



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Influencia de la interacción *in vitro* de las proteínas recombinantes Ciclina ZmCycD6;1 y HsCKS1 en la actividad de cinasa de ZmCDKA;1/B1;1 sobre ZmpRb.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GRISelda NERI FLORES

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS**

VOCAL: **Profesor: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS**

SECRETARIO: **Profesor: NURIA VICTORIA SANCHEZ PUIG**

1er. SUPLENTE: **Profesor: SILVIA KARINA GODINEZ PALMA**

2° SUPLENTE: **Profesor: ELPIDIO GARCIA RAMIREZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jorge M. Vázquez Ramos _____

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

Dr. Elpidio García Ramírez _____

SUSTENTANTE (S):

Griselda Neri Flores _____

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por mi formación académica y profesional.

Al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos por su asesoría y apoyo durante la realización del proyecto y la revisión del escrito.

Al Dr. Elpidio García Ramírez por su paciencia, apoyo, confianza y libertad que me tuvo en el desarrollo del proyecto; por su valiosa amistad.

A la Dr. Aurora Lara Nuñez por sus consejos y conocimientos que enriquecieron notablemente el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del H. Jurado, Dr. J. Eleazar Martínez Barajas, a la Dr. Nuria Victoria Sánchez Puig y a la Dr. Silvia Karina Godínez Palma por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus comentarios que mejoraron el mismo.

A el financiamiento para la realización de los experimentos por parte de Conacyt (CB220661) y Conacyt infraestructura (252001), PAIP (5000-9130), PAPIIT (IA201814) y PAIP (5000-9124).

Al subprograma 127 "Formación básica en investigación" por el estímulo económico de Ayudante de profesor de asignatura.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
FIGURAS	4
TABLAS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. El maíz.....	7
1.1.1. Características del maíz.....	8
1.1.2. Estructura del grano de maíz.....	9
1.2. Ciclo celular.....	11
1.2.1. Regulación del ciclo celular.....	14
1.2.2. Cinasas dependiente de ciclinas (CDKs).....	15
1.2.3. Ciclinas.....	17
1.2.3.1. Regulación de la transición G1/S.....	21
1.2.3.2. Ciclina D6;1.....	22
1.2.4. Subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS).....	23
1.3. Importancia del estudio de las interacciones proteicas <i>in vitro</i>	28
2. ANTECEDENTES	30
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPOTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1. Objetivo general.....	34
5.2. Objetivos particulares.....	34
6. MATERIALES Y METODOLOGIA	35
6.1. Material biológico.....	35
6.2. Metodología.....	35
6.2.1. Sobreexpresión de proteínas recombinantes.....	35
6.2.2. Cromatografía de afinidad de las proteínas control.....	36
6.2.3. Interacción <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes.....	37
6.2.4. Interacción <i>in vitro</i> de ZmCDKA;1, ZmCycD6;1 y HsCKS1.....	38

6.2.5. Purificación de la proteína cinasa activadora de CDK monomérica de <u>S. cerevisiae</u> (scCAK1) y el extremo carboxilo de la proteína del retinoblastoma de maíz (ZmpRb).....	38
6.2.6. Ensayo de actividad de cinasa por Phos-Tag SDS-PAGE.....	39
6.3. Técnicas generales.....	39
6.3.1. Electroforesis de proteínas.....	39
6.3.2. Western blot.....	40
7. RESULTADOS	42
7.1. Técnica de interacción <i>in vitro</i>	42
7.2. Controles de la técnica de interacción <i>in vitro</i>	43
7.3. Controles de interacciones <i>in vitro</i> inespecíficas.....	44
7.4. Interacción <i>in vitro</i> con GST-ZmCDKA;1, SSP-ZmCycD6;1, SSP-ZmHsCKS1.....	45
7.5. Interacción <i>in vitro</i> entre GST-ZmCDKB1;1, MBP-ZmCycD2;2, SSP-ZmCycD6;1, SSP-HsCKS1	46
7.6. Formación de complejos ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 en función de la concentración de ZmCycD6;1	48
7.7. Formación de complejos ZmCycD6;1-HsCKS1 en función de la concentración de ZmCycD6;1 y HsCKS1.....	48
7.8. Formación de complejos ZmCDKA;1-HsCKS1 y ZmCDKA-ZmCycD6;1-HsCKS1 en función de la concentración de HsCKS1.....	49
7.9. Purificación de la proteína de activación de CDKA;1 (scCAK1) y proteína sustrato (ZmpRb).....	51
7.10. Ensayo de actividad de cinasa por Phos-tag.....	52
8. DISCUSION	54
8.1. Técnica de interacción <i>in vitro</i>	54
8.2. Interacción de ZmCDKA;1-ZmCycD6;1, ZmCDKA;1-HsCKS1 y ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1.....	55
8.3. Formación de complejos ZmCDKA;1-ZmCycD6;1, ZmCDKA;1-HsCKS1 y ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1	57
8.4. Actividad de los complejos.....	58
9. CONCLUSIONES	60

10. PERSPECTIVAS	60
11. REFERENCIAS	61
12. APENDICE	70

RESUMEN

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas con material genético idéntico. En momentos concretos del ciclo, la célula comprueba que se cumplan las condiciones para pasar a la etapa siguiente; de este modo, si no se cumplen estas condiciones, el ciclo se detiene. Existen cuatro transiciones principales: G0 a G1 (comienzo del crecimiento), G1 a S (iniciación de la replicación), G2 a M (iniciación de la mitosis) y el avance de metafase a anafase. Para realizar esta regulación existen muchos genes que ayudan a controlar positiva o negativamente este proceso, algunos de estos genes codifican proteínas reguladoras del ciclo celular como: CDKs (Cyclin Dependent Kinase, por sus siglas en inglés), ciclinas, KRPs (Kip Related Protein, por sus siglas en inglés) y CKSs (subunidad reguladora de CDKs).

Las CDKs son proteínas cinasas que forman, junto con las ciclinas, un heterodímero funcional altamente regulado por otros moduladores, aparte de las ciclinas, como son CAK (cinasa activadora de CDK), CKI (Inhibidores de cinasas dependientes de ciclina), fosforilaciones inhibitorias y CKS. De todos estos moduladores, CKS es uno de los más peculiares por las funciones tan variables que ha mostrado en varios sistemas.

Por otro lado, las ciclinas tipo D actúan principalmente durante la fase G1 y en la transición hacia la fase S mediante la vía de pRb y constituyen un sensor de las condiciones extracelulares que permitan la proliferación celular.

En nuestro laboratorio, uno de nuestros objetivos principales es saber cómo se regula el ciclo celular principalmente en la interfase G1-S en maíz. Por lo tanto, en el presente trabajo se sobreexpresaron proteínas recombinantes de maíz que están involucradas en este proceso, se analizaron las interacciones *in vitro* de algunos de estos actores con lo que se determinó que: 1) HsCKS1 interactúa con ZmCDKA;1 pero no con ZmCDKB1;1; 2) ZmCycD6;1 estimula la interacción ZmCDKA;1-HsCKS1; asimismo se determinó que 3) la presencia de HsCKS1 en el complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1 aumenta la actividad de cinasa ocasionando la hiperfosforilación sobre Zm-pRb, proteína blanco de CDKs en la transición G1-S.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclina
CEI	Células iniciales de corteza y endodermis.
Cyc	Ciclina
CycD	Ciclina tipo D
GST	Glutación S-Transferasa
GST-ZmpRb	Extremo carboxilo de la proteína del retinoblastoma de maíz unido a la glutación-S-transferasa
His	Histidinas
HsCKS1	Subunidad reguladora 1 de CDK de Humano
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
kDa	Kilodaltones
KRP	Kip Related Protein
LB	Luria-Bertani
MBP	Proteína de Unión a Maltosa
PBS	Buffer de fosfato salino
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
Rpm	Revoluciones por minuto
scCAK1	Cinasa activadora de CDK monomérica de <u><i>S. cerevisiae</i></u> .
SCR	Factor transcripcional SCARECROW
SHR	Factor transcripcional SHORT-ROOT
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SSP	Proteína Sustrato de Subtilisina
SSP-CycD6;1	Proteína recombinante ciclina D6;1 con etiqueta de Proteína Sustrato de Subtilisina
SSP-HsCKS1	Proteína recombinante HsCKS1 con etiqueta de Proteína Sustrato de Subtilisina
Zm	<i>Zea mays</i> (maíz)

FIGURAS

Figura 1.- Planta de maíz, *Zea mays* ssp.

Figura 2.- Secciones verticales de la semilla de maíz madura.

Figura 3.- Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control.

Figura 4.- Representación esquemática de los mecanismos de regulación de la actividad de CDKs.

Figura 5.- Modelo propuesto para la regulación de la transición G1/S del ciclo celular en plantas.

Figura 6.- Alineamiento de secuencias proteicas de p13^{suc1} y CKSs.

Figura 7.- Esquema de dos diferentes funciones de CKS.

Figura 8.- Modelo de la estructura cristalográfica de HsCKS1.

Figura 9.- Módulos CDK-ciclina extraídos del interactoma.

Figura 10.- Esquema general de la técnica para las interacciones *in vitro*.

Figura 11.- Solo GST-ZmCDKA;1 y GST-ZmCDKB1;1 se anclan a la resina glutatión-agarosa. Inmunodetección de la afinidad de GST-ZmCDKA;1, GST-ZmCDKB1;1, SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1 a la resina glutatión-agarosa.

Figura 12.- No existen interacciones inespecíficas de la etiqueta GST con las proteínas SSP-ZmCycD6;1 o SSP-HsCKS1, ni existe interacción de GST-ZmCycD6;1 con SSP-HsCKS1.

Figura 13.- Existe una mayor interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-HsCKS1 cuando está presente SSP-ZmCycD6;1. Inmunodetección de interacciones de GST-ZmCDKA;1 con SSP-ZmCycD6;1 y/o SSP-HsCKS1.

Figura 14.- GST-ZmCDKB1;1 no interactúa con SSP-HsCKS1 en ausencia o presencia de SSP-ZmCycD6;1. Inmunodetección de interacciones de GST-ZmCDKB1;1 con SSP-ZmCycD6;1 y/o SSP-HsCKS1.

Figura 15.- Formación del complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 en función de la concentración de ZmCycD6;1.

Figura 16.- ZmCycD6;1 no interacciona con HsCKS1.

Figura 17.- La interacción de ZmCDKA-HsCKs1 aumenta cuando está presente ZmCycD6;1 aun en condiciones de variación de volúmenes.

Figura 18.- Purificación de scCAK1. Inducción y purificación de scCAK1 por resina de amilosa y resina de Niquel-NTA.

Figura 19.- Purificación de GST-ZmpRb. Inducción y purificación de GST-ZmpRb por resina glutatión agarosa.

Figura 20.- Esquema del fundamento de la técnica de Phos-tag (Modificado de Wako, Phos-Tag™ series, NARD).

Figura 21.- HsCKs1 estimula la hiperfosforilación de GST-ZmpRb (complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1.HsCKs1). Ensayo de actividad por Phos-tag.

Figura 22.- Comparación de las secuencias primarias deducidas de cDNAs de ZmCKs1, ZmCKs2, HsCKs1 y HsCKs2.

Figura 23.- Determinación de identidad entre ZmCKs1 y 2 vs HsCKs1 y 2.

Figura 24.- No hay patrón diferencial de corrimiento de ZmpRb en geles de Bis-tris sin Phos-tag.

Figura 25.- Existe un patrón de corrimiento diferencial de GST-ZmpRb con Phos-tag en presencia y ausencia de CAK cuando están presentes los complejos.

Figura 26.- Dominios de la proteína Rb.

TABLAS

Tabla 1.- Clasificación taxonómica del maíz de acuerdo al USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

Tabla 2.- Tipos de ciclinas y sus características.

Tabla 3.- Proporción de volumen re suspendido en PBS y el volumen de medio LB inducido.

... Tierra desnuda, tierra despierta, tierra maicera con sueño, el Gaspar que caía de donde cae la tierra, tierra maicera bañada por ríos de agua hedionda de tanto estar despierta, de agua verde en el desvelo de las selvas sacrificadas por el maíz hecho hombre sembrador de maíz... (Asturias, 1949).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El maíz

Maíz, arroz y trigo, son los cultivos más abundantes en el mundo, pero en relevancia, el maíz es el primero en cuanto a volumen de producción. Desde hace cincuenta años, la extensión y volumen de producción del grano mesoamericano ha ido en aumento, y de seguir así, se convertirá en el grano más importante del planeta, lo cual se debe a la gran cantidad de productos que se obtienen de este, tanto para la alimentación humana y animal, como para uso industrial.

En cuanto a su aprovechamiento, todas las partes del maíz son utilizadas: el jugo de su caña verde se usa para preparar bebidas fermentadas; las hojas sirven para envolver tamales; los elotes se comen asados, en esquites, sopas y otros guisos. Otros de sus usos son en la medicina tradicional, en la industria como fuente de materia prima y es también motivo e inspiración de expresiones artísticas y artesanales.

Por otra parte, el maíz también ha adquirido importancia como modelo biológico ya que tiene una larga historia de desarrollo de herramientas de genética y genómica y es considerado uno de los sistemas de plantas superiores más accesibles. Con el genoma secuenciado en su totalidad, un conjunto de herramientas citogenéticas, métodos como la genética inversa, el maíz puede ser objeto para estudiar aspectos más allá de la biología vegetal (Nannas and Dawe 2015). Además es fácil cultivarlo en cualquier escala, desde pocas plantas en macetas a hectáreas; se puede cultivar con éxito todo el año en invernaderos y cámaras de crecimiento con iluminación

adecuada; también es muy resistente y se puede cultivar al aire libre bajo una serie de condiciones, desde climas tropicales a climas templados (Shaw 1988).

1.1.1. Características del maíz

Nombre común: MAÍZ. El nombre proviene de Antillas, pero en México, los nahuas denominaron *centli* a la mazorca y *tlaoilli* al grano (Armenta 2007).

Tabla 1.- Clasificación taxonómica del maíz de acuerdo al USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) (<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ZEMA>)

Reino	Plantae (Plantas)
Subreino	Tracheobionta (Plantas Vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (Plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (Planta con flores)
Clase	Liliopsida (Monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Nombre científico (género y especie)	<i>Zea mays</i>

El maíz es una planta de grano grande que evolucionó a partir de sus ancestros silvestres de hierba por la intervención directa de la agricultura humana. Muchas variedades o "razas" difieren en propiedades físicas (Goodman y Brown 1988), pero en general el maíz es una planta que crece aproximadamente 8 pies de altura con unas 20 hojas largas y estrechas de crecimiento individual de los nodos a lo largo del tallo (Kiesselbach 1999). Del tallo nacen dos o tres inflorescencias muy densas o mazorcas envueltas en espigas, en cada mazorca se ven las filas de granos, cuyo número puede variar de 8 a 30 granos, a cada grano le corresponde un largo hilo sedoso que sobresale por el extremo de la mazorca. El tallo de la planta está rematado en el extremo por una gran panoja de pequeñas flores masculinas (Figura 1).



Figura 1.- Planta de maíz, *Zea mays* ssp. (Modificada de Nannas and Dawe 2015).

1.1.2. Estructura del grano de maíz

Los granos de maíz son cariósides desnudas, cuyas partes fundamentales son el Pericarpio, el Endospermo y el Germen (Ospina 2002). El pericarpio constituye la parte externa del grano, siendo el 5-6% del total del peso del grano y está dividido en cuatro capas delgadas las cuales son:

- 1) El epicarpio que es la capa externa que cubre el grano y está conformado por células de paredes gruesas.
- 2) El mesocarpio que son capas constituidas por pocas células siendo la capa externa la más gruesa similar a la del epicarpio, mientras las células de las capas internas son planas, de paredes delgadas.
- 3) Células cruzadas. Son capas de células de paredes delgadas, con muchos espacios intercelulares.
- 4) Células tubulares. Son capas de células largas paralelas, sin ramificaciones.

El Endospermo representa aproximadamente el 80% del total del peso del grano y está compuesto por tres capas:

- 1) Capa de Aleurona. De una sola célula, contiene proteínas, aceites, minerales y vitaminas.
- 2) El Endospermo Córneo. Formado por células de forma irregular y alargadas y
- 3) El Endospermo Harinoso que se localiza en la parte central del grano; está constituido por células grandes en relación a las otras células que componen el endospermo.

El Embrión o Germen representa entre el 8 y el 12% del peso del grano y está conformado por el:

- 1) Escutelo que es el órgano encargado de la alimentación del embrión en el momento de su germinación.
- 2) Eje embrionario: conformado por una plúmula que posee de cinco a seis hojas y una radícula (Figura 2).

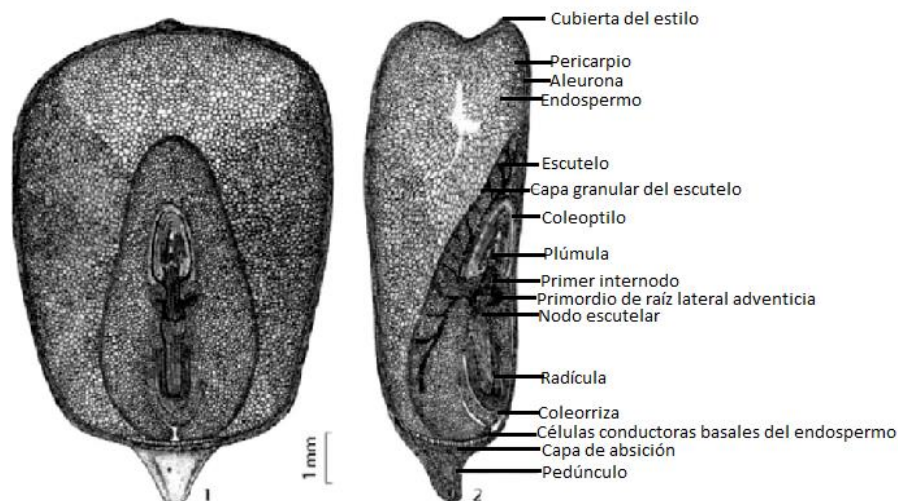


Figura 2.- Secciones verticales de la semilla de maíz madura vista 1) de frente y 2) perfil (Modificado de Kiesselbach, 1999).

Uno de los procesos más importantes para que una planta continúe su ciclo de vida es la germinación de la semilla. Por definición la germinación comienza con la toma de agua y termina con la aparición de la radícula a través de la envoltura de la semilla (Nonogaki *et al.*, 2010). Sin embargo para nuestro modelo de estudio definimos a la germinación como la serie de eventos bioquímicos que llevan a la célula a la culminación exitosa del primer ciclo celular completo y a la multiplicación celular restante (Vázquez Ramos, 1990).

1.2. Ciclo celular

El ciclo celular tiene un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de todos los organismos (Dewitte and Murray, 2003). En las plantas, el ciclo celular es un proceso altamente ordenado por el que, a partir de la proliferación celular, se lleva a cabo la culminación de la germinación de una semilla para la formación de una plántula y su posterior desarrollo dirigido a la creación de todas aquellas estructuras requeridas para la generación de una nueva planta, por lo que la proliferación debe coordinarse de manera exacta y continúa con la diferenciación celular (Godínez and Vázquez, 2013).

La función básica del ciclo celular es la de duplicar en forma exacta el DNA cromosómico y luego distribuir las copias en dos células hijas genéticamente iguales así como asegurar que el proceso se realice de forma regulada para la correcta generación de sistemas complejos como lo son los sistemas celulares.

La duración del ciclo celular varía de manera significativa en distintos tipos celulares. Una levadura unicelular puede dividirse cada 90-120 minutos en condiciones ideales, mientras que una célula hepática de mamífero se divide en promedio menos

de una vez por año. En maíz, nuestro grupo de trabajo ha reportado que a 25°C, en oscuridad, el ciclo celular se reactiva durante las primeras 6 horas posteriores a la imbibición, mientras que fase S comienza cerca de las 12 horas y alrededor de las 28 a 32 horas después de la imbibición se observan células en fase M coincidiendo esto con la protrusión de la radícula (Baíza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991; Herrera *et al.*, 2000).

Antes de la repartición en partes iguales del material genético se presentan varios procesos bioquímicos como la duplicación del DNA, la síntesis de histonas y otras proteínas asociadas con el DNA en los cromosomas y se produce una reserva adecuada de organelos para las dos células hijas. Los procesos anteriormente mencionados ocurren durante la interfase que, a su vez, se divide en tres etapas:

G1 es un periodo de crecimiento general y duplicación de los organelos citoplasmáticos. En las células que tienen centriolos, estas estructuras comienzan a separarse y a duplicarse. Durante la etapa temprana de la fase G1 se revisa el estado metabólico de la célula antes de avanzar hasta una etapa de compromiso en el ciclo, definida por un punto en el que la célula "decide" si se compromete o no a completar el ciclo celular.

Fase S es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación del ADN, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas.

En la fase G2 comienzan a ensamblarse las estructuras directamente asociadas con la mitosis y la citocinesis. Los cromosomas recién duplicados, dispersos en el

núcleo en forma de filamentos de cromatina relajada, comienzan a enrollarse lentamente y condensarse. La duplicación del par de centriolos se completa y los cuatro centriolos maduros, ubicados justo por fuera de la envoltura nuclear se acomodan uno perpendicular de otro.

En la Fase M o mitosis se produce la segregación de los componentes intracelulares en dos células hijas. Consta de varias etapas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis.

- Profase: condensación de la cromatina, desorganización de algunos orgánulos. Prometafase: desensamblaje de la envoltura nuclear.
- Metafase: ordenación de los cromosomas en la placa ecuatorial, una región equidistante entre los dos centrosomas del huso mitótico.
- Anafase: separación de las cromátidas y migración hacia los centrosomas.
- Telofase: descondensación de las cromátidas y reorganización de la envoltura nuclear.
- Citocinesis: formación del surco de escisión y separación de los citoplasmas de las dos células hijas (Alberts, 2002) (Figura 3).

Es importante enfatizar que muchas actividades características de la célula siguen ocurriendo durante todo el ciclo celular como actividades que consumen energía. Así, en todo momento, la célula está sintetizando algunas macromoléculas y degradando otras, regulando la entrada de algunas sustancias y la salida de otras, controlando su movimiento interno y, a la vez, respondiendo a una variedad de

estímulos. Por lo anterior la regulación del ciclo celular es determinante para el éxito de la división celular.

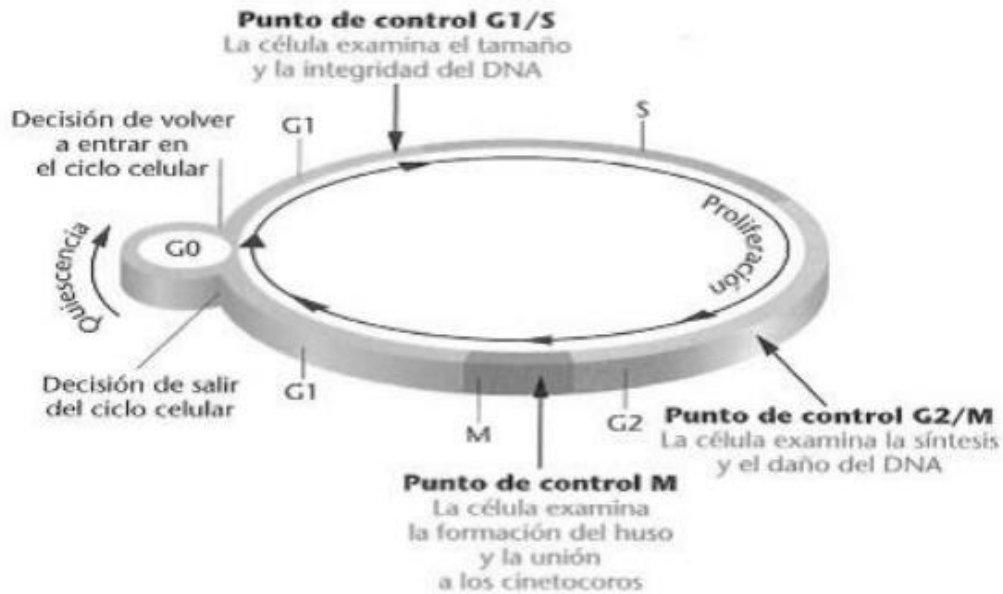


Figura 3.- Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control (Klug and Cummings, 1999).

1.2.1. Regulación del ciclo celular

El sistema de control del ciclo celular se da mediante la activación y la inactivación de proteínas y complejos proteicos que inician o regulan la replicación del DNA, la mitosis y la citocinesis.

La fosforilación representa uno de los métodos utilizados con mayor frecuencia por las células para estimular o inhibir la actividad de una proteína. Las reacciones de fosforilación que controlan el ciclo celular son ejecutadas por un conjunto específico de proteínas cinasas de Ser/Thr, conocidas como Cinasas Dependientes de ciclina (CDKs). Las CDKs son enzimas que transfieren un grupo fosfato de una molécula

de ATP a una cadena lateral del aminoácido de la proteína diana y son activadas mediante su asociación con proteínas reguladoras conocidas como ciclinas (Cyc).

1.2.2. Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs)

En plantas las CDKs se han agrupado en 8 tipos: CDKA-CDKG y CKL de acuerdo a su motivo de unión a Ciclinas (Dénes *et al.*, 2007), de las cuales las más estudiadas son las CDKA y CDKB. Las primeras descripciones de CDKs se realizaron en *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*. La CDK se describió como una proteína de 34 kDa (CDC2/CDC28), la cual presenta un motivo PSTAIRE (el motivo central en la interacción de la CDK con su subunidad reguladora ciclina) en el sitio de unión a las ciclinas, motivo que se encuentra conservado en las CDKs 1 y 2 de mamíferos. En plantas, CDKA es semejante a CDK1 en estructura terciaria y también presenta el motivo PSTAIRE. A semejanza de levaduras y diferencia de las células de mamíferos, la CDKA regula la progresión de G1 a S y también de G2 de M, asociada a diferentes ciclinas conforme progresa el ciclo celular (Vázquez-Ramos, 2006; Godinez-Palma *et al.*, 2013).

La CDKB es exclusiva de plantas y no se ha reportado homólogo en ningún otro tipo de eucariontes. En *Arabidopsis*, CDKB se ha clasificado en dos grupos, cada uno con dos miembros: CDKB1;1, CDKB1;2, CDKB2;1 y CDKB2;2 (Vandepoele *et al.*, 2002). El subgrupo de CDKB1 contiene el motivo de unión a Cyc PPTALRE y estudios realizados en Alfalfa, Tabaco y *Arabidopsis*, muestran que se expresa desde la fase S hasta la mitosis. En maíz la presencia de la proteína CDKB1;1 se ha reportado desde tiempo 0h hasta 24 h de germinación (Godinez-Palma *et al.*, 2013). Por otra parte, el subgrupo de CDKB2 se caracteriza por tener el motivo de

unión a Cyc P(S/P)TTLRE y estudios realizados en alfalfa y *Arabidopsis*, muestran que se expresa solo durante la transición G2/M (Fobert *et al.*, 1996; Magyar *et al.*, 1997; Sorrell *et al.*, 2001). En diferentes estudios, se ha visto que la actividad de cinasa de CDKB1 y CDKB2 se limita a la transición de G2/M (Fobert *et al.*, 1996; Porceddu *et al.*, 2001; Sorrell *et al.*, 2001).

La actividad de las CDKs se regula a múltiples niveles (Figura 4). La CDK monomérica carece de actividad hasta que forma un complejo heterodimérico con una ciclina (Cyc). Además, las CDKs también se activan por la fosforilación en una Thr conservada por CAK (Cinasa activadora de CDK) (Revisado por Dewitte and Murray, 2003). Por tanto, la actividad de CDKs puede ser regulada por: la abundancia de ciclinas, modificaciones postraduccionales, la localización intracelular, la destrucción regulada, o por la actividad regulada de CAK. Además, la actividad de CDKs puede ser inhibida por la fosforilación en Thr14 o Tyr 15, llevada a cabo por la cinasa Wee1. Esta fosforilación catalizada por Wee1 ha sido reportada en maíz y *Arabidopsis* (Sun *et al.*, 1999; Sorrell *et al.*, 2002). Otros mecanismos de control son la asociación de las CDKs, ya sea con proteínas inhibitorias de su actividad (KRPs) que pueden bloquear el loop por donde entra el ATP que usa la CDK para fosforilar la proteína blanco (Revisado por Dewitte and Murray, 2003); o bien con CKS, una proteína de andamiaje que tienen influencia directa sobre la fosforilación (y/o hiperfosforilación) del sustrato (McGrath *et al.*, 2013).

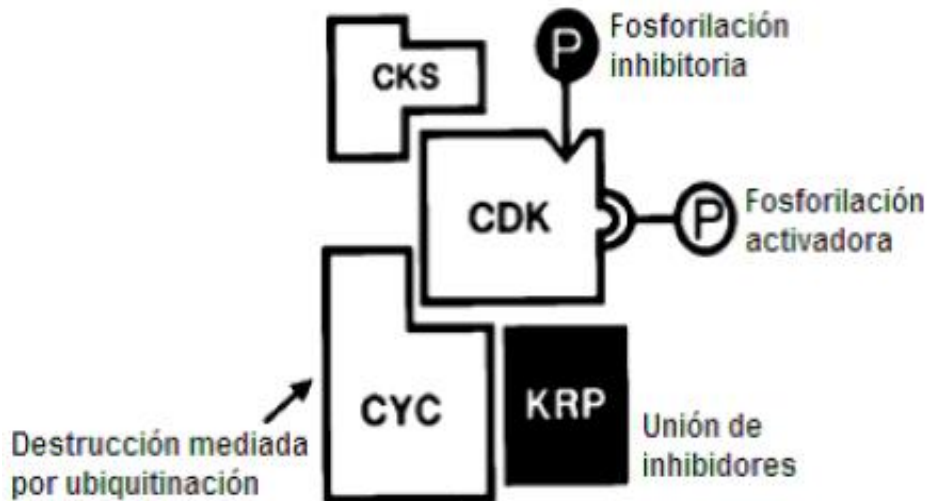


Figura 4.- La actividad de CDKs está regulada en múltiples niveles. CDK carece de actividad hasta que forma un complejo con las ciclinas y es activada por CAK; por otra parte esta actividad puede ser inhibida por fosforilaciones llevadas a cabo por la cinasa Wee1 o por unión de proteínas inhibitorias (KRP), asimismo CDKs pueden interactuar con CKS una proteína de andamiaje que tienen influencia directa sobre la fosforilación del sustrato (Modificado de Dewitte and Murray, 2003).

1.2.3. Ciclinas

Las ciclinas se denominan de esta manera porque, a diferencia de las CDKs, sus concentraciones varían en forma periódica durante el ciclo celular. Las alteraciones cíclicas de las concentraciones de ciclinas contribuyen a la formación y la activación de los complejos CDK-ciclina; a su vez, la activación de estos complejos desencadena la progresión del ciclo celular.

El descubrimiento e identificación de las ciclinas en 1983, utilizando huevos de erizos de mar, fue el primer paso para el entendimiento de los mecanismos de control de la actividad de las CDKs que conducen el ciclo celular (Evans *et al.*, 1983; Novack *et al.*, 1998). Las ciclinas son una familia de proteínas que tienen una región conservada de 250 aminoácidos, llamada centro de ciclina o caja ciclina, la cual a

su vez está constituida por dos dominios: el dominio ciclina amino y el dominio ciclina carboxilo (Nugent *et al.*, 1991).

El dominio ciclina amino es el que define a las ciclinas por ser el más conservado entre ellas, además posee 5 aminoácidos no continuos altamente conservados que son esenciales para el plegamiento y función de ciclinas mitóticas (ciclinas tipos A y B) y que también están presentes en las ciclinas D (Menges *et al.*, 2007). Por otra parte, el dominio ciclina carboxilo es menos conservado y está presente en muchas, pero no en todas las Cyc, lo que sugiere una función específica pero no crítica para el desempeño de las ciclinas (Wang *et al.*, 2004). Además de los dominios amino y carboxilo, las ciclinas tipos A y B tienen un motivo denominado “caja de destrucción”, lo que les permite ser reconocidas y degradadas por el complejo promotor de la anafase (APC). Adicionalmente, las ciclinas tipo D poseen cajas PEST que las marca para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma (Revisado por Dewitte and Murray, 2003).

En el genoma humano existen 22 genes de ciclinas que se agrupan con base en el análisis de su función y secuencia de aminoácidos (Nakamura *et al.*, 1995; Pines, 1995). Estos grupos son A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, T y UNG2, y sólo 5 de ellos (A, B, C, H, L) están presentes en plantas, aunque el grupo C solo se ha encontrado en *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2004). Por otro lado, existen tipos de ciclinas que solo se encuentran en plantas, como las ciclinas tipo D que aunque se denominan igual que las ciclinas D de animales, forman un grupo filogenético distinto y no muestran homología de secuencia entre ellas (excepto por un motivo muy conservado en la región N-terminal que las caracteriza), aunque si poseen

funciones similares, al menos molecularmente, mientras que, fisiológicamente esto aún no queda claro. Asimismo la ciclina tipo T que está relacionada igualmente con las ciclinas T, H y L de humanos, no son ortólogos y forman un grupo diferente, lo mismo que las ciclinas F, las cuales aparentemente se encuentran exclusivamente en monocotiledóneas (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006). Otras ciclinas específicas de plantas son SDS, J18 y U (Azumi *et al.*, 2002). Entre las ciclinas que más se han estudiado en plantas tenemos:

Tabla 2.- Tipos de ciclinas y sus características

Tipo de ciclina	Sistema de estudio	Características	Referencia
A (A1, A2, A3)	<i>Arabidopsis</i> , arroz, tabaco y maíz.	CycA3 se expresa durante la transición G1/S y la fase S; mientras que las CycA1 y CycA2 muestran un pico de expresión durante la transición G2/M. La actividad de cinasa asociada a CycA de <i>Arabidopsis</i> , tiene un máximo de actividad durante las fases S y G2. En el desarrollo del endospermo en maíz, la actividad de cinasa asociada a CycA1 fue mayor durante la etapa mitótica.	Renaudin <i>et al.</i> , 1996; Wang <i>et al.</i> , 2004; Reichheld <i>et al.</i> , 1996; Menges <i>et al.</i> , 2005; Dante <i>et al.</i> , 1990

B (B1, B2, B3)	Suspensiones celulares sincronizadas de <i>Arabidopsis</i>	La expresión de la <i>CycB</i> aparece durante la fase S, tiene un aumento en G2 y una máxima expresión durante la mitosis temprana, posteriormente una rápida disminución conforme avanza la mitosis	Renaudin et al., 1996; Vandepoele et al., 2002; Hirt et al., 1992; Beeckman et al., 2001; Menges et al., 2002
D	Identificadas por rescatar la función de cepas mutantes carentes de Cyc de fase G1 en levaduras	Tienen un motivo conservado LxCxE, el cual se localiza cerca del N-terminal de la proteína y es responsable de la interacción con la proteína relacionada al retinoblastoma (pRb). Este dominio se encuentra en casi todas las CycsD, excepto en la CycD6;1. Su expresión en plantas es dependiente de las condiciones externas y responde a factores de crecimiento, hormonas y nutrimentos.	Dahl et al., 1995; Buendía-Monreal et al. 2011

El papel biológico de las CycsD todavía no es claro, sin embargo, se ha propuesto que estas proteínas son de las primeras moléculas en “percibir” las condiciones externas antes de dar inicio a los eventos replicativos de las células en plantas. Por

lo tanto, se cree que son mediadores del control de la transición G1-S (Boniotti and Gutierrez 2001; De Jager *et al.*, 2005; Uemukai *et al.*, 2005; Menges *et al.*, 2006).

1.2.3.1. Regulación de la transición G1-S

Aunque no se han encontrado homólogos de las ciclinas E en plantas, fundamentales en la transición G1-S en animales, las ciclinas tipo A o quizá algunas del tipo D podrían participar en la regulación de la transición G1-S y de G2-M del ciclo celular (Wen-Hui Sen, 2001).

Se ha propuesto un modelo del control de la transición G1-S en el ciclo celular en el cual las ciclinas tipo D (CycD) son los mediadores primarios de la transición y tienen la función de estimular el avance del ciclo celular. Durante la fase G1, la proteína pRb se encuentra en su forma activa (hipofosforilada) y puede unirse a activadores transcripcionales de la familia de E2F, dando como resultado la formación de un complejo que reprime la transcripción de genes blanco para E2F determinantes para el establecimiento de la fase S. Conforme avanza la fase G1, pRb es fosforilada secuencialmente por diferentes complejos CDK-ciclina tipo D, inactivándola y finalmente liberando a E2F para activar genes requeridos para el avance del ciclo celular (Figura 5)(Revisado por Colli *et al.*, 2007).

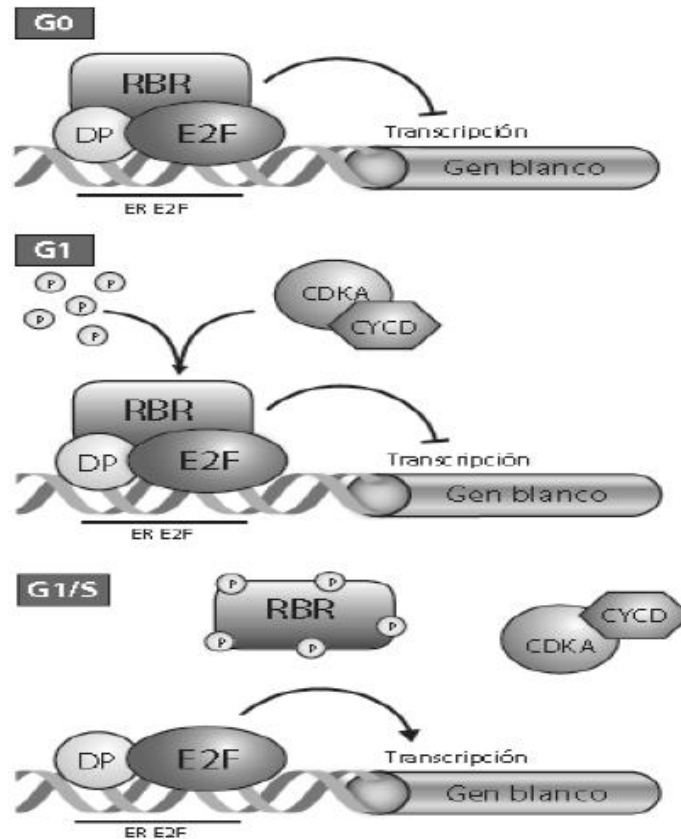


Figura 5.- Modelo general de la regulación en la interfase G1-S de ciclo celular en eucariotes (Modificado de Nugent, 1991).

1.2.3.2. Ciclina D6;1

La *CycD6;1* es el único miembro del subgrupo de genes *CycD6* en maíz y genómicamente tiene una organización típica de las ciclinas D que consiste en 6 exones y 5 intrones. La única característica que la distingue de las demás ciclinas es que carece del motivo de unión a pRb (LXCXE). Sin embargo, al igual que otras ciclinas, *CycD6;1* es regulada por fitohormonas al menos a nivel de mRNA durante la germinación de ejes embrionarios. En presencia de benciladenina (una citocinina), los niveles de transcrito decrecen al inicio pero se reestablecen hacia las 16 horas postimbibición. Mientras que con ácido abscísico su expresión se inhibe significativamente durante el proceso germinativo (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

En cuanto a la función de CycD6;1 de *Arabidopsis thaliana*, se sabe que guía la fosforilación de pRb específicamente en las células iniciales de corteza y endodermis (CEI) del nicho de células madre del meristemo apical de la raíz, el cual es el tejido meristemático cuyas divisiones originan las células que, tras diferenciarse, forman los tejidos adultos de la raíz (el parénquima y los tejidos vasculares).

De forma análoga al mecanismo descrito anteriormente para la inhibición de E2F, pRb también se encuentra reprimiendo el dímero de factores transcripcionales SCARECROW (SCR) y SHORT-ROOT (SHR). Cuando el complejo CycD6;1-CDKB1;1 fosforila a pRb, se promueve la actividad de SCR-SHR, lo cual provoca la división celular asimétrica de la CEI y posteriormente de la CEID (CEI daughter cell, por sus siglas en inglés) para dar origen a las células meristemáticas de dos tejidos radiculares diferentes: corteza y endodermis (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012).

Sin embargo, también se ha reportado que la interacción de CycD6;1 con CDKB1;1 no es específica y que CycD6;1 puede interactuar con CDKA y con CDKB1, pero únicamente forma un complejo activo con CDKA (Weimer *et al.*, 2012).

1.2.4. Subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS)

La familia de CKSs se compone de proteínas de baja masa molecular (9-18KDa) que realizan funciones esenciales en el ciclo celular. La primera CKS en identificarse fue el producto del gen *Suc1+* (p13^{suc1}, **S**uppressor of *cdc2* 1 mutant) en *S. pombe*, el cual se identificó por su habilidad de rescatar a los alelos sensibles a la temperatura de *cdc2* (Hindley *et al.*, 1987).

En estudios posteriores basados en la identidad de su secuencia y función se pudieron identificar homólogos de p13^{suc1}, entre ellos CKS1 (en *S. cerevisiae*), HsCKS1 y HsCKS2 (*Homo sapiens*), Xe-p9 (*Xenopus laevis*), AtCKS1 (*Arabidopsis thaliana*), OsCKS (*Oriza sativa*), entre otros (Figura 6) (Draetta *et al.*, 1987; Patra and Dunphy, 1996; De Veylder *et al.*, 1997; Egan and Solomon, 1998).

Estudios de co-inmunoprecipitación han demostrado que las proteínas CKS se unen a las cinasas dependientes de ciclina mitótica de levadura (Brizuela *et al.*, 1987), células humanas (Draetta *et al.*, 1987), y huevos de rana (Patra *et al.*, 1996). Esta interacción conservada subyace en el uso generalizado de Suc1 como una matriz de cromatografía de afinidad para purificar los complejos de CDK-ciclina de una variedad de sistemas. Las CKS humanas se unen específicamente con CDK1, CDK2 y CDK3 (Harper 2001).

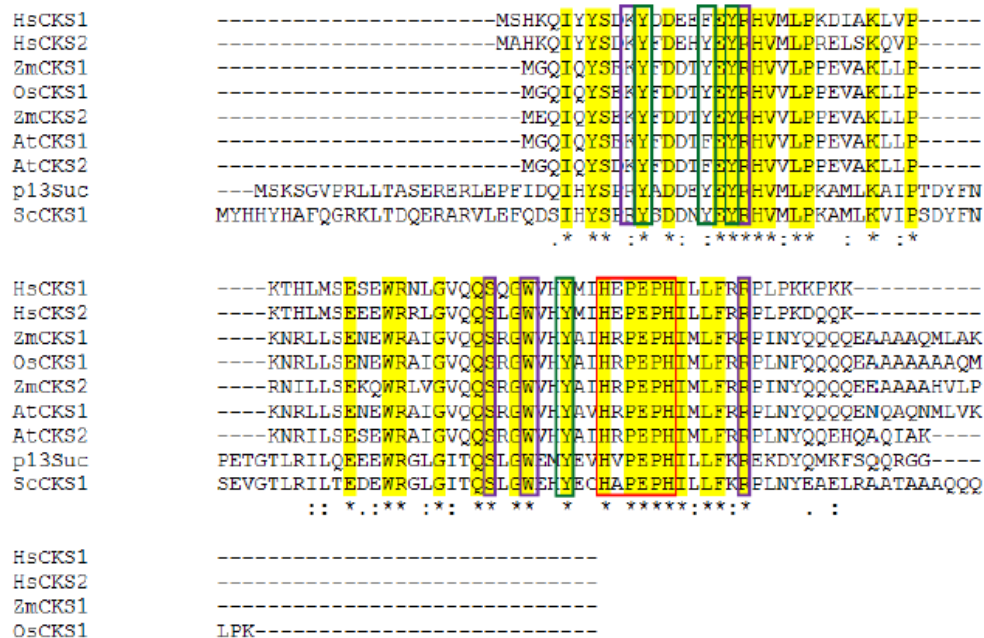


Figura 6.- Alineamiento de secuencias proteicas de p13^{suc1} y diferentes CKS ortólogas. En morado se muestra el sitio de unión de fosfato, en verde el sitio de unión a CDKs y en rojo la región de dimerización (Axosco, tesis 2014).

En cuanto a su función, se ha demostrado que CKS1 de animales realiza una función como cofactor de la ubiquitin ligasa SCFSkp2, que media la degradación dependiente de ubiquitina de los inhibidores de CDKs, p27, p21 y la proteína p130 de la familia pRb, entre otros (Spruck *et al.*, 2001; Bornstein *et al.*, 2001; Tedesco *et al.*, 2002). CKS2 es esencial para las primeras etapas de la meiosis, ya que en ratones *Knockout CKS2^{-/-}* se detiene el desarrollo de células germinales en la metafase de la primera división meiótica (Spruck *et al.*, 2003).

Asimismo, las proteínas CKS se han implicado frecuentemente en la modulación del estado de fosforilación de las CDKs mitóticas en la Tyr 15. Por ejemplo, antes de entrar a la mitosis, el complejo CycB-Cdc2 se mantiene inactivo por la fosforilación en Tyr 15 de la subunidad Cdc2. En los extractos citoplasmáticos de huevos de *Xenopus*, la adición de un exceso de la proteína Xe-p9 (CKS) se correlaciona con un retraso en la desfosforilación de la Tyr 15 de la subunidad Cdc2 en estos complejos (Patra *et al.*, 1996).

La eliminación de Xe-p9 de extractos de huevo de *Xenopus* tiene diferentes efectos en función de la fase del ciclo celular. Los extractos de huevo de *Xenopus* en interfase que carecen de Xe-p9 son incapaces de entrar en la mitosis y se mantiene el estado fosforilado de la Tyr 15 de Cdc2 (como lo hacen los extractos con exceso de Xe-p9). Mientras que los extractos mitóticos son incapaces de volver a entrar a interfase; lo que se ha correlacionan con un defecto en la destrucción de la ciclina B (Patra *et al.*, 1996).

Por otra parte, también se ha demostrado que CKS es un factor de especificidad que media la asociación de CDK- sustrato para múltiples funciones (figura 7), CKS

puede unirse a sustratos fosforilados en sitios consenso específicos ((S/T)Px(L/R)) y el complejo de CDK-ciclina-CKS estimula aún más la fosforilación del sustrato (hiperfosforilación), por ejemplo, Sic1 (proteína del ciclo celular que inhibe al complejo Cdc28-Clb en levaduras y detiene la entrada a fase S) (McGrath *et al.*, 2013).

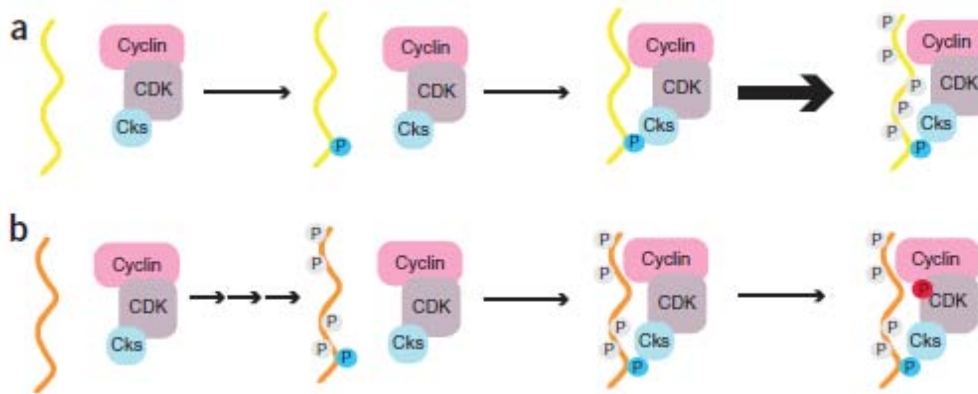


Figura 7.- Esquema de dos diferentes funciones de CKS: a) Hiperfosforilación de sustratos por fosforilación temprana y b) Inducción de fosforilación inhibitoria.

La estructura de CKS de *S. pombe* y de *H. sapiens* se ha estudiado por cristalografía de rayos-X y se han generado modelos de la estructura secundaria de p13^{Suc1}, HsCKS1 y HsCKS2. Estos modelos estudiados muestran dominios comunes en p13^{Suc1} y sus homólogos, además de una conformación común de un pliegue de cuatro hebras betas antiparalelas (β 1- β 4) y dos pequeñas hélices α . Estas regiones comprenden primero al N-terminal, el cual corresponde a una horquilla- β , seguido por una horquilla α -helicoidal expuesta y finalmente el C-terminal correspondiente a una horquilla- β (figura 8). Aunque las secuencias adicionales en p13^{Suc1} codifican para otras α -hélices, el núcleo estructural se conserva (Arvai *et al.*, 1995; Endicott and Nurse; 1995).

En resumen, cuando la CKS se une a las CDK no actúa como inhibidor o activador en el sentido clásico enzimológico, sino que parece modular la selección o la extensión de la fosforilación del sustrato. Además, aunque se han reportado como reguladores de la transición G2/M, también se relacionan directamente con vías de control que regulan G1/S y sobre todo con el desarrollo de diversos tipos de cáncer, así como también se les estudia para mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos (Del Rincón *et al.*, 2014).

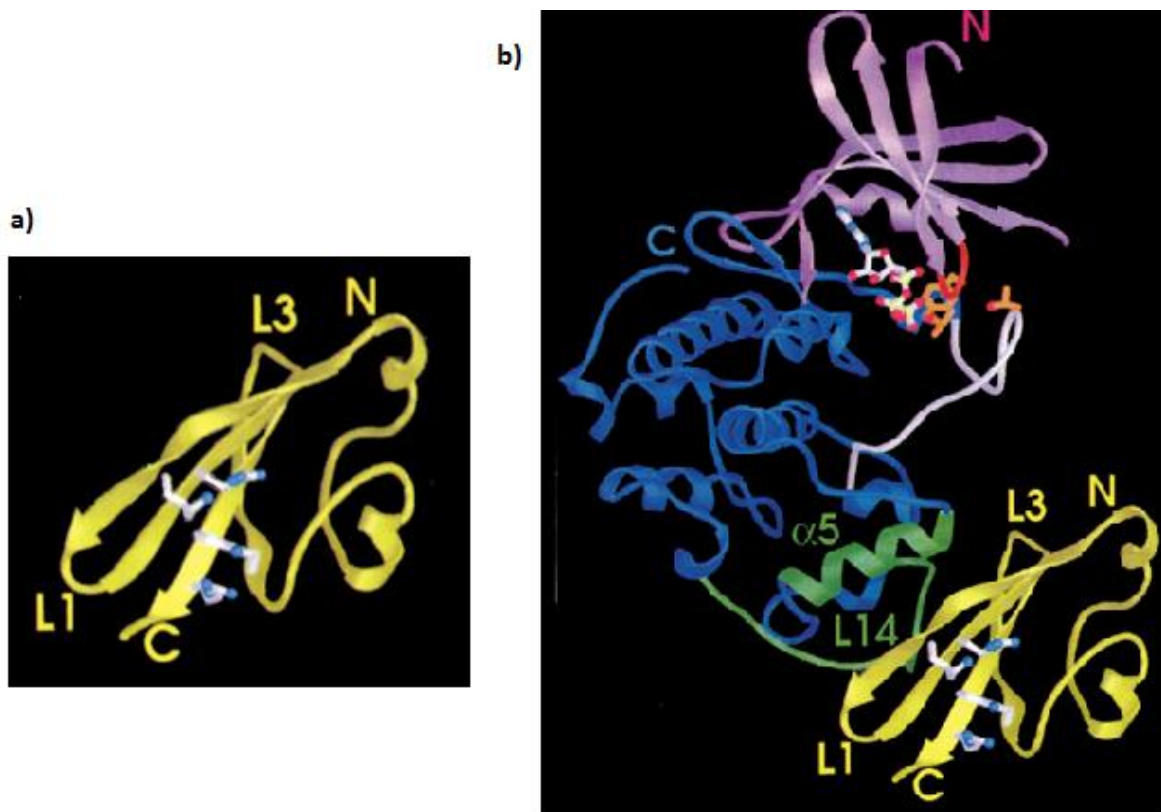


Figura 8.- Modelo de la estructura cristalográfica de HsCKS1: a) Estructura cristalográfica de HsCKS1 como monómero y b) en complejo con CDK2 (en amarillo HsCKS1, en púrpura lóbulo amino terminal de CDK2, en azul lóbulo carboxi terminal, en verde hélice $\alpha 5$ y bucle L14, sitio donde interactúa CDK2 con HsCKS1 (Pines, 1995).

1.3. Importancia del estudio de las interacciones proteicas *in vitro*

En la actualidad, es difícil comprender la actividad biológica de las proteínas de manera aislada, ya que la mayoría de las rutas funcionales y procesos celulares están determinados por asociaciones proteicas. Los análisis de las interacciones proteicas a gran escala generan una cantidad de información que es integrada en diferentes bases de datos y da lugar a complejas redes de proteínas que son representadas en mapas de interacciones proteicas o interactomas. A través del análisis de estos complicados interactomas, se ha llegado a proponer que la complejidad de los organismos no depende únicamente del número de proteínas codificadas en sus genomas, sino que también está relacionada con el número de interacciones que existen entre las proteínas de ese organismo, de forma que su complejidad aumenta a medida que muestra mayor número de interacciones (Claverie, 2001).

El interés por el estudio de las interacciones proteicas ha potenciado el desarrollo de una variedad de técnicas de análisis de interacciones que puede basarse en métodos experimentales (empíricos) o métodos computacionales (teóricos) que predicen posibles interacciones proteicas. La elección de un determinado método para el análisis de interacciones proteicas depende principalmente del tipo de proteínas, ya que influyen factores como solubilidad, la localización, la estructura, el nivel o tiempo de expresión característicos de cada proteína. Entre los métodos experimentales están los estudios *in vitro* o bioquímico-biofísicos que son técnicas que se basan en el uso de extractos celulares más o menos complejos.

En suspensiones celulares de *Arabidopsis*, mediante la técnica de purificación en TAP (Tandem Affinity Purification, por sus siglas en inglés) se reportó una serie de interacciones de proteínas relacionadas con el ciclo celular, demostrando su validación biológica en plantas de *Arabidopsis* (figura 9, Van Leene *et al.*, 2010).

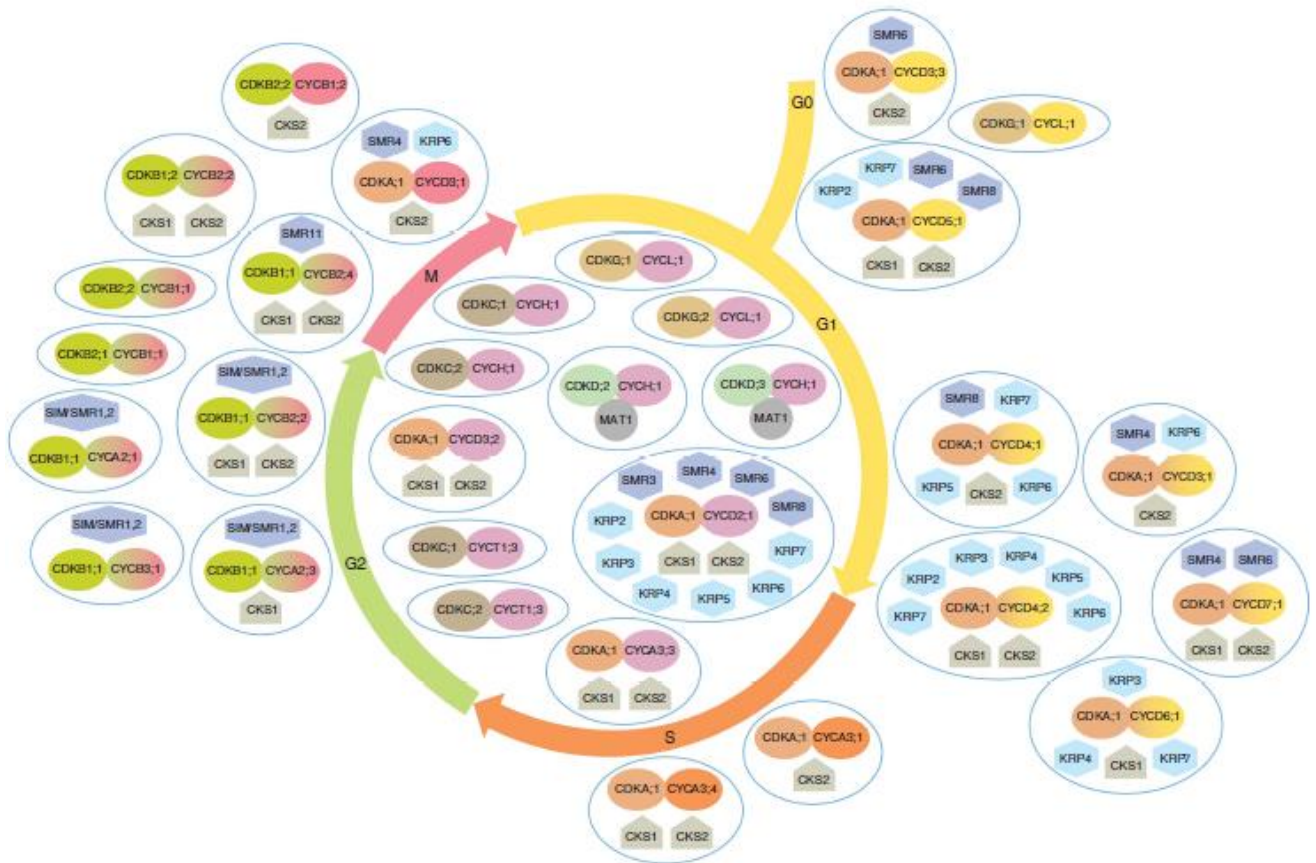


Figura 9.- Módulos CDK-ciclina extraídos del interactoma de *Arabidopsis* (Van Leene *et al.*, 2010)

2. ANTECEDENTES

El genoma de maíz contiene al menos 17 genes que codifican para ciclinas tipo D y 15 de estos genes se expresan durante la germinación y en diferentes tejidos de plántula. Estos genes de *CycDs* de maíz se pueden clasificar en los grupos *CycD1*, *CycD2/D4*, *CycD3*, *CycD5*, *CycD6* y *CycD7*. El gen de la *CycD6;1* es el único miembro de este grupo de genes en maíz, que tiene como característica que carece del motivo de unión a pRb (LxCxEx) (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

En semillas completas embebidas, el patrón de acumulación de *CycD6;1* muestra un aumento dentro de las primeras 6 horas, se mantiene constante durante al menos 18 horas, de modo que a las 24 horas aún permanecen elevados los niveles y posteriormente a las 30h disminuyen (Zamora, tesis 2014).

Mediante ensayos de Inmunoprecipitación cruzada (α -*CycD6;1* y α -CDKA) se determinó que existe interacción entre ZmCDKA y Zm*CycD6;1* (Zamora, tesis 2012).

Asimismo se ha analizado que Zm*CycD6;1* puede unirse a ZmpRb1, la interacción se ha observado tanto con el dominio pocket como con la región carboxilo terminal. La actividad de cinasa asociada a *CycD6;1* es capaz de fosforilar a ZmpRb1 tanto en el dominio pocket como en la región carboxilo (Zamora, tesis 2014).

También se ha demostrado *in vivo*, mediante ensayos de *pull down*, que existe una asociación de CDKs de maíz a p13^{suc1} (CKS) y que estas CDKs interaccionan con diferentes ciclinas (*CycA*, *CycD3;1* y *CycD6;1*), lo cual podría sugerir la formación de complejos CDK-ciclina-CKS.

Con respecto a los niveles de la proteína CycD6;1 que se encuentra unida a CDK, éstos disminuyen gradualmente hasta las 24h de imbibición (Axosco, tesis 2014), este comportamiento es similar al reportado para el nivel de la proteína CycD6;1 durante la imbibición de ejes embrionarios de maíz (Zamora, tesis 2012).

Cuando se comparan las secuencias de las CKSs de maíz con otras CKSs de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, se puede determinar que las CKSs son muy conservadas, observándose una identidad mayor a 78% con plantas dicotiledóneas y una identidad mayor al 56% con CKSs de humano (Muñoz, tesis 2010).

La proteína ZmCKS se encuentra en ejes embrionarios desde semilla seca con una disminución a las 6h de imbibición para posteriormente aumentar gradualmente hasta las 18h de imbibición y disminuir a las 24h de imbibición (Muñoz, tesis 2010).

En estudios se ha utilizado a p9^{CKShs1} o p10CKSA1 como herramienta para separar a la CDKA de la CDKB de *Ostreococcus tauri* dado que p9 muestra una baja afinidad por la CDKB de *O. tauri* (Corellou *et al.*, 2005).

Por otra parte CDKB1;1 de maíz se une a p13^{suc1} durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz y muestra un aumento en su asociación a las 36h de imbibición. Asimismo p13^{suc1} también se une con CDKA y su asociación aumenta gradualmente conforme avanza el periodo de imbibición (36h de imbibición) (Axosco, tesis 2014).

En estudios de interacción *in vitro* de proteínas de *Xenopus* se determinó que la ciclina B promueve la interacción entre p34^{cdc2} (CDK1 de levaduras) y HsCKS1.

También se determinó que la fosforilación activadora en Thr 160 promueve que la interacción de p34^{cdc2} y HsCKS1 aumente (Egan and Solomon, 1998).

En nuestro grupo de trabajo se han generado construcciones de plásmidos con insertos que codifican ZmCDKA;1, ZmCDKB1;1, ZmCycD6;1 y HsCKS1 y que se han utilizado para transformar cepas de bacterias capaces de sobreexpresar dichas proteínas. Por medio de la cromatografía de afinidad se han podido purificar estas proteínas para generar anticuerpos homólogos (Godinez-Palma *et al.*, 2013; Zamora 2012 y García, datos en proceso de publicación).

3. JUSTIFICACION

La germinación de semillas es un proceso que implica la activación de la proliferación y de la diferenciación celular para que continúe el ciclo vital de las plantas y, por lo tanto, la regulación del ciclo celular es indispensable. Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en estudiar la vía de regulación de la transición G1-S del ciclo celular durante la germinación, puesto que es en esta fase donde la célula se asegura que tiene todas las condiciones necesarias para reactivar su metabolismo y es aquí donde ocurren una serie de mecanismos de verificaciones moleculares (integridad de pared celular, membranas, mitocondrias, DNA, etc.), después de los cuales la célula se compromete a replicar su DNA. Entre las proteínas que participan directamente en la progresión del ciclo celular estudiadas en nuestro laboratorio, que sabemos que se encuentran desde la semilla madura y durante la germinación, están las ciclinas A1;1, B1;2, B2;1, D3;1, D4;2, D5;3 y D6;1. Las CDKs A y B1;1, las KRPs 1;1 y 4;2 y las CKSs. Y en específico CKS ha sido altamente estudiada por la diversidad de funciones a las cuales ha sido asociada, mencionadas anteriormente, (Egan and Solomon, 1998; Corellou et al., 2005; McGrath et al., 2013), sin embargo, dichas funciones no han sido claramente descritas en plantas, particularmente en maíz. Por lo cual, en el presente proyecto, mediante proteínas recombinantes y un sistema *in vitro*, se plantea: 1) determinar si existe interacción de HsCKS1 con el complejo ZmCDKA;1/ZmCDKB1;1-ZmCycD6;1 y 2) cómo la formación del complejo ZmCDKs-ZmCycD6;1-HsCKS1 influye en la actividad de cinasa de CDKs. Se propone trabajar con HsCKS1 para estandarizar un sistema para interacciones *in vitro* que después se utilizara en un proyecto posterior para trabajar con ZmCKS.

4. HIPÓTESIS

La proteína ZmCycD6;1 estimulará la interacción entre ZmCDKA y HsCKS1, pero no la asociación de HsCKS1 con ZmCDKB. La unión de HsCKS1 al complejo CDKA-CycD6;1 aumentará la actividad de cinasa sobre ZmpRb.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar las diversas interacciones *in vitro* de GST-ZmCDKA/B, SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1, así como la actividad de cinasa de los complejos.

5.2. Objetivos particulares

Establecer y estandarizar una técnica para analizar interacciones *in vitro* con proteínas recombinantes.

Determinar la interacción *in vitro* de:

- ❖ GST-ZmCDKA;1/B1;1-SSP-ZmCycD6;1
- ❖ GST-ZmCDKA;1/B1;1-SSP-HsCKS1.
- ❖ GST-ZmCycD6;1- SSP-HsCKS1 y
- ❖ GST-ZmCDKA;1/B1;1-SSP-ZmCycD6;1- SSP-HsCKS1.

Evaluar la actividad de cinasa de los complejos:

- ❖ GST-ZmCDKA;1/B1;1-SSP-ZmCycD6;1 y
- ❖ GST-ZmCDKA;1/B1;1-SSP-ZmCycD6;1- SSP-HsCKS1.

6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

6.1. Material biológico

Cepas: *Escherichia coli* BL21-CodonPlus-RIL transformada con el vector pGEX-4T2 ZmCDKA;1, *E.coli* BL21-CodonPlus-RIL transformada con el vector pGEX-4T2 ZmCDKB1;1, *E.coli* BL21-CodonPlus-RIL transformada con el vector pGEX-4T2 Ct-ZmpRb, *E.coli* BL21-CodonPlus-RIL transformada con el vector Ppal7 ZmCycD6;1, *E.coli* BL21-CodonPlus-RIL transformada con el vector Ppal7 HsCKS1, *E.coli* BL21 Codon Plus RIL transformada con el vector pCDFDuet-1 ZmCycD2;2 y *E.coli* BL21 Codon Plus RIL transformada con el vector pHMGWA scCAK1.

Anticuerpos: anti-CDKA (Garza, homogeniza la letra datos en proceso de publicación), anti CDKB1;1 (Godinez-Palma *et al.*, 2013), anti-CycD6;1 (Zamora, 2012), anti-MBP (abcam); anti-pRb (Zamora) y anti-CKS (García, datos en proceso de publicación).

6.2. Metodología

6.2.1. Sobreexpresión de proteínas recombinantes

A partir de cepas de *E. coli* que sobreexpresan las diferentes proteínas (generadas previamente en nuestro grupo de investigación), se tomó una asada de cada cultivo de bacterias transformadas y se inocularon en 3 mL de medio LB + ampicilina 100µg/mL*. Los cultivos se incubaron por 12h a 37°C con agitación constante de 150 rpm en un equipo LAB-LINE Orbit. Después de la incubación se tomaron 2 ml de cada cultivo y se transfirieron a matraces de 500 mL con 200 mL de medio LB estéril + ampicilina 100µg /mL*. Dichos cultivos se incubaron a 37°C hasta alcanzar

una DO_{600} nm entre 0.5-0.6. A continuación se agregó IPTG a una concentración final de 0.1mM para inducir la sobreexpresión de las proteínas recombinantes por 2h en las condiciones antes mencionadas (para tener un control de la sobreexpresión de las proteínas se tomó 1 ml del cultivo antes de inducir con IPTG y 1 ml del cultivo después de las 2h de inducción, en la sección 6.3.1. se describe cómo se prepararon estas muestras para SDS-PAGE y posterior Western blot). A continuación estos medios se transfirieron a botellas de 250 mL, se centrifugaron a 6,000 rpm en un rotor Sorvall modelo SL-250T por 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el pellet se almacenó a -70°C para su posterior uso.

*Los volúmenes de pre-cultivo y cultivo de bacterias para sobreexpresión variaron dependiendo de si eran para purificar proteínas control, proteínas para interacción o proteínas para interacción con variación de volumen.

6.2.2. Cromatografía de afinidad de las proteínas control

El pellet de cada cultivo (GST-ZmCDKA;1, SSP-ZmCycD6;1, SSP-HsCKS1 y GST-ZmCDKB1;1) se resuspendió en 10 mL de PBS + 0.1% tween 20, se lisaron las bacterias mediante sonicación en un equipo Vibra Cell VC505 a una amplitud de 29% por 1:00 minuto. El lisado se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C en un rotor SL-50T Sorvall. El pellet se desechó y el sobrenadante se pasó por filtros de 0.45 μ m de diámetro y se pasó por una columna con 1 mL de resina de glutatión-agarosa (SIGMA-Aldrich) previamente equilibrada con PBS 1X + 0.1% Tween 20 para separar a la proteína recombinante por cromatografía de afinidad. La resina con la recombinante unida se lavó con PBS 1X + 0.1% Tween 20 y posteriormente

se eluyó con 3 mL de una disolución de glutatión reducido 10 mM en 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 (todo el procedimiento se realizó en hielo).

Durante el procedimiento antes descrito, se recolectaron fracciones de 1 mL de la porción soluble filtrada que se agregó a la columna, de la fracción que no adsorbió la resina, del lavado de la resina y la elusión (Estas muestras se prepararon como se menciona en la sección 6.3.1.).

6.2.3. Interacción *in vitro* de proteínas recombinantes

Después de sobreexpresar las proteínas recombinantes como se indica en 6.2.1., el pellet de cada cultivo se resuspendió en 10 mL de PBS 1X + 0.1% Tween 20, estos volúmenes resuspendidos se juntaron en un solo tubo de tal manera que el volumen final fuera de 20 mL (por ejemplo: si la interacción que se quiere observar es entre GST-ZmCDKA;1 y SSP-ZmCycD6;1, entonces el pellet resuspendido de ambas cepas transformadas y sobreexpresantes de ambas proteínas se juntan en un solo tubo), estas combinaciones del cultivo de bacterias que sobreexpresan las diferentes proteínas se centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min y el pellet se resuspendió en 10 mL de PBS 1X + 0.1% Tween 20 (con el fin de mantener el volumen final de 10 mL). A continuación se realizó el lisado de las bacterias como se describió previamente en 6.2.2, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 15 min, se filtró el sobrenadante y se dejó incubar a 4°C por 18 horas en agitación constante.

Posteriormente estas muestras se purificaron mediante una columna con resina de glutatión-agarosa (SIGMA-Aldrich), como se menciona en 6.2.2.

6.2.4. Interacción *in vitro* de ZmCDKA;1, ZmCycD6;1 y HsCKS1

Para la realización de las interacciones se utilizó el mismo procedimiento de interacción *in vitro* (6.2.3.), solo con la variación de volúmenes de cultivo de bacterias que sobreexpresan a las proteínas, dejando como volumen fijo de 10 ml (33 ml de medio) a la proteína de anclaje (GST-ZmCDKA;1) en todos los puntos y variando el volumen de SSP-ZmCycD6;1 o SSP-HsCKS1 desde 0.01 ml (0.03 ml de medio) hasta 50 ml (165 ml de medio), después de juntar estos volúmenes se centrifugaron para resuspender en un volumen de 10 ml final y no obtener variación de volumen. Todos los puntos son de un mismo medio de cultivo, solo en la purificación se trataron como muestras independientes.

6.2.5. Purificación de la proteína cinasa activadora de CDK monomérica de *S. cerevisiae* (scCAK1) y el extremo carboxilo de la proteína del retinoblastoma de maíz (ZmpRb)

La purificación de estas dos proteínas se realizó como se menciona en 6.2.2., variando la resina, para scCAK1 se utilizó Amylose Resin (Biolabs) (Buffer de columna: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA y Buffer de elución: Buffer de columna más 10mM de maltosa) y resina Níquel-NTA (Thermo Scientific) (Buffer de columna: 20 mM fosfato de sodio (pH 7.8), 500 mM NaCl y Buffer de elución: 20 mM fosfato de sodio (pH 6.0), 500 mM NaCl y 10mM, 20mM, 250mM de Imidazol); para esta última resina se realizó un gradiente de elución variando la concentración de imidazol.

Para ZmpRb se utilizó resina glutatión-agarosa (SIGMA-Aldrich). El perfil de purificación se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

6.2.6. Ensayo de actividad de cinasa por Phos-Tag SDS-PAGE

Para la reacción de actividad se agregó a un tubo eppendor de 1.5 mL: 10µg de muestra (complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 o ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1), ATP a una concentración final de 1mM, 5µg de sustrato GST-ZmpRb en Buffer para actividad de cinasa (Tris-HCl pH 7.5 (25mM), MgCl₂ (15mM), KCl (25mM), EGTA (5mM), NaCl (250mM), Triton x-100 0.2%, DTT 1mM, NaF 1mM, Na₂VO₄ 1mM, Glicerol 30%, Coctel de inhibidores (1 tableta, Complete Roche®) y β-glicerolfosfato 60mM) en un volumen final de 20 µl, la reacción se llevó a 30°C por 0, 15 y 45 minutos, después se agregó buffer de carga para llegar a un volumen final de 30 µl.

Se realizó un SDS-PAGE con geles Bis-tris-Phos-tag (Kinoshita and Kinoshita-Kikuta, 2011), al término de la reacción de actividad, el gel se colocó en una solución de Tris 25mM, Glicina 192mM, MeOH 10% y EDTA 1mM por 10 minutos en agitación constante; a continuación el gel se colocó en la misma solución pero sin EDTA por 30 minutos en agitación constante (Kinoshita and Kinoshita-Kikuta, 2011). Después de estos enjuagues el gel se transfirió a una membrana de PVDF como se menciona en Técnicas generales.

6.3. Técnicas generales

6.3.1. Electroforesis de proteínas

Para verificar la presencia de proteínas y para los ensayos de Western blot se utilizó la técnica de SDS-PAGE. El gel al 12% se preparó como se indica en Sambrook *et*

al., 1989 y se corrió a 90 volts hasta que el frente de corrida pasara el gel concentrador, luego a 120 volts durante el corrimiento en el gel separador. El amortiguador de electrodos utilizado fue Tris-glicina-SDS 1X.

Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga 1X (SDS 2%, β -mercaptoetanol 2mM, glicerol 4%, Tris-HCl 40mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.01%) como se menciona a continuación:

- Muestras del cultivo sin inducir e inducido se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un volumen de buffer de carga dado tal que al final se obtuvieran en 20 μ l una densidad de 0.2 unidades (estas muestras antes de cargarlas en el gel se pasaron por una jeringa de insulina para eliminar la mucosidad).
- Muestras del filtrado, fracción no adsorbida a la columna y lavado de la columna: se colocaron 20 μ l de muestra en un tubo eppendorf de 1.5 ml con buffer de carga concentración final 1X.
- Muestra de elución: se precipitaron 500 μ L con ácido tricloroacético (TCA) al 10% como concentración final, seguido de una centrifugación a 12,000 rpm por 5 min, descartando el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en buffer de carga 1X (el pH se ajusta con Tris).

6.4. Western blot (Wb)

Para los ensayos de western blot las muestras se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Millipore) en el equipo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 350-400 mAmp por 1 hora. Las membranas se bloquearon con una

disolución al 10% de leche-PBS 1X + 0.01% Tween 20 durante 2h en agitación y luego incubadas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una disolución al 5% de leche en PBS 1X +0.1% Tween 20, por 12h a 4°C en agitación. Terminado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X + 0.1% Tween 20 por 15 minutos cada uno. A continuación se incubaron con un anticuerpo anti-conejo acoplado a una peroxidasa durante 1h a temperatura ambiente y en agitación, se repitieron los 3 lavados de 15 minutos.

Posteriormente se bañaron las membranas con 0.5mL de la solución de detección por quimioluminiscencia Western Blotting Detection Reagent (Millipore). Las imágenes se obtuvieron con el equipo Chemi Doc (Bio-Rad) en el programa Imagen Lab.

7. RESULTADOS

7.1. Técnica de interacción *in vitro*

Una de las primeras estrategias que se siguieron para obtener una técnica de interacción *in vitro* fue utilizando proteínas recombinantes purificadas, su incubación y posterior co-purificación sin embargo esta técnica no dio resultados. Posteriormente se utilizó formaldehído para realizar estas interacciones, pero debido a que GST se entrecruzaba no se podían obtener los controles necesarios; por lo cual se decidió utilizar una técnica nueva donde las proteínas interaccionaran desde la lisis de las bacterias que sobreexpresaban a las mismas.

De manera global, la técnica que se utilizó para estudiar interacciones *in vitro* de ZmCDKA;1, ZmCDKB1;1, ZmCycD6;1 y HsCKS1, fue la sobreexpresión de las proteínas recombinantes correspondientes por separado, para entonces mezclarlas e incubarlas en un buffer en condiciones fisiológicas (PBS), purificando ya fuera a GST-ZmCDKA;1 ó a GST-ZmCDKB1;1 y posteriormente determinar las interacciones por Wb si la proteína de interés co-purificaba (figura 10).

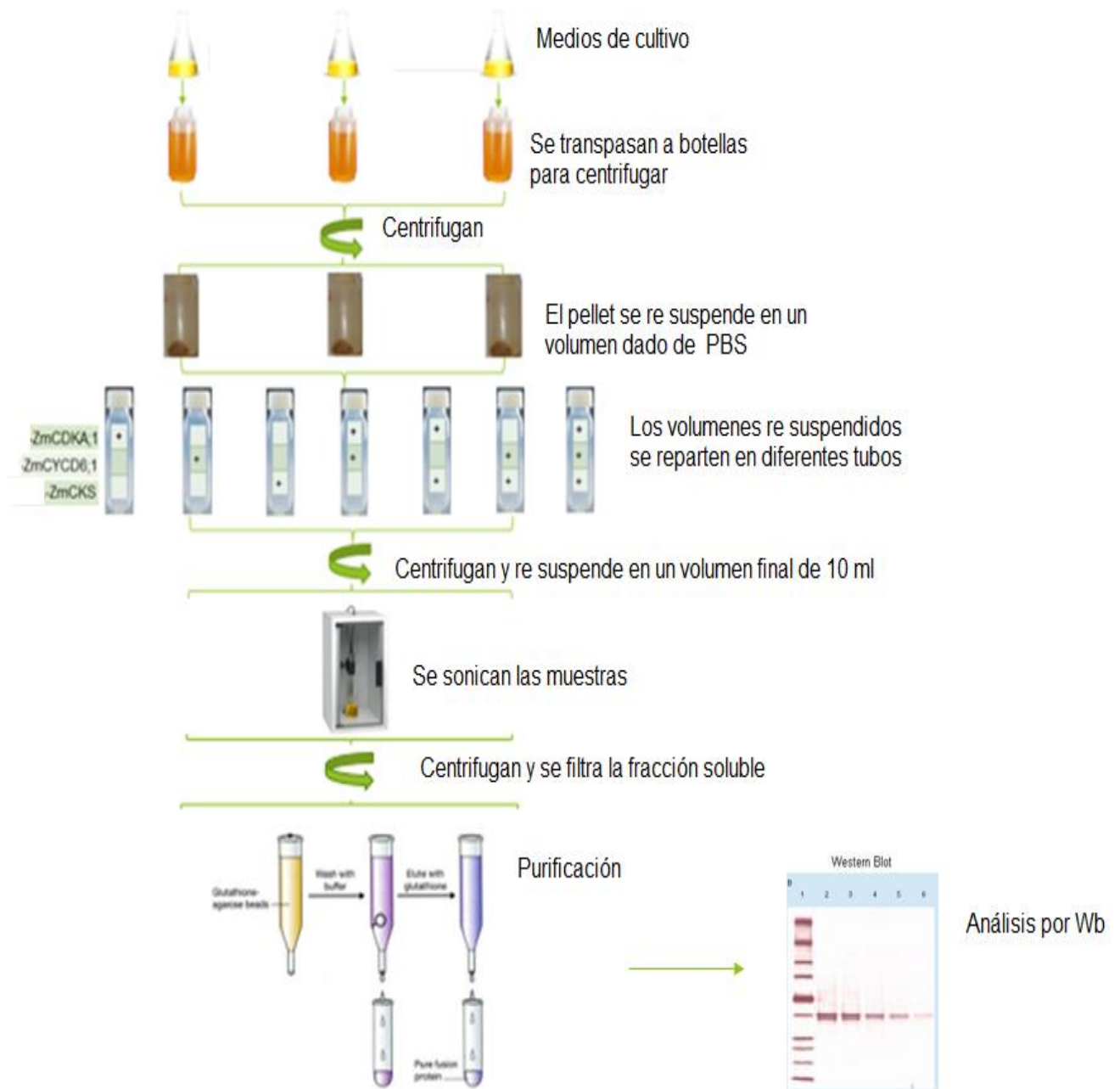


Figura 10.- Esquema general de la técnica para las interacciones *in vitro*.

7.2. Controles de la técnica de interacción *in vitro*

Como primer paso para determinar la especificidad de la técnica, se realizó una cromatografía de afinidad con la resina de glutatión-agarosa (SIGMA-Aldrich) y las proteínas GST-ZmCDKA;1, GST-ZmCDKB1;1, SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1

para determinar que no existiera un anclado inespecífico de las proteínas recombinantes que no tienen a GST como etiqueta. Como se puede observar en la figura 11, la purificación mediante resina de glutatión-agarosa fue específica para GST-ZmCDKA;1 y GST-ZmCDKB1;1 que son las únicas que tienen GST y no para SSP-ZmCycD6;1 o SSP-HsCKS1. Por lo tanto se decidió utilizar a GST-ZmCDKA;1 y GST-ZmCDKB1;1 como proteínas de anclaje.

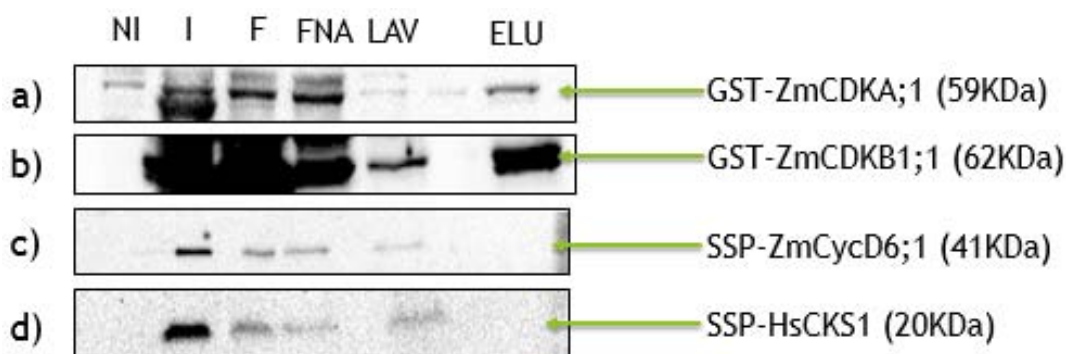


Figura 11.- Solo GST-ZmCDKA;1 y GST-ZmCDKB1;1 se anclan a la resina glutatión-agarosa. Inmunodetección de la afinidad de a) GST-ZmCDKA;1, b) GST-ZmCDKB1;1, c) SSP-ZmCycD6;1 y d) SSP-HsCKS1 a la resina glutatión-agarosa. Las fracciones que se cargaron en el gel NI (Muestra de cultivo de bacterias no inducidas), I (Muestra de cultivo de bacterias inducidas), F (*Input* de la fracción soluble agregada a la columna), FNA (Fracción no adsorbida a la columna), LAV (Lavado de la columna) y ELU (Elución).

Como se puede observar en la figura 11 el anticuerpo de CDKA y CDKB tiende a reconocer un doblete en la masa esperada y aunque no se sabe cuál es la razón se podría atribuir a una modificación postraduccional o a productos truncos de proteína.

7.3. Controles de interacciones *in vitro* inespecíficas

Como siguiente control de la técnica, se realizó un ensayo de interacción de GST (etiqueta de las proteínas de anclaje) con SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1 para descartar que alguna de estas dos proteínas pudiera tener una interacción inespecífica directamente con GST y no con ZmCDKA;1 o ZmCDKB;1. Como se

puede observar figura 12 (a y b) ni SSP-ZmCycD6;1 ni SSP-ZmHsCKS1 interaccionan con GST.

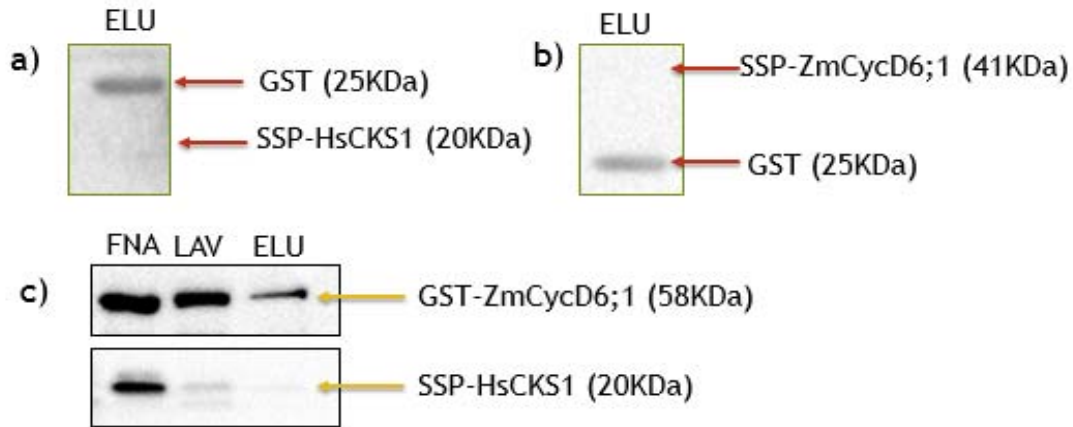


Figura 12.- No existen interacciones inespecíficas de la etiqueta GST con las proteínas SSP-ZmCycD6;1 o SSP-HsCKS1, ni existe interacción de GST-ZmCycD6;1 con SSP-HsCKS1. a) Etiqueta GST con SSP-HsCKS1 revelado con anti GST y anti CKS; b) Etiqueta GST con SSP-ZmCycD6;1 revelado con anti GST y anti CycD6;1 y c) Interacción de GST-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1 revelado con anti CycD6;1 y anti CKS. FNA (Fracción no adsorbida a la columna), LAV (Lavado de la columna) y ELU (Elución).

Por otra parte, también se realizó un ensayo de interacción entre GST-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1 para determinar si SSP-HsCKS1 podría asociarse con esta ciclina. Para esta interacción se utilizó la construcción de CycD6;1 con la etiqueta de GST, en la figura 12 (inciso c) se puede observar que no hubo interacción entre GST-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1.

7.4. Interacción *in vitro* entre GST-ZmCDKA;1 y SSP-ZmCycD6;1, ó SSP-ZmHsCKS1

Cuando se usó a GST-ZmCDKA;1 como anzuelo, se identificó la interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-ZmCycD6;1 y de GST-ZmCDKA;1 con SSP-HsCKS1. Asimismo, la co-elución de SSP-ZmCycD6;1 y SSPHsCKS1 con GST-ZmCDKA;1

sugiere la formación del complejo GST-ZmCDKA;1-SSP-ZmCycD6;1-SSP-HsCKs1. Sin embargo, la unión de SSP-HsCKs1 a GST-ZmCDKA;1 cuando está ausente o presente SSP-ZmCycD6;1 es diferencial, obteniéndose una mayor interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-HsCKs1 cuando está presente GST-ZmCycD6;1 (Figura 13).



Figura 13.- Existe una mayor interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-HsCKs1 cuando está presente SSP-ZmCycD6;1. Inmunodetección de interacciones de GST-ZmCDKA;1 con SSP-ZmCycD6;1 y/o SSP-HsCKs1: a) Inmunodetección de la interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-ZmCycD6;1 b) Inmunodetección de la interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-HsCKs1 y c) Inmunodetección de la interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKs1. Las fracciones que se cargaron en el gel fueron FNA (fracción no adsorbida a la columna), LAV (lavado de la columna) y ELU (elución).

7.5. Interacción *in vitro* entre GST-ZmCDKB1;1 y MBP-ZmCycD2;2, ó SSP-ZmCycD6;1, SSP-HsCKs1

Después de obtener las interacciones con GST-ZmCDKA;1 el sistema se probó con GST-ZmCDKB1;1. Para este conjunto de experimentos se realizó una interacción más, como control de que el sistema fuera funcional. Se comprobó una interacción

previamente descrita entre CDKB1;1 y CycD2;2 (figura 14, inciso a), (Godínez *et al.*, 2013), ya que no teníamos un antecedente que probara que CDKB1;1 interaccionara con CycD6;1. A continuación se demostró la interacción de GST-ZmCDKB1;1 con SSP-HsCycD6;1, pero CDKB no fue capaz de asociarse a SSP-HsCKS1 en presencia o ausencia de GST-ZmCycD6;1 como se observa en la figura 14 (incisos b, c y d).

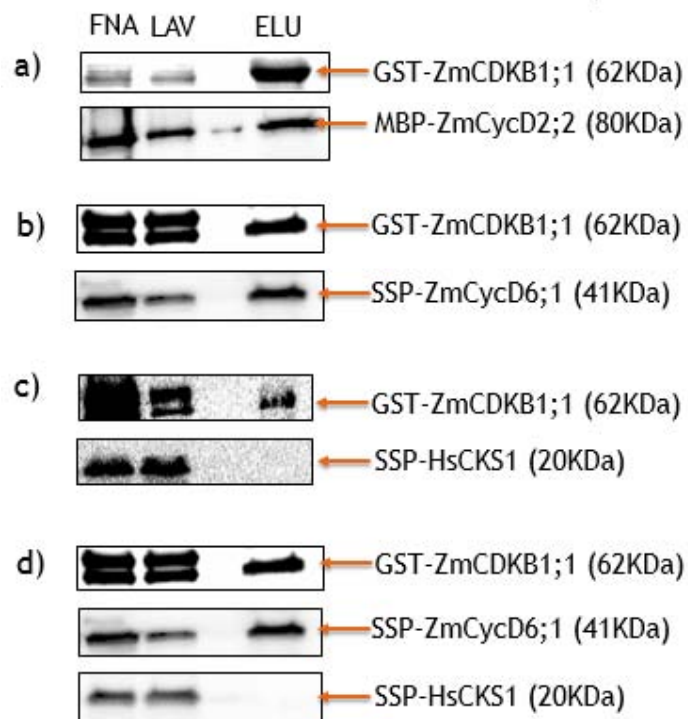


Figura 14.- GST-ZmCDKB1;1 no interactúa con SSP-HsCKS1 en ausencia o presencia de SSP-ZmCycD6;1. Inmunodetección de interacciones de GST-ZmCDKB1;1 con SSP-ZmCycD6;1 y/o SSP-HsCKS1 a) Inmunodetección de la interacción de GST-ZmCDKB1;1 con MBP-ZmCycD2;2 (Control positivo) b) Inmunodetección de la interacción de GST-ZmCDKB1;1 con SSP-ZmCycD6;1, c) Inmunodetección de la interacción de GST-ZmCDKB1;1 con SSP-HsCKS1 e d) Inmunodetección de la interacción de GST-ZmCDKB1;1 con SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1. Las muestras que se cargaron fueron FNA (Fracción no adsorbida a la columna), LAV (Lavado de la columna) y ELU (Elución).

7.6. Formación de complejos ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 en función de la concentración de ZmCycD6;1

A continuación se realizaron interacciones variando la concentración de ZmCycD6;1, las cuales solo se llevaron a cabo con GST-ZmCDKA;1 debido a que fue la única cinasa que interactuó con SSP-HsCKS1. Para estos experimentos se mantuvo a GST-ZmCDKA;1 constante y SSP-ZmCycD6;1 fue incrementándose, de esta manera se observa un patrón de unión de SSP-ZmCycD6;1 a GST-ZmCDKA;1 hasta llegar a un punto (10ml de GST-ZmCDKA;1 y 10 ml de SSP-ZmCycD6;1) donde empieza a visualizarse una saturación del sistema (Figura 15).

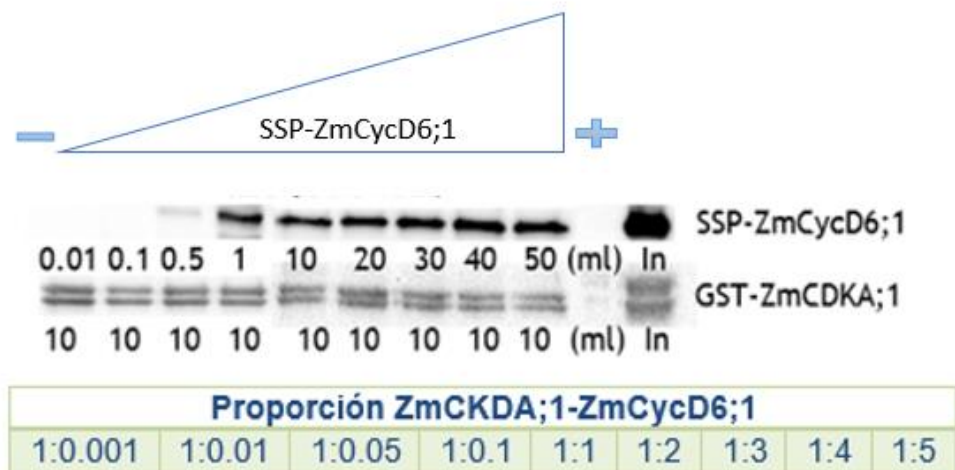


Figura 15.- Formación del complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 en función de la concentración de ZmCycD6;1, los volúmenes de ZmCDKA;1 se mantuvieron constantes (proteína de anclaje) mientras que los volúmenes de ZmCycD6;1 se fueron aumentando. El carril denominado como In (*Input*) es un control positivo. La tabla muestra una relación de proporción entre los volúmenes agregados para cada experimento.

7.7. Formación de complejos ZmCycD6;1-HsCKS1 en función de la concentración de ZmCycD6;1 y HsCKS1

Otra interacción que se realizó fue la de GST-ZmCycD6;1 con SSP-HsCKS1; aunque en primera instancia no se había observado esta interacción, este

experimento se realizó debido a que en la literatura se hace mención que a concentraciones mayores de Cyc esta puede estar interactuando con HsCKs1 (Egan and Solomon, 1998). Sin embargo en nuestro sistema como se puede observar en la figura 16 aun con el aumento de GST-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKs1 la interacción es nula.



Figura 16.- GST-ZmCycD6;1 no interacciona con SSP-HsCKs1. Los volúmenes tanto de GST-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKs1 se fueron aumentado. El carril de In (Input) es un control positivo.

7.8. Formación de complejos ZmCDKA;1-HsCKs1 y ZmCDKA-ZmCycD6;1-HsCKs1 en función de la concentración de HsCKs1.

A continuación se hizo la interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-HsCKs1 y la interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKs1, para determinar si la asociación de SSP-HsCKs1 a GST-ZmCDKA;1 es dependiente de la concentración de SSP-HsCKs1 y observar una unión como cuando está presente SSP-ZmCycD6;1. Como se observa en la figura 17 (inciso a) esta unión de SSP-HsCKs1 a GST-ZmCDKA;1 a pesar del aumento en el volumen de SSP-HsCKs1 sigue siendo menor con respecto a donde se encuentra SSP-ZmCycD6;1 figura 17 (inciso b).

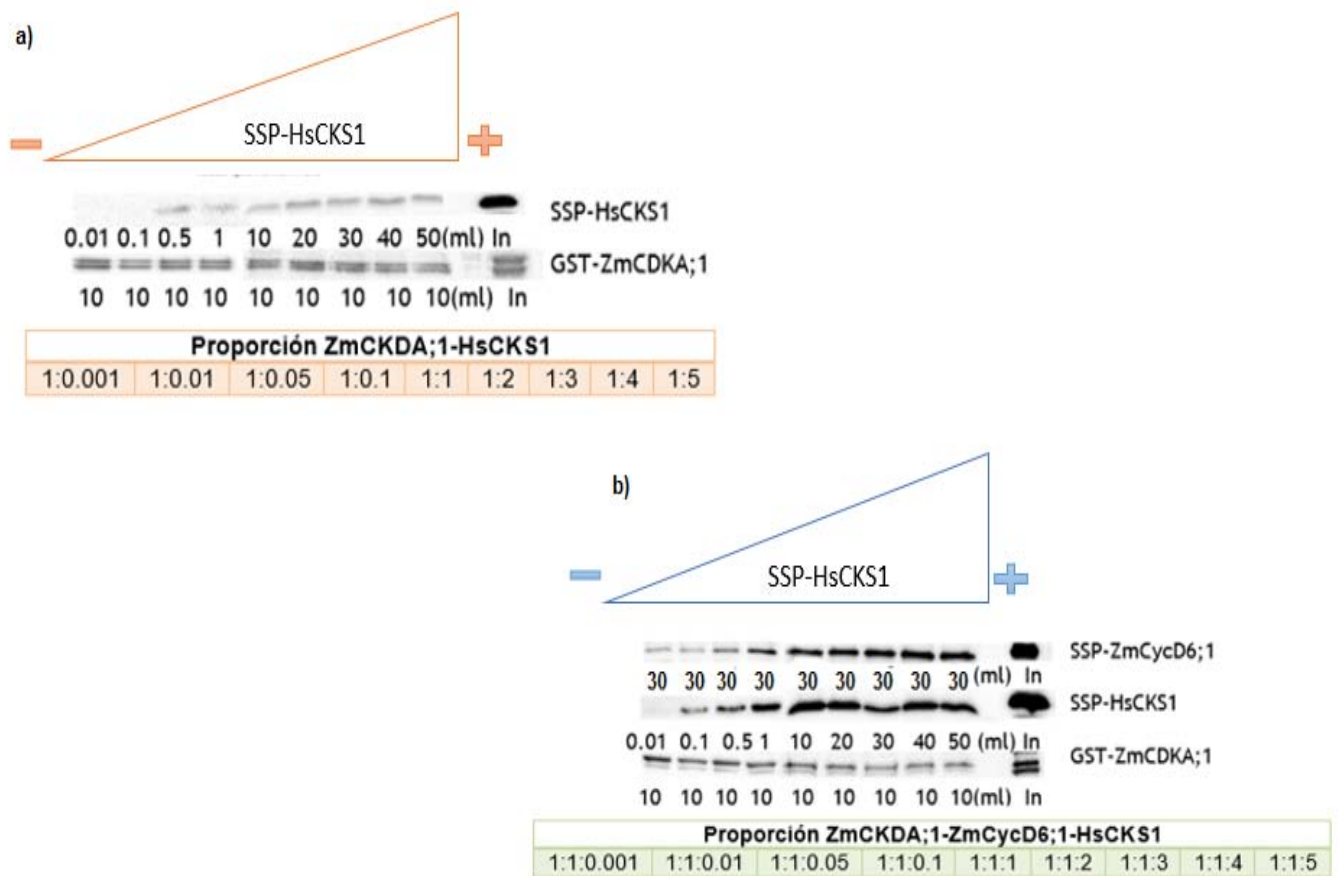


Figura 17.- La interacción de ZmCDKA-HsCKs1 aumenta cuando está presente ZmCycD6;1 aun en condiciones de variación de volúmenes: a) los volúmenes de GST-ZmCDKA;1 se mantuvieron constantes (proteína de anclaje) mientras que los volúmenes de SSP-HsCKs1 se fueron aumentando, b) los volúmenes de GST-ZmCDKA;1 y SSP-ZmCYCD6;1 se mantuvieron constantes y SSP-HsCKs1 se fue aumentando. El carril de In (*Input*) es un control positivo. La tabla muestra una relación de proporción entre los volúmenes agregados para cada experimento.

7.9. Purificación de la proteína de activación de CDKA;1 (scCAK1) y proteína sustrato (ZmpRb)

Después de obtener los complejos de ZmCDKA;1-ZmCycD6;1; ZmCDKA;1-HsCKs1 y ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKs1, se determinó si estos complejos eran activos. Para esto, se sobreexpresaron 2 proteínas: la proteína scCAK1 (proteína

que fosforila y activa a CDKA;1 en la posición Thr 160) y al extremo carboxilo terminal de ZmpRb, que es uno de los sustratos de complejos CDKs-CycD en el ciclo celular. Para ZmpRb se sobreexpresó y purificó el extremo carboxilo terminal (observar en el apéndice), secuencia donde se encuentran la mayoría de los sitios fosforilables; la proteína scCAK1 se sobreexpresó y purificó completa.

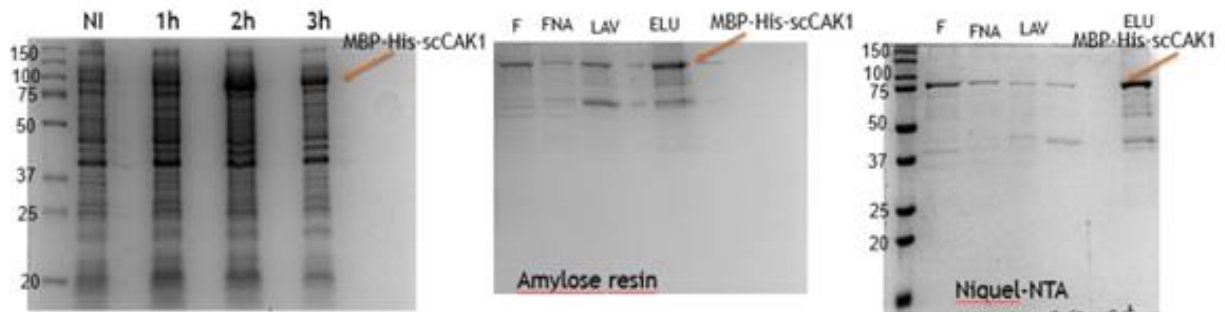


Figura 18.- Purificación de scCAK1. Inducción y purificación de scCAK1 por resina de amilosa y resina de Niquel-NTA, para el perfil de purificación se cargaron en el gel NI (Fracción no inducida); 1h, 2h, 3h (Fracciones inducidas), F de amylose resin (*Input* de la fracción soluble que se agregó a la columna), F de Niquel-NTA (fracción eluida de la amylose resin), FNA (Fracción no adsorbida a la columna), LAV (lavado de la columna) y ELU (Elución).

Para obtener a scCAK1 se realizaron purificaciones consecutivas utilizando 2 resinas diferentes ya que esta proteína se sobreexpresó con la etiqueta de MBP (Proteína de unión a maltosa) y con His (Histidinas). Sin embargo en ambas purificaciones todavía se observan productos de menor masa molecular (figura 18), obteniendo una purificación parcial.

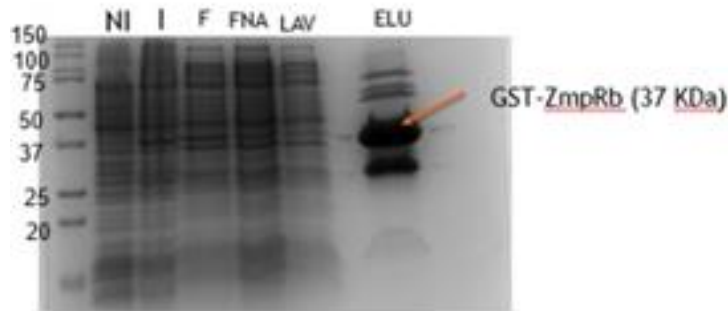


Figura 19.- Purificación de GST-ZmpRb. Inducción y purificación de GST-ZmpRb, resina glutatión agarosa, para el perfil de purificación se cargaron en el gel NI (Fracción no inducida), I (Fracción inducida), F (*Input* de la fracción soluble que se agregó a la columna), FNA (Fracción no adsorbida a la columna), LAV (lavado de la columna) y ELU (Elución).

La GST-ZmpRb (figura 19) se purificó con resina glutatión-agarosa y esta fracción se utilizó como sustrato en los ensayos de actividad de cinasa.

7.10. Ensayo de actividad por Phos-tag

Phos-tag™ es una molécula funcional que une específicamente iones fosforilados, su función es separar específicamente proteínas fosforiladas (Phos-tag™ Acrylamide), y la detección mediante Western blot (Phos-tag™ Biotin). En 2002, el grupo del Profesor Koike (Universidad de Hiroshima) informó que un complejo dinuclear de metal de 3-bis [bis complejo (piridin-2-metil) amino] propan-2-olato dizinc (II) actúa como una molécula selectiva de unión a Phos-tag™ en una solución acuosa a un pH neutro. En este sistema dos iones metálicos cooperan en la unión a un grupo fosfato, por tanto las proteínas fosforiladas se van reteniendo, separándose de las no fosforiladas (figura 19, Wako, Phos-Tag™ series, NARD) que pueden identificarse después por Wb.

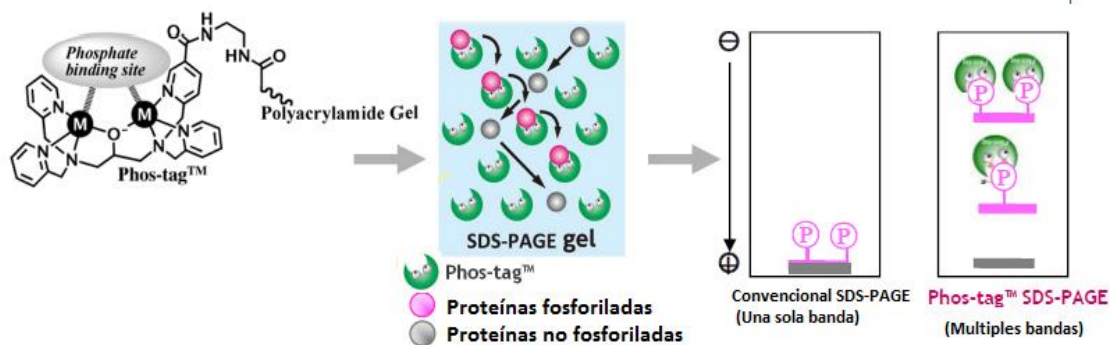


Figura 20.- Esquema del fundamento de la técnica de Phos-tag (Modificado de Wako, Phos-Tag™ series, NARD)

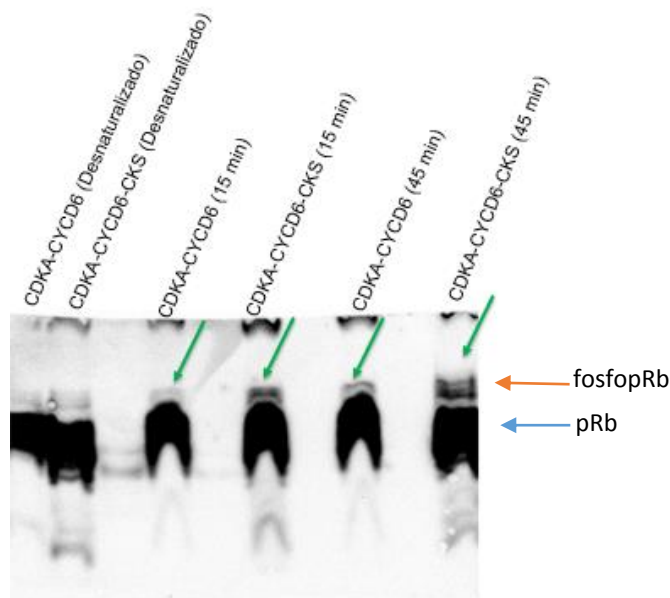


Figura 21.- HsCKS1 estimula la hiperfosforilación de GST-ZmpRb (complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1.HsCKS1). Ensayo de actividad por Phos-tag, todos los carriles contienen al complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 o ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1 como se señala en la figura, ATP (1mM), scCAK1 (3µM), GST-ZmpRb (5µM) y Buffer de actividad de cinasa la reacción se ensayó a 30°C a diferentes tiempos (0,15 y 45 min). La membrana fue revelada con anti Rb.

Esta metodología se usó como auxiliar para realizar el ensayo de actividad (Figura 20), como se observa, cuando está presente el complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 se observaron dos bandas que puede corresponder a la fosfopRb y a la pRb lo que estaría comprobando una fosforilación de ZmpRb. Sin embargo, cuando está el

complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1, la banda que podría corresponder a la fosforilación de GST-ZmpRb es más intensa y además se logran ver más bandas, lo cual puede indicar diferentes niveles de fosforilación de GST-ZmpRb. El control negativo, en el cual no se agregó Phos-tag y el control en presencia y ausencia de CAK, se muestra en el apéndice.

8. DISCUSIÓN

8.1. Técnica de interacción *in vitro*

Después de que se obtuvo la sobreexpresión de proteínas recombinantes (ZmCDKA;1, ZmCDKB1;1, ZmCycD6;1 y HsCKS1) en nuestro grupo de trabajo, uno de los siguientes pasos fue analizar si estas proteínas podrían interactuar *in vitro*, como se menciona en resultados se realizaron dos técnicas anteriores a la propuesta en este trabajo, una fue purificar a las proteínas recombinantes y después determinar si interaccionaban, protocolo con el cual no se obtuvieron resultados lo que atribuimos a que los cambios de pH y diferentes buffer por los que tenían que pasar las proteínas para su purificación y posteriormente los buffer de interacción modificaban el ambiente en el que se encontraba la proteína de tal forma que esta se veía afectada y no podía interaccionar. El siguiente protocolo fue utilizar formaldehído, sin embargo debido a que GST forma multidímeros no se podía determinar si estas proteínas estaban interactuando o solo GST se estaba dimerizando. Por último, con base en los intentos anteriores, se establecieron condiciones para crear una técnica que mediante sobreexpresión, liberación celular, incubación y cromatografía de afinidad de proteínas nos ayudara a determinar estas interacciones.

Debido a que no es una técnica ya reportada, para estandarizarla, primero se realizaron controles donde se verificó que la resina glutatión agarosa solo tiene afinidad por las proteínas que tienen como etiqueta a GST (Figura 11) y después se determinó que GST no estuviera interactuando con ZmCycD6;1 o HsCKS1 (Figura 12). Para eliminar la posibilidad de una interacción inespecífica y corroborar que todo tipo de interacción que se estuviera observando fuera de las proteínas esperadas. Otro punto importante fue el corroborar resultados similares a los ya reportados con anterioridad en el laboratorio, como la interacción que se observó entre CDKA y CycD6;1 (Zamora, 2012) y la interacción de CDKB1;1 y CycD2;2, mediante inmunoprecipitaciones (Godínez *et al.*, 2013).

Mediante investigación bibliográfica se determinó que algunos de nuestros datos presentan similitudes con datos ya reportados de interacción usando otras técnicas ya estandarizadas, lo cual nos confirmaba que la técnica propuesta es adecuada para realizar este tipo de trabajo experimental.

8.2. Interacción de ZmCDKA;1-ZmCycD6;1, ZmCDKA;1-HsCKS1 y ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1

Se demostró que SSP-HsCKS1 se une a GST-ZmCDKA;1, pero no a GST-ZmCDKB1;1, mediante selección por afinidad anclando a GST-ZmCDKA;1 ó a GST-mCDKB1;1, esto sugiere que solo GST-ZmCDKA;1 puede interactuar funcionalmente con SSP-HsCKS1. Considerando que HsCKS1 (de humano) muestra un alto porcentaje de identidad de aminoácidos con ZmCKS1 (de maíz, Apéndice 1), se supondría que ZmCKS solo se uniría a ZmCDKA;1 y que tendría una función específica formando complejos con esta cinasa, sin embargo también

se tiene que considerar que CDKA y CDKB se distinguen por varias características, por ejemplo, la CDKA contiene el motivo PSTAIRE, que se encuentra comúnmente en los homólogos de CDK de otros organismos; a diferencia de CDKB que contiene un motivo PPTALRE, solo presente en CDKBs de plantas, pero en ningún otro organismo; por lo tanto, HsCKS1 no reconoce a ZmCDKB (Figura 14). Algo similar se determinó en *Arabidopsis* ya que *cdc2aAt* (una CDKA) puede complementar levaduras mutantes en $p34^{cdc2/Cdc28}$ sensibles a la temperatura, mientras que *cdc2bAt* (una CDKB) no puede (Hirayama *et al.*, 1991). La incapacidad de *Cdc2bAt* para asociarse con la proteína de la levadura de fisión *Suc1* ofrece una explicación probable de su incapacidad para complementar mutantes en $p34^{cdc2}$ (De Veylder *et al.*, 1997).

Por otra parte se ha reportado en *Arabidopsis* que *Cks1At* puede unirse a *Cdc2aAt* y *Cdc2bAt* *in vivo* e *in vitro*, usando un enfoque de dos híbridos o selección por cromatografía de afinidad *Cks1At*-Sefarosa, deduciendo que durante su evolución, la *Cdc2bAt* podría haber perdido su capacidad para unirse a cualquier *Suc1* / *Cks1* homólogo no vegetal, pero aún conserva su capacidad de unirse a *Cks1At* (De Veylder *et al.*, 1997); por tal motivo tampoco podemos descartar la posibilidad de que *ZmCKS1* si pueda unirse a *ZmCDKB1;1*. Otro elemento que refuerza esta suposición es que en el laboratorio se determinó que *CDKB1;1* de maíz se une a $p13^{suc1}$ durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz y $p13^{suc1}$ tiene alta homología con *ZmCKS1* (Axosco, 2014).

En cuanto a la diferencia que se observa de la interacción que existe entre GST-*ZmCDKA;1* y SSP-HsCKS1 cuando está presente o ausente SSP-*ZmCycD6;1*, esta

podría ser debida a que a pesar de que GST-ZmCDKA;1 pueda unir débilmente a SSP-HsCKs1 sin la presencia de SSP-ZmCycD6;1, al interactuar GST-ZmCDKA;1 con SSP-ZmCycD6;1, ZmCDKA;1 podría modificar su estructura de tal forma que el loop donde interactúa con SSP-HsCKs1 quedara más expuesto y pueda unirse SSP-HsCKs1 a GST-ZmCDKA;1 con mayor afinidad, dando una mayor estabilidad al complejo.

8.3. Formación de complejos ZmCDKA;1-ZmCycD6;1, ZmCDKA;1-HsCKs1 y ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKs1

Después de determinar que interacciones se llevan a cabo con las proteínas que se propusieron al principio del trabajo (GST-ZmCDKA;1, GST-ZmCDKB1;1, SSP-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKs1) y descartar la posible interacción de SSP-HsCKs1 con GST-CDKB1;1, nuestro interés se basó en saber si el aumento en la inmunodetección de HsCKs1 cuando estaba presente ZmCycD6;1 era independiente de la concentración agregada de HsCKs1, por lo cual primero se estableció una concentración (volumen) de ZmCycD6;1 en donde la unión a ZmCDKA;1 no variara tanto en comparación con un volumen mayor, como se observa en la figura 15, cuando se agregan 30 ml de ZmCycD6;1 el sistema ya empieza a saturarse, por tanto se tomó este volumen para en los siguientes experimentos mantener a GST-ZmCDKA;1 y SSP-ZmCycD6;1 constantes y solo variar a SSP-HsCKs1.

Después de determinar este volumen de SSP-ZmCycD6;1, se prosiguió a hacer los experimentos sin y con SSP-ZmCycD6;1 variando solamente en volumen de SSP-HsCKs1, figura 17, obteniendo que solamente donde se encontraba SSP-

ZmCycD6;1 la inmunodetección de HsCKS1 era mayor, por lo tanto SSP-ZmCycD6;1 si estimula la interacción de GST-ZmCDKA;1 con SSP-HsCKS1.

Otro punto importante de resaltar es que al realizar un experimento donde se aumentan los volúmenes de GST-ZmCycD6;1 y SSP-HsCKS1 no exista interacción, figura 16, nos reafirma que la unión de SSP-HsCKS1 solo es con GST-ZmCKA;1, descartando la posibilidad de que el aumento de la inmunodetección de SSP-HsCKS1 sea por uniones inespecíficas con ZmCycD6;1.

8.4. Actividad de los complejos

Por último, se analizó si estos complejos podrían ser activos, ya que a pesar de lo importante que pueda ser saber si hay interacción proteína-proteína, es sumamente importante saber si estos complejos podían fosforilar a ZmpRb y suponer que *in vivo* podrían estar cumpliendo una función sobre este sustrato.

Con el antecedente de que CKS aumenta la actividad de cinasa causando hiperfosforilaciones en sustratos como Sic1 (McGrath *et al.*, 2013), para este trabajo se realizó el ensayo de actividad mediante Phos-tag, el cual es un sistema que nos permite visualizar en un SDS-PAGE un patrón diferencial en los niveles de fosforilación del sustrato.

Para activar a ZmCDKA;1 de los complejos que se obtuvieron *in vitro* se decidió purificar a scCAK1. Como sustrato se purificó a GST-ZmpRb ya que es blanco de fosforilación de CDKs-Ciclinas D y en su secuencia tiene múltiples sitios de fosforilación.

Como se observa en la figura 20, cuando está presente el complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1 se presenta una sola banda por arriba de GST-ZmpRb, lo cual nos estaría indicando fosforilación de GST-ZmpRb, sin embargo cuando está el complejo ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS1 se visualiza claramente un mayor número de bandas por encima de la banda de GST-ZmpRb y con una mayor intensidad, por lo que se sugiere que en nuestro sistema HsCKS1 estimula la hiperfosforilación de ZmpRb.

Con estos resultados y los antecedentes mencionados en los que se ha analizado la unión de ZmCycD6;1 a ZmpRb1 presentando interacción tanto con el dominio pocket como con la región carboxilo terminal y la actividad de cinasa asociada a inmunoprecipitados con ZmCycD6;1 es capaz de fosforilar a ZmpRb1 en los mismos sitios (Zamora, 2014), suponemos que en algunos de estos inmunoprecipitados podría venir asociada alguna ZmCKS y que los resultados obtenidos *in vitro*, podría obtenerse *in vivo*, sin embargo se requiere más trabajo para confirmar lo anterior.

Otro punto importante por mencionar es que existen reportes en los que se ha demostrado que CAK1 debe unirse primero a CDK para activarla y después CDK forma complejos con CKS, debido a que cuando se forma el complejo CDK-CKS el residuo Thr160 queda inaccesible (Bourne *et al.*, 1996). Sin embargo en nuestro trabajo se contradice con esta propuesta, ya que nuestros resultados demuestran que se puede formar primero el complejo y posteriormente se activó con scCAK1; observando actividad de cinasa solo en las muestras que se agregó scCAK1.

9. CONCLUSIONES

- Se estableció y estandarizó una técnica para analizar interacciones *in vitro* con proteínas recombinantes.
- HsCKS1 interactúa con ZmCDKA;1 pero no con ZmCDKB1;1.
- CycD6;1 interactúa con CDKA y CDKB1;1
- ZmCycD6;1 estimula la unión de ZmCDKA;1 con HsCKS1.
- El complejo formado con HsCKS1 (ZmCDKA;1-ZmCycD6;1-HsCKS) estimula hiperfosforilación sobre ZmpRb.

10. PERSPECTIVAS

- Utilizar esta técnica para analizar otras interacciones con proteínas implicadas en el ciclo celular (KRPs, otro tipo de ciclinas, CDKs).
- Realizar los mismos experimentos utilizando ZmCKS1 y ZmCKS2 para tener una perspectiva más fisiológica.
- Reanalizar la actividad de fosforilación sobre ZmpRb utilizando (γ -³²P)-ATP.

11. REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Biología molecular de la célula*, Garland Science, 4ª edición, Nueva York, 2002.
2. Armenta-Ramírez A.B., *Modelo Insumo-Producto (Integración de la Matriz Insumo-Producto)*, Centro de Investigación y Posgrado de la División Académica de Ciencias Económico-Administrativas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México, 2007, pp. 372.
3. Asturias M.A., *Hombres de maíz*, Buenos Aires: Losada, 1949, pág. 4.
4. Axosco Marin J., *Complejos de CDKs/Ciclinas de maíz que se asocian a p13 suc1 durante las primeras 36 horas de imbibición*, UNAM, México D.F., Tesis de licenciatura 2014.
5. Azumi Y., Liu D., Zhao D., Li W., Wang G., Hu Y., Ma H., Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein, *EMBO J*, 2002; 21: 3081-3095.
6. Baíza A.M., Vázquez-Ramos J.M., Sánchez de Jiménez E., DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination, *J Plant Physiol*, 1989; 135: 416-421.
7. Beeckman T., Burssens S., Inze D., The peri-cell-cycle in Arabidopsis, *J. Exp. Bot.*, 2001; 52: 403-411.
8. Bewley J.D. and Black M., *SEEDS Physiology of development and germination*, 1º ed. New York: Plenum Press; 1985.
9. Boniotti M.B., Gutierrez C., A cell-cycle regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex., *Plant J.*, 2001; 28: 341-350.
10. Bornstein G., Bloom J., Sitry-Shevah D., Nakayama K., Pagano M., Hershko A., Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase, *J. Biol. Chem.*, 2001; 278: 25752–25757.
11. Bourne Y., Watson M.H., Hickey M.J., Holmes W., Rocque W., Reed S.I., Tainer J.A., Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein HsCKS1, *Cell.*, 1996; 84:863–874.

12. Brizuela L., Draetta G., Beach D., p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase, *EMBO J.*, 1987; 6:3507–3514.
13. Claverie J.M., Gene number. What if there are only 30,000 human genes?, *Science*, 2001; 291 (5507): 1255-1257.
14. Colli-Mull J.G., Rodríguez Zapata L.C., Castaño de la Serna E., El control del ciclo celular en plantas, *Ciencia*, 2007, 67-71.
15. Corellou F., Camasses A., Ligat L., Peaucellier G., Bouget F.Y., Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase, *Plant Physiol.*, 2005; 138: 1627–1636.
16. Cruz-Ramirez A., Diaz-Triviño S., Blilou I., Grieneisen V.A., Sozzani R., Zamioudis C., A Bistable Circuit Involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA Integrates Cues to Inform Asymmetric Stem Cell Division, *Cell*, 2012; 150: 1002-1015.
17. Dahl M., Meskiene I., Bögre L., Ha D.T.C., Swoboda I., *et al.*, The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle, *Plant Cell.*, 1995; 7: 1847-1857.
18. Dante Ricardo A., Sabelli Paolo A., Nguyen Hong N., Leiva-Neto João T., Tao Yumin, Lowe Keith S., Hoerster George J., Gordon-Kamm William J., Jung Rudolf and Larkins Brian A., Cyclin-dependent kinase complexes in developing maize endosperm: evidence for differential expression and functional specialization, *Planta*, 2014; 239: 493–509.
19. De Jager S.M., Maughan S., Dewitte W., Scofield S., Murray J.A., The developmental context of cell-cycle control in plants, *Semin Cell Dev. Biol.*, 2005; 16: 385-396.
20. De Veylder L., Segers G., Glab N., Casteels P., Montagu M.V., Inzé D., The Arabidopsis *CKS1* At protein binds the Cyclin-dependent kinases *Cdc2aAt* and *Cdc2bAt*, *FEBS*, 1997; 412: 446-452.
21. De Veylder L., Segers G., Glabb N., Casteels P., Van Montagu M., Inzeac D., The Arabidopsis *Cks1At* protein binds the cyclin-dependent kinases *Cdc2aAt* and *Cdc2bAt*, *FEBS Letters*, 1997; 412 : 446-452.

22. Del Rincón S.V., Widschwendter M., Sun D., Ekholm-Reed S., Tat J., Teixeira L.K., Ellederova Z., Grolieres E., Reed S.I. and Spruck C., Cks overexpression enhances chemotherapeutic efficacy by overriding DNA damage checkpoints, *Oncogen*, 2014; 1-17.
23. Dénes D., Mátyás C., Pál M., Gábor V.H., The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and development regulation, *Annual Plant Reviews*, 2007; 32: 1-25.
24. Dewitte W., Murray J.A.H., *Annu. Rev. Plant., Biol.* 2003; 54: 235– 264.
25. Draetta G., Brizuela L., Potashkin J., Beach D., Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*, *Cell*, 1987, 50:319–325.
26. Egan E.L., Solomon M.J., Cyclin-Stimulated Binding of CKS Proteins to Cyclin-Dependent Kinases, *Mol. Cell Biol.*, 1998; 18: 3659-3667.
27. Endicott J.A., Nurse P., The cell cycle and *Suc1*: from structure to function?, *Structure*, 1995; 3: 321-325.
28. Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J., Distel D., Hunt T., Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division, *Cell.*, 1983; 33: 389-396.
29. Fobert P.R., Gaudin V., Lunness P., Coen E.S., Doonan J.H., Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants, *Plant Cell.*, 1996; 8: 1465-1476.
30. Godínez-Palma S.K., García E., De la Paz Sánchez M., Rosas F., Vázquez Ramos J.M., Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination, *J. Exp. Bot.*, 2013; 1-11.
31. Godínez-Palma S.K., Vázquez Ramos J.M., Ciclinas D y CDKs en el inicio de la germinación de maíz. En: Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVII, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., 2013 p. 160-183.

32. Goodman M. M., Brown W. L., Races of corn, in *Corn and Corn Improvement*, edited by G. F. Sprague, and J. W. Dudley. American Society of Agronomy, Madison, WI, 1988; 39–74.
33. Harper J. Protein destruction: Adapting roles for Cks proteins, *Current Biology*, 2001, 11: R431-R435.
34. Herrera I., Sánchez M.P., Molina J., Plasencia J., Vázquez-Ramos J.M., Proliferating cell nuclear antigen expression in maize. Regulation by phytohormones during seed development and germination and its association with a putative cyclin D protein, *Physiol Plant*, 2000; 110: 127-34.
35. Hindley J., Phear G., Stein M., *et al.*, Suc1+ encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and directly involved in the division cycle of *Shizosaccharomyces pombe*, *Mol Cell Biol*, 1987; 50: 319-325.
36. Hirayama T., Imajuku Y., Anai T., Matsui M., Oka A., *Gene*, 1991; 105, 159-165.
37. Hirt H., Mink M., Pfosser M., Bögre L., Györgyey J., *et al.*, Alfalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs, *Plant Cell.*, 1992; 4: 1531-1538.
38. Kiesselbach T. A., *The Structure and Reproduction of Corn*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999.
39. Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling, *Proteomics*, 2011; 11: 319–323.
40. Klug W.S., Cummings M.R., *Conceptos de genética*, 1999. Prentice Hall.
41. La H., Li J., Ji Z., Cheng Y., Li X., Jiang S., *et al.*, Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa L.*), *Mol. Gen Genomics*, 2006; 275: 374-386.
42. Magyar Z., Mészáros T., Miskolczi P., Deák M., Fehér A., *et al.*, Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells, *Plant Cell.*, 1997; 9: 223-235.
43. McGrath A., Balog M., Köivomägi M., Lucena R., Mai V., Hirschi A., Kellogg D.R., Loog M., Rubin S.M., Cks confers specificity to phosphorylation-

- dependent CDK signaling pathways, *Nature structural & molecular biology* 2013; 12: 1407-1415.
44. Menges M., De Jager S.M., Gruissem W., Murray J.A., Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control, *Plant J.*, 2005; 41: 546-566.
 45. Menges M., Murray J.A., Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell cycle gene activity, *Plant J.*, 2002; 30: 203-212.
 46. Menges M., Pavesi G., Morandini P., Bogre L., Murray J.A.H., Genomic Organization and Evolutionary of Plant D-Type Cyclins, *Plant Physiol.*, 2007; 145: 1558-1576.
 47. Menges M., Samland A.K., Planchais S., Murray J.A., The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*, *Plant Cell.*, 2006; 18: 893-906.
 48. Muñoz Hernández J.E., Caracterización de la subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (CKS) de maíz durante la germinación, UNAM, México D.F. Tesis de licenciatura 2010.
 49. Nakamura T., Sanokawa R., Sasaki Y.F., Ayusawa D., Oishi M., Mori N., Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain, *Exp. Cell. Res.*, 1995; 221: 534-542.
 50. Nannas N.J., Kelly Dawe R., Genetic and Genomic Toolbox of *Zea mays*, *Genetics*, 2015; 199: 655–669
 51. Nonogaki H., Bassel G.W., Bewley J.D., Germination-still a mystery, *Plant Sci.*, 2010; 179: 574-581.
 52. Novack B., Csikasz-Nagy A., Gyorffy B., Chen K., Tyson J.J., Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions, *Biophys Chem.*, 1998; 72: 185-200.
 53. Nuget J.H., Alfa C.E., Young T., Hyams J.S., Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis, *J Cell Sci.*, 1991; 99: 669-674.

54. Ospina J.E., Características físico mecánicas y análisis de calidad de granos, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Agrícola, Bogotá, 2002; 18 y 19.
55. Patra D., Dunphy W.G., Xe-p9, a *Xenopus* suc1/CKS homolog, has multiple essential roles in cell cycle control, *Genes Dev*, 1996, 10:1503–1515.
56. Pines J., Cyclin and cyclin-dependent Kinases: a biochemical view, *Biochem J.*, 1995; 308: 697-711.
57. Porceddu A., Stals H., Reichheld J., Segers G., De Veylder L., Barrôco R.D., Casteels P., Van Montagu M., Inzé D., Mironov V., A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants, *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 36354-36360.
58. Rafalski A., Morgante M., Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size, *Trends Genet*, 2004; 20: 103–111.
59. Reichheld J.P., Chaubet N., Shen W.H., Renaudin J.P., Gigot C., Multiple A-Type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cell, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 13819, 13824.
60. Renaudin J.P., Doonan J.H., Freeman D., *et al.*, Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization, *Plant Mol Biol.*, 1996; 32: 1003-1018.
61. Reyes J., Jiménez-García L.F., González M., Vázquez-Ramos J.M., Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize, *Seed Sci Res*, 1991; 1:113-7.
62. Roudier F., Fedorova E., Györgyey J., *et al.*, Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein, *Plant J.*, 2000; 23: 73-83.
63. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2° ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
64. Shaw R. H., Climate requirement, in *Corn and Corn Improvement*, edited by G. F. Sprague, and J. W. Dudley. American Society of Agronomy, Madison, WI, 1988; 609–638 .

65. Sorrell D.A., Menges M., Healy J.M., Deveaux Y., Amano C., *et al.*, Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yel-low-2 cells, *Plant Physiol.*, 2001; 126: 1214-1223.
66. Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., Francis, D.A., A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 2002; 215: 518-522.
67. Spruck C., Strohmaier H., Watson M., Smith A.P., Ryan A., Krek T.W. *et al.*, A CDK- independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1, *Mol Cell.* 2001; 7: 639–650.
68. Spruck C.H., De Miguel M.P., Smith A.P., Ryan A., Stein P., Schultz R.M. *et al.*, Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis, *Science*, 2003; 300: 647–650.
69. Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., *et al.*, Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity developing endosperm, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4180-4185.
70. Tedesco D., Lukas J., Reed S.I., The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF (Skp2), *Genes Dev*, 2002; 16: 2946–2957.
71. Uemukai K., Iwakawa H., Kosugi S., *et al.*, Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity, *Plant Mol Biol.*, 2005; 57: 83-100.
72. Van Leene J., Hollunder J., Eeckhout D., Persiau G., Van De Slijke E., Stals H. *et al.*, Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Systems Biol.*, 2010; 6 (397): 1-12.
73. Vandepoele K., Raes J., De Veyler L., Rouzé P., Rombauts S., Inzé D., Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 2002; 14: 903-916.
74. Vandepoele K., Raes J., De Veyler L., Rouzé P., Rombauts S., Inzé D., Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 2002; 14: 903-916.

75. Vázquez J.M. La bioquímica como herramienta para el estudio de la germinación. En: Molina Moreno J, Estrada Gómez JA, Livera Muñoz M, González Hernández VA, editores. Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México. 1° ed. Chapingo, México: SOMEFI; 1990 p. 189-202.
76. Vázquez J.M., El ciclo celular: Modelos Animales y Vegetales. En Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Velázquez López I, Oria Hernández J (eds). Mensaje Bioquímico, Vol XXX, Depto Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., 2006 p. 57-75.
77. Vázquez J.M., Sánchez M.P., The cell cycle and seed germination, *Seed Sci Res*, 2003; 13: 113-130.
78. Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Phos-tag series, Introducing a phosphate affinity-based SDS-PAGE analysis for evaluation of the mobility shift of phosphorylated proteins, The key to analyzing phosphorylated molecules, NARD; Phos-Tag™ was developed by Department of Functional Molecular Science at Hiroshima University.
79. Wallace J., Larsson S., Buckler E., Entering the second century of maize quantitative genetics, *Heredity*, 2013; 112: 30–38.
80. Wang G.F., Kong H.Z., Sun Y.J., Zhang X.H., Zhang W., Altman N., *et al.*, Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins, *Plant Physiol.*, 2004; 135: 1084-1099.
81. Weimer A.K., Nowack M.K., Bouyer D., Zhao X., Harashima H., Nasser S., *et al.*, Retioblastoma related 1 regulates asymmetric cell divisions in Arabidopsis, *Plant Cell*, 2012; 24(10): 4083-4095.
82. Wen-Hui S., “The plant cell cycle: G1/S regulation”, *Euphytica*, 2001; 118: 223-232.
83. Zamora Zaragoza J. Estudio de la expresión a nivel de proteína de la ciclina Zeama;CycD6;1 durante la germinación de maíz (*Zea mays*), UNAM, México D.F. Tesis de licenciatura 2012.

84. Zamora Zaragoza J., Caracterización de la ciclina CycD6;1 de maíz y sus interacciones con otros reguladores del ciclo celular, UNAM, México D.F. Tesis de Maestría 2014.

12. APENDICE

Tabla 3.- Proporción de volumen resuspendido en PBS y el volumen de medio LB inducido. Para interacciones individuales se utilizó la proporción indicada en el recuadro rojo; para las interacciones con variación de volumen se utilizó la suma de todos volúmenes mencionados (aproximadamente 500 ml) de medio LB para inducir y se resuspendió en la suma del volumen de PBS mencionado (aproximadamente 152 ml), para su posterior distribución.

Volumen de medio LB (ml)	0.0033	0.033	0.165	0.33	3.3	33	66	99	132	165
Volumen de PBS usado para resuspender (ml)	0.001	0.01	0.05	0.1	1	10	20	30	40	50

```

HsCKs2 MAHKQIYYSDKYFDEHYEYRHVMLPRELSKQVPKTHLMSEEEWRRLGVQQSLGWVHYMIH 60
HsCKs1 MSHKQIYYSDKYDDEEFYRHVMLPKDIAKLVKTHLMSESEWRNLGVQQSQGWVHYMIH 60
ZmCKs1 --MGQIQYSEKYFDDTYEYRHVVLPPEVAKLLPKNRLLESENWRRAIGVQQSRGWVHYAIH 58
ZmCKs2 --MEQIQYSEKYDDTYEYRHVVLPPEVAKLLPRNILLSEKQWRLVGVQQSRGWVHYAIH 58
          **  **:* ** * : :*****:* ** ::* :*:. *:**:** :***** ***** **
  
```

```

HsCKs2 EPEPHILLFRRPLPKDQK----- 79
HsCKs1 EPEPHILLFRRPLPKPKK----- 79
ZmCKs1 RPEPHIMLFRRLNQQQEEAAA----- 82
ZmCKs2 RPEPHIMLFRRPINQQQEEAAAAHVLPK 88
          .*****:*****: . ::
  
```

Figura 22.- Comparación de las secuencias primarias deducidas de cDNAs de ZmCKs1, ZmCKs2, HsCKs1 y HsCKs2 (Muñoz, 2010).

SecA	Nombre	Tamaño (aa)	SecB	Nombre	Tam(aa)	Identidad %
1	ZmCKs1	83	2	ZmCKs2	88	85
1	ZmCKs1	83	3	HsCKs2	79	64
1	ZmCKs1	83	4	HsCKs1	79	60
2	ZmCKs2	88	3	HsCKs2	79	59
2	ZmCKs2	88	4	HsCKs1	79	56
3	HsCKs2	79	4	HsCKs1	79	81

Figura 23.- Determinación de % identidad entre ZmCKs1 y 2 vs HsCKs1 y 2 (Muñoz, 2010).

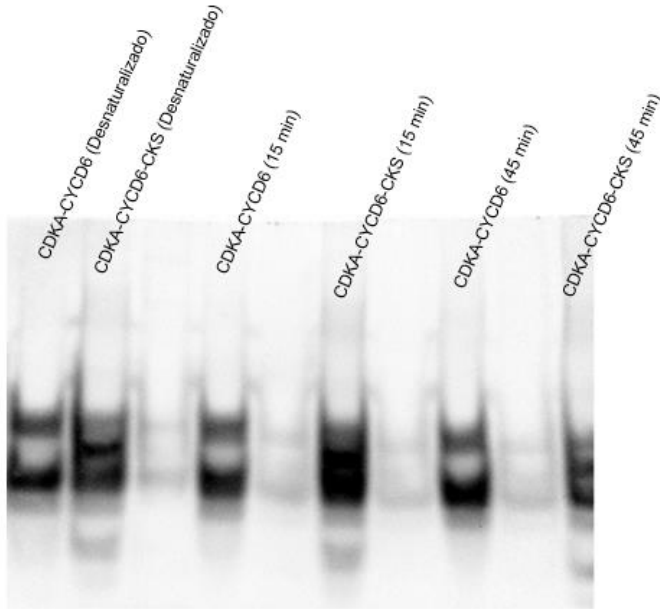


Figura 24.- No hay patrón diferencial de corrimiento de GST-ZmpRb en geles de Bis-tris sin Phos-tag: Western blot del ensayo de actividad, todos los carriles contienen al di o tri complejo como se señala en la figura, ATP (1mM), scCAK1 (3 μ M), GST-ZmpRb (5 μ M) y Buffer de actividad de cinasa la reacción se ensayó a 30°C por diferentes tiempos (0,15 y 45 min). El gel no contiene Phos-tag. La membrana fue revelada con anti Rb.

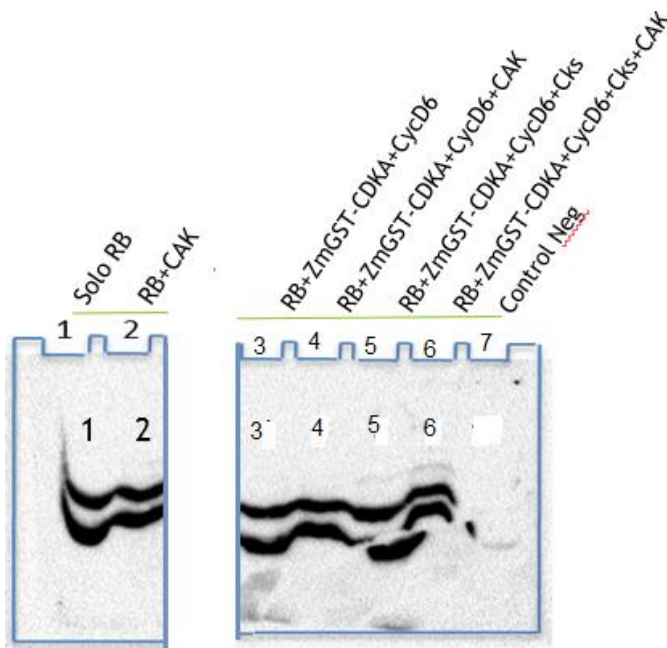


Figura 25.- Existe un patrón de corrimiento diferencial de GST-ZmpRb con Phos-tag en presencia y ausencia de scCAK cuando están presentes los complejos. Western blot del ensayo de actividad, ATP (1mM), GST-ZmpRb (5 μ M) y Buffer de actividad de cinasa la reacción se ensayó a 30°C. La membrana fue revelada con anti Rb. El control negativo es sin ZmpRb,

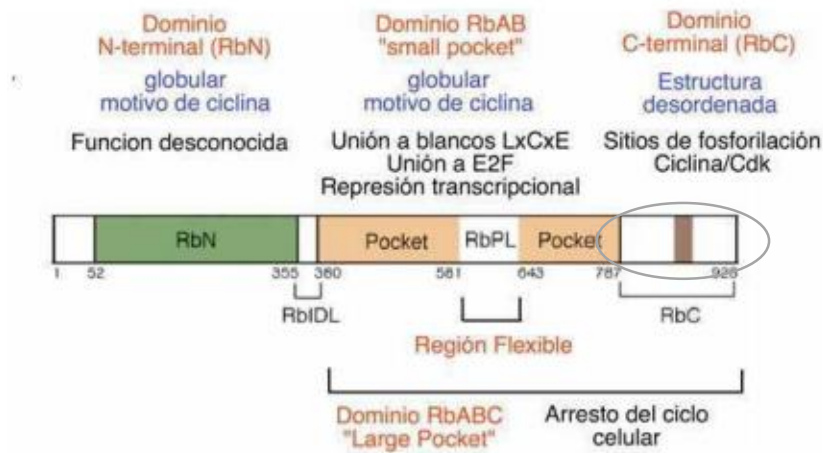


Figura 26.- Dominios de la proteína Rb. El esquema muestra los diferentes dominios de Rb, indicando su ubicación, tamaño, y las funciones mediadas por cada uno. Para este trabajo se utilizó solo el fragmento carboxilo encerrado en verde, proteína recombinante GST-ZmpRb, masa molecular (kDa) 37.