicidad del antígeno y consiste en una solución acuosa con un aceite mineral y un agente dispersante (p. ejemplo el manoleato). El adyuvante completo de Freund, a diferencia con el incompleto,

incorpora una suspensión de *Mycobacterium* muertos por calor. En las siguientes dos dosis, se inyectó una cantidad de 200 µg de proteína pura con 200 µL de adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich), por vía subcutánea. Para las dosis posteriores (hasta completar 8 semanas), se inyectaron 200 µg de proteína en PBS 1X por ganglio popliteo. Para realizar la sangría de cosecha se extrajo la sangre del conejo por punción cardíaca hasta blanco. Se colocó la sangre en tubos falcon de 50 mL, almacenando a 4 °C/4 h y se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min.

Se separó cuidadosamente el suero y se colocó en tubos falcon. Para clarificar el suero se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min, posteriormente se recolectó el suero y se almacenó a -20 °C.

Los anticuerpos fueron titulados por inmuno ensayos tipo “Western blot” utilizando 2-5 µg de proteína recombinante y 50 µg/mL de extracto crudo de proteína total de ejes embrionarios de maíz.

7.9 PURIFICACIÓN DE IgGs DE CONEJO ANTI GST-OsCKS1

La purificación de las IgGs se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit Montage Prosep A (Millipore).

7.10 WESTERN BLOT

Después de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida 14% en condiciones desnaturalizantes de las muestras seleccionadas (extractos crudos de maíz a 0, 6, 12, 18 y 24 h de imbibición), las proteínas se transfirieron a una

membrana de immobilon (Millipore) de la siguiente manera; la membrana se solvató en metanol durante 1 min, luego se enjuagó con 20 mL de agua desionizada. El gel y la membrana de PVDF se incubaron durante 10 min en el buffer de electrotransferencia (CAPS 10 mM pH 11). Para la electrotransferencia semiseca (Multiphor II, Pharmacia Biotech), se colocaron en el ánodo 4 papeles Whatman 3M del tamaño del gel (9 x 6.5 cm) previamente humedecidos en el buffer CAPS, se colocó la membrana de immobilon sobre los papeles, encima de éste el gel de poliacrilamida y finalmente otros 4 papeles Whatman 3M humedecidos en buffer CAPS; antes de colocar el cátodo se eliminaron las burbujas que se formaron (utilizando un rodillo) y se transfirió a 75 mA por minigel durante 1.5 h.

La membrana se incubó con solución de bloqueo (PBS 1x, Leche Sveltis marca Nestle en polvo 5% + Tween 20 0.5%) durante 1 h, pasado este tiempo se agregó el primer anticuerpo (anti GSTOsCKS1 1:1000) en solución de bloqueo, dejándose en agitación durante toda la noche a 4 °C, posteriormente la membrana se lavó con PBS 1x + Tween 0.5% + NaCl 0.5 M por 15 min tres veces. Se incubó con el anticuerpo anti-inmunoglobulinas G de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) en PBS 1x + Tween 20 0.5% + NaCl 0.5 M por 1 h a temperatura ambiente; después de la incubación se lavó tres veces con PBS 1x + Tween 0.5% + NaCl 0.5 M tres veces por 15 min.

La identificación de las proteínas se llevó a cabo con el sistema de “Immobilon Western” (Millipore).

7.11 ENSAYO DE COMPETENCIA

El anticuerpo anti-OsCKS1 en una dilución 1:1000 se incubó a 4 °C por 12 h en PBS 1X con la proteína recombinante GST-OsCKS1 (50 µg y 90 µg). Posteriormente, esta mezcla se utilizó como primer anticuerpo en el ensayo de Western Blot, (previamente descrito).

7.12 ENSAYO DE PULL-DOWN

El extracto proteico de ejes embrionarios de maíz (200 µg en 500 µL de buffer A; Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 2.5 mM pH 8.0, EGTA 2.5 mM, NaF 2.5 mM, Triton X-100 0.1% v/v) se incubó durante 12 h a 4 °C con 10 µL de resina Glutathione sepharose (GE healthcare) conjugada con GST-OsCKS1 (en el equipo Shaker Rotisserie, Labquake), después de la incubación la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 30 s, se eliminó el sobrenadante y la resina se resuspendió en 500 µL de buffer A, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en el equipo ya mencionado, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante, este paso se repitió 2 veces más. La proteína unida a la resina conjugada con GST-OsCKS1 se despegó agregando 40 µL de buffer de carga para proteínas (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, DTT 100 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.2 mg/mL) y calentando a 95 °C durante 5 min. Posteriormente las proteínas se aislaron en una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 14% y posteriormente se transfirieron a una membrana de inmobilon P^{SO} para hacer los ensayos de inmunodetección de CDKAs, CDKB1 y ciclina A1.

Tabla 2.- Determinación de identidad entre ZmCKs1 y 2.

SecA	Nombre	Tam(aa)	SecB	Nombre	Tam(aa)	Identidad
1	ZmCKs1	83	2	ZmCKs2	88	85

Cuando se comparan las secuencias primarias de ZmCKs1 y 2 vs OsCKs1, se puede observar que la ZmCKs1 es 98% idéntica a OsCKs1, mientras que ZmCKs2, tiene un 81% identidad (ver figura 9 y tabla 3).

```

OsCKs1  MGQIQYSEKYFDDTYEYRHVVLPPPEVAKLLPKNRLLSENEWRAIGVQQSRGWVHYAIHRP 60
ZmCKs1  MGQIQYSEKYFDDTYEYRHVVLPPPEVAKLLPKNRLLSENEWRAIGVQQSRGWVHYAIHRP 60
ZmCKs2  MEQIQYSEKYDDTYEYRHVVLPPPEVAKLLPRNILLSEKQWRLVGVQQSRGWVHYAIHRP 60
*  *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
OsCKs1  EPHIMLFRRPLNFQQQQEAAAAAAAAQMLPK 90
ZmCKs1  EPHIMLFRRPLNFQQQQEAAA----- 82
ZmCKs2  EPHIMLFRRPINYYQQQQEAAA--AHVLPK 88
*****:*:***** **:
    
```

Figura 9. Comparación de las secuencias primarias deducidas de cDNA de ZmCKs1 y ZmCKs2 Vs OsCKs1.

Tabla 3.- Determinación de identidad entre ZmCKs1 y 2 vs OsCKs1.

SecA	Nombre	Tam(aa)	SecB	Nombre	Tam(aa)	Identidad
1	OsCKs1	90	2	ZmCKs1	83	98
1	OsCKs1	90	3	ZmCKs2	88	81
2	ZmCKs1	83	3	ZmCKs2	88	85

El maíz y el arroz son monocotiledóneas, y son muy cercanas en cuanto a la divergencia evolutiva; cuando se compara la secuencia primaria de CKs de monocotiledóneas vs dicotiledóneas, se observa que también están altamente conservadas (ver figura 10 y tabla 4).

En la figura 11 se observa la relación mas estrecha entre la CKS1 de maíz con CKS1 de arroz, en comparación con la CKS2 de maíz, (ambas monocotiledóneas), estas proteínas se encuentran mas alejadas evolutivamente hablando a CKS de dicotiledóneas como lo son *Arabidopsis*, *Glycine max* y *Vitis vinifera*.

En este tipo de árboles la longitud de las ramas representa el grado de divergencia entre las secuencias.

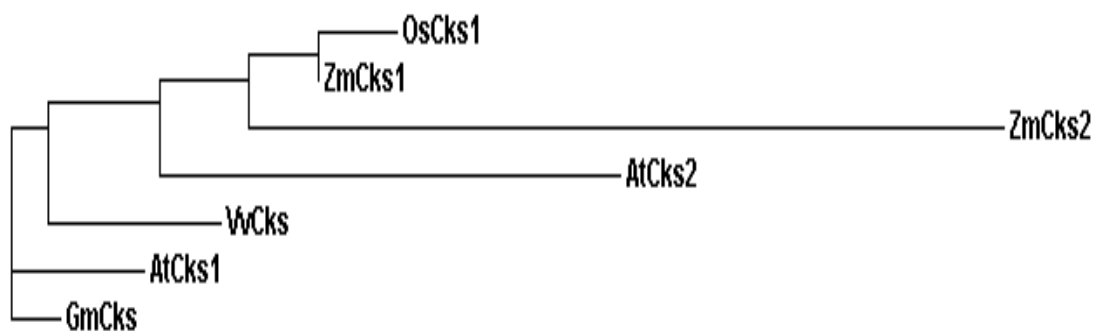


Figura 11. Árbol filogenético obtenido con el programa ClustaW2 de ZmCKS 1 y 2, OsCKS1, AtCKS1 y 2, VvCKS y GmCKS.

Cuando se comparan las secuencias de CKS1 y 2 de maíz con las CKS1 y 2 de humano, podemos observar que la identidad entre las CKS de estos organismos tan divergentes evolutivamente, también está altamente conservada. En la figura 12 se puede observar que el porcentaje de identidad entre las CKS1 y 2 de maíz vs CKS1 y 2 de humano esta por arriba del 56% (ver tabla 5). Debido a la identidad que se comparte entre CKSs de maíz vs humano, esto se puede explotar debido a que existen anticuerpos comerciales (Santa Cruz biotechnology) que están disponibles y que se utilizaron en el presente trabajo para validar a los anticuerpos que se obtuvieron contra la CKS de arroz.

```

HsCK2 MAHKQIYYS DKYFDEHYEYRHVMLPRELSKQVPKTHLMSEEEWRR LGVQQSLGWVHYMIH 60
HsCK1 MSHKQIYYS DKYDDEEFYRHVMLPKDIAKLVPKTHLMSESEWRNLGVQQSQGWVHYMIH 60
ZmCK1 --MGQIQYSEKYFDDTYEYRHVVLPPEVAKLLPKNRLLSENEWRAIGVQQSRGWVHYAIH 58
ZmCK2 --MEQIQYSEKYYDDTYEYRHVVLPPEVAKLLPRNILLSEKQWRLVGVQQSRGWVHYAIH 58
      **  **:* ** * : *****:** ::* :*:. *:**. :** :***** ***** **

HsCK2 EPEPHILLFRRPLPKDQQK----- 79
HsCK1 EPEPHILLFRRPLPKPKK----- 79
ZmCK1 RPEPHIMLFRRPLNFQQQQEAAAS----- 82
ZmCK2 RPEPHIMLFRRPINYQQQQEAAAAHVLPK 88
      .*****:*****: . : :

```

Figura 12. Comparación de las secuencias primarias deducidas de cDNAs de ZmCK1, ZmCK2, HsCK1 HsCK2.

Tabla 5.- Determinación de identidad entre ZmCK1 y 2 vs HsCK1 y 2.

SecA	Nombre	Tam(aa)	SecB	Nombre	Tam(aa)	Identidad
1	ZmCK1	83	2	ZmCK2	88	85
1	ZmCK1	83	3	HsCK2	79	64
1	ZmCK1	83	4	HsCK1	79	60
2	ZmCK2	88	3	HsCK2	79	59
2	ZmCK2	88	4	HsCK1	79	56
3	HsCK2	79	4	HsCK1	79	81

8.2 AMPLIFICACIÓN DEL cDNA DE OsCK1

A partir de la secuencia de cDNA de OsCK1, obtenida de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (GenBank: AY583319.1) se diseñaron oligonucleótidos específicos con el programa OligoPerfect Design de Invitrogen (figura 13).

5-atgggccagatccagtactccgagaagtacttcgacgacacctacgagtacaggcacgtcgtccttccg
ccggaggctcgccaagctcctccccaagaatcgcttctctccgagaacgagtgggcgcgcatcggagtg
cagcagagccgcggtgggtgcactacgcatccaccggccggagccgcacatcatgctgttccgccc
cccgtcaactccagcagcagcaggaggcagccgcggtgcagcggcgcagatgctgccaagtga-3

✔ OSCKS1Fwd 5'aaagatccatgggccagatccagtactcc

✔ OSCKS1Rev 5'aaagcggccgcttgggcagcatctgc

Figura 13. Secuencia nucleotídica del cDNA codificante de la CKS de arroz y oligonucléotidos utilizados para amplificar dicha secuencia.

8.3 CALIDAD E INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL DE ARROZ

El RNA total de arroz (figura 14) se obtuvo como se describe en material y métodos, y a partir de éste se realizó la reacción de transcripción reversa.

La integridad del RNA se comprobó al efectuar una electroforesis en gel de agarosa, visualizando las bandas del RNA ribosomal (figura 14, carril 2) .La pureza se determinó por espectrofotometría A_{260}/A_{280} nm teniendo un valor muy cercano a 2 y la concentración se determinó considerando 1 unidad A_{260} de ssRNA= 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para tener una buena calidad, este valor debe oscilar entre 1.8-2.0 unidades. Este resultado nos indica la buena calidad de nuestro RNA.

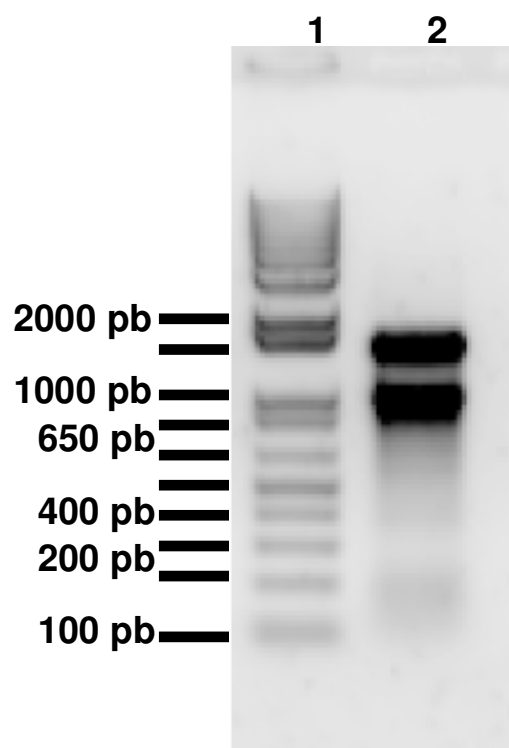


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de RNA total de arroz a partir de 2.5 mL de células en suspensión de arroz (aproximadamente 25 mg en peso fresco. Carril 1- marcadores, carril 2- 10 μ g de RNA.

8.4 OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL cDNA DE OsCKS1 POR PCR Y LIGACIÓN EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN pGEX 4T2 Y pProEx HTb

El cDNA DE OsCKS1 se amplificó por PCR y la banda del tamaño esperado (270 pb, ver figura 15) se purificó como se describe en materiales y métodos. El producto de PCR fue ligado al vector de clonación pGEM-T Easy de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Promega). Posteriormente se realizó la transformación por choque térmico en células competentes *E. coli DH5 α* . A las células transformadas se les extrajo plásmido y posteriormente éste se digirió con las enzimas de restricción BamH1/Not1 (ver material y en métodos), se hizo una

electroforesis en gel de agarosa 1.5% y la banda de 270 pb (cortada del gel) se purificó con el kit ILLUSTRA™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, figura 16)

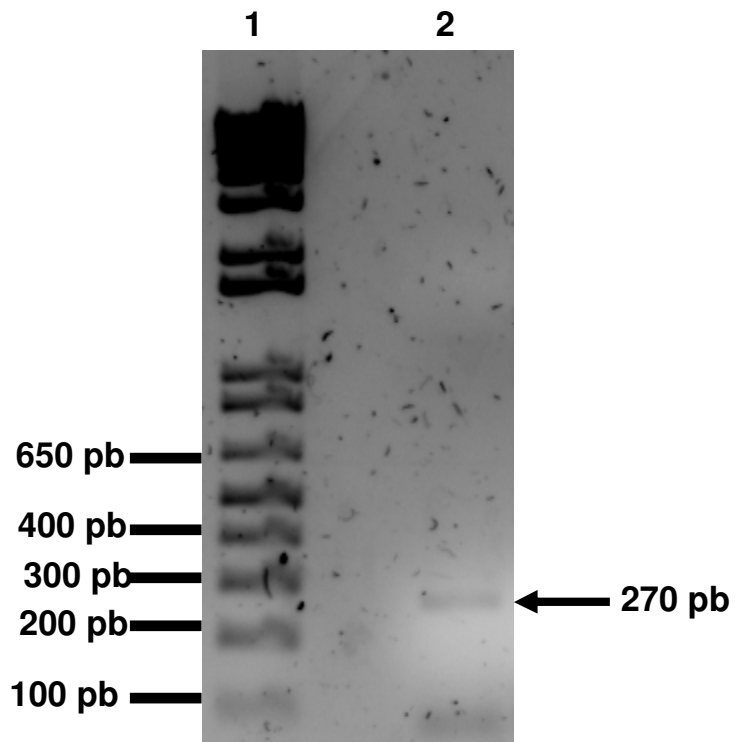


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%.
Carril 1- marcadores de DNA, carril 2- amplificación del cDNA de OsCKS1 por PCR.

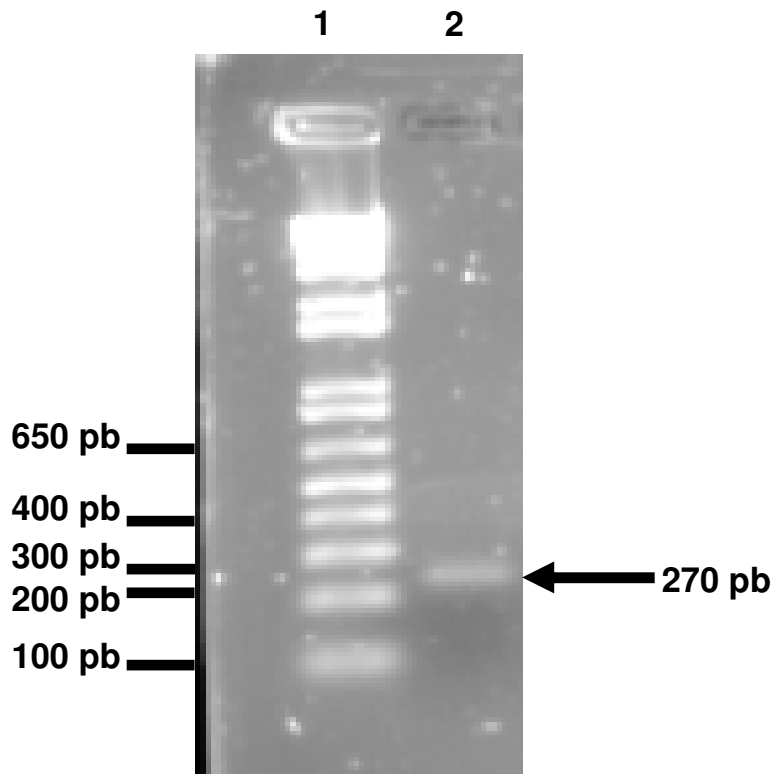


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%.
 Carril 1- marcadores de DNA, carril 2- purificación con kit ILLUSTRATE™ GFX™
 PCR DNA and Gel Band Purification Kit.

El inserto se mezcló con los vectores pGEX 4T2 y pProEx HTb (por separado), efectuándose la reacción de ligación y posteriormente se efectuó la transformación de células competentes *E. coli* BL21-RIL. Se extrajeron los plásmidos y se mandaron a secuenciar tanto en dirección 5´-3´ como 3´-5´ utilizando los oligonucleotidos OsCKS1Fwd y OsCKS1Rev respectivamente. El resultado obtenido de la secuenciación (no mostrado), indica que se clonó la secuencia del cDNA de OsCKS reportada en el banco de datos del genoma de arroz en marco de lectura, paralelamente a esto, se realizó una digestión del plásmido pGEX 4T2 con las enzimas de restricción BamH1/Not1. El producto de la digestión se aplicó a una electroforesis en gel de agarosa 1.5% y se visualizaron tanto la banda

correspondiente al vector, como la de la banda de 270 pb, tamaño esperado de la OsCKS1 (figura 17).

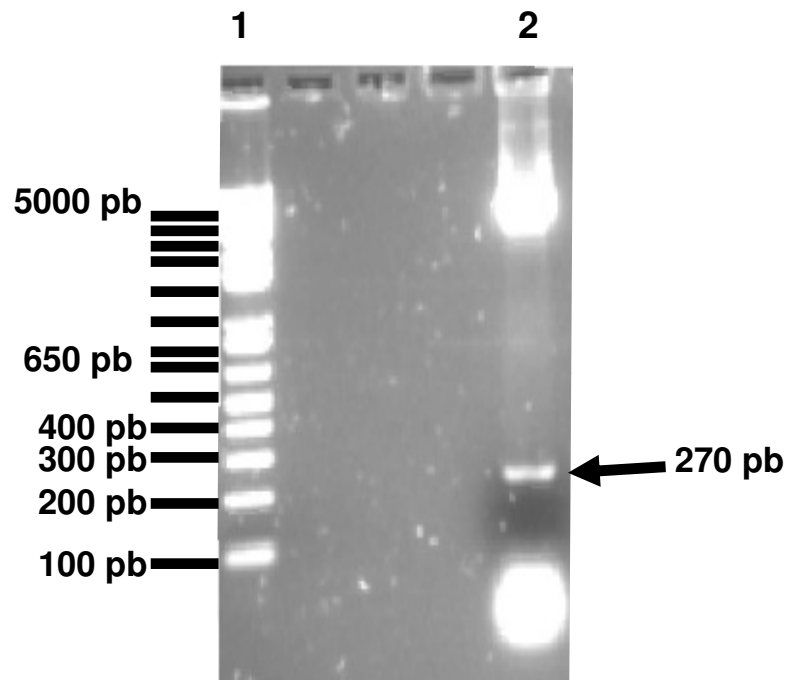


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Carril 1. Marcadores de pb Carril 2. Digestión del plásmido pGEX 4T-2 con las enzimas de restricción BamH1 y Not1.

8.5 SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES GST-OsCKS1 e Hist-OsCKS1

Una vez que se comprobó la inducción de las proteínas recombinantes, éstas se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Los carriles 8, 9 y 10 de las figuras 18 y 19 muestran la purificación de OsCKS1 fusionada a GST (36 KDa, Figura 18) y purificación de OsCKS1 con cola de histidinas (15 KDa, Figura 19). En el perfil de sobreexpresión de las proteínas recombinantes OsCKS1-GST y OsCKS-1-Hist se observa claramente la diferencia con las células no inducidas (carril 2 en figura

18 y 19 respectivamente). También se observa que la mejor purificación se obtiene con la resina de gtlutati3n-sefarosa, ya que no se observan prote3nas contaminantes en el paso de eluci3n, debido a ello y a partir de este punto, el trabajo se continu3 3nicamente con la prote3na fusionada a Glutati3n S-Transferasa (GST).

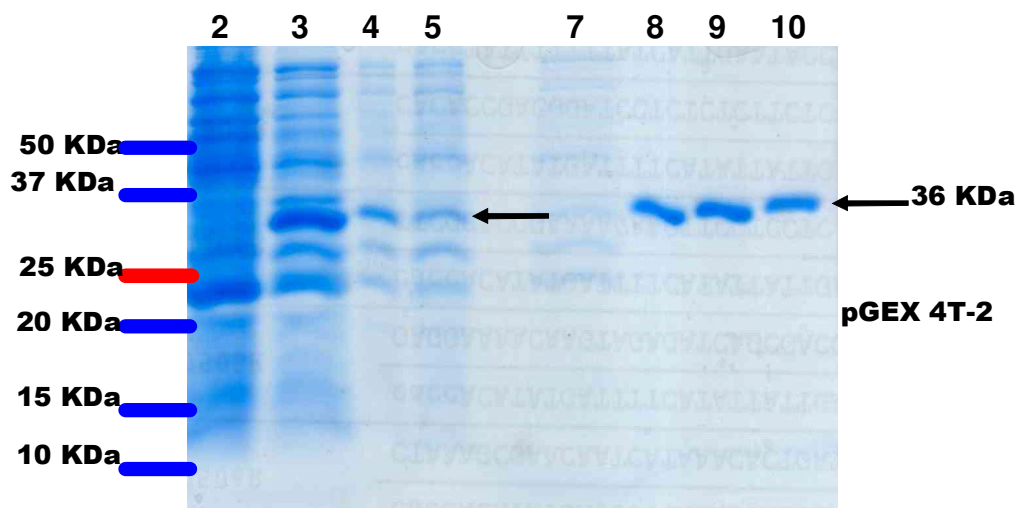


Figura 18. Purificaci3n de OsCKS1-GST en una resina de Glutathione Sepharose. Las prote3nas obtenidas de los diferentes pasos de purificaci3n fueron aisladas en una electroforesis en gel de poliacrilamida 14% y te3idas con azul Coomassie. Carril 2- extracto crudo de c3lulas transformadas sin inducir, carril 3- extracto crudo de c3lulas transformadas e inducidas con IPTG, carriles 4 y 5- fracci3n proteica no adsorbida a la resina, carril 7- lavado con PBS 1X, carriles 8, 9 y 10- eluci3n de prote3nas adsorbidas a la resina con glutati3n reducido.

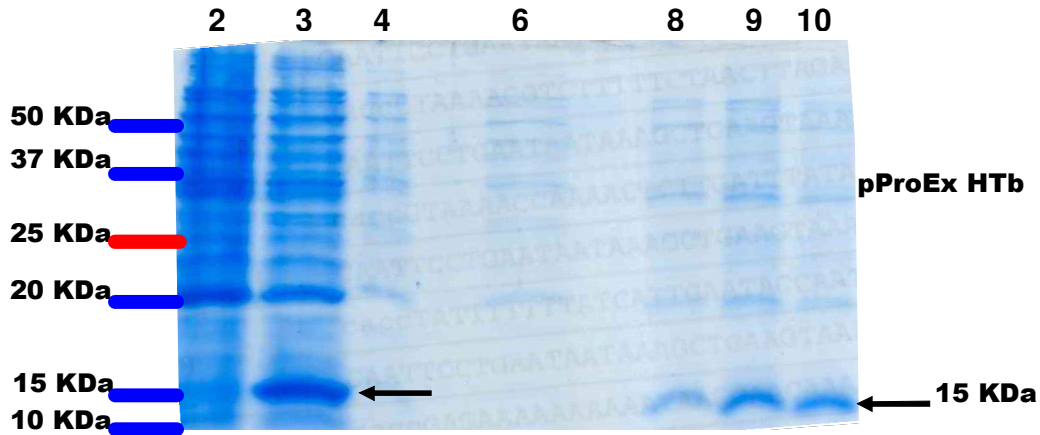


Figura 19. Purificación de Hist-OsCKS1-GST en una resina de Ni-NTA. Las proteínas obtenidas de los diferentes pasos de purificación fueron aisladas en una electroforesis en gel de poliacrilamida 14% y teñidas con azul Coomassie. Carril 2- sin inducir, carril 3- proteína Inducida con IPTG, carril 4- fracción no adsorbida, carril 6- lavado con PBS 1X, carriles 8, 9 y 10- elución de Hist-OsCKS1 con imidazol 0.25 M.

Se diseñó un esquema de inmunización donde se inocularon dos conejos de la raza Nueva Zelanda. Ambos conejos se inmunizaron con proteína pura GST-OsCKS1. Para la primera dosis se preparó una emulsión con 200 μ L de adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich) y 200 μ g de proteína para cada conejo por vía subcutánea. Para la siguiente muestra se preparó una emulsión 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich). En las siguientes dosis se inyectaron 200 μ L (1 μ g/ μ L), sin adyuvante, por ganglio popliteo, esperando obtener una mejor respuesta inmunológica, esto se realizó una vez por semana hasta completar los 2 meses de tratamiento.

Se hizo una sangría de prueba para ver si había un título adecuado de anticuerpos, obteniéndose resultados positivos (figura 20).

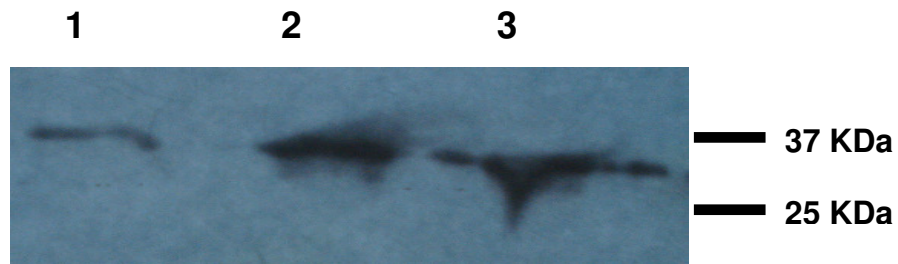


Figura 20. Inmunodetección de OsCKS1 (10 µg) con el anticuerpo anti GST-OsCKS. Carril 1- dilución 1:1000, carril 2- 1:750, carril 3- 1:500, Ac 2º 1:20000.

8.6 VALIDACIÓN DEL ANTICUERPO anti-GSTOsCKS1

La validación del anticuerpo anti-GSTOsCKS1; se realizó efectuando un ensayo de competencia, donde el anticuerpo anti GSTOsCKS1 en una dilución 1:1000 se incubó 12 h con la proteína recombinante OsCKS1 (50 µg) y se llevó a un volumen de 100 µL con PBS 1X. Esta solución se utilizó como primer anticuerpo para la realización del ensayo tipo Western Blot para observar el efecto de competencia (figura 21).

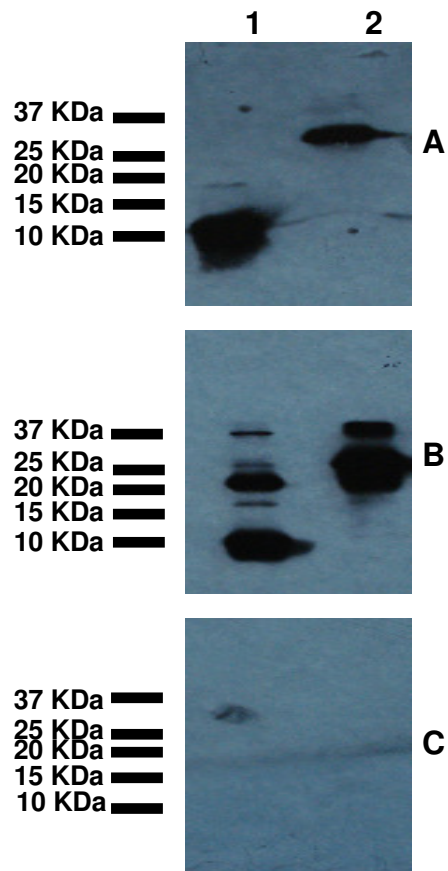


Figura 21. Validación del anticuerpo anti GSTOsCKS1. A; Utilizando el anticuerpo anti OsCKS1. B; Anticuerpo dirigido contra CKS1/2 de *Homo sapiens*, C. Igual que que A, pero preincubando 12 h con 50 μ g de GST-OsCKS1. Carril 1- extracto crudo de ejes embrionarios de maíz de 24 h de imbibición, carril 2- proteína recombinante OsCKS1.

Con este ensayo de competencia (figura 21 C), nos podemos dar cuenta que el anticuerpo generado en los conejos reconoce tanto a la proteína OsCKS1 como a ZmCKS. Tenemos como controles tanto al anticuerpo comercial anti HsCKS1/2 (figura 21 B) y al anticuerpo generado anti OsCKS1 (figura 21 A), pero esta sin incubación con antígeno. Al preincubar el anticuerpo con el antígeno y realizar el ensayo de Western Blot no se detecta ninguna señal en las placas de revelado, ya

que este anticuerpo tiene sus sitios de reconocimiento ocupados con la proteína recombinante.

8.7 INMUNORRECONOCIMIENTO DE ZmCKSSs CON ANTICUERPOS ANTI OsCKS1

Después de haber validado el anticuerpo anti OsCKS1, se procedió a estudiar mediante ensayos de Western Blot el nivel de presencia de ZmCKSSs. En la figura 22 A se tiene una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida al 14%, teniendo extractos crudos de maíz imbibidos a diferentes tiempos. En la figura 22 B se puede observar mediante un ensayo de Western Blot, que el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 11 KDa (ZmCKS1 y 2 tienen un peso molecular predicho con el programa ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) de; 10.4 y 10.6 kDa respectivamente). ZmCKS 1/2 se encuentra en semilla seca, mostrando una disminución a las 6 h de imbibición, teniendo posteriormente un incremento gradual para llegar a un máximo a las 18 h, disminuyendo ligeramente a las 24 h de imbibición. El inmunoreconocimiento de ZmCKS con el anticuerpo OsCKS1 era de esperarse, debido a su alta identidad (arriba del 81%), lo cual nos hace ver que en este tipo de ensayos se pueden usar para detectar proteínas homólogas en organismos diferentes de aquellos de donde se obtuvo la proteína antigénica, tanto de mamíferos como de plantas, debido a que son proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución. Además de tener una estimación visual del control de carga en todos los carriles (ver figura 22A), se utilizó el anticuerpo anti ZmCDKA (desarrollado en nuestro laboratorio) para realizar la inmunodetección con este, ya

que resultados previos mostraron que la cantidad de ZmCDKA no varía durante la germinación (manuscrito en preparación), lo cual también observamos en una membrana con el mismo control de cargado (ver figura 22C).

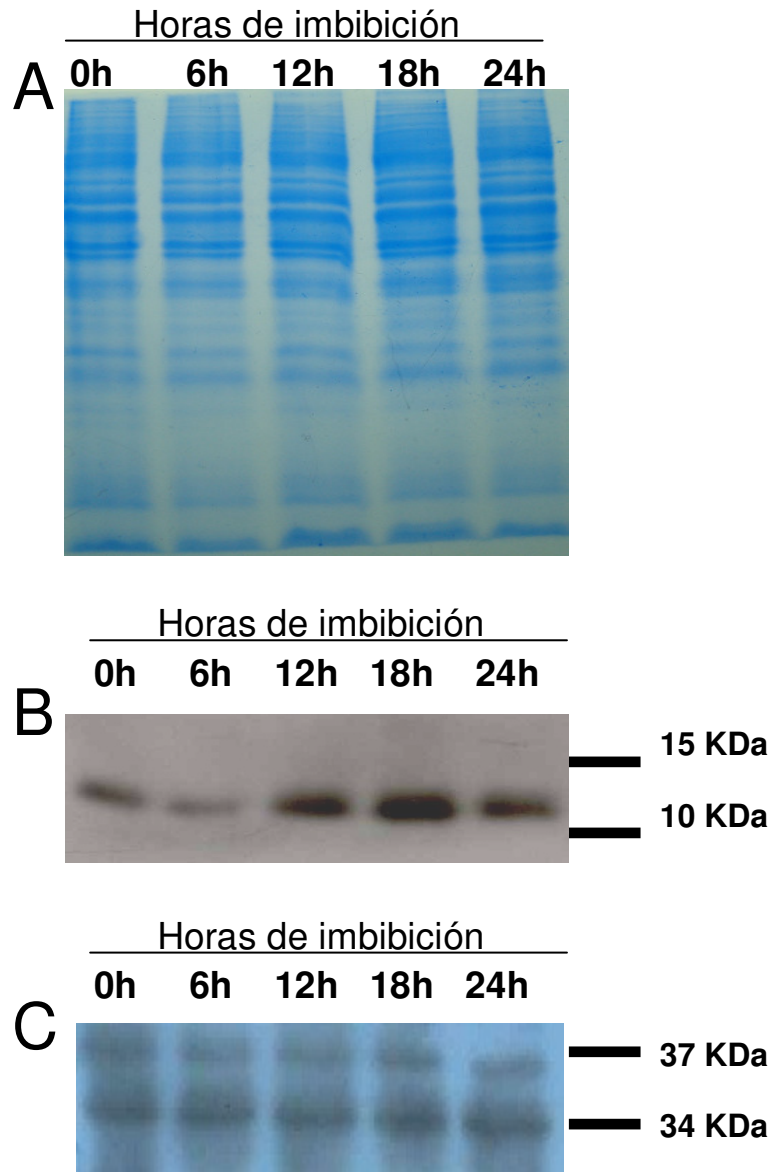


Figura 22. Inmunodetección de ZmCKS con el anticuerpo OsCKS1
(A) Electroforesis de extractos crudos de maíz (50 µg) a diferentes tiempos de imbibición en gel de poliacrilamida 14% teñido con azul de coomassie.
(B) Western Blot antiOsCKS1 Ac. 1^º 1:1000, Ac. 2^º 1:7500. (C) Western blot AntiCDKA (Control de carga).

8.7.1 INMUNORRECONOCIMIENTO DE ZmCKS CON ANTICUERPOS ANTI CKS 1 Y 2 DE HUMANO

Para tener una herramienta más en la identificación de ZmCKS se decidió hacer el inmunoreconocimiento con el anticuerpo comercial dirigido contra las CKS1 y 2 de humano (Santa Cruz Biotechnology). El Anticuerpo anti CKS 1/2 de humano reconoció de manera específica una banda de aproximadamente 11 kDa, en un patrón semejante al que se obtuvo utilizando el anticuerpo anti-OsCKS1 (figura 23B).

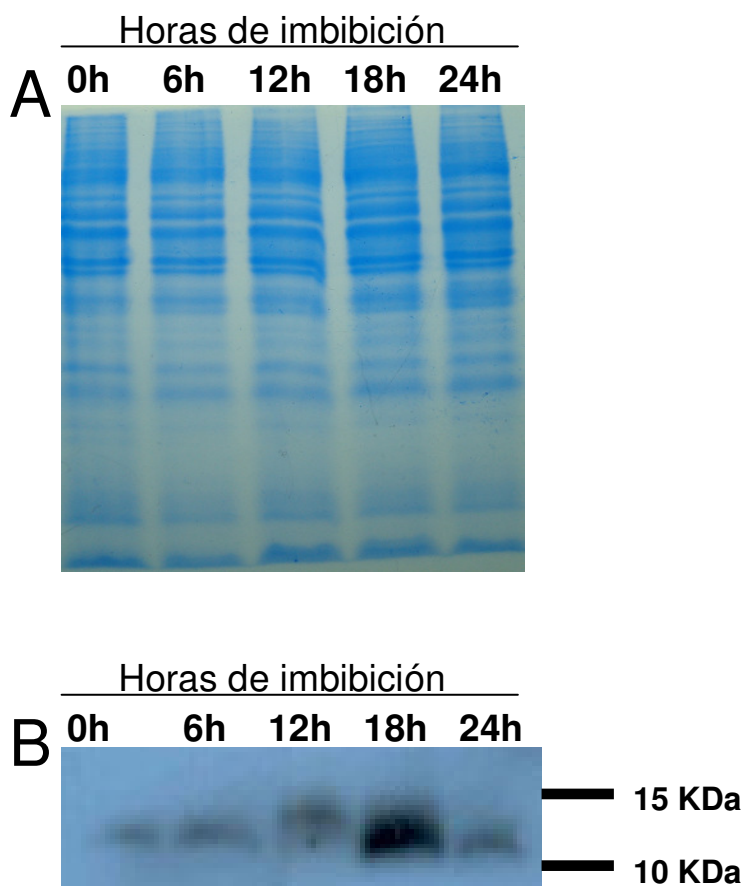


Figura 23. Inmunodetección de ZmCKS con anticuerpos antiCKS 1 y 2 de humano. (A). Electroforesis de extractos crudos de maíz (50 μ g) a diferentes tiempos de imbibición en gel de poliacrilamida 14% teñido con azul de Coomassie. (B) Western Blot AntiHsCKS1/2 (Santa Cruz) Ac 1^o 1:2000 Ac 2^o 1:20000.

8.8 ENSAYOS DE PULL-DOWN DE CDKs

Uno de los principales objetivos del presente trabajo consistió en utilizar a GST-OsCKS1 como “anzuelo” para aislar CDKs, por lo cual, después de haber conjugado GST-OsCKS1 a la resina de glutathione-sepharose e incubarla con los extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz como se indica en materiales y métodos, se procedió a determinar si esta resina de afinidad podía unir a las CDKs tipo A y/o tipo B y a Ciclina A1. En figura 24A se observa la membrana PVDF teñida con rojo de ponceau, la cual nos sirve como patrón de cargado. En las figuras 24B y 24C se observa que, tanto CDKs tipo A como tipo B respectivamente, provenientes de extractos crudos de maíz, se asocian a GST-OsCKS1 y que el nivel de asociación (cantidad de CDK asociada a GST-OsCKS1), no varía significativamente durante las primeras 24 h de imbibición; aunado a ello, se puede observar que la ciclina A se encuentra presente en los complejos de CDKs y que el nivel de asociación de esta no varía durante las primeras 24 h de imbibición de los ejes embrionarios (figura 24D).

Este resultado sugiere fuertemente que la hipótesis propuesta no es aceptable ya que los niveles observados, tanto de la asociación a CDKA y B, así como a ciclina A1 no presenta una variación notable durante las primeras 24 h de imbibición., sin embargo, algo que resulta muy interesante, y ahora factible de hacer, consistirá en determinar la actividad de cinasa en las fracciones que se obtienen del ensayo de pull-down.

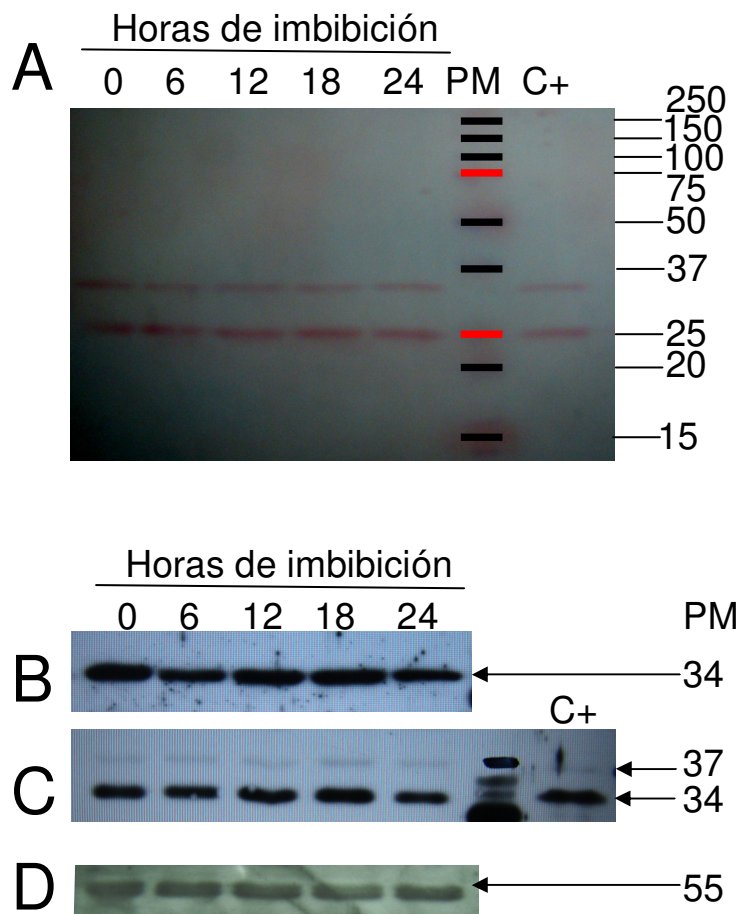


Figura 24. Ensayo de pull-down de CDKA (B), CDKB1 (C) y Ciclina A1 (D). 200 μ g de extracto crudo de maíz de 0, 6, 12, 18 y 24 h imbibición fueron incubados con 10 μ L de Glutathione sepharose conjugada con GST-OsCKS1. La inmunodetección de CDKA se efectuó con el anticuerpo anti-CDKA (1:1000) desarrollado en nuestro grupo de trabajo y la inmunodetección de CDKB1 se efectuó con el anticuerpo anti CDKB1 (1:1000, donado amablemente por Masaaki Umeda) y Ciclina A1 (1:5000, desarrollado también en nuestro grupo), (A) membrana de inmobilon-P teñida con rojo de ponceau. C+: Extracto crudo de yema floral de *Arabidopsis thaliana* donada amablemente por el M.C. Gregorio Orozco de la Facultad de Química, UNAM.

9.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un homólogo de CKS en plantas, AtCKS1, se ha aislado a través del uso de un sistema de dos híbridos utilizando AtCDC2a como anzuelo (De Veylder et al., 1997b). El gen AtCKS1 es funcional en levaduras, y el producto del gen se asocia con CDKA y B de *Arabidopsis in vivo* (en levadura) e *in vitro*. En el análisis de hibridación *in situ* (Jacqmard et al., 1999) se revela aún más que AtCKS1, junto con AtCDC2a y AtCDC2b, es fuertemente transcrita en tejidos en división activa, lo que sugiere que estas proteínas pueden interactuar también en las plantas. La expresión de AtCKS1 en una serie de tejidos poliploides, donde los transcritos de AtCDC2a y AtCDC2b están presentes en niveles muy bajos o están ausentes (Jacqmard et al., 1999), indica que AtCKS1 puede desempeñar un papel en el endociclo. Es concebible que AtCKS1 sea necesaria para el funcionamiento de una CDK aún no identificada en *Arabidopsis*, presumiblemente una que está involucrada en el proceso de la endorreducción (Mironov et al., 1999).

Al inicio de este trabajo no se tenía ningún reporte de CKS en maíz, por lo cual se inició el presente trabajo clonando el cDNA de la CKS de arroz, considerando que el arroz y maíz son monocotiledóneas y que proteínas con funciones esenciales tiene una identidad muy alta entre estos sistemas (por ejemplo, la DNA polimerasa delta tiene una identidad mayor al 90% (maíz vs arroz), García et al., 2006). Se generaron anticuerpos anti OsCKS1 con la confianza de que iban a reconocer a ZmCKS. A la fecha se han reportado 26 secuencias de cDNAs completos de CKSs de maíz en la base de datos del NCBI; al hacer la traducción de las mismas

se observan 2 proteínas diferentes (ver figura 8), a las cuales nombramos ZmCKS1 y ZmCKS2. Cuando se compara la secuencia primaria de estas proteínas, se observa que tienen una identidad de 85%. Aunque a la fecha los 3 reportes de cDNAs de CKS de arroz liberados en el banco de datos del NCBI coinciden en una sola proteína, no sería de sorprender que pronto se reporte la presencia de una segunda CKS de arroz, ya que todos los sistemas eucariotes multicelulares estudiados hasta ahora presentan 2 genes diferentes. Actualmente poco se sabe de las funciones diferenciales de una y otra en plantas y, debido a que tienen una alta identidad en cuanto a secuencia primaria, es casi imposible diferenciarlas por ensayos de Western Blot; por lo tanto, lo que se visualiza en los ensayos de Western blot es (muy probablemente), la suma de la presencia de ambas proteínas. Cuando se comparan las secuencias de las CKSs de maíz con otras CKSs de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, se puede observar que las CKSs son muy conservadas, observándose una identidad mayor a 78% con plantas dicotiledóneas. ZmCKS 1 y 2 tienen una identidad por arriba del 56% con respecto a las HsCKS 1 y 2 de humano, lo que permitió utilizar exitosamente los anticuerpos comerciales anti CKS 1 y 2 de humano, que reconocieron en los extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz una banda de aproximadamente 11 kDa, el tamaño esperado.

La proteína ZmCKS se encuentra en ejes embrionarios de semilla seca presentando una disminución a las 6 h para posteriormente aumentar gradualmente hasta las 18 h de imbibición, presentando una disminución a las 24 h de imbibición. La presencia de CKS en semilla seca podría deberse a que la proteína tuvo una funcionalidad durante la maduración de la semilla y/o a que se

sintetizó durante dicha etapa para la utilización inmediata durante el inicio de la germinación.

Otro de los objetivos del presente trabajo consistió en clonar y sobreexpresar a GST-OsCKS1 con el fin de inmovilizarla a una resina de glutathione-sepharose, para posteriormente determinar si es que las CDKs tipo A y/o tipo B se le asocian. El resultado obtenido (figura 24) muestra que tanto las CDKs tipo A como la CDKB1 se asocian y el nivel de asociación no varía significativamente durante las primeras 24 h de imbibición. Se sabe que los niveles de la proteína CDKA no varían durante el ciclo celular; sin embargo, el nivel de las CDKB1 sí varía, siendo el nivel muy bajo en la fase G1 y teniendo un máximo en la transición G2/M. La cantidad de CDKB1 asociada a CKS durante la germinación de maíz, al igual que con la CDKA, no varía significativamente, lo cual se podría explicar debido a que el eje embrionario es un organismo cuyos tejidos tienen células que están en diferente estadio del ciclo celular. Aunado a y en concordancia con lo anterior, se puede observar el patrón de expresión de la ciclina A1, proteína que se presenta principalmente en las fases S y G2 y tampoco varía durante dicho período, por lo tanto la hipótesis propuesta no puede ser aceptada hasta medir los niveles de asociación con CDKs.

10.0 CONCLUSIONES

- ✔ CKS es una proteína muy conservada a lo largo de la evolución.
- ✔ ZmCKS se encuentra presente en semilla seca, teniendo un incremento hacia las 18 h de imbibición, decayendo a las 24 h.
- ✔ OsCKS1 recombinante une tanto a CDKA como a CDKB1 y a Ciclina A a lo largo de la germinación.
- ✔ El anticuerpo generado en este trabajo servirá como una herramienta en la detección de posibles interacciones de CDKs con otras proteínas involucradas en el ciclo celular, proporcionando con esto una alternativa más para futuros ensayos.

11.0 PERSPECTIVAS

Inmovilizar a OsCKS1-GST en la resina de glutathione-sepharose para estudiar la asociación de CDK con proteínas que participan en el ciclo celular.

Medir los niveles de asociación CKS-CDKs y CKS-Ciclina A1 a lo largo de la germinación, esto mediante ensayos de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-CDKA, y posterior a esto un ensayo de inmunorreconocimiento con el anticuerpo anti-CKS, esperando con esto un incremento en los niveles de asociación CDK-CKS.

12.0 BIBLIOGRAFÍA

- Arellano-Salazar G. Y. (2007).

Tesis de Maestría. Facultad de Química (UNAM). Efecto de una auxina sobre la síntesis de DNA y los niveles de proteínas del ciclo celular (transición G1/S) durante la germinación de ejes embrionarios de semillas de maíz (*Zea Mays*).

- Baíza, A., Vázquez-Ramos J.M. y Sanchez de Jiménez, E. (1989).

DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal Plant Physiology* 133: 416-421.

- Barroco R.M., De Veylder L., Magyar Z., Engler G., Inzé D., Mironov V. (2003).

Novel complex of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 401-412.

- Bewley J.D., Black M. (1994).

Seeds, physiology of development and germination.
Ed. Plenum Press, NY.

- Bravo-Alberto C.E., Buendía-Monreal M. (2008).

Tesis de Licenciatura. Facultad de Química-UNAM. Estudio de la región promotora de cuatro ciclinas D de maíz.

- Cruz H. Jeglay Y., (2006).

Cátedra de Relación suelo – planta – hombre en el cultivo de maíz. Facultad de agronomía-Universidad central de Venezuela.

- De Jesús-Juárez N., (2008).

Tesis de Maestría. Facultad de Química (UNAM). Estudio sobre la proteína ICK de maíz.

- Deltour, P. Jacqmard, M., (1974).

Relation between water stress and DNA synthesis during germination of Zea mays L. Annals of Botany 529-534.

- De Veylder, L., Segers, G., Glab, N., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., (1997).

The Arabidopsis CKS1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. FEBS Letters 412: 446-452.

- Dewitte, W. y Murray, J., (2003).

The Plant Cell Cycle, Annual Review of Plant Biology 54: 235-264.

- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacqmard A, Kilby NJ, Murray J.A.H., (2003).

Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. Plant Cell 15: 79–92.

- García Ramírez E., (2006).

Tesis de doctorado. Facultad de Química (UNAM). Caracterización de las DNA Polimerasas α y δ de maíz durante la germinación.

- Geng Y., Yu Q., Sicinska E., Das M., Schneider J.E., Bhattacharya S., Rideout W.M., Bronson R.T., Gardner H., Sicinski P., (2003).

Cyclin E ablation in the mouse. Cell 114: 431–443.

- Gutiérrez R., Quiroz-Figueroa F. y Vázquez-Ramos J.M., (2005).

Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiology* 46:166-73.

- Hayles, J., Beach D. H., Durkacz B. y Nurse, P. M., (1986).

The fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*; isolation of a sequence *sucl+* that suppresses *cdc2-* mutant function. *Molecular and General Genetics* 202:291-293.

- Hadwiger, J.A., Wittenberg C., Mendenhall M.d. y Reed S. I. (1989).

The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 Gene, a Homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc¹⁺* Gene, Encodes a Subunit of the Cdc28 Protein Kinase Complex. *Molecular And Cellular Biology* 9: 2034-2041.

- Jacquard A., De Veylder L., Segers G., de Almeida., Engler J., Bernier G., Van Montagu M., Inze D., (1999).

Expression of CKS1At in *Arabidopsis thaliana* indicates a role for the protein in both the mitotic and the endoreduplication cycle. *Planta* 207:496-504.

- Mancilla-Flores A.H., (2008).

Tesis de Licenciatura. Facultad de Química-UNAM. Clonación de la ZmKrp1 de Maíz y Estudios de Expresión Durante la Germinación.

- Merav Slotky, (2005).

The expression of the ubiquitin ligase subunit CKS1 in human breast cancer
Breast Cancer Research 7: 737-744.

- Mironov, V., De Veylder L., (1999).

Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants—The Nexus. *Plant Cell* 11: 509-522.

- Moreno-Casasola, P., (1996).

Vida y Obra de granos y semillas, La ciencia desde México 191-195.

- Paliwal R.L., Granados G., Lafitte H.R., Violic, A., Marathúe, J., (2001).

El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Producción y protección vegetal 28.

- Prober D.A. y Edgar B.A., (2001).

Growth regulation by oncogenes — new insights from model organisms. Current Opinion in Genetics and Development 11: 19-26.

- Quiroz-Figueroa F. y Vázquez-Ramos J.M., (2006).

Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. Physiologia Plantarum 128: 556-568.

- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., (1992).

Biology of Plants. Worth Publishers, Inc. NY, 545-562.

- Sánchez M., Torres A., Boniotti M., Gutierrez C. y Vázquez-Ramos J.M., (2002).

PCNA protein associates to CDKA type protein kinases in germinating Maize.

Plant Molecular Biology 50: 167-175.

- Sherr, C. J. y Roberts, J. M., (1999).

CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes and Development 13: 1501-1512.

- Takatsuka, H., Ohno R. y Umeda M., (2006).

The Arabidopsis cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. The Plant Journal 59: 475 – 487.

- Vázquez-Ramos J.M., (2006).

Mensaje Bioquímico, Volumen XXX Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. El Ciclo Celular: Modelos Animales y Vegetales.

- Vázquez-Ramos, J.M. y Sánchez, M.P., (2003).

The cell cycle and seed germination. Seed Science Research 13: 113-130.

Vincent P.L.D., (2002).

Zea mays (maize, corn). In Encyclopedia of Life Science. Macmillan Publishers Ltd John Wiley and Sons. 1-7.

- Wade-Harper J. (2001).

Protein destruction: Adapting roles for CKS proteins. Current Biology 11: R431-R435.

- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang W., Atman, N., de Pamphilis, C.W. y 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.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>