



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

# INTERACCIÓN DE LAS CICLINAS D CON CDKS DURANTE LA GERMINACIÓN EN MAÍZ

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:  
SILVIA KARINA GODÍNEZ PALMA

Tutor: DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos en el laboratorio 114 del edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité Tutoral que asesoró esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño  
Dr. Roberto Coria Ortega

El jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Roberto Coria Ortega
VOCAL	Dr. Francisco Campos Álvarez
SECRETARIO	Dra. María Imelda López Villaseñor
SUPLENTE	Dra. Irma Bernal Lugo
SUPLENTE	Dr. Alejandro Zentella Dehesa

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química, por abrirme la oportunidad de enseñarme a tener la convicción de un pensamiento con nuevo, de esencia espiritual y liberal.

Al Dr. Jorge Vázquez, por creer en mí y brindarme su confianza, por todo el apoyo recibido durante mi estancia en este proyecto, por su gran sabiduría, consejos y por ser el forjador de una de las mejores experiencias en mi vida profesional, pero sobre todo por ser un gran ser humano y amigo

Al Dr. Elpidio García, por su ayuda técnica e intelectual, por sus sabios consejos y su gran paciencia, por permitirme adentrarme a lo grandioso de esta ciencia pero sobre todo, gracias por permitirme conocerlo y saber que las personas inteligentes tienen mucho que aportar a la vida.

Al comité tutorial integrado por la Dra. Patricia Coello y el Dr. Roberto Coria, que gracias a sus consejos y observaciones, siempre tan puntuales, este trabajo se ha concluido,

A Leticia García, por su paciencia, su gran trabajo, por su eficiencia y sobre todo por ser una gran mujer y amiga.

Al CONACyT por el apoyo otorgado durante el desarrollo del proyecto, brindado por el proyecto 79874

Al la DGAPA IN- 201309, por el apoyo económico brindado durante mi estancia en este proyecto

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi amigo incondicional, a aquel que siempre me llena de bendiciones, paciencia y sabiduría, a Dios.

Dedico cada uno de mis éxitos a las dos personitas que velan por mí y que me dieron la vida, forjándome con buenos consejos y predicando siempre con el mejor ejemplo, para que yo pueda ser una mejor persona, por quienes son mi mayor orgullo y por quienes daría mi vida. A mis padres: Silvia Palma y Nicolás Godínez, los AMO.

A mi nena hermosa que siempre esta conmigo, a ti preciosa te dedico este trabajo y todos mis éxitos, porque gracias a tu gran corazón eres la luz que me ilumina. Ale, recuerda que siempre serás la mejor hermanita del mundo y ahora que comienzas otra etapa en tú vida, te dedico lo que viene a ti, a Kike y a ese hermoso bebé que nos traerá más alegría a nuestros corazones. Te amo.

A mi ejemplo a seguir, a la personita que siempre me apoya y me alienta a seguir adelante, dándome los mejores consejos de cómo ver la vida, por todas esas muestras de cariño que me aportan ganas de vivir, por ser el mejor amigo y hermano. Arturo, gracias por todo lo que repercutes en mi vida, junto a tú gran familia. A mis tres niños hermosos (Andy, Chris y Angelita) y a Norma por esa alegría que aportan a mi corazón.

A toda mi familia, que si no fuera por ellos, yo no sería quien soy ahora, porque no me pudo tocar mejor familia que la que tengo, porque gracias a ustedes, ahora soy una persona de valores y grandes sentimientos, porque son lo máximo, por ello, mil gracias a todos, los AMO.

Al amor de mi vida, al hombre que me enseñó a tener fe y a creer en mí. Porque esos miércoles se convirtieron en lo mas transcendental e importante para mi vida, por que gracias a tu gran amor, pudimos rescatarnos de esa sombría y hoy nosotros somos lo más real en nuestros mundos abstractos, agradecerte a ti todo lo que me haz brindado, solo lo podría hacer de una única forma, regalándote mi corazón y mi ser. TE AMO FRANCISCO.

A mis mejores amigas, a mis amigas de toda la vida, a las niñas que comparten mis alegrías y mis tristezas, a ellas les dedico no solo miss

triumfos, sino mi amistad y mi corazón absoluto. Brenda, Liber y Pao, brujas las adoro.

A mis amigos del laboratorio 114, Pilo, Dona, Carlitos, Manuel, Yaddith, Enrique, Lupita, Laura, Dago, Germán, Sara, Víctor, Jorge Zamora, Mingyar, Jorge, Silvia, Miguel e Ilenia por los gratos momentos que he pasado con ustedes y sobre todo por permitirme ser parte de sus vidas.

A mis grandes amigos del lab 115, Erick, Lilián, Bety, Neto, Eneas, el Dr. Rogelio, por soportarme y por sus grandes muestras de cariño, gracias por todo chicos (as).

A mis grandes amigos de la Facultad de Química, Kayum y Juanito, a las chochas (os) y a todos aquellos que siempre están ahí. Gracias por su confianza, su cariño y por todos los grandes momentos que he pasado en su compañía. Los quiero mucho.

A mis amigas incondicionales, a Alejandra Mireya, por el corazón más puro que he conocido, por esas risas y todas esas charlas que siempre me llenan de vida, pero sobre todo nena, gracias por ser tú. A Elizabeth, porque la vida no sería la misma sin ti y tú familia, los quiero mucho.

INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABREVIATURAS</b>	2
<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1 El maíz	3
1.2 La germinación	5
1.3 El ciclo celular	7
1.3.1 Características de las ciclinas D	9
1.3.2 Características de CDKs de plantas	11
1.4 Inhibidores del ciclo celular	13
1.5 Fitorreguladores	14
Antecedentes	15
Hipótesis	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	17
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	18
3.1 Material Biológico	18
3.2 Cepas utilizadas	18
3.3 Plásmidos	18
3.4 Secuencias diseñadas	19
3.5 Cultivos en medios sólidos y líquidos	19
3.6 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	19
3.7 Selección de colonias	20
3.8 Aislamiento del vector de clonación pGEM – T easy y de los insertos de las ciclinas D, obtenidos de <i>Escherichia coli</i> .	20
3.9 Digestión enzimática del ADN plasmídico.	20
3.10 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	21
3.11 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	21
3.12 Ligación	21
3.13 Transformación con los vectores de expresión	22
3.14 Sobreexpresión de la proteína de interés (desnaturalización de la proteína)	22
3.15 Preparación del gel de acrilamida	23
3.16 Preparación y purificación de la proteína de interés	23
3.17 Cuantificación de proteína por el Método de Bradford	24
3.18 Obtención de anticuerpos contra las proteínas puras.	24
3.19 Detección de las ciclinas D por la técnica de Western Blot	25
3.20 Cuantificación del ADN por efecto de adición de hormonas	25
3.21 Extracción de proteínas de ejes embrionarios de maíz	26
3.22 Restauración de las membranas	27
3.23 Inmunoprecipitación	27

<b>4. RESULTADOS</b>	
Selección de las secuencias correspondientes a los ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3	28
Obtención de anticuerpos policlonales	
4.1 Obtención de los fragmentos de ADN de los extremos carboxilo terminal de las ciclinas D4;2 y D5;3	
4.2 sobreexpresión de los péptidos de fusión de los ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3	31
4.3 Purificación de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad	32
4.4 Digestión y purificación de los péptidos de los ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3 de los péptidos de fusión	34
4.5 Obtención caracterización de los anticuerpos anti ciclina D4;2 y D5;3	35
4.6 Estudio de las ciclinas D durante la germinación de maíz	35
4.7 Interacción de ciclinas D con Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs)	38
4.8 Interacción entre Ciclina D4;2 y CDKs	41
4.9 Efecto de fitohormonas en los niveles de acumulación de la Ciclina D4;2	43
4.10 Efecto de fitohormonas en la interacción de la Ciclina D4;2 con las diferentes CDKs	44
4.11 Interacciones entre Ciclina D5;3 y las CDKs	47
4.12 Efecto de fitohormonas en los niveles de acumulación de la Ciclina D5;3	49
4.13 Efecto de fitohormonas en la interacción de la Ciclina D5;3 con las diferentes CDKs	50
<b>5. DISCUSIÓN</b>	52
5.1 Obtención de los anticuerpos contra las ciclinas tipo D	52
5.2 Acumulación de las ciclinas D a lo largo de la germinación en maíz	53
5.3 Interacción de las ciclinas D con las CDKs	53
5.4 Interacción ciclina D4;2 y las CDKs	54
5.5 Interacción ciclina D5;3 y las CDKs	55
<b>6. CONCLUSIONES</b>	56
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	56
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	57
<b>ANEXO I</b>	64



### RESUMEN

La inquietud de nuestro grupo de trabajo ha sido estudiar la germinación de las semillas de maíz; para ello hemos adoptado la definición de germinación molecular, donde un conjunto inicial de procesos bioquímicos y moleculares que permiten al embrión estar en condiciones de reiniciar la primera ronda de divisiones celulares, estableciéndose el desarrollo y proliferación de las células en los tejidos que posteriormente formarán a la planta.

Este proyecto está centrado en el estudio de la fase G1 del ciclo celular de plantas y su relación con la entrada a la fase S en un proceso de desarrollo como es la germinación de las semillas de maíz, enfocándolo al estudio de las proteínas que determinan la entrada a la fase G1, como son las ciclinas D y las cinasas dependientes de ciclina.

En este trabajo se estudió la acumulación a nivel de proteína de dos ciclinas, la ciclina D4;2 y la ciclina D5;3; para ello fue necesaria la producción de anticuerpos contra estas dos proteínas, a partir de la secuencia peptídica de sus extremos carboxilo, lo que nos permitió la identificación más precisa de las ciclinas en extractos proteicos de maíz, mostrando que existen niveles constantes para ambas ciclinas desde semilla seca y a lo largo del proceso germinativo.

La interacción entre la ciclina D4;2 y dos diferentes CDKs, CDKA y CDKB, se observa mayoritariamente entre las 0 y las 12 horas de la germinación, mientras que la ciclina D5;3 se une diferencialmente a estos dos tipos de cinasas, manteniendo una fuerte interacción con la CDKA;1 durante toda la germinación, mientras que con la CDKB;1 solo lo hace a las 18 y 24 horas.

Los estudios de inmunodetección demostraron que ni el ácido indol acético, ni el ácido abscísico (ABA) afectan la acumulación de las ciclinas durante la germinación, en comparación con los niveles del control. Así mismo, las interacciones entre las ciclinas D y las CDKs no se modifican, manteniendo el mismo comportamiento a lo largo de la germinación y los mismos niveles de interacciones, ambos, al comparar los tratamientos hormonales con los controles.

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABS	Albumina sérica bovina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARN m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN r	Ácido ribonucleico ribosomal
ARN t	Ácido ribonucleico de tranferencia
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CYCD	Ciclina tipo D
EC	Extracto Crudo
ECT	Extremo Carboxilo Terminal
IAA	Ácido indol acético
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1- tiogalactopiranósido
G1	Interfase post-mitótica
G2	Interfase post-sintética
GST	Glutation S tranferasa
kDa	Kilo daltones
M	Fase de mitosis
LB	Luria Bertani
pb	Pares de bases nitrogenadas
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
pRB	Proteína de retinoblastoma
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilendiamina
WB	Western Blot

## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

Todos los grupos étnicos que habitaron Mesoamérica consideraron al maíz como raíz de su origen. “Los hombres fueron hechos de maíz” y los propios dioses se adornaban con los frutos de la planta y presidían la gran festividad a este grano (cosmología azteca).

El maíz constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo y está entre los cereales que tienen mayor diversidad de aplicaciones. Sin embargo, más importante aún es lo que el maíz representa culturalmente para nuestro país, lo que nos ha impulsado a usarlo como modelo biológico de estudio, buscando promover mejoras en el sector agrícola mediante la obtención de tiempos más cortos de germinación, conocimiento de los mecanismos de resistencia al estrés y con ello un mayor beneficio a la población.

Las semillas son el principal mecanismo de generación de las plantas, transfiriendo el material genético de una generación a otra; para que una semilla pueda dar origen a un nuevo ser debe pasar por tres fases, maduración, diseminación y germinación.

La información taxonómica es trascendental para el estudio de los organismos, ya que nos sitúa en la elección del método a seguir para estudiar determinado modelo. El maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays*, es una planta herbácea, monocotiledónea y anual de la familia de las gramíneas (Raven *et al.*, 1992).

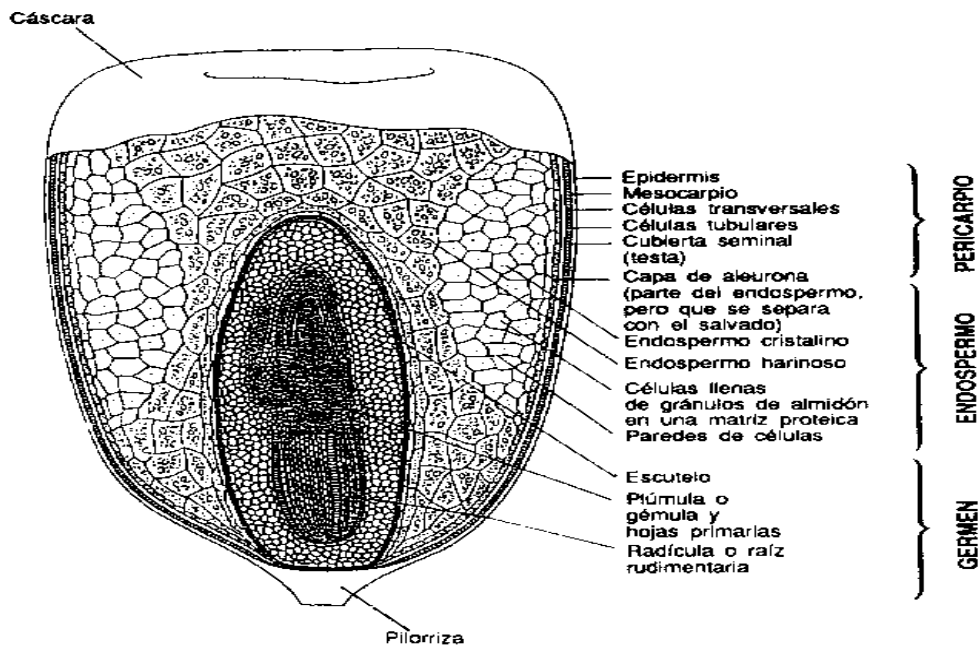
### 1.1 El maíz

La planta del maíz alcanza de 0.5 m a 6 m de alto, forma un tallo erguido, hueco, robusto y sin ramificaciones. Las hojas forman una vaina larga arrollada íntimamente al tallo, del cual nacen 2 ó 3 espigas o mazorcas envueltas en espatas. En cada mazorca existen filas de granos, cuyo número puede variar de 8 a 30 y su color puede ir desde amarillo claro hasta azul pardo (Paliwal *et al.*, 2001).

El embrión maduro de una planta de maíz (cariopsis, **Figura 1**) está formado por un eje embrionario y un cotiledón; en este último se encuentra el endospermo, que es una estructura discoidea, gruesa que funciona como reservorio de nutrientes; seguido del endospermo, se encuentra una estructura modificada llamada escutelo, en el que se almacenan enzimas hidrolíticas

## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

que permitirán la movilización de reservas del endospermo al eje embrionario cuando se lleve a cabo la germinación. El eje embrionario está constituido por regiones diferenciadas: el coleoptilo que es la primera hoja que sirve de protección cuando se da el brote de la plúmula durante el proceso germinativo, la plúmula que es la yema del embrión y 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, 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 ésta a su vez está protegida por la coleorriza. El escutelo y el eje embrionario forman al embrión de la semilla, en el que se encuentra toda la información genética y las proteínas necesarias para la formación de un nuevo organismo (Raven *et al.*, 1992; Bewley y Black, 1994).



(Facilitado por el Wheat Flour Institute, Chicago, Illinois, 1964)

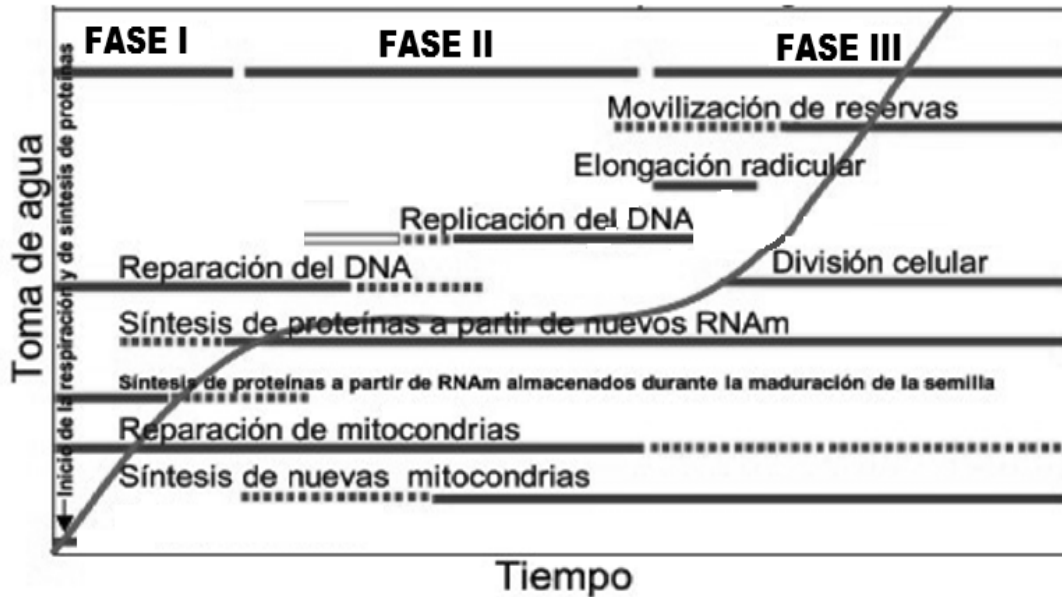
**Figura 1.** Diagrama de la semilla de maíz y sus principales estructuras. Modificada de Bewley y Black, 1994

Dentro del endospermo de una semilla de maíz madura existen células muertas y el espacio citoplásmico se ha obstruido con reservas de nutrientes que fueron sintetizados durante el desarrollo de la semilla y que serán esenciales durante la germinación y la formación de la plántula (Bewley y Black, 1994). Es así que la reactivación del ciclo de vida de cada planta dependerá de las condiciones de estos tejidos y estructuras, desde el inicio, a partir de una semilla, hasta la culminación del proceso germinativo que será determinante en el subsecuente desarrollo de la planta.

### 1.2 La germinación

El concepto de germinación es difícil de consolidar, ya que ha sido utilizado de muchas formas. Así, mientras que para los agrónomos, una semilla ha germinado una vez que la plántula emerge de la superficie del suelo; para los fisiólogos vegetales, la germinación se termina con la protrusión de la radícula, aún cuando para este momento no haya divisiones celulares en el tejido, ya que el primer crecimiento de las células radiculares se da por el efecto de la elongación. Uno de los principales eventos de la germinación es restablecer condiciones aptas para el reinicio de la proliferación celular; una vez que la entrada al ciclo celular ha sido establecida, éste tendrá que completarse necesariamente; es así que para nuestros fines de trabajo y tratando de delimitar más el concepto de germinación, hemos adoptado una definición de germinación molecular, bajo la cual, un conjunto inicial de procesos bioquímicos y moleculares permiten al embrión estar en condiciones de reiniciar la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas, convirtiéndose en un proceso preparativo para el posterior desarrollo y proliferación de las células en los tejidos que más adelante formarán a la planta.

La única señal externa que se requiere para el establecimiento de la germinación en semillas es la entrada de agua, llamada imbibición (Mayer, 1975). Este proceso consta de tres fases definidas (**Figura 2**). La fase I es rápida, mecánica e independiente del estado metabólico de la semilla, produciendo rupturas en las membranas internas por el cambio estructural de los lípidos de la membrana resultado de las fuerzas de hidratación de los tejidos embrionarios, de las paredes celulares y de los organelos; al reactivarse secuencialmente sus funciones, se comienzan a sintetizar proteínas a partir de ARNm preexistente, se reanudan los procesos de respiración para la producción de ATP, al mismo tiempo que se comienzan a sintetizar nuevos ARNm, ARNt y ARNr (Ching, 1972). La fase II es lenta y acompaña los procesos metabólicos descritos anteriormente; durante esta fase se observa una reducción casi total en la entrada de agua a la semilla, se disminuyen los procesos reparativos y se incrementa el número de mitocondrias, se lleva a cabo la replicación del ADN y normalmente en esta fase se comienza a dar la protrusión de la radícula. La fase III puede considerarse como un evento tardío; es una fase rápida que se relaciona con la finalización de la elongación radicular previo a la división celular, además, en esta fase se lleva a cabo la movilización de reservas de la semilla (Bewley and Black, 1994, Osborne, 1983).



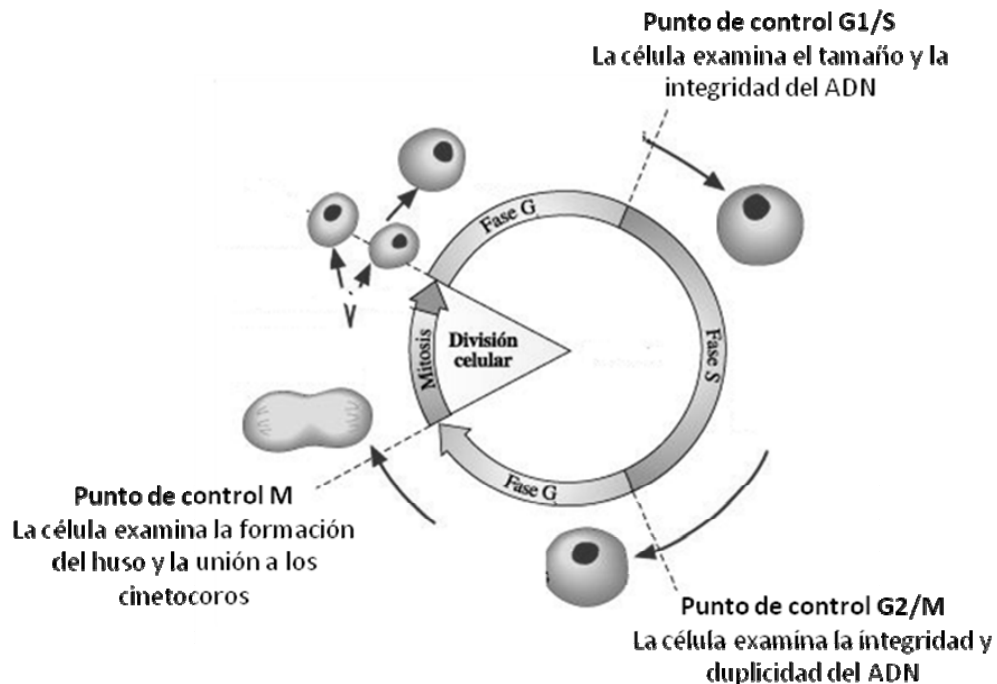
**Figura 2.** Curso temporal de eventos asociados a la germinación y postgerminación de semillas. El tiempo requerido para que los eventos sean completados varía desde algunas horas a muchas semanas, dependiendo de factores genéticos inherentes y de factores ambientales prevaletentes, particularmente temperatura y disponibilidad de agua (modificado a partir de Bewley, 2001)

La emergencia de la radícula se debe inicialmente a la elongación celular y posteriormente a la proliferación celular. Durante la germinación ocurre el crecimiento de las células y su posterior división. Para que las células puedan dividirse y así formar parte de los tejidos que constituyen una planta madura, deben ocurrir una serie de pasos que se conocen como fases del ciclo celular. Se ha reportado que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour y Jacqmard, 1974). La síntesis replicativa nuclear del ADN en embriones de maíz comienza entre las 12 y las 15 horas iniciadas la imbibición, teniendo un máximo de actividad después de las 30 horas (Vázquez-Ramos *et al.*, 1986, Georgieva *et al.*, 1994).

### 1.3 El ciclo celular

Las células son las unidades básicas de la vida y el ciclo celular tiene un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares, incluyendo las plantas (Dewite y Murray, 2003). Este proceso es una serie de eventos ordenados que conducen a la proliferación celular, necesaria para la germinación de la semilla y este proceso debe coordinarse de manera continua con la diferenciación celular para el crecimiento y formación de la planta.

La división celular es el resultado de la ejecución del ciclo celular, que consta de cuatro fases (**Figura 3**): una fase de síntesis o replicación del ADN (**fase S**), una fase mitótica o de división (**fase M**) y dos fases intermedias denominadas interfase postmitótica (**G1**) y fase postsintética (**G2**). Durante estas fases la célula se asegura de tener todas las condiciones necesarias para terminar de manera exitosa la división celular; en la fase G1, la célula revisa que las condiciones sean las óptimas para el crecimiento de la misma y estén todos los elementos necesarios para la replicación del ADN y en la fase G2, se revisa la duplicidad e integridad del ADN.



**Figura 3.** Puntos de control y puntos de decisión de la proliferación de la célula a lo largo del ciclo celular (modificada de Ayala, *et. al*, 1984)

La progresión a través del ciclo celular en las células eucariotas está controlada por proteínas claves llamadas ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Las ciclinas, como su nombre lo indica, son proteínas que fluctúan a lo largo del ciclo celular y regulan la activación y direccionamiento de las CDKs hacia compartimentos subcelulares y sustratos específicos (Jackman *et al.*, 2003). La actividad de cinasa de las CDKs depende de que se unan a las ciclinas y al igual que en los animales, las plantas tienen varios tipos de estas proteínas, por lo que se forman distintos complejos involucrados en la transición entre las diferentes fases del ciclo celular (Stals y Inze 2001; Oakenfull *et al.*, 2002). Los puntos de control más importantes operan en las transiciones G1/S, G2/M y uno más en el paso de la metafase a la anafase. En las células animales, la progresión de G1 a la fase S está mediada por los complejos de CDK4 o CDK6 y la ciclina D1, que son inducidas por factores de crecimiento a niveles de ARNm. Estos complejos fosforilan e inactivan a la proteína del retinoblastoma (RB) permitiendo la liberación del factor de transcripción E2F y así se induce la transcripción de genes involucrados en la progresión de la fase S (Dean, 2000). Posteriormente, la ciclina E se une a CDK2 formando un complejo que hiperfosforila a la proteína RB, asegurando la transición de G1/S. En *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que las ciclinas CycD2;1 y CyCD3;1 interactúan con CDKA;1 *in vivo* (Healy, *et al.*, 2001) y estos complejos tienen actividad sobre la proteína relacionada a RB, ó RBR (Boniotti y Gutiérrez, 2001). También se ha demostrado que el complejo CDKA/CYCD3 de tabaco (*Nicotiana tabacum*), purificado a partir de células de insectos, fue capaz de fosforilar a RBR *in vitro* (Nakagami, *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que los mecanismos de regulación de la transición G1/S están bien conservados entre los animales y las plantas.

Por la similitud con las ciclinas de animales, las ciclinas de plantas se han clasificado como tipos A, B, C, D, H y L (Barroco *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2004). Las ciclinas tipo A y B son ciclinas mitóticas (Mironov *et al.*, 1991; Pines *et al.*, 1991). La ciclina A de *Arabidopsis thaliana*, *Zea Mays* (maíz) y *Oryza Sativa* (arroz) aparece en la fase S y se mantiene hasta G2/M, mientras que la ciclina B se acumula durante la fase G2 y al inicio de la fase M (Renaudin *et al.*, 1994). Estas ciclinas forman complejos activos con las cinasas CDKA y CDKB, aunque hasta ahora se tiene relativamente poca información sobre las funciones de los complejos entre CDKA/B y las ciclinas mitóticas.

La entrada a mitosis es desencadenada por la interacción CDK1-ciclinas A/B en células animales, mientras que dos tipos diferentes de CDKs en plantas, CDKA y CDKB, participan en la entrada a mitosis y su progresión (Potuschak y Doerner, 2001; Criqui y Genschik, 2002).

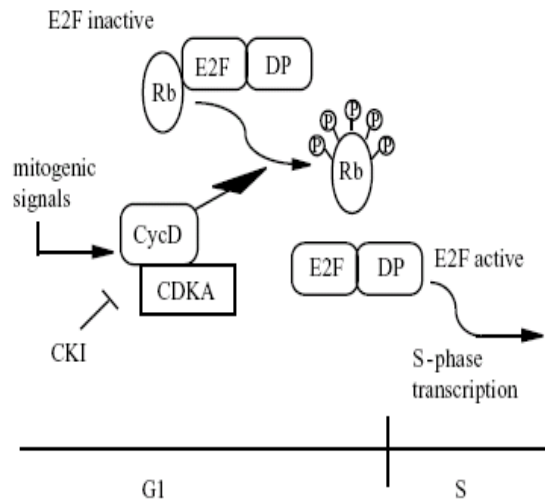


En *Arabidopsis thaliana* (planta dicotiledónea) se han identificado diez genes de ciclinas D y se han agrupado en seis o siete grupos (Oakenfull *et al.*, 2002; Vandepoele *et al.*, 2002), mientras que en arroz (planta monocotiledónea) se han reportado 14 genes de ciclinas D (La *et al.*, 2006); actualmente se sabe que en maíz hay al menos 16 genes de ciclinas tipo D (datos por publicar, Buendía y Vázquez- Ramos, 2009). Las plantas poseen menos tipos de ciclinas que los animales, pero la mayoría de esos tipos comprenden más miembros (Renaudin *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2004). Aunque no es clara la razón de la existencia de tantas ciclinas, se puede especular que cada una tiene un tiempo específico de acción o se expresa en un tejido específico o bien podrían existir rutas reguladoras de la división celular específicas de plantas.

### **1.3.1 Características de las ciclinas D**

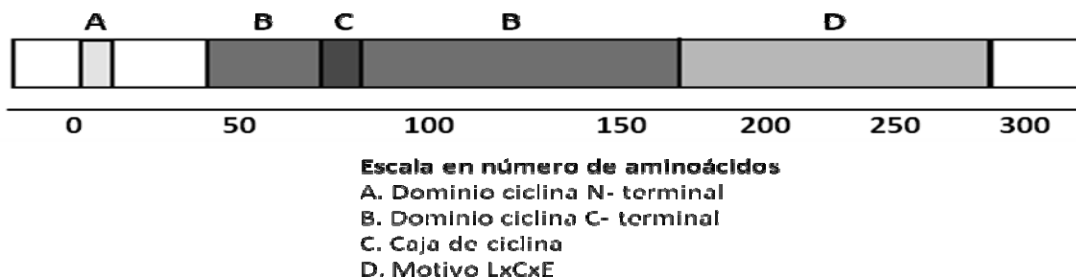
Las ciclinas D tienen una función especial en el control de la reentrada al ciclo celular al percibir señales externas y acoplarlas a las señales de proliferación (Inzé y De Veylder, 2006). Las señales mitogénicas regulan, a nivel transcripcional y traduccional a los complejos CDK-CYCD y controlan la estabilidad de las proteínas, el ensamblaje e importe de los complejos hacia el núcleo (Sherr y Roberts, 2004). Subsecuentemente, los complejos activos de CDK-CYCD promueven la progresión de la fase G1 a S para llevar a cabo la proliferación celular.

Actualmente se sabe que hay un patrón similar en plantas a la vía ciclinas D/pRB presente en animales (Ramírez-Parra *et al.*, 1999), donde las ciclinas D forman complejos con la CDKA y controlan la ruta en la que está involucrada la proteína homóloga a la de retinoblastoma, RBR en plantas y los factores de transcripción E2F/DP (**Figura 4**). Aunque las ciclinas tipo D de plantas muestran una baja similitud en su secuencia proteica con respecto a las de animales, comparten características claves como su participación en la vía antes mencionada (Ramírez-Parra *et al.*, 1999).



**Figura 4.** Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas (Oakenfull *et al.*, 2002).

Las ciclinas D de plantas muestran una organización estructural típica (**Figura 5**), mantienen una región de 250 aminoácidos muy conservada la cual consiste de dos dominios llamados amino terminal y carboxilo terminal (La *et al.*, 2006; Menges *et al.*, 2007). El dominio amino terminal comprende aproximadamente 120 aminoácidos, dentro de esta región se encuentra la secuencia conservada de ocho aminoácidos llamada caja ciclina, que sirve como sitio de unión a CDK y el motivo LxCxE de unión a la proteína RBR. El dominio N terminal está presente en todas las secuencias de ciclinas D. Sin embargo, el dominio carboxilo terminal está presente en algunas, pero no en todas las ciclinas, lo que sugiere una función específica y le confiere antigenicidad diferencial a las ciclinas. Algunas ciclinas D de plantas también poseen cajas PEST que permiten su degradación mediada por ubiquitinación.



**Figura 5.** Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas. A. Dominio ciclina-N-terminal, B. Dominio ciclina-C-terminal, C. Caja ciclina, D. Motivo LxCxE. Escala en número de aminoácidos.

### **1.3.2 Características de las CDKs de plantas**

Las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) de plantas han sido aisladas y clasificadas en cinco grandes grupos de acuerdo a la conservación del motivo de unión a la ciclina. La CDK tipo A de plantas es homóloga a Cdc2 de mamíferos, ya que conserva la secuencia aminoacídica PSTAIRE en el motivo de unión a ciclina. En este grupo de CDKs, el transcrito y los niveles de proteína no muestran una expresión preferencial por una fase del ciclo celular y además son detectadas, aunque en bajos niveles, en tejidos diferenciados. Estos resultados sugieren una función dual de las CDKs tipo A en plantas, implicando que actúan tanto en la progresión a S como en el paso a M (Ferreira, *et al.*, 1991), por lo que estarían involucradas en la proliferación celular y en el mantenimiento de una adecuada división celular en tejidos diferenciados durante el desarrollo de la planta (Martínez, *et al.*, 1992). Se sabe que en plantas CDKA puede unirse a las ciclinas tipo D (De Veylder *et al.*, 1997) y que este complejo ciclina D/CDKA es capaz de fosforilar, *in vitro*, a la proteína RBR de tabaco para que ocurra la transición de G1 a S (Nakagami, *et al.*, 1999).

Las CDKs tipo B poseen un motivo de unión a ciclina diferente, PPTALRE o PPTTLRE, por lo que se han dividido en dos subgrupos (CDKB;1 y CDKB;2); su actividad es dependiente del ciclo celular y actúan en la transición G2/M (Mironov *et al.*, 1999). Este tipo de CDKs son únicas de plantas, lo que sugiere que podrían estar realizando un papel relevante y específico dentro del ciclo celular vegetal. Estudios anteriores demostraron que este tipo de CDKs son capaces de unirse a las ciclinas tipo A y B. La interacción de las ciclinas D con la CDKB aún no ha sido totalmente demostrada, sin embargo, estudios en *Arabidopsis thaliana* (Kono *et al.*, 2003) han demostrado una interacción activa entre la ciclina D4;1 y la CDKB2;1, dándose de manera tejido-específica ó espacio específico. Otros resultados en *Nicotiana tabacum* demuestran la asociación entre ciclina D3;1 y CDKB;1 en purificados de células de insectos y también se ha comprobado que estas tienen actividad de cinasa al ponerle como sustrato la Histona H1 (Kawamura *et al.*, 2005).

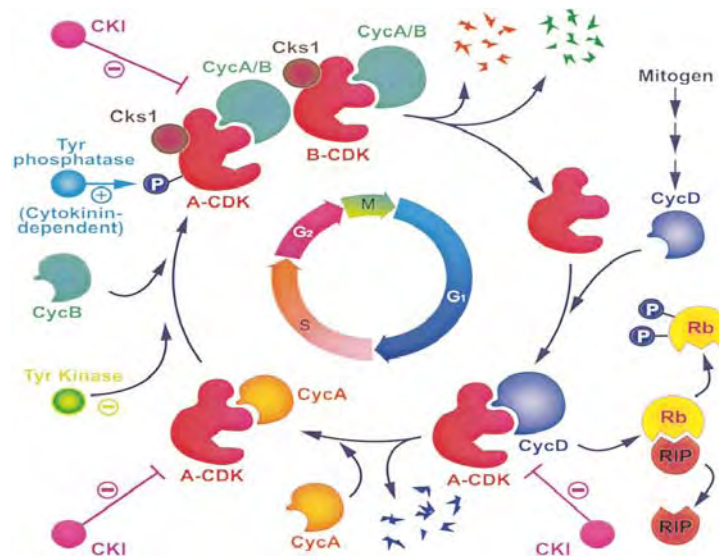
Actualmente se han identificado otras cuatro familias de CDKs (CDK C, D, E y F). Estas proteínas han sido poco caracterizadas y su función en el ciclo celular no es muy clara. La CDKC ha sido caracterizada por su motivo de unión PSTAIRE, también presente en CDK9 de humanos. La CDKC de *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado en células que se están dividiendo, pero aún se desconoce su función, aunque se cree que podría estar involucrada en el control de la transcripción.

Las CDKs tipos D y F de plantas son homólogos funcionales de las cinasas activadoras de CDKs (CAK), tienen motivo NFTALRE en su dominio de unión a ciclinas y presentan similitud con CDK7 de humanos. CDKD de arroz es capaz de fosforilar a CDKA de arroz (*Oryza sativa*), a CDK2 de humanos y al dominio C-terminal de la subunidad grande de la ARN polimerasa II de *Arabidopsis thaliana* (Serizawa *et al.*, 1995). Finalmente, las cinasas tipo E, que poseen la secuencia conservada SPTAIRE, muestran una señal débil constitutiva durante la sincronización del ciclo celular. En la **Tabla 1** se muestra un resumen de los diferentes tipos de CDKs en plantas.

**Tabla 1.** Clasificación de CDKs en plantas

Clase	Motivo de unión a ciclina	Fase típica dependiente	Homólogo en mamíferos
<b>Tipo A</b>	PSTAIRE	Constitutiva	CDK1, CDK2
<b>Tipo B</b>	PPTALRE PPTTLRE	S/G2 G2/M	No reportado No reportado
<b>Otras clases de CDKs</b>	NFTALRE  PITAIRE SPTAIRE	G1/S  Inespecífico Inespecífico	CDK 7 (CAK)  Cinasa CHED? CDK8?

La asociación de un tipo de ciclina específica con una CDK específica, determina la actividad de los complejos ciclina-CDK, así como su estabilidad, localización y especificidad por el sustrato; esta actividad a su vez también es regulada por el estado de fosforilación de la CDK, el control de la degradación de la ciclina y la unión de inhibidores de las CDKs (**Figura 6**).



**Figura 6.** Esquema del Ciclo Celular en Plantas (Tomada de Mironov, 1999). Participación de los diversos complejos de ciclina-CDK, durante las fases del ciclo celular y los mecanismos de regulación de los mismos.

#### 1.4 Inhibidores del ciclo celular

En las células animales, los inhibidores de CDKs (ICKs) se dividen en dos distintas familias, que difieren en estructura, mecanismo de acción y especificidad: la familia KIP/CIP y la familia INK4. Estas proteínas inhibidoras de las CDKs están implicadas en la detención del ciclo celular en respuesta a varias señales, como la privación de factores de crecimiento y daño al ADN celular, entre otras (Ormenese *et al.*, 2004).

En plantas, las proteínas KRPs (homólogas a las ICKs), representan siete tipos de inhibidores en *Arabidopsis thaliana* y solo para dos de ellos se sabe su función específica: KRP1 regula la endoreplicación y está implicada en procesos de crecimiento de la planta, mientras que KRP2 afecta los complejos que se forman con la CDKA;1 (Ormenese *et al.*, 2004). Sin embargo, los siete tipos de KRPs de *Arabidopsis thaliana* inhiben, *in vitro*, la actividad de cinasa de los complejos ciclina D2-CDKA y ciclina D2-CDKB (Nakai *et al.*, 2006).

Los mecanismos básicos que controlan el ciclo celular se han conservado entre especies, sin embargo, su regulación es diferente debido a que las células de las plantas son totipotenciales y están controladas por fitohormonas (Jacobs, 1995) lo que provoca una diferencia en la expresión de muchas proteínas involucradas a lo largo de este proceso.

### 1.5 Fitorreguladores

Los factores involucrados en la regulación de la germinación pueden ser divididos como extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos están relacionados con las condiciones ambientales como la cantidad disponible de agua, la presión de oxígeno, la temperatura y, para algunas semillas, la luz (Mayer y Poljakoff, 1975). Dentro de los factores intrínsecos se encuentran los fitorreguladores u hormonas vegetales. Se han descrito un gran número de fitorreguladores, de los cuales 5 son los mejor estudiados: las giberelinas, las auxinas, el ácido abscísico (ABA), el etileno y las citocininas (Raven, 1992).

A las giberelinas se les ha asociado un papel importante durante la germinación, principalmente a nivel de inducción de enzimas hidrolíticas en el proceso de movilización de reservas, estimulan el crecimiento de los tallos (elongación) e hipocotilos y posibilitan la movilización de reservas en la semilla, teniendo su mayor efecto en la estimulación de la germinación tardía (Hill, 1977).

La liberación enzimática de conjugados glucosidos y su transporte hacia la punta del coleoptilo, en donde favorecen la elongación y el crecimiento celular, son los efectos más importantes asociados a las auxinas (Cohen, 1982). Las auxinas principales son: ácido indolacético (IAA), ácido 4-cloroindolacético, ácido indolbutírico y ácido fenilacético.

Algunas funciones asociadas al ácido abscísico (ABA) son la síntesis de proteínas de reserva, la inducción de dormancia (Karssen et al., 1983) y la prevención del crecimiento del embrión. Los niveles de ABA aumentan durante la embriogénesis y disminuyen en la germinación; esto último, junto con la inhibición que efectúa sobre enzimas específicas durante este proceso, sugiere que el ABA actúa como un modulador negativo de la germinación (Quatrano, 1987). El ABA previene el estrés hídrico provocando el cierre de estomas; contrarresta el efecto de auxinas, pero no inhibe el crecimiento en sí.

Las citocininas son un grupo de fitorreguladores mitogénicos, los cuales han sido descritos como estimuladores de la germinación de semillas (Van Staden, 1993; Gutiérrez *et al.*, 2005). En semillas y cultivos de tejidos vegetales, en presencia de auxinas, promueven la división celular y estimulan la formación de tallos y raíces (Miller et al., 1956). Estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (al contrario de las auxinas).

## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

---

El etileno acelera la senescencia en tejidos vegetales; es el responsable de la maduración de frutos climatéricos (tomate, manzanas, aguacate, etc) y de otros tejidos como las hojas, tallos y flores. Estimula la germinación de semillas; es una hormona asociada a todas las situaciones de estrés de la planta (temperaturas extremas, heridas, patógenos).

### ANTECEDENTES

Los estudios sobre ciclo celular en plantas han involucrado fundamentalmente especies de dicotiledóneas. Se conoce muy poco sobre la regulación del ciclo celular en monocotiledóneas. El grupo de trabajo del doctor Vázquez-Ramos de la Facultad de Química de la UNAM ha estado involucrado en estudios del ciclo celular en maíz, particularmente durante el proceso de la germinación de la semilla. En los últimos años se han dirigido los esfuerzos a caracterizar ciclinas D, debido a su importancia como reguladoras fundamentales de la fase G1 del ciclo celular y creemos que tienen mucho que ver con el establecimiento y avance de la germinación de semillas.

Se sabe que la ciclina tipo D es una proteína relativamente inestable, de tal forma que una vez que comienza la fase S, hacia las 15 horas de la germinación, la proteína tiende a ser degradada. Al no estar presente la ciclina D, la actividad de la cinasa asociada decae con la misma cinética; dado que la proteína tipo RBR desaparece también durante las primeras horas de la germinación, el factor E2F se libera y entonces puede actuar para permitir la entrada a la fase S. Es importante señalar que la cinasa asociada a ciclinas tipo D de plantas presenta una secuencia de aminoácidos PSTAIRE en el sitio de unión a ciclina. En maíz, la cinasa que se asocia a la ciclina tipo D contiene la secuencia PSTAIRE y se ha encontrado que no es una, sino dos proteínas de diferente peso molecular (Lara *et al.*, 2007), demostrando la interacción con un algún tipo de CDK A. Estas aportaciones se originaron mediante la clonación de cuatro ciclinas D de maíz, inicialmente llamadas CYCD2;1, CYCD4;1, CYCD5;1 y CYCD5;2. Al realizar un estudio detallado sobre la expresión de estas cuatro ciclinas, se demostró un patrón diferencial a nivel de ARNm y este patrón se modificó por la adición de fitohormonas como las citocininas y auxinas (BA e IAA, respectivamente), que incrementaron notablemente sus niveles (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). La adición de inhibidores de la germinación como el ácido abscísico (ABA) a la solución amortiguadora de imbibición, repercutió en la disminución de los niveles de mensajeros de estas ciclinas. Sin embargo, al evaluar la conducta de las ciclinas a nivel de proteína durante la germinación, tanto en condiciones control como en presencia de IAA y ABA, no se observó incremento alguno en su cantidad, y si por el contrario, se observó una ligera reducción de niveles. Por lo tanto, no parece



existir correlación entre el nivel de RNAm y la cantidad de proteína observable para ninguna de estas ciclinas (Gutiérrez- Ruth *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2007). Interesantemente, la actividad de cinasa asociada a los complejos CDK-CYCD sí responde positivamente a la adición de fitorreguladores, por lo que se concluye que éstos actúan tanto a nivel de expresión génica de las ciclinas, como a nivel de activación de la cinasa en los complejos CDK-CYCD (Lara *et al.*, 2007). Este estudio requirió la obtención de anticuerpos homólogos, desarrollados a partir de las proteínas completas; los que resultaron no ser muy específicos, debido al reconocimiento de otras bandas en los extractos de maíz aun bajo las condiciones más astringentes. Uno de los objetivos prioritarios de este proyecto fue la obtención de nuevos anticuerpos, empleando sólo fragmentos seleccionados de las ciclinas D4;2 y D5;3, en base a su inmunogenicidad, usando el extremo carboxilo de cada ciclina que es el que más varía entre ciclinas (Lara *et al.*, 2007).

### **HIPOTESIS**

Las ciclinas D4;2 y D5;3 interaccionarán con la CDKA;1 en los primeros tiempos de germinación estudiados y posiblemente habrá interacción de estas ciclinas con CDKB;1 en los últimos tiempos de germinación.

## CAPITULO 2. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluación de la interacción de ciclinas D con CDKs durante la germinación en ejes embrionarios de maíz.

### Objetivos específicos:

- ❖ Obtención de anticuerpos contra las ciclinas D4;2 y D5;3, usando las secuencias extremo carboxilo de las proteínas.
- ❖ Determinar la expresión, a nivel de proteína, de las ciclinas D4;2 y D5;3, durante tiempos establecidos en el proceso de germinación.
- ❖ Determinar la interacción de las ciclinas D4;2 y D5;3 con CDKA;1 y CDKB;1 durante la germinación.
- ❖ Estudiar el efecto de las hormonas en la formación de los complejos ciclinas D- CDKs durante la germinación.

## CAPITULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Material biológico

Se usaron ejes embrionario de semillas de maíz variedad Chalqueño obtenidas directamente del Valle de Chalco, Estado de México, extraídos de la siguiente forma: las semillas a usar se limpiaron con papel absorbente; posteriormente, usando una navaja estéril se cortó la parte del pericarpio y el endospermo, para así obtener el embrión, con la misma navaja se prosiguió a retirar el escutelo y dejar únicamente el eje embrionario. En todos los casos, los ejes embrionarios obtenidos eran lavados con hipoclorito de sodio 0.1%, se secaron con papel absorbente y se almacenaron a 4°C.

### Cepas utilizadas

Espece	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> cepa DH5α	SupE44 ΔlacU169 (Φ80 lac ZΔ M15) HsdR17 RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1	Hanahan (1983)

### 3.3 Plásmidos

Los plásmidos utilizados se muestran en la **Tabla 1** y sus mapas se muestran en el **Anexo I**.

**Tabla 1:** Plásmidos utilizados

Plásmido	Marcador	Utilidad
pGEM- T easy	Gen β- gal	Vector de clonaje, incorpora el gen β-galactosidasa.
pGEX 4T2	Gen de resistencia a ampicilina Amp <sup>r</sup> , gen codificante de GST	Vector de expresión, permite expresar cualquier producto clonado como proteína de fusión con GST (Glutation-S-transferasa), contiene un gen de resistencia a ampicilina
pPROEX HTb	Gen de resistencia a ampicilina Amp <sup>r</sup>	Vector de expresión. Proteína de fusión con cola de histidinas

### 3.4 Secuencias diseñadas.

Las secuencias clonadas en el vector pGEM T-easy y en los vectores de expresión, se muestran en la **Tabla 2** y sus inserciones se observan en el **Anexo I**.

**Tabla 2:** Secuencias de ADN de los extremos carboxilos de las ciclinas D4;2 y D5;3 usadas para la clonación en el vector de expresión pGEM-T easy (obtenidas por el Dr. Francisco Quiroz, 2006).

Nombre	Secuencia
Ciclina D4;2 extremo carboxilo	cagagccctgtgggggtgctggacgcggccgcctgcctcagctacaggagcgaagaggcagcgact gcgactgcgacttctgctgctcacatgggccccctggcttcaagctcgtcctcgacctccc ggtgaccagcaaaaggaggaaactgccagccgatgtgatggatcgtgcagtgaccggtaaagc gcgcgccccccaatggaccaaaagag
Ciclina D5;3 extremo carboxilo	gagacgcccgccgcaatctggacgcgctcaaggcgatcctgggctcatcattccgagctag acaccggcatgtgtactcctgctacagcgcaatgattcgggaggacgacaagtcgccgacgcagt cgacgtcgacgtcgacgggggtggcgtcctcgggcgtctctgtcgccgcacgccccgggggagc gggagtcccagccccgggcgttccgtgtcgtggcgccaataatgccgtggcaccgccccgc cggcaaccacggacaaccgacaagaggagacggttgcgctcacctcagcgacag

### 3.5 Cultivos en medios sólidos y líquidos.

*E. coli* se creció tanto en medio líquido Luria- Bertani (LB) (Invitrogen) como en medio Agar LB (Life Technologies) a 37°C.

Todos los medios fueron preparados con agua desionizada y se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 120°C.

Cuando fue necesaria la selección de clonas por resistencia a antibióticos, los cultivos se suplementaron con ampicilina a una concentración final de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

### 3.6 Transformación de células competentes de *E. coli*.

Las transformaciones de las células competentes de *E. coli* se llevaron a cabo mediante choque térmico, siguiendo el procedimiento descrito a continuación: se mezclaron las células competentes previamente descongeladas y se incubaron en hielo por 20 min, de tal forma que 100 µL de células competentes son transformadas con 0.1 ng de ADN plasmidico, el cultivo se sometió a un choque térmico de 42°C por dos minutos en un heat block. Posteriormente se regresó el tubo de centrifuga al hielo y se agregó 1 mL de medio LB dejándolo en incubación por 45 min a 37 °C. Se

concentraron las bacterias por centrifugación por 30 seg a 12000 rpm y se eliminó el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 µL de medio LB para resuspender el botón bacteriano, éste se sembró en medio LB sólido suplementado con ampicilina y se incubó por 12 horas a 37°C.

### **3.7 Selección de colonias**

De la caja petri se aislaron cinco colonias y sembró cada colonia seleccionada en tubos conteniendo 3mL de medio LB líquido con ampicilina, de esas mismas colonias se sembró por estriado en una caja petri con LB sólido con ampicilina formando 5 líneas, tanto los tubos como las cajas se incubaron por 12 h a 37°C en una incubadora Lab-Line® (Orbit Environ-Shaker).

### **3.8 Aislamiento del vector de clonación pGEM-T easy y de los insertos de las ciclinas D, obtenidos de *Escherichia coli*.**

Se realizaron minipreparaciones por el procedimiento de lisis alcalina (miniprep), usando el plásmido Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare). Las células correspondientes a 3 ml de cultivo se concentraron por centrifugación a 12 000 rpm durante 30 seg y se resuspendieron en 200 µL de la solución I (glucosa 50mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10mM). Se le añadió 200 µL de la solución II (NaOH 0.2 M, SDS 1%) y se agitó la mezcla brevemente para romper las células. Posteriormente se añadió 400 µL de la solución III (acetato de potasio 3M, pH 4.8) para detener la lisis y precipitar el ADN genómico, esta suspensión se centrifugó a 12 000 rpm durante 4 min. El plásmido contenido en el sobrenadante se transfirió a una mini-columna de purificación y se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 seg, descartando el líquido. La columna se lavó con 400 µL de la solución III y se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 seg descartando nuevamente el sobrenadante, se agregaron 400 µL de buffer de lavado a la columna y se centrifugó a 16 000 rpm por 30 segundos. Finalmente la columna se transfirió a un tubo de centrífuga de 1.5 mL y se le adicionó 50 µL de buffer de elución, se incubó por 30 seg a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 30 segundos para coleccionar el plásmido.

### **3.9 Digestión enzimática del ADN plasmídico.**

Para verificar la presencia de los insertos correspondientes, el ADN plasmídico fue digerido con las nucleasas de restricción *Not* I y *Bam* HI (Invitrogen), mediante la preparación de la siguiente mezcla de reacción: 26 µL de buffer de reacción 10 x, 1.5 µL de la enzima *Not* I (15 U/µL) y 2.0 µL de la enzima *Bam* HI (10 U/µl). En un tubo de centrífuga se agregó 3.7 µL de la mezcla, 20 µL de ADN plasmídico y H<sub>2</sub>O cbp 30 µL. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C durante 2 h.

### 3.10 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se pesaron 0.6 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer y se agregaron 40 mL de solución amortiguadora TAE 1x (50mM Tris, 1mM acetato de sodio, 2 mM EDTA pH 8,5), la solución se calentó en horno de microondas hasta solubilizar por completo la agarosa, la mezcla se dejó enfriar y se agregó 1  $\mu$ L de bromuro de etidio de una concentración stock de 10 mg/mL. Se colocó el peine para la formación de los pozos de carga y se vació la solución en la cámara de electroforesis; el peine fue retirado una vez que la agarosa se gelificó. Se agregaron 600 mL de solución amortiguadora TAE 1x, hasta cubrir el gel. En cada pozo se cargaron 10  $\mu$ L de las muestras de la digestión, con 5  $\mu$ L buffer de carga y la visualización del gel se realizó en un transiluminador (UV-Transilluminator, UVP, inc.).

### 3.11 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de los fragmentos de ADN correspondientes a los insertos se realizó usando el kit GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). El gel se cortó con una navaja nueva y estéril y las bandas correspondientes a los insertos de las ciclinas y las de los vectores de expresión se purificaron de la siguiente manera: cada banda se colocó en un tubo de centrifuga previamente pesado, se adicionó 10  $\mu$ L de solución amortiguadora de captura por cada 10 mg de peso del gel de agarosa. La mezcla se invirtió manualmente y se colocó en un heat block a 60°C hasta su completa disolución. Posteriormente se centrifugó la mezcla y 600  $\mu$ L del sobrenadante se transfirieron a una columna GFX MicroSpin, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 seg, descartando el líquido. Se adicionó 500  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavado tipo II a la columna de purificación y se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 seg, descartando el líquido; la columna de purificación se transfirió a un tubo de centrifuga nuevo y estéril para agregarle 10-15  $\mu$ L de buffer de elución tipo IV en el centro de la columna, ésta se incubó a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min.

### 3.12 Ligación

Una vez linearizados los insertos mediante la digestión con las enzimas *Not I/Bam H1*, con sus extremos compatibles, se ligaron en los vectores de expresión pGEX 4T2 y pPROEX, que previamente fueron digeridos y purificados siguiendo el mismo procedimiento utilizado para los insertos. Las condiciones de reacción se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Condiciones de reacción para la ligación

	Solución amortiguadora de ligación 2x	Vector de expresión	Ciclinas D4;2 ó D5;3	T4 DNA ligasa
<i>Vector de expresión PGEX 4T-2</i>	21 µL	15 µL	5 µL	1 µL
<i>Vector de expresión pPROEX</i>	21 µL	15 µL	5 µL	1 µL

Las muestras se incubaron a 37°C durante 12 horas y se procedió a la realización de gel de agarosa al 1.5%.

### 3.13 Transformación con los vectores de expresión

Se agregaron 0.5 ng del vector de expresión (pGEX o pPROEX) con el inserto de la ciclina correspondiente, a un tubo de centrífuga de 1.5 mL que contenía 100 µL de células competentes de la cepa *E.coli* DH5  $\alpha$ . La transformación se realizó por choque térmico como se describió en el apartado 3.6.

#### Verificación de la transformación

Los vectores de expresión con los insertos se recuperaron de las bacterias competentes realizando una minipreparación como se describe en el apartado 3.3. Se prosiguió con una digestión con las enzimas *Not* 1 y *Bam* H1 (ver apartado 3.8) y los insertos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

### 3.14 Sobreexpresión de la proteína de interés (desnaturalización de la proteína)

De las bacterias transformadas, se tomaron 300 µL del cultivo y se transfirieron a nuevos tubos con medio Luria y ampicilina, éstos se incubaron a 37°C por 12 h en agitación. La absorbancia fue medida cada hora hasta llegar a una DO<sub>595</sub> de 0.5, una vez que se alcanzó la densidad óptica deseada, se tomo 1mL del cultivo y al resto del cultivo se adicionó el inductor Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.6 mM y prosiguió la incubación. Se midió la DO<sub>595</sub> cada hora hasta llegar a 1 unidad de absorbancia y se tomó una muestra de 0.5 mL. Posteriormente, a cada muestra se le agregó 125 µL de PBS 1x, y 125 µL de solución amortiguadora de carga. Las muestras se resuspendieron en el vórtex y se calentaron a 85°C durante 5 min en un heat block.

### 3.15 Preparación del gel de acrilamida

En un tubo de ensaye de plástico con capacidad de 50 mL se colocaron los reactivos indicados en la tabla 4 para la preparación del gel separador, se mezclaron y vertieron sobre los moldes correspondientes, se adicionó 1mL de isopropanol para evitar la formación de burbujas en la superficie del gel y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 10 min. Al término, se retiró el isopropanol y se vertió la mezcla del gel apilador (indicado en la **Tabla 4**). Se colocó el peine separador de carriles y se dejó polimerizar por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el peine y se eliminaron los residuos de poliacrilamida de los pozos usando una aguja.

**Tabla 4:** Composición de las soluciones para la preparación del gel de policrilamida \*

	Gel separador 12%		Gel apilador 5%
<b>Acrilamida: Bis-acrilamida (30:08)</b>	6.2mL	Acrilamida: Bis- acrilamida (30:08)	0.81 mL
<b>Tris-HCl 0.75 M pH 8.8</b>	4.0 mL	Tris-HCl 0.75 M pH 6.8	1.7 mL
<b>Agua destilada</b>	5.8 mL	Agua destilada	2.5 mL
<b>Persulfato de Amonio 10%</b>	150 µL	Persulfato de Amonio 10%	50 µL
<b>TEMED</b>	15 µL	TEMED	10 µL

\*Cantidades calculadas para la preparación de 2 geles

Los geles ya preparados se colocaron en un equipo de electroforesis Bio Rad y se agregaron 500 mL de solución amortiguadora de electrodos (Tris-HCl 0.025 M, pH 8.0, Glicina 0.2M y SDS 1%). Posteriormente, se cargaron las muestras, previa preparación, en los pozos y se hizo pasar una corriente de 92 Volts durante 2.5 h.

### 3.16 Preparación y purificación de la proteína de interés

Las bacterias transformantes de *E. coli* se trataron como en el apartado **3.9**, el extracto bacteriano se centrifugó a 6500 rpm por 10 min en una centrífuga utilizando el rotor JA-14 y la pastilla se lisó con solución amortiguadora de lisis (Tris HCl pH 8, PBS 1x y Tritón 1%), las células fueron sonicadas por un minuto y se centrifugó nuevamente a 6500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se filtró usando filtros desechables de 2µ y éste se pasó a través de 0.5 mL de resina de Glutathione Sefarose <sup>TM</sup> (Amersham Bioscences). Con la finalidad de que la máxima cantidad de proteína de interés fuera atrapada en la columna, cada extracto se hizo pasar tres veces, se lavó la columna con



el amortiguador de lisis celular y se eluyeron tres fracciones con Glutación reducido (GibcoBRL™) a una concentración de 15 mM.

A cada fracción se le determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford descrito en el apartado 3.17 y se realizó un gel de acrilamida al 12% para verificar la banda correspondiente de la proteína recombinante pura. Posteriormente, las fracciones con la mayor cantidad de proteína recombinante pura, se trataron con 10 unidades de trombina (Amersham Biosciences) por mg de proteína. La mezcla se dejó digerir por una noche a 25°C y con agitación constante. Después de la digestión cada muestra se pasó por 0.5 mL de Benzamidina-Sefarosa (Amersham Biosciences), para retener la trombina.

Las muestras se pasaron tres veces por la resina de glutación-sefarosa para retener a la GST ya digerida y al final se colectó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó la columna con 1 mL del amortiguador de lisis celular. A los eluatos obtenidos en las dos digestiones se les midió la concentración de proteína y se realizó un gel de acrilamida al 12% para corroborar las bandas correspondientes. La proteína pura se utilizó para la generación de anticuerpos.

### **3.17 Cuantificación de proteína por el Método de Bradford**

Se realizó una curva patrón para determinar la cantidad de proteína contenida en las distintas muestras. La curva patrón fue realizada por duplicado, colocando albúmina sérica bovina en concentraciones finales de 1.2; 2.4; 3.6; 4.8; 6.0; 7.2; 8.4; 9.6; 10.6 y 12 µg/µL a un volumen final de 100 µL; posteriormente, se agregó a cada dilución de la curva 150 µL del reactivo de Bradford (Dilución 1:4 de Dye Reagent Concentrate, Bio- Rad).

Para cuantificar las muestras, se colocó por duplicado 1 µL de muestra y 99 µL de agua desionizada, además de los 150 µL del Reactivo de Bradford. La lectura de absorbancia de la curva patrón y de las muestras, se efectuó en el espectrofotómetro Microplate Roadeo de Bio- Rad; con las mediciones de la curva se obtuvo una ecuación lineal que nos permitió conocer la concentración de la proteína en las muestras analizadas.

### **3.18 Obtención de anticuerpos contra las proteínas puras.**

La obtención de anticuerpos contra las ciclinas D4;2 y D5;3 se realizó utilizando cuatro conejos jóvenes (Nueva Zelanda) mediante inyección intramuscular de 250 µg de proteína recombinante pura mezclada 1:1 con el adyuvante completo de Freud (Sigma) para la primera inoculación e

incompleto para las siguientes dos inoculaciones; a partir de la tercer aplicación la inyección fue de 200 µg de proteína sin adyuvante, por ganglio poplíteo. Toda la proteína se dosificó en diez aplicaciones. Al cabo de ochenta días, los antisueros generados contra las ciclinas D4;2 y D5;3 fueron colectados y evaluados por su habilidad para detectar las proteínas correspondientes.

### 3.19 Detección de las ciclinas D por la técnica de Western Blot

Se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles al 12% y las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Millipore) durante 1:30 horas a 75 mA por membrana; al término de la transferencia las membranas se bloquearon con albúmina sérica (ABS., SIGMA) al 3% (p/v) en PBS 1x o con suero fetal bovino (SFB), durante 1 h. Posterior al bloqueo, se agregó el primer anticuerpo. Las condiciones de dilución de los anticuerpos se muestran en la **Tabla 5** y se dejaron durante toda la noche, a 4°C en agitación. Posteriormente, las membranas se dejaron atemperar durante 1 h y se les realizaron tres lavados de 15 min cada uno con una solución de PBS 1x, Tween al 0.5% y NaCl 0.5%. Al término de los lavados se adicionó el segundo anticuerpo anti conejo (SIGMA) durante 2 h, bajo agitación constante, posteriormente, se realizaron 3 lavados con una solución de PBS 1x, Tween al 0.5% y NaCl al 0.5%. Finalmente se adicionó 0.5 ml de la solución de detección del kit Western Blotting Detection Reagents (Millipore) y se dejó incubar por 1 min.

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

**Tabla 5:** Diluciones usadas de anticuerpos

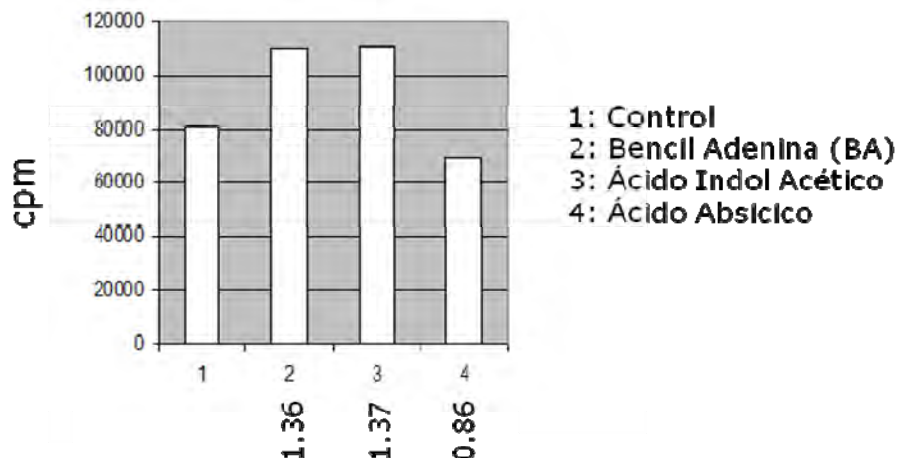
ANTICUERPO	DILUCIÓN	DILUCIÓN SEGUNDO ANTICUERPO
CICLINA D4;2	1:2500	1:40000
CICLINA D5;3	1:5000	1:40000
CICLINA B1 (CONTROL)	1:1000	1:40000
CDKA	1:1000	1:40000
CDKB	1:500	1:40000
PSTAIRES	1:1000	1:40000

### 3.20 Modificación en la síntesis de ADN por efecto de adición de hormonas

Para verificar la cantidad de las hormonas a utilizar, se cuantificó el efecto hormonal sobre la síntesis de ADN mediante la incorporación de timidina tritiada, usando la siguiente metodología:

primeramente se obtuvieron y se desinfectaron 10 ejes embrionarios con NaClO al 0.1% durante 30 seg y se lavaron con suficiente agua estéril. Estos se colocaron en papel filtro para su secado durante 15 min y posteriormente los ejes embrionarios se colocaron dentro de una caja petri adicionándoles 1 mL de buffer de imbibición suplementado con las hormonas BA, ABA ó IAA y 50  $\mu$ Ci/mL de timidina tritiada (en solución amortiguadora), estos ejes se embebieron durante 17 h (por duplicado). Al término de las 17 h se homogenizaron en un mortero adicionando 1 mL de solución de lisis a 4°C, el homogeneizado se transfirió a un tubo de ensaye de 10 mL y se agregó 1 mL de TCA al 20% durante 1 h a 4°C, se filtró y lavó dos veces con TCA al 5% y 2 más con etanol al 90%. Los filtros se dejaron secar durante 1 h a 60°C y después se introdujeron en viales con 5 mL de líquido de centelleo. La cuantificación de la incorporación de timidina [ $H^3$ ] al ADN se realizó en un contador de centelleo (Beckman LD 6000IC). A los resultados se les hizo el estudio estadístico correspondiente (**Gráfica 1**).

**Gráfica 1:** Cuantificación de timidina tritiada para seguir el efecto de la adición de fitohormonas



### 3.21 Extracción de proteínas de ejes embrionarios de maíz

Se extrajeron 0.5 g de ejes embrionarios a partir de semillas maduras de maíz Chalqueño, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% y posteriormente se lavaron tres veces con agua desionizada estéril y se dejaron secar por 10 min.

Los ejes embrionarios ya desinfectados se colocaron en cajas petri de vidrio estériles y se agregó 1 ml de solución amortiguadora de imbibición (Tris HCl 50mM pH 7.4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sacarosa 2%) y cuando fue necesario la solución amortiguadora fue suplementado con hormonas (IAA 0.1  $\mu$ M o ABA 50  $\mu$ M), las cajas se colocaron en una estufa a 25°C durante 6, 12, 18 y 24 h para obtener los tiempos de germinación y al término de cada tiempo los ejes se homogenizaron con

nitrógeno líquido en un mortero con buffer de extracción de proteínas (Tris- HCl 70 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 25 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM, sacarosa 0.25 mM, DTT 7.5 mM, Tritón X-100 al 0.1%, una tableta de inhibidor de proteasas y una de inhibidor de fosfatasa), la muestra se centrifugó a 5000 rpm. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron como se describe en el apartado **3.17** y la técnica de Western Blot se realizó como se indica en el apartado **3.19**.

### **3.22. Restauración de las membranas**

Para eliminar los reactivos de quimioluminiscencia previamente usados y poder hacer la identificación de otras proteínas en un mismo gel, las membranas de PVDF se lavaron tres veces por 10 min con PBS 1x, Tween 0.5%, NaCl 0.5%, posteriormente se agregaron 5 ml de solución amortiguadora de desnudado (Tris-HCl 0.5 M, pH 7.8, β-mercaptoetanol 1.0 %, H<sub>2</sub>O cpb 200 mL y SDS al 10% volumen final) y se incubó a 55°C durante 2 min, la incubación se mantuvo hasta los 12 min de reacción, agitando suavemente las membranas cada 2 min.

Al término de la incubación las membranas se dejaron atemperar durante 30 min y se les realizaron tres lavados de 15 min con PBS 1x, Tween 0.5%, NaCl 0.5%. Las membranas se bloquearon con ABS al 3% p/V o con suero fetal bovino al 10% v/V diluido en buffer PBS-Tween-NaCl, durante 1 h y se colocó el anticuerpo primario dejándolo incubarse toda la noche a 4°C. Posteriormente se procedió a realizar el Western Blot como se indica en el apartado **3.19**.

### **3.23 Inmunoprecipitación**

Se tomaron 10 µL de proteína A agarosa (ROCHE) y se colocaron en tubos Eppendorf de 0.5 ml, a esta resina se le adicionó 2 µL del anticuerpo a utilizar y se dejó incubarse durante 2 h. Posteriormente, se agregó 100 µg de extracto proteico de maíz, obtenido de los extractos crudos como se menciona en el apartado **3.21** y la mezcla se dejó incubarse durante toda la noche a 4°C.

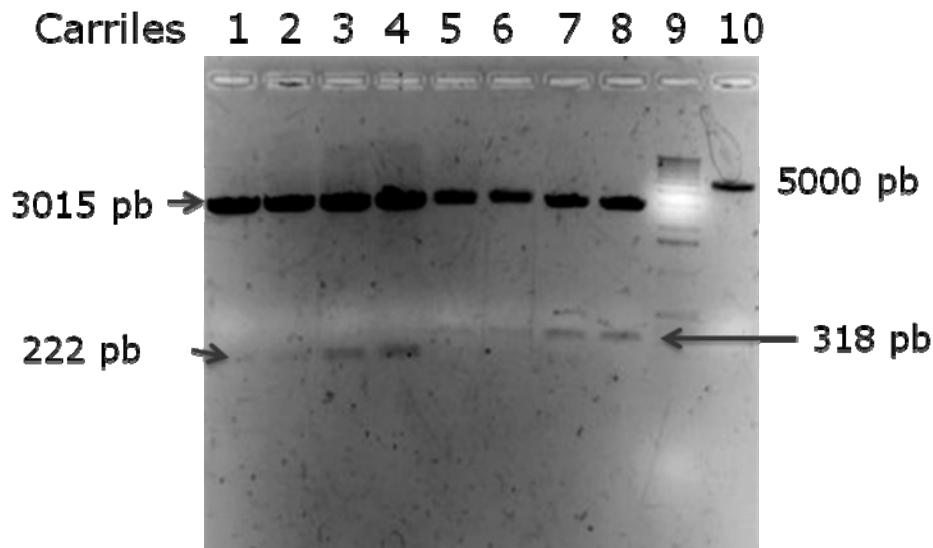
A la mezcla incubada se le realizaron tres lavados con 300 µL del buffer de lavado (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM de NaCl, 2.5 mM de EDTA, pH 8.0, 2.5 mM de NaF y 0.1% de Triton X-100) y se centrifugó entre cada lavado a 3000 rpm durante 1min, descartando el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con solución amortiguadora de carga para desnaturalizarla y se cargó en un gel de acrilamida al 12 %, posteriormente las proteínas se identificaron por la técnica de Western Blot como se indica en el apartado **3.19**.



Obtención de anticuerpos policlonales

**4.1 Obtención de los fragmentos de ADN de las secuencias de los extremos carboxilos terminales de las ciclinas D4;2 y D5;3.**

Los insertos obtenidos de los extremos carboxilos terminal (ECT) de las ciclinas D4;2 y D5;3 ligados al vector de clonación pGEM-T Easy, fueron introducidos para su transformación en células de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . Las colonias que lograron transformarse, se seleccionaron mediante su resistencia a ampicilina, ya que dicho vector contiene el gen Amp r que confiere resistencia a éste antibiótico. Se recuperó el plásmido de varias transformantes positivas (**Figura 1**) y se realizó una digestión empleando las enzimas de restricción *Not* I y *Bam* HI. Mediante el análisis electroforético se pudieron revelar los correspondientes tamaños para los fragmentos ECT de ambas ciclinas, observándose en los carriles 1 al 4 una banda de 222 pb para la ciclina D4;2 y en los carriles 5 al 8 una banda de 318 pb para la ciclina D5;3, en el carril 10 se muestra una banda producto de la digestión del vector de expresión pGEX 4T2 puro.



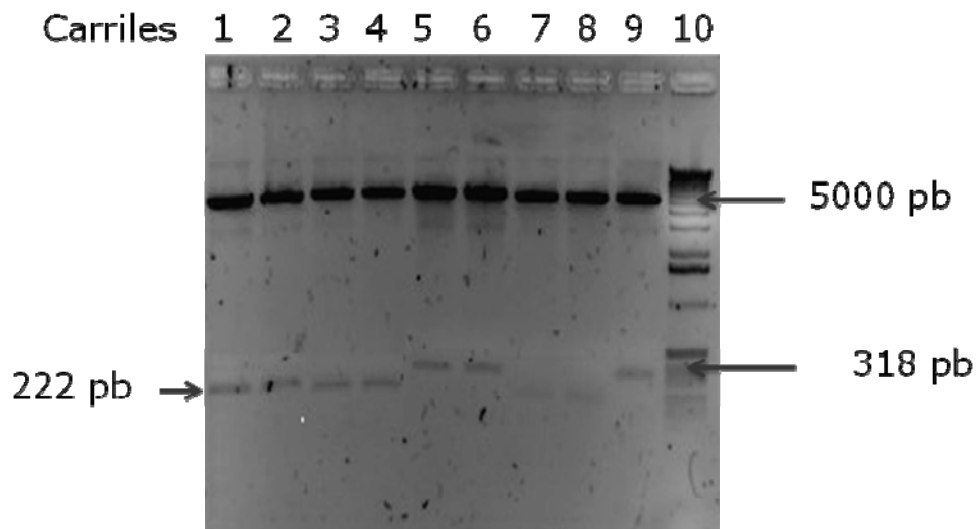
**Figura 1.** Productos de la digestión de los fragmentos de DNA que codifican para el extremo carboxilo terminal de las ciclinas D4;2; y D5;3. Carriles 1,2, 3 y 4, fragmentos de la ciclina D4;2; Carriles 5,6,7 y 8, fragmentos de la ciclina D5;3, Carril 9, marcador de peso molecular; Carril 10, vector de expresión pGEX 4T-2 . Electroforesis: gel de agarosa al 1.5%, 98 volts por 40 min

La visualización anterior de los productos de la digestión, nos aseguró que las transformantes contienen al vector de clonación así como a los insertos de los ECT de las ciclinas, con este resultado se procedió a realizar la ligación de los fragmentos ECT en los vectores de expresión, para la posterior sobreexpresión de los péptidos de fusión.

Los productos resultantes de la digestión (carriles 3 y 4 ó 7 y 8, correspondientes a los fragmentos ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3 respectivamente) se cortaron del gel y se purificaron mediante el kit Ilustra™ plasmidPrep Mini Spin de GE de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se ligaron en los vectores de expresión pGEX 4T2 y pPROEX.

Una vez realizadas las construcciones anteriores, se transformaron nuevamente células competentes de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se realizó una nueva digestión con las enzimas *Not* I y *Bam* HI para verificar que la transformación fuese exitosa.

La **Figura 2** muestra los resultados obtenidos de la digestión de los insertos de los ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3 de los vectores de expresión pGEX 4T-2 y pPROEX con las enzimas de restricción.



**Figura 2.** Productos de la digestión de los vectores de expresión pGEX 4T2 y pPROEX conteniendo los insertos que codifican para los extremos carboxilos de las ciclinas D4;2 y D5;3, por las enzimas de digestión *Not* I y *Bam* HI. Carriles 1, 2, 3 y 4, insertos digeridos de la ciclina D4;2 en el vector pGEX; Carriles 5, 6 y 9, insertos digeridos de la ciclina D5;3 en el vector pGEX; Carriles 7 y 8, insertos digeridos de la ciclina D4;2 en el vector pPROEX; Carril 10, marcadores de peso molecular. Electroforesis: Gel de agarosa al 1.5 %, 98 volts por 30 min.

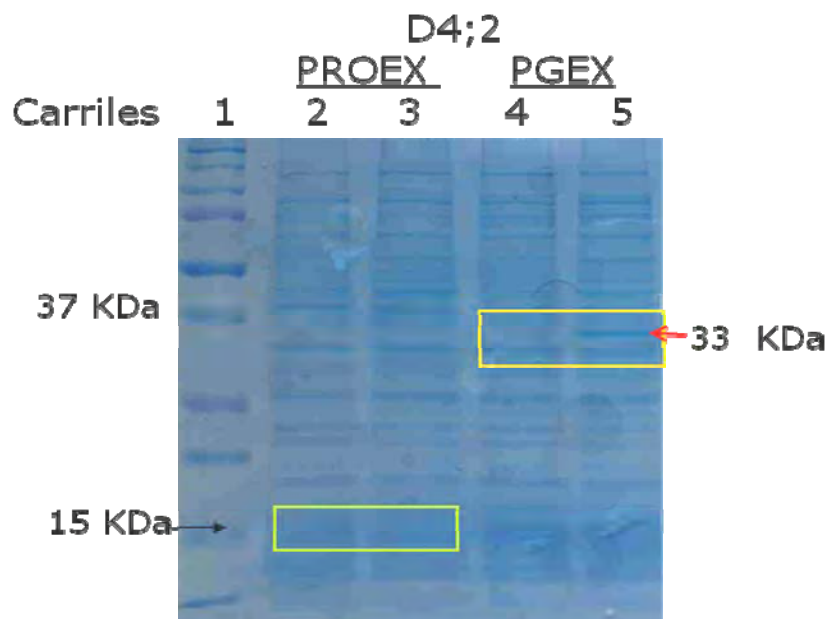
En los carriles 1 al 4 se muestran las bandas de 222 pb correspondientes a los fragmentos ECT de la ciclina D4;2 y en 4970 pb la banda del vector pGEX 4T-2; en los carriles 5,6 y 9 se observa la banda correspondiente al fragmento ECT de la ciclina D5;3 en 318 pb, digerida del vector pGEX 4T-2. En los carriles 7 y 8 se muestran los fragmentos ECT de la ciclina D4;2 (222 pb) obtenidos del vector de expresión pPROEX.



#### 4.2 Sobreexpresión de los péptidos de fusión de los ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3

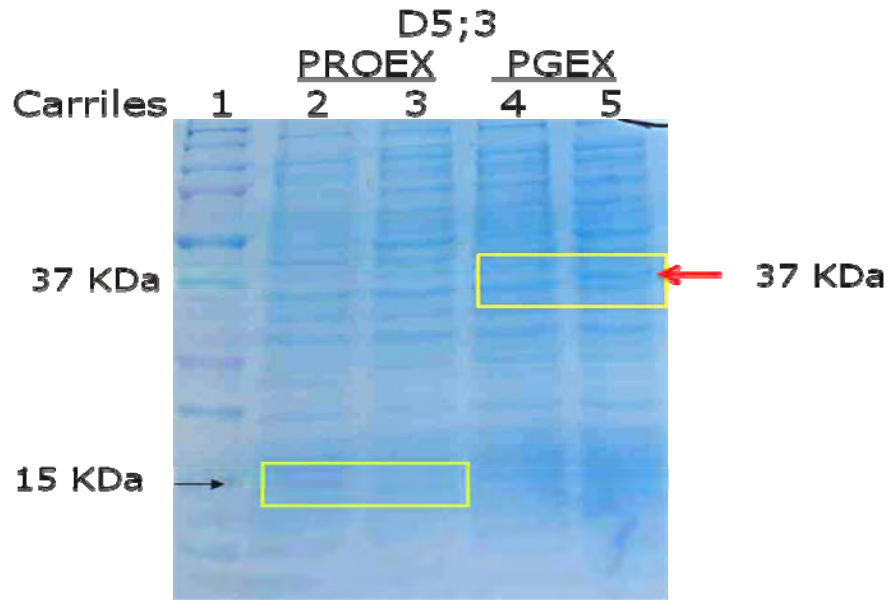
Una vez que se confirmó la presencia de los insertos, se continuó con la sobreexpresión de los péptidos de fusión de ambas ciclinas. El péptido correspondiente al ECT de la ciclina D4;2 tiene un peso molecular aproximado de 8 kDa y el péptido del ECT de la ciclina D5;3 es de 11 kDa y ambos están fusionados a la proteína glutatión S transferasa (GST, 25 kDa) de acuerdo a las características del vector pGEX 4T2, por lo que, al estar ligados ambos péptidos con la GST, resultan péptidos de fusión con pesos aproximados de 33 kDa para la ciclina D4;2 y de 36 kDa para la ciclina D5;3. El vector pPROEX contiene la secuencia para una cola de histidinas que origina un péptido de 4 kDa y que produce un péptido de fusión para la ciclina D4;2 con un peso molecular de 12 kDa, mientras que, para la ciclina D5;3 es de 15 kDa aproximadamente.

En la **Figura 3** se observa una banda de 33 kDa (carril 5) que corresponde al péptido de fusión del ECT de la ciclina D4;2 y en la **Figura 4** se observa una banda de 37 kDa (carril 5) para el péptido de fusión del ECT de la ciclina D5;3, presentes solo después de la inducción con IPTG en una concentración de 0.6 mM. En los carriles 4 de ambos geles se observa que estas bandas no se presentan en ausencia de inducción.



**Figura 3.** Expresión del péptido de fusión codificado en los vectores de expresión pGEX y pPROEX y el ECT de ciclina D4;2. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Proteína de la clona ciclina D4.2-pPROEX sin la inducción de IPTG, Carril 3, Proteína de la clona ciclina D4.2-pPROEX bajo la inducción de IPTG; Carril 4, Proteína de la clona ciclina D4.2-pGEX sin la inducción de IPTG, Carril 5, Proteína de la clona ciclina D4.2-pGEX bajo la inducción de IPTG. Gel de acrilamida al 14%, 98 volts por 2 h 30 min.





**Figura 4.** Expresión del péptido de fusión codificado en los vectores de expresión pGEX y pPROEX y el ECT de la ciclina D5;3. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Proteína de la clona ciclina D5;3-pPROEX sin la inducción de IPTG, Carril 3, Proteína de la clona ciclina D5;3-pPROEX bajo al inducción de IPTG; Carril 4, Proteína de la clona ciclina D5-pGEX sin la inducción de IPTG, Carril 5, Proteína de la clona ciclina D5-pGEX bajo al inducción de IPTG. Gel de acrilamida al 14%, 98 volts por 2 h 30 min.

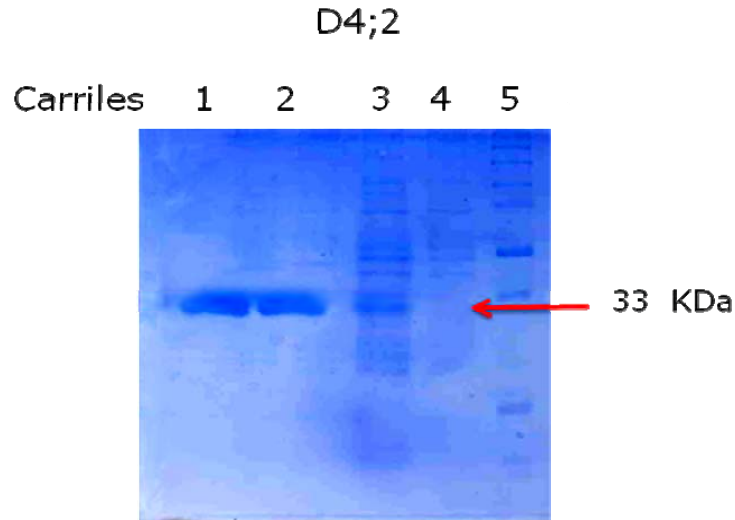
No se lograron visualizar las bandas de 12 y 15 kDa resultado de la sobreexpresión de los péptidos de fusión de los ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3 fusionados a la cola de histidinas del vector de expresión pPROEX (**Figuras 3 y 4**, carriles 3), aún bajo la inducción del IPTG, por lo que proseguimos el proyecto utilizando solo las construcciones en el vector pGEX 4T2.

#### 4.3 Purificación de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad

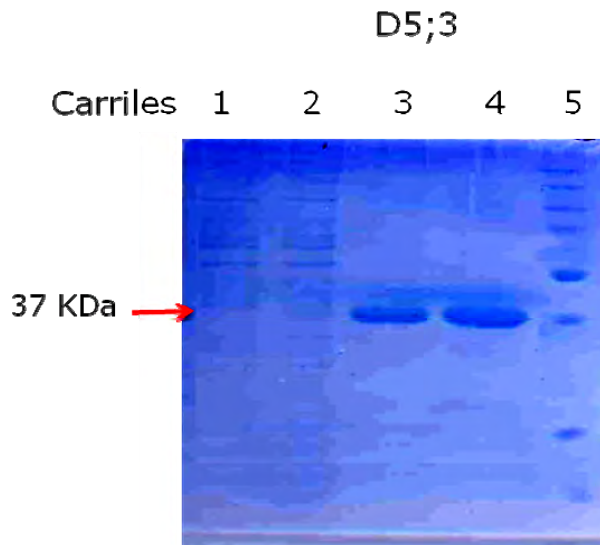
Las células que mostraron sobreexpresión de los péptidos de fusión de los ECT de las ciclinas fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina, posteriormente, fueron lisadas mediante sonicación. La purificación de los péptidos de fusión se realizó usando columnas de Glutathion sefarosa, que retienen a la GST (glutathion S transferasa), facilitando el desprendimiento de proteínas inespecíficas. El perfil electroforético de las fracciones recuperadas se muestra en las **Figuras 5 y 6**. En la **Figura 5**, carriles 1 y 2, aparece una sola banda en el peso correspondiente al péptido de fusión de la ciclina D4;2, resultado de la primera y segunda fracción obtenidas de la columna, eluyendo con glutathion reducido, sustrato que desplaza a la proteína fusionada; en el carril 3 se muestra la inducción del péptido de fusión con IPTG en cultivos bacterianos y que no está presente en el cuarto carril, en ausencia de IPTG. En la **Figura 6** se muestra el resultado con el péptido de

## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

fusión de la ciclina D5;3; en el carril 1 se tiene al extracto proteico de bacterias sin inducción con IPTG, mientras que en el carril 2 se observa el extracto proteico inducido con IPTG en el cual se logra visualizar la banda en 37 kDa; en los carriles 3 y 4 aparecen las bandas proteicas producto de la purificación usando la columna de Glutación sefarosa, las que coinciden con el peso de del péptido de fusión de la ciclina D5;3 (37 kDa).



**Figura 5.** Perfil electroforético de la purificación del péptido de fusión del ECT de la ciclina D4;2. Carriles 1 y 2, purificación del péptido de fusión de la ciclina D4;2. Carril 3, Extracto proteico bacteriano con IPTG; Carril 4; Extracto proteico bacteriano sin IPTG; Carril 5, Marcadores de peso molecular

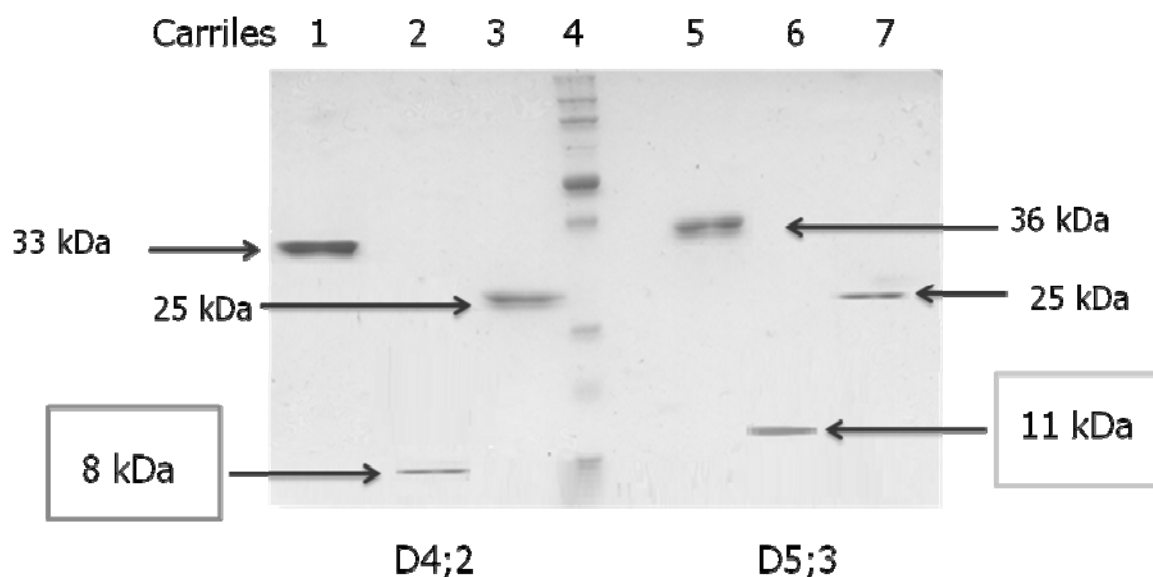


**Figura 6.** Perfil electroforético de la purificación del péptido de fusión del ECT de la ciclina D5;3. Carril 1, Extracto proteico bacteriano sin IPTG; Carril 2; Extracto proteico bacteriano con IPTG; Carriles 3 y 4, Purificación de los péptidos de fusión de la ciclina D5;3. Carril 5, Marcadores de peso molecular

#### 4.4 Digestión y purificación de los péptidos ECT de las ciclinas D de los péptidos de fusión

Después de observar la presencia pura de los péptidos de fusión, se unieron las fracciones con la mayor concentración proteica y se realizó una digestión con la proteasa trombina. La mezcla de digestión se paso por la columna de benzamidina-sefarosa y de glutation-sefarosa varias veces, para retener la trombina y la GST, respectivamente y obtener los péptidos de las ciclinas, libres de la proteína de fusión.

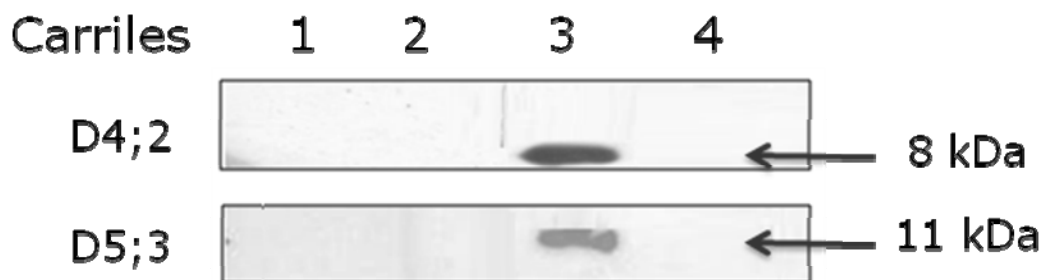
La **Figura 7** muestra en el carril 1 al péptido de fusión del ECT de la ciclina D4;2, en el carril 2 se observa una banda en 8 kDa que corresponde al péptido de extremo carboxilo terminal de la ciclina D4;2 ya sin GST, mientras que en el carril 3 la banda de 25 kDa corresponde a la proteína GST y el carril 4 muestra los marcadores de peso molecular. En el carril 5 se muestra una banda de 37 kDa correspondiente al péptido de fusión del ECT de la ciclina D5;3; en el carril 6 la banda de 11 kDa corresponde al péptido ECT de la ciclina D5;3 sin GST y en el carril 7 se puede ver a la proteína GST como control.



**Figura 7.** Purificación de los péptidos ECT de las ciclinas D. Carril 1, Péptido de fusión de la ciclina D4.2, Carril 2, Péptido del ECT purificado de la ciclina D4;2; Carril 3, Proteína GST; Carril 4, Marcadores de peso molecular; Carril 5, Péptido de fusión de la ciclina D5;3; Carril 6, Péptido del ECT purificado de la ciclina D5;3; Carril 7, Proteína GST. Gel de acrilamida al 12%.

#### 4.5 Obtención y caracterización de los anticuerpos anti ciclina D4;2 y D5;3

Los péptidos puros de los ECT de las ciclinas se emplearon para obtener anticuerpos policlonales, la **Figura 8** muestra el Western Blot realizado para la identificación del antígeno por el anticuerpo correspondiente a cada ciclina. En el carril 1 de cada placa se encuentra un extracto proteico bacteriano analizado con el suero preinmune, los carriles 2 y 4 contienen extracto bacteriano sin inducir, en el carril 3 de cada placa aparecen las bandas en 8 y 11 kDa, indicativo del reconocimiento de los péptidos ECT de las ciclinas D4;2 y D5;3 por el correspondiente anticuerpo.



**Figura 8.** Identificación antígeno-anticuerpo de los péptidos de los ECT de las ciclinas D5;3 y D4;2, obtenidos a los 80 días después de la inmunización. Carril 1, Péptido ECT puro de las ciclinas D4;2 y D5;3 analizado con el suero preinmune extraído en el día 1 previo a la inmunización; Carril 2, Extracto proteico bacteriano de *E.coli* sin IPTG; Carril 4: Péptido ECT puro de las ciclinas D4;2 y D5;3 analizado con el correspondiente anticuerpo primario en una dilución 1:2500 y 1:5000 respectivamente; Carril 5, Extracto proteico bacteriano de *E. coli* sin inducción de IPTG.

Las bandas correspondientes al peso de los péptidos de los extremos carboxilos terminales de las ciclinas confirman que nuestros antígenos inducen una respuesta inmune satisfactoria y que nuestros anticuerpos obtenidos son específicos, ya que no hay aparición de otras bandas en el Western Blot; además se comprobó que los conejos no producían anticuerpos contra estas dos ciclinas D de maíz antes de la primera inmunización, ya que se observa la ausencia de banda al usar el suero preinmune.

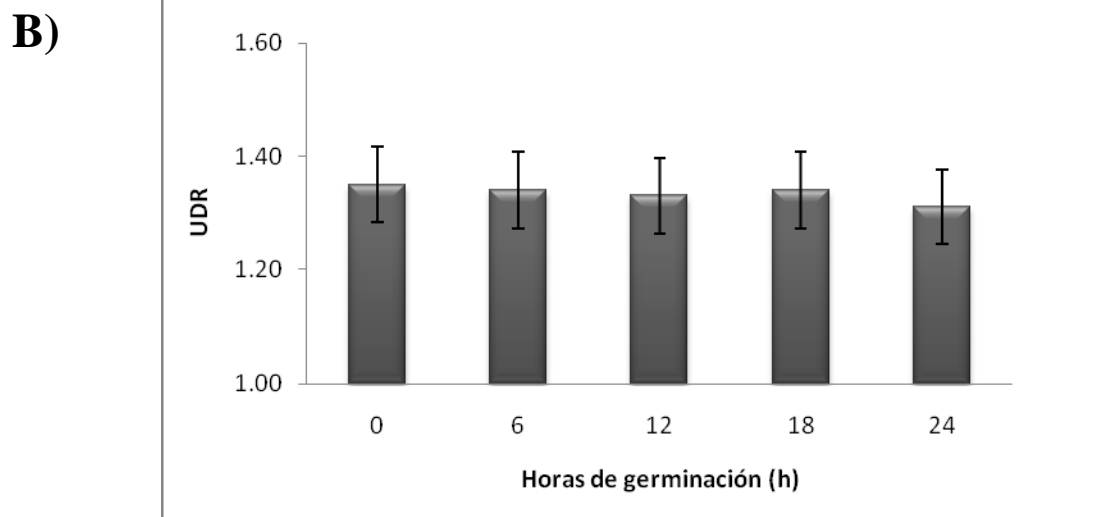
#### 4.6 Estudio de las ciclinas D durante la germinación de maíz

Lara y Vázquez-Ramos (2007), identificaron en extractos de maíz la ciclina D4;2 con un peso de 41 kDa y la ciclina D5;3 con 37 kDa. Con la finalidad de estudiar el comportamiento y la cantidad presente de ambas ciclinas durante la germinación, se obtuvieron extractos de maíz embebidos a diferentes tiempos (0, 6, 12, 18 y 24 h) y se procesaron para Western Blot. El resultado se muestra en las **Figuras 9 y 10**, donde se observa que los anticuerpos generados fueron capaces de reconocer

## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

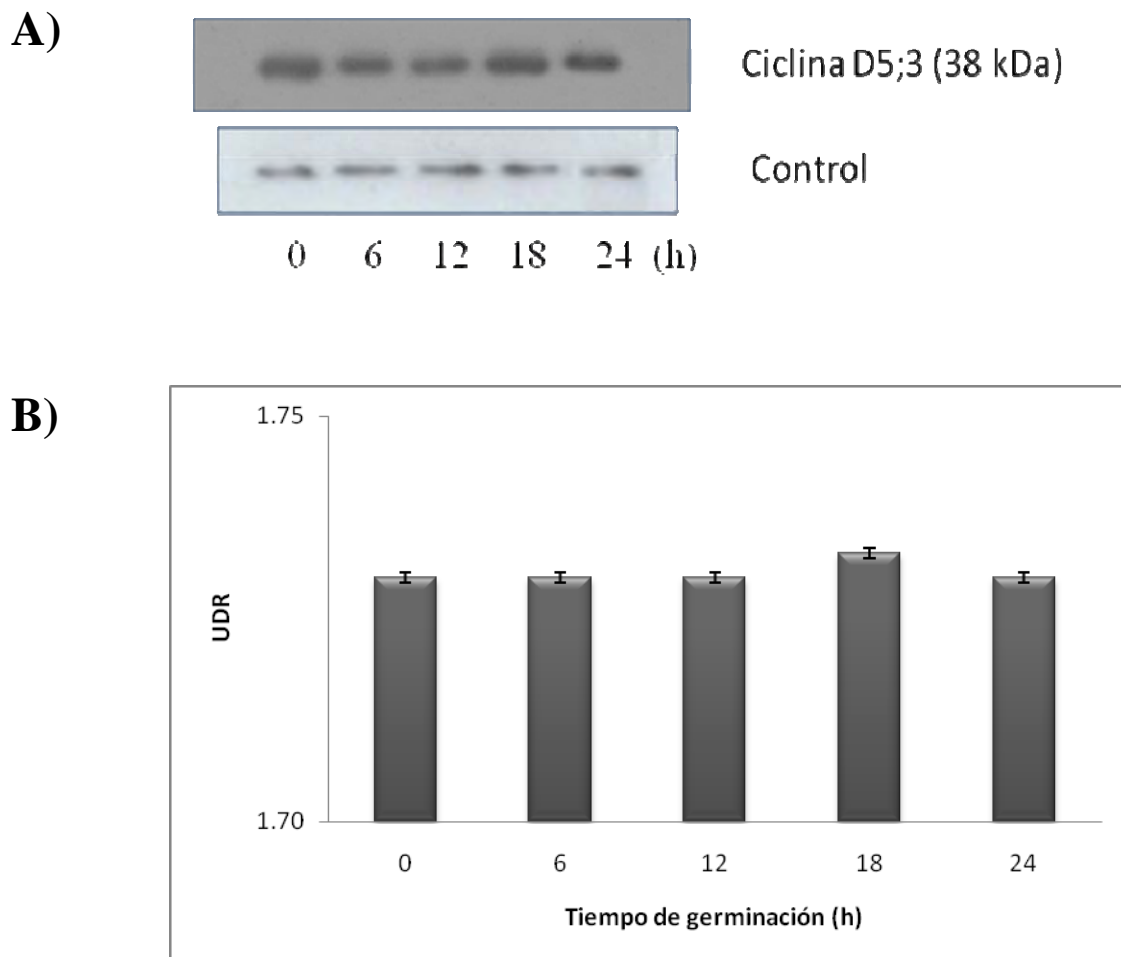
a las ciclinas en sus pesos respectivos y de manera específica ya que no hay presencia de otras bandas.

El Western Blot para la ciclina D4;2 muestra los niveles de la proteína a las 0, 6, 12, 18 y 24 h de germinación. La **Figura 9** en el panel A muestra que la proteína se mantiene en los mismos niveles a las 0, 12 y 24 h y se puede observar un pequeño incremento a las 6 y 18 h de germinación. Sin embargo la densitometría (**Figura 9**, panel B), indica que no hay diferencias estadísticamente significativas (análisis de Anova), en la cantidad de proteína entre un tiempo y otro. El análisis estadístico se realizó con la diferencia entre los resultados obtenidos de las ciclinas D de maíz y la ciclina B1 de humano usado como control de carga, ya que dicha ciclina no se ve modificada en ninguno de los tiempos de germinación estudiados en maíz, resultados descritos por Lara, 2007.



**Figura 9.** Expresión de la ciclina D4;2 en la germinación. Panel A: Western Blot de la ciclina D4;2 a diferentes tiempos de germinación. Se usó un anticuerpo contra una putativa ciclina B1 como patrón de cargado. Panel B, densitometría. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=5).

Los resultados obtenidos para la ciclina D5;3, muestran una similitud con los de la ciclina D4;2, ya que no hay un cambio en la acumulación de esta ciclina a lo largo de los tiempos germinativos, lo que es observable en la **Figura 10** (panel A) con la presencia de una banda de 38 kDa, mientras que los resultados de la densitometría arrojan que no hay cambios en ninguno de los tiempos al compararse con el tiempo cero (panel B).



**Figura 10.** Expresión de la ciclina D5;3 en la germinación. Panel A: Western Blot de la ciclina D5;3 a diferentes tiempos de germinación. Se usó un anticuerpo contra una putativa ciclina B1 como patrón de cargado. Panel B, densitometría. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=5).

### 4.7 Interacción de ciclinas D con Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs)

Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación para estudiar la interacción entre las ciclinas D y las CDKs A y B durante los diferentes tiempos de la germinación. Primeramente se exploró la interacción de las ciclinas D con CDKA;1 y CDKB;1 usando anticuerpos contra CDKs desarrollados en nuestro laboratorio.

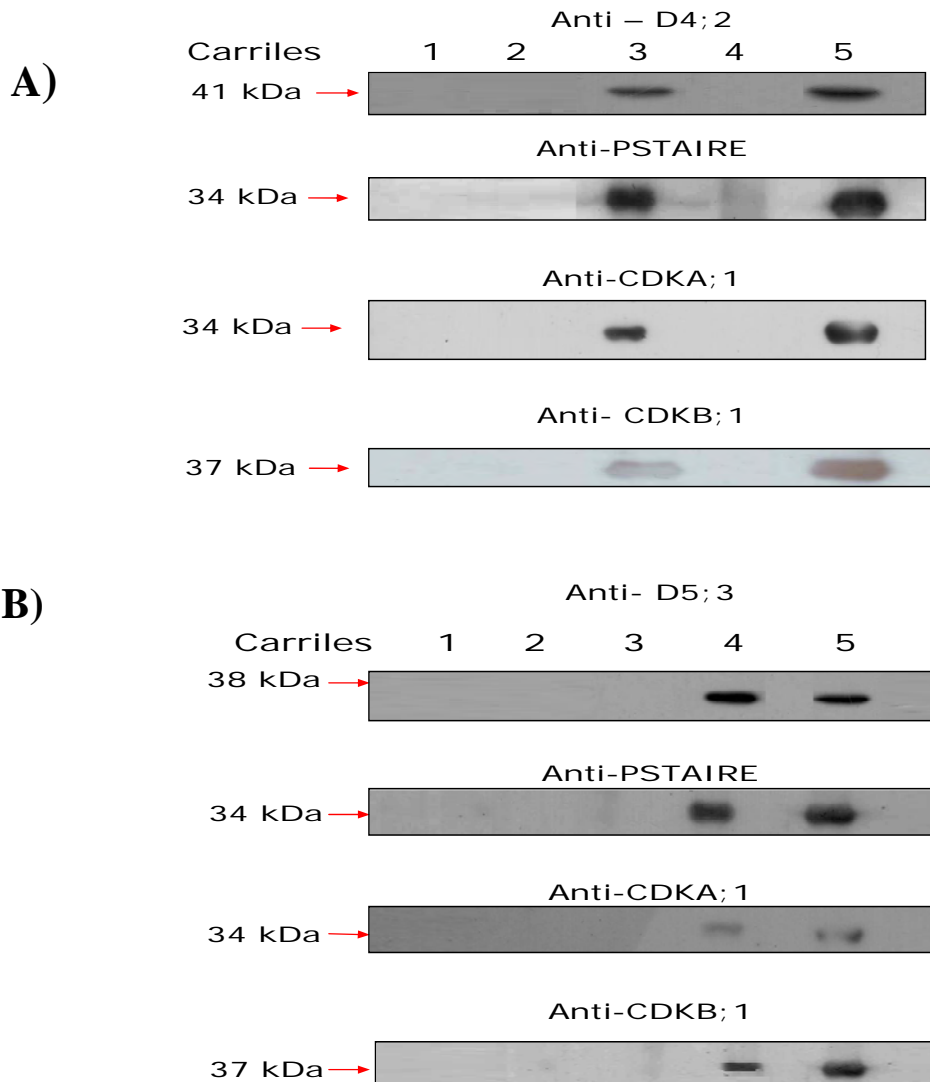
La **Figura 11** muestra las asociaciones de las ciclinas D4;2 y D5;3 con CDKs. En la **Figura 11A**, primer panel, se muestra el Western Blot resultado del inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-ciclina D4;2 y el extracto crudo de maíz a las 12 h, revelando con el mismo anticuerpo, para detectar a la ciclina correspondiente, el cual muestra una banda en 41 kDa para la ciclina D4;2. El segundo panel muestra la asociación de la ciclina con una proteína que contiene la secuencia PSTAIRE, típica de proteínas tipo Cdc2, con un peso en 34 kDa; en el tercer panel se ve la unión de la ciclina D4;2 con la CDKA;1 (34 kDa) y por último se observa la asociación de la ciclina D4;2 con la CDKB;1, con peso de 37 kDa.

Para verificar este resultado y que la aparición de las bandas en los pesos correspondientes correspondiera a las interacciones entre las ciclinas y las CDKs, se realizaron una serie de controles; así, en el carril 1 de todos los paneles de la **Figura 11A** se muestra el inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-ciclina D4;2 y solo la proteína A, el carril 2 muestra la incubación de la proteína A con el extracto crudo (EC); en ninguno de estos carriles se logra observar banda alguna, ya que o no hay proteína que pueda ser reconocida por los anticuerpos o no se agrega anticuerpo para reconocer a las proteínas en estudio. En el carril 3 de cada panel se muestran las bandas correspondientes a las interacciones de ciclina D4;2 con CDKA;1, la proteína que contiene PSTAIRE o bien CDKB;1, usando un EC obtenido de la imbibición de los ejes embrionarios por 12 h. En el carril 4 se observa el resultado de la inmunoprecipitación usando suero preinmune, que sirve como control negativo; finalmente, en el carril 5 se colocó únicamente un EC de ejes embebidos por 12 h, que sirvió como control positivo.

En un experimento semejante, en la **Figura 11B** se observan las inmunoprecipitaciones usando el anticuerpo anti-ciclina D5;3 y extracto crudo a las 18 h, primeramente detectando su mismo antígeno, que muestra una banda en 38 kDa; en seguida se observa el reconocimiento de la proteína que contiene una secuencia PSTAIRE, en 34 kDa, y las interacciones con CDKA;1 y CDKB;1, con la aparición de bandas en 34 y 37 kDa, respectivamente.

## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

No hay banda detectable en el carril 1 de cada panel ya que solo es la incubación de la proteína A y el anticuerpo contra la ciclina D5;3, en los carriles 2, se muestra el uso del suero preinmune como control negativo; en los carriles 3, esta el inmunoprecipitado usando solo la proteína A y el EC, en el cual no se detecta banda alguna; en los carriles 4 se muestran el resultado del inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-ciclina D5;3, el extracto crudo y la proteína A, en todos los paneles se observan las bandas correspondientes a las CDKs que interactúan con esta ciclina se agregaron la proteína A y el EC obtenido de ejes embebidos por 18 h y por último en los carriles 5, se muestra la detección de las CDKs en EC de 18 h como control positivo.



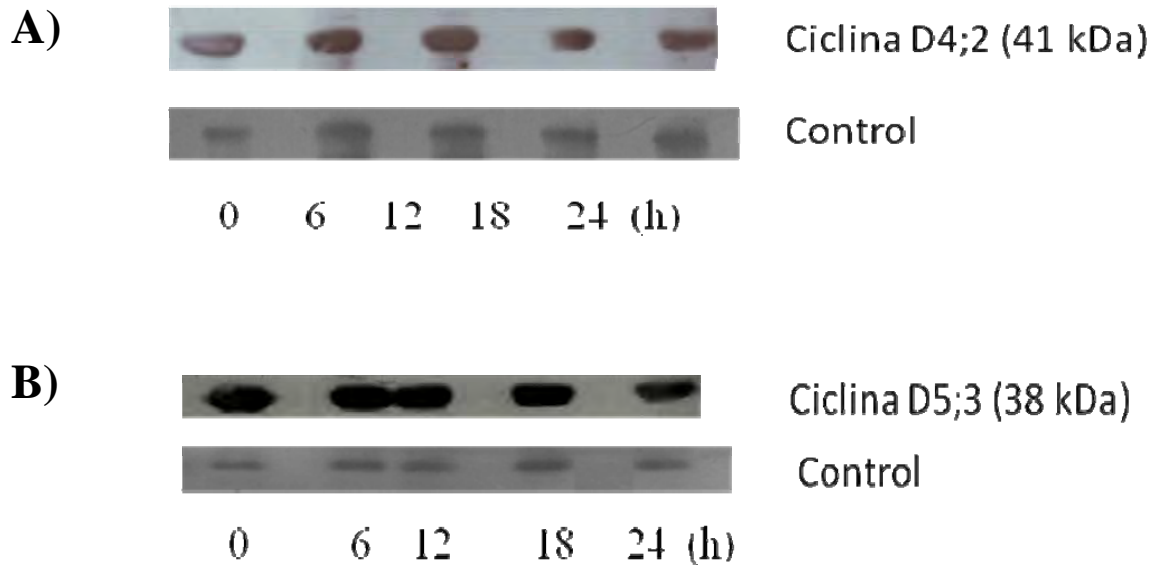
**Figura 11.** Asociación de ciclinas D con PSTAIRE, CDKA;1 y CDKB;1. Panel A) Inmunoprecipitado con anticuerpo anti-ciclina D4;2. Carril 1, Proteína A y  $\alpha$ D4;2. Carril 2, Proteína A y EC a las 12 h de imbibición. Carril 3, EC, proteína A y  $\alpha$ D4;2. Carril 4, Pre-inmune, EC y proteína A. Carril 5, EC. Panel B) Inmunoprecipitado con anticuerpo anti-ciclina D5;3. Carril 1, Proteína A y  $\alpha$ D5;3. Carril 2, Pre-inmune, EC y proteína A. Carril 3, Proteína A y EC. Carril 4, EC, proteína A y  $\alpha$ D4;2. Carril 5, EC a las 18 h de imbibición.

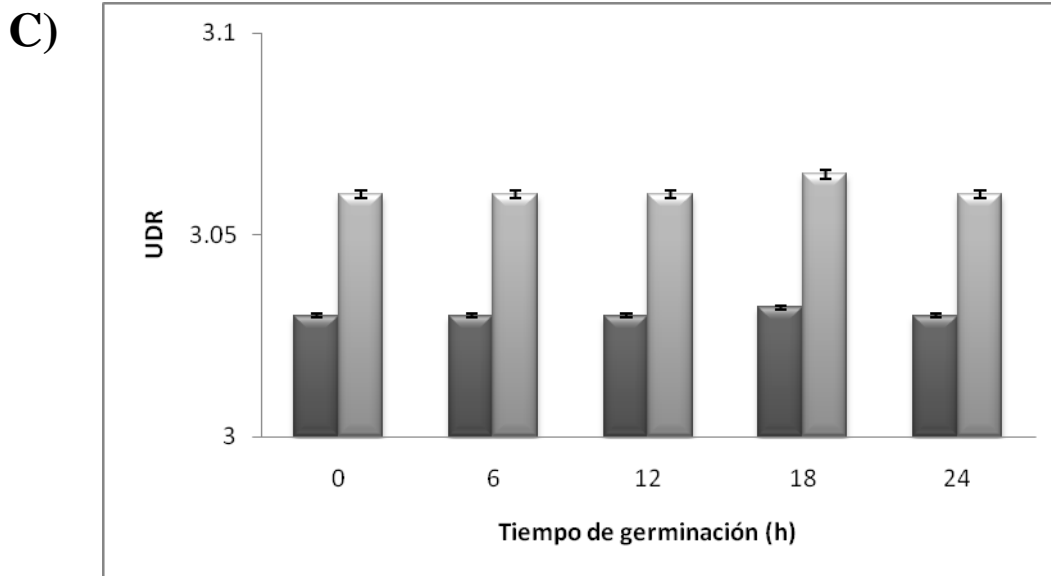


La elección de los tiempos de germinación para el control positivo y los inmunoprecipitados se dio de acuerdo a resultados obtenidos en la acumulación de estas ciclinas durante la imbibición, además de que los datos previamente reportados por nuestro grupo (Lara- Núñez y Vázquez-Ramos, 2007), que indican que la ciclina D4;2 tiene un pico hacia las 12 h y la ciclina D5;3 hacia las 18 h.

Para verificar que no hubiese reconocimiento de los anticuerpos de una ciclina por la otra, se hicieron experimentos cruzados, usando la proteína ciclina D4;2 y anticuerpos anti-ciclina D5, o bien al revés; en ambos casos, la ausencia de bandas nos confirmó que los anticuerpos son específicos para cada una de las ciclinas (datos no mostrados).

Posteriormente se llevaron a cabo estudios de interacción entre las ciclinas D y CDKs a distintos tiempos de germinación de maíz. Primeramente se encontró, mediante inmunoprecipitaciones usando EC a todos los tiempos de imbibición, que la cantidad de las ciclinas D4;2 y D5;3 no varía a lo largo del proceso germinativo, ambas proteínas mantienen una cantidad constante durante los tiempos de germinación estudiados (**Figura 12**, paneles A, B y C), resultados que concuerdan con los Western Blots ilustrados en las **Figuras 9 y 10**.

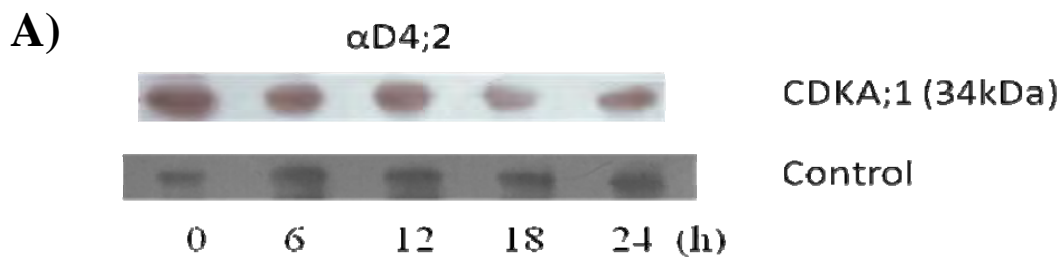


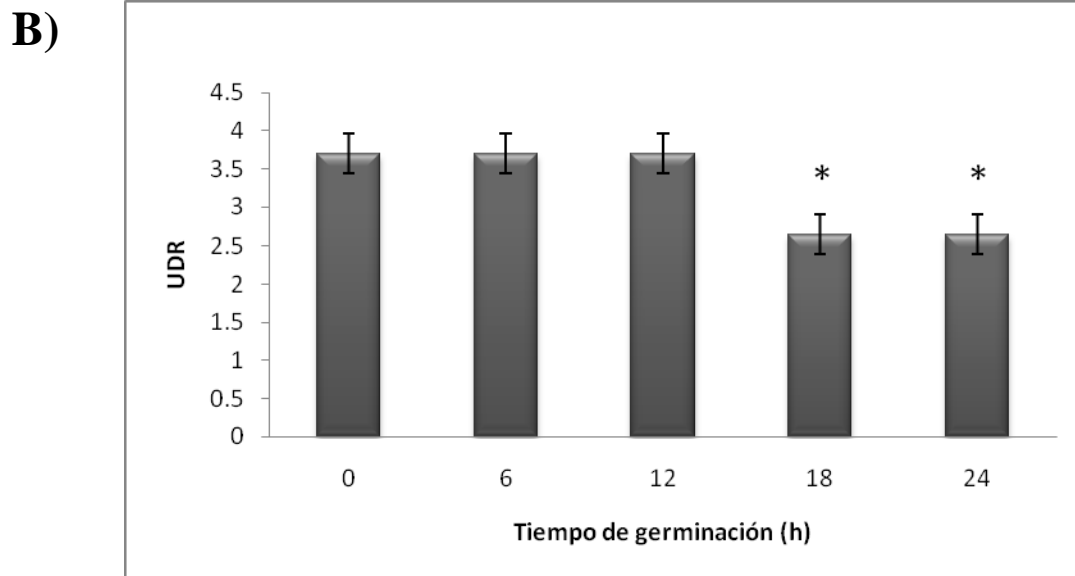


**Figura 12.** Inmunoprecipitación de las ciclinas D4;2 y D5;3 a lo largo de la germinación. Panel A, inmunoprecipitado de la ciclina D4;2, reconocido con el anticuerpo anti D4;2. Panel B, inmunoprecipitación de la ciclina D5;3 reconocido con el anticuerpo anti-D5;3. Panel c, densitometría de ambas ciclinas D, barras azules, ciclina D4;2, barras rojas, ciclina D5;3. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=4). Control, proteína de maíz reconocida por un anticuerpo anti-ciclina B humana.

#### 4.8 Interacción entre Ciclina D4;2 y CDKs

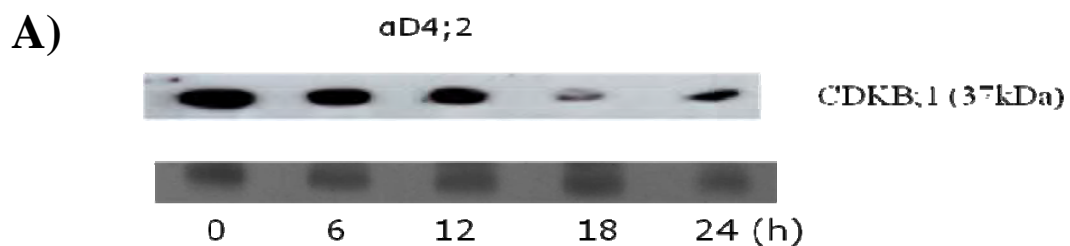
La **Figura 13**, panel A, indica que la ciclina D4;2 interacciona con la CDKA;1 de maíz, en todos los tiempos de la germinación, mostrando una disminución de estos complejos a partir de las 18 h; en el panel B se incluye la densitometría realizada a las bandas obtenidas, reiterando que la cantidad de los complejos ciclina D4;2–CDKA;1 se mantiene en los mismos niveles hasta las 12 h y posteriormente esta interacción decae en un 30%.



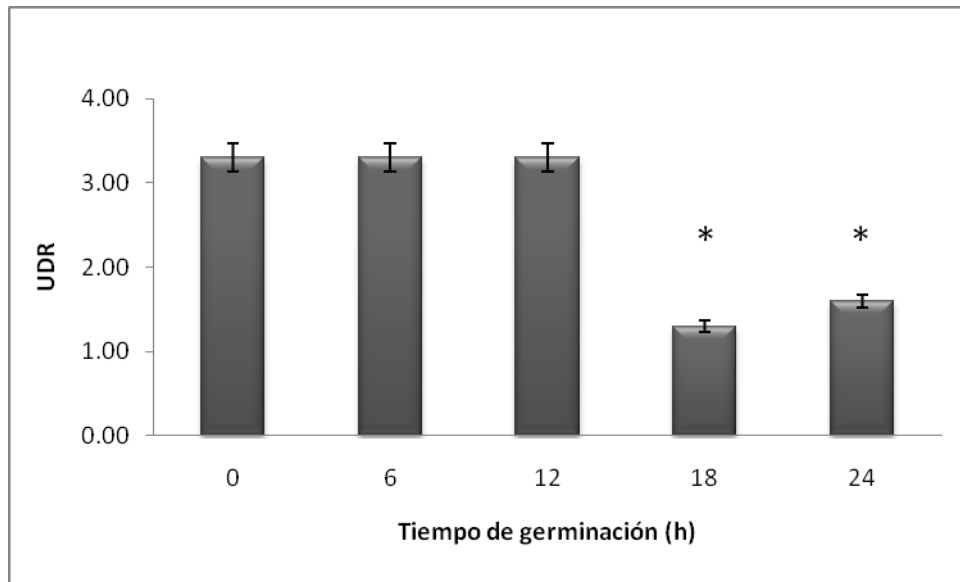


**Figura 13.** Inmunoprecipitado de la proteína CDKA;1 con anticuerpos anti D4;2 durante la germinación. Panel A, Western Blot del inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CDKA;1 y su respectivo control de carga. Panel B, densitometría del western blot en el panel A. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=3). (\*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al control.

La **Figura 14** muestra la interacción entre la ciclina D4;2 y la CDKB;1. En el panel A se observa el Western Blot que resulta de la interacción de estas dos proteínas al reconocerse una banda de 37 kDa en todas las horas estudiadas; esta identificación se observa cuando realizamos los inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-ciclina D4;2 y se reconoce a la CDKB;1 con anticuerpos específicos; existe interacción a lo largo de la germinación, sin embargo, esta unión se observa fuertemente solo entre las 0 y 12 h y posteriormente la interacción disminuye. En el panel B se muestra el resultado del análisis estadístico, indicando una diferencia significativa en los tiempos 18 y 24 h.



**B)**

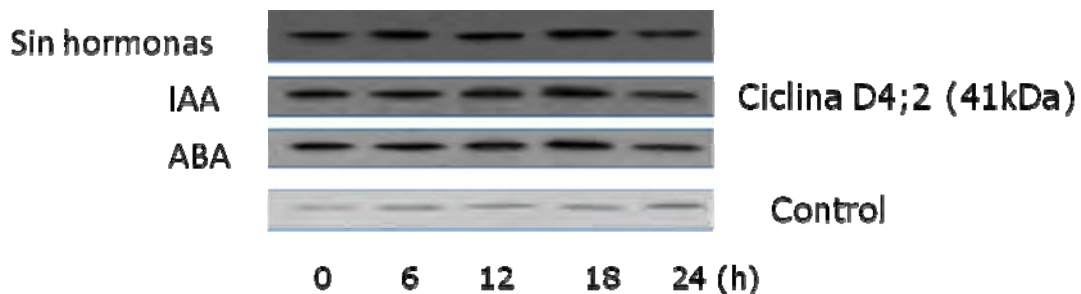


**Figura 14.** Inmunoprecipitado de la proteína CDKB;1 con anticuerpos anti D4;2 durante la germinación. Panel A, Western Blot del inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CDKB;1 y su respectivo control de carga. Panel B, densitometría del western blot en el panel A. Cada barra representa la media ± ES de experimentos independientes (n=3). (\*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al control.

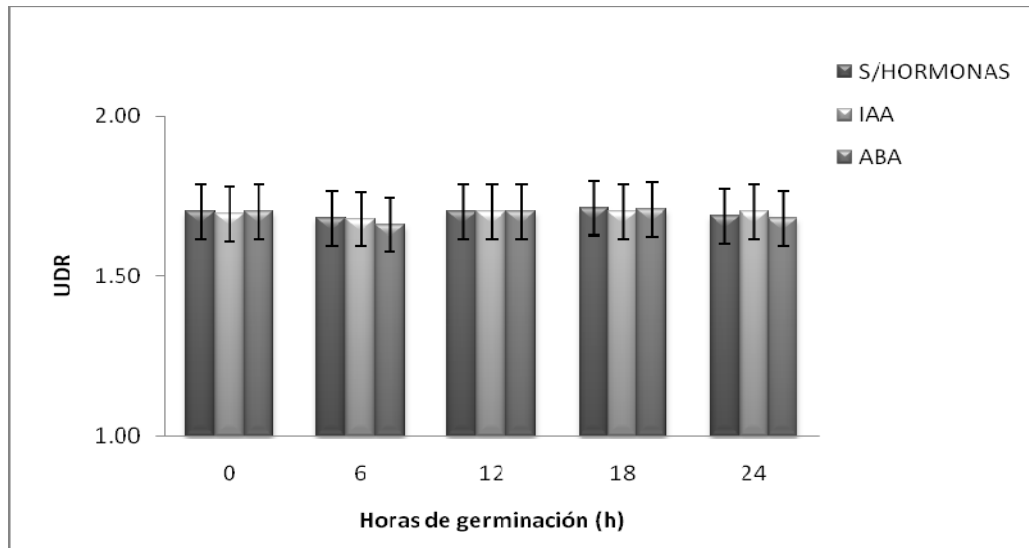
#### 4.9 Efecto de fitohormonas sobre los niveles de acumulación de la ciclina D4;2

La **Figura 15**, panel A muestra el efecto de diferentes fitohormonas sobre la cantidad de proteína ciclina D4;2. Se puede observar que ni la imbibición con auxinas (IAA) ni la adición de ácido abscísico (ABA) modifica la cantidad de ciclina D4;2 a lo largo de la germinación. Al realizar la densitometría (panel B), se puede observar que no hay cambios entre las muestras que no contienen hormonas y las que están suplementadas con alguna de las dos hormonas.

**A)**



B)



**Figura 15.** Efecto de hormonas sobre la expresión de la ciclina D4;2. Panel A) Niveles de proteína ciclina a lo largo de la germinación en muestras con/sin hormonas. Panel B, Densitometría de las bandas en el Western Blot. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=3).

La auxina (IAA) incrementa los niveles de transcritos de las ciclinas D4;2 y D5;3, mientras que el ácido abscísico los disminuye (Gutiérrez, 2005; Quiroz y Vázquez-Ramos, 2006), sin embargo, los resultados anteriores indican que a nivel de proteína no hay influencia hormonal.

#### 4.10 Efecto de fitohormonas en la interacción de la Ciclina D4;2 con las diferentes CDKs

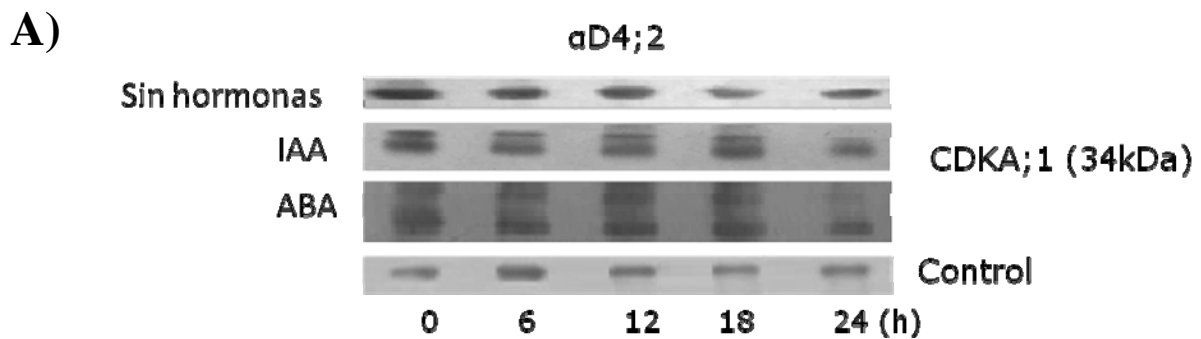
Para el estudio del efecto de las fitohormonas en la acumulación de los complejos ciclina D4;2 con CDKs, se realizaron inmunoprecipitados usando el anticuerpo contra la ciclina D4;2 y se reveló usando los anticuerpos contra las cinasas. La **Figura 16A** muestra en el primer panel el Western Blot usando ejes embrionarios embebidos solo con solución amortiguadora; en el segundo, cuando los ejes se embebieron en presencia de auxinas y el tercero cuando se añadió ácido abscísico a los ejes embrionarios.

Se puede observar (**Figuras 16 A y B**) que la adición hormonal no modifica la interacción entre la ciclina D4;2 y la CDKA;1; de hecho, los niveles de proteína CDKA;1 son semejantes a los encontrados previamente (**Figura 13A, Figura 16A**, primer panel) a los diferentes tiempos de germinación con /sin hormonas, incluida la caída en asociación después de las 12 h. Se observa, sin embargo, en las muestras de ejes tratados con hormonas, una segunda banda en un peso aproximado

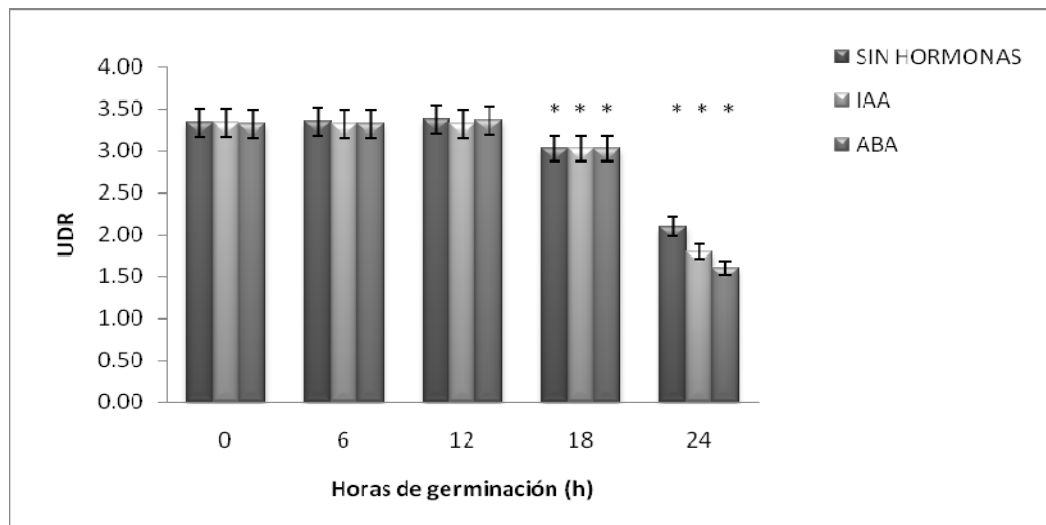
## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

de 37 kDa. La naturaleza de esta segunda banda se definió al realizar un Western Blot cruzado, ya que el anticuerpo contra la CDKA;1 puede reconocer a la CDKB;1, pero el anticuerpo contra la CDKB;1 no reconoce a la CDKA;1 (datos no mostrados); la banda en 37 kDa disminuye particularmente en los tiempos posteriores a las 12 h. Este resultado nos permite sugerir que la segunda banda detectada se debe a la CDKB;1, sin embargo, será necesario separar los complejos de las ciclinas D con CDKs, mediante la técnica de Pull Down.

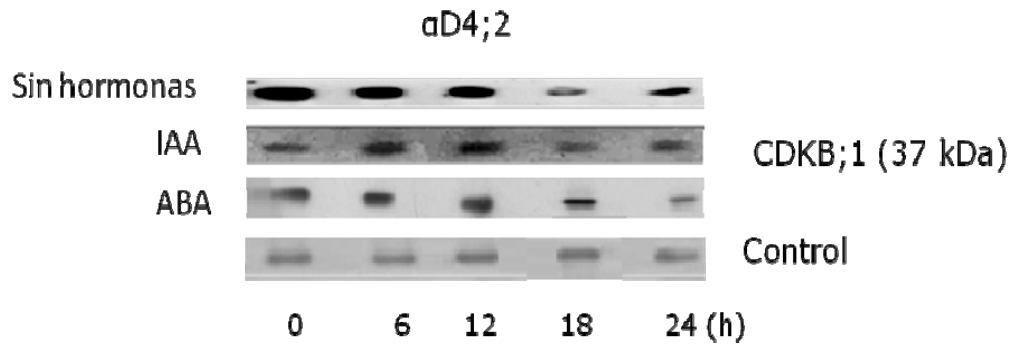
En el panel C se muestra el resultado para la interacción entre la ciclina D4;2 y la CDKB;1 y el efecto de la adición de hormonas. El primer Western muestra el resultado de las interacciones sin la adición de hormonas, en el segundo, las interacciones con la adición de IAA y por último aquellos complejos que se formaron cuando los ejes embrionarios fueron imbibidos con el ABA. El análisis estadístico de la densitometría (panel D) indica que no hay modificación alguna entre los tres tratamientos. Nuevamente, la asociación ciclina/CDK se reduce después de las 12 h.



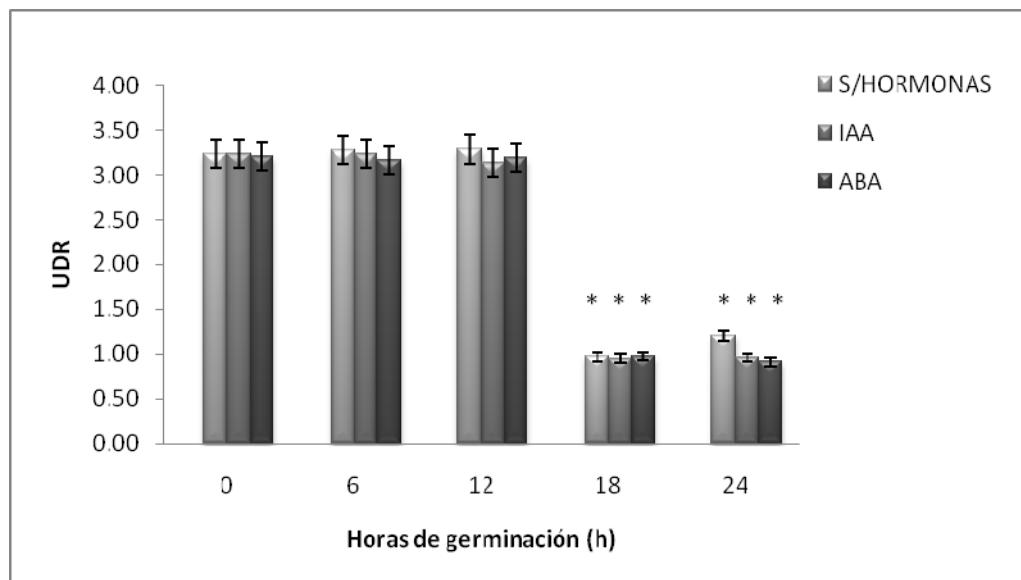
**B)**



C)



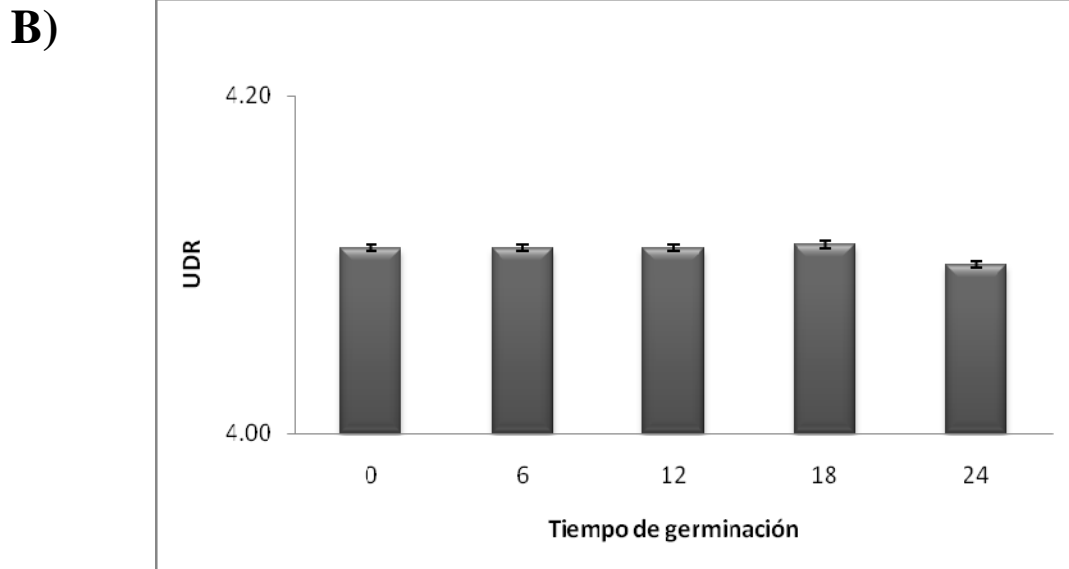
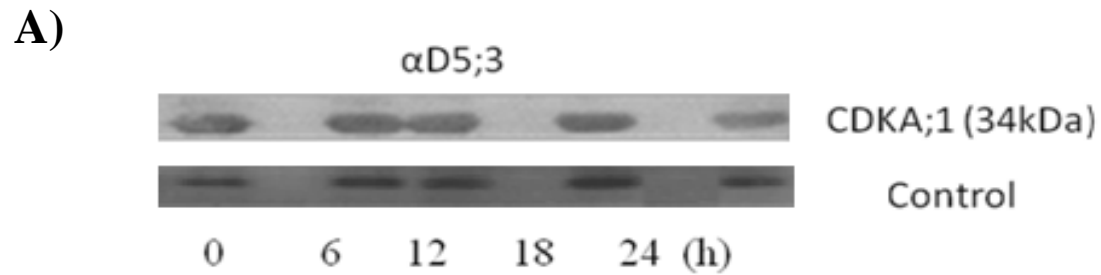
D)



**Figura 16.** Efecto de las hormonas sobre la interacción ciclina D4;2- CDKs. Panel A) Complejos ciclina D4;2- CDKA;1 a lo largo de la germinación en muestras sin hormonas tratadas con IAA o tratados con ABA. Panel B) densitometría de las interacciones ciclina D4;2-CDKA;1. Panel C) Complejos ciclina D4;2- CDKB;1 a lo largo de la germinación en muestras sin hormonas, muestras tratadas con IAA y muestras tratados con ABA. Panel D) densitometría de las interacciones ciclina D4;2-CDKB;1. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=3). (\*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al control.

#### 4.11 Interacciones entre Ciclina D5;3 y las CDKs

En lo que respecta al resultado de la ciclina D5;3 y su interacción con la CDKA;1, este complejo permanece en los mismos niveles desde el tiempo 0 hasta las 24 h, lo que se muestra en el Western Blot de la **Figura 17**, panel A. Se analizaron las placas por densitometría, corroborando el resultado del Western Blot.

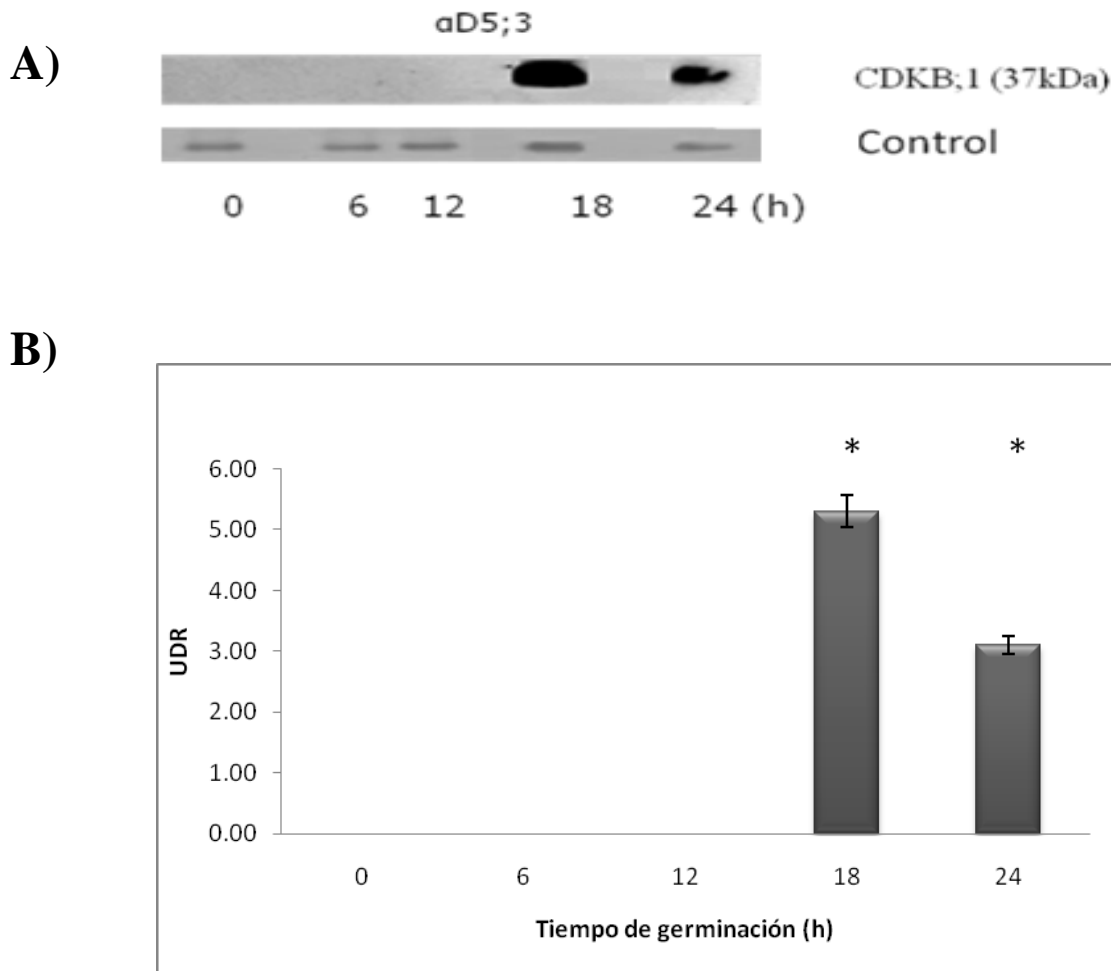


**Figura 17.** Inmunoprecipitado de la proteína CDKA;1 con anticuerpos anti D5;3 durante la germinación. Panel A, Western Blot del inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CDKA;1 y su respectivo control de carga. Panel B, densitometría del Western Blot en el panel A. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=3). (\*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al control.



## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

La **Figura 18** muestra la interacción entre la ciclina D5;3 y CDKB;1. En el panel A se observa el Western Blot revelando con anticuerpo anti-CDKB;1, que muestra una banda de 37 kDa correspondiente a CDKB;1 de maíz. Interessantemente solo se observa interacción en los tiempos 18 y 24 h de la germinación; en el panel B se muestra la densitometría, encontrando una diferencia significativa de interacción entre los tiempos 18 y 24 h.

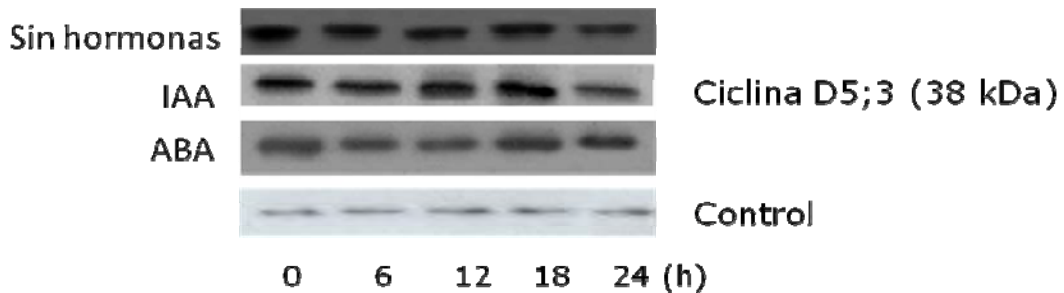


**Figura 18.** Inmunoprecipitado de la proteína CDKB;1 con anticuerpos anti D5;3 durante la germinación. Panel A, Western Blot del inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CDKB;1 y su respectivo control de carga. Panel B, densitometría del Western Blot en el panel A. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=3). (\*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al control.

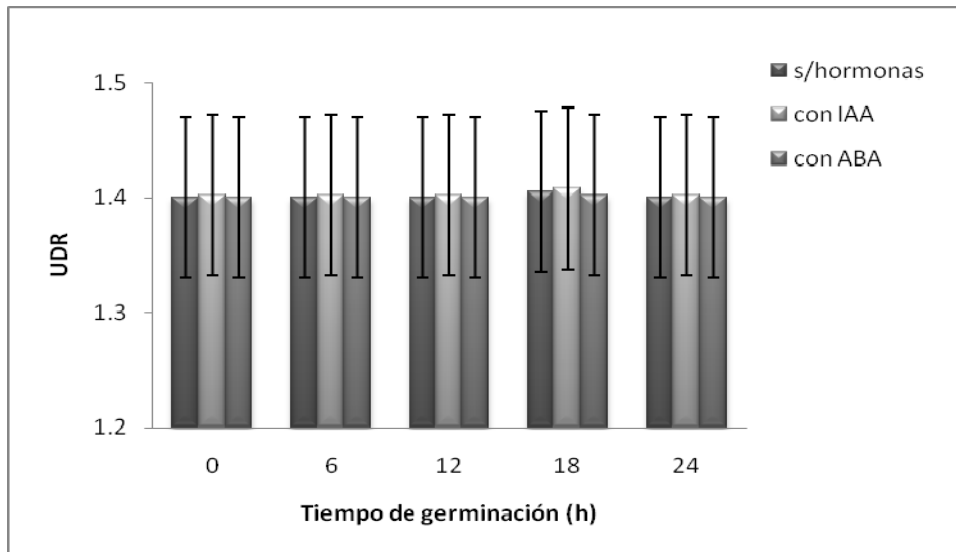
#### 4.12 Efecto de las fitohormonas en los niveles de acumulación de la Ciclina D5;3

La acumulación de la ciclina D5;3 en presencia o ausencia de fitohormonas (**Figura 19**, panel A), presenta un patrón similar al de la ciclina D4;2, ya que no se logró observar un cambio significativo durante la imbibición. La densitometría indicó que no hay un valor estadísticamente diferente en las muestras, definiendo a la ciclina D5;3 como una proteína que mantiene niveles constantes (**Figura 19**, panel B).

**A)**



**B)**

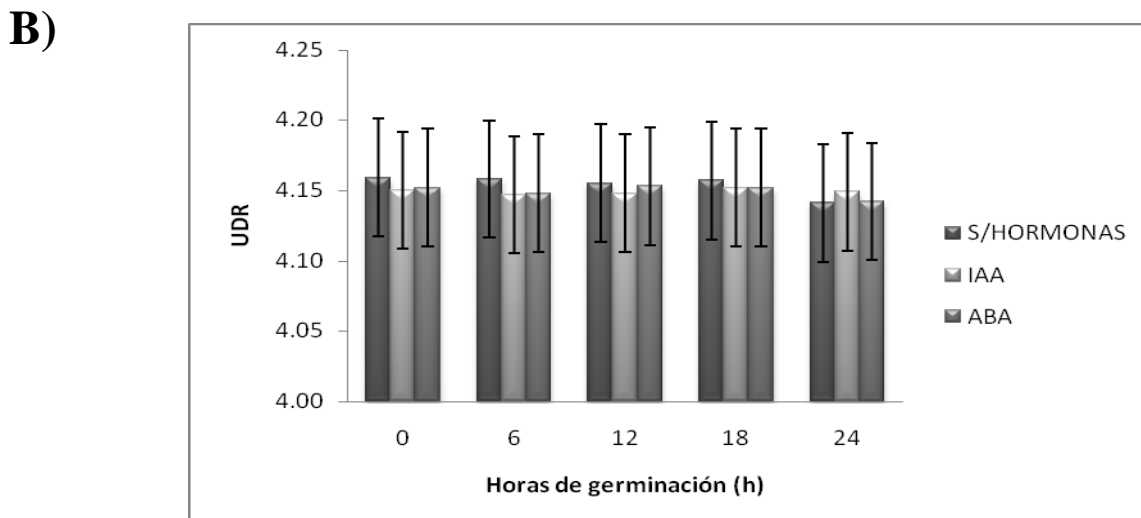
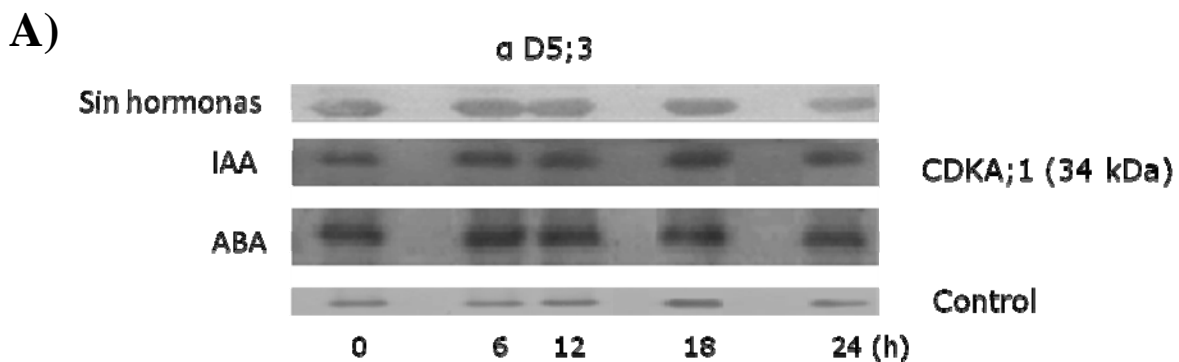


**Figura 19.** Efecto de hormonas sobre la expresión de la ciclina D5;3. Panel A) Niveles de proteína ciclina a lo largo de la germinación en muestras con/sin hormonas. Panel B, Densitometría de las bandas en el Western blot. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=3).

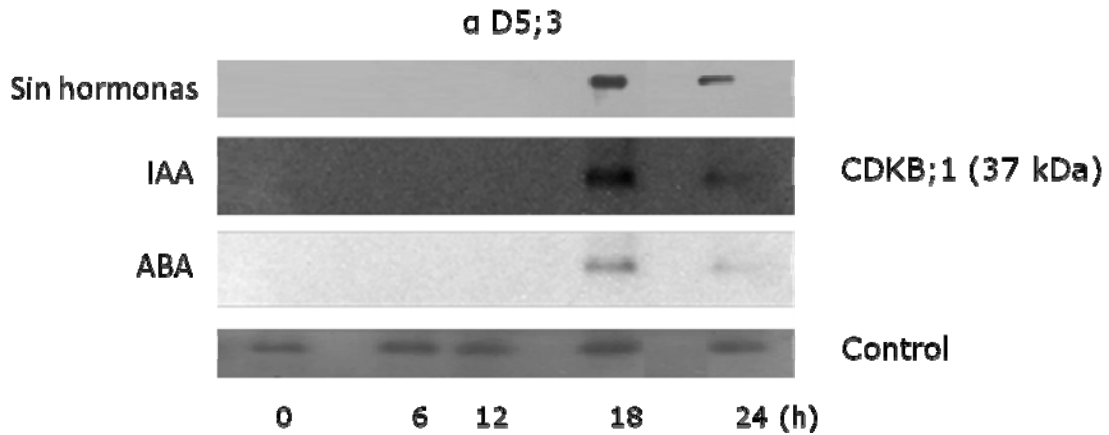
#### 4.13 Efecto de fitohormonas en la interacción de la Ciclina D5;3 con las diferentes CDKs

La interacción de la ciclina D5;3 con CDKA;1 a lo largo de la germinación no se ve afectada, ni por tratamiento hormonal, ni por el tiempo estudiado. Esto se muestra al observar los Western Blots de la **Figura 20** (panel A); así mismo, la densitometría realizada (panel B), demuestra que al hacer el análisis estadístico, no hay diferencia entre una muestra y otra, observándose el mismo nivel de acumulación de estos complejos desde el tiempo cero hasta las 24 h.

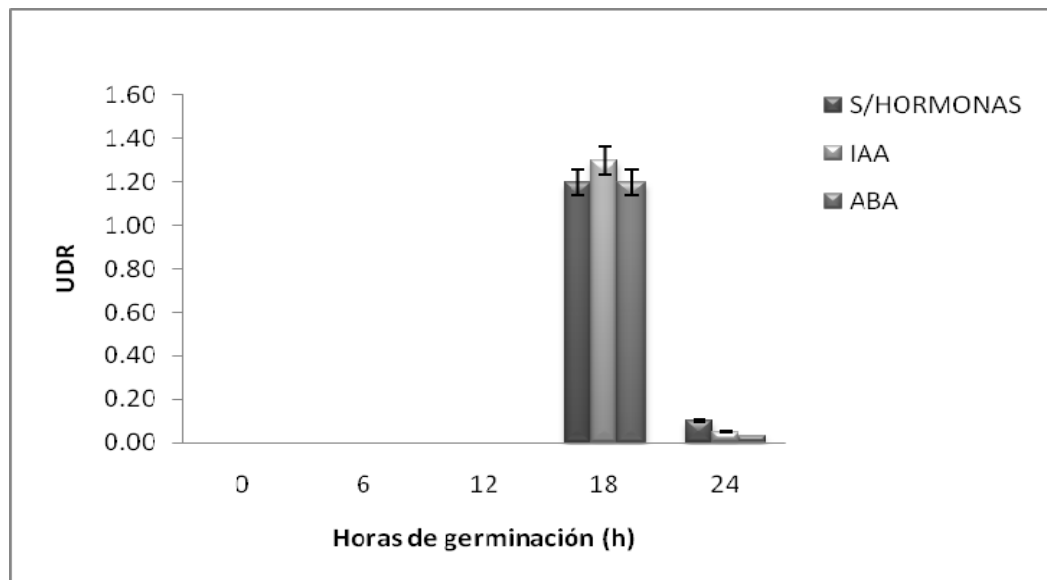
Los resultados obtenidos para la interacción de la ciclina D5;3 y CDKB;1, muestran en el panel C que los ejes tratados con fitohormonas mantienen el mismo comportamiento que las muestras control a lo largo de la germinación, en las que la interacción solo se da en los tiempos 18 y 24 h; al realizar la densitometría, el resultado estadístico demuestra que la interacción es mayoritaria a las 18 h y posteriormente esta decae casi 70% en el último tiempo germinativo estudiado (panel D).



C)



D)



**Figura 20.** Efecto de las hormonas sobre la interacción ciclina D5;3- CDKs. Panel A) Complejos ciclina D5;3- CDKA;1 a lo largo de la germinación en muestras sin hormonas, tratadas con IAA o tratados con ABA. Panel B) densitometría de las interacciones ciclina D5;3-CDKA;1. Panel C) Complejos ciclina D5;3- CDKB;1 a lo largo de la germinación en muestras sin hormonas, muestras tratadas con IAA y muestras tratados con ABA. Panel D) densitometría de las interacciones ciclina D5;3-CDKB;1. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de experimentos independientes (n=3). (\*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al control.

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención de los anticuerpos contra las ciclinas tipo D

El estudio de las 16 ciclinas tipo D de maíz encontradas en nuestro laboratorio, demuestra que todas tienen el dominio amino terminal que las caracteriza, en éste se encuentra la caja de ciclinas que permite la unión con las cinasas dependientes de ciclinas (Menges et al., 2007) y la región LXCXE, que permite, la interacción con la proteína Rb. Sin embargo, solo 10 de las ciclinas D de maíz tienen el dominio carboxilo terminal, sugiriendo que esta característica les aporta antigenicidad o una función especial.

El uso de los extremos carboxilo de las ciclinas D4;2 y D5;3 para generar antígenos específicos, nos permitió una buena sobreexpresión de proteína recombinante, sin afectar el crecimiento de las bacterias transformantes solo al usar el vector pGEX, mientras que no se logró ver la sobreexpresión de la proteína en el vector pPROEX . Con este resultado deducimos que este vector no es útil para la sobreexpresión de estos péptidos y por lo que se utilizó el vector de expresión pGEX.

El método de purificación usando la columna de Glutación sefarosa y la elución con glutatión reducido, nos permitió la eliminación de proteínas inespecíficas de los extractos bacterianos lisados, obteniendo solo la proteína de interés; además, la digestión con trombina, una enzima que corta en la unión entre la GST y el péptido recombinante, nos permitió obtener solo la secuencia peptídica de los extremos carboxilo de ambas ciclinas y así acumular suficiente antígeno para las inmunizaciones subsiguientes.

La respuesta antigénica se indujo al hacer la administración por el ganglio poplíteo, el que pertenece al sistema linfático que esta extendido por todo el cuerpo y de esta forma facilita la respuesta inmunológica. La inmunización resulto eficaz, ya que al caracterizar los anticuerpos después de la punción cardiaca, se logró identificar los péptidos de las ciclinas en extractos proteicos de células bacterianas, sin la aparición de bandas inespecíficas.

### 5.2 Acumulación de las ciclinas D a lo largo de la germinación en maíz

La ciclinas fluctúan a lo largo del ciclo celular (Jackman et al., 2003), de ahí su nombre; sin embargo, los resultados de Western Blot obtenidos en este trabajo mostraron que los niveles de proteína no fluctúan y que incluso ambas ciclinas estudiadas se encuentran presentes en la semilla seca. Estudios previos de vida media de algunas proteínas en maíz, usando cicloheximida (Mayoral, tesis de Licenciatura, 2009), demostraron que las ciclinas D5;3 y D4;2 están presentes en semilla seca, pero a las pocas horas de iniciada la germinación (3 a 6 horas), ambas desaparecen, sugiriendo que la proteína almacenada es blanco de un proceso de degradación y por lo tanto no participa en la germinación, por lo que debe de haber un proceso de síntesis *de novo* para permitir su re-acumulación y que pueda avanzar el ciclo celular y con ello el proceso germinativo. Lo anterior indicaría que estas ciclinas si están fluctuando y la razón por la cual no se ven cambios, es el eficiente recambio que las regula durante la germinación. No está aún claro cuál es el papel de estas ciclinas en la semilla seca y si su presencia ejerce alguna función en las primeras fases del ciclo celular o de la germinación.

### 5.3 Interacción de las ciclinas D con las CDKs

Estudios anteriores (Lara-Núñez y Vázquez-Ramos, 2007) demostraron que las ciclinas D mantienen una interacción con proteínas que contienen la secuencia PSTAIRE, lo cual sugiere la unión con una CDK tipo A. La presencia en Western Blots de una banda con un peso molecular semejante al de la CDK tipo B fue inesperada.

La interacción de las ciclinas D de maíz con la CDKB es aún un resultado preliminar. Las CDKBs se expresan durante las fases G2 y M y forman complejos con ciclinas mitóticas (tipos A y B), mientras las ciclinas D se expresan principalmente en la fase G1 y en la transición G1/S y forman complejos con la CDKA; sin embargo, estudios en *Arabidopsis thaliana* (Kono et al., 2003) y *Nicotiana tabacum* (Kawamura et al., 2005), demuestran que si existe interacción entre las CDKBs y algunas ciclinas tipo D de manera tejido específico ó espacio específico y se ha demostrado que estos complejos poseen actividad de cinasa sobre histona H1. Esta evidencia podría sugerirnos que también en maíz habría interacción ciclinas D-CDKB y que estos complejos podrían tener actividad de cinasa.

### 5.4 Interacción ciclina D4;2 y las CDKs

La ciclina D4;2 forma complejos con la CDKA;1 (figura 13) a lo largo de la germinación en el maíz; sin embargo, existe unión ciclina D4;2-CDKA;1 en la semilla seca. Se ignora si estos complejos, con la ciclina “almacenada” son funcionales y si están participando en la germinación, o bien si es la ciclina sintetizada de novo, unida a CDKA;1 la que participa en la entrada al ciclo celular y por lo tanto al inicio de la germinación. El decaimiento en asociación a las 18 horas quizás indique un rol menos importante del complejo en tiempos en que las células estarían entrando a la fase G2. El complejo ciclina D-CDKA podría estar funcionando en la vía RB para la transición G1/S (0-12 h), de tal forma que las células se apresten a iniciar la síntesis de ADN.

La interacción de la ciclina D4;2 con la CDKB;1 sigue un patrón muy similar a la interacción con CDKA;1, con unión hasta las 18 h y posterior decaimiento. No es fácil explicar este resultado si se considera que la CDKB debería estar presente principalmente en las fases G2/M. Tendríamos que hacer un estudio cuidadoso de la ontogenia de la CDKB;1 durante la germinación y quizás sería importante saber si la interacción ocurre en los mismos o diferentes lugares que con la CDKA; ya que en estudios previos realizados en mamíferos han demostrado que existe interacción ciclinas D y CDKs en el citoplasma, incluso se ha logrado visualizar a los tres tipos de ciclinas D fuera del núcleo (Brayja *et al.*, 2008). También podría estar dándose la asociación con la CDKB;1 sin que necesariamente se active la cinasa en el complejo, lo que estaremos estudiando a futuro. Estos y otros resultados de nuestro grupo sugerirían que el ciclo celular durante el proceso germinativo no es necesariamente un ciclo celular canónico.

Los resultados también indican que la ciclina D4;2 no tiene preferencia por una CDK específica en algún tiempo de la germinación, aunque se tiene en común la disminución de estos complejos a partir de las 18 h, tiempo en el que probablemente su función no sea ya tan necesaria. Es importante recordar que los niveles de la ciclina D4;2 se mantienen constantes hasta las 24 h. Quizás esta ciclina pudiera estar formando complejos con otras proteínas en el núcleo, como se ha demostrado en mamíferos con el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), una proteína implicada en la síntesis de ADN y que dentro de su secuencia contiene sitios de unión para las ciclinas D (Xion *et al.*, 1992; Kontopidis *et al.*, 2004). La interacción entre ciclinas D y PCNA en maíz también han sido demostradas por nuestro grupo

Experimentos desarrollados en nuestro laboratorio demuestran que los niveles de expresión de los ARN mensajeros de las ciclinas tipo D (D2;1, D4;1, D5;1 y D5;2), se modifican ante la adición de hormonas, incrementándose los niveles a la adición de auxinas y citocininas. Sin embargo, al embeber ejes embrionarios con una hormona inhibidora de la germinación, como el ácido abscísico (ABA), los niveles de los ARN mensajeros disminuyen (Gutiérrez, et al., 2005; Quiroz- Vázquez Ramos, 2006). En este mismo artículo, los autores demuestran que la adición de hormonas no afecta a nivel de proteína, concluyendo que la acción hormonal solo es distintiva a nivel de expresión génica. Corroborando lo anterior, los resultados en este trabajo muestran que no hay cambios en la acumulación de la proteína ciclina D4;2 a lo largo de la germinación (**Figura 15**), como efecto de la adición de hormonas. Algunos estudios sugieren que la adición de auxinas puede aumentar la cantidad de nucleasas (Gutiérrez, 2005), lo que podría desestabilizar a los ARNm y así evitar su traducción, aunque no tenemos ninguna evidencia al respecto. Una conducta semejante se observa en la asociación ciclina/CDK: no hay ninguna diferencia en la asociación en presencia/ausencia de hormonas, manteniéndose el patrón ya descrito arriba, sugiriendo que esta asociación depende fuertemente de la estequiometría de las proteínas.

### 5.5 Interacción ciclina D5;3 y las CDKs

La ciclina D5;3 y la CDKA;1 forman complejos en todos los tiempos de germinación (**Figura 17**) y a semejanza de los complejos ciclina D4;2/CDKA, el complejo existe desde la semilla seca. La argumentación es por lo tanto semejante a la ya descrita párrafos arriba para la asociación ciclina D4;2/CDKA, aunque pareciera ser que la interacción de la ciclina D5;3 con la cinasa es más fuerte y duradera que con la CDKA;1, ya que no disminuye aún transcurridas 24 h. Ahora bien, dado que los anticuerpos contra la proteína CDKA;1 podrían estar reconociendo también a la CDKB;1, estos resultados habría que tomarlos con cautela. Se vuelve necesario separar los complejos formados por la ciclina con CDKA;1 de los formados con CDKB;1, mediante un ensayo de Pull Down o ensayos de competencia.

De manera interesante, la interacción de ciclina D5;3 con la CDKB;1 solo se observa hacia las 18 h de germinación (**Figura 18**), sugiriendo que este complejo podría estar funcionando en tiempos de germinación tardía, estando probablemente implicado en las fases G2-M del ciclo. Tanto la ciclina D5;3 como la CDKB;1 están presentes desde el tiempo cero, por lo que el hecho de que no aparezca señal de asociación en los tiempos tempranos podría indicar que la unión se impide porque alguna de las proteínas está compartimentalizada, o bien tiene que suceder una modificación en alguna de las proteínas que permita su asociación, la que solo se da hacia el final de la germinación.



## Interacción de las ciclinas D con CDKs durante la germinación en maíz

---

Lo que este resultado pareciera indicar es que esta ciclina, en conjunto con CDKB;1, está desempeñando una función importante para el paso hacia la mitosis, como ha sido reportado para *Arabidopsis thaliana* (Kono et al., 2003) y *Nicotiana tabacum* (Kawamura et al., 2005).

Ni la adición del IAA ni la modificaron el nivel proteico de la ciclina D5;3, comparando con el control durante la germinación. En general, los niveles de ciclina D5;3 en ejes embrionarios no cambian. De igual manera, los niveles y tiempos de asociación con CDK no cambian, reiterando que ciclina D5;3 y CDKB;1 solo están como complejo hacia las 18 h. Será fundamental ahora ver la actividad de cinasa asociada y el posible efecto que los fitorreguladores pudieran tener.

Finalmente los resultados indican que las ciclinas tipo D estudiadas forman complejos con CDKA;1, pero también forman complejos con CDKB;1; si comparamos los resultados de la interacción de la ciclina D4;2-CDKB;1 y los de la ciclina D5;3-CDKB;1, podríamos sugerir que las últimas con CDKB;1 podrían estar actuando como ciclinas mitóticas, aunque aún queda la duda de si estos complejos son activos.

## CAPITULO 6. CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvieron dos anticuerpos capaces de reconocer a la ciclina D4;2 y a la ciclina D5;3, de manera específica.
- ✓ Ambas ciclinas resultaron tener un comportamiento constante durante las horas estudiadas de la germinación.
- ✓ Se logró determinar la interacción entre las ciclinas D y las CDKs, de lo que resultó que:
  - ❖ Ambas ciclinas interaccionan con CDKA;1 durante la germinación, sin embargo, la interacción ciclina D4;2- CDKA;1 disminuye a partir de las 18 h, mientras que el complejo ciclina D5;3-CDKA;1 se mantiene constante hasta las 24 h.
  - ❖ La interacción de la ciclina D4;2 con la CDKB;1, se observa a lo largo de la germinación y disminuye a las 18 h; mientras que el complejo ciclina D5;3- CDKB;1 solo se observa en los tiempos 18 y 24 h.

Las ciclinas se unen diferencialmente con los dos tipos de CDKs

- ✓ La adición de hormonas como el IAA y el ABA no modifica los niveles de acumulación de las ciclinas D, a nivel de proteína, ni sus interacciones con las CDKs, en los tiempos germinativos estudiados.

## CAPITULO 7.PERSPECTIVAS

- Separar los complejos ciclinas D-CDKs, mediante inmunoprecipitados consecutivos o por la técnica de Pull-Down.
- Realizar los experimentos de actividad de cinasa para los complejos CDKA;1-ciclina D4;2 y D5;3 y los complejos CDKB;1-ciclina D5;3 y D4;2

## CAPITULO 8. BIBLIOGRAFIA

**Barroco, RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inzé D, Mironov V** (2003). Novel complexes of cyclin- dependent kinases and cyclin- like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol Life Sci* **60**: 401-412

**Bewley, J.D and Black, M.** (1994) Seeds. Physiology of development and germination, 2a edition, Plenum Press, New York, pp 8-213.

**V. Bryja V, Pacherník J, Vondrá J, Sou K., Cajánek L., Horvath V, Holubcová Z., Dvo P., and Hampl A.** (2008). Lineage specific composition of cyclin D–CDK4/CDK6–p27 complexes reveals distinct functions of CDK4, CDK6 and individual D-type cyclins in differentiating cells of embryonic origin *Cell Prolif.* **41**: 875–893

**Ching, T.M.** (1972). Metabolism of germination in seeds, In T. T. Kozlowski, Seed Biology, Vol. 3, Academic Press, New York, pp 115-117

**Cohen, JD** (1982). Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-aspartate from seeds of *Glycine max* L. *Plant Physiol* **70**: 749-753

**Criqui M. C. and Genschik P.** (2002). Mitosis in plants: how far we have come at the molecular level?. *Plant Biology*, **5**:487–493

**Deltour, R. and Jacquard, A.** (1974). Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L., *Ann. Bot.* **38**: 329

**De Veylder L, Engler JDA, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Mongagu MV, Engler G, Inzé D** (1999). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Plant* **208**: 453–462

**Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquard A, Kilby NJ, Murray JAH** (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**: 79–92

- Dyson N** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**: 2245-2262
- Ferreira, P. C. G., Hemerly, A. S., Villaroel, R., Van Montagu, M. and Inzé, D.** (1991). The Arabidopsis functional homologue of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. *Plant Cell* **3**: 531.
- Georgieva, E. I., López, G., Sendra, R., Grobne, P. and Loidl, P.** (1994). Histone acetylation in *Zea mays*. II. Biological significance of post- translational Histone acetylation during embryo germination, *J. Biol. Chem.*, **266**: 18751
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F y Vázquez-Ramos JM** (2005). Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol* **46**:166-73
- Hill AT** (1977). Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Ed. Omega, Barcelona
- Hutchison, C. and Glover, D. M.** (1995). Cell cycle control, 1a edition. Oxford University Press England. pp. 184- 213
- Inzé D, De Veylder L** (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J.** (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5**: 143-148
- Kaldis, P., Sutton, A. and Solomon, M. J** (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* **86**: 553.
- Karszen CM** (1968). The Light promoted germination of the seeds of *Chenopodium album* L. II. Effects of (RS) abscisic acid. *Acta Bot Neerl* **17**: 293-308
- Kawamura1 K., Murray J., Shinmyo A. and Sekine M.** (2006). Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. *Plant Mol. Biology* **61**:311–327

**Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Uchimiya H, and Umeda M.** (2003). Arabidopsis D-Type Cyclin CYCD4;1 Is a Novel Cyclin Partner of B2-Type Cyclin-Dependent Kinase. *Plant Physiology*, **132**: 1315–1321

**Kontopidis G, Wu S, Zheleva D, Taylor P, McInnes C, Lane D, Fischer P, and Walkinshaw D.** (2004). Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design. *PNAS* **102**:1871- 1876

**Krude, T., Jackman, M., Pines, J. and Laskey, R. A.** (1997). Cyclin / cdk- dependent initiation and DNA replication in a human cell- free system, *Cell* **88**: 109.

**La HG, Li J, Ji ZD, Cheng YJ, Li XL, Jiang SY, Venkatesh PN, Ramachandran S** (2006). Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa L.*). *Mol Genet Genomics* **275**: 374-386

**Lara-Núñez A, De Jesús N, Vázquez Ramos JM** (2008). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant* **132**: 79 – 88

**Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S. I. and Harlow, E.** (1992). Cyclin E/cdk2 and A/ cdk2 kinases associate with p107 and E2F in temporally distinct manner. *Genes Dev.* **6**: 1874

**Lees, E. M. and Harlow, E.** (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A in sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase, *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1194

**Martinez M.C, Jørgensen J.E, Lawton M.A, Lamb CJ, Doerner PW.** (1992). Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc Natl Acad Sci* **16** :7360-7364.

**Mayer, A.M. and Poljakoff, A.** (1975). The germination of seeds. 2a edition. Pergamon Press. pp. 21-26

**Mayoral Reyes Donají del Carmen y Vázquez Ramos Jorge.** (2009). Tesis de licenciatura. Estudio de la estabilidad de proteínas del ciclo celular en maíz.

**Menges M, Pavesi G, Morandini P, Bögre L, Murray JAH** (2007). Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins. *Plant Physiol* **145**: 1558-1576

**Miller CO, Skoog F, Okamura FS, Von Saltza MH, Strong FM** (1956). Isolation structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J Am Chem Soc* **78**: 1375-1380

**Mironov V, De Veylder L, Montagu M, Inzé D** (1999). Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants The Nexus. *Plant Cell* **11**: 509–521

**Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A** (1999). Tobacco retinoblastoma- related protein phosphorylated by a distinct cyclin- dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* **18**: 243-252

**Oakenfull EA, Riou Khamlichi C, Murray J** (2002). Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Biol Science* **357**: 749.760

**Ormenese S ,Almeida J., De Groodt R., De Veylder, Inze D.,Jacqumard A.** (2004). Analysis of the Spatial Expression Pattern of Seven Kip Related Proteins (KRPs) in the Shoot Apex of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Bot.* **93**: 575- 580

**Orsbone, D.J.** (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Botanic.* **61**: 3568

**Quatrano RS** (1987). Plant hormones and their role in plant growth and development. Ed. PJ Davies, Nijhoff, Dordrecht, Hol., p. 494

**Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR** (2001). El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal –28

**Pines, J. and Hunter, T.** (1991). Human cyclins A and B are differentially located in the cell and undergo cell cycle- dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.*: **115**, 1

**Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutiérrez C** (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res* **27**: 3527-3533

**Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichhron, S.E.** (1992). Biology of plants, 5<sup>a</sup> edition, Worth publishers, New York, pp. 545-563

**Renauding, J. P., Colasanti, J., Rime, H., Yyuan, Z. and Sundaresan V.** (1994). Cloning of four cyclins from maize indicate that higher plant have three structurally distinct groups of mitotic cyclins, *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, **91**: 7375

**Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrel DA, Sundaresan V, Murray JAH** (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* **32**: 1003-1018

**Russell, P., and Nurse, P.** (1986). Cdc25 functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**: 145.

**Sánchez de Jiménez, Aguilar. E., R. and López,** (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochemistry Biophysics Res.* pp 99, 445

**Sherr CJ** (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551–555

**Sherr CJ** (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* **20**: 187 – 190

**Sherr CJ, Roberts JM** (2004) Living with or without cyclins and cyclindependent kinases. *Genes Dev* **18**: 2699–2711

**Simon, E. W** (1984) Early events in germination, in “Seed physiology V; II. Germination and reserve mobilization. Academic Press, Australia. pp 77

**Stals H. and Inzé D.** (2001). When plant cells decide to divide. *Plant Science* **6**: 359-364



**Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inzé D** (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 903–916

**Van Staden J** (1983). Seeds and cytokinins. *Physiol Plant* **58**: 340-346

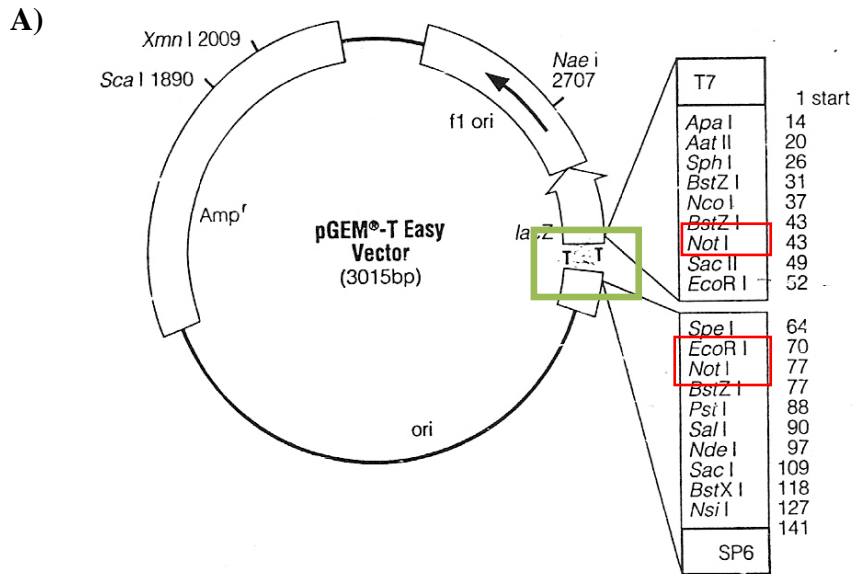
**Vázquez, R. J. and Osborne, D.J.** (1986). Chromatography analysis of the DNA synthesized during early germination of rye. *Mut. Res.*, **166**: 39

**Wang GF, Kong H.Z, Sun Y.J, Zhang X. H, Zhang W, Altman N, Depamphilis C.W, Ma H** (2004). Genome- wide analysis of the cyclins family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* **135**. 1084-1099

**Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D** (1992). D- type cyclins associate with multiple protein kinase and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**: 504

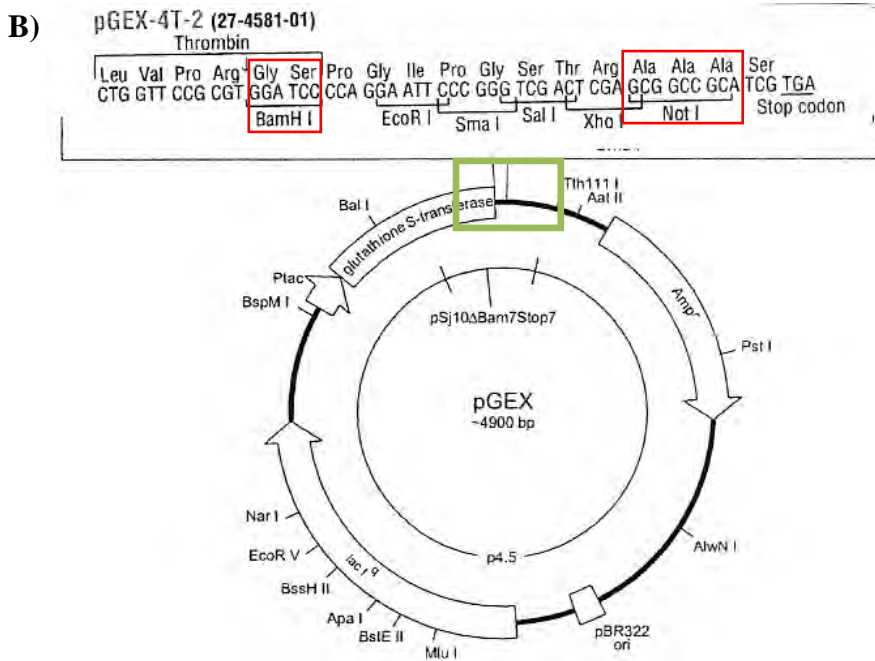
**Zlatanova, J. S. Ivanov, P.V Stoilov, L. M. Chimshirova, V. and Stanchev, B.** (1987). DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Mol. Biol.* **10**, 139.

ANEXO I



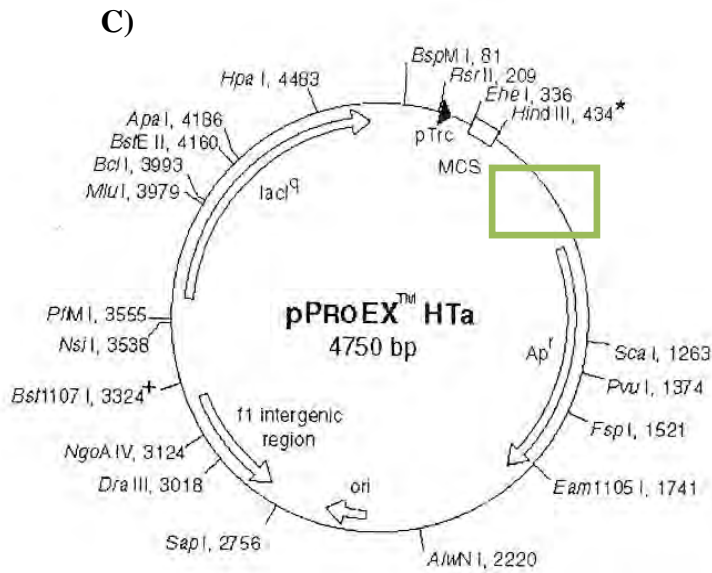
Lugar de inserción para los fragmentos de las ciclinas D

Figura A. Mapa de restricción y secuencia del vector de clonación pGEM-T Easy



Lugar de inserción para los fragmentos de las ciclinas D

Figura B. Mapa de restricción y secuencia del vector de expresión pGEX



Lugar de inserción para los fragmentos de las ciclinas D

Figura C. Mapa de restricción y secuencia del vector de

expresión pPROEX HTa

pProEX HTb

```

ACAGGAAACAGACC ATG TCG TAC TAC CAT CAC GAT CAC CAT CAC GAT TAC GAT ATC CCA ACG ACC GAA AAC CTG TAT TTT CAG** GGC GCC ATG GGA TCC
RBS met ser tyr tyr his his his his his asp tyr asp ile pro thr thr glu asn leu tyr phe gln gly ala me gly ser
(his), spacer region rTEV protease cleavage site
EcoR I Stu I Sal I Sst I Spe I Not I Nsp V Xba I Pst I Xho I Sph I*** Kpn I Hind III
GGA ATT CAA AGG CCT ACG TCG ACG AGC TCA CTA GTC GGG GCC GCT TTC GAA TCT AGA GCC TGC AGT CTC GAG GCA TGC GGT ACC AAG CTT GGC TGT
gly ile gln arg pro thr ser thr ser ser leu val ala ala ala phe glu ser arg ala cys ser leu glu ala cys gly thr lys leu gly cys
TTT GCC GGA TGA GAG AAG ATT TTC AGC CTG ATA CAG
phe gly gly stop
    
```