



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE CICLINAS ZMCyCB1;2 Y ZMCyCB2;1
EN EJES EMBRIONARIOS DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

María Fernanda Ayub Miranda

MÉXICO, D.F.

AÑO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JOSE PEDRAZA CHAVERRI**

VOCAL: **Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**

SECRETARIO: **Profesor: AURORA LARA NÚÑEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 114, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

AURORA LARA NÚÑEZ

SUSTENTANTE (S):

MARIA FERNANDA AYUB MIRANDA

Agradecimientos Académicos.

Se agradece al jurado integrado por los doctores:

JOSE PEDRAZA CHAVERRI

SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

AURORA LARA NÚÑEZ

Por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis y sus valiosas aportaciones en la misma.

A los apoyos económicos otorgados en los proyectos:

Conacyt CB220661

Conacyt 252001

PAIP ALN 5000 – 9130

PAIP JVR 5000 – 9124

PAPITT ALN IA201814

Sin los cuales no hubiera sido posible todo el desarrollo experimental efectuado en la realización de esta tesis.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El maíz	1
1.1.1 La semilla	2
1.1.2 Estructura de la semilla	3
1.2 Germinación de las semillas	4
1.2.1 Imbibición	4
1.2.2 Germinación	4
1.3 Ciclo celular	8
1.3.1 Regulación del ciclo celular	10
1.3.2 Ciclinas	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Ciclinas en plantas	13
2.1.1 Dominios de las ciclinas	14
2.1.2 Ciclinas B	15
2.1.3 Ubicación espacio-temporal de ciclinas B	16
2.1.4 CDKs y su interacción con ciclina B	17
3. HIPÓTESIS	22

4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1. Material biológico.....	23
5.1.1 Semillas de maíz	23
5.2. Métodos.....	23
5.2.1 Extracción de proteínas de eje embrionario o de tejido de maíz	23
5.2.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford	24
5.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE)	24
5.2.4 Western blot.....	25
5.2.5. Extracción de plásmidos.....	26
5.2.6. Gel de agarosa	26
5.2.7. Transformación de bacterias.....	27
5.2.8. Sobre expresión de proteína recombinante	27
5.2.9. Purificación de proteína, condiciones nativas.....	27
5.2.10. Ensayos de competencia	28
5.2.11. Inmunoprecipitados	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 Validación de anticuerpos	30
6.1.1. Western blot revelado con suero inmune y suero preinmune	30
6.1.2 Competencia de anticuerpos.....	31
6.2. Perfil de abundancia proteica.....	33

6.3 Ensayos de interacción in vivo entre ciclinas B, CDKs y otras proteínas	34
6.3.1 Ciclinas-CDKA y CDKB	34
6.3.2 Ciclinas-CDKs a diferentes tiempos durante la germinación y post-germinación ..	37
6.3.3. ZmCycB-KRP	39
6.3.3.1 Inmunoprecipitado ZmCycB2;1-KRP	40
6.3.4 ZmCycB-PCNA.....	41
6.3.4.1. ZmCycB2;1-PCNA.....	41
7. CONCLUSIONES	42
8. PERSPECTIVAS.....	43
APÉNDICE	44
Apéndice I. Ensayos de interacción <i>in vitro</i> entre CDKs-cilinas	44
Apéndice II. Membrana incubada con suero pre inmune y suero inmune	45
Apéndice III. Membranas completas empleadas para conocer el perfil de abundancia proteica.....	46
REFERENCIAS.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MAÍZ.	1
TABLA 2. CICLINAS B DE PLANTAS	16
TABLA 3. PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA DE LA SEMILLA MADURA DE MAÍZ	3
FIGURA 2. PROCESOS CELULARES ASOCIADOS A LA GERMINACIÓN.	6
FIGURA 3. FASES DEL CICLO CELULAR.	9
FIGURA 4. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE CICLINAS EN ARABIDOPSIS.	14
FIGURA 5. PERFIL DE ABUNDANCIA DE LA ZMCDKA1 Y ZMCDKB1;1 EN EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ	18
FIGURA 6. INTERACCIÓN Y ACTIVIDAD DE ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE CYCB1;1 Y CDKA EN <i>ARABIDOPSIS</i> .	19
FIGURA 7.1. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ZMCDKA1 CON ZMCYCB1;2 Y ZMCYCB2;1.	21
FIGURA 7.2. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ZMCDKB1;1 CON ZMCYCB1;2 Y ZMCYCB2;1.	21

FIGURA 8. WESTERN BLOT REVELADO CON EL SUERO PRE-INMUNE Y SUERO INMUNE DE LOS ANTICUERPOS GENERADOS.	30
FIGURA 9. COMPETENCIA DE ANTICUERPOS (ZMCYCB1;2).	31
FIGURA 10. COMPETENCIA DE ANTICUERPOS (ZMCYCB2;1).	31
FIGURA 11. PERFIL DE ABUNDANCIA PROTEICA DE ZMCYCB1;2 Y ZMCYCB2;1.	33
FIGURA 12. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> ZMCYCB CON ZMCDKA1.	35
FIGURA 13. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> ZMCYCB CON CDKB .	36
FIG 14. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> A DIFERENTES TIEMPOS DURANTE LA GERMINACIÓN ENTRE CDKA Y ZMCYCB.	37
FIG 15. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> A DIFERENTES TIEMPOS DURANTE LA GERMINACIÓN ENTRE CDKB Y ZMCYCB.	38
FIGURA 16. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> ENTRE ZMCYCB2;1 Y KRP.	40
FIGURA17. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> ENTRE ZMCYCB2;1 Y PCNA.	41

Apéndice

FIGURA 7.1. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ZMCDKA1 CON ZMCYCB1;2 Y ZMCYCB2;1. IMAGEN COMPLETA.	44
FIGURA 7.2. ENSAYOS DE INTERACCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ZMCDKB1;1 – ZMCYCB. IMAGEN COMPLETA.	45
FIGURA 8. WESTERN BLOT REVELADO CON SPI Y SI DE ZMCYCB. IMAGEN COMPLETA	45
FIGURA 11. MEMBRANAS EMPLEADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ABUNDANCIA PROTEICA DE AMBAS CICLINAS.	46

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
ATP	Adenosintrifosfato
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
Cyc	Ciclina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ET	Extracto proteico total
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IPTG	Isopropil-D- β -tiogalactopiranosido
kDa	Kilo dalton
KRP	Kip Related Proteins
LB	Luria-Bertani
O/N	Overnight / Toda la noche
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
SI	Suero inmune
SPI	Suero preinmune
TAE	Tris acetato-EDTA
TEMED	N,N,N,N, tetrametiloetilendiamina

Resumen

El ciclo celular es un acontecimiento esencial para la vida y los organismos regulan finamente los mecanismos que les permitirán asegurar la correcta duplicación y segregación de su genoma.

Existe una maquinaria perfectamente acoplada de proteínas que se encarga de regular la progresión entre las fases que componen al ciclo celular. Entre estas proteínas se encuentran las ciclinas, que son las subunidades reguladoras de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de los principales reguladores de la fase G1 y la transición G1/S del ciclo celular; sin embargo, el presente trabajo tiene por objetivo caracterizar a las denominadas ciclinas mitóticas o ciclinas B, presentes en la transición G2/M. Comenzando con la validación de los anticuerpos específicos generados para inmunodetectar a las ciclinas B1;2 y B2;1 de maíz (ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1) con ayuda de los cuales vislumbramos un máximo de concentración alrededor de las 18 y 24 horas, para ambas ciclinas, después de imbibir ejes embrionarios de maíz, aunque también fue posible observar un patrón diferencial entre ellas, pues la ZmCycB2;1 aumenta desde las 12 horas, disminuye a las 30 para volver a aumentar a las 36, mientras la ZmCycB1;2 mantiene el aumento únicamente entre 18 y 24 horas. También se hicieron inmunoprecipitados revelados con α -CDKA, α -CDKB, α -PCNA y α -KRP para estudiar la interacción de estas ciclinas con proteínas que participan en el ciclo celular.

En conclusión, las ciclinas B presentan un máximo de concentración alrededor de las 18 y 24 h. La interacción de ambas ciclinas B con CDKA y CDKB es diferencial, dependiente del tiempo de germinación y no se relaciona directamente con la abundancia de las proteínas en los tiempos estudiados. Además de que la ZmCycB2;1 resultó incapaz de unirse a KRP sin embargo es capaz de unirse a PCNA sugiriendo posibles funciones de esta ciclina en otras fases del ciclo celular.

1. Introducción

1.1 El maíz

Hace miles de años el territorio mexicano fue habitado por grupos nómadas que subsistían gracias a la caza y recolección. Posteriormente estos grupos desarrollaron prácticas agrícolas y entre las plantas que domesticaron se encuentra el teocintle (*Zea mays spp. parviglumis*), el cual por su cercanía filogenética es considerado como el ancestro silvestre del maíz (*Zea mays*). Así, la constante selección del teocintle con características deseadas produjo una especie fenotípicamente muy diferente pero genéticamente muy similar a su ancestro (Piperno *et al.* 2009; Vela 2011).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz. (Departamento de Agricultura, USA)
(<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ZEMA>)

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i>

Al igual que otros integrantes de la familia Poaceae (Tabla 1). El maíz se compone principalmente de follaje. El tallo, similar al bambú, es delgado y segmentado por juntas llamadas nodos, de los cuales sale una hoja en dirección opuesta a la que sale del nodo contiguo y el espacio entre ellos se denomina inter-nodo. A diferencia de la mayoría de las gramíneas, posee flores unisexuales, es decir, la inflorescencia masculina está separada de la inflorescencia femenina.

Cada año se cultiva más maíz que cualquier otro cultivo en la tierra; la producción global durante el año 2013 fue alrededor de 1 millón de toneladas (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>). Además de su impacto como alimento y combustible, el maíz ha sido ampliamente utilizado en estudios de genética desde que Darwin y Mendel realizaron observaciones con respecto a la herencia en el maíz (Dyer 1877; Coe 2001), desde entonces se ha ocupado como modelo para un sin fin de estudios, que van desde desarrollo hasta epigenética. Por ejemplo: se han identificado mutaciones sobre la síntesis de almidón, la composición de proteínas de reserva y la biosíntesis de carotenoides (Candela y Hake 2008).

Como modelo de estudio tiene muchas ventajas. Posee más diversidad fenotípica que cualquier otro modelo, el hecho de que las inflorescencias femeninas y masculinas estén separadas facilita el control de las cruces, además una sola planta puede proveer gran cantidad de progenie. Existen diversas colecciones de germoplasma fácilmente accesibles alrededor del mundo, los más notables se encuentran en México (CIMMYT) con 28,000 muestras de maíz y teosintle (CIMMYT, <http://www.cimmyt.org/es/banco-de-germoplasma>), Estados Unidos (USDA-ARS) y Francia (INRA); (Wallace, Larsson y Buckler 2014).

1.1.1 La semilla

Las semillas son muy diversas en forma y tamaño, son el medio por el cual el nuevo individuo es dispersado y casi siempre provienen de la reproducción sexual. Contienen al embrión, el cual está rodeado por una estructura protectora que a su vez brinda nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) durante las primeras etapas de desarrollo. Así, el éxito de la planta estará determinado entre otras cosas por el tiempo, el lugar y el vigor de la semilla que germinará, el cual está ligado a factores fisiológicos y bioquímicos de la misma.

La importancia de éstas no es sólo biológica, puesto que ahí se encuentra toda la maquinaria para poder desarrollar una nueva planta, si no también económica y social. Se estima que en el mundo casi tres cuartas partes de alimento provienen

directamente de semillas, y muchos componentes importantes de la dieta son elaborados a partir de las mismas.

Las semillas, como las conocemos hoy son el resultado de una selección milenaria por parte de los agricultores que elegían aquellas provenientes de plantas con características deseables, posteriormente el entendimiento genético y bioquímico de las mismas trajo consigo mejoras en la calidad y cantidad de las semillas que se cosechan actualmente.

1.1.2 Estructura de la semilla

El grano de maíz es clasificado como una cariósida, es el fruto típico de las gramíneas (Poaceae).

La cariósida posee tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 1).

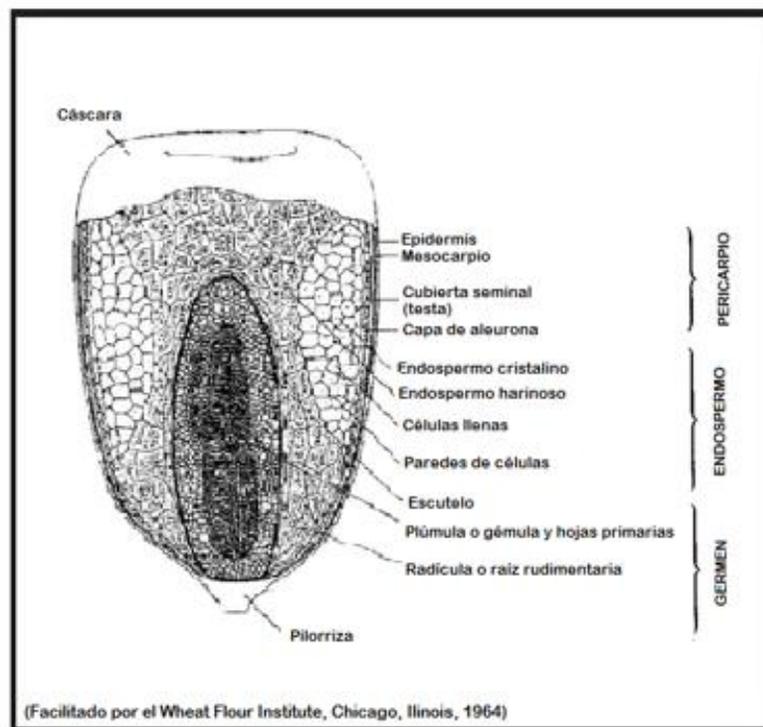


Figura 1. Anatomía de la semilla madura de maíz vista de frente. Modificado de Hosney, 1992.

Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. El pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente 87%. El endospermo, en cambio contiene un nivel elevado de almidón 87%, aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas relativamente bajo. El embrión se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas 33%, aproximadamente 20% de proteínas y minerales (FAO, <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s03.htm>).

El pericarpio consiste en la pared transformada del ovario que cubre a la semilla y actúa como protección del embrión y el endospermo. Constituye la parte estructural más externa del grano, su espesor normalmente varía de 60 a 80 μm , el cual está formado por un tejido denso y correoso.

El endospermo y el embrión representan genéticamente a la siguiente generación ya que poseen material genético de las líneas paterna y materna, a diferencia del pericarpio, que por derivar de la pared del ovario, es genéticamente de origen materno (Bewley y Black 1985; Zamora-Zaragoza 2015).

1.2 Germinación de las semillas

1.2.1 Imbibición

La absorción de agua por las semillas es un paso esencial para el inicio de la germinación y se denomina imbibición. La cantidad de agua absorbida durante la imbibición es generalmente baja y consta de dos a tres veces el peso de la semilla seca. Para el subsecuente crecimiento de la semilla que involucra el establecimiento de los sistemas de la raíz y el tallo se requiere de una mayor cantidad de agua (Bewley y Black 1985).

1.2.2 Germinación

Es una secuencia de eventos que dan como resultado la transformación de un embrión en estado quiescente en una plántula, aunque esto no depende de la germinación únicamente, Es complicado dar una definición exacta de germinación

debido a que el límite donde la misma termina y comienza el desarrollo posterior de la planta es poco claro. En el ámbito agronómico se tiene por término de la germinación el momento en que la plántula emerge de la superficie del suelo, mientras que desde el punto de vista de la fisiología vegetal, la germinación comprende únicamente hasta la elongación del eje embrionario, generalmente en el extremo radicular, lo cual se hace visible cuando éste atraviesa la cubierta de la semilla (Bewley y Black 1985).

En nuestro grupo de trabajo nos hemos enfocado a estudiar el ciclo celular durante la germinación del maíz, por lo cual hemos adoptado una definición de la germinación basada en procesos bioquímicos y celulares. Definiéndola como la serie de eventos bioquímicos que llevan a las células a la consecución del primer ciclo celular completo en las zonas meristemáticas y a la multiplicación celular restante (Vázquez-Ramos y Sánchez 2003). Dichos procesos incluyen la hidratación de membranas y demás estructuras celulares, reactivación de proteínas y ribosomas, aumento de la actividad respiratoria, síntesis de macromoléculas, elongación celular, es decir, aquellos involucrados en el paso desde una semilla quiescente, casi totalmente deshidratada y con un metabolismo casi nulo a una semilla con metabolismo muy activo que resulta en el crecimiento del embrión (Bewley and Black, 1985; Vázquez-Ramos 1990). La hipótesis que surge de nuestra definición es que una vez que las células de una semilla reactivan el metabolismo celular y completan la primera ronda de división celular, la semilla puede continuar los procesos de proliferación y crecimiento durante el desarrollo según su propio programa genético y así dar lugar a la planta. Por lo tanto, el término de la germinación es precisamente la culminación de la primera ronda de divisiones celulares exitosas en los meristemas (Vázquez-Ramos y Sánchez 2003).

En la Figura 2 se relacionan los procesos de la célula en función al tiempo y la entrada de agua, teniendo entonces que la absorción inicial de agua, imbibición, durante la Fase I es un proceso principalmente físico; la actividad fisiológica comienza unos minutos después de que la célula se ha hidratado, después de que todos los tejidos de la semilla son embebidos por completo. Durante la Fase II el

contenido de agua es prácticamente constante y la actividad metabólica incrementa con la transcripción sustancial de nuevos genes. La protrusión de la radícula a través de las estructuras aledañas marca el fin de la germinación y en la Fase III hay otra toma importante de agua que, en conjunto con una mayor utilización de reservas, permite estabilizar a las plántulas (Bewley 2013).

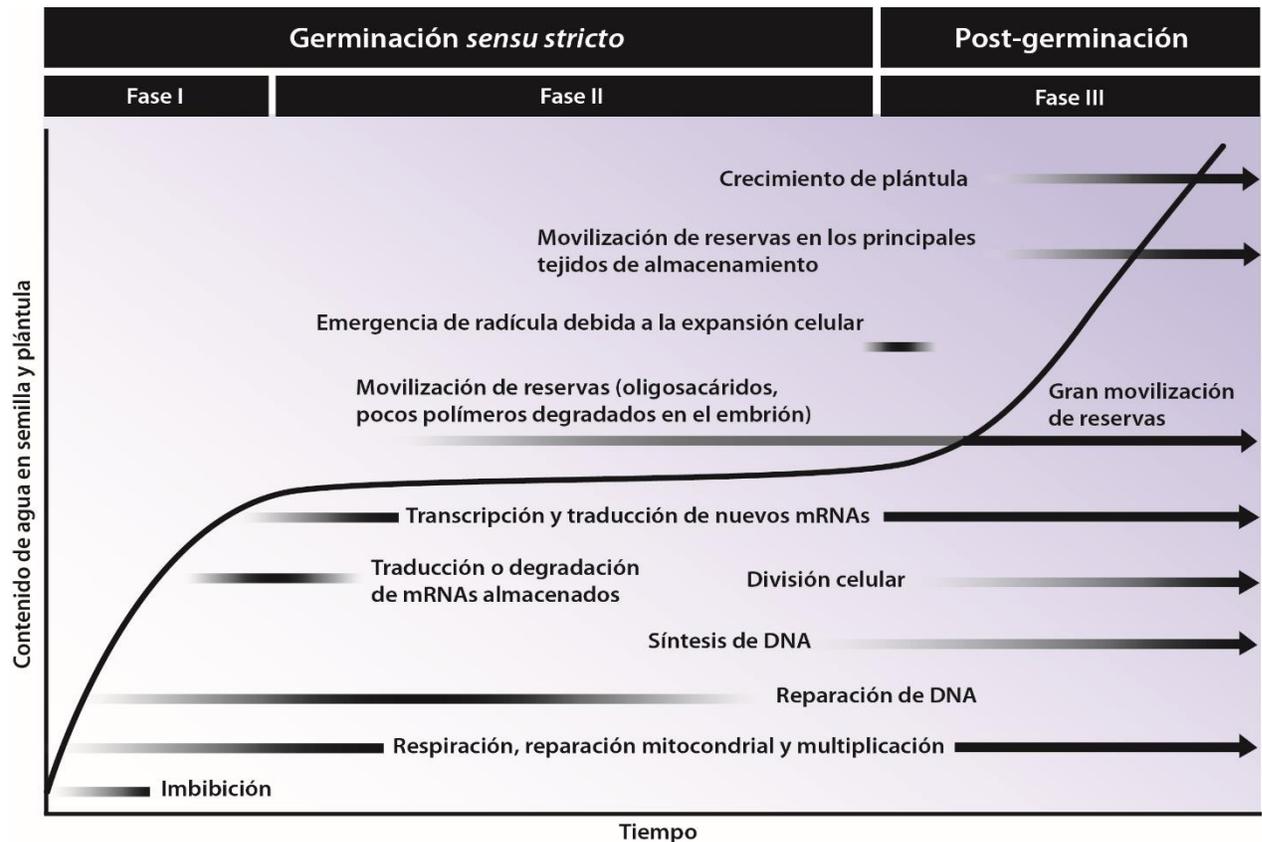


Figura 2. Procesos celulares asociados a la germinación. El esquema relaciona procesos de la célula en función al tiempo y a la entrada de agua a la semilla. (Modificado de Nonogaki *et al.*, 2010).

Es importante remarcar que antes de la germinación, el desarrollo de las semillas puede ser dividida en dos fases conceptualmente diferentes:

La primera es un periodo de morfogénesis durante el cual el eje embrionario se establece a través de divisiones celulares muy activas, los órganos del embrión y otros tejidos son formados. (Goldberg, de Paiva y Yadegari 1994; Meinke 1995; West y Harada 1993).

La segunda es un periodo subsecuente de maduración, comprendido por la detención del ciclo celular en los tejidos y de la formación de órganos, la acumulación de nutrientes de reserva, cambios en el tamaño y peso del embrión (por la pérdida de agua) y finalmente, la supresión de la germinación temprana. Las semillas también adquieren tolerancia a la desecación, deshidratación y quiescencia, y en algunas especies, la inducción de la dormancia (Koornneef, Bentsink y Hilhorst 2002).

Se ha visto que en semillas secas de *Arabidopsis thaliana*, las células del embrión quedan arrestadas en la fase G1 del ciclo celular (Bewley y Black 1994). En semillas de jitomate se estudió mediante citometría de flujo el contenido de ADN en el núcleo y por inmunodetección la presencia de β -tubulina, los resultados indicaron que la mayoría de las células se encontraban arrestadas en G1 (de Castro *et al.* 1998). De igual manera la mayoría de las células embrionarias de maíz quedan arrestadas en G1 (Georgieva, López-Rodas, y Loidl 1993). En nuestro grupo se ha reportado que, a 25°C en oscuridad, el ciclo celular se reactiva estando aún en esta fase durante las primeras 6 horas posteriores a la imbibición, mientras que la fase S comienza cerca de las 12 horas y entre 28 y 32 horas después de la imbibición se observan células en fase M, coincidiendo esto con la protrusión de la radícula en nuestro modelo (Baíza *et al.* 1989; Reyes *et al.* 1991; Herrera *et al.* 2000).

Por lo anterior es posible estudiar a las proteínas que participan en el ciclo celular durante la germinación, se sabe que las células de ejes embrionarios no embebidos poseen niveles visibles de todas las proteínas analizadas que son consideradas propias del ciclo celular como las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), ADN polimerasas, ADN ligasas, entre otras (Lara-Núñez, De Jesús, y Vázquez-Ramos 2008). Incluso, algunas de ellas no sufren modificaciones en dichos niveles a lo largo del proceso germinativo, como por ejemplo, las ADN polimerasas y las CDKs, aunque sí se observan cambios en su actividad (Vázquez-Ramos y Sánchez 2003). Algunas ciclinas, aunque no todas, muestran un comportamiento fluctuante durante la

germinación, con una correlación parcial con su actividad de cinasa asociada (Lara-Núñez, De Jesús, y Vázquez-Ramos 2008, Godínez-Palma *et al.* 2013).

1.3 Ciclo celular

La vida como la conocemos hoy es producto de repetidas rondas de crecimiento y división celular. El ciclo celular es un proceso complejo que involucra numerosas regulaciones de proteínas que dirigen a la célula a través de eventos específicos que culminan en la mitosis y la consecuente producción de dos células hijas, en principio, con la misma cantidad de material celular. De todos los componentes intracelulares, la célula presta más atención al material genético, ADN, pues este debe ser estrictamente duplicado y repartido de manera exacta en las dos células hijas, asegurando así la propagación de una copia completa del genoma de la especie.

Puesto que el ADN es vital para el individuo, la célula ha desarrollado un complejo control de su duplicación, preparándose para duplicar el ADN si el medio contiene los nutrientes necesarios para hacerlo, diseñando elaborados mecanismos que permiten corroborar su correcta duplicación, así como complejos sistemas de reparación de daños. Una célula sana hará todo lo posible por no dividirse hasta que la copia de este material sea perfecta.

Esta serie ordenada de eventos de duplicación del material genético (replicación) y su posterior segregación, junto con el material celular restante, en las células nuevas se denomina ciclo celular, y en él recae la principal función de todo ser vivo: la reproducción (Alberts *et al.* 2002).

Metabólicamente, el ciclo celular puede verse como una sucesión de la fase de replicación y crecimiento celular (interfase), y la fase de segregación equitativa del ADN (mitosis). Sin embargo, las células eucariontes poseen un sistema de regulación del ciclo celular mucho más complejo y fino que las células procariontes y presentan fases intermedias de regulación entre la replicación del ADN y su segregación en dos diferentes núcleos (Zamora-Zaragoza, 2015), estas fases

intermedias pueden ser divididas en tres fases (G_1 , S y G_2), las cuales constituyen la interfase (Figura 3).

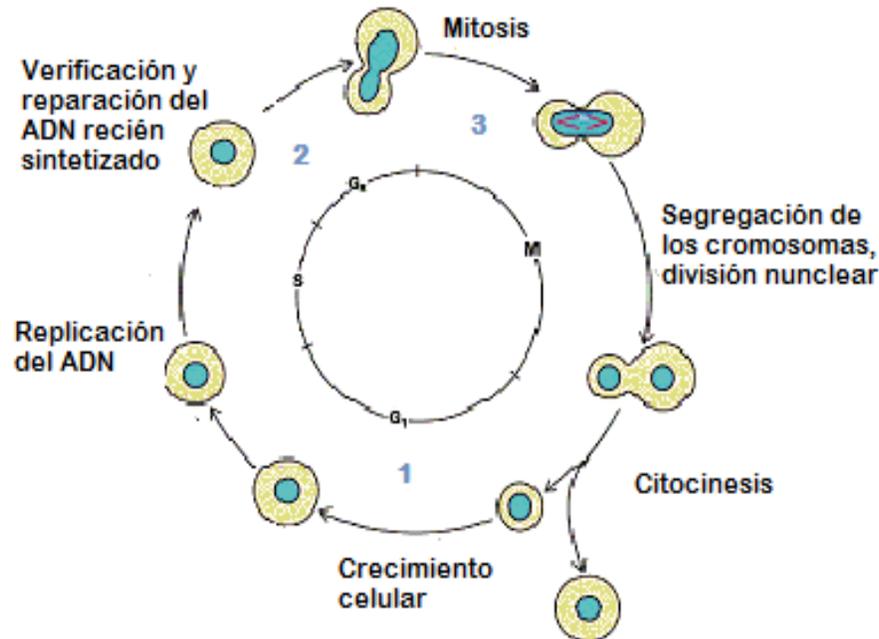


Figura 3. Fases del Ciclo celular. Existen tres puntos de control, 1. En G_1 para evaluar las condiciones del entorno, 2. En G_2 donde se verifica la integridad del ADN recién sintetizado. 3. Durante la metafase para verificar la alineación de los cromosomas en el plano metafásico antes de entrar en anafase. Las etapas previas a la mitosis (G_1 , S y G_2) son conocidas como la interfase. (Modificada de Modeling the Budding Yeast Cell Cycle, Tyson J. *et al.*, 2003)

En la primera fase (G_1) la célula sensa las condiciones intra y extra celulares (por ejemplo, disponibilidad de nutrientes), sólo si la célula considera que éstas son óptimas para comenzar y finalizar la ronda, el ciclo sigue adelante, de lo contrario se detiene o entra en apoptosis. Posterior a G_1 se encuentra la fase de Síntesis de ADN, fase S, en donde el material genético se duplica. Finalmente el genoma recién sintetizado entra a una fase de control, fase G_2 en donde se asegura la integridad y duplicidad del genoma para que en la fase M (mitosis) pueda repartirse en dos núcleos. Cuando el material genético queda repartido en ambos núcleos, ocurre la separación del citoplasma y sus componentes mediante un proceso llamado

citocinesis, para derivar en dos nuevas células (Alberts *et al.* 2002, Vázquez-Ramos y Sánchez 2003).

1.3.1 Regulación del ciclo celular

El control y regulación de los eventos de proliferación en eucariontes se llevan a cabo a todo lo largo del ciclo celular; sin embargo existen tres puntos de regulación muy estrictos, ampliamente estudiados. La transición de la fase G1 hacia la fase S, la transición de G2 a M y la transición de la metafase a la anafase durante la mitosis donde todos los cromosomas condensados deben alinearse en el ecuador de la célula antes de poder segregarse (Vázquez – Ramos y Sánchez, 2003).

La progresión del ciclo celular y su regulación están determinadas por distintas proteín-cinasas de serina y treonina que requieren la unión de una subunidad regulatoria llamada ciclina (Cyc) para poder activarse, y por lo tanto son denominadas cinasas dependientes de ciclinas, CDKs.

Las ciclinas y las CDKs forman un complejo heterodimérico que se encarga de regular la transición entre las diferentes fases del ciclo celular por medio de fosforilaciones activadoras o inhibitorias. El principio básico de la progresión del ciclo celular es un equilibrio entre síntesis y destrucción de ciclinas que provee ondas en la actividad de las CDKs dirigiendo así el ciclo a través de las transiciones G1/S y G2/M (Nieuwland, Menges y Murray 2007). Estas degradaciones se dan en tiempos específicos sobre componentes necesarios de la fase que concluyó, de manera que la célula no puede regresar a dicha fase y, por lo tanto, el ciclo adquiere una secuencia unidireccional de sus fases (King *et al.* 1996).

La comprensión de los mecanismos que siguen los principales reguladores del ciclo celular (Cyc-CDKs) en el organismo, ha contribuido a la comprensión general de cómo se llevan a cabo los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular en espacio y tiempo.

El estudio del ciclo celular y su regulación en el desarrollo de las plantas es de gran interés dado que existen enormes diferencias con los procesos de desarrollo en

animales. Por ejemplo, en animales la morfología de los individuos depende del desarrollo embrionario y el desarrollo post-embrionario involucra proliferación de células prácticamente diferenciadas durante una etapa corta de la vida donde el individuo crece y posteriormente la proliferación cesa casi por completo en la mayoría de los tejidos; en cambio, la morfología de las plantas depende mucho más del desarrollo post-embrionario, y durante toda su vida, requieren continuamente de divisiones celulares en los meristemas seguidas de procesos de diferenciación para originar nuevos órganos reiterativamente (Nieuwland, Menges y Murray 2007).

El descubrimiento de las ciclinas en huevos de erizo de mar por Tim Hunt y su equipo en 1983, proporcionó la pista fundamental que apuntaba hacia los mecanismos bioquímicos que regulan el ciclo celular en eucariontes (Evans *et al.* 1983; Novak *et al.* 1998). Fueron descritas como unas proteínas cuyos niveles de acumulación fluctuaban durante el ciclo celular, es a ello que deben su nombre, es decir, a su aparición transitoria y cíclica (Evans *et al.*, 1983), en la actualidad se denominan ciclinas a aquellas proteínas que tienen una región conservada en su dominio, llamada “caja ciclina”, región en donde se encuentra el dominio de unión a CDKs. (Hunt 1991; Pines 1995) Aunque no necesariamente todas las proteínas con este dominio participan en la regulación del ciclo celular.

Al principio sólo se conocían dos tipos de ciclinas, unas correspondientes a la regulación de la fase S (llamadas ciclinas A) y otras correspondientes a la fase M (denominadas ciclinas B), posteriormente se demostró que estas ciclinas se asociaban a una subunidad cinasa, que más tarde se denominaría Cdk1 (Lohka, Hayes y Maller 1988).

1.3.2 Ciclinas

Hoy se conoce una gran variedad de ciclinas y CDKs en animales, levaduras y plantas. Y se sabe que la asociación entre ciclinas-CDKs es clave en la regulación de proteín-cinasas de serina y treonina. La unión de las ciclinas es una poderosa herramienta ya que la CDK es inactiva sin la asociación de éstas, es por eso que regulando la síntesis, destrucción o localización de las ciclinas se puede regular la

actividad de las CDKs, así como la unión de diferentes ciclinas con la misma CDK modifica las funciones de esta última. Se debe tener en cuenta que este tipo de regulación mediante ciclina-CDKs no es exclusiva del ciclo celular ya que este mecanismo también se encuentra involucrado en la transcripción y respuesta a la disponibilidad de fosfato (Lenburg y O'Shea 1996; Fisher y Nurse 1996).

La aparición de las ciclinas se rige por diversos factores. Las ciclinas que controlan la transición G1/S son generalmente responsables de reconocer señales externas como hormonas y carbohidratos, o señales internas como tasa de crecimiento o tamaño de la célula, estas ciclinas usualmente son proteínas inestables que rápidamente se degradan por vía del proteosoma, esto combinado con la expresión regulada por tales señales, conduce a su rápida desaparición una vez que el estímulo es eliminado. Dicho comportamiento es típico de las ciclinas D.

Por otro lado las ciclinas presentes durante la fase S (ciclinas A) y las ciclinas mitóticas (ciclinas B) muestran una síntesis y destrucción que es regulada dependiendo de la fase del ciclo celular, es decir, su abundancia depende del momento en que se encuentra la célula en el ciclo celular más que en señales extrínsecas (Nieuwland, Menges y Murray 2007).

2. Antecedentes

Las plantas son organismos que necesitan adaptarse de una manera flexible, debido a que no pueden moverse hacia condiciones ambientales más favorables, y han desarrollado elaborados mecanismos de respuesta a daños, condiciones adversas, frío, calor, etc. Uno de estos mecanismos involucra un control extremadamente regulado del ciclo celular y su progresión. Las semillas pueden permanecer en un estado de dormancia, que es un fenómeno natural de algunas semillas que no germinan aunque tengan la capacidad de hacerlo, por largos periodos hasta que las condiciones sean favorables para su crecimiento. Las ciclinas juegan un papel fundamental en esta regulación.

2.1 Ciclinas en plantas

Para nombrar a las ciclinas de plantas, es necesario escribir la primer letra del género y la primer letra del nombre específico, por ejemplo, Zm para *Zea mays*. Seguidas de las letras CYC y una letra más para designar la familia a la que pertenece la ciclina, por ejemplo, ZmCYCB. Posteriormente un número para designar el subgrupo al que pertenece (ZmCYCB1) y un número de gen específico, ZmCYCB1;2 (Nieuwland, Menges y Murray 2007).

Las ciclinas de plantas comparten homología génica con las clases A-, B-, C-, H- y L- de mamíferos aunque los subgrupos de estas clases no están conservados entre plantas y animales (Renaudin *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis* 50 homólogos de ciclinas han sido identificadas y divididas en 9 clases con 23 subgrupos y dos ciclinas adicionales CYCQ1;1 y otra proteína tipo ciclina CYL;1 (Figura 4); (Abrahams *et al.*, 2001; Nieuwland, Menges y Murray 2007).

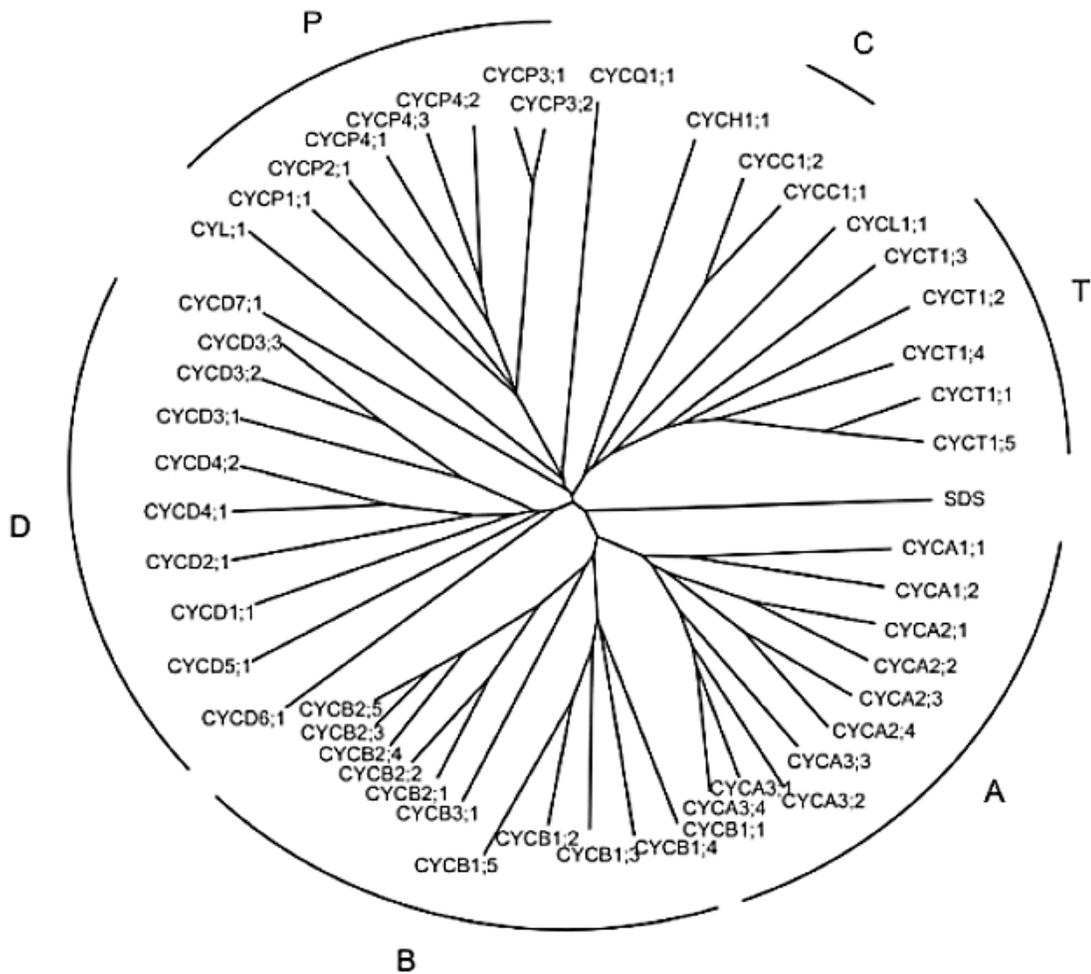


Figura 4. Árbol Filogenético de ciclinas de Arabidopsis (Nieuwland, Menges y Murray 2007).

En arroz han sido encontradas 50 ciclinas divididas en las siguientes clases: A-, B-, C-, D-, H-, L-, SDS-, Q-, T-, P- y F-. Mientras que comparte con *Arabidopsis* las primeras 10 clases, la última (F-) no ha sido encontrada en *Arabidopsis* ni en otra especie (La *et al.*, 2006).

2.1.1 Dominios de las ciclinas

Las ciclinas tienen una región conservada de 250 aminoácidos que a su vez contiene dos dominios: N (amino) y C (carboxilo); (Nugent *et al.*, 1991). El dominio N abarca la región de unión a CDKs, tiene 100 aminoácidos y es conocido como la

caja de ciclinas (cyclin box). El dominio C es menos conservado, lo que sugiere una actividad específica pero no crítica del mismo.

Algunas ciclinas también poseen una caja de destrucción (D-box), misma que está presente en todas las ciclinas A- y B- excepto CYCA3;3, CYCB2;5 y CYCB3;1 (Wang *et al.* 2004).

Por último, la mayoría de las ciclinas poseen un motivo PEST que parece conferir inestabilidad a las ciclinas (Rechsteiner y Rogers 1996; Wang *et al.* 2004).

2.1.2 Ciclinas B

Las ciclinas B fueron las primeras ciclinas en ser aisladas de plantas (Hata *et al.* 1991; Hemerly *et al.*, 1993), están fuertemente relacionadas con las ciclinas A en cuanto a la secuencia de aminoácidos. Han sido subdivididas en 3 clases: CYCB1, CYCB2 y CYCB3 (Renaudin *et al.*, 1996; Vandepoele *et al.*, 2002), CYCB1 y CYCB2 existen en mono y dicotiledóneas mientras que las CYCB3 no han sido reportadas en monocotiledóneas aún (Wang *et al.*, 2004; Nieuwland, Menges y Murray, 2007). La secuencia típica de las ciclinas B (H/Qx(K/R/Q)(F/L) ha sido identificada en todas las ciclinas B de *Arabidopsis* (Nieuwland, Menges y Murray 2007).

En cuanto a su función, en 1996 se observó que las CYCB de plantas está conservada en animales por medio de una micro-inyección de ARNm de NtCYCB1;1 en ovocitos de *Xenopus*. NtCYCB1;1 fue suficiente para revertir el arresto natural de G2/M de los mismos (Qin *et al.*, 1996). La expresión ectópica de CYCB1;1 en *Arabidopsis* estimuló la división celular en raíz, resultando en una tasa de crecimiento más rápida (Doerner *et al.*, 1996). Por otro lado la expresión ectópica de CYCB1;2 fue capaz de inducir divisiones celulares en tricomas de *Arabidopsis*, células que normalmente entran a endoreduplicación, sin embargo la expresión ectópica de CYCB1;1 no logró inducir divisiones celulares en tricomas, indicando que ambas CYCB1 de plantas son capaces de promover la transición de G2 a M pero sugiriendo que existen funciones especializadas para cada ciclina B (Schnittger *et al.*, 2002).

Las CYCB2 parecen controlar la progresión hacia la mitosis, ya que la expresión ectópica de la CYCB2 de alfalfa en tabaco provoca la entrada prematura de las células a mitosis (Weingarter *et al.*, 2003). Mientras que en arroz la CYCB2 mostró asociación con la CDKB2;1 mitótica, además de colocalizar con los cromosomas de células en metafase y luego desaparecer una vez que las células atraviesan la misma (Lee *et al.* 2003). La asociación a los cromosomas y la destrucción después de la metafase fue previamente descrita para dos CYCB1 de tabaco (Criqui *et al.*, 2000).

En la Tabla 2. Se enlistan algunas ciclinas B conocidas en plantas:

Tabla 2. Ciclinas B de plantas (Nieuwland, Menges y Murray 2007)

Nombre de la ciclina	Locus ID	Nombre de la ciclina	Locus ID	Nombre de la ciclina	Locus ID
AtCYCB1;1	At4g37490,X62279	OsCYCB1;3	X76122	LeCYCB1;1	AJ243454
AtCYCB1;2	At5g06150,L27223	OsCYCB1;4	X76123	PhCYCB1;1	AJ250315
AtCYCB1;3	At3g11520,L27224	OsCYCB1;5	X62820,Z26331	CrCYCB1;1	D86386
AtCYCB1;4	At2g26760	OsCYCB2;1	X62303	NtCYCB1;2	D50737
AtCYCB1;5	At1g34460	OsCYCB2;2	D50871	PcCYCB1;1	L34207
AtCYCB2;1	At2g17620,Z31400	MsCYCB2;1	Z37978	LeCYCB1;1	AJ011108
AtCYCB2;2	At4g35620,Z31400	AmCYCB1;1	Y08992	ZmCYCB1;1	U10079
AtCYCB2;3	At1g20610	AmCYCB1;2	Os01g17400	ZmCYCB1;2	U10078
AtCYCB2;4	At1g76310	GmCYCB1;1	Os02g41720	ZmCYCB1;3	U66608
AtCYCB2;5	At1g20590	GmCYCB1;2	Os05g41390	ZmCYCB2;1	U10076
AtCYCB3;1	At1g16330	GmCYCB1;3	Os04g47580	LeCYCB2;1	AJ243455
OsCYCB1;1	Os01g59120	NtCYCB1;1	Os06g51110	MsCYCB2;2	X82040,X68741
OsCYCB1;2	Os02g55680	NsCYCB1;1	X82039	MsCYCB2;3	X78504

2.1.3 Ubicación espacio-temporal de ciclinas B

En 1999 se realizó la inmunodetección de cuatro ciclinas cuya abundancia aumentaba durante la división celular, usando maíz como modelo (ZmCycA1;1 ZmCycB1;1, ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1) y la proteína-cinasa Cdc2a (Conocida en la actualidad como CDKA). Se inmunodetectaron en células en división del tejido de la raíz; en células cuya división había cesado en la región primaria del meristemo; en células que reanudaron la división en la formación de la raíz lateral de los

primordios y en células cuya división celular fue inducida mediante una herida. La ZmCycB1;2 fue la única proteína de las examinadas que estuvo restringida a tejidos en división por lo que se consideró un factor limitante de la división celular, mientras las demás declinaron un poco después de que las células completaron la división. Por otro lado la ZmCycB1;2 decayó rápidamente en núcleo y citoplasma posterior a la división; en células que no se dividían Cdc2a y ZmCycB1;1, ZmCycA1;1 y ZmCycB2;1 persisten, indicando que hay ciclinas en plantas estrechamente relacionadas con la división celular y otras que persisten, especialmente en el núcleo en células que no se dividen.

La transición de la división a la diferenciación pareciera dispararse con el decremento de las proteínas del ciclo celular, especialmente con la disminución de las ciclinas en el citoplasma.

En la reanudación de la división celular durante la formación de las raíces laterales y en respuesta a daño se observó un aumento en la concentración nuclear y una baja en la concentración citoplasmática de la ciclina ZmCycB2;1 sugiriendo un rol de ésta en la transición de la fase G₀/G₁ (Mews *et al.*, 2000).

2.1.4 CDKs y su interacción con ciclina B

Como se mencionó con anterioridad las CDKs actúan diferencialmente en las etapas del ciclo celular de plantas, poseen sitios de unión a ATP y a su sustrato dentro de la región catalítica, la cual se encuentra entre los lóbulos formados por los dominios N-terminal y C-terminal. La unión de la ciclina estabiliza al sitio catalítico (Joubés *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de la unión de la ciclina, el sitio activo de la CDK permanece restringido por una estructura de asa llamada "loop T", la cual al ser fosforilada en un residuo conservado de treonina (T160) cambia su conformación para permitir la correcta unión del sustrato y el acceso al grupo γ -fosfato del ATP al sitio activo. Esta fosforilación activadora en T160 está a cargo de una Cinasa Activadora de CDK (Cak) (Dewite y Murray, 2003).

En *Arabidopsis* se conocen dos tipos de CDK, que conducen a la célula a través de la mitosis, CDKA y CDKB. Dentro del tipo A se conoce a *Arath;CDKA;1*, nombrada

inicialmente como *Atcdc2a* (Ferreira *et al.*, 1991); y muestra un dominio PSTAIRE que se encuentra perfectamente conservado entre las CDKs tipo A.

La clase B, que es única de plantas, fue descubierta poco después y nombrada *Atcdc2b* inicialmente (Joubés *et al.*, 2000). En *Arabidopsis* las CDKs B comprenden a la *Arabidopsis*; *CDKB1;1, B1;2, B2;1* y *B2;2*. Las CDKs B1 y B2 se distinguen de las CDK A debido a que muestran una divergencia evolutiva en el dominio PSTAIRE por PPTLARE o PPTLRE (Imajuku *et al.*, 1992).

En *Arabidopsis* la *CDKA1;1* es expresada desde la fase S hasta la mitosis y exhibe dos picos de actividad enzimática, durante G1/S y durante G2/M (Porceddu *et al.* 2001) Mientras que para la *CDKB* no se conocen con exactitud sus sustratos ni su función (Francis, 2011).

De las CDKs en maíz, fue reportado recientemente en el laboratorio que la abundancia de *CDKA* se mantuvo constante durante la germinación, mientras que la *CDKB* mostraba un pico a las 18 horas (Figura 5). La regulación en la actividad de cinasa de la *CDKA* se debió a la asociación diferencial con distintas ciclinas, preferencialmente ciclinas tipo D, modificando su actividad de cinasa. La asociación con *CDKA* y *CDKB* también resultó diferencial para cada ciclina, (Godínez – Palma *et al.*, 2013).

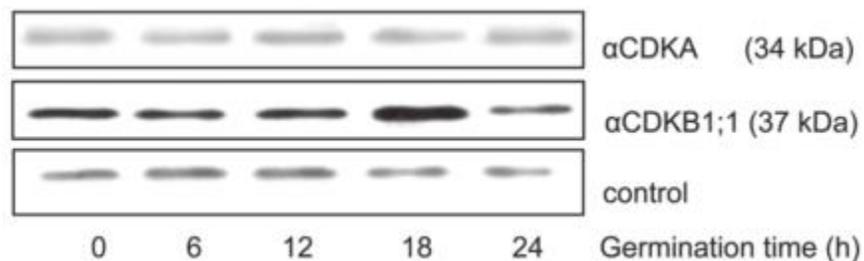


Figura 5. Perfil de abundancia de la ZmCDKA1 y ZmCDKB1;1 en ejes embrionarios de maíz (Godínez-Palma *et al.* 2013).

Cabe mencionar que las CDKs pueden funcionar también fuera del ciclo celular y regular otros procesos. Por ejemplo, *CDKA*, además de su función regulatoria de la

interfase, juega un papel importante en el control de la dinámica de los microtúbulos y por lo tanto, en la progresión de la mitosis (Steinborn *et al.*, 2002).

En cuanto a la interacción y actividad de las CDKs con las ciclinas B, se realizaron ensayos *in vitro* con CDKA;1 y CDKB2;1 de *Arabidopsis* para comprobar si había interacción con la CYCB1;1, mediante inmunoprecipitados, así como ensayos de cinasa con los mismos complejos utilizando Histona H1 como sustrato de fosforilación. Se observó interacción de la CYCB1;1 con ambas CDKs y estos complejos fueron activos (Figura 6).

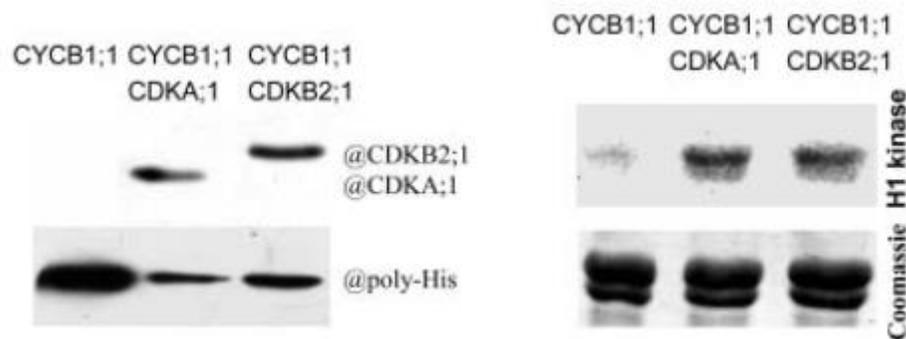


Figura 6. Interacción y actividad de ensayos *in vitro* de CYCB1;1 y CDKA de *Arabidopsis*. A la izquierda se observa que la CYCB1;1 interacciona tanto con CDKA como con CDKB, a la derecha se observan los ensayos de actividad de cinasa, encontrando que ambos complejos son activos (Weingartner 2003).

En nuestro grupo de trabajo se produjeron dos anticuerpos contra ciclinas B, uno para la ZmCycB1;2 y otro para la ZmCycB2;1, entre ambas proteínas existe 35% de identidad aproximadamente y el extremo carboxilo no se parece, debido a esto se diseñaron anticuerpos contra ese extremo para aumentar la especificidad.

Se estudió la identidad entre ZmCycB1;1 y ZmCycB1;2, en la última se encontró una secuencia de 16 aminoácidos en el extremo carboxilo que no compartía con la ZmCycB1;1, por lo tanto el anticuerpo fue diseñado contra este péptido (RVALHPPAPAALPDLV) evitando así el reconocimiento de ambas proteínas. El código de acceso para la obtención de la secuencia de ZmCycB1;2 es: **GRMZM2G034647_P01**.

Para el diseño del anticuerpo contra la ciclina ZmCycB2;1 se utilizó una secuencia del extremo carboxilo (YAAKSEPATFLFDA) que no compartía con la otra ciclina, aumentando así su especificidad; el código de acceso de donde se obtuvo la secuencia de esta proteína es: **GRMZM2G073671_T01**.

Además contamos con tres construcciones, una para un péptido de 16 aminoácidos para ZmCycB1;2, así como para las proteínas completas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 (Lara-Núñez, Datos no publicados).

Con estas herramientas se realizaron experimentos *in vitro* para analizar interacción de las proteínas recombinantes ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 con CDKA y CDKB. Dicha interacción se observó *in vitro* entre las CDKS y ambas ciclinas cargando las mismas fracciones en membranas diferentes y revelándolas contra su respectivo anticuerpo, si en la fracción de elución se observa la banda correspondiente al peso de la proteína esperada tanto para la CDK como para la ciclina, existe coelución y por lo tanto se asume que hay interacción Figuras 7.1 y 7.2.

Los pesos esperados para cada proteína son: ZmCDKA 34 kDa, ZmCDKB 37 kDa, ZmCycB1;2 aproximadamente 60 kDa y ZmCycB2;1 aproximadamente 40 kDa.

Los resultados sugieren que la unión *in vitro* entre CDKA y ZmCycB1;2 es casi nula. (Figura 7.1a) mientras que la unión CDKA - ZmCycB2;1 es fuerte (Figura 7.1d).

Los ensayos con CDKB revelaron asociación con ambas ciclinas aunque la unión con ZmCycB2;1 es mayor (Figuras 7.2b y 7.2d); (Neri, Datos no publicados).

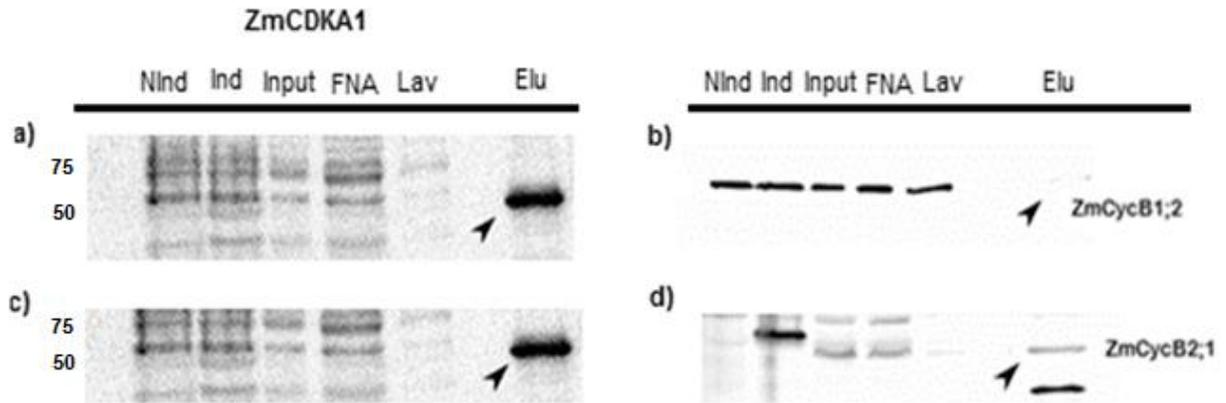


Figura 7.1. Ensayos de interacción *in vitro* de la ZmCDKA1 con ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1. Se probó la capacidad de asociación entre ZmCDKA1 con dos ciclinas B en columnas de afinidad. Se inmovilizaron en cada membrana diferentes fracciones, Nind cultivo no inducido; Ind cultivo inducido; Input (20µL de la fracción que se agrega a la columna); FNA fracción no absorbida; Lav lavado de la columna; Elu elución de la columna de afinidad. Ver figura completa en el Apéndice I (Neri 2015, Datos no publicados).

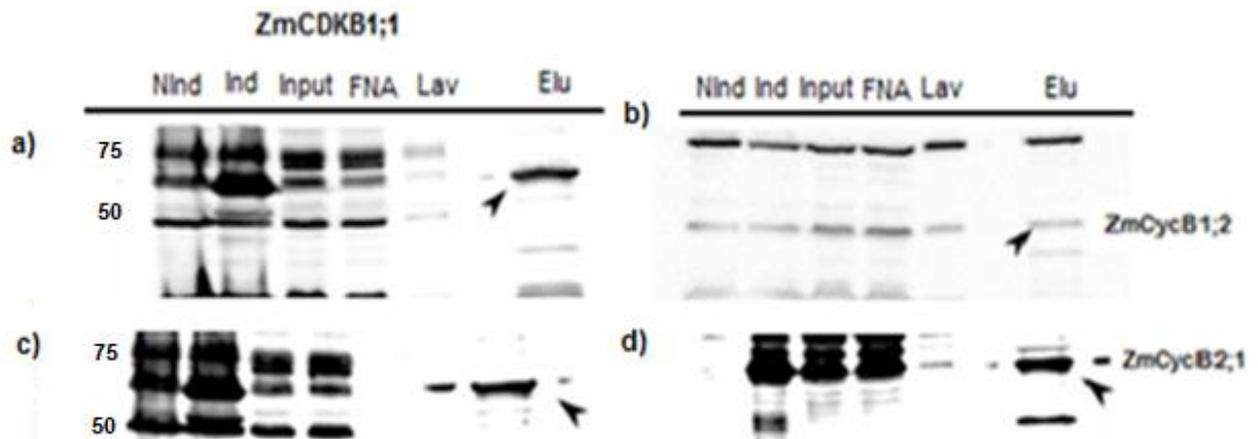


Figura 7.2. Ensayos de interacción *in vitro* de la ZmCDKB1;1 con ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1. Se probó la capacidad de asociación entre ZmCDKB1;1 con dos ciclinas B en columnas de afinidad. Se inmovilizaron en cada membrana diferentes fracciones, Nind cultivo no inducido; Ind cultivo inducido; Input (20µL de la fracción que se agrega a la columna); FNA fracción no adsorbida; Lav lavado de la columna; Elu elución. Ver figura completa en el Apéndice I (Neri, Datos no publicados).

3. Hipótesis

Las ciclinas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 participan en la transición G₂-M, por lo que ambas presentarán un pico de abundancia en horas tardías de la germinación del maíz. Estas ciclinas podrán asociarse con CDKA, CDKB así como con otras proteínas del ciclo celular.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar las ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 durante la germinación de maíz.

4.2 Objetivos particulares

- Producir proteína recombinante para la validación de los anticuerpos.
- Determinar el patrón de abundancia de ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 durante la germinación de ejes embrionarios.
- Analizar, mediante inmunoprecipitados, la asociación entre las ciclinas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 y otras proteínas del ciclo celular (CDKA, CDKB, PCNA y KRP).

5. Metodología

5.1. Material biológico

5.1.1 Semillas de maíz

Para los ensayos se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays var. Chalqueño*, cosecha 2012) almacenados a 4°C.

Los ejes embrionarios son extraídos cuidadosamente de semilla seca con el uso de bisturí, se desinfectan con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% y se lava tres veces con agua desionizada estéril. Los ejes se secan por 10 min en papel absorbente estéril y se colocan en cajas Petri de vidrio, estériles o desechables, con papel filtro Whatman estéril y se agrega solución amortiguadora de imbibición que incluya sacarosa al 2%. Las cajas se incuban a 25°C a distintos tiempos de germinación.

5.2. Métodos

5.2.1 Extracción de proteínas de eje embrionario o de tejido de maíz

Aproximadamente 0.25 g de ejes embrionarios fueron colocados en un mortero previamente enfriado a -20°C, donde se homogeneizan con el amortiguador de extracción de proteínas (70 mM Tris – HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 75 mM NaCl, 25 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM ditioneitol (DTT), 01% Tritón X-100, sacarosa 2%, una tableta de coctel inhibidor de proteasas y una de inhibidor de fosfatasas). Las muestras se centrifugan a 6000 g, se retira la grasa que por diferencia de densidades se concentró en la superficie y se alícuota el sobrenadante para guardar a -70°C hasta su uso. La proteína se cuantifica por el método de Bradford en placa y se lee en un lector de placas de Elisa (EPOCH, Bio Tek®).

5.2.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

En una placa para ELISA, se realizó la curva patrón con concentraciones crecientes de BSA, se adicionó el agua necesaria para que el volumen final de agua y BSA fueran 62 μL , posteriormente se adicionaron 10 μL de amortiguador de extracción. Para la muestra se hicieron diluciones 1:4, 1:8 y 1:16 (o hasta que se encontrara dentro del rango de la curva); se adicionaron 10 μL de muestra y 62 μL de agua. Finalmente se adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford tanto a la curva como a la muestra, se dejó incubar la placa durante cinco minutos y posteriormente se leyó a 595 nm en un lector de placas de Elisa (EPOCH, Bio Tek[®]).

5.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

En un tubo Falcon de 50 mL se colocaron los reactivos indicados en la tabla 3 para la preparación del gel separador, se mezclaron y vertieron entre dos vidrios para electroforesis (1 mm de grosor), se adicionó 1 mL de agua destilada para evitar la formación de burbujas en la superficie del gel así como para facilitar la polimerización, se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Al término, se retiró el agua y se vertió la mezcla del gel apilador, cuya composición se encuentra en la tabla 3. Se colocó el peine separador de carriles y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente se retiró el peine y se eliminaron los residuos de acrilamida de los pozos con una espátula.

Tabla 3. Composición de las soluciones para la preparación del gel de poliacrilamida.*

Gel separador 12%		Gel apilador 5%	
Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8)	4.0 mL	Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8)	0.81 mL
Tris-HCl 0.75 M pH 8.8	2.5 mL	Tris-HCl 0.75 M pH 6.8	1.7 mL
Agua destilada	3.44 mL	Agua destilada	2.5 mL
Persulfato de amonio 10%	50 µL	Persulfato de amonio 10%	50 µL
TEMED	7 µL	TEMED	10 µL

| 25

*Cantidades calculadas para la preparación de 2 geles.

Una vez polimerizados, los geles se montaron en una cámara de electroforesis de Bio Rad® y se agregó amortiguador de electrodos, tris-glicina-SDS 1x (Sambrook et al., 1989). Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga para obtener una concentración 1x (SDS 2%, glicerol 4%, Tris-HCl pH 6.8 40 mM, azul de bromofenol 0.01%, con o sin β-mercaptoetanol 2 mM, dependiendo la muestra) y calentando a 90°C durante 5 minutos.

5.2.4 Western blot

Para los ensayos de Western blot se realizaron SDS-PAGE 12% como se indicó en el apartado 5.2.3 y se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Millipore) previamente activadas sumergiéndolas 30 segundos en metanol 100%, posteriormente se sumergieron 1 minuto en agua destilada para retirar el exceso de metanol, una vez transcurrido el tiempo se equilibraron las membranas en el amortiguador de transferencia húmeda (Tris 25 mM-glicina 192 mM pH 8.3 y metanol 20%).

Mientras tanto en el casete de transferencia se acomodó una esponja, dos capas de papel filtro (Wathman, Cat: 3030917) húmedas, la membrana activada, el gel de

poliacrilamida, dos capas de papel filtro y otra esponja, todo lo anterior fue humedecido previamente con amortiguador de transferencia 1x.

Se colocaron los casetes en el porta casetes y se transfirió bajo un campo eléctrico de 350 mA durante una hora. Al término de la transferencia las membranas fueron retiradas y bloqueadas con una solución de PBS 1X-Tween 20 0.1% y 5% leche desengrasada durante media hora mínimo en agitación. Pasado el tiempo se retiró la solución de bloqueo y se adicionó una solución con la misma composición de PBS 1X-Tween 20 0.1% y 5% leche con la alícuota del anticuerpo primario correspondiente, que se dejó incubar O/N en agitación a 4°C.

Terminado el tiempo de incubación se hicieron tres lavados el primero con PBS 1X, seguido de un lavado de PBS 1X-Tween 20 0.1% con NaCl 2% y finalmente PBS 1X, cada uno de 15 minutos.

Las membranas lavadas se colocaron en una disolución 5% de leche en PBS-Tween20 0.1% con una alícuota del anticuerpo secundario anti-conejo (ThermoScientific, Cat: 31460) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente se humedecieron las membranas con 0.5 mL de la solución de detección por quimioluminiscencia (ThermoScientific, Cat: 32106). El revelado se hizo en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad®).

5.2.5. Extracción de plásmidos

La extracción de plásmido se realizó con el kit comercial Zyppy™PlasmidMiniprep Kit (ZYMO RESEARCH, Cat: D4019). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.6. Gel de agarosa

En un matraz de 500 mL se agregó 30 mL de TAE 1X y 0.3 g de agarosa, se pesó y tapó el matraz. La mezcla se calentó en microondas aproximadamente 50 segundos hasta ebullición para solubilizar los cristales. Se permitió que el matraz se enfriara y se pesó para completar con agua destilada el agua perdida durante la solubilización de los cristales. Una vez que el matraz alcanzó una temperatura

aproximada de 60 °C se adicionó bromuro de etidio en concentración final de 0.2 µg/mL, se homogenizó y se vació en la base para geles, previamente sellada con cinta para evitar derrames. Tras colocar el peine y se permitió la gelificación. El gel se cargó y corrió a 80 volts con TAE 1x.

5.2.7. Transformación de bacterias

Se agregó 1µL de plásmido a las células transformantes (*E. coli* BL21 CodonPlus-RIL) y se incubaron 30 minutos en hielo. Finalizada la incubación se dio un choque térmico 30 segundos a 42°C. Seguido de una incubación de cinco minutos en hielo tras la cual se adicionó 1mL de medio LB sin antibiótico y se dejó en agitación una hora 37°C; 300 µL fueron plaqueados en una caja con Kanamicina (30 µg/µL) y se incubaron O/N a 37°C.

5.2.8. Sobre expresión de proteína recombinante

Una vez seleccionadas con kanamicina 30 µg/µL, la expresión de la proteína recombinante se indujo adicionado IPTG a una concentración final de 0.1mM a un cultivo bacteriano de *E. coli* BL21CodonPlus-RIL con una densidad óptica de 0.6 - 0.8 a 600 nm de longitud de onda. Después de la adición de IPTG se dejó incubando 3 h a 37°C en agitación constante (250 g), se pusieron en hielo 5 minutos y luego se centrifugaron las células a 3584 g durante 15 minutos a 4°C. La expresión de la proteína recombinante se verificó con un SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie.

5.2.9. Purificación de proteína, condiciones nativas

Se descongeló el pellet, obtenido en el paso 5.2.8, en hielo 15 minutos y se re suspendió en amortiguador de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 10 mM pH 8.0; 2-5 mL por gramo de peso húmedo).

Al finalizar el tiempo de incubación la mezcla fue sonicada en hielo 10 segundos por 1 minuto de reposo, mínimo 3 veces, seguido de una centrifugación del lisado a 11200 g por 30 minutos a 4°C.

El sobrenadante se mezcló con una matriz de Ni-NTA (Qiagen, Cat: 30210) al 50% (1 mL de Ni-NTA por cada 4 mL de lisado), durante 60 minutos a 200 rpm a 4°C.

Se acondicionó una jeringa de 5 mL con una capa delgada de fibra de vidrio para retener las perlas de Ni-NTA que fueron adicionadas antes de la incubación de 60 minutos con el lisado. Se removió la tapa de la jeringa y se colectó el eluyente en tubos eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 8 mL de amortiguador de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, pH 8.0), el eluyente fue colectado en tubos eppendorf.

Finalizados los lavados se agregaron 5 mL de amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM , pH 8) Se colectó el eluyente en tubos eppendorf, la proteína purificada se recuperó de las primeras fracciones.

5.2.10. Ensayos de competencia

En tubos eppendorf de 1.5 mL se adicionó 0.5 mL PBS 1X, anticuerpo primario 1:2000 más la cantidad de proteína recombinante deseada, 500 μg para la concentración máxima y 50 μg para el caso de la concentración mínima. Para el control de competencia negativo se mezcló en un tubo eppendorf la misma dilución de anticuerpo con 500 μg de BSA, por último se adicionó en otro tubo PBS 1X con anticuerpo como otro control. Se incubaron a 4°C, O/N en un rotador de tubos (Boekel, modelo: 260750).

Por otra parte 10 μg de extracto proteico total de 24 horas fueron transferidos en una membrana de nitrocelulosa, terminando la transferencia se cortaron los carriles de cada fracción proteica fijada y se realizó Western blot a cada fracción como se indica en el apartado 5.2.4, cada una de estas fracciones fue incubada con la mezcla de anticuerpo primario – proteína recombinante correspondiente y el anticuerpo secundario se utilizó en una dilución 1:20 000.

5.2.11. Inmunoprecipitados

En tubos eppendorf de 1.5 mL se agregaron 20 μ L de Agarosa – Proteína A (Sigma Aldrich[®], Cat: P7786) lavados 3 veces con 0.5 mL de PBS 1X, se adicionaron 0.6 mL de PBS 1X y se incubaron a 4°C O/N en un rotador de tubos (Boekel, modelo: 260750).

Mientras tanto 5 μ L de anticuerpo y 300 μ g de ET se adicionaron a 0.5 mL de PBS 1X y se incubaron en el mismo rotador que la proteína A y el PBS O/N a 4°C.

Finalizada la incubación se descartó el PBS de la proteína A y se agregó el anticuerpo junto con el ET previamente incubados a los tubos que así lo requerían. Se dejaron rotando por tres horas a temperatura ambiente y se prosiguió a realizar 3 lavados con 0.5 mL de PBS-Tritón 1% y uno con PBS. Se recuperaron las perlas y fueron re-suspendidas en 100 μ L de amortiguador de elución suave (SDS 0.2% (w/v), Tween 20 0.1% (v/v) y Tris-HCl 50 mM, pH 8.0) Se incubaron 7 minutos a 25°C en el rotador. Se removió el sobrenadante y fue transferido a un tubo de 1.5 mL. Se realizó otra incubación con el amortiguador de elución suave. Al finalizar ésta se recuperó el sobrenadante y se juntó con el anterior.

Los tubos se centrifugaron a 3584 g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y fue transferido a un tubo con 1 mL de acetona a -20°C que fue incubada a -20°C O/N para precipitar la proteína. Tras centrifugar a 3584 g/ 5 min a 4°C se removió el sobrenadante y se dejó secar por cinco minutos. El pellet fue re-suspendido en amortiguador de carga y se realizó un Western blot.

6. Resultados

6.1 Validación de anticuerpos

Como se mencionó anteriormente, se obtuvieron anticuerpos contra las ciclinas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 (Lara-Núñez, Datos no publicados) que no habían sido validados. En la Figura 8 se fijaron a una membrana de nitrocelulosa 50 µg de extracto proteico total (ET) y 10 µg de proteína recombinante (PR), la membrana se cortó dejando dos carriles con ET por sección y fueron incubados por separado con Suero pre-inmune (SPI) y Suero Inmune (SI) de los animales empleados para la producción de anticuerpos.

6.1.1. Western blot revelado con suero inmune y suero preinmune

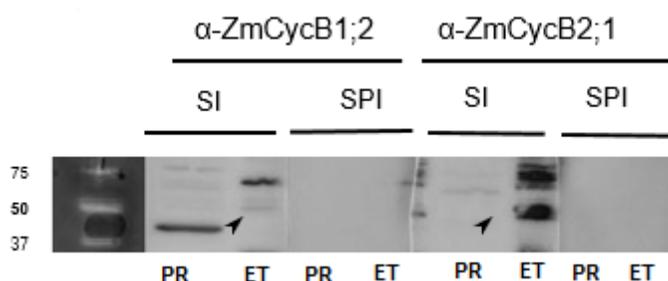


Figura 8. Western blot revelado con el suero pre-inmune y suero inmune de los animales empleados para producir α -ZmCycB1;2 y α -CycB2;1. En la membrana se inmovilizó la proteína recombinante correspondiente (PR) y extracto proteico total (ET) de 18 horas. Membrana completa Apéndice II.

Se observa que en las fracciones incubadas con SPI no hay reconocimiento de alguna proteína, mientras que las incubadas con SI muestran un patrón de bandedo, debido a la inmunización exitosa.

6.1.2 Competencia de anticuerpos.

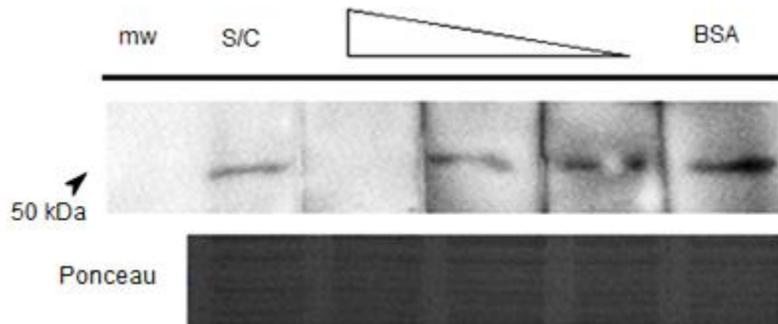


Figura 9. Competencia de la proteína recombinante ZmCycB1;2 con su respectivo anticuerpo, de izquierda a derecha: marcadores moleculares (mw); Anticuerpo sin competir ; Anticuerpo competido con 500 μg de proteína recombinante; Anticuerpo competido con 50 μg de proteína recombinante; Anticuerpo competido con 5 μg de proteína recombinante; competencia con 500 μg de BSA.

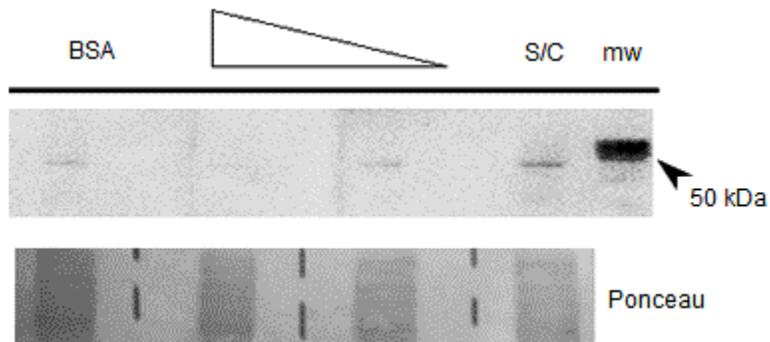


Figura 10. Competencia de la proteína recombinante ZmCycB2;1 con su respectivo anticuerpo, de izquierda a derecha: competencia con 125 μg de BSA; Anticuerpo competido con 125 μg de proteína recombinante; Anticuerpo competido con 12.5 μg de proteína recombinante; Anticuerpo sin competir y los marcadores moleculares.

Tanto en la competencia del anticuerpo contra ZmCycB1;2 como en la competencia del anticuerpo contra ZmCycB2;1 se inmovilizaron 10 µg de extracto total a la membrana, el título del anticuerpo primario que se usó fue de 1:2000 para ambos casos y la competencia se realizó toda la noche a 4°C.

En las Figuras 9 y 10 podemos observar el decremento en la intensidad de la banda conforme aumenta la cantidad de proteína recombinante con la que se compitió al anticuerpo correspondiente. Este es el comportamiento esperado ya que al competir un anticuerpo con la proteína recombinante se forma un complejo Anticuerpo-proteína muy estable, lo cual evita el reconocimiento entre dicho anticuerpo y la proteína endógena del maíz que se fijó en la membrana, disminuyendo de este modo la señal emitida.

Aunque la competencia se realizó con las mismas condiciones, al principio, para ambos anticuerpos, el anticuerpo de la ciclina B1;2 no mostraba decrementos tan evidentes con la cantidad de proteína recombinante utilizada inicialmente (125 y 12.5 µg) por lo que se decidió probar con cantidades mayores para resaltar la competencia.

6.2. Perfil de abundancia proteica

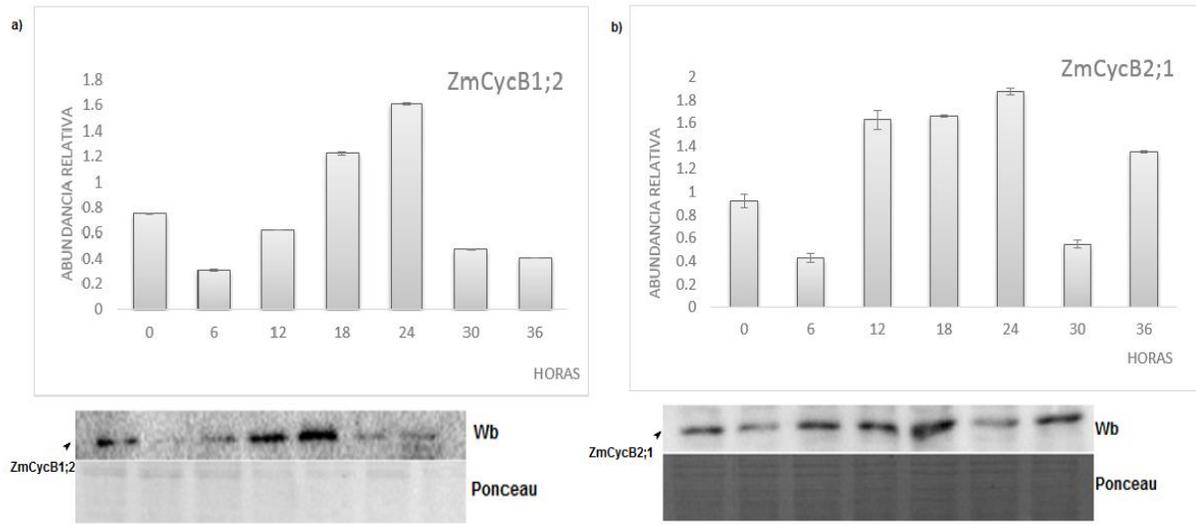


Figura 11. Perfil de abundancia proteica de ambas ciclinas a diferentes horas después de la imbibición de ejes embrionarios de maíz. Se cargó 50 µg de proteína total en cada carril. En la figura a) se graficó la abundancia de ZmCycB1;2 (experimento por triplicado). En la parte inferior se muestra el Western resultante y su control de carga correspondiente. En la figura b) se graficó la abundancia de ZmCycB2;1 (experimento por triplicado). En la parte inferior se muestra el Western resultante y su control de carga correspondiente. Membranas completas utilizadas para generar los gráficos en el Apéndice III.

Se realizó un perfil de abundancia para cada una de las ciclinas estudiadas con el fin de conocer las fluctuaciones de éstas conforme progresa la germinación y el ciclo celular (figura 11) ya que, según la literatura revisada, las ciclinas de la familia B se presentan principalmente durante la transición G2/M en donde fungen como reguladoras. En ambas figuras (11 a y b) es posible observar un incremento en la cantidad de proteína hacia las 18 y 24 horas, tiempos en donde se considera que la célula de maíz se encuentra entre G2 y M según lo reportado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo (Baíza *et al.* 1989).

Es importante señalar que aun cuando ambas proteínas pertenecen a la familia B y siguen patrones similares, poseen diferencias importantes que sugieren funciones especializadas de cada proteína.

Podemos observar que para la ciclina B1;2 los niveles de proteína disminuyen y se mantienen bajos hasta las 18 horas en donde se incrementa la cantidad de la misma poco menos que el doble de la inicial, mientras para la ciclina B2;1 el incremento en la cantidad de proteína se da desde las doce horas y alcanza a duplicar la cantidad inicial, sobrepasándola incluso para las 24 horas. Ambas ciclinas disminuyen su abundancia alrededor de las 30 horas, sin embargo la ciclina B2;1 vuelve a aumentar para las 36 horas, pequeños cambios que no pueden ser pasados por alto si consideramos que la naturaleza lleva miles de años perfeccionando estos sistemas de regulación. Estos resultados son similares a los reportados por Mews *et al.* 2000 en los que se observó que la ciclina B1;2 de maíz sólo se encontraba en células que se dividían mientras la ZmCycB2;1 persiste principalmente en el núcleo de células que no están en división, además el incremento de ésta última a las 36 horas podría estar indicando el inicio de otra ronda de división debido a la implicación de esta ciclina en la transición de la fase G₀/G₁ que fue reportada por el mismo grupo de trabajo.

6.3 Ensayos de interacción in vivo entre ciclinas B, CDKs y otras proteínas

6.3.1 Ciclinas-CDKA y CDKB

Para conocer la interacción entre ciclinas y proteínas, se utilizó una mezcla de extractos totales de ejes embebidos por 18 y 24 horas, ya que, como se observa en la figura 11 existe un máximo de abundancia a estas horas para ambas ciclinas, por lo que suponíamos que de existir interacción entre CDKs-ciclinas, sería mayor en este intervalo.

Empleamos α -ZmCycB1;2 inmovilizada a una resina para unir covalentemente la ZmCycB1;2 presente en el ET y las proteínas con las que tuviera interacción, para la ZmCycb2;1 se utilizó el anticuerpo α -ZmCycb2;1 inmovilizado en la resina.

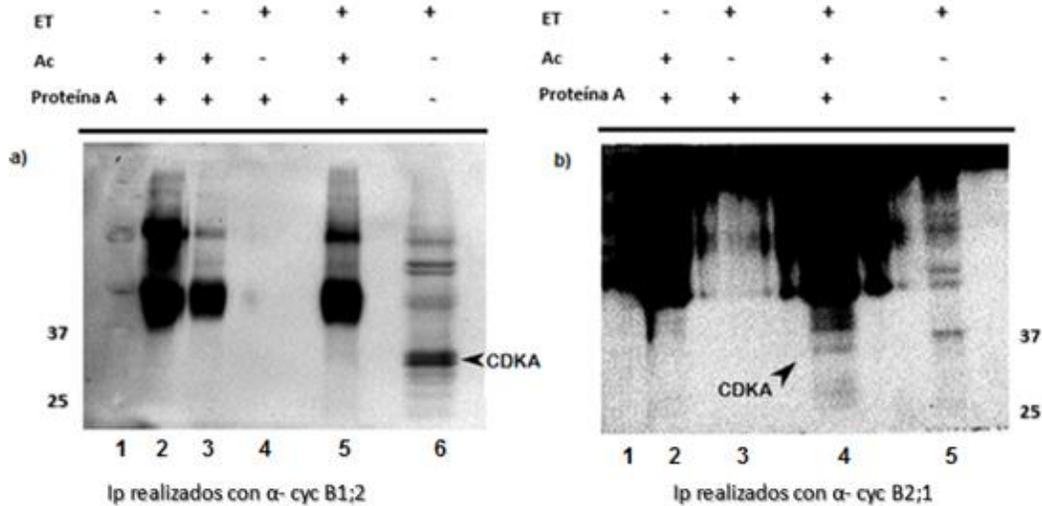


Figura 12. Ensayos de interacción *in vivo* de ZmCycB con ZmCDKA1 (34 kDa) mediante inmunoprecipitados. Panel a) Carril 1: Marcadores moleculares. Carril 2 y 3: Perlas + Ac, en el carril 2 se cargó el doble que en el 3 con el propósito de forzar el sistema y observar posibles falsos positivos debido a la cadena ligera del anticuerpo con el que se realizó el inmunoprecipitado. Carril 4: Perlas + ET. Carril 5: Perlas + ET+ Ac. Carril 6: ET. Panel 12b) Carril 1 Marcadores. Carril 2: Perlas + Ac. Carril 3: Perlas + Ac+ ET. Carril 5: ET. Las membranas se revelaron con α CDKA.

Al inmunoprecipitar y revelar con α -CDKA se observó un comportamiento diferencial entre ambas ciclinas, pues mostraron unión con ZmCycB2;1 y no así con ZmCycB1;2, o al menos no tan obvia. Esto es consistente con los resultados de la interacción *in vitro* (Neri, datos no publicados); en donde si bien se observó la interacción entre ZmCDKA1, fue mucho mayor la unión con ZmCycB1;2.

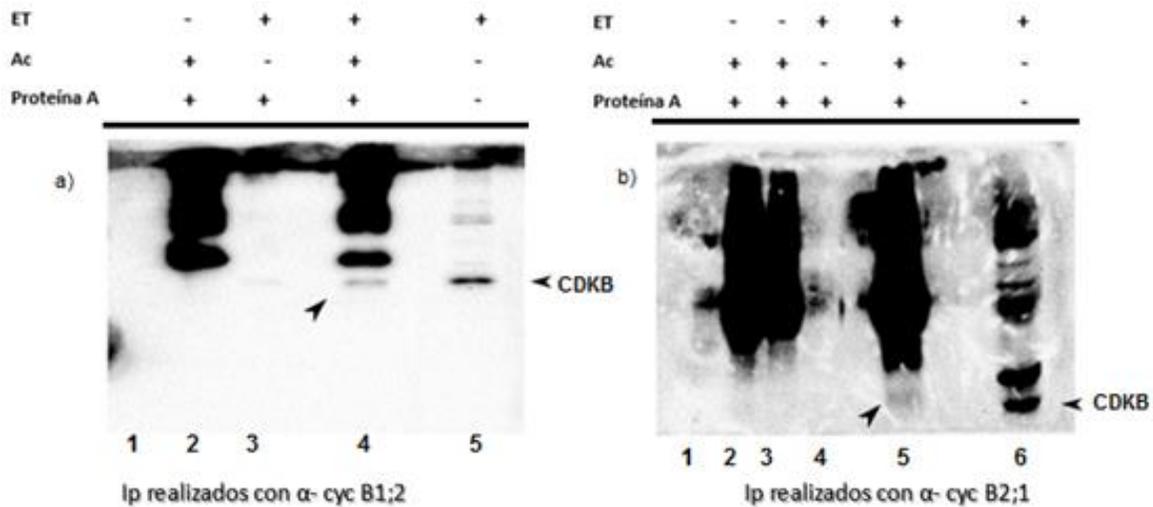


Figura 13. Ensayos de interacción *in vivo* de ZmCycB con CDKB (37 kDa). Panel 13a) Carril 1: Marcadores moleculares. Carril 2: Perlas + Ac. Carril 3: Perlas + ET. Carril 4: Perlas + ET+ Ac. Carril 5 ET. Figura 13b) Carril 1: Marcadores moleculares. Carril 2 y 3: Perlas + Ac. Carril 4: Perlas + ET. Carril 5: Perlas + ET + Ac. Carril 6: ET. La membranas se revelaron con α -CDKB.

Al hacer el ensayo de interacción *in vivo* inmunoprecipitando con ZmCDKB1;1 observamos asociación con ambas ciclinas, resultado que también fue consistente con los experimentos *in vitro* (Neri, Datos no publicados).

Hasta ahora sabemos que el ciclo celular es regulado por ciclinas en complejo con diferentes cinasas, se adjudicó a la fluctuación de las primeras, principalmente, la regulación del ciclo celular. Sin embargo, como se observó en la Figura 11, aunque hay un aumento de ambas ciclinas en tiempos finales de la germinación, la proteína está presente durante todo el proceso germinativo, si bien en parte es debido a que las células en maíz no son sincrónicas a lo largo del eje embrionario, da pauta para formularnos nuevas preguntas, por ejemplo. ¿Siempre que estén presentes ciclinas y CDKs habrá complejos? ¿La transición entre fases del ciclo celular está regulada únicamente por la aparición de las ciclinas y su unión a una CDK? ¿Basta con la formación del complejo para que se cumpla la función de cinasa, es decir, el complejo está activo siempre?

6.3.2 Ciclinas-CDKs a diferentes tiempos durante la germinación y post-germinación

Para intentar responder la primera pregunta se realizaron inmunoprecipitados con Extracto total de ejes a distintos tiempos de imbibición con ambas CDKs (Figuras 14 y 15).

| 37

Se quería conocer el *status* de los complejos en: semilla seca (0 horas), a tiempos tempranos de la germinación (6 horas), en donde se observa el incremento de ambas ciclinas (18 horas) y en tiempos post-germinativos (36 horas). Para intentar hacer el estudio más “cuantitativo” en lugar de poner concentraciones saturantes de extracto total (aproximadamente 1 mg de ET) como en los inmunoprecipitados anteriores, se realizaron con 200 µg de ET y para el control positivo se cargaron 10 µg de ET.

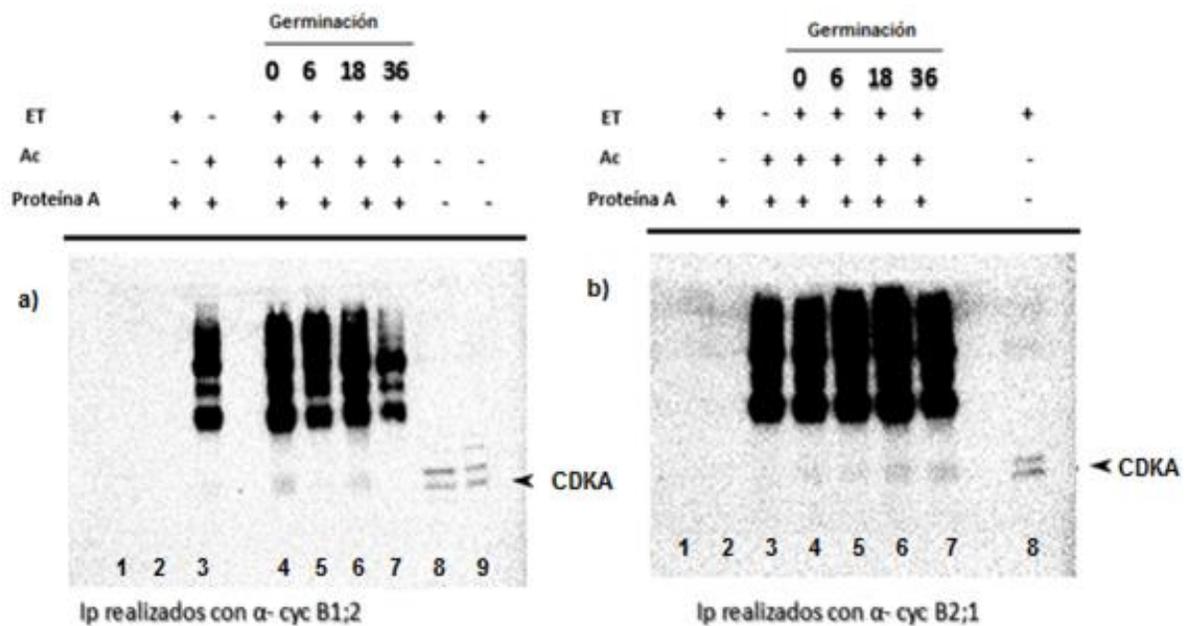


Fig 14. Ensayos de interacción *in vivo* a diferentes tiempos durante la germinación entre CDKA y a) ZmCycB1;2. Carril 1 marcadores moleculares. Carril 2 perlas + 200 µg de ET. Carril 3 perlas + 5 µg de anticuerpo α-CycB1;2. Carril 4 perlas+ Ac + 200 µg de ET (0 horas). Carril 5 perlas+ Ac + 200 µg de ET (6 horas). Carril 6 perlas+ Ac + 200 µg de ET (18 horas). Carril 7 perlas+ Ac + 200 µg de ET (36 horas). Carril 8 20 µg ET (18 horas). Carril 9 10 µg de ET (18horas); y b) ZmCycB2;1. Carril 1 marcadores moleculares. Carril 2 perlas + 200 µg de ET. Carril 3 perlas + 5 µg de anticuerpo α-CycB1;2. Carril 4 perlas+ Ac + 200 µg de ET (0horas). Carril 5 perlas + Ac + 200 µg de ET (6horas). Carril

6 perlas+ Ac + 200 µg de ET (18 horas). Carril 7 perlas + Ac + 200 µg de ET (36 horas). Carril 8 10 µg ET (18 horas).

Debido a estos resultados podemos decir que las ciclinas B aunque siguen patrones similares de abundancia se comportan de manera diferencial con respecto a la unión con la CDKA ya que con ZmCycB1;2 muestra asociación únicamente en 2 de los tiempos estudiados: en 0 y 18, mientras que con CycB2;1 hay asociación a todos los tiempos analizados pero se intensifica a las 18 y 36 horas de imbibición. Sería interesante observar si estos complejos son además activos, para poder tener más información acerca de su relevancia en el ciclo celular.

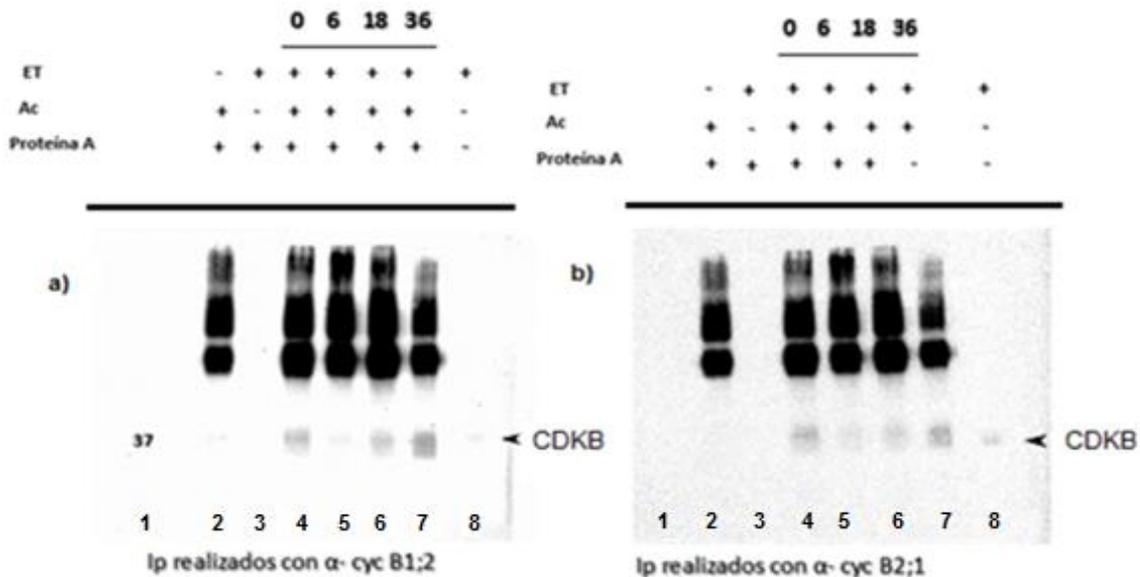


Fig 15. Ensayos de interacción *in vivo* a diferentes tiempos durante la germinación entre CDKB y a) ZmCycB1;2. Carril 1 marcadores moleculares. Carril 2. perlas + 5 µg de anticuerpo α-CycB1;2. Carril 3 perlas + 200 µg de ET. Carril 4 perlas+ Ac + 200 µg de ET (0 horas). Carril 5 perlas+ Ac + 200 µg de ET (6 horas). Carril 6 perlas+ Ac + 200 µg de ET (18 horas). Carril 7 perlas+ Ac + 200 µg de ET (36 horas). Carril 8 10 µg ET (18 horas) y b) ZmCycB2;1. Carril 1 marcadores moleculares. Carril 2 perlas + 5 µg de anticuerpo α-CycB2;1. Carril 3 perlas + 200 µg de ET. Carril 4 perlas+ Ac + 200 µg de ET (0 horas). Carril 5 perlas+ Ac + 200 µg de ET (6 horas). Carril 6 perlas+ Ac + 200 µg de ET (18 horas). Carril 7 perlas+ Ac + 200 µg de ET (36 horas). Carril 8 10 µg ET (18 horas).

En contraste, la CDKB presentó interacción con ambas ciclinas en la mayoría de los tiempos estudiados, sin embargo aunque la cantidad de proteína ZmCycB1;2 a 18

horas es mayor que a las 36 tanto para ZmCycB1;2 como para ZmCycB2;1 la formación de los complejos ciclinas-CDKs parece ser mayor a las 36 horas. Sugiriendo una actividad especializada en este tiempo y que no existen necesariamente más complejos en aquellos tiempos donde la abundancia proteica es mayor.

Debido a que la ZmCycB2;1 aumenta su concentración al menos seis horas antes que la ZmCycB1;2 (Figura 11) , además de los informes que sugieren actividad de la ZmB2;1 en un mayor intervalo que la ZmCycB1;2, resultaba interesante analizar la asociación de estas ciclinas con proteínas cuya función se conoce en fases tempranas de la germinación.

6.3.3. ZmCycB-KRP

La actividad de las CDKs es regulada de manera compleja, así como las ciclinas son proteínas que promueven su actividad, existe otro tipo de proteínas que se unen a los complejos ciclina-cinasa para regularlos negativamente por medio de fosforilaciones/desfosforilaciones de cinasas/fosfatasaes específicas. En el caso de plantas se conocen dos familias de inhibidores de CDKs. Una de ellas se conoce como ICKs (in teractores/inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas) /KRP Kip Related Proteins, (Wang *et al.* 1999) .

En estudios de mapeo de dominios se ha demostrado que la interacción IC/KRP con CDKs tipo A y ciclinas tipo D es a través del dominio de interacción/inhibición de CDK/ciclina localizado en la región carboxilo terminal (Wang *et al.* 1998). Mientras que en algunos estudios se ha demostrado que algunas ICK/KRPs también pueden interactuar con otros complejos CDK/ciclina diferentes a los complejos CDKA/CYCD, incluyendo CDKB/CYCD2, complejos con CDKB2;1 y CYCA—(Nakai *et al.* 2006; Pettko-Szandtner *et al.* 2006; Coelho *et al.* 2005). Sin embargo, no fue posible identificar interacciones de las ICKs/KRPs de *Arabidopsis* con CDKB;1 mediante ensayos de doble híbrido (De Veylder *et al.* 2001; Janiski *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2002).

Se decidió trabajar primero con la ZmCycB2;1 en los ensayos de interacción con KRP y PCNA debido al hecho de que se sugieren funciones para esta proteína en tiempos anteriores a la transición G₂-M, aún en células que no se están dividiendo, mientras que la ZmCycB1;2 se ha reportado principalmente en tejido proliferativo, durante las fases G₂ y M.

6.3.3.1 Inmunoprecipitado ZmCycB2;1-KRP

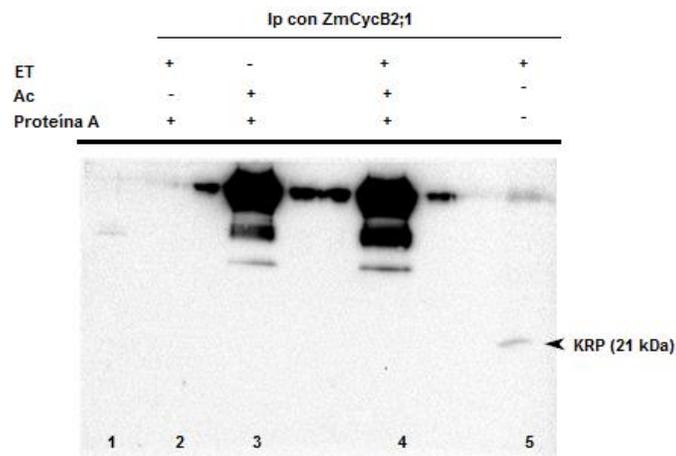


Figura 16. Ensayos de interacción *in vivo* entre ZmCycB2;1 y KRP. Carril 1: Marcadores moleculares. Carril 2: Perlas + ET. Carril 3: Perlas + Ac. Carril 4: Perlas + ET+ Ac. Carril 5 ET.

Se inmunoprecipitó con la ciclina B2;1 y la membrana fue revelada con α -KRP, sin embargo no se encontró asociada al inmunoprecipitado.

Para descartar por completo la asociación entre esta proteína y la ciclina sería conveniente realizar inmunoprecipitados con ET germinados por diferentes horas. Ya que como se demostró con la ZmCycB1;2 – CDKA (Figura 14) existen diferencias en el comportamiento de las proteínas, dependientes del tiempo de germinación.

6.3.4 ZmCycB-PCNA.

El PCNA es una proteína nuclear que predomina en las fases G1 y S del ciclo celular. Esta proteína se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de ADN pues funciona como una pinza deslizante requerida para la procesividad, como cofactor de la ADN polimerasa δ también es requerida para la reparación del daño a ADN y en la recombinación (Kelman 1997), interactuando con diversas proteínas.

Durante la germinación de maíz está presente a bajos niveles en semilla seca y gradualmente aumenta hasta alcanzar un máximo entre las 15 y 20 horas de germinación (predominantemente fase S). (Herrera *et al.* 2000).

6.3.4.1. ZmCycB2;1-PCNA.

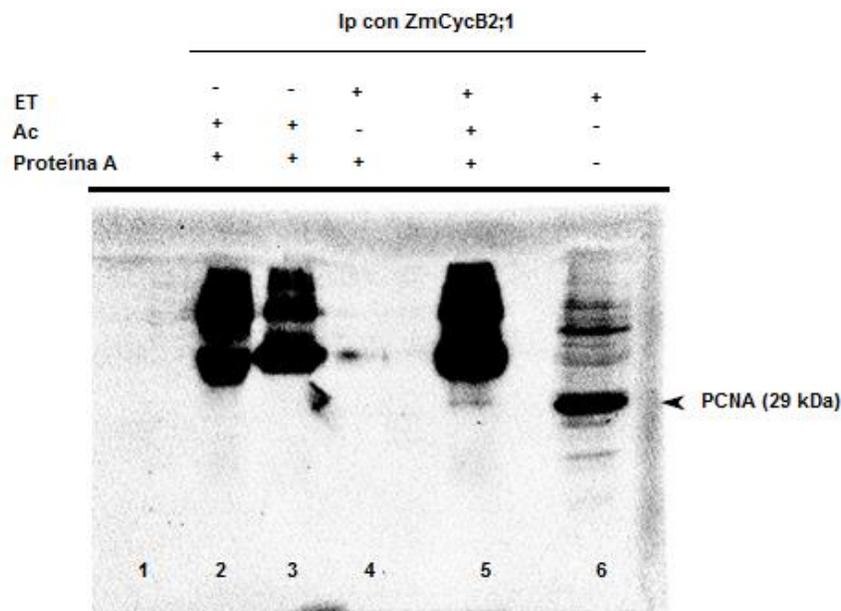


Figura17. Ensayos de interacción *in vivo* entre ZmCycB2;1 y PCNA. Carril 1: Marcadores moleculares. Carril 2: Perlas + Ac. Carril 3: Perlas + Ac. Carril 4: Perlas + ET. Carril 5: Perlas + ET+ Ac. Carril 6 ET.

Fue posible inmunoprecipitar a PCNA con la ZmCycB2;1, presumiblemente ambas proteínas trabajan en la reparación de daños al ADN, aunque esta información no es concluyente.

7. Conclusiones

- Las ciclinas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 presentan un pico hacia las 18 y 24 horas, tiempos que corresponden con la transición de la fase G2 a M en maíz.
- La CDKA forma complejos con la ZmCycB2;1, cuando se utilizan mezclas de ET de ejes de 18 y 24 horas de imbibición.
- Ambas ciclinas son capaces de unirse a la CDKB, cuando se utilizan mezclas de ET de ejes de 18 y 24 horas de imbibición.
- Las ciclinas presentan una asociación diferencial con las CDKs dependiendo del tiempo de imbibición de los ejes embrionarios y ésta asociación muestra patrones diferentes para cada unión ciclina-CDK estudiada.
- La formación de complejos no depende únicamente de la presencia de ambas proteínas y no es proporcional a la cantidad de proteína presente.
- No existe interacción entre KRP y alguna CDK cuando esta última está unida a ZmCycB2;1. Sin embargo hay interacción entre ZmCycB2;1 y PCNA.

8. Perspectivas

- Analizar la actividad de cinasa asociada a los complejos con entre ambas CDKs y las ZmCycBs a diferentes tiempos durante la germinación.
- Realizar ensayos de interacción con α - cromatina, para saber si hay o no interacción entre ésta y las ciclinas B, así como ensayos de interacción de PCNA y KRP con ZmCycB1;2 para poder tener un panorama más completo de la interacción entre estas proteínas y otras involucradas en la regulación del ciclo celular.
- Buscar modificaciones post-traduccionales de las ciclinas a diferentes tiempos durante la germinación y en post-germinación y en tejidos diferenciados (raíz, hoja, tallo).
- Separar fracciones de núcleo y citoplasma de ejes embrionarios imbibidos por diferentes tiempos, realizar inmunoprecipitados para comparar asociaciones de ambas proteínas en cada fracción y realizar ensayos de actividad de cinasa sobre histona.
- Estudiar el papel de factores externos, como carbohidratos y hormonas, en los complejos ciclinas B – CDKs y como estos afectan positiva o negativamente la entrada a la mitosis.

Apéndice

Apéndice I. Ensayos de interacción *in vitro* entre CDKs-cilinas

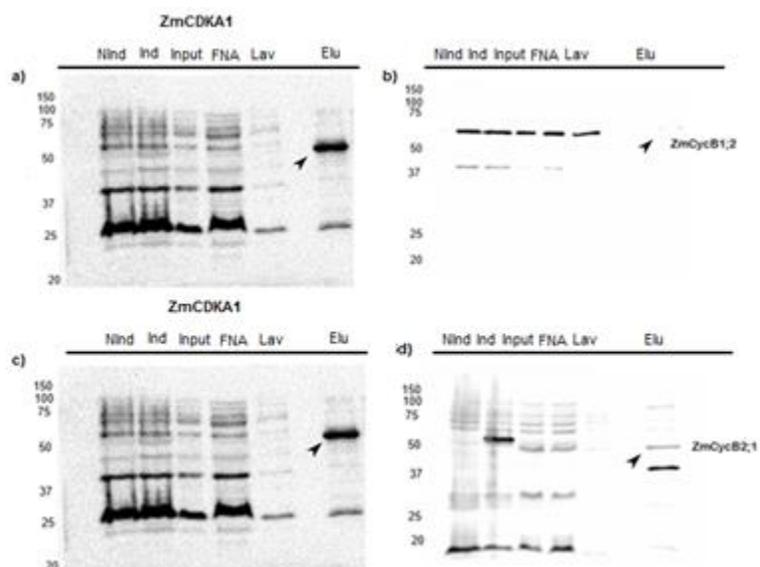


Figura 7.1. Ensayos de interacción *in vitro* de la ZmCDKA1 con ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1. Se probó la capacidad de asociación entre ZmCDKA1 con dos ciclinas B en columnas de afinidad. Se inmovilizaron en cada membrana diferentes fracciones, Nind cultivo no inducido; Ind cultivo inducido; Input (20 μ L de la fracción que se agrega a la columna); FNA fracción no adsorbida; Lav lavado de la columna; Elu elución (Neri 2015, Datos no publicados).

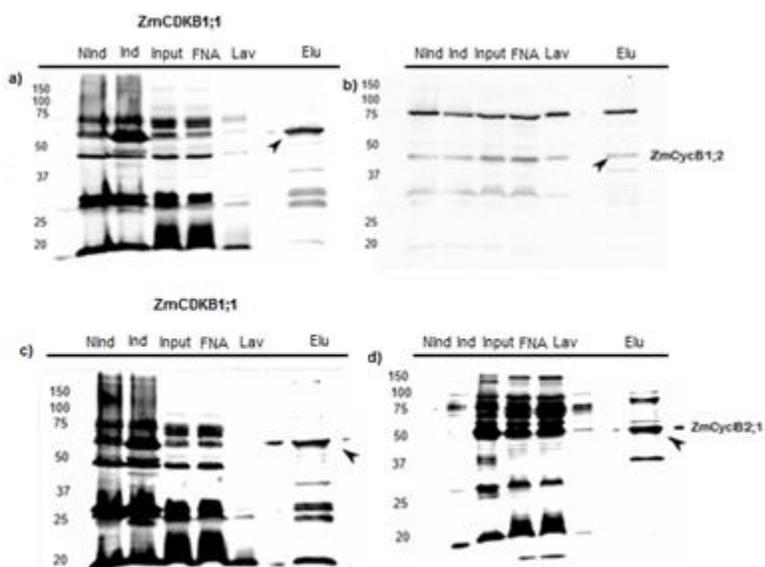


Figura 7.2. Ensayos de interacción *in vitro* de la ZmCDKB1;1 con ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1. Se probó la capacidad de asociación entre ZmCDKB1;1 con dos ciclinas B en columnas de afinidad. Se inmovilizaron en cada membrana diferentes fracciones, Nind cultivo no inducido; Ind cultivo inducido; Input (20µL de la fracción que se agrega a la columna); FNA fracción no adsorbida; Lav lavado de la columna; Elu elución. Ver figura completa en el apéndice 1 (Neri 2015, Datos no publicados).

Apéndice II. Membrana incubada con suero pre inmune (SPI) y suero inmune (SI)

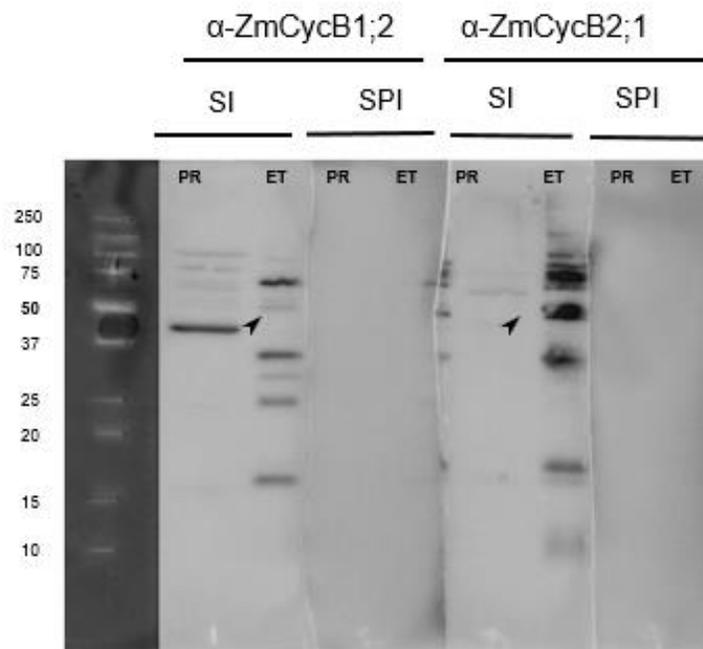


Figura 8. Western blot revelado con el suero pre-inmune y suero inmune de los animales empleados para producir α -ZmCycB1;2 y α -CycB2;1.

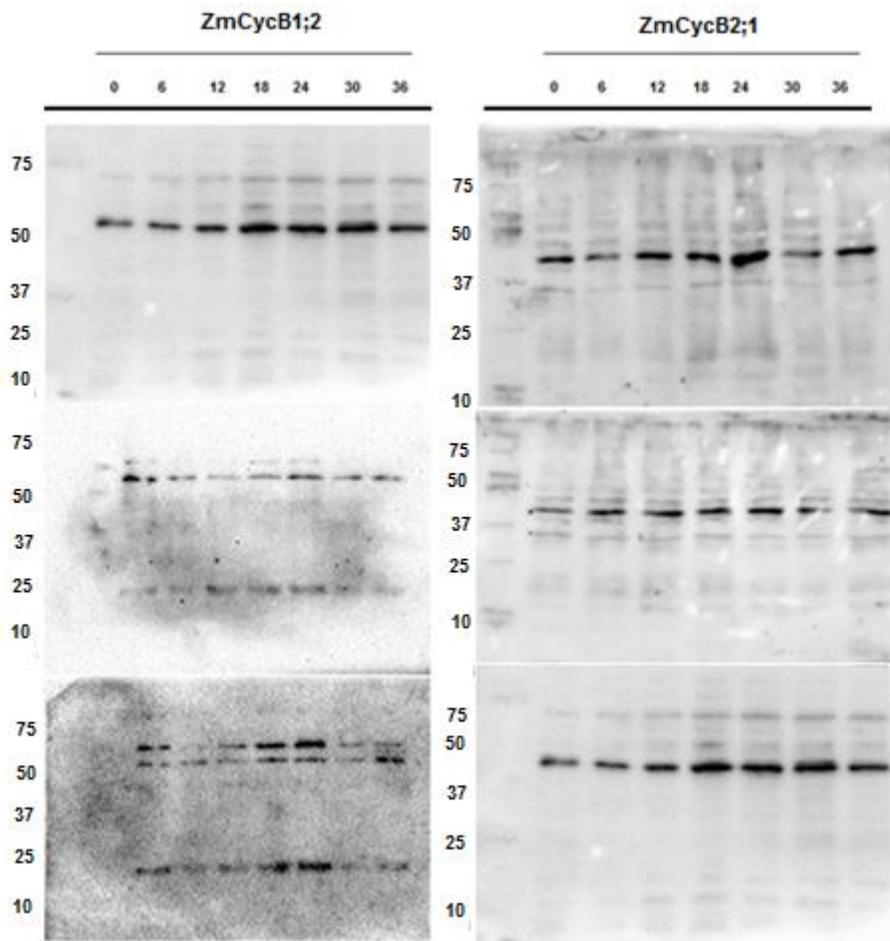


Figura 11. Membranas completas empleadas para la determinación de abundancia proteica de ambas ciclinas. A la izquierda western blot por triplicado revelado con ZmCycB1;2. A la derecha western blot por triplicado revelado con ZmCycB2;1. En las seis membranas se inmovilizaron 50 µg de ET a diferentes tiempos de germinación.

Referencias

- Alberts, Bruce et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition*. pp 983-1026.
- Baíza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E. 1989. "DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination." *J Plant Physiol.* 135: 416 - 421.
- Bewley, J Derek, and Black M. 1985. *Seeds: Physiology of development and germination, First Edition*. pp 5 - 11, 114 - 115.
- Bewley, J Derek, and Black M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination, Second Edition*. pp 27-34. 56-60.
- Bewley, J Derek, and Kent J Bradford. *J. Derek Bewley · Kent J Bradford Henk W.M. Hilhorst · Hiro Nonogaki*. 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, Third Edition*. pp 29 - 36, 133 - 135
- Candela, Héctor, and Sarah Hake. 2008. "The Art and Design of Genetic Screens: Maize." *Nature reviews. Genetics* 9(3): 192–203.
- Coe, E H. 2001. "The Origins of Maize Genetics." *Nature reviews. Genetics* 2(11): 898–905.
- Coelho, CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins A. 2005. "Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication." *Plant Physiology* 238: 2323-2336.
- Criqui, Marie Claire et al. 2000. "Cell Cycle-Dependent Proteolysis and Ectopic Overexpression of Cyclin B1 in Tobacco BY2 Cells." *Plant Journal* 24(6): 763–773.
- De Castro, D. 1998. "A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds." pp 2 - 8.
- De Veylder, L, Beekman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, Van der Shueren E, Maes S, Naudts M, Inzé D. 2001. "Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis." *The Plant Cell* 13: 1653 - 1667.
- Dewitte, Walter, and James A H Murray. 2003. "The Plant Cell Cycle." *Annual Review of Plant Biology* 54: 235–264.
- Doerner, P et al. 1996. "Control of Root Growth and Development by Cyclin Expression." *Nature* 380(6574): 520–523.

- Dyer, W. T. Thiselton. 1877. "The Effects of Cross- and Self-Fertilisation in the Vegetable Kingdom." *Nature* 15(381): 329–32.
- Evans, T et al. 1983. "Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division." *Cell* 33(2): 389–96.
- Ferreira, P C et al. 1991. "The Arabidopsis Functional Homolog of the p34cdc2 Protein Kinase." *The Plant cell* 3(5): 531–40.
- Fisher, D L, and P Nurse. 1996. "A Single Fission Yeast Mitotic Cyclin B p34cdc2 Kinase Promotes Both S-Phase and Mitosis in the Absence of G1 Cyclins." *The EMBO journal* 15(4): 850–60.
- Francis, Dennis. 2011. "A Commentary on the G2/M Transition of the Plant Cell Cycle." *Annals of Botany* 107(7): 1065–70.
- Georgieva, Elena I., Gerardo López-Rodas, and Peter Loidl. 1993. "Maize Embryo Germination." *Planta* 192(1): 125–29.
- Godínez-Palma, Silvia K. et al. 2013. "Complexes of D-Type Cyclins with CDKs during Maize Germination." *Journal of Experimental Botany* 64(18): 5661–71.
- Goldberg, R B, G de Paiva, and R Yadegari. 1994. "Plant Embryogenesis: Zygote to Seed." *Science (New York, N.Y.)* 266(5185): 605–14.
- Hata, S, H Kouchi, I Suzuka, and T Ishii. 1991. "Isolation and Characterization of cDNA Clones for Plant Cyclins." *The EMBO journal* 10(9): 2681–88.
- Hemerly, a S et al. 1993. "cdc2a Expression in Arabidopsis Is Linked with Competence for Cell Division." *The Plant cell* 5(12): 1711–23.
- Herrera, I et al. 2000. "Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Maize Seed Development and Germination: Regulation by Phytohormones and Its Association with Putative Cell Cycle Proteins." *Physiologia Plantarum* 110(1): 127–34. <Go to ISI>://000089349700017.
- Hu, X. et al. 2010. "Genome-Wide Analysis of Cyclins in Maize (Zea Mays)." *Genetics and molecular research : GMR* 9(3): 1490–1503.
- Hunt, T. 1991. "Cyclins and Their Partners: From a Simple Idea to Complicated Reality." *Seminars in cell biology* 2(4): 213–22.
- Imajuku, Y, T Hirayama, H Endoh, and A Oka. 1992. "Exon-Intron Organization of the Arabidopsis Thaliana Protein Kinase Genes CDC2a and CDC2b." *FEBS letters* 304(1): 73–77.

Jasinski S, Riou-Khamlichi C, Roche O, Perennes C, Bergounioux C, Glab N. 2002. "The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3;1-overexpressing plants. *Journal of Cell Science* 115:973 - 982.

Joubès, J et al. 2000. "CDK-Related Protein Kinases in Plants." *Plant molecular biology* 43(5-6): 607–20.

| 49

King, R W, R J Deshaies, J M Peters, and M W Kirschner. 1996. "How Proteolysis Drives the Cell Cycle." *Science (New York, N.Y.)* 274(5293): 1652–59.

Koornneef, Maarten, Leónie Bentsink, and Henk Hilhorst. 2002. "Seed Dormancy and Germination." *Current Opinion in Plant Biology* 5(1): 33–36.

La, Honggui et al. 2006. "Genome-Wide Analysis of Cyclin Family in Rice (*Oryza Sativa* L.)." *Molecular genetics and genomics : MGG* 275(4): 374–86.

Lara-Núñez, Aurora, Natividad De Jesús, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2008. "Maize D4;1 and D5 Cyclin Proteins in Germinating Maize. Associated Kinase Activity and Regulation by Phytohormones." *Physiologia Plantarum* 132(1): 79–88.

Lee, Jeongkyung et al. 2003. "Cell Cycle Function of a Rice B2-Type Cyclin Interacting with a B-Type Cyclin-Dependent Kinase." *Plant Journal* 34(4): 417–25.

Lenburg, Marc E., and Erin K. O'Shea. 1996. "Signaling Phosphate Starvation." *Trends in Biochemical Sciences* 21(10): 383–87.

Lohka, M J, M K Hayes, and J L Maller. 1988. "Purification of Maturation-Promoting Factor, an Intracellular Regulator of Early Mitotic Events." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(9): 3009–13.

Meinke, D W. 1995. "Molecular Genetics of Plant Embryogenesis." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46(1): 369–94.

Mews, Miriam, Francis J. Sek, Dieter Volkmann, and Peter C. L. John. 2000. "Immunodetection of Four Mitotic Cyclins and the Cdc2a Protein Kinase in the Maize Root: Their Distribution in Cell Development and Dedifferentiation." *Protoplasma* 212(3-4): 236–49.

Nakai, T, Kato K, Shinmyo A, Sekine M. 2006. "Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase." *FEBS Letters* 580: 336-340.

- Nieuwland, J, M Menges, and Jah Murray. 2007. "The Plant Cyclins." *Annual Plant Reviews Volume 32: Cell Cycle Control and Plant Development*: 31–61.
- Nonogaki, Hiroyuki, George W. Bassel, and J. Derek Bewley. 2010. "Germination-Still a Mystery." *Plant Science* 179(6): 574–581.
- Novak, Bela et al. 1998. "Mathematical Model of the Fission Yeast Cell Cycle with Checkpoint Controls at the G1/S, G2/M and Metaphase/anaphase Transitions." *Biophysical Chemistry* 72(1-2): 185–200.
- Nugent, JH, Alfa CE, Young T, Hymas JS. 1991. "Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis." *J. Cell Sci* 99: 669 - 674.
- Pettko-Szandtner, A, Meszaros T, Horvath GV, et al. 2006. "Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase." *Plant Journal* 46:111 - 123.
- Pines, J. 1995. "Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases: A Biochemical View." *Biochemical Journal* 308(Pt 3): 697–711.
- Piperno, Dolores R et al. 2009. "Starch Grain and Phytolith Evidence for Early Ninth Millennium B.P. Maize from the Central Balsas River Valley, Mexico." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(13): 5019–24.
- Porceddu, Andrea et al. 2001. "A Plant-Specific Cyclin-Dependent Kinase Is Involved in the Control of G2/M Progression in Plants." *Journal of Biological Chemistry* 276(39): 36354–60.
- Qin, L X et al. 1996. "G2-and Early-M-Specific Expression of the NTCYC1 Cyclin Gene in Nicotiana Tabacum Cells." *Plant molecular biology* 32(6): 1093–1101.
- Quiroz-Figueroa, Francisco, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2006. "Expression of Maize D-Type Cyclins: Comparison, Regulation by Phytohormones during Seed Germination and Description of a New D Cyclin." *Physiologia Plantarum* 128(3): 556–68.
- Rechsteiner, Martin, and Scott W. Rogers. 1996. "PEST Sequences and Regulation by Proteolysis." *Trends in Biochemical Sciences* 21(7): 267–71.
- Renaudin, J P et al. 1996. "Plant Cyclins: A Unified Nomenclature for Plant A-, B- and D-Type Cyclins Based on Sequence Organization." *Plant molecular biology* 32(6): 1003–18.

Reyes J, Jiménez-García LF, González M, Vázquez-Ramos JM. 1991. "Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize." *Seed Sci Res* 1: 113-7.

Schnittger, Arp, Ulrike Schöbinger, York Dieter Stierhof, and Martin Hülskamp. 2002. "Ectopic B-Type Cyclin Expression Induces Mitotic Cycles in Endoreduplicating Arabidopsis Trichomes." *Current Biology* 12(5): 415–20.

Steinborn, Katharina et al. 2002. "The Arabidopsis PILZ Group Genes Encode Tubulin-Folding Cofactor Orthologs Required for Cell Division but Not Cell Growth." *Genes and Development* 16(8): 959–71.

Vandepoele, Klaas et al. 2002. "Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in Arabidopsis." *The Plant Cell Online* 14(4): 903–16. <http://www.plantcell.org/content/14/4/903> \n <http://www.plantcell.org/content/14/4/903.full.pdf> \n <http://www.plantcell.org/content/14/4/903.short>.

Vázquez-Ramos, J.M. 1990. "La bioquímica como herramienta para el estudio de la germinación." En Molina Moreno J, Estrada Gómez JA, Livera Muñóz M, González Hernández VA, editores. *Análisis de la enseñanza, producción e investigación de las semillas en México*. 1ra edición Chapingo, México: SOMEFI. pp 595 - 616.

Vázquez-Ramos, J.M., and M.d.I.P. Sánchez. 2003. "The Cell Cycle and Seed Germination." *Seed Science Research* 13(2): 113–30.

Vela E. 2011. "El Maíz. Arqueología Mexicana." 38: 10-26.

Wallace, J G, S J Larsson, and E S Buckler. 2014. "Entering the Second Century of Maize Quantitative Genetics." *Heredity* 112(1): 30–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462502>.

Wang, H., Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC. 1988. "ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid." *Plant Journal* 15:501-510.

Wang, Guanfang et al. 1999. "The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is localized to the cytosol in Swiss/3T3 cells." *Oncogene* 18: 5204-10

Wang, Guanfang et al. 2004. "Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-like Proteins." *Plant physiology* 135(2): 1084–99.

Weingartner, Magdalena et al. 2003. "A Plant Cyclin B2 Is Degraded Early in Mitosis and Its Ectopic Expression Shortens G2-Phase and Alleviates the DNA-Damage Checkpoint." *Journal of cell science* 116(Pt 3): 487–98.

West, Marilyn A L, and John J Harada. 1993. "Embryogenesis in Higher Plants: An Overview." 5(10): 1361–69.

| 52

Yamaguchi, Masatoshi et al. 2000. "Activation of CDK-Activating Kinase Is Dependent on Interaction with H-Type Cyclins in Plants." *Plant Journal* 24(1): 11–20.

Zamora-Zaragoza, J. 2015. "Caracterización de la ciclina CycD6;1 de maíz y sus interacciones con otros reguladores del ciclo celular." *Tesis de Maestría*. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM. México.

Zhou, Y, Fowke LC, Wang H. 2002. "Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic Arabidopsis plants." *Plant Cell Reports* 20: 967-975.