



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Caracterización de la ciclina CycD6;1 de maíz y sus interacciones  
con otros reguladores del ciclo celular**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Jorge Zamora Zaragoza**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Vázquez Ramos, Facultad de Química - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Imelda López Villaseñor, Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM

† Dr. Mario Rocha Sosa, Instituto de Biotecnología - UNAM

MÉXICO, D. F. Enero, 2014



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.

## RECONOCIMIENTOS

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

El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química - UNAM
Dra. Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM
Dr. Mario Rocha Sosa <sup>†</sup>	Instituto de Biotecnología - UNAM

Se reconoce:

La colaboración de la Dra. Sonia Vázquez Santana de la Facultad de Ciencias - UNAM y del Dr. Felipe Cruz García de la Facultad de Química - UNAM en el asesoramiento técnico en los experimentos de inmunolocalización por fluorescencia.

La asesoría técnica y discusión de resultados de la Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez del Instituto de Ecología UNAM; de la Dra. Aurora Lara Núñez del laboratorio 114 de la Facultad de Química; del Técnico Académico del laboratorio 114, Dr. Elpidio García Ramírez; así como de mis compañeros de laboratorio durante la duración del proyecto.

El financiamiento para la realización de los experimentos por parte de PAPIIT (2125-12) y PAIP (6290-11).

Durante la duración de la maestría gocé de una Beca de Maestría Nacional otorgada por Conacyt, así como un apoyo económico para asistencia a congreso otorgado por PAEP.

Posterior al término de la maestría gocé de un Estímulo económico de Ayudante de Investigador Nivel III otorgado por el SNI.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día.....

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular - UNAM
Vocal	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química - UNAM
Secretario	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular - UNAM
Suplente	Dr. José Luis Reyes Taboada	Instituto de Biotecnología - UNAM
Suplente	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química - UNAM

## AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. Jorge Vázquez, por la invaluable influencia que su propio ejemplo tuvo en mi formación académica, científica y personal; por la entera confianza y libertad que me tuvo en el desarrollo del proyecto; por la crítica y discusión del proyecto en general; por su amistad.

A los doctores Aurora Lara, Mary Paz Sánchez y Elpidio García por compartir conmigo su conocimiento y experiencia que enriquecieron notablemente el desarrollo de este proyecto así como mi formación en el laboratorio.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por su enorme ayuda en la realización de los experimentos de inmunolocalización por fluorescencia.

A los miembros del comité tutor, Dra. Imelda López Villaseñor y Dr. Mario Rocha Sosa que criticaron, discutieron y enriquecieron el proyecto.

A los miembros del Jurado, doctores Derrando López Casillas, Patricia Coello Coutiño, Roberto Coria Ortega, José Luis Reyes Taboada y Tzvetanka Dimitrova Dinkova, por sus comentarios y correcciones durante la revisión de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio 114, Gris, Roberto, Javier, Fernanda, Brendy, Cassandra, y muy en especial a Sara, Silvia, Mingyar, Víctor y Fernando por las aportaciones experimentales, la discusión e ideas a mi trabajo no sólo durante la maestría, sino desde mi llegada al laboratorio hace 5 años. A todos, por su amistad, compañerismo y por haber hecho de mi estancia en el laboratorio una etapa que disfruté al punto de olvidar la frustración de cada experimento fallido.

A Yéssica.

Al Conacyt por la beca otorgada

Al SNI por el Estímulo Económico de Ayudante de Investigador Nivel III

A los proyectos PAPIIT (212512) y PAIP (6290-11) por el financiamiento de este trabajo.

# CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>III</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
El Maíz.....	1
La semilla de maíz.....	2
Germinación.....	4
Ciclo Celular.....	7
Regulación y reguladores del ciclo celular.....	10
Las Cdks y su regulación.....	11
Ciclinas.....	14
La vía CycD/Rb/E2F y la transición G1/S.....	16
Rb y Rbr: función, estructura e interacciones.....	18
i) <i>Función</i> .....	18
ii) <i>Estructura</i> .....	20
iii) <i>Interacciones</i> .....	21
iii.i) LxCxE: Motivo de unión a Rb.....	22
<b>ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO.....</b>	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	29
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
CycD6;1 se acumula diferencialmente durante la germinación.....	32
Cycd6;1 se localiza en la coleorriza y se transloca del citoplasma al núcleo a lo largo de la germinación.....	34
La actividad de cinasa asociada a CycD6;1 durante la germinación implica un nivel más de regulación.....	36
CycD6;1 interacciona con Rbr y tiene actividad de cinasa asociada sobre el dominio pocket y la región C-terminal.....	38
CycD6;1 se localiza en el meristemo de la raíz después de la germinación.....	42
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
La CycD6;1 se regula temporalmente a diferentes niveles durante la germinación.....	46
La localización tisular de CycD6;1 sugiere que está involucrada en procesos externos al ciclo celular relacionados con el control de la germinación.....	50
La cantidad de CycD6;1 activa está regulada espacio-temporalmente.....	53
CycD6;1 se une y fosforila a Rbr en diferentes dominios.....	57

CycD6;1 es regulada espacialmente durante el ciclo celular en el meristemo de la raíz después de la germinación.....	58
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>62</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>64</b>
I. Material.....	64
I.I Semillas de maíz.....	64
I.III Plásmidos.....	64
I.III. Cepas y condiciones de crecimiento.....	64
II. Técnicas generales.....	65
II.I. Electroforesis de DNA.....	65
II.II. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	65
II.III. Purificación de DNA plasmídico.....	65
II.IV. Preparación de células competentes.....	66
II.V. Transformación de células competentes.....	66
II.VI. Electroforesis de proteínas.....	67
II.VII. Western blot.....	67
III. Clonaciones y sobreexpresión de proteínas recombinantes.....	67
III.I. Amplificación de CDS.....	67
III.II. Clonación de pPal7:CycD6-FL.....	68
III.III. Clonación de pDest15:Rbr-Pd, pDest15:Rbr-Ct y pDest15:Rbr-PC.....	69
III.IV. Inducción de proteínas recombinantes.....	69
IV. Ensayo de competencia.....	69
V. Ensayos de germinación.....	70
VI. Ensayos de inmunofluorescencia.....	71
VII. Ensayos de actividad de cinasa.....	72
VIII. Análisis estadístico.....	73
IX. Interacción CycD6;1 - Rbr <i>in vitro</i> .....	73
<i>Apéndice 1. Primers y temperaturas de alineamiento.....</i>	<i>75</i>
<i>Apéndice 2. Proteínas recombinantes.....</i>	<i>76</i>
Fragmentos Recombinantes de GST:Rbr1.....	76
GST:CdkA y PeX:CycD6-FL.....	76
Purificación de proteínas recombinantes de GST.....	77
<i>Apéndice 3. Cortes histológicos de la semilla de maíz.....</i>	<i>79</i>
<i>Apéndice 4. Controles del ensayo de actividad de cinasa.....</i>	<i>79</i>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Anatomía de la semilla madura de maíz.....	3
2. Esquema del brote de semilla de maíz germinada.....	5
3. Procesos celulares asociados a la germinación.....	7
4. Representación esquemática de las fases del ciclo celular.....	8
5. Regulación de la actividad de Cdk.....	13
6. Representación esquemática de la transición G1/S.....	17
7. Estructura, función e interacciones de Rb.....	21
Figura I. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación <i>ex situ</i> .....	28
8. Validación de anticuerpos anti-CycD6;1 de maíz.....	31
9. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación de semilla.....	33
10. Inmunofluorescencia de CycD6;1 durante la germinación.....	34
11. Actividad de cinasa asociada a CycD6;1.....	38
12. Interacción <i>in vitro</i> de CycD6;1 con Rbr1.....	39
13. Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre Rbr.....	40
14. Inmunofluorescencia de CycD6;1 en punta de raíz.....	43
15. Inmunofluorescencia de CycD6;1 en punta de raíz.....	44
16. Modelo de la regulación espacio temporal de CycD6;1 durante la germinación de maíz.....	61
17. Figura A1. Inducción de proteínas recombinantes.....	76
18. Figura A2. Purificación de proteínas recombinantes.....	77
18. Figura A3. Cortes histológicos de semilla de maíz.....	78
19. Figura A4. Controles de los ensayos actividad de cinasa.....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Clasificación taxonómica del maíz.....	1
2. Composición química de las partes de la semilla de maíz.....	4
A1. <i>Primers</i> para fragmentos de Rbr1 y CycD6-FL.....	74
A2. CDS amplificados y pares de primers utilizados.....	74
A3. Proteínas recombinantes.....	75

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AtCycD6;1	CycD6;1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtRbr	Rbr de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtRbr-Ct	Carboxilo terminal de AtRbr
AtRbr-Pd	<i>Pocket domain</i> de AtRbr
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CEI	Células iniciales de corteza y endodermis
CEID	Células hijas de CEI
Cyc	Ciclina
CycD	Ciclina tipo D
CycD6-Ag	Inmunógeno de los anticuerpos anti-ciclina D6
CycD6-FL	Ciclina D6 de longitud completa
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
Krp	Kip related protein
LB	Luria-Bertani
PeX	Profinity eXact Fusion Tag (Bio-Rad)
Rb	Proteína de retinoblastoma
Rbr	Retinoblastoma related protein
Rbr-Ct	Región C-Terminal de Rbr
Rbr-Pd	Pocket domain de Rbr
Rbr-PC	Rbr-Pd + Rbr-Ct
Scr	Scarecrow
Shr	Shortroot
ZmCycD6;1	CycD6;1 de maíz
ZmRbr	Rbr de maíz



## RESUMEN

Una nueva planta comienza su desarrollo a partir de un embrión cuyo crecimiento está detenido en la semilla seca y continúa después de un período de quiescencia en la germinación. Una semilla ortodoxa seca mantiene un metabolismo prácticamente nulo hasta que la entrada de agua “la despierta” bioquímicamente y muchos procesos celulares se reactivan, de los cuales, uno sumamente importante es el ciclo celular; y dado que la mayoría de las células de las zonas meristemáticas de la semilla seca se detienen en la fase G1, nuestra hipótesis de trabajo implica que una germinación exitosa requiere que las células de la semilla reactiven el metabolismo celular a partir de G1 y completen la primera ronda de divisiones celulares, después de lo cual la semilla puede continuar los procesos de proliferación y crecimiento durante el desarrollo ulterior según su propio programa genético y así dar lugar a la planta. En este contexto, nuestra estrategia ha consistido en estudiar a los principales reguladores de la fase G1 y transición G1/S a nivel de proteína endógena: las ciclinas D (CycD).

En el presente trabajo, se reporta la validación de anticuerpos policlonales específicos contra la CycD6;1 de maíz con los cuales se determinó que la proteína endógena está presente en la semilla seca y a lo largo de la germinación con niveles mínimos hacia el final de la misma. También se determinó que CycD6;1 forma complejos activos durante la germinación aunque el patrón de actividad no correlaciona con el de acumulación de proteína. A pesar de carecer del dominio de unión a la proteína blanco natural de las CycD, Rbr, sí es capaz de unirse a ella y fosforilarla en diferentes regiones. Interesantemente, se observó que la proteína se localiza en la coleorriza, un tejido muy importante en el control de la germinación. Su localización subcelular cambia a lo largo del tiempo de germinación desde el citoplasma hacia el núcleo. Las conclusiones principales de este trabajo son que CycD6;1 de maíz es regulada espacial y temporalmente durante la germinación de semillas a diferentes niveles. Aunque no se ha demostrado su unión a Rbr *in vivo*, en este trabajo demostramos que CycD6;1 de maíz une *in vitro* a Rbr a pesar de la ausencia del motivo LXCXE en su secuencia.

## INTRODUCCIÓN

### El Maíz

Hace aproximadamente 7000 a 9000 años el actual territorio mexicano estaba habitado por grupos nómadas de cazadores-recolectores que comenzaban a desarrollar prácticas agrícolas. Entre las plantas que se domesticaron se encuentra el teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*), el cual, por su cercanía filogenética se cree que es el ancestro silvestre del maíz actual (*Zea mays*). La hipótesis más aceptada plantea que la constante selección de teocintle con características deseables para los humanos conllevó una evolución acelerada, produciendo así una nueva especie morfológicamente muy diferente pero genéticamente muy similar a su ancestro (Piperno *et al.*, 2009; Vela, 2011).

El maíz constituye, junto con otros elementos de la vida cotidiana, el centro de la cosmovisión mesoamericana como lo demuestra su papel fundamental en mitos de origen, donde se explica que el ser humano está hecho o procede del maíz (Carrillo, 2009). Esto no es de extrañar si tomamos en cuenta la fuerte interdependencia entre ambas especies, dejando a la expresión “Los hombres de Maíz” distante de ser únicamente una metáfora popular (Perales, 2009).

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

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

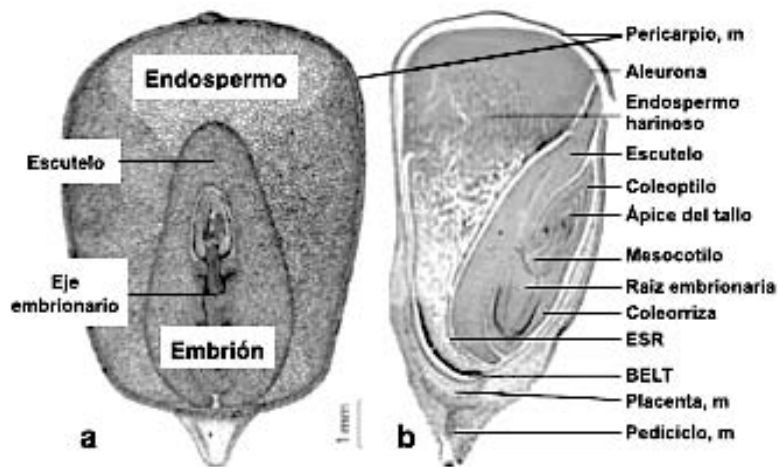
Al igual que otros integrantes de la familia Poaceae (Tabla 1), el maíz se compone principalmente por follaje. El tallo, similar al bambú, es delgado y segmentado por juntas o articulaciones llamadas nodos, de los cuales sale una hoja en dirección opuesta a la que sale del nodo contiguo, y el espacio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

### **La semilla de maíz**

La semilla madura o cariopsis (figura 1) posee tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión, que difieren considerablemente en su composición química (Tabla 2). El pericarpio es la capa dura y transparente exterior de la semilla. 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, al igual que la placenta y el pedicelo (figura 1). El endospermo contiene cuatro tejidos diferentes: el endospermo harinoso, la aleurona (el más externo), la capa de transferencia del endospermo basal (BETL, por sus siglas en inglés) y la región que rodea al embrión (ESR, del inglés *Embryo Surrounding Region*). En total, el endospermo representa aproximadamente 85% del peso total del grano y sirve de fuente de energía (en forma de gránulos de almidón y cuerpos protéicos) para el embrión durante varios días posteriores a la germinación (Scanlon y Takacs, 2009).

El embrión posee un eje central (eje embrionario) que contiene las estructuras embrionarias que darán origen a la plántula después de la germinación. En su extremo basal se encuentra el meristemo de la raíz, que dará origen a la raíz primaria, y en el apical contiene el meristemo apical del tallo. Dentro del eje (figuras 1 y 2), un tejido protector llamado coleoptilo, el cual se convertirá en una cubierta que protege al primer brote que emerge de la semilla hacia la superficie del suelo, envuelve 5 ó 6 primordios (según el fondo genético)

de los cuales crecerá una hoja en cada uno durante el desarrollo de la planta (Scanlon y Takacs, 2009). De igual manera, la raíz embrionaria está cubierta por un tejido protector similar llamado coleorriza. Del primer nodo (nodo escutelar) surge el escutelo, que da origen al cotiledón. El escutelo no se convierte en tejido foliar pero sirve para absorber y digerir al endospermo durante la germinación. El espacio comprendido entre el nodo escutelar y el nodo coleoptilar se denomina mesocotilo, el cual se alarga rápidamente durante la germinación para propiciar que el coleoptilo emerja del suelo y junto con él, las hojas (Vincent, 2002; Scanlon y Takacs, 2009).



**Figura 1.** Anatomía de la semilla madura de maíz madura vista a) de frente y b) perfil. ESR, *Embryo Surrounding Region* (región que rodea al embrión); BELT, *Basal Endosperm Transfer Layer* (capa de transferencia del endospermo basal); m, tejido de origen materno. Modificado a) de Kiesselbach, 1999 y b) de Scanlon and Takacs, 2009).

Por su gran importancia en diversos ámbitos de la sociedad mundial actual, así como por la vasta disponibilidad de información y estudios acerca de su biología, el maíz representa una excelente planta modelo para la ciencia básica y aplicada, así como para la vinculación de estas con otros sectores de la sociedad como son el agrícola e industrial en general. Es por esto que el maíz, a diferencia de otras plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, puede representar tanto el modelo como el objeto de estudio en sí. En nuestro grupo de trabajo hemos adoptado al maíz, particularmente la germinación de semillas, como nuestro modelo para el estudio de los reguladores del ciclo celular.

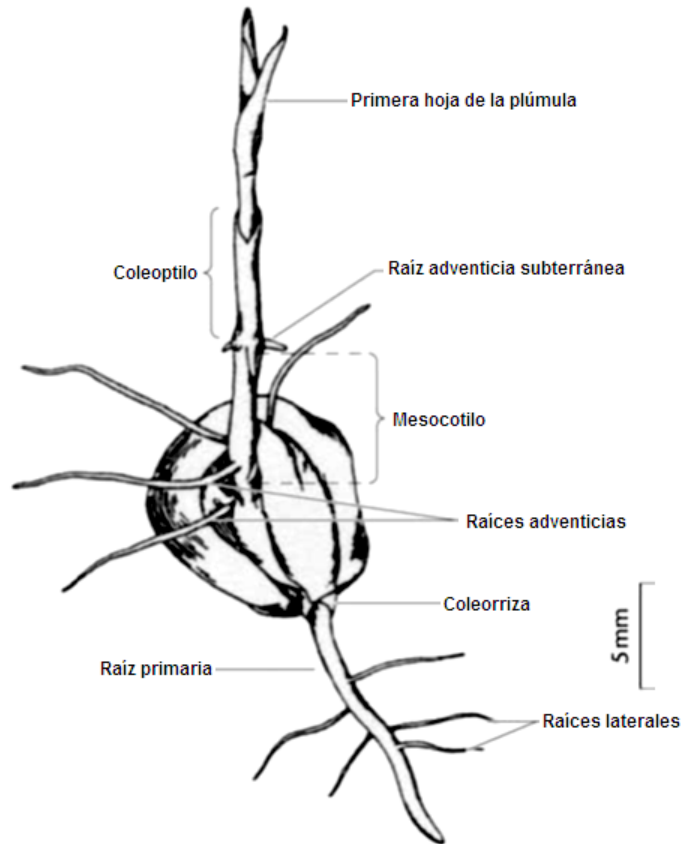
**Tabla 2.** Composición química de las partes principales de la semilla de maíz expresado en porcentaje según datos de la FAO. (<http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S03.htm>)

<b>Componente químico</b>	<b>Pericarpio</b>	<b>Endospermo</b>	<b>Embrión</b>
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

### **Germinación**

La germinación es un proceso que generalmente tiene como resultado el establecimiento de una nueva planta en desarrollo a partir de una semilla madura, aunque esto no depende de la germinación únicamente, sino también de procesos de desarrollo ulteriores. Sin embargo, es difícil dar una definición concisa del concepto “germinación”, ya que el límite que divide el proceso germinativo del desarrollo posterior de la planta es poco claro. A pesar de esto, delimitar la definición de germinación es necesario para enmarcar teóricamente los procesos germinativos y distinguirlos de los postgerminativos. 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 and Black, 1985). En este contexto fisiológico, un límite más preciso que ha sido usado experimentalmente en estudios sobre el control de la germinación (White y Rivin, 2000) es cuando la raíz embrionaria rompe y emerge de la coleorriza (figura 2). Los procesos posteriores a la protrusión radicular o apical (cualquiera que ocurriera primero) no son, para el fisiólogo vegetal, parte de la germinación, sino del crecimiento y desarrollo de la planta. Es preciso apuntar que según esta definición de la fisiología vegetal, una semilla puede completar el proceso germinativo y detener su crecimiento para no

emerger nunca del suelo, lo cual contradice el enfoque agronómico (Bewley and Black, 1985).



**Figura 2.** Esquema del brote de semilla de maíz germinada. Se observan etapas tempranas de varios tipos de raíz y de la hoja. Modificado de Freeling y Walbot, 1994.

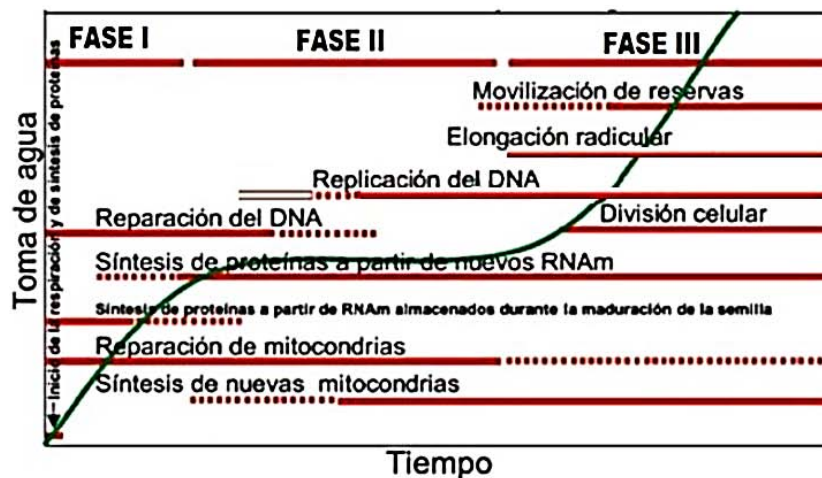
Ya que en nuestro grupo de trabajo nos hemos enfocado a estudiar el ciclo celular durante la germinación del maíz, hemos adoptado una definición de la germinación distinta a las anteriores y basada en procesos bioquímicos y celulares. Así pues, desde nuestro punto de vista, definimos a la germinación 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, 1990). 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, aquéllos 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 divisiones celulares, 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.

Cabe señalar que si bien el término de la germinación es confuso, el inicio de la germinación es siempre la entrada de agua a la semilla quiescente, puesto que se sabe que bajo condiciones adecuadas de temperatura y oxígeno, la toma de agua es suficiente y necesaria para que la germinación comience (al menos en semillas ortodoxas, Mayer y Poljakoff, 1975), lo cual, como se mencionó anteriormente, reactiva el metabolismo y se llevan a cabo procesos celulares tales como síntesis y reparación de mitocondrias, reparación y replicación de DNA, síntesis de proteínas y división celular (figura 3).

Con base en la definición bioquímica de germinación, el ciclo celular toma un papel trascendental en la regulación de este proceso, puesto que se sabe que la reactivación del ciclo celular en el meristemo radicular precede a la protrusión de la radícula. Dicha reactivación del ciclo celular está dada principalmente por la expresión de los genes de ciclinas D, y por lo tanto, estos genes son reguladores fundamentales de la velocidad de germinación (Masubelele *et al.*, 2005).

En semillas secas de *Arabidopsis thaliana*, las células del embrión quedan arrestadas en la fase G1 del ciclo celular (Bewley y Black, 1994). De igual manera, la mayoría de las células embrionarias de maíz quedan arrestadas en G1 durante su maduración (Deltour y Jacqmard, 1974), y 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).



**Figura 3.** Procesos celulares asociados a la germinación. El esquema relaciona procesos de la célula en relación al tiempo y a la entrada de agua a la semilla (modificado de Black *et al.*, 2006).

Como se ha visto, la germinación de semillas proporciona un modelo fisiológico excelente para el estudio de la reactivación de la proliferación ya que en semillas secas la mayoría de las células se encuentran detenidas en la fase G1, particularmente en las zonas meristemáticas (Sánchez *et al.*, 2005).

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), DNA polimerasas, DNA ligasas, entre otras (Lara-Núñez *et al.*, 2008). Incluso, algunas de ellas no sufren modificaciones en dichos niveles a lo largo del proceso germinativo, como por ejemplo las DNA polimerasas y las Cdks, aunque sí se observan cambios en su actividad (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003). Algunas ciclinas, aunque no todas, muestran un comportamiento fluctuante durante la germinación, con una correlación parcial con su actividad de cinasa asociada (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006; Lara-Núñez *et al.*, 2008, Godínez-Palma *et al.*, 2013).

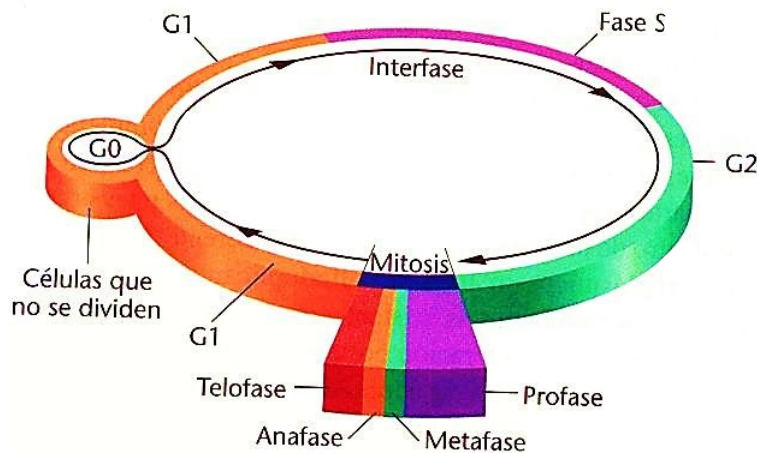
### Ciclo Celular

Todos los seres vivos, desde las bacterias hasta los mamíferos, son producto de repetidas rondas de crecimiento y división celular. En el caso de los organismos



unicelulares, una sola ronda de crecimiento y división resulta en un nuevo individuo, pero para organismos multicelulares son requeridas secuencias largas y complejas de proliferación celular en concierto con procesos de diferenciación, crecimiento y comunicación celular para poder originar un organismo funcional.

Todas las células se reproducen llevando a cabo una secuencia unidireccional de eventos ordenados durante los cuales el material celular se divide de manera aproximadamente equitativa en dos nuevas células. Sin embargo, dentro de este material celular, el DNA debe ser estrictamente duplicado y repartido de manera exacta en las dos células, de modo que cada una cuente con una copia completa del genoma de la especie, puesto que es éste el que contiene codificada la información necesaria para el desarrollo de un nuevo individuo. 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).



**Figura 4.** Representación esquemática de las fases del ciclo celular (Klug y Cummings, 1998)

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 DNA (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 DNA y su segregación en dos diferentes núcleos.

La caracterización y estudio de este sistema de regulación ha permitido la definición de tres fases previas a la separación de los cromosomas, las cuales constituyen la interfase (figura 4). Estas tres fases tienen distintos propósitos, como son la percepción de que las condiciones extra e intra celulares sean óptimas para poder iniciar y concluir el ciclo celular (fase G1) ya que una vez que la célula entra a este proceso debe concluirlo pues de lo contrario puede quedar arrestada a mitad del ciclo o entrar en apoptosis. Una vez que se han percibido estas condiciones óptimas, el material genético debe replicarse, lo cual ocurre durante la fase de síntesis o fase S. Concluida esta, durante la fase G2 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, 2003).

La organización básica del ciclo celular y su sistema de control son esencialmente los mismos en las células eucariontes, lo cual nunca significa que sean exactamente iguales, puesto que existen características como el tiempo de duración de cada fase que pueden variar no solo de una especie a otra, sino de un tipo celular a otro dentro de un mismo organismo, es por esto que podemos estudiar el proceso del ciclo celular de manera global en muchos modelos celulares diferentes, pero debemos ser cautelosos con los resultados derivados de dicho estudio, pues pueden ser específicos del modelo que se utilice. Gran parte de lo que conocemos proviene de estudios hechos en cultivos celulares y de organismos modelo específicos como levadura, *C. elegans*, rana, mosca, líneas celulares de mamíferos y plantas. Cabe resaltar que la tendencia de estudiar el ciclo celular en un contexto fisiológico de desarrollo es relativamente reciente y apenas comenzamos a comprender mecánicamente el papel de los reguladores del ciclo celular en el desarrollo de los organismos.

## **Regulación y reguladores del ciclo celular.**

El ciclo celular es un proceso muy importante en el desarrollo de cualquier organismo y, por lo tanto, es comprensible que la evolución se haya encargado de imponer sobre él un control muy estricto. 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 y referidos en la literatura: 1) la transición de la fase G1 hacia la fase S, 2) la transición de G2 a M y 3) la transición de metafase a anafase durante la mitosis, donde todos los cromosomas condensados deben alinearse en el ecuador de la célula antes de poder segregarse (Vázquez-Ramos, 2003).

*Grosso modo*, 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 ciclina (Cdks).

Uno de los sustratos más conocidos de estas Cdks que es fosforilado en una fase específica del ciclo celular es la histona H1 en cromosomas mitóticos (Herrera *et al.*, 1996; Contreras *et al.*, 2003; Sarg *et al.*, 2006). Otra proteína blanco de los complejos ciclina-cinasa bien caracterizada durante el ciclo celular es la proteína de retinoblastoma (Rb), cuya fosforilación tiene una importante función en la transición G1/S. En otros casos, la fosforilación mediada por Cdks sirve para la eliminación de componentes específicos del ciclo celular vía proteasoma, ya que el reconocimiento de proteínas blanco para proteólisis mediada por ubiquitinación normalmente requiere de fosforilaciones previas (Craig *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). En este contexto, es necesario señalar que 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).

El estudio de los principales reguladores del ciclo celular en el contexto del desarrollo del organismo ha contribuido enormemente a la comprensión de cómo se orquestan los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular en espacio y tiempo. Conocer cómo las señales que controlan el balance entre estos procesos se integran al funcionamiento de la maquinaria básica del ciclo celular ha sido un reto que no ha terminado por definirse, pero en el que se ha avanzado rápidamente con la perspectiva de sentar las bases moleculares del desarrollo. En este respecto, aunque el estudio del ciclo celular en plantas es más reciente que en animales y levaduras, ha avanzado enormemente pues ha tenido este enfoque contextualizado desde sus inicios.

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 postembrionario 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 postembrionario, y durante toda su vida, requieren continuamente de divisiones celulares en los meristemos seguidas de procesos de diferenciación para originar nuevos órganos iterativamente (Inzé *et al.*, 2005).

### **Las Cdks y su regulación.**

Al igual que en otros eucariontes, las Cdks actúan diferencialmente en las distintas etapas del ciclo celular de plantas y su regulación suele ser a nivel postraduccional más que transcripcional o postranscripcional. Como ejemplo tenemos que en *Arabidopsis thaliana*, los niveles de mRNA de CdkA no varían a lo largo del ciclo celular, pero su actividad de cinasa aumenta en la fase G1 y permanece alta durante la fase S. Por otra parte, en células BY-2 de tabaco, la actividad de cinasa de CdkA permanece alta durante G2, mientras que en células

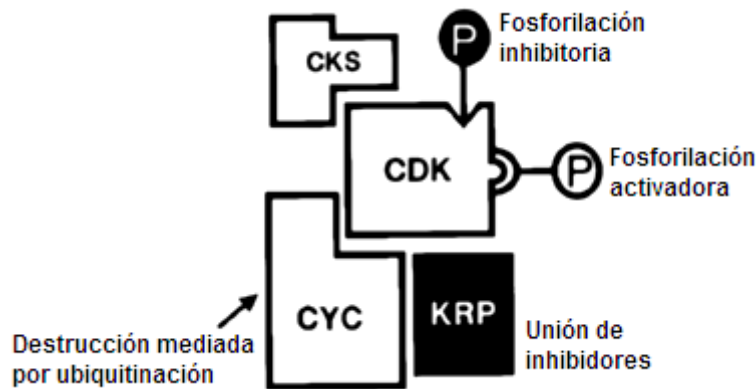
de *Arabidopsis* hay una reducción en esta actividad durante G2 y aparece un segundo pico de actividad en la transición hacia la fase M (Inzé y De Veylder; 2006). Esta regulación postraducciona se entiende a partir de su estructura, donde el estudio en las proteínas de animales ha brindado mayor información, y la homología con las de plantas sugiere mecanismos similares.

Las Cdks 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 extremos N-terminal y C-terminal. La unión de la ciclina estabiliza al sitio catalítico (revisado por 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  $\gamma$ -fosfato del ATP al sitio activo. Esta fosforilación activadora en T160 está dada por una Cinasa Activadora de Cdk (Cak) (revisado por Dewitte y Murray, 2003).

Además de la unión con ciclinas y la fosforilación por Cak (figura 5), existe una regulación negativa de la actividad de Cdk dada por fosforilación inhibitoria en los residuos T14 y Y15 catalizada por las cinasas Myt1 y Wee1. Esta regulación ya ha sido reportada tanto en *Arabidopsis* como en maíz (Sun *et al.* 1999; Sorrell *et al.*, 2002). En este contexto, datos de nuestro laboratorio sugieren que los complejos de ciclinas D con Cdks (A y B) durante la germinación son regulados por fosforilaciones inhibitorias y activadores (Godínez-Palma, datos sin publicar).

Las Cdks de tipo B son únicas de plantas y su expresión transcripcional está regulada por la progresión del ciclo celular, lo cual no se ha observado en Cdks de otras especies fuera de las plantas. Las CdkB1 se expresan desde el inicio de la fase S hasta la fase M en la mayoría de las especies examinadas (revisado en Dewitte y Murray, 2003). En maíz, recientemente reportamos que la presencia de la proteína CdkA es constante durante la germinación pero se asocia diferencialmente a distintas ciclinas tipo D, lo cual modifica la actividad de cinasa

asociada a estas ciclinas, además de que la asociación con CdkA y CdkB también es diferencial para cada ciclina (Godínez-Palma *et al.*, 2013) .



**Figura 5.** Regulación de la actividad de Cdk. Modificado de Dewitte y Murray, 2003.

Para que la Cdk pueda ser activada es necesario que estas fosforilaciones en T14 y Y15 sean removidas por una fosfatasa. En levadura y en mamíferos, esta fosfatasa se denomina Cdc25, y aunque aún no se conoce algún homólogo directo en plantas, es altamente probable la existencia de un equivalente funcional (Dewitte y Murray, 2003).

Así como las ciclinas son proteínas que promueven la actividad de las Cdk, existe otro tipo de proteínas que se unen a los complejos ciclina-cinasa para regularlos negativamente (figura 5), estas son denominadas inhibidores de Cdk (Ick) y a pesar de poseer una función regulatoria esencial en el ciclo celular, la conservación de secuencia entre los Ick de animales (Kip) y los de plantas (Kip Related Proteins o Krp) está limitada al dominio de interacción con ciclina y Cdk; sin embargo, tanto las Kip como las Krp poseen homología de función (Wang *et al.*, 1999). Además de los inhibidores Krp, recientemente se ha descrito otra familia de inhibidores de complejos Cyc/Cdk específico de plantas llamados Siamese (Sim) (Churchman *et al.*, 2006). Otro regulador del complejo ciclina-cinasa es la subunidad de Cdk (Cks) que puede actuar como modulador de la actividad de CDK y aparentemente su función es importante para el correcto andamiaje del complejo ciclina-Cdk con sus respectivos sustratos (Bourne *et al.*, 1996).

Cabe mencionar que las Cdks pueden funcionar también fuera del ciclo celular y regular otros procesos. Por ejemplo, CdkA, además de su función reguladora en 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). Además desempeña una función crítica en la reprogramación de células diferenciadas que, adyacentes a un daño tisular en gametóforos, regresan a un estado proliferativo desdiferenciado en *Physcomitrella patens* (Ishikawa *et al.*, 2011). Otro caso es el de CdkB1;1, cuya supresión reduce el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* principalmente mediante la inhibición de la elongación, independientemente de la división celular o la endorreproducción (Yoshizumi *et al.*, 1999); sin embargo, no se ha determinado qué ciclina se asocia a estas Cdks mientras cumplen funciones en procesos externos al ciclo celular.

### **Ciclinas.**

Las primeras ciclinas se identificaron en huevos de erizo de mar como unas proteínas cuyos niveles de acumulación fluctuaban durante el ciclo celular y es a ello que deben su nombre, es decir, a su aparición transitoria y cíclica (Evans *et al.*, 1983). Son una superfamilia de proteínas con homología relativamente baja, pero que comparten una región poco conservada de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos denominada centro de ciclina, el cual a su vez está constituido por dos dominios, el dominio ciclina amino y el dominio ciclina carboxilo (Nugent *et al.*, 1991; Noble, *et al.*, 1997). En todos los eucariontes, estas proteínas constituyen el mecanismo principal de control de la actividad de Cdk, ya que sin la unión de la ciclina, la subunidad Cdk es inactiva (revisado por Dewitte y Murray, 2003).

Existen diversos tipos de ciclinas en los organismos eucariontes, y algunos de ellos están conservados entre animales y plantas; sin embargo, también existen familias de ciclinas particulares a algunas especies. Por ejemplo, sabemos que en el genoma humano existen 22 genes de ciclinas que se agrupan con base en el análisis de su función y secuencia de aminoácidos (Nakamura *et al.*, 1995;

Pines, 1995). Estos grupos son A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, T y UNG2, y solo 5 de ellos (A, B, C, H, L) están presentes en plantas, aunque el grupo C solo se ha encontrado en *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2004). Por otro lado, existen tipos de ciclinas que sólo se encuentran en plantas, como son las ciclinas tipo D que aunque se denominan igual que las ciclinas D de animales, forman un grupo filogenético distinto y no muestran homología de secuencia con ellas (excepto por un motivo muy conservado en la región N-terminal que las caracteriza), aunque sí poseen funciones similares, al menos molecularmente, mientras que fisiológicamente esto aún no queda claro. Lo mismo ocurre con las ciclinas T y F, que en plantas fueron nombradas así porque fueron relacionadas topográficamente en un árbol filogenético a las ciclinas T y F de mamíferos, pero aunque las T están relacionadas igualmente a las T, H y L de humanos, no son ortólogos y forman un clado aparte (Wang *et al.*, 2004); lo mismo que las F, las cuales aparentemente son particulares de plantas monocotiledóneas y aún no es claro si son genes o pseudogenes (La *et al.*, 2006). También son específicas de plantas las ciclinas SDS que participan en la meiosis (Azumi *et al.*, 2002) y la ciclina J18 que solo se ha reportado en *Arabidopsis thaliana*. Las ciclinas U tampoco están presentes en mamíferos, pero en el 2004 Wang y colaboradores mostraron que están filogenéticamente agrupadas con al menos tres genes de protistas (Wang *et al.*, 2004).

La acumulación de las ciclinas depende ampliamente tanto de la regulación transcripcional como postranscripcional, y del recambio proteico dado por el balance entre la traducción de mensajeros y la degradación de las proteínas. Las ciclinas de tipo A y B poseen un motivo llamado “caja de destrucción” que las identifica para ser removidas por la vía del complejo promotor de anafase (APC - proteasoma, mientras que las ciclinas D poseen cajas PEST para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma (revisado por Dewitte y Murray, 2003).

Dentro del ciclo celular, las ciclinas A y B participan en la transición G2/M, mientras que las ciclinas D actúan durante la fase G1 y en la transición hacia la fase S. Las tres familias de ciclinas (A, B y D) son considerablemente más numerosas en plantas que en animales (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006), por lo



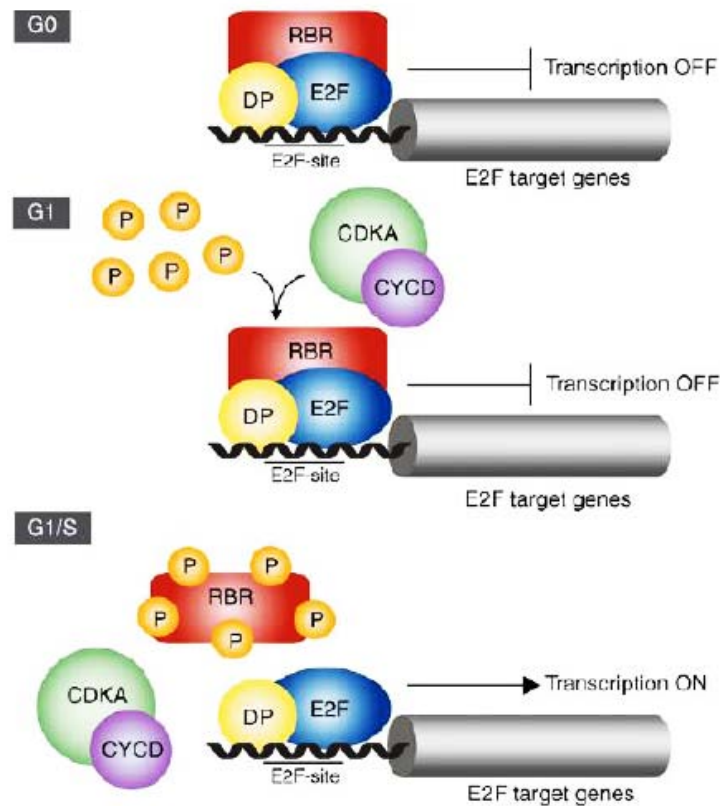
que es de esperar que posean funciones tiempo/espacio específicas y estén asociadas a otros procesos de desarrollo independientemente de su participación en el ciclo celular, o bien, también cabe la posibilidad de que algunos parálogos sean redundantes.

### **La vía CycD/Rb/E2F y la transición G1/S.**

Como se mencionó anteriormente, los complejos ciclina-cinasa actúan fosforilando sustratos específicos, lo cual provoca, junto con los procesos de degradación de proteínas, la progresión ordenada y unidireccional de las fases del ciclo celular. En nuestro grupo de trabajo hemos enfocado nuestra atención en uno de los principales puntos de regulación del ciclo celular: la transición de la fase G1 a la fase S. Durante este proceso, tanto en animales como en plantas, están involucradas principalmente las ciclinas de tipo D (CycD) (Inzé y De Veylder, 2006). El papel fundamental de las ciclinas tipo D es integrar las señales extracelulares con la maquinaria del ciclo celular (Sherr, 1995). La fase G1 está involucrada en la percepción y respuesta a señales de crecimiento, de desarrollo y ambientales (Oakenfull *et al.*, 2002) que permitirán a la célula progresar apropiadamente a lo largo de cada una de las demás fases hasta completar exitosamente el ciclo celular. Cuando existen las condiciones favorables para que la célula prolifere, las ciclinas D forman complejos con una Cdk, que en el caso de animales puede ser Cdk4 o Cdk6 y una vez ensamblado el complejo, Cdk4 debe fosforilarse en la treonina 172 (equivalente a la T160 de Cdk1) para adquirir actividad de cinasa. Esta fosforilación en T172 se debe al complejo de una Cak con ciclina H (Sherr, 1995).

En plantas, las ciclinas D forman complejos con la CdkA durante la fase G1 (Oakenfull *et al.*, 2002); sin embargo, en nuestro grupo hemos reportado la existencia de complejos de CycDs con CdkB durante la germinación, lo cual no necesariamente significa que estos complejos estén actuando en G1 (Godínez-Palma *et al.*, 2013). Análogamente al mecanismo de activación por Cak, existe un residuo de treonina fosforilable en la ciclina D (T191) necesario para la actividad

del complejo y su importación al núcleo (Nakagami *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha visto que si no existen condiciones favorables para la proliferación, como fuentes de carbono y señales hormonales que la promuevan, el complejo está unido a un inhibidor, que en animales puede ser del tipo Ick o Kip y en plantas es una Krp (Toyoshima y Hunter, 1994; Lee *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997).



**Figura 6.** Representación esquemática de la transición G1/S. En G0, Rbr reprime la actividad del factor transcripcional dimérico E2F/DP. La activación de Cycd/CdkA provoca la fosforilación de Rbr y la liberación de E2F/DP, que transcribe el programa de fase S. Rbr, Retinoblastoma-related protein; E2F, E2 factor; DP, dimerization partner.

En el caso de nuestro modelo de estudio, sabemos que la reactivación del ciclo celular en la germinación comienza mayoritariamente en la fase G1 y dada nuestra hipótesis de trabajo, el estudio de las ciclinas D se vuelve prioritario. Estructuralmente, las ciclinas D de plantas poseen el dominio ciclina amino pero el ciclina carboxilo está solo en algunas (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006; Buendía Monreal *et al.*, 2011). Todas excepto la CycD6;1, poseen el motivo LxCxE hacia el extremo amino. Este motivo está muy conservado en todas las ciclinas D de

plantas y animales y es requerido para la unión a la proteína Rb (Ewen *et al.*, 1993; Soni *et al.*, 1995). En plantas se ha demostrado que, *in vitro*, las ciclinas D con este motivo mutado son ineficientes para unirse a la proteína Rbr (Ach *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 1998).

Una vez que el complejo CycD-Cdk es activo, fosforila a la proteína Rb (llamada así por habersele descubierto en células tumorales de retinoblastoma) en múltiples sitios ubicados principalmente en el extremo carboxilo de ésta (Nakagami *et al.*, 2002). En estado hipofosforilado, Rb se encuentra unida al factor de transcripción dimérico E2F/DP (E2F forma un heterodímero con DP, del inglés *Dimerization Partner*, para transactivar, donde DP funciona en el reconocimiento del promotor mediante un dominio de unión a DNA), impidiendo la transactivación de sus genes blanco (figura 6); pero conforme Rb pasa a un estado hiperfosforilado, pierde afinidad por E2F/DP, se desprende de él y se permite entonces su actividad de transactivación de los genes que reconoce gracias a una secuencia canónica en los promotores (revisado en Inzé y De Veylder, 2006), y que en general, son genes cuyas proteínas serán necesarias para el comienzo y progresión de la fase S (figura 6).

En plantas se ha visto que E2F no controla únicamente la transcripción de genes relacionados con el ciclo celular, pues un estudio del genoma de *Arabidopsis* mostró que cerca de 6 mil genes son potencialmente regulados por E2F, de los cuales, apenas una tercera parte se relacionan al ciclo celular (Ramirez-Parra *et al.*, 2003). Sin embargo, por medio de microarreglos y herramientas bioinformáticas, fue posible identificar 70 genes blanco putativos de E2F que se conservan entre *Arabidopsis* y arroz y que codifican para proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, replicación del DNA y dinámica de la cromatina (Vandepoele *et al.*, 2005).

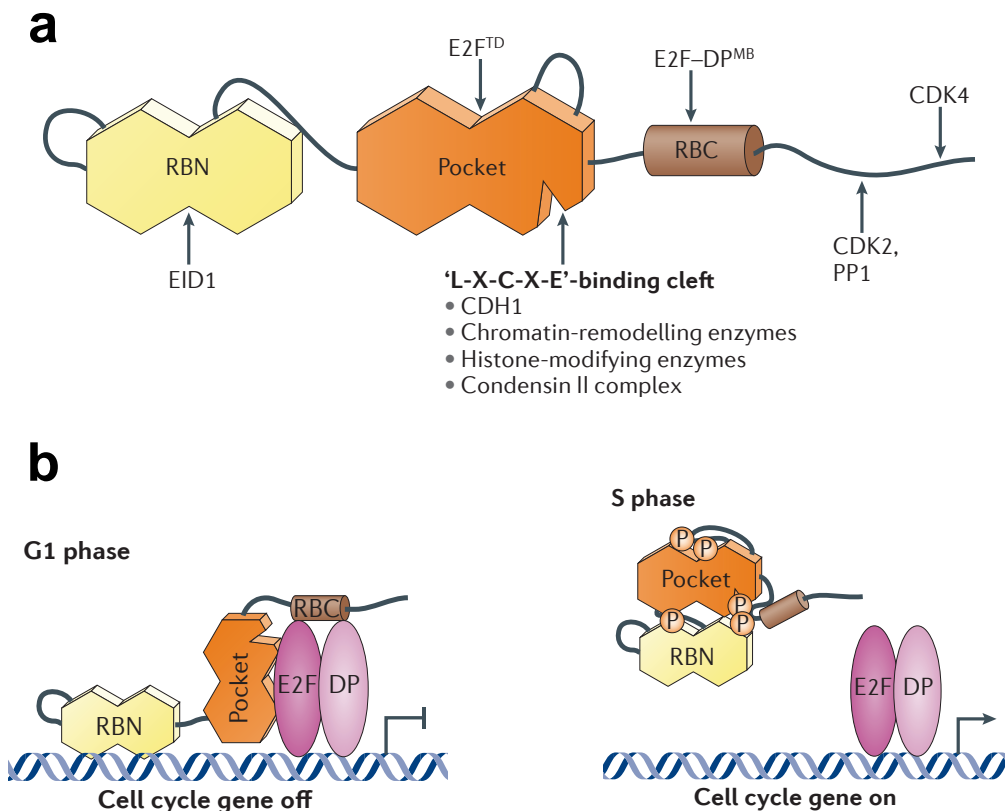
### **Rb y Rbr: función, estructura e interacciones.**

*i) Función.* La proteína de retinoblastoma (Rb) fue descubierta como una proteína que al estar mutada, induce excesiva proliferación y crecimiento de

células tumorales de retinoblastoma y osteosarcoma (Friend *et al.*, 1986). Debido a su importante función en la regulación negativa del ciclo celular y a que eliminar su actividad promovía desregulación y proliferación desmedida, además de haber sido determinado que esta proteína está alterada en numerosos tipos de cáncer, está definida como una de las proteínas supresoras de tumores más importantes que se conocen (Classon and Harlow, 2002). Actualmente, el estudio durante más de dos décadas y media sobre Rb ha permitido esclarecer que existe más de un mecanismo por el cual puede inhibir el progreso del ciclo celular, aunque el más aceptado es el dependiente de E2F/DP descrito en el apartado anterior.

En el mismo contexto, Rb es capaz de regular la apoptosis indirectamente mediante la regulación directa sobre E2F1 específicamente (en humanos existen 8 tipos de proteínas E2F). Se sabe que E2F1 sufre diversas modificaciones postraduccionales (fosforilación, acetilación y desmetilación) en respuesta al daño al DNA, lo cual permite la transactivación de genes que inducen muerte celular. De este modo, la inhibición de Rb sobre E2F1 se interpreta como un mecanismo que bloquea la apoptosis. Particularmente, se ha demostrado que E2F1 es la única E2F capaz de seguir unida a Rb durante la fase S incluso después de la fosforilación de Rb por Cdk, y por lo tanto la inhibición de la transcripción de genes blanco de E2F1, que en gran medida son genes proapoptóticos, persiste. Sin embargo, ante daño al DNA, Rb es desfosforilado en los sitios canónicos de Cdk (reprimiéndose a los genes de ciclo celular inducidos por las demás E2Fs) y fosforilado en otros sitios reconocidos por cinasas que se activan en respuesta al daño. Además, otras modificaciones postraduccionales sobre Rb (acetilación y metilación) aunadas a las que sufre E2F1, permiten ahora la transactivación de sus genes blanco sin que sea necesaria la disrupción entre Rb y E2F1 (revisado en Dick y Rubin, 2013). De este modo, Rb bloquea la transcripción de genes proapoptóticos mediada por Rb durante el ciclo celular, pero en respuesta a daño al DNA, el complejo Rb-E2F1 sufre numerosas modificaciones postraduccionales que activan la expresión de dichos genes. En otras palabras, cuando las condiciones para proliferación celular son favorables, Rb reprime la apoptosis y permite el ciclo celular, pero cuando ocurre daño al DNA que no fue posible

reparar, reprime al ciclo celular y activa el proceso apoptótico; todo mediado por modificaciones postraduccionales tanto en E2F1 como en Rb.



**Figura 7.** Estructura, función e interacciones de Rb. a) Esquema de la estructura de Rb de humanos donde se muestra con flechas los sitios de interacción con diversas proteínas y los dominios separados por secuencias linker intrínsecamente desordenadas. b) Interacción de Rb hipofosforilado con E2F/DP durante la fase G1 y plegamiento de Rb hiperfosforilado que impide su unión a E2F en la transición a fase S. Modificado de Dick y Rubin, 2013.

ii) *Estructura.* Rb forma parte de una familia de proteínas definidas por la presencia de un dominio identificado por ser la región mínima para la unión a proteínas virales (como la proteína E1A de adenovirus, la SV40 TAg -antígeno T del virus del simio- y la proteína E del virus del papiloma humano). Este dominio, denominado “*pocket*”, está conformado a su vez por los subdominios pocket A y pocket B (figura 7), los cuales se asemejan estructuralmente a la conformación de las ciclinas pero con tres hélices extra, e interaccionan entre ellos para formar el dominio *pocket*. Además, Rb posee otros dos subdominios semejantes en el extremo amino, los cuales forman un dominio parecido al *pocket* que se denomina dominio amino terminal. En la región del extremo carboxilo, hay otra secuencia

menos conservada que aunque se define como el "dominio" carboxilo terminal, es en realidad intrínsecamente desordenado. Entre cada uno de los dominios y subdominios existen secuencias *linker* sin estructura, las cuales son funcionalmente muy relevantes, pues poseen múltiples sitios de fosforilación canónicos para Cdks y participan en la inactivación de Rb (revisado en Dick and Rubin, 2013; figura 7).

La proteína homóloga a Rb en plantas se denomina *Retinoblastoma-Related protein* (Rbr) y posee alrededor de 40% de identidad de secuencia con Rb de humano. Tanto Rb como Rbr y las demás proteínas de la familia *pocket* que conservan los dominios amino, carboxilo y pocket, tienen una masa cercana a 100 KDa. En Rbr también pueden distinguirse los dominios y subdominios correspondientes así como los sitios de fosforilación en las secuencias *linker* (revisado en Gutzat *et al.*, 2012). En Rb, dentro del subdominio pocket B se encuentra una hendidura formada por tres hélices donde interactúa con el motivo LXCXE (Lee *et al.*, 1998) y por identidad de secuencia, se predice que este sitio estructural está conservado en Rbr (Revisado en Gutzat *et al.*, 2012).

*iii) Interacciones.* La actividad general de las proteínas *pocket* como Rb y Rbr consiste en estimular o inhibir a otras proteínas mediante la interacción proteína - proteína. A lo largo 26 años desde su descubrimiento, se ha acumulado una larga lista de interactores de Rb y Rbr, algunos sumamente conservados evolutivamente y otros más específicos. De esta forma, puede verse que estas proteínas de gran tamaño sirven como una plataforma para múltiples contactos protéicos y se ha definido sitios específicos dentro de su estructura y secuencia para diversas proteínas con las que interacciona. Por ejemplo, para la inactivación del factor transcripcional E2F durante el ciclo celular, se ha identificado una región en la interfase entre los subdominios *pocket A* y B que contacta directamente al dominio de transactivación de E2F. Un segundo contacto con E2F/DP tiene lugar entre el dominio carboxilo terminal de Rb (RBC) y una secuencia conservada en ambas proteínas, E2F y DP, llamada *marked box* (figura 7). En el dominio amino terminal

de Rb ocurre la interacción con EID1 (*E1A-like inhibitor of differentiation 1*) (Dick and Rubin, 2013).

Rb también sirve como sitio de interacción (*docking site*) con fosfatasa y cinasas. Distintos sitios de unión dentro del Rb son contactados por diferentes complejos Cyc-Cdk como CycA-Cdk2, CycD-Cdk4 y CycD-Cdk6, aunque no son claras las causas ni consecuencias de las diferencias en la preferencia de cada sitio dentro del Rb por una u otra Cdk (Pan *et al.*, 2001; Dick and Rubin, 2013). En este sentido, se ha visto que la proteína-fosfatasa 1 se une al mismo sitio de *docking* que la CycA y puede inhibir la actividad de Cdk sobre Rb por competencia por el sitio de interacción además de regular el estado de fosforilación (Hirschi *et al.*, 2010). Interesantemente, la interacción de Rb con la proteína de caja F SKP2 (que marca proteínas para poliubiquitinación y degradación por proteasoma) se propone como un mecanismo del bloqueo del ciclo celular, específicamente de la actividad de Cdk, independiente de E2F, ya que Rb impide que SKP2 induzca la degradación de p27, un inhibidor de Cdk y por lo tanto p27 se estabiliza y bloquea la actividad de Cdk, evitando así la progresión del ciclo celular (Ji *et al.*, 2004). Un mecanismo alternativo para la inhibición del ciclo celular independiente de E2F propone que la interacción con SKP2 es simultánea a la interacción con el Complejo Promotor de la Anafase (APC) y promueve la degradación de SKP2 en lugar de sólo secuestrarla, aunque al final la inactivación del ciclo también ocurre por la estabilidad de p27 y su actividad inhibidora sobre Cdks (Binne *et al.*, 2007).

### **iii.i) LxCxE: Motivo de unión a Rb**

Además del sitio de interacción con E2F, el dominio *pocket* posee otro sitio que estructuralmente es una hendidura donde interactúan proteínas que tienen un motivo canónico y altamente conservado en la evolución: LXCXE, donde X es cualquier aminoácido y L, C, E son leucina, cisteína y glutamato, respectivamente (Lee *et al.*, 1998). Sin embargo, otros estudios estructurales han demostrado que los aminoácidos que flanquean el motivo LXCXE también son importantes en la fuerza de interacción (Singh *et al.*, 2005). Entre las proteínas más estudiadas que

interaccionan con Rb mediante el motivo LXCXE se encuentran las proteínas virales TAg, E1A y E7, las cuales requieren de esta interacción para su actividad (Lee *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001). El sitio de unión para el motivo LXCXE está conservado en genes ortólogos y parálogos de Rb y está predicho en Rbr. De igual forma, proteínas de virus que infectan plantas también contienen el motivo LXCXE y es fundamental para su unión a Rbr (Ach *et al.*, 1997). Por otra parte, existen proteínas que interactúan con el mismo sitio de Rb pero no tienen un motivo LXCXE canónico (revisado en Dick and Rubin, 2013).

Además de las proteínas virales, también hay una gran cantidad de proteínas celulares que usan el motivo LXCXE para unirse a Rb y Rbr. Ejemplo de ellas son algunas enzimas modificadoras de la cromatina y de histonas que participan en la regulación de la transcripción mediada por Rb (Brehm y Kouzarides, 1999). Particularmente, se ha demostrado que una desacetilasa de histona se une a Rb gracias al motivo LXCXE para regular genes blanco de E2F (Bourgo *et al.*, 2011). Otro ejemplo importante y ampliamente conservado evolutivamente son las ciclinas tipo D. Es importante volver a señalar que entre las ciclinas D de animales y de plantas existe un porcentaje de identidad muy bajo y que filogenéticamente parecen no estar relacionadas (Wang *et al.*, 2004), pero ambos grupos conservan el motivo LXCXE e interaccionan con Rb y Rbr, respectivamente para fosforilarlo (Huntley *et al.*, 1998). Al igual que la interacción con E2F, las interacciones en la hendidura para LXCXE son bloqueadas por sitios específicos de fosforilación por Cdks (revisado en Dick and Rubin, 2013).



## ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

En el año 2009, con la liberación de la secuencia del genoma de maíz (Schnable *et al.*, 2009), inició en nuestro laboratorio un proyecto que pretendía identificar todos los genes que codifican para proteínas de la familia de ciclinas tipo D (CycDs) en maíz (*Zea mays*). El trabajo, publicado en 2011, reportó la existencia de al menos 17 marcos de lectura abiertos (ORF) cuya secuencia de proteína predicha se agrupaba filogenéticamente con las ciclinas tipo D de las ya publicadas para *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Buendía-Monreal *et al.*, 2011) y que se dividían en los subgrupos filogenéticos correspondientes en dichas especies, es decir, se encontró que en maíz existe al menos un gen miembro de cada uno de los siete subgrupos (*CYCD1* a *CYCD7*) en los que se dividen las *CYCDs* de plantas (Buendía-Monreal *et al.*, 2011). El análisis por RT-PCR de dichos genes durante la germinación y en tres diferentes tejidos de plántula (mesocotilo, punta de raíz y punta de hoja) mostró patrones de expresión diferenciales, lo cual sugiere que no son redundantes. De los 17 genes, no fue posible encontrar la expresión de dos de ellos (*CYCD5;2b* y *CYCD7;1*).

Dado que en el laboratorio nos hemos centrado en estudiar a los reguladores de la transición G1/S durante la germinación de maíz y con la publicación de los genes de *CYCDs*, se abrió la posibilidad de estudiar a las proteínas codificadas por dichos genes, pues se sabe que en general las *CYCDs* son blanco de intensa regulación y los patrones de mRNA poco o nada nos dicen sobre la función que ejerce la proteína. La estrategia consiste en generar anticuerpos específicos contra la proteína de interés de modo que pueda estudiarse a la proteína endógena sin necesidad de recurrir a líneas transgénicas de reporteros traduccionales que no necesariamente se comportan igual y para nuestro modelo en particular podrían suponer más desventajas que ventajas.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de las CycD de plantas reveló que contienen el motivo LXCXE de unión a Rbr, lo cual sugiere su actividad sobre un

sustrato específico, con excepción de CycD6, que no lo presenta. Esto es consistente al menos en *Arabidopsis*, arroz, tomate, uva, *Brachypodium distachyon*, álamo y también en maíz (datos sin publicar). Dentro de los demás subgrupos de CycD, existen contadas excepciones donde el motivo sólo es menos conservado y muestra variaciones de un aminoácido (Buendía-Monreal *et al.*, 2011). Esta característica única del subgrupo CycD6 de plantas lo hace particularmente interesante. Por lo anterior, se eligió a la proteína CycD6;1 de maíz como objeto de estudio en el presente proyecto.

En el momento que dio inicio este proyecto en el laboratorio (2010) lo único que se sabía de las CYCD6 eran patrones de acumulación de mRNA en distintos tejidos, órganos o tiempos de desarrollo determinados por RT-PCR y que algunas fitohormonas podían alterar su expresión (Guo *et al.*, 2007; Buendía Monreal, 2011). Más tarde ese mismo año, fue publicado en la revista *Nature* un grupo de genes de *Arabidopsis thaliana* regulados por los factores transcripcionales SHORT-ROOT (SHR) y SCARECROW (SCR) determinado por microarreglos (Sozzani *et al.*, 2010), entre los cuales estaba *CYCD6;1*, de la cual también se mostraba su localización tisular en el meristemo de la raíz y en el embrión inmaduro de líneas transgénicas para el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del gen de *CYCD6;1*, es decir, un reportero transcripcional. En 2012, otro trabajo de líneas reporteras transcripcionales con la proteína Gus mostraba la expresión de la *CYCD6;1* de *Arabidopsis thaliana* en el embrión durante el desarrollo de semilla, pero en la semilla madura estaba únicamente en el endospermo (Collins *et al.*, 2012), una capa unicelular de gran relevancia en el control de la germinación.

El mismo año, en otro artículo demostraron por primera vez que la función de la CycD6;1 en *Arabidopsis thaliana* es guiar la fosforilación de Rbr específicamente en las células iniciales de corteza y endodermis (CEI) del nicho de células madre del meristemo apical de la raíz. Análogamente al mecanismo descrito anteriormente para la inhibición de E2F, en este caso Rbr se encuentra

reprimiendo al dímero de factores transcripcionales SCR-SHR y la fosforilación del complejo CycD6;1-CdkB1;1 sobre Rbr permite la actividad de SCR-SHR, lo cual provoca la división celular asimétrica de la CEI y posteriormente de la CEID (*CEI daughter cell*) para dar origen a las células meristemáticas de dos tejidos radiculares diferentes: corteza y endodermis (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012). Tan solo un par de meses después, se publicó un artículo muy similar pero con discrepancias del primer reporte. A diferencia del artículo de Cruz-Ramírez *et al.* (2012), donde demostraron que la interacción de CycD6;1 con CdkB1;1 era específica, en el otro determinaron que CycD6;1 podía unirse tanto a CdkA como a CdkB1, pero que únicamente formaba un complejo activo con CdkA (Weimer *et al.*, 2012). En cuanto a la actividad de cinasa asociada a CycD6;1, Cruz-Ramírez y colaboradores (2012) establecieron que está dada sobre el dominio *pocket* de Rbr pero que no hay actividad sobre la región C-terminal, a diferencia de la mayoría de las CycDs. Weimer y colaboradores (2012) únicamente ensayaron la actividad de cinasa sobre histona H1.

El patrón de acumulación del mRNA durante la germinación de maíz muestra que la CYCD6;1 tiene niveles indetectables de mensajero en el eje embrionario de la semilla seca y comienza a expresarse conforme avanza la germinación (Buendía-Monreal *et al.*, 2011). En cuanto a la regulación de CYCD6 por fitohormonas también ha sido reportado que *CYCD6;1* de arroz responde negativamente a citocininas a nivel de transcripción (Guo *et al.*, 2007). *CYCD6;1* en la raíz de *Arabidopsis thaliana* aumenta su expresión en presencia de auxinas (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012) y de paclobutrazol, un inhibidor de la síntesis de ácido giberélico (Koizumi *et al.*, 2013), una hormona que entre otros procesos, controla positivamente el proceso germinativo. Sin embargo, con las concentraciones probadas de auxina, la *CYCD6;1* de maíz no mostró cambios significativos en su expresión, aunque sí hubo reducción de mRNA con citocininas en las primeras 8 horas de germinación y con ácido absísico (ABA) la represión permaneció por al menos 16 horas después de la imbibición (Buendía-Monreal *et al.*, 2011). No obstante, aún queda mucho por explorar sobre la regulación hormonal de este

gen, pues sabemos que las fitohormonas también pueden regular a las CycDs a otros niveles (proteína y actividad, por ejemplo) o bien, que existe comunicación cruzada (crosstalk) en las vías de señalización de diferentes hormonas o entre hormonas y azúcares (Gutiérrez *et al.*, 2005).

A pesar de que se han acumulado datos importantes sobre CYCD6;1, especialmente en *Arabidopsis thaliana*, a la fecha existe muy poca información sobre la proteína, que a fin de cuentas, es la responsable de la función. Lo único que se sabe proviene de mutantes nulas en el gen de *CYCD6;1*: las semillas no mostraban ningún fenotipo claro en el tiempo de germinación (al menos bajo las condiciones usadas), y en plántulas, el único efecto visible fue una ligera reducción en la longitud de la raíz (Sozzani *et al.*, 2010).

Durante la primera etapa de este proyecto (tesis de licenciatura) se obtuvieron anticuerpos policlonales específicos contra CycD6;1 de maíz capaces de reconocer a la proteína endógena y se determinó que en ejes embrionarios embebidos durante 24 horas, la proteína está presente desde la semilla seca y durante todos los tiempos de imbibición probados, habiendo una reducción hacia las 18 y 24 horas después de la imbibición; además se detectó la interacción entre CycD6;1 y CdkA mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Zamora Zaragoza, 2012). Por otra parte, aunque la interacción entre CycD6;1 y Rbr ya ha sido reportada para *Arabidopsis thaliana* (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012), no se ha mencionado nada del mecanismo por el cual podría darse la interacción dada la carencia del motivo LXCXE en CycD6;1. Además, no es posible extrapolar los datos de *Arabidopsis* hacia maíz y suponer que todo lo reportado para una planta será absolutamente válido para la otra. Existen diferencias enormes entre *Arabidopsis* y maíz tan sólo morfológicamente y evidentemente las estructuras de maíz son más complejas. Esto se hace evidente también en el número de genes. Mientras que en *Arabidopsis* existen 10 genes de ciclinas D, en maíz hay 17; y aunque ambas plantas sólo poseen un gen de CYCD6, en maíz existen cuatro genes de RBR (RBR1 - RBR4) cuando en *Arabidopsis* sólo existe RBR1.

Con este panorama, se planteó caracterizar más detalladamente el comportamiento de la CycD6;1 de maíz en condiciones fisiológicas y su probable interacción con Rbr. La caracterización incluye patrones de acumulación, inmunolocalización y probables interacciones durante la germinación de semillas de maíz.

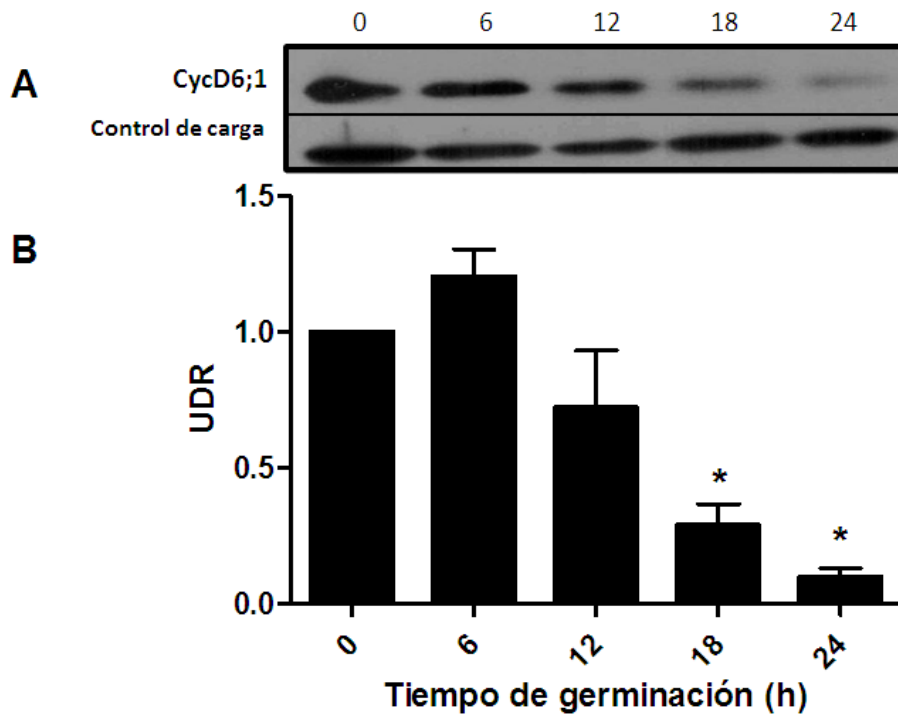


Figura 1. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación *ex situ* de ejes embrionarios de maíz. A) inmunodetección de CycD6;1 de 0 a 24 horas postimbibición. B) Densitometría de A. UDR, Unidades de densidad relativa. n=3; \*\*P<0.01 Tomado de la tesis de licenciatura (Zamora Zaragoza, 2012)

Dado que

- a) la expresión de *CYCD6;1* en *Arabidopsis thaliana* es específica de las CEI/CEID (Sozzani *et al.*, 2010);
- b) en maíz existe una mayor expresión de *CYCD6;1* en la punta de raíz que en cualquier otro tejido analizado (Buendía-Monreal *et al.*, 2011);
- c) La raíz embrionaria de maíz se encuentra estructuralmente completa en la semilla madura (Hochholdinger, 2009);
- d) La proteína *CycD6;1* de maíz está presente en ejes embrionarios embebidos (Zamora Zaragoza, 2012);
- e) *CycD6;1* de *Arabidopsis* se une a Cdk5 y posee actividad de cinasa sobre Rbr (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012; Weimer *et al.*, 2012);
- f) *CycD6;1* de maíz se une a CdkA en ejes embrionarios embebidos (Zamora Zaragoza, 2012),

se plantea la siguiente

## HIPÓTESIS

La *CycD6;1* de maíz se localizará dentro de la zona meristemática de la raíz embrionaria formando complejos activos capaces de fosforilar a Rbr durante la germinación de semillas.

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

Caracterizar la presencia y actividad de cinasa asociada a *CycD6;1* durante la germinación de semillas.

### Objetivos particulares.

- Determinar el patrón de acumulación de la proteína *CycD6;1* durante la germinación de semillas de maíz.
- Evaluar la interacción entre *CycD6;1* y Rbr.
- Evaluar la actividad de cinasa asociada a complejos de *CycD6;1* sobre Rbr.
- Determinar la localización tisular de *CycD6;1* en ejes embrionarios durante la germinación.

## RESULTADOS

Durante el trabajo de tesis de licenciatura (Zamora Zaragoza, 2012) se generaron anticuerpos policlonales contra la CycD6;1 (número de acceso: GRMZM2G050933) en conejos inmunizados con una proteína de fusión que contiene GST en el extremo amino y el péptido inmunogénico de CycD6;1 en el extremo carboxilo (P239 - G292); esta proteína representa el antígeno (Ag) reconocido por los anticuerpos anti-CycD6;1 y se le denomina GST:CycD6-Ag. Estos anticuerpos fueron validados para el reconocimiento específico de ZmCycD6;1 mediante un ensayo de competencia en el cual se preincubaron los anticuerpos anti-ZmCycD6;1 con cantidades crecientes de GST:CycD6-Ag y después se utilizaron para el reconocimiento de la CycD6;1 endógena en extractos proteicos de maíz mediante western blot, de manera que la intensidad de la banda correspondiente a CycD6;1 (con las mismas condiciones de exposición) disminuyera debido a que los anticuerpos disponibles en las distintas alícuotas son cada vez menos. Como control positivo se utilizó anticuerpos sin preincubar y como control negativo los anticuerpos se preincubaron con albúmina sérica bovina (BSA) en una cantidad equivalente a la más alta usada de GST:CycD6-Ag, de manera que la BSA, a pesar de ser una proteína de alta masa molecular y con una gran cantidad de epítomos, no compitió con la Cycd6;1 endógena, lo cual indicó que los anticuerpos son específicos (Zamora Zaragoza, 2012).

Puesto que GST:CycD6-Ag tiene una masa molecular aproximada de 32 KDa, de los cuales 26 KDa corresponden a GST, una fracción importante de la población de anticuerpos corresponde a anti-GST; por lo anterior, al iniciar el trabajo de maestría, se decidió enriquecer la población de anticuerpos anti-CycD6;1 mediante la remoción de anticuerpos anti-GST. Para ello se sobreexpresó GST y se incubó el suero inmune anti-CycD6;1. El sobrenadante se recuperó y juntó con la fracción de lavado.

Después del proceso de remoción de anticuerpos anti-GST, se repitió el ensayo de competencia para verificar la validación de los anticuerpos purificados,





En la figura 8b se muestra el western blot en el que se cargó extracto de bacterias transformadas con la construcción de pPal7-CycD6-FL y se observa el reconocimiento de una banda de masa esperada únicamente en el carril donde se cargó extracto de bacterias a las que se agregó IPTG para inducir la sobreexpresión de PeX:CycD6-FL. Cabe mencionar que también se observa una banda de menor masa molecular que podría ser un producto de degradación, pues está únicamente en el extracto de bacterias inducidas con IPTG y dado que el CycD6-Ag se localiza hacia el extremo carboxilo de la CycD6;1, no podría ser un producto de traducción truncado, pues la masa no corresponde a la de una proteína que sólo le faltaran menos de 20 aminoácidos, como tendría que ser el caso para haber reconocimiento en CycD6-Ag.

### **CycD6;1 se acumula diferencialmente durante la germinación.**

Dado que el eje embrionario contiene todas las estructuras que darán origen a las diferentes partes de la planta después de la germinación, resulta particularmente interesante determinar si CycD6;1 está presente en el eje durante la germinación. Dentro del eje se encuentran los meristemos del tallo y de la raíz, los cuales son nichos de células altamente proliferativas que se generan a partir de células madre y continúan proliferando hasta alcanzar zonas donde la tasa de división celular es menor y comienzan procesos de elongación celular seguidos de diferenciación, donde las células dejan de dividirse. Por lo anterior, resulta factible que un regulador del ciclo celular, como es una CycD, se encuentre presente en el eje embrionario durante la germinación, ya que en este proceso ocurre una reactivación metabólica global que incluye la activación del ciclo celular.

Anteriormente, en el trabajo de licenciatura se reportó la acumulación de la proteína CycD6;1 en ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 horas (Zamora Zaragoza, 2012). Sin embargo, este enfoque, aunque involucra a la proteína endógena, no necesariamente es representativo de la fisiología normal de la semilla, pues los ejes embrionarios en dicho trabajo fueron extraídos de la semilla seca y posteriormente embebidos en una solución de Tris 50mM suplementada con sales y sacarosa 2%; pero es sabido que durante la germinación de la semilla

ocurre una amplia comunicación y señalización hormonal y por azúcares entre el escutelo y el eje embrionario (Sánchez-Linares *et al.*, 2012), las cuales a su vez podrían estar regulando la expresión de genes que participan en procesos de proliferación y desarrollo.

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió determinar los patrones de acumulación de la CycD6;1 endógena durante la germinación de semillas, para lo cual se usaron semillas desinfestadas y germinadas a 25°C en oscuridad sólo en presencia de agua, lo cual impone condiciones más representativas de la fisiología normal de la germinación. Asimismo se amplió la ventana de estudio de 24 a 36 horas, pues en el caso de los ejes extraídos de la semilla seca, la solución de imbibición entra en contacto directamente con el eje de manera inmediata, mientras que en las semillas tiene que ocurrir una toma activa de agua antes de entrar en contacto con la totalidad del eje (Bewley y Black, 1994).

Para determinar semicuantitativamente la acumulación de CycD6;1, se inmunodetectó en ejes extraídos cada 6 horas después de la germinación y se comparó con los niveles de la proteína en ejes de semilla seca mediante un análisis densitométrico previa normalización con CycA, que permanece sin cambios durante la germinación.

En la figura 9a se observa que la cantidad de proteína aumenta significativamente en las primeras 6 horas de imbibición y se mantiene constante hasta las 24 horas. A las 30 horas ocurre una caída drástica en los niveles de proteína, siendo ahora menores incluso que los de semilla seca. Esta tendencia continúa hacia el término de la germinación, pues a las 36 horas el análisis se realizó para dos diferentes poblaciones de semillas: sin germinar (36) y germinadas (36g), tomando como criterio la protrusión radicular y ruptura de coleorriza. Cabe señalar que en todos los casos, incluso a 36 horas de semillas germinadas (36g) cuya raíz había roto la coleorriza, este tejido fue sistemáticamente incluido para la extracción de proteínas. En los ejes de semillas germinadas por 36 horas la presencia de CycD6;1 es prácticamente indetectable.

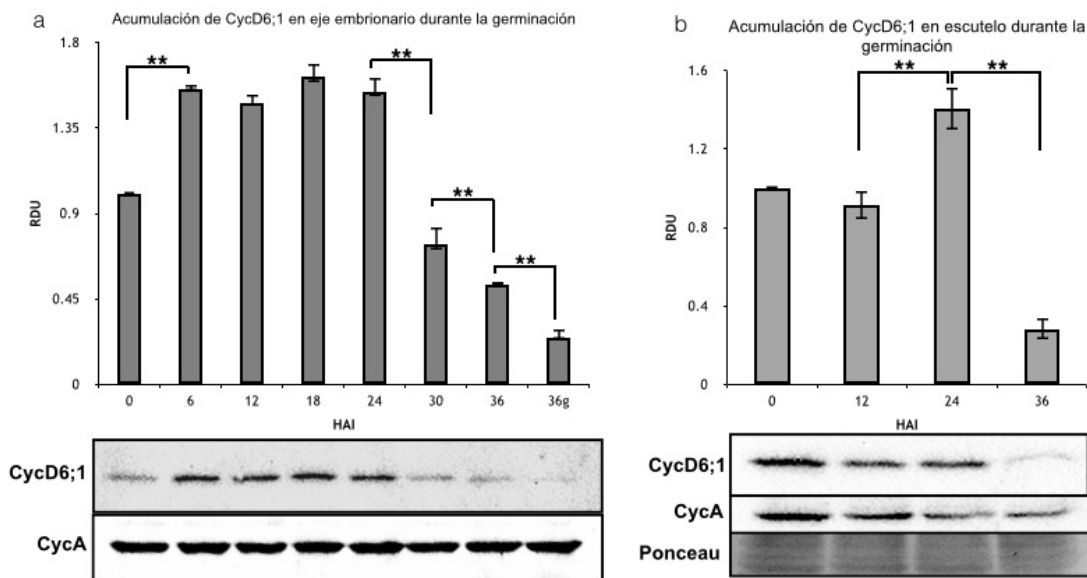


Figura 9. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación de semilla. Análisis densitométrico de la inmunodetección por western-blot de CycD6;1 a diferentes tiempos después de la imbibición en a) Eje embrionario y b) escutelo. HAI, horas después de imbibición; 36g, 36HAI en semillas germinadas; RDU, Unidades de densidad relativa  $\pm$  SD. n=3; \*\*P<0.01

Aunque el escutelo no dará origen a ninguna estructura anatómica de la planta después de la germinación, forma parte del embrión y juega un papel muy importante en este proceso, por lo cual se decidió analizar si CycD6;1 también está en este tejido, y como se muestra en la figura 9b, tiene un patrón de acumulación similar al de eje embrionario, con la salvedad de que el aumento ocurre después de las 12h. Sin embargo, no descartamos que este efecto sea más una consecuencia de la normalización respecto a la CycA, puesto que esta proteína no parece constante como lo hace en el eje. A pesar de esto, la disminución a 36 horas es evidente.

**Cycd6;1 se localiza en la coleorriza y se transloca del citoplasma al núcleo a lo largo de la germinación.**

En el eje embrionario se encuentran los meristemos apicales del tallo y de la raíz y al ser células proliferativas, especulamos que la probabilidad de encontrar a la CycD6;1 en los meristemos sería mayor. Además, en *Arabidopsis thaliana* se demostró que el gen se expresa en el meristemo apical de la raíz, específicamente en las CEI/CEID y por lo tanto, esperábamos que la CycD6;1 de maíz también estuviera en los tejidos correspondientes.

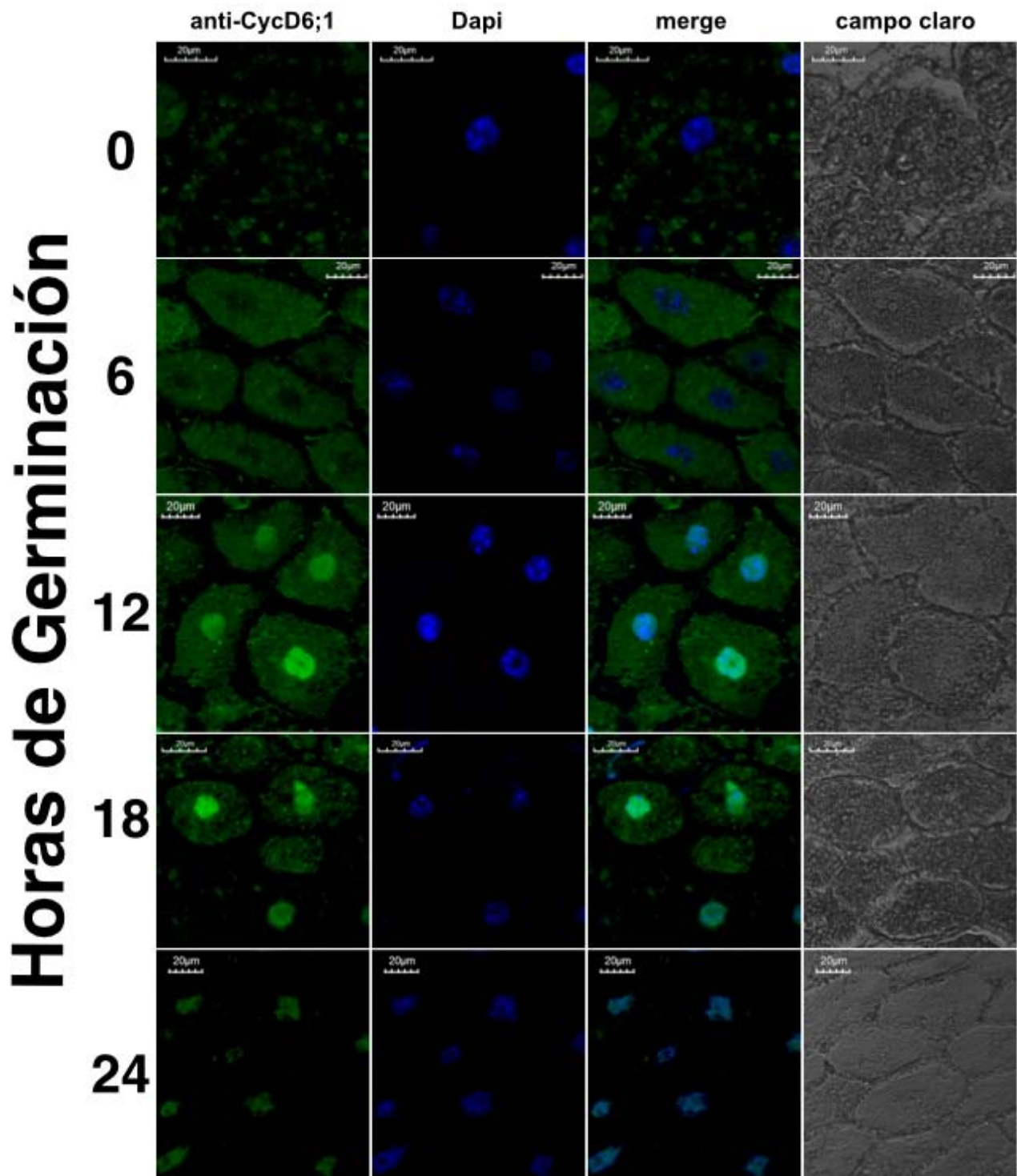


Figura 10. Inmunolocalización por fluorescencia de CycD6;1 en células de la coleoriza durante la germinación de semilla en las primeras 24 h de imbibición. Barras de escala = 20µM. El tejido mostrado se referencia en ejemplos de cortes histológicos en el apéndice 3.

Para determinar la localización de CycD6;1 se realizaron ensayos de localización por inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-CycD6;1 para reconocer a la proteína endógena en cortes histológicos de ejes embrionarios extraídos de semillas que estuvieron embebidas durante distintos tiempos (cada 6 horas de 0 a 24 horas). El resultado de microscopía confocal se muestra en la figura 10. CycD6;1 se localizó en la coleorriza, el tejido que cubre y protege a la raíz embrionaria. La coleorriza es un tejido diferenciado que además de servir de protección, participa en la señalización hormonal que recibe el eje embrionario durante la germinación y en otras especies controla la dormancia de la semilla (Barrero *et al.*, 2009).

Por otra parte, además de la localización tisular, la señal fluorescente de la CycD6;1 se encuentra mayoritariamente en el citoplasma de la semilla seca con un patrón granuloso. A las 6 horas de germinación, la señal de la CycD6;1 pierde el patrón granuloso pero sigue teniendo mayor presencia en el citoplasma que en el núcleo. A partir de este punto es notorio como la señal comienza a aparecer gradualmente en el núcleo conforme avanza el tiempo de germinación. A las 12 horas, en prácticamente todas las células se observa señal de CycD6;1 tanto en el citoplasma como en el núcleo y a las 18 horas ya se observan células donde la señal está únicamente en núcleo, aunque en la mayoría aún se encuentra señal citoplasmática pero más débil que la de 6 y 12 horas. Esta tendencia continúa 6 horas después, de manera que a 24 horas prácticamente en todas las células la señal es exclusivamente nuclear.

**La actividad de cinasa asociada a CycD6;1 durante la germinación implica un nivel más de regulación.**

Una de las razones primordiales para estudiar a CycD6;1 a nivel de proteína en lugar de mRNA, es que sabemos que las CycDs poseen una extensa regulación a diferentes niveles y por distintos estímulos y que la función está dada por la proteína, no por el mRNA. Particularmente en el caso de CycD6;1, el patrón de mRNA reportado en nuestro laboratorio (Buendía-Monreal *et al.*, 2011) difiere considerablemente de lo observado para la proteína (Zamora Zaragoza, 2012;

figura 9). Sin embargo, la función primordial de las ciclinas está dada cuando forman un complejo proteico con la subunidad catalítica Cdk. Además, la actividad del complejo Cyc/Cdk posee varias formas de regulación más allá que la unión de ambas subunidades. Entre las formas más estudiadas de regulación se encuentran la unión de otras proteínas moduladoras y/o inhibitorias de la actividad de cinasa, y las modificaciones postraduccionales, de las cuales las fosforilaciones (activadoras e inhibitoras) son las más importantes.

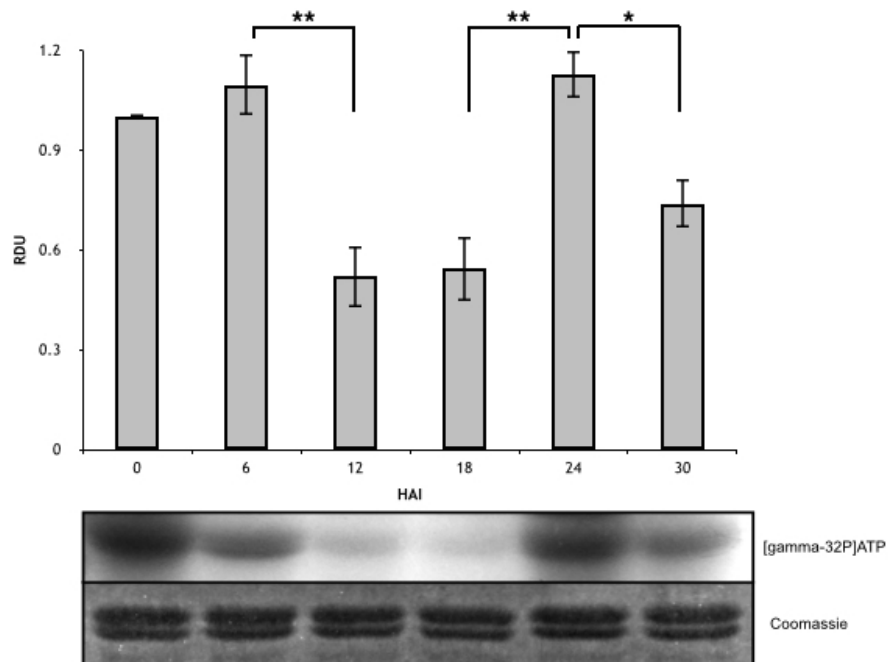


Figura 11. Actividad de cinasa asociada a CycD6;1. Inmunoprecipitados de CycD6;1 a diferentes tiempos de germinación en ensayos de actividad de cinasa con [gama-32]ATP sobre Histona H1. La densitometría está normalizada con el coomassie de Histona H1 y con el valor de 0 h. HAI, horas después de imbibición; RDU, Unidades de densidad relativa  $\pm$  SD. n=3; \*P<0.05, \*\*P<0.01

En la tesis de licenciatura se reportó que CycD6;1 está unida a CdkA en extractos protéicos de ejes embrionarios embebidos, aunque no se determinó si dicho complejo es activo. En la figura 11 se muestra el patrón de la actividad de cinasa asociada a la ciclina en inmunoprecipitados de extractos de ejes embrionarios extraídos de semillas embebidas utilizando los anticuerpos anti-CycD6;1. Como era de esperarse, CycD6;1 forma complejos activos capaces de fosforilar a la histona H1, un sustrato común de los complejos Cyc/Cdk.

El análisis de la actividad durante los diferentes tiempos de germinación no muestra una correlación clara con el patrón de acumulación de proteína, lo que sugiere la existencia de otro nivel de regulación entre la proteína y su actividad asociada. Sin embargo, hay una correlación parcial con el patrón de localización subcelular observado en la figura 10, ya que después de una disminución en la actividad a 12 y 18h, se observa una mayor actividad a 24 horas, lo que corresponde al tiempo en el cual la señal de CycD6;1 se encuentra en el núcleo. A las 30 horas la actividad vuelve a disminuir significativamente, aunque en este caso sí puede relacionarse con los niveles de proteína observados en la figura 9, que a 30 horas son más bajos respecto a los tiempos previos. Por lo tanto, la regulación de la actividad parece estar parcialmente influenciada por la localización subcelular y por la degradación de la proteína.

#### **CycD6;1 interacciona con Rbr y tiene actividad de cinasa asociada sobre el dominio pocket y la región C-terminal**

La carencia del motivo de interacción con Rbr, LXCXE, sugiere que Cycd6;1 no sería capaz de interactuar con Rbr; sin embargo en *Arabidopsis thaliana* ya ha sido reportada esta interacción determinada por complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) en protoplastos (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012). No obstante, en dicho artículo nada se menciona sobre la falta del LXCXE en AtCycD6;1 ni tampoco esclarecen la forma en que podrían interactuar.

Para estudiar la interacción entre CycD6;1 y Rbr1, se generaron dos diferentes construcciones que codifican para proteínas recombinantes con GST en el extremo amino y distintos fragmentos de la proteína Rbr1 de maíz. Cabe señalar que en el genoma de maíz existen 4 genes que codifican para proteínas Rbr, Rbr1 - Rbr4. Sin embargo, se eligió a Rbr1 para este estudio porque es la más cercana filogenéticamente a AtRbr1, y por lo tanto la más probable para conservar los determinantes estructurales que le permitan interactuar con CycD6;1. También, Rbr1 es la más estudiada y posee la estructura predicha típica de las proteínas pocket. Las proteínas recombinantes de los diferentes fragmentos

de Rbr1 se denominan GST:Rbr-Pd y GST:Rbr-Ct; contienen el dominio pocket y la región carboxilo terminal, respectivamente.

La interacción entre Cycd6;1 fue determinada por un ensayo *in vitro* en el que se dejó interaccionar el lisado bacteriano sobreexpresante de la construcción pPal7:CycD6-FL (PeX:CycD6-FL) con los de GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct por separado y luego fueron purificadas las proteínas con el tag de GST en una resina de glutatión sefarosa siguiendo las indicaciones del fabricante. Como control positivo se utilizó a GST:CdkA y como control negativo a GST. Las fracciones de elución se retaron con el anticuerpo anti-CycD6;1 en un western blot para detectar a PeX:CycD6-FL en caso de que la interacción se hubiera dado. El resultado, mostrado en la figura 12, indica que ZmCycd6;1 sí es capaz de interactuar con Rbr1. Esta interacción está dada principalmente en el dominio pocket, aunque también fue posible detectar la banda correspondiente a PeX:CycD6-FL en la fracción de la región carboxilo terminal con una intensidad mucho menor (Figura 12a). La interacción también ocurre con el control de GST:CdkA, pero no con GST.

Debido a que Rbr es inestable y es difícil purificarla íntegramente, aparecen bandas que posiblemente son productos de degradación en las purificaciones de GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct y GST:CdkA. Para evitar confundir la banda correspondiente a PeX:CycD6-FL con las bandas anteriores, se realizó otro western blot donde se cargaron las mismas fracciones, pero se detectó a GST con un anticuerpo comercial (Figura 12b). Se observa que en la purificación de GST:Rbr-Pd hay dos bandas cercanas a la masa molecular de PeX:CycD6-FL pero cuando el western-blot se realiza con el anti-CycD6;1 aparece una tercera banda que sí corresponde a PeX:CycD6-FL. Lo mismo ocurre con la banda que aparece en la purificación de GST:CdkA, ya que con el anticuerpo anti-GST aparece una banda arriba de la esperada para PeX:CycD6-FL, pero con el anti-CycD6;1 aparece una segunda banda que igualmente corresponde a la detectada en la fracción inducida con IPTG mostrada en el segundo carril. Ver Apéndice 2, figura A2.



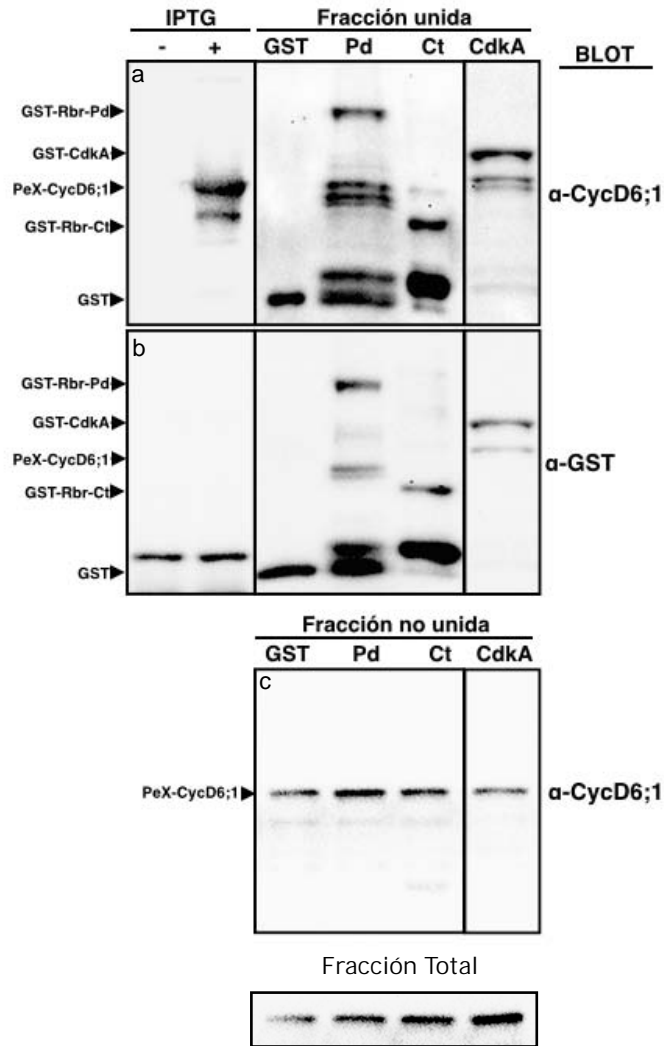


Figura 12. Interacción *in vitro* de CycD6;1 con Rbr1. Lisados bacterianos sobreexpresantes de PeX:CycD6-FL se mezclaron por separado con sobreexpresantes de GST, GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct y GST:CdkA. Las mezclas se purificaron con resina de glutatión sefarosa y la elución se corrió en un SDS-PAGE seguido de western blot con los anticuerpos a) anti-CycD6;1 y b) anti-GST. c) Inmunodetección por western blot de PeX:CycD6-FL en la fracción no unida a la resina de glutatión sefarosa. Los primeros dos carriles de a) y b) son los lisados bacterianos con PeX:CycD6-FL sin inducir e inducida con IPTG.

Los anticuerpos anti-CycD6;1 aún son capaces de reconocer a GST, puesto que el inmunógeno contra el que fueron generados es una proteína de fusión con GST. Sin embargo el reconocimiento de CycD6;1 es específico pues PeX:CycD6-FL no es reconocida con el anti-GST comercial. Por último se realizó un western-blot con el anti-CycD6;1 en las fracciones no unidas a la resina de glutatión sefarosa después de la purificación para demostrar que en todos los casos se cargó la proteína PeX:CycD6-FL (Figura 12c).

Más allá de la interacción, resulta importante saber si los complejos de CycD6;1 son capaces de fosforilar a Rbr. Frecuentemente se utiliza la región C-terminal de Rbr como un sustrato común de Cdks en ensayos de actividad; sin embargo, en el mismo reporte donde se determinó la unión de AtCycD6;1 con AtRbr también mostraron que AtCycD6;1 formaba complejos capaces de fosforilar a AtRbr en el dominio *pocket* pero no en la región C-terminal. Debido a esto, se realizó el ensayo de actividad de cinasa asociada a los inmunoprecipitados de Cycd6;1 a partir de extractos proteicos de ejes de semillas embebidas y usando como sustrato los diferentes fragmentos de ZmRbr1.

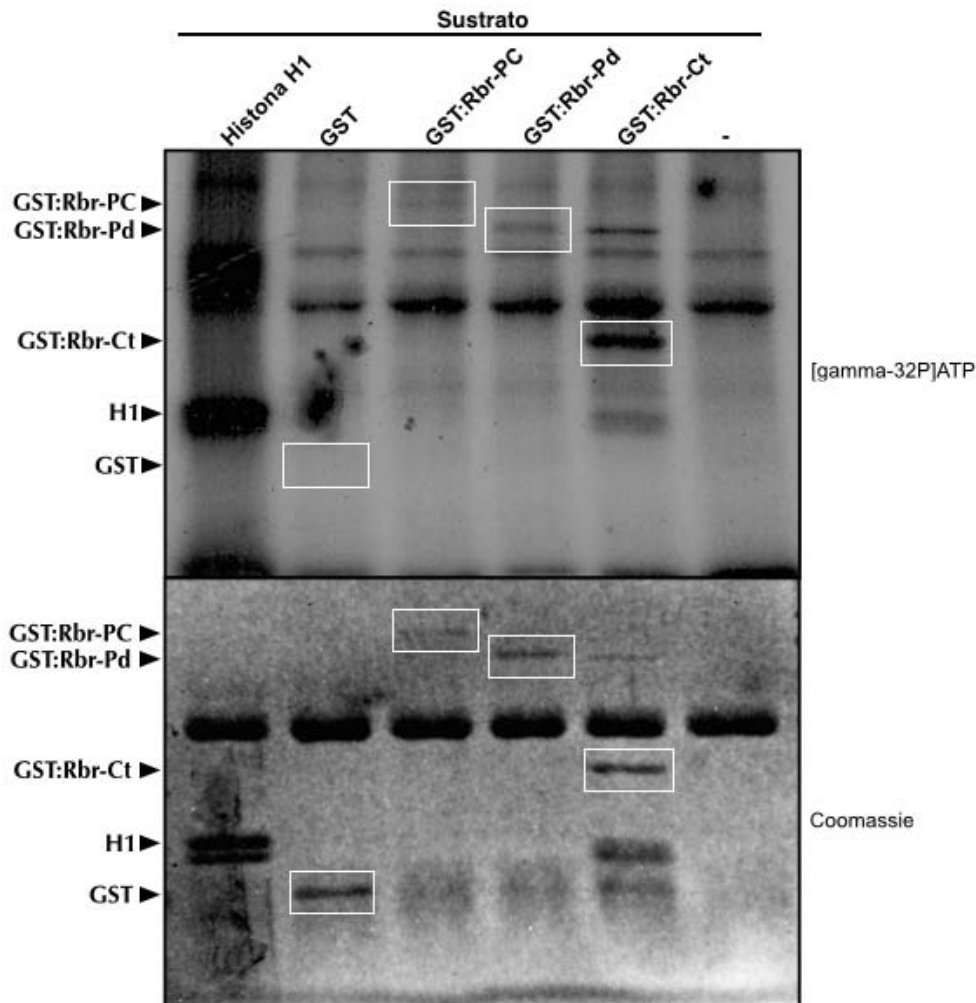


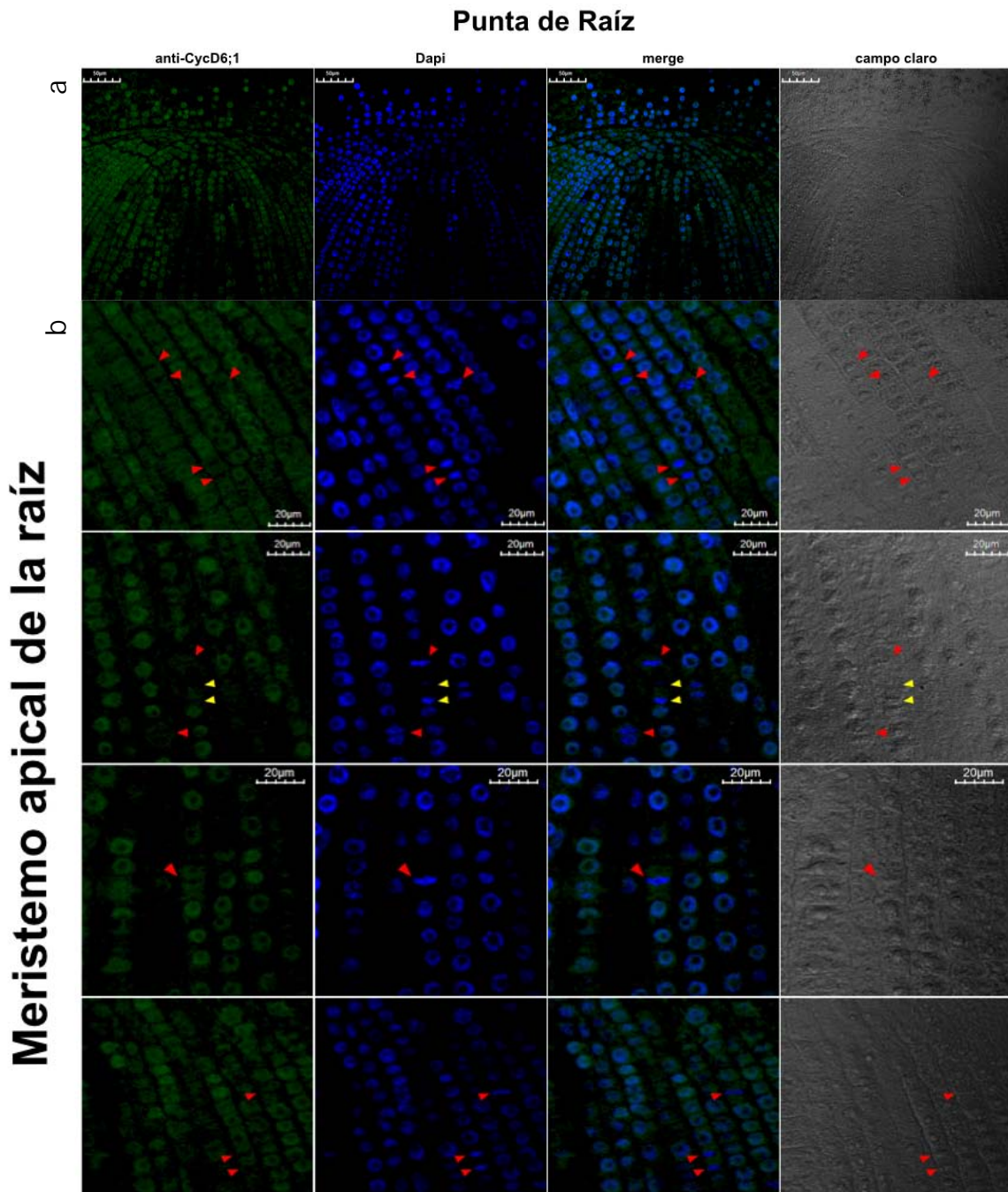
Figura 13. Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre Rbr. Inmunoprecipitados de CycD6;1 de maíz se pusieron en un ensayo de actividad de cinasa con [gamma-32P]ATP sobre diferentes sustratos: Histona H1, GST, GST:Rbr-PC, GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct, y sin sustrato (-). Los recuadros blancos enmarcan la banda que corresponde a las proteínas recombinantes.

En este caso, además de GST:Rbr-Pd y GST:Rbr-Ct, se utilizó un tercer fragmento que incluye a los anteriores; una proteína de fusión con GST y el dominio pocket seguido de la región carboxilo terminal: GST:Rbr-PC. En la figura 13 se observa que hubo actividad de cinasa sobre las 3 proteínas, indicando que a diferencia de AtCycD6;1, los complejos de ZmCycD6;1 sí son capaces de fosforilar a Rbr1 en la región C-terminal, pero también en el dominio pocket.

Cabe mencionar que la purificación de GST:Rbr-PC y GST:Rbr-Pd se dificulta dada su alta inestabilidad y por ello no fue posible cargar la misma cantidad de proteína en todos los carriles como se observa en el gel de coomassie de la figura 13. Además, los fragmentos tienen diferente cantidad de sitios de fosforilación por lo que resulta difícil concluir sobre la afinidad por cada sustrato. Por otro lado, notamos la existencia de una banda de tamaño similar a GST:Rbr-Pd en el carril de GST:Rbr-Ct; sin embargo, dicha banda no es reconocida por el anticuerpo anti-GST (fig. 12b) y por tanto no podría ser GST:Rbr-Pd. En el apéndice 2 (Fig. A2) se apoya esta aseveración.

### **CycD6;1 se localiza en el meristemo de la raíz después de la germinación.**

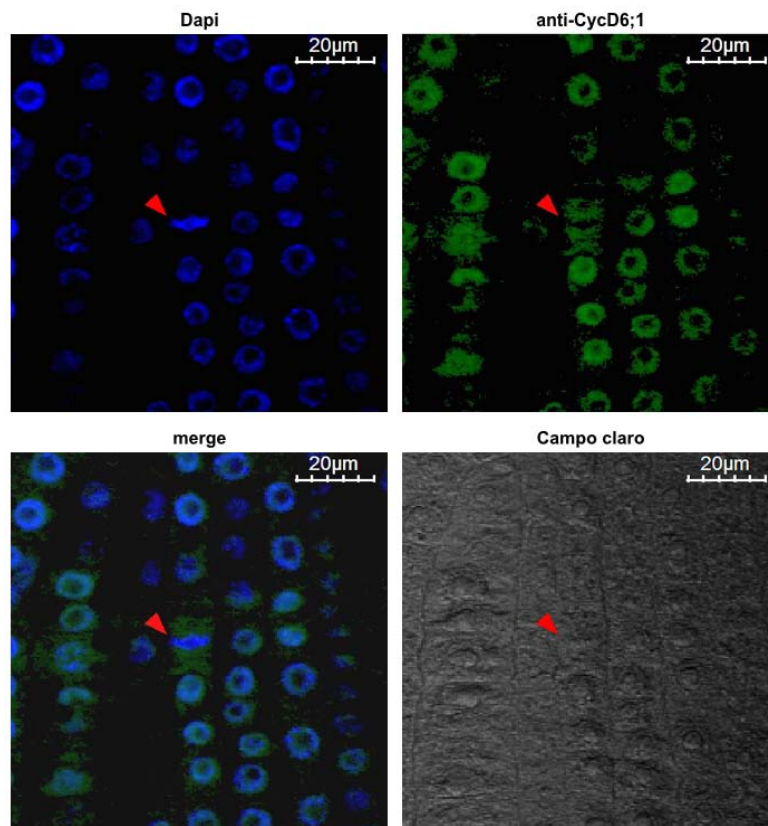
Durante la germinación, CycD6;1 no se localiza en el meristemo de la raíz embrionaria, y su localización subcelular en la coleorriza, es dependiente del tiempo de germinación. En el caso de AtCycD6;1, su expresión en el meristemo de la raíz fue estudiada en tiempos posteriores a la germinación, así que quisimos ver si en maíz era posible identificar a CycD6;1 en tiempos posteriores a la protrusión de la raíz primaria aunque la proteína no estuviera presente en la raíz durante las primeras horas de germinación,.



**Figura 14.** A) Inmunolocalización por fluorescencia de la proteína CycD6;1 en diferentes secciones de punta de raíz a 72 horas postimbibición. Las puntas de flecha roja indican posibles cromosomas mitóticos y las amarillas, posibles telofases. Escala: a) 50 µm. b) 20 µm.

Por ensayos de inmunofluorescencia en puntas de raíz primaria de semillas embebidas por 72 horas se detectó la presencia de CycD6;1 y, a diferencia de lo reportado para AtCycD6;1, ZmCycD6;1 no parece tener una

localización tan específica (figura 14). Por otra parte, un análisis más detallado de la zona meristemática de la raíz reveló que de manera general, CycD6;1 se encuentra en los núcleos cuya morfología es redonda, presumiblemente en interfase, pues incluso es posible identificar zonas más oscuras dentro de dichos núcleos que podrían corresponder al nucleolo (Figura 15). Este comportamiento no es absoluto, pues en muchas células también se detecta señal fluorescente en el citoplasma. Sin embargo, debido a que a las 72 horas el meristemo está activo, es relativamente frecuente encontrar señal de DAPI con morfologías diferentes a la de los núcleos antes mencionados y sin las zonas que presumiblemente son nucleolos; por lo tanto especulamos que estas células se encuentran en alguna fase de la mitosis. En estas células probablemente mitóticas, la señal fluorescente correspondiente a CycD6;1 nunca colocaliza con la señal del DAPI, que corresponde a la cromatina compacta.



**Figura 15.** Inmunolocalización por fluorescencia de la proteína CycD6;1 en punta de raíz 72 horas post imbibición. Esta figura es la ampliación de una de las secciones de la figura 14.

## DISCUSIÓN

Una nueva planta comienza su desarrollo a partir del embrión cuyo crecimiento está detenido en la semilla seca y continúa nuevamente después de un período de quiescencia mediante un proceso llamado germinación. La semilla seca mantiene un metabolismo prácticamente nulo (quiescencia) hasta que la entrada de agua (imbibición) “la despierta” bioquímicamente y los procesos celulares se reactivan (Bewley y Black, 2004).

Para que la germinación derive en el establecimiento de una nueva planta, es necesario que estos procesos sean reactivados y llevados a cabo correctamente, de manera que se favorezca el balance adecuado entre proliferación y diferenciación de acuerdo al programa genético de desarrollo de la especie. La reactivación del ciclo celular es uno de los eventos necesarios para que la germinación sea exitosa, sin embargo aún no están entendidos los mecanismos que la gobiernan. Estudiar el comportamiento de los principales reguladores del ciclo celular es un primer paso para acercarnos más al entendimiento de las bases moleculares de la germinación.

A pesar de que “el único” factor externo que una semilla necesita para germinar es la entrada de agua, muchos procesos se desencadenan al interior de la semilla. La comunicación entre células, órganos y tejidos es esencial para orquestar estos procesos adecuadamente en tiempo y espacio. Al interior de las células también es necesario que las señales externas sean integradas y relacionadas con el estatus interno para así emitir una respuesta coordinada. Aunado a lo anterior, la complejidad aumenta si pensamos que todos los reguladores del ciclo celular de maíz que se han buscado a nivel de proteína se encuentran en el eje embrionario durante la germinación (García *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008; Godínez-Palma *et al.*, 2013;). Esto nos hace pensar que el ciclo celular y su reactivación durante la germinación no es un proceso lineal, sino una compleja red de procesos bioquímicos y fisiológicos que involucra una enorme cantidad de reguladores

actuando en sincronía, funcionando ordenadamente en tiempo y espacio, coordinando desde el nivel molecular hasta el sistémico, el adecuado desarrollo de un organismo. El estudio de las interacciones proteína - proteína , actividades enzimáticas, y localización de proteínas son aspectos de enorme relevancia para lograr un mejor entendimiento del funcionamiento de esta red reguladora.

**La CycD6;1 se regula temporalmente a diferentes niveles durante la germinación.**

Dentro de los reguladores del ciclo celular, las ciclinas responden al estatus interno y su expresión es regulada de manera temporal por las fases del ciclo celular. Las CycD integran también señales extracelulares y median la respuesta celular que se traduce en una decisión hacia proliferar o no. Sin embargo, en un contexto de multicelularidad, la señalización es sumamente compleja y difícil de dilucidar. Además, el número de genes de CYCDs en plantas es notablemente mayor que en animales (Wang *et al.*, 2004; Buendía-Monreal *et al.*, 2011), lo cual complica el estudio en el contexto de desarrollo de un organismo. Una hipótesis simplista nos haría pensar que cada CYCD se expresa en tejidos y etapas distintas del desarrollo cumpliendo funciones similares; sin embargo hemos visto en varios reportes que esto es apenas parcialmente cierto sólo en algunos casos. *Arabidopsis thaliana* posee 10 genes de CYCDs, de los cuales 9 se expresan durante la embriogénesis y en la semilla madura, habiendo sobrelape en tiempo y espacio en repetidas ocasiones (Collins *et al.*, 2012). En maíz, 15 de los 17 genes de CycDs se expresan durante la germinación y algunos con patrones muy similares (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

Un primer paso para abordar el estudio de cómo las CycDs en conjunto participan en la reactivación y mantenimiento del ciclo celular es caracterizarlas una por una de la manera más completa posible y encontrar los puntos de cruce en los procesos que regulan y/o que las regulan a ellas. En un reporte sobre la activación del ciclo celular en el ápice de la raíz y su relación con la germinación en *Arabidopsis thaliana* se observó que la expresión de las CycDs es diferencial a

lo largo del tiempo y se definen en grupos de genes activados tempranamente y tardíamente (Masubelele *et al.*, 2005). AtCycD6;1 junto con CycD3;1 y CycD4;2 forma parte de los genes tardíos. Lo anterior correlaciona con el patrón de expresión reportado para CycD6;1 de maíz (Buendía-Monreal *et al.*, 2011); sin embargo, estos patrones de expresión en ambas especies no concuerdan con lo reportado en el presente trabajo pues aunque el mRNA no es detectable en las primeras horas de germinación, la proteína está presente desde la semilla seca y durante toda la germinación (figura 8). De hecho, los niveles máximos de mRNA se alcanzan al mismo tiempo que los de proteína comienzan a disminuir cuando se usan las mismas condiciones de imbibición (Zamora Zaragoza, 2012) y por lo tanto sería más acertado asumir que su función no es tardía, contrario a lo discutido en los artículos donde han visto únicamente su actividad transcripcional.

Por otro lado, el hecho de que los niveles de proteína disminuyan drásticamente justo después de que los de mRNA están aumentando (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), sugiere que CycD6;1 está siendo degradada después de su posible función en la germinación, pero tiene que ser sintetizada *de novo* posteriormente y por tanto, es probable que se requiera en una etapa de desarrollo ulterior.

En el presente trabajo se caracterizó parcialmente el comportamiento de la CycD6;1 en ejes embrionarios durante la germinación de semillas maíz. A diferencia del estudio realizado durante la tesis de licenciatura, el patrón de acumulación de proteína corresponde a condiciones más cercanas a las fisiológicas, pues en el caso anterior se determinó a partir de ejes embrionarios extraídos con escalpelo de la semilla seca y luego embebidos en una solución suplementada con sales y sacarosa. En estudios previos se ha descrito que esta metodología es adecuada para el estudio del ciclo celular, puesto que procesos como la síntesis de DNA no se afectan más que en el tiempo, pues se adelantan probablemente porque la entrada de agua al eje es más rápida en los ejes extraídos que en la semilla completa (Baíza *et al.*, 1989; Sánchez *et al.*, 2005). Sin embargo, entre el eje y el escutelo ocurren eventos de señalización que controlan



los procesos que tienen lugar durante la germinación, y es sabido que las CycDs son ampliamente reguladas por vías y redes de señalización hormonales que se cruzan entre ellas y también con señalización mediada por azúcares (Gutiérrez *et al.*, 2005; Hirano *et al.*, 2011a; Wang y Ruan, 2013). Por lo anterior, haber determinado nuevamente el patrón de acumulación de CycD6;1 en semillas completas embebidas tiene relevancia para estudios posteriores sobre su regulación por hormonas y azúcares. Además, debido a que el proceso de entrada de agua es más lento, se amplió el tiempo de estudio hasta 36 horas.

La comparación con lo descrito en la tesis de licenciatura revela que los patrones de acumulación son distintos, apoyando la idea de que al menos esta CycD podría estar siendo regulada por señales provenientes del escutelo. A diferencia de lo reportado para la síntesis de DNA, donde había una diferencia de dos horas entre los ejes embebidos *ex situ* y los extraídos de semillas embebidas, CycD6;1 alcanza niveles de proteína mayores en la semilla que en los ejes embebidos *ex situ*. En ambos casos la cantidad de proteína disminuye hacia los últimos tiempos, pero en los ejes embebidos *ex situ* se alcanza la mínima cantidad a 24 horas, mientras que niveles similares de proteína en los ejes de semillas germinadas se alcanzan hasta las 36 horas, es decir, tienen los mismos niveles de proteína con 12 horas de diferencia, sugiriendo que en los ejes embebidos *ex situ* se afecta notablemente la estabilidad de la proteína.

En la figura 9 se observa que los niveles de proteína aumentan dentro de las primeras 6 horas y luego se mantienen constantes durante al menos 18 horas más, de modo que a 24 horas aún permanecen elevados y posteriormente disminuyen. Esta tendencia continúa con disminuciones significativas a 36 horas en semillas donde aún no ocurre ruptura de coleorriza y luego a 36 horas en semillas germinadas, lo cual indica que en semillas cuyo tiempo fisiológico es más avanzado, la CycD6;1 sigue la tendencia de desaparecer. En comparación con las condiciones de germinación *ex situ*, existe una tendencia a aumentar en las primeras 6 horas, pero este aumento nunca llega a ser significativo y después de las 12 horas comienza la caída en los niveles de proteína.

En ambos casos, hacia el final de la ventana de tiempo considerada, la proteína disminuye hasta el punto de ser apenas detectable bajo las condiciones utilizadas, indicando que el equilibrio entre síntesis y degradación de la proteína está desplazado hacia la degradación, mientras que sólo en condiciones fisiológicas es posible observar que a tiempos tempranos, este equilibrio está desplazado hacia la síntesis, sugiriendo que las señales que promueven esta síntesis provienen del tejido externo al eje embrionario, mientras que las de degradación se encuentran presentes dentro del eje. Cualquiera que sea el caso, tanto en ejes extraídos y embebidos como en semilla completa, a nivel de mRNA o de proteína, los niveles de CycD6;1 durante la germinación no son constantes. Aunado a esto, la diferencia contrastante en los patrones de mRNA y proteína sugieren que CycD6;1 está siendo regulada a diferentes niveles durante la germinación.

Una de las señales que podría afectar la estabilidad y síntesis de la proteína CycD6;1 es la sacarosa, pues aunque en las semillas germinadas *ex situ* hay suplemento de sacarosa al 2%, esta concentración no es la fisiológica y, por otro lado, esa sacarosa es consumida por el eje y no se reemplaza durante toda la imbibición. Los azúcares, además de servir como fuente de carbono, también son moléculas señalizadoras que pueden modificar la expresión de genes relacionados con el ciclo celular e interactuar con vías de señalización por hormonas (Gutiérrez *et al.*, 2005; Wang y Ruan, 2013).

Por otra parte, existen antecedentes que demuestran que la sacarosa estabiliza proteínas de ciclo celular que son degradados por proteasoma (Hirano *et al.*, 2011a y 2011b) y que la falta de sacarosa, además de producir degradación de reguladores de la fase G1, produce arresto celular mediado por Rbr (Hirano *et al.*, 2008). En contraparte, la sacarosa también puede modificar la transcripción de genes de CYCDs (Gutiérrez *et al.*, 2005). Actualmente en el laboratorio se están llevando a cabo estudios sobre la influencia de azúcares sobre distintos reguladores del ciclo celular a lo largo de la germinación (Lara-Núñez; Datos sin publicar), un estudio a profundidad en este sentido es necesario para correlacionar

esta regulación con los niveles de azúcares a que es sometido el eje durante la movilización de reservas que ocurre en la fase III de la germinación (figura 3), lo cual puede relacionarse a su vez con procesos de desarrollo posteriores a la protrusión radicular pero aún ligados al proceso germinativo, donde aparentemente la CycD6;1 también está presente, dado que su mRNA se acumula hacia tiempos tardíos de la germinación (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, en el presente trabajo se obtuvieron resultados que sugieren al menos dos niveles más de regulación: localización y actividad. Ambos serán discutidos a detalle más abajo, pero cabe aquí resaltar que la localización tejida específica y subcelular implican una regulación espacio-temporal ligada al proceso germinativo.

Un aspecto novedoso de este trabajo es que se identificó a la CycD6;1 en escutelo, un tejido del embrión de gran relevancia en la germinación, pero que no ha sido reportado como proliferativo, sino diferenciado y que en etapas tardías entra a muerte celular programada para alimentar al eje. La acumulación de CycD6;1 es diferencial a lo largo del tiempo con una clara disminución hacia las 36 horas. Sin embargo, es difícil especular sobre el patrón de acumulación en tiempos previos, ya que la normalización con CycA puede afectar el comportamiento de los datos densitométricos, pues CycA en escutelo no se comportó constante como lo hace en el eje.

**La localización tisular de CycD6;1 sugiere que está involucrada en procesos externos al ciclo celular relacionados con el control de la germinación.**

Además de la regulación temporal de CycD6;1 a nivel de mRNA y proteína, los ensayos de inmunolocalización por fluorescencia revelaron que la proteína endógena no se ubica en todo el eje embrionario y, sorprendentemente, no fue posible localizarla en el meristemo radicular, lo cual contradice la hipótesis planteada *a priori* en este proyecto, dada la expresión del ortólogo de *Arabidopsis*

*thaliana* (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012) y que en maíz la raíz embrionaria está preformada en la semilla seca (Hochholdinger, 2009).

Interesantemente, CycD6;1 se localiza en un tejido presumiblemente no proliferativo que cubre a la raíz embrionaria: la coleorriza. Este tejido además de servir para protección, controla la germinación en otras especies. Anatómicamente, la coleorriza es un tejido que se continúa con el escutelo por un lado y por el otro con el coleoptilo, que recubre y protege a las hojas de plúmula y al hipocotilo (Scanlon y Takacs, 2009). Hay poca información respecto a la función de este tejido, pero se ha visto que juega un papel importante en el establecimiento de la dormancia (Barrero *et al.*, 2009).

La dormancia es una capacidad que tienen algunas semillas para reprimir la germinación incluso en condiciones favorables (Hilhorst, 2007). Esta represión de la germinación no es por falta de vigor ni porque la semilla esté muerta. Las semillas dormantes son semillas vivas con la capacidad de germinar normalmente, pero está siendo reprimida mediante procesos activos que requieren la síntesis y transporte de hormonas, lo cual a su vez involucra regulación de procesos metabólicos y cambios transcripcionales en algunos tejidos (Lee *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Para que una semilla dormante germine, es necesario “romper” la dormancia, lo cual también es un proceso activo que está determinado por condiciones ambientales (Steber, 2007).

Dado que la germinación es un proceso en el que el embrión se elonga y sale de la cubierta de la semilla, la dormancia es una condición impuesta por la cubierta hacia el embrión que le impide reiniciar su crecimiento. En variedades dormantes de *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que la dormancia está impuesta por el endospermo, que es una capa prácticamente unicelular que rodea al embrión y lo separa de la testa, un tejido duro formado por células muertas que sirve de protección (Lee *et al.*, 2010). El endospermo por su parte, es un tejido vivo en el cual hay síntesis *de novo* y liberación selectiva hacia el embrión de ácido abscísico (ABA) durante la imbibición de semillas dormantes. Cuando la

síntesis de novo de ABA es bloqueada o cuando se retira mecánicamente la cubierta del embrión, la germinación ocurre de manera normal; por el contrario, si a embriones de semillas no dormantes se les pone en contacto con cubiertas de semillas dormantes, o con ABA exógeno, la germinación no ocurre (Lee *et al.*, 2010).

Notablemente, la expresión de CYCD6;1 en semillas maduras de *Arabidopsis* está dada sólo en el endospermo (Collins *et al.*, 2012). Este tejido es análogo en la función de imponer dormancia a la coleorriza en los cereales. Al igual que en *Arabidopsis*, utilizando variedades dormantes y no dormantes de trigo, se ha visto que la coleorriza participa activamente en la imposición de dormancia sobre el eje embrionario de este cereal, aunque los mecanismos moleculares y de señalización son menos claros (Barrero *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2011). Un aspecto en común de ambos sistemas y, por lo tanto, entre el endospermo de *Arabidopsis* y la coleorriza de los cereales, es que sintetizan ABA para imponer la dormancia y que los niveles de ácido giberélico (GA) son prácticamente nulos mientras dura la condición de dormancia, pero al romperse, los niveles de ABA disminuyen y los de GA aumentan. Este equilibrio es percibido por el eje embrionario (o el embrión, según sea el caso) para llevar a cabo o no el proceso germinativo (White *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2010).

Con los resultados de este trabajo, un nuevo aspecto en común surge entre estos dos tejidos análogos de cereales y dicotiledóneas: la localización de la proteína CycD6;1 de maíz en la coleorriza de la semilla seca y durante la germinación correlaciona con la localización de la expresión de AtCYCD6;1 en el endospermo de la semilla madura (Collins *et al.*, 2012). Esta localización común para genes ortólogos en dos tejidos que cumplen la misma función durante la germinación abre una nueva vertiente para el estudio de la CycD6;1 y su relación con la dormancia, pero al mismo tiempo sugiere que el mecanismo molecular de la dormancia implica la participación de reguladores del ciclo celular en tejidos no proliferativos, algo que hasta la fecha no ha sido propuesto en las teorías ni estudios sobre esta condición.

Para apoyar esta especulación, existen reportes que muestran que CycD6;1 se regula por las dos principales hormonas que regulan la dormancia, ABA y GA. En maíz, se vio que la expresión del gen de CYCD6;1 se ve afectada negativamente durante la germinación en presencia de ABA (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), mientras que en *Arabidopsis* se ha descrito que la presencia de un inhibidor de la síntesis de GA aumenta la expresión de AtCYCD6;1 en la zona meristemática de la raíz (Koizumi y Gallagher, 2013), pero nada se ha dicho de cómo esta hormona podría controlar la expresión de CYCD6;1 en la semilla. Por otra parte, AtCycD6;1 es capaz de unirse y fosforilar a Rbr para liberar la represión sobre SCR, que posee un motivo LXCXE. SCR forma parte de la familia de reguladores transcripcionales GRAS a la cual también pertenecen las proteínas DELLA, involucrados en represión transcripcional y de crecimiento por ausencia de GA. Las proteínas DELLA, al igual que SCR, contienen el motivo LXCXE o variantes de él y por tanto podrían unirse a Rbr (Zamora Zaragoza, datos sin publicar). El mecanismo de imposición de dormancia por el endospermo de *Arabidopsis* requiere de la participación de RGL2, una proteína DELLA que se expresa en este tejido durante la germinación y que impone represión transcripcional (y en última instancia, la represión de la germinación) en presencia de ABA (Lee *et al.*, 2010). Cuando los niveles de ABA disminuyen y aumentan los de GA, o bien, cuando hay presencia exógena de GA, la función de RGL2 es interferida y la germinación ocurre. Sin embargo, no se sabe cómo es que RGL2 ni otros DELLA median la represión transcripcional. Una hipótesis es que se unen a Rbr mediante el motivo LXCXE, y por tanto, Cycd6;1 sería la única CycD capaz de fosforilar a Rbr para promover la germinación, de manera similar a como lo hace cuando se une a SCR, sin embargo este mecanismo no se ha probado experimentalmente.

### **La cantidad de CycD6;1 activa está regulada espacio-temporalmente.**

Además de la localización tisular de CycD6;1, la mayoría de las células donde se encontró la señal de CycD6;1 sigue siempre el mismo patrón de localización subcelular. En semilla seca, CycD6;1 se encuentra en el citoplasma

con un patrón granulado y rara vez es posible detectarla colocalizando con la señal del DAPI, es decir, en el núcleo. A las 6 horas la señal pierde el patrón granulado, se vuelve más difusa y sigue siendo mayoritariamente citoplasmática. Sin embargo, conforme avanza la germinación, CycD6;1 comienza a internarse en el núcleo, de manera que la señal está en ambas fracciones a las 12 y 18 horas, pero a las 18 ya es posible ver células con toda la señal en el núcleo y otras donde la señal citoplasmática es débil comparada con la nuclear. A las 24 horas, la señal fluorescente rara vez es citoplasmática.

Los mecanismos en los que participan las CycD y demás reguladores del ciclo celular implican que su actividad está típicamente dada dentro del núcleo, aunque recientemente se reportó una importante función de complejos Cyc/Cdk en citoplasma en levadura, específicamente en la regulación de la maquinaria que transporta proteínas de citoplasma a mitocondria (Harbauer *et al.*, 2014). Los resultados de la actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre histona H1 muestran que se encuentra formando complejos activos desde la semilla seca y durante toda la germinación; sin embargo, es difícil imaginar que CycD6;1 esté funcionando realmente en las primeras horas si no está dentro del núcleo, aunque aún no podemos descartar esta posibilidad.

Notablemente, el patrón de acumulación de proteína correlaciona con el de actividad sólo a las 24 y 30 horas, donde en ambos (actividad y proteína) hay una caída después de estar en su máximo nivel. Sin embargo, durante las primeras 18 horas los patrones de acumulación de proteína y actividad difieren contrastantemente. Si la actividad medida corresponde a la total y no dependiera del sustrato utilizado, una posible explicación es que la proteína que hay en la semilla seca está formando complejos activos, después, a las 6 horas, la proteína tiene una mayor acumulación pero no mayor actividad, lo cual sugiere que hay más síntesis de proteína y poca degradación, de manera que la proteína activa remanente de la semilla seca sigue presente con su actividad, y la proteína recién sintetizada aún no tiene actividad, pues necesita unirse a una Cdk y luego ser activada por fosforilación. Después de las 6 horas, y durante 12 horas más, la

actividad decrece significativamente pero la proteína permanece con niveles altos. Bajo el mismo contexto, esto indicaría que la proteína sigue sintetizándose pero aún no es activa, y la remanente de semilla seca continúa degradándose, y con ello, disminuyendo la actividad. A las 24 horas los niveles de proteína siguen constantes, es decir, la síntesis y degradación mantiene un equilibrio, pero la actividad de cinasa aumenta considerablemente, sugiriendo que la proteína nueva ya es activa. A las 30 horas, el equilibrio síntesis/degradación se desplaza hacia la degradación de la ahora activa CycD6;1, lo cual se refleja en la caída en la actividad. Antes de corroborar esto es necesario verificar que el patrón de actividad sea similar al menos frente a un sustrato diferente a Histona H1, por ejemplo Rbr.

Al modelo anterior puede integrarse la localización subcelular, ya que justo cuando la proteína nueva es activa, la gran mayoría de la señal es nuclear. Por otra parte, es notable que el patrón de actividad por sí solo imita un comportamiento cíclico, ya que a lo largo del tiempo disminuye y aumenta regularmente. Sin embargo, desde un enfoque holístico este comportamiento resulta difícil de explicar bajo el modelo del ciclo celular en el cual las ciclinas, a nivel de proteína, también fluctúan periódicamente, pues no podemos olvidar que el tejido en el que se encuentra más consistentemente no es proliferativo y que estos procesos están en el contexto del desarrollo de un organismo donde las células no son sincrónicas y sería difícil observar tan claramente la conducta del ciclo celular (figura 16).

Una explicación alterna pero que también cabe en el modelo anterior para explicar el comportamiento de la actividad de cinasa asociada surge de la observación de que el tiempo que tarda la CycD6;1 en internalizarse casi por completo en el núcleo es al menos 24 horas, y por lo tanto cabe esperar que sea un proceso regulado y no únicamente mecánico impulsado por la entrada del agua. Además, si tomamos en cuenta que la germinación es un proceso mediante el cual la semilla continúa sus procesos de desarrollo y crecimiento después de un período de latencia, estos resultados indican que la exclusión de la Cycd6;1 fuera



del núcleo es otro proceso regulado y que no se internaliza inmediatamente después de su síntesis (figura 16).

Por otra parte, ni las CycDs ni las Cdks tienen señales de localización nuclear definidas y se sugiere la participación de proteínas transportadoras que las lleven del lugar de síntesis (citoplasma) al lugar de acción (núcleo), lo cual puede también estar regulado. Una de las proteínas que pudieran cumplir esta función en plantas son las KRPs, inhibidores de la actividad de cinasa y que algunas de ellas poseen señales de localización nuclear (Bird *et al.*, 2007) y de hecho transportan Cdks al núcleo (Zhou *et al.*, 2006). Datos del laboratorio sugieren que Cycd6;1 también es capaz de unirse a KRP, y esta inhibir la actividad de CycD6;1 (Rosas-Bringas y Godínez-Palma, datos sin publicar).

Con base en lo anterior, podemos imaginar un mecanismo en el que Cycd6;1 se encuentre formando complejos activos en el citoplasma con CdkA (Zamora Zaragoza, 2012; este trabajo) que son transportados probablemente por una KRP hacia el núcleo. La unión con KRP podría inhibir su actividad, aunque no necesariamente abatirla, pues se ha visto que dependiendo de la concentración, hay diferentes grados de inhibición. De esta manera, la proteína recién sintetizada desde las 6 horas y hasta las 18 horas, podría o seguir formando complejos con Cdk en el citoplasma, pero la unión con KRP en cualquier caso siempre inhibiría la actividad. Una vez dentro del núcleo, el transportador/inhibidor no tendría que permanecer unido y al despegarse del complejo aumentaría la actividad, lo cual explicaría que a 24 horas, cuando toda la proteína está en el núcleo, la actividad sea mayor. En el núcleo es donde cabría esperar que se encontrara el sustrato de CycD6;1, que probablemente sea Rbr. A las 30 horas, justo al final de la germinación, la disminución en la actividad de cinasa correlaciona con una disminución en los niveles de la proteína como se mencionó antes.

Cualquiera que sea el caso, faltan experimentos para poder pasar de la especulación explicativa a la demostración del modelo. Sin embargo, no podemos dejar de resaltar que aunque el modelo esté incompleto, existe una sorprendente

coincidencia de tiempo (24 h) y espacio (núcleo) con la máxima cantidad de proteína activa.

### **CycD6;1 se une y fosforila a Rbr en diferentes dominios**

Una de las primeras preguntas que surgió del estudio de la secuencia de las CycD fue si la CycD6;1 tenía la capacidad de interactuar con Rbr a pesar de carecer del motivo de unión a ella. En *Arabidopsis* ya fue reportado que AtCycD6;1 sí se une y fosforila a Rbr específicamente en el dominio pocket y no en el carboxilo. Sin embargo, un análisis de las metodologías con las que se llegaron a estas conclusiones revela que no necesariamente son absolutamente concluyentes, además de que es el único reporte a la fecha que ha dicho esto y no mencionan la carencia del motivo LXCXE.

Nuestros resultados demuestran que CycD6;1 de maíz también puede unirse a ZmRbr1 habiendo interacción tanto con el dominio pocket como con la región carboxilo terminal. El estudio realizado *in vitro* sugiere que la interacción es más fuerte con el dominio pocket. Así mismo, CycD6;1 fue capaz de fosforilar a Rbr1 tanto en el dominio pocket como en la región carboxilo. Sin embargo, otros experimentos son necesarios para determinar si la unión y fosforilación de complejos activos de CycD6;1 sobre Rbr ocurre *in vivo*, además de que también falta determinar cuál de las 4 Rbr presentes de maíz estaría interactuando con CycD6;1. Por otra parte, el estudio de la bioquímica de esta interacción necesita completarse usando diferentes fragmentos de CycD6;1 para saber más sobre la naturaleza de esta interacción.

La relevancia fisiológica de que una misma CycD pueda unirse a Rbr en al menos dos diferentes sitios está lejos de ser comprendida, pero al mismo tiempo vimos que puede fosforilar a Rbr en diferentes sitios y esto sugiere que cuando Rbr esté unido a diferentes proteínas, ya sea por el motivo LXCXE o no, CycD6;1 tiene capacidad de actuar sobre Rbr, por lo cual podría participar en diferentes procesos celulares. Esto ya queda sugerido para CycD6;1 con el hecho de que la encontramos presente en tres diferentes tejidos, escutelo, coleorriza y ápice de la

raíz, en dos diferentes etapas del desarrollo, durante la germinación y después de la protrusión radicular, respectivamente. Además, la naturaleza de ambos tejidos es diferente, ya que el escutelo y la coleoriza no son tejidos proliferativos y el meristemo radicular sí lo es, por lo cual cabe esperar que si CycD6;1 está en ambos, puede cumplir roles dentro y fuera del ciclo celular.

**CycD6;1 es regulada espacialmente durante el ciclo celular en el meristemo de la raíz después de la germinación.**

El hecho de que la expresión de CYCD6;1 en semilla madura de *Arabidopsis* y la localización de la proteína en maíz correlacionen sugiere que estos genes ortólogos pudieran ser regulados de manera similar. Sin embargo, ZmCycD6;1 no fue localizada en el meristemo de la raíz durante la germinación. Por lo anterior, decidimos explorar en tiempos posteriores a la germinación, pues un dato relevante es que la expresión de CycD6;1 en la raíz de *Arabidopsis* fue reportada únicamente en plántulas de entre 5 y 15 días después de la germinación (Sozzani *et al.*, 2010), y en semillas maduras no se encuentra en el embrión (Collins *et al.*, 2012).

Interesantemente, aunque la raíz de maíz ya esté formada antes de la germinación, sólo fue posible encontrar a CycD6;1 en meristemo de raíz después de la protrusión radicular y no antes, sugiriendo que hay señales que la mantienen reprimida durante la germinación y que tras la protrusión, otros procesos de desarrollo se desencadenan en el meristemo radicular diferentes a los que impulsan el crecimiento durante la germinación. Estos datos de alguna manera correlacionan con lo reportado para AtCYCD6;1; sin embargo, la anatomía de los meristemos de maíz y *Arabidopsis* es notoriamente diferente (revisado en Hochholdinger *et al.*, 2004) y por lo tanto la correlación es únicamente parcial. En *Arabidopsis*, la expresión de CYCD6;1 es específica de las CEI/CEID (Sozzani *et al.*, 2010; Cruz-Ramírez *et al.*, 2012), mientras que en maíz la señal no se encuentra confinada a células específicas del meristemo, aunque aún queda por

ver si un estudio cinético del desarrollo de la raíz nos permite identificar cambios en su localización tisular.

Por otra parte, la localización subcelular de ZmCycD6;1 en el meristemo de la raíz no tiene un patrón tan definido como en la germinación, pues es posible ver células donde la localización es exclusivamente nuclear mientras que en otras está tanto en núcleo como en citoplasma, aunque nunca encontramos células en las que la localización fuera exclusivamente citoplasmática. Aquí queda también por hacer un estudio cinético para verificar este supuesto.

Al tratarse de un tejido proliferativo, a diferencia de la coleorriza y el escutelo, en el ápice de la raíz primaria fue posible identificar con cierta frecuencia algunas células en las que la señal del DAPI no tuviera la morfología normal de las células en interfase, sino que se asemejara más a figuras mitóticas. En estas células, la localización de CycD6;1 sí tiene un patrón característico, y es que nunca colocaliza con la señal del DAPI, lo cual sugiere que en mitosis, Cycd6;1 está siendo excluida de la cromatina. Interesantemente, en *Arabidopsis thaliana*, CYCD6;1, junto con otras ciclinas y reguladores del ciclo celular, aumentan su expresión en tiempos caracterizados por la aparición de genes exclusivos de la mitosis pero bajo el contexto fisiológico en el que estos reguladores del ciclo celular promueven división celular en el ápice de la raíz y, consecuentemente, germinación (Masubelele *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

A partir de nuestros resultados, podemos puntualizar que la CycD6;1 está siendo ampliamente regulada en tiempo y espacio a diferentes niveles a lo largo de la germinación (figura 16). Y aunque aún no queda clara su función en la germinación, su localización en la coleorriza y presencia en escutelo indica que en la germinación no necesariamente participa sólo en procesos relacionados al ciclo celular, sino probablemente en otros relacionados al control de la germinación. Esto se refuerza con la comparación en los niveles de proteína entre la germinación *ex situ* y en semilla, abriéndose una nueva vertiente para el estudio de la regulación por señales (hormonales, por azúcares) desde un tejido (escutelo) hacia otro (eje embrionario).

La regulación espacio-temporal de CycD6;1 parece ser dependiente del proceso de desarrollo, y está dada a nivel de tejido como a nivel subcelular. Así mismo, el equilibrio de los procesos de síntesis y degradación de CycD6;1 es dinámico y se desplaza diferencialmente en función del tiempo de germinación, además de que en el eje embrionario está claramente afectado por las señales que provienen del escutelo.

Aunque no descartamos alguna función de CycD6;1 en el citoplasma, el hecho de que a 24h coincidan la mayor cantidad de proteína con la mayor actividad de cinasa asociada a CycD6;1 y con con el momento donde casi toda la proteína está en el núcleo y por otro lado, que CycD6;1, a pesar de carecer del motivo LXCXE, sea capaz de interactuar y fosforilar a una Rbr indican fuertemente que la función primordial de CycD6;1 durante la germinación es dentro del núcleo, en un momento fisiológico determinado después del cual, tiene que ser degradada.

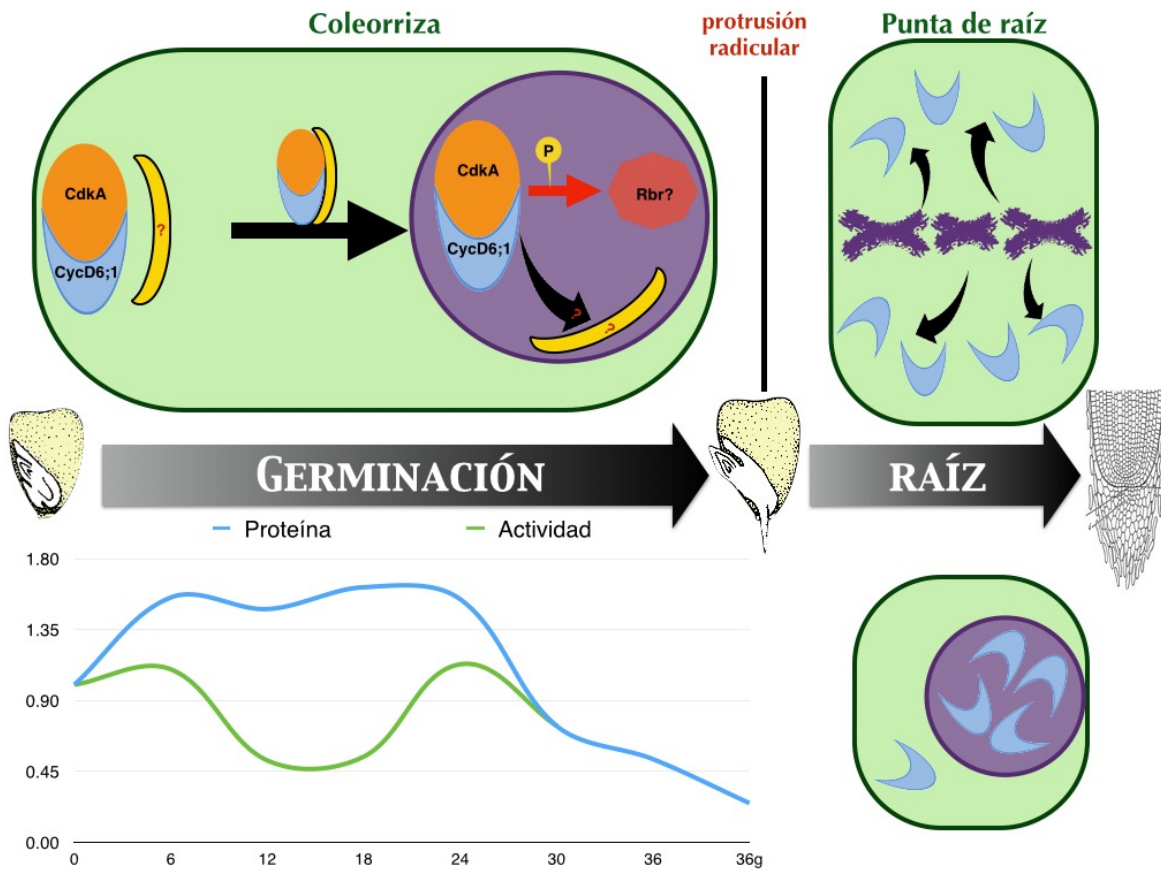


Figura 16. Modelo de la regulación espacio temporal de CycD6;1 durante la germinación de maíz. CycD6;1 se encuentra en el citoplasma de las células de la coleoriza formando complejos activos en la semilla seca es transportada al núcleo a lo largo de la germinación donde podría encontrar a su sustrato natural, Rbr. Un transportador hipotético es KRP, que podría inhibir la actividad de estos complejos durante el transporte a núcleo.

## PERSPECTIVAS

- En este trabajo, muchas vertientes se abrieron para continuar esclareciendo la función y regulación de CycD6;1 durante y después de la germinación. En la discusión se plantean dos modelos alternativos pero no excluyentes para explicar las diferencias entre la actividad de cinasa y la cantidad de proteína. En esta fase del estudio, estos modelos son meramente especulativos. Para poder fundamentar el modelo en el que la proteína remanente es activa y la recién sintetizada en tiempos tempranos de germinación no lo es, podríamos inhibir la degradación de proteína, de manera que la remanente seguiría activa. Si este proceso se continúa hasta las 24 horas donde según la especulación, la proteína nueva ya es activa, el patrón de actividad no disminuiría, sino que sólo aumentaría. Asimismo, si se inhibe la síntesis de proteína, la actividad sólo tendería a disminuir al igual que la proteína.

- Probablemente, demostrar el modelo en el que la inhibición en tiempos intermedios está mediada por una KRP sería más difícil de probar, pues aunque ya hay datos de que CycD6;1 puede unirse a más de una KRP y que esto afecta su actividad (Rosas Bringas, Datos sin publicar), habría que probar que la unión ocurre *in vivo* y se modifica a lo largo del tiempo de germinación de acuerdo a lo esperado. Esto podría hacerse mediante ensayos de inmunoprecipitación y colocalización por inmunofluorescencia. Sin embargo, estos experimentos sólo darían más indicios para apoyar el modelo, pero para probarlo habría que hacer un ensayo en el que se impidiera la unión *in vivo* lo cual es complicado dada la dificultad para manipular genéticamente el organismo modelo.

- La bioquímica de la interacción entre Rbr y CycD6;1 dio información valiosa pero aún poco fina. En ese respecto valdría la pena ahora generar fragmentos de CycD6;1 para saber si al igual que las demás CycDs, CycD6;1 también se une por el extremo amino a Rbr. Asimismo, ir acotando las regiones de unión y probablemente llegar a determinar un posible motivo de unión en

CycD6;1 con Rbr y una región de Rbr para unir ciclinas, ya que se sabe que otras ciclinas (A y E) pueden fosforilarla *in vivo*, pero no se conocen las determinantes estructurales de esta interacción. Aquí también cabría realizar ensayos de coimmunolocalización para determinar si CycD6;1 une a Rbr *in vivo*.

- Resulta también interesante determinar si el patrón de actividad de cinasa observado sobre Histona H1 es o no repetible sobre Rbr.

- Ensayos de inmunoprecipitación acoplados a análisis por espectrometría de masas podrían ser útiles para saber cuál de las 4 Rbr de maíz interacciona con CycD6;1 y de igual manera, conocer a detalle otras interacciones de CycD6;1, por ejemplo, específicamente con qué Cdk actúa y si es sólo una o se une a más de una en diferentes momentos del desarrollo.

- Aunque la anatomía de la raíz de *Arabidopsis* y maíz son muy diferentes, aún no se excluye que CycD6;1 de maíz cumpla la misma función que el ortólogo de *Arabidopsis*. Para ello valdría la pena insertar el gen de ZmCYCD6;1 en el fondo mutante de *cycd6;1* de *Arabidopsis*.

- La evidente regulación que tiene CycD6;1 a diferentes niveles es otra interesante vertiente de este proyecto. En ése sentido es importante determinar cómo es la regulación hormonal y por azúcares sobre el gen, la proteína y la actividad, con la expectativa de explicar con bases moleculares las diferencias entre la acumulación de mRNA, Proteína y complejos activos.



## **METODOLOGÍA**

*\*Nota preliminar: Para información sobre las construcciones utilizadas en el presente trabajo, así como primers, vectores, clonaciones, sobreexpresión y purificación de proteínas, ver apéndices.*

### **I. Material**

#### **I.I Semillas de maíz**

Para los ensayos de germinación se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* var. Chalqueño) almacenadas a 4°C.

#### **I.III Plásmidos**

Los plásmidos utilizados para la clonación del CDS de CycD6;1 y para la expresión de la proteína recombinante PeX:CycD6-FL fueron pGem-T Easy (Promega, Cat: A1360) y pPal7 (Bio-Rad, Cat: 156-3002), respectivamente. Este último cuenta con un promotor inducible por IPTG que permite expresar una proteína de fusión con el Profinity eXact Tag (Bio-Rad) en el extremo amino de aproximadamente 8 KDa y el péptido de interés en el extremo carboxilo. Ambos tienen un gen de resistencia a ampicilina para la selección de transformantes.

Tecnología gateway: Para la expresión de fragmentos de Rbr, estos se clonaron en el vector pENTR™/D-TOPO (Invitrogen, cat: K2400-20) y se realizó la reacción de recombinación con la enzima LR-Clonase II (Invitrogen) con el vector pDest15 (Invitrogen, Cat: 11802-014), el cual cuenta con resistencia a ampicilina y un promotor inducible por IPTG que permite expresar una proteína de fusión con GST en el extremo amino y el péptido de interés en el extremo carboxilo.

#### **I.III. Cepas y condiciones de crecimiento.**

Para la clonación de pGem-T Easy:CycD6-FL (Promega) pPal7:CycD6-FL (Bio-Rad) y construcciones en pDest15 (Invitrogen) se utilizó la cepa *E. coli* DH5- $\alpha$ . Para clonación de construcciones en el vector pENTR™/D-TOPO (Invitrogen) se utilizó *E. coli* One Shot® TOP10. Para la expresión de proteínas recombinantes se usó la cepa *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL.

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio Luria-Bertani con el antibiótico(s) correspondiente(s) a 37°C en agitación constante (150 rpm). Los cultivos de volúmenes pequeños ( $\leq 5\text{mL}$ ) fueron contenidos en tubos de ensayo, mientras que para volúmenes grandes ( $\geq 50\text{mL}$ ) se emplearon matraces Erlenmeyer de al menos el triple de capacidad del volumen a contener. Los cultivos sólidos se hicieron en agar LB con el antibiótico(s) correspondiente(s) contenido en cajas Petri a 37°C. Tanto el medio LB como el agar LB se esterilizaron en autoclave y cuando la temperatura hubo descendido a  $\approx 40^\circ\text{C}$  se añadieron los antibióticos necesarios.

## **II. Técnicas generales**

### **II.I. Electroforesis de DNA**

Para verificar las reacciones de amplificación y las de digestión de DNA, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado con solución amortiguadora TAE 1x (Tris 50mM, acetato de sodio 1mM, EDTA 2mM) pH 8.5 teñido con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador (UV-Transilluminator, UVP inc). Las fotografías de geles se obtuvieron con los equipos Digital science Image Station 440CF! (Kodak) y ChemiDoc MP (Bio-Rad).

### **II.II. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa**

La purificación de productos de amplificación o digestión de DNA se realizó con el Kit comercial GenElute Gel Extraction Kit (SIGMA-ALDRICH) siguiendo las instrucciones del fabricante (cat: NA1111).

### **II.III. Purificación de DNA plasmídico**

La purificación de plásmidos se realizó con el kit comercial Zyppy Plasmid miniPrep Kit (Zymmo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. (Cat: D4019).

#### **II.IV. Preparación de células competentes**

Para preparar células competentes de las cepas utilizadas de *E. coli*, se inocularon 3mL de medio LB con la cepa correspondiente y se incubaron 12h a 37°C en agitación constante. De este cultivo se tomaron 0.3mL para inocular 250 mL de medio LB contenido en un matraz Erlenmeyer y se incubó 3h a 37°C en agitación constante. Pasadas las 3h, se traspasó el cultivo a tubos falcon y se colocaron en hielo durante 15 minutos para posteriormente empastillar las células a 4000 g por 10 minutos. Las pastillas se lavaron con agitación muy suave con un total de 20mL de cloruro de calcio 0.1M y se volvieron a incubar en hielo 20 minutos. Se centrifugaron los tubos a 4 Krpm por 10 minutos nuevamente y se lavaron las pastillas por agitación muy suave con 1.5mL en total de cloruro de calcio 0.1M. Se repartió el volumen final en alícuotas de 100µL en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad y se incubó en hielo 1h. Las células fueron almacenadas a -70°C.

#### **II.V. Transformación de células competentes**

Para transformación con productos de ligación, se utilizaron 10µL de esta reacción. Para transformar con plásmido purificado por miniprep, se utilizó 1µL del eluato. Se agregó el volumen correspondiente de DNA a 100µL de células competentes y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Luego se aplicó un choque térmico a 42°C por 45 segundos y se regresó al hielo por 2 minutos más. Se añadió 1mL de medio LB y se incubó 1 h a 37°C en agitación. En caso de haber transformado con productos de ligación, se centrifugaron las bacterias 1minuto a 5Krpm, se desechó el exceso de medio LB y las células se resuspendieron en el medio restante para luego plaquear con todo el volumen en cajas Petri con agar LB con el antibiótico correspondiente. Si la transformación se realizó con plásmido purificado, se tomaron 200µL de medio con bacterias sin empastillar y se plaquearon en agar LB con el antibiótico correspondiente. Las cajas Petri inoculadas se incubaron toda la noche a 37°C para observar la formación de colonias.

## **II.VI. Electroforesis de proteínas**

Para verificar la presencia de proteínas y para los ensayos de western blot se realizaron electroforesis en gel Tris-glicina desnaturizante de poliacrilamida al 10% y 12% según fuera el caso (SDS-PAGE). El gel se preparó como se indica en Sambrook *et al.*, 1989 y se corrió a 96 volts hasta que el frente de corrida pasara el gel concentrador, luego a 107 volts durante el corrimiento en el gel separador. El amortiguador de electrodos utilizado fue de Tris-glicina-SDS 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga para obtener una concentración final 1x (SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2mM, glicerol 4%, Tris-HCl pH 6.8 40mM, azul de bromofenol 0.01%) y calentando a 90°C por 10 minutos.

## **II.VII. Western blot**

Para los ensayos de western blot se realizaron SDS-PAGE 10% o 12% como se indica en el apartado II.VI y se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Millipore) en el equipo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 350 mA por 1 hora. Las membranas fueron bloqueadas con una disolución al 10% de leche en PBS-Tween20 0.1% por 2h y luego incubadas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una disolución al 5% de leche en PBS-Tween20 0.1% O/N a 4°C en agitación. Terminado el tiempo de incubación se hicieron cuatro lavados de 10 minutos con PBS-Tween20 0.1%, se incubaron con un anticuerpo anti-conejo (Thermo Scientific, Cat: 31460) acoplado a HRP diluído 1:20 000 en PBS-Tween20 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente en agitación y se repitieron los cuatro lavados de 10 minutos con PBS-Tween20 0.1%. Posteriormente se lavaron las membranas con 0.5 mL de la solución de detección por quimioluminiscencia (Thermo Scientific, Cat: 32106). El revelado se hizo en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad).

## **III. Clonaciones y sobreexpresión de proteínas recombinantes.**

### **III.I. Amplificación de CDS**

Para la amplificación de CDS de CYCD6;1 de longitud completa (CycD6-FL) y de los fragmentos de Rbr1 (Rbr-Pd, Rbr-Ct, Rbr-PC) se diseñaron oligonucleótidos (apéndice 1) en el programa AmpliFX v.1.5.3 (<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>). Los oligos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM. La amplificación de cDNA se realizó a partir de cDNA total de ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 horas mediante una PCR con la enzima iProof High-fidelity DNA polymerase (Bio-Rad, Cat: 172-5310) sobre cDNA total de ejes embrionarios embebidos por 12 h.

### **III.II. Clonación de pPal7:CycD6-FL**

El CDS de CYCD6;1 amplificado y purificado se ligó en el vector de clonación pGem-T Easy (Promega) utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1. La mezcla de reacción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (cat: A1360) y la reacción se incubó 12h a 4°C. Después de purificar el plásmido pGem-T Easy con el inserto de DNA codificante para el péptido inmunogénico, se hizo una reacción de digestión con las enzimas NcoI y XhoI (Invitrogen) a 37°C por 2h. El fragmento escindido se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó a partir de la banda del gel. El fragmento purificado (inserto) se ligó al vector pPal7 (BioRad) previamente digerido con las mismas enzimas y purificado a partir de gel de agarosa 1% poniendo en la reacción el inserto y el vector en una relación molar 3:1 e incubando toda la noche a 4°C con la enzima T4 DNA ligase (Promega). Los productos de ligación se usaron para transformar células competentes *E. coli* DH5- $\alpha$ . Al día siguiente se inoculó 3mL de LB ampicilina 100  $\mu$ g /mL con una colonia de células transformantes y se incubó 12h a 37°C para purificar plásmido para verificar por PCR y doble digestión (NcoI / XhoI) que el plásmido contuviera el inserto de longitud esperada. Hecho esto se envió a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM para validar que el plásmido tuviera, en el correcto marco de lectura, la secuencia codificante para la proteína de fusión Profinity eXact Tag (PeX) - CycD6-FL. Para la secuenciación, se utilizaron los oligonucleótidos con que se clonó el inserto y el primer del promotor T7. El resultado de la secuenciación de DNA se tradujo en el marco de lectura

adecuado con la herramienta Translate de ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org/tools/>) y la secuencia de aminoácidos se comparó con la base de datos de maizesequence.org en un alineamiento múltiple ClustalW en BioEdit.

### **III.III. Clonación de pDest15:Rbr-Pd, pDest15:Rbr-Ct y pDest15:Rbr-PC**

Debido a que los *primers forward* contienen la secuencia CACC en el extremo 5', el CDS amplificado y purificado de Rbr-Pd, Rbr-Ct, Rbr-PC contiene esta misma secuencia. Se realizó la reacción de clonación en el vector pENTR™/D-TOPO (Invitrogen, cat: K2400-20) en una relación 1:1 siguiendo las indicaciones y recomendaciones del fabricante y se transformó en células competentes *E. Coli* TOP10. El escrutinio de transformantes se hizo de acuerdo a las indicaciones del fabricante y una de las clonas positivas para la secuenciación se utilizó para realizar la recombinación con el vector destino pDest15 (Invitrogen) usando la enzima Gateway® LR Clonase® II (Invitrogen, Cat: 11791-20) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

### **III.IV. Inducción de proteínas recombinantes**

Las construcciones pPal7:CycD6-FL, pDest15:Rbr-Pd, pDest15:Rbr-Ct y pDest15:Rbr-PC se utilizaron para transformar células competentes *E. coli* BL21 CodonPlus-RIL. Una vez seleccionadas con ampicilina 10 µg/mL, la expresión de la proteína recombinante se indujo adicionando IPTG a una concentración final de 0.2 mM a un cultivo bacteriano de *E. coli* BL21CodonPlus-RIL con una densidad óptica de 0.6 - 0.8 a 600nm de longitud de onda. Después de la adición de IPTG se dejó incubando por 2 h a 37°C en agitación constante (1500rpm), se pusieron en hielo 5 minutos y luego se centrifugaron las células a 4000 g por 15 minutos a 4°C. La expresión de la proteína recombinante se verificó con un SDS-PAGE teñido con azul de coomassie.

### **IV. Ensayo de competencia**

Se corrieron 0, 5, 20, 60 y 100 µg de la proteína recombinante GST-CycD6-Ag (antígeno de CycD6;1) así como 100µg de GST en un SDS-PAGE y se

transfirieron a una membrana de PVDF que, posterior al bloqueo, se cortó en fragmentos para separar los carriles con las distintas cantidades de proteína GST-CycD6-FL y GST. Cada fragmento de membrana se incubó por separado con el suero inmune a una dilución de 1:1500 en PBS-Tween1%- leche al 5% O/N. Al día siguiente, estas mismas diluciones del suero se volvieron a utilizar para un ensayo de western blot donde cada disolución se usó para inmunodetectar a la CycD6;1 endógena en 50µg de proteína de extracto proteico total de ejes embrionarios de semilla seca. El anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Cat: 110-218) se utilizó en una dilución de 1:20 000.

## **V. Ensayos de germinación**

Semillas de maíz variedad chalqueño se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio 3% en agitación constante durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril hasta que perdieran el olor a hipoclorito. Después se lavaron con una disolución de bromo-cloro-dimetil-hidantoína (Sin-Bac) al 5% durante 5 minutos y se acomodaron en grupos de 8 semillas enrolladas en toallas de papel absorbente y posteriormente fueron humedecidas con agua destilada estéril. Los rollos se colocaron en posición vertical conservando la polaridad de la semillas en un recipiente con agua destilada estéril y se incubaron a 25°C por 6, 12, 18, 24, 30 y 36h en oscuridad. Finalizado el tiempo correspondiente de germinación, para cada repetición biológica de cada tiempo y semilla seca, se extrajeron 10 ejes embrionarios con escalpelo y cada lote se congeló con nitrógeno líquido y se homogenizó en morteros de porcelana adicionando 1 mL de disolución de extracción de proteínas (70mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM ditioneitol (DTT), 0.1% Triton X-100, 0.25 mM sacarosa, una tableta de coctel inhibidor de proteasas y una de inhibidor de fosfatasas). En el caso de semilla seca y los tiempos 12, 24 y 36h, también se colectó el escutelo y se procesó de la misma forma. Las muestras se centrifugaron a 12Krpm por 1h, la fracción soluble fue separada y centrifugada nuevamente a 12Krpm por 1h. La fracción soluble se cuantificó por el método de Bradford en

placa de ELISA usando una curva patrón de BSA comercial (Bio-Rad, Cat: 500-0207). Todo el material y disoluciones se usaron estériles.

Los patrones de acumulación de la proteína CycD6;1 se determinaron por western blot con el anticuerpo anti-CycD6;1 (1:1500) y sus respectivas densitometrías, realizadas con la herramienta de análisis por volumen (Volume tools) usando el método de sustracción local y ajustado por el área de cada banda en el programa Image Lab 5.2.1 (2014 Bio-Rad), fueron normalizadas con las correspondientes densitometrías de CycA inmunodetectada en la misma membrana de cada repetición biológica como control de carga. Las intensidades normalizadas de las bandas se expresan en unidades de densidad relativa (UDR) respecto al tiempo 0 (semilla seca). Los ensayos se hicieron por triplicado y el análisis estadístico se hizo mediante una ANOVA de una vía seguido de prueba *post-hoc* de Tukey.

## **VI. Ensayos de inmunofluorescencia.**

Para determinar la localización por inmunofluorescencia de CycD6;1 en ejes embrionarios y raíces, se colectaron los ejes y 2 mm de la punta de raíz después de los tiempos de imbibición correspondientes bajo las condiciones especificadas en el apartado V. El tejido colectado se fijó en formaldehído al 4% en PBS 1X pH 7.2 a temperatura ambiente por 2 h y se realizaron 5 lavados de 15 minutos cada uno con PBS1X. El tejido fijado se deshidrató en pases graduales de etanol con concentraciones ascendentes: 57, 70, 85, 96 y 100%, de 1 h cada uno. Después se pasaron a Slide Brite por 15 minutos, se impregnaron en una mezcla de Slide Brite y paraplast 1:1 en la estufa a 54-58 °C O/N y posteriormente en Paraplast Plus (Polysciences Inc.) por 24h. Después se incluyeron en bloques de paraplast puro y se dejó solidificar. Los cortes de 5-7 µm de espesor se obtuvieron en microtomo rotatorio y fueron colocados en portaobjetos Superfrost (Fisher) y almacenados hasta su uso.

Los cortes se desparafinaron con pases secuenciales de etanol en concentración creciente y se rehidrataron de la misma manera pero con concentraciones decrecientes. Se aislaron con marcador PAP-PEN y se bloquearon con BSA al 3%



en PBS 1X suplementado con azida de sodio 0.01% y Tritón X-100 0.1% en cámara húmeda a 4°C durante 4 h. Posteriormente se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS 1x. Después se incubaron con el anticuerpo primario anti-CycD6;1 en una dilución 1:500 en PBS 1x O/N a 4°C y se repitieron los 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1x. Se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG H+L de conejo hecho en cabra acoplado a Alexa Fluor 488 en dilución 1:500 por 3 h en obscuridad a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se lavaron 4 veces por 10 minutos con PBS 1X y se montaron con medio de montaje acuoso para fluorescencia con DAPI a 2 µg/mL. Se sellaron con barniz de uñas transparente y se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su observación en microscopio confocal (Olympus).

## **VII. Ensayos de actividad de cinasa**

Para determinar la actividad de cinasa asociada a CycD6;1, se realizaron inmunoprecipitados en los que se preincubó 300 µg de extracto proteico total con 10 µL de suero inmune anti-CycD6;1 y llevados a un volumen final de 1 mL O/N a 4 °C en tubos de microfuga de 2 mL en agitación constante en un rotador de tubos (Boekel, modelo: 260750) y luego se agregaron 20 µL de Agarosa-Proteína A (Sigma Aldrich, Cat: P7786), incubándose por 4 h a 4 °C. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos en el roscero con 500 µL de Buffer A (25mM Tris/HCl, pH 7.5, 125mM NaCl, 2.5mM EDTA, pH 8.0, 2.5mM EGTA, 2.5mM NaF, and 0.1% Triton X-100) previamente enfriado a 4 °C y dos lavados con 500 µL de buffer de cinasa (70mM Tris/HCl, pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl, 1mM ditiotreitól, 5mM EGTA, 20mM ATP) a 4 °C. Después del último lavado se removió el Buffer de cinasa excedente y se montó la reacción con 3 µg de sustrato (Histona -Sigma Aldrich, Cat: H5505- o proteína recombinante de GST:Rbr según correspondiera), y 3 µCi de [gama-32P]-ATP disueltos en buffer de cinasa. La reacción se incubó a 30 °C durante 30 minutos y la reacción se detuvo con buffer de carga de proteínas y desnaturalizando como se indica en el apartado II.VI. Las muestras se corrieron en un SDS-PAGE 10%. Los geles se tiñeron con azul de coomassie y se secaron

en un secador de geles al vacío (Bio-Rad, Cat: modelo: 543) entre un papel filtro (Wathman, Cat: 3030917) y papel celofán dulce. Los geles secos se expusieron en una placa de europio revelada en el equipo Molecular Imager FX (Bio-Rad) y/o placas fotográficas Hiperfilm ECL 18x24cm (Kodak) utilizando la disolución de revelado GBX developer (Kodak) y de fijación GBX fixer (Kodak). En ambos casos, la imagen se analizó en el programa Image Lab 5.2.1 (2014 Bio-Rad) y la densitometría se normalizó al respectivo control de carga (la banda correspondiente a la proteína sustrato en el gel teñido con azul de coomassie). El análisis estadístico se realizó igual que en los ensayos de acumulación de proteína CycD6;1 durante la germinación.

### **VIII. Análisis estadístico.**

Para determinar si existieron diferencias significativas entre los valores densitométricos de los ensayos de germinación y actividad de cinasa asociada a CycD6;1, se realizó una ANOVA de una vía en Excel con una alfa de 0.05 y 0.01. Para determinar entre qué valores existieron las diferencias estadísticamente significativas se realizó una prueba *post-hoc* de Tukey.

### **IX. Interacción CycD6;1 - Rbr *in vitro*.**

Para probar la interacción con los fragmentos de Rbr, se sobreexpresaron las proteínas PeX:CycD6-FL, GST, GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct, GST:CdkA en un cultivo bacteriano líquido (400 mL para Pex:CycD6-FL y 100 mL de las demás) de la cepa *E. coli* BL21 CodonPlus RIL durante dos horas y se centrifugaron para concentrar las células. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 mL de PBS 1x por cada 100 mL de volumen original. Después se juntaron 10 mL de PeX:CycD6-FL con los 10 mL de cada una de las demás resuspensiones (de las proteínas recombinantes con GST). Después se lisaron las células con lisozima (Sigma Aldrich, Cat: L7651) durante 15 minutos a 37 °C y se añadió MgCl<sub>2</sub> 6mM, EDTA 1mM y Benzonasa (Sigma Aldrich, Cat: E1014) 1.5 U/mL (concentraciones finales), y se incubó 30 minutos más a 37 °C para digerir ácidos nucleicos y reducir la viscosidad. Después se dejaron incubando los lisados

bacterianos a 4 °C una hora y se centrifugaron 30 minutos a 12 000 g dos veces. La fracción soluble se purificó en columna con una resina de glutatión agarosa (Sigma Aldrich, Cat: G4510) conforme a las indicaciones del fabricante. Volúmenes conocidos de las fracciones purificadas se corrieron en un SDS-PAGE al 10% junto con una curva patrón de BSA. El gel se tiñó con azul de coomassie y las bandas que por su masa correspondieran a las proteínas recombinantes de GST de longitud completa (no se tomaron en cuenta productos de menor masa) se cuantificaron por densitometría. Cantidades iguales de las proteínas recombinantes de GST se corrieron en un nuevo SDS-PAGE 10% y se realizó un western-blot con el anticuerpo anti-CycD6;1 para detectar la copurificación de PeX:Cycd6-FL. Se realizó un western-blot similar con un anticuerpo comercial anti-GST (Santa Cruz Biotechnology, Cat: 110-218) Las fracciones no unidas a la resina de glutatión sefarosa durante la purificación de las proteínas recombinantes de GST también fueron sometidas a western blot con el anticuerpo anti-CycD6;1.

**Apéndice 1. Primers y temperatura de alineamiento para la amplificación de CDS de las proteínas recombinantes.**

Tabla A1. *Primers* para la amplificación de la secuencia codificante (CDS) de fragmentos de Rbr1 y CycD6;1 de longitud completa (CycD6-FL).

Nombre	Secuencia 5' > 3'	*Clave IBt-año
**FwCycD6FL	AAACCATGGCGACGGAGGAGTG	3270-2012
RvCycD6FL	TTTTCTCGAGAATCTCCGACTCTTCGATC	3271-2012
ZmRbr1-Pd Fw	CAC CAT GAC ACC AGT AAC TTC TGC	5866-2013
ZmRbr1-Pd Rv	AGG AAA GGC TTC GCT GCT GGA ACA AA	5867-2013
ZmRbr1-Ct Fw	CAC CGA AGA CAA GAA GAA TGC TAG TGG	5868-2013
ZmRbr1-Ct Rv	GGA GCA CGG ATC TGT GAG CTA TAT AC	5869-2013

\*La información sobre los primers puede obtenerse con la clave del Instituto de Biotecnología (IBt) y año en <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/busquedas.html>

Tabla A2. CDS amplificados y pares de primers utilizados.

CDS	<i>Primer forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	T <sub>m</sub> (°C)
CycD6-FL	FwCycD6FL	RvCycD6FL	61
Rbr-Pd	ZmRbr1-Pd Fw	ZmRbr1-Pd Rv	58.6
Rbr-Ct	ZmRbr1-Ct Fw	ZmRbr1-Ct Rv	56.4
Rbr-PC	ZmRbr1-Pd Fw	ZmRbr1-Ct Rv	58.6

## Apéndice 2. Proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo.

Tabla A3. Proteínas recombinantes.

Proteína recombinante	Vector	masa molecular (KDa)
PeX:CycD6-FL	pPal7 (Bio-Rad)	40.3
GST:Rbr-Pd	pDest15 (Invitrogen)	69.6
GST:Rbr-Ct	pDest15 (Invitrogen)	47.2
GST:Rbr-PC	pDest15 (Invitrogen)	91.6
**GST:CdkA	pGex-4T-2 (GE healthcare)	60
*GST	pGex-4T-2 (GE healthcare)	26

\*Inducción del vector vacío.

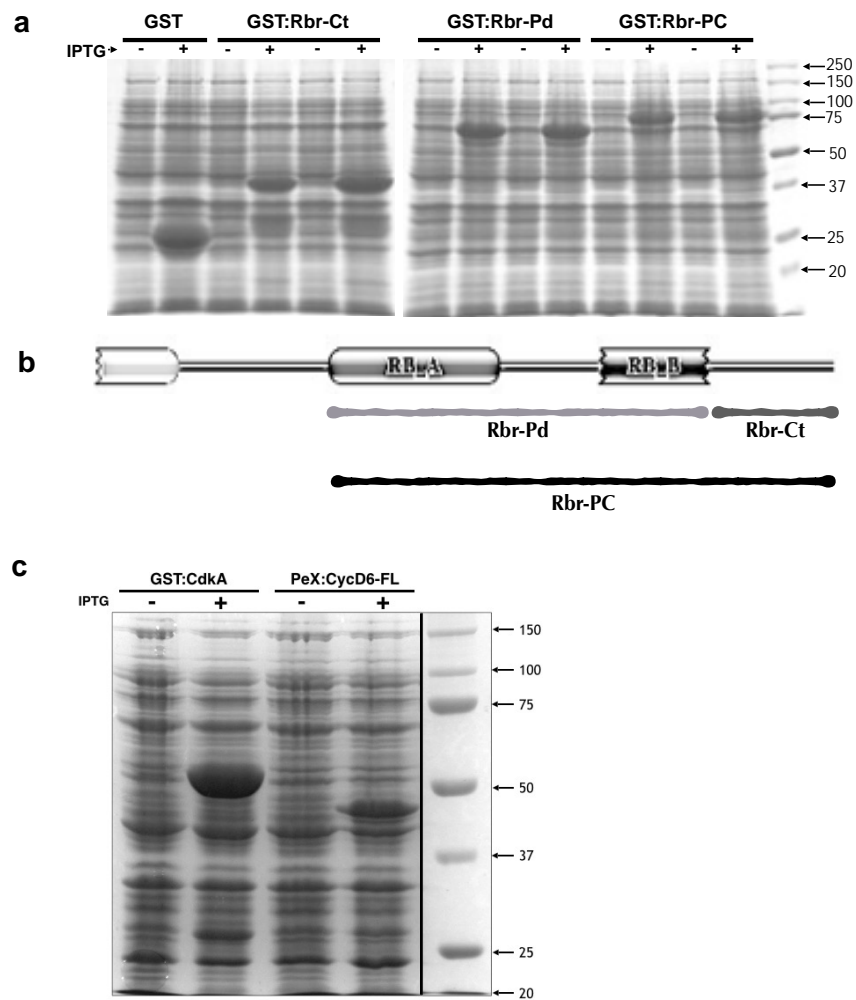
\*\*Construcción no generada en este trabajo.

### Fragmentos Recombinantes de GST:Rbr1

Para generar las proteínas recombinantes GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct y GST:Rbr-PC se predijeron la longitud y posición de los subdominios *pocket A* y *pocket B* con la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org>; Finn *et al.*, 2014), de manera que GST:Rbr-Pd contiene ambos subdominios; GST:Rbr-Ct, el extremo C-terminal excluyendo el subdominio *pocket B* completo; y GST:Rbr-PC incluye ambos fragmentos juntos, es decir, desde el inicio del subdominio *pocket A* hasta el codón de paro (Figura A1 B).

### GST:CdkA y PeX:CycD6-FL

Las las proteínas recombinantes GST:CdkA y PeX:CycD6-FL contienen la secuencia de aminoácidos de longitud completa en ambos casos.

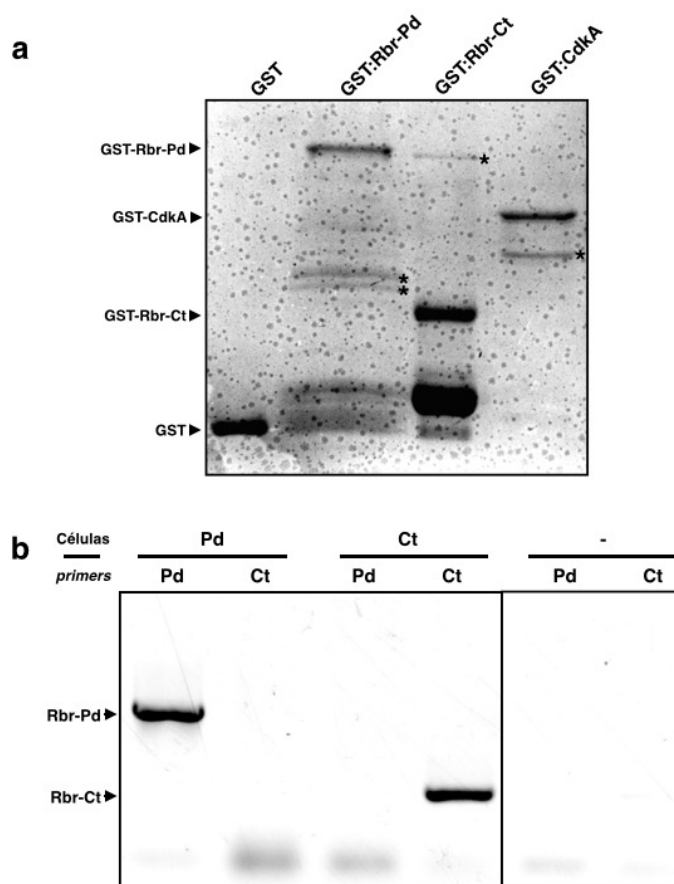


**Figura A1.** Inducción con IPTG de proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo. a) Inducción por duplicado de GST, GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct y GST:Rbr-PC; b) Representación esquemática de la estructura de la proteína Rbr1 y los fragmentos clonados que se incluyen en las proteínas recombinantes GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct y GST:Rbr-PC; c) Inducción de GST:CdkA y PeX:CycD6-FL. Las flechas indican la masa del marcador estándar en KDa.

## Purificación de proteínas recombinantes de GST

En la figura 12a (interacción *in vitro*), se observan bandas de tamaño no esperado en los carriles que corresponden a la purificación de GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct y GST:CdkA, y que son reconocidas por el anticuerpo anti-GST (fig. 12b). Como se muestra en la figura A2a, estas bandas están presentes en las fracciones purificadas de dichas proteínas recombinantes con resina de glutatión sefarosa. En la figura 13 (actividad sobre fragmentos de Rbr), aparece una banda en el carril de GST:Rbr-Ct que aparentemente tiene la misma masa que GST:Rbr-Pd y es fosforilada. Sin embargo, cuando las fracciones purificadas se corren en un SDS-

PAGE de menor concentración (8%), hay una mejor separación de estas bandas y se observa que existe una ligera diferencia de masas. Para confirmar que no exista contaminación cruzada de las construcciones, se realizó una PCR en colonia usando el par de primers ZmRbr1-Pd Fw / ZmRbr1-Pd Rv tanto en las células transformantes que expresan GST:Rbr-Ct como las que expresan GST:Rbr-Pd. Las mismas reacciones se realizaron con el par de primers ZmRbr1-Ct Fw / ZmRbr1-Ct Rv. El resultado (figura A2b) muestra que las células que expresan GST:Rbr-Ct no tienen niveles detectables de la construcción de GST:Rbr-Pd, y viceversa.



**Figura A2.** Purificación de proteínas recombinantes. a) Tinción de coomassie (SDA-PAGE 8%) de las fracciones purificadas de las proteínas GST, GST:Rbr-Pd, GST:Rbr-Ct y GST:CdkA. Las puntas de flecha a la izquierda marcan la masa de las proteínas correspondientes de longitud completa; los asteriscos marcan las bandas inesperadas de masas diferentes a la proteína completa y que interfieren en los resultados de las figuras 12 y 13. b) PCR en colonia de células transformantes las construcciones que codifican para Pd, GST:Rbr-Pd; Ct, GST:Rbr-Ct; -, control negativo sin templado. Para cada colonia de células se utilizaron los para de primers Pd, ZmRbr1-Pd Fw / ZmRbr1-Pd Rv; y Ct, ZmRbr1-Ct Fw / ZmRbr1-Ct Rv. Gel de agarosa 1%.

### Apéndice 3. Cortes histológicos de la semilla de maíz.

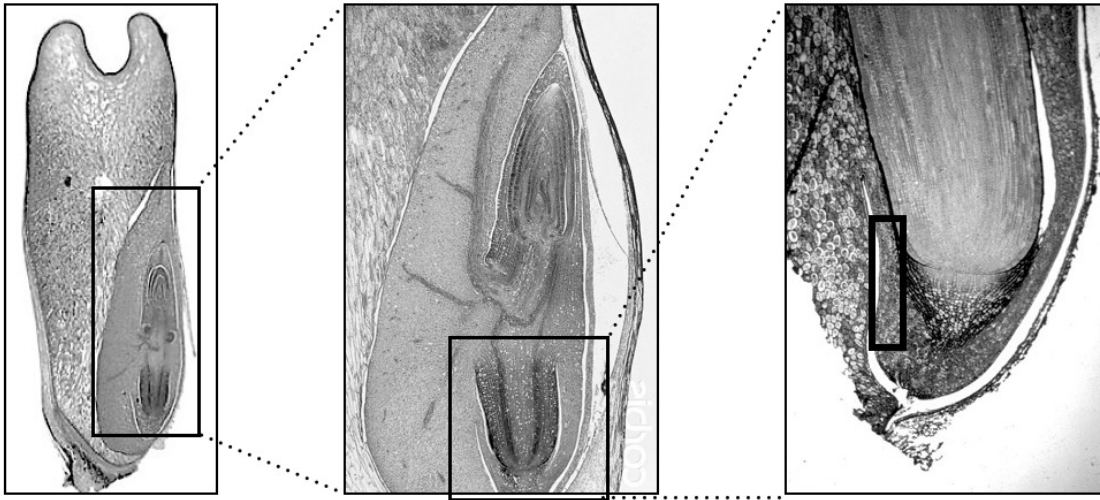


Figura A3. Cortes histológicos de semilla de maíz. Las ampliaciones del corte histológico muestran la zona donde fue detectada la CycD6;1 de maíz durante la germinación. El cuadro de contorno grueso en la última ampliación señala la coleoriza, el tejido donde consistentemente se localizó a CycD6;1

### Apéndice 4. Controles del ensayo de actividad de cinasa.

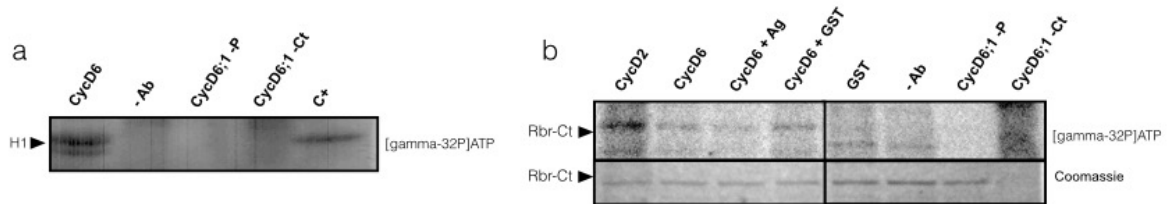


Figura A4. Controles de los ensayos actividad de cinasa. Detección por autoradiografía de la fosforilación sobre a) Histona H1 y sobre b) la región carboxilo terminal de Rbr mediada por inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-CycD6;1, anti-CycD2 o anti-GST. En b) los anticuerpos anti-CycD6;1 fueron preincubados con el antígeno (Ag) o con GST antes de la inmunoprecipitación. En a) y b) se realizó el inmunoprecipitado sin anticuerpo (-Ab), sin extracto proteico de maíz (-P) o sin sustrato (-H1 o -Ct). En a) el control positivo (c+) es un pull-down con p13-suc, una proteína que une Cdk.



## REFERENCIAS

- Ach RA, Durfee T, Miller AB, Taranto P, Hanley-Bowdoin L, Zambryski PC, Griesem W. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5077–86.
- Ach RA, Taranto P, Griesem W. A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *Plant Cell* 1997; 9:1595–606.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science; 2002. p.983-1026.
- Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y, Ma H. Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J* 2002; 21: 3081–95.
- Baiza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* 1989 135 : 416–21.
- Barrero JM, Talbot MJ, White RG, Jacobsen JV, Gubler F. Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in barley. *Plant Physiol* 2009;150(2): 1006-21.
- Bewley JD and Black M. *SEEDS: Physiology of development and germination*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Plenum Press; 1985.
- Bewley JD & Black M. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Plenum Press; 1994.
- Binné UK, Classon MK, Dick FA, Wei W, Rape M, Kaelin WG Jr, *et al*. Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nature Cell Biol* 2007; 9:225–32.
- Bird DA, Buruiana MM, Zhou Y, Fowke LC, Wang H. Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitors are nuclear-localized and show different localization patterns within the nucleoplasm. *Plant Cell Reports* 2007; 26: 861–72.
- Black, M., Bewley, J.D., Halmer, P. *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses*. UK: Cromwell Press, 2006.
- Bourgo RJ, Thangavel C, Ertel A, Bergseid J, McClendon AK, Wilkens L, *et al*. RB restricts DNA damage-initiated tumorigenesis through an LXCXE-dependent mechanism of transcriptional control. *Mol Cell* 2011; 43: 663–72.
- Bourne Y, Watson MH, Hickey MJ, Holmes W, Rocque W, *et al*. Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 1996; 84 : 863–74.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al*. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122 : 947–56.
- Brehm A and Kouzarides T. Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 142–5.
- Buendía Monreal M. *Caracterización filogenética y de expresión génica de las ciclinas tipo D de maíz*. Tesis de maestría; 2011. Posgrado en ciencias Bioquímicas, UNAM. México.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiologia Plantarum* 2011; 143 (3) :297-308.
- Carrillo Trueba, C. *El Origen del Maíz, naturaleza y cultura en mesoamérica*. *Ciencias* 2009; 92-93: 4-13.
- Churchman ML, Brown ML, Kato N, Kirik V, Hülskamp M, Inzé D, De Veylder L, *et al*. SIAMESE, a Plant-Specific Cell Cycle Regulator, Controls Endoreplication Onset in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 2006; 18(11): 3145–57.

- Classon M and Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Rev Cancer* 2002; 2:910–7.
- Collins C, Dewitte W, Murray JA. D-type cyclins control cell division and developmental rate during Arabidopsis seed development. *J Exp Bot* 2012; 63(10):3571-86.
- Contreras A, Hale TK, Stenoien DL, Rosen JM, Mancini MA, and Herrera RE. The dynamic mobility of histone H1 is regulated by cyclin/CDK phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2003; 23, 8626-86.
- Craig KL and Tyers M. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 72(3):299-328.
- Cruz-Ramirez A, Díaz-Triviño S, Blilou I, Grieneisen VA, Sozzani R, Zamioudis C. A Bistable Circuit Involving SCARECROW/RETINOBLASTOMA Integrates Cues to Inform Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*, 2012; 150: 1002-15.
- Deltour R and Jacquard A. Relation between water stress and DNA synthesis during Germinations of Zea mays L. *Ann Bot* 1974; 38: 529-534.
- Dewitte W and Murray JA. The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol*, 2003; 54: p. 235-64.
- Dick FA and Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14(5):297-306.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33: 389–96.
- Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato JY, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993; 73: 487–97.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323:643–6.
- García E, Laquel P, Castroviejo M, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM. Maize replicative alpha-type DNA polymerase: separation of polymerase and primase activities and recognition of primase subunits. *Physiol Plant* 2002;114(4):533-9.
- Godínez Palma SK. Interacción de las ciclinas D con Cdks durante la germinación en maíz. Tesis de Maestría; 2010. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. México.
- Godínez-Palma SK. Regulación por fosforilación de la actividad de Cinasa de complejos CycD/Cdk durante la germinación de maíz. Datos sin publicar.
- Godínez-Palma SK, García E, Sánchez Mde L, Rosas F, Vázquez-Ramos JM. Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J Exp Bot* 2013; 64(18):5661-71.
- Guo J, Song J, Wang F, Zhang XS. Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Mol Biol* 2007; 64(4):349-60.
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM. Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol* 2005;46(1):166-73.
- Gutzat R, Borghi L, Grussem W. Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci* 2012; 17(3):139-48.
- Harbauer AB, Opalińska M, Gerbeth C, Herman JS, Rao S, Schönfisch B, *et al.* Cell cycle-dependent regulation of mitochondrial preprotein translocase. *Science*. 2014; 346(6213):1109-13.
- Healy JM, Menges M, Doonan JH, Murray JAH. The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* 2001; 276: 7041-7.
- Herrera I, Sánchez MP, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM. Proliferating cell nuclear antigen expression in maize. Regulation by phytohormones during seed development and germination and its association with a putative cyclin D protein. *Physiol Plant* 2000; 110: 127–34.

- Herrera RE, Chen F, Weinberg RA. Increased histone H1 phosphorylation and relaxed chromatin structure in Rb-deficient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93, 11510-5.
- Hilhorst HWM. Definitions and hypotheses of seed dormancy, en Bradford K y Nonogaki H Eds. *Seed development, dormancy and germination. Annual Plant Reviews*, 27. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2007. pp. 50-71.
- Hirano H, Harashima H, Shinmyo A, Sekine M. Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation. *Plant Mol Biol* 2008; 66: 259–75.
- a) Hirano H, Harashima H, Shinmyo A, Sekine M. Arabidopsis G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation. *Plant Physiol Biochem* 2011; 49: 687-91.
- b) Hirano H, Shinmyo A, Sekine M. Both negative and positive G1 cell cycle regulators undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* 2011; 6(9):1394-6
- Hirschi A, Cecchini M, Steinhardt RC, Schamber MR, Dick FA, Rubin SM. An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. *Nature Struct Mol Biol* 2010; 17:1051–7.
- Hochholdinger F. The Maize Root System: Morphology, Anatomy, and Genetics, en Bennetzen JL y Hake S Eds. *Handbook of Maize: Its Biology*. New York: Springer; 2009. pp. 145-60.
- Hochholdinger F, Park WJ, Sauer M, Woll K. From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci* 2004; 9(1):42-8.
- Huntley R, Healy JMS, Freeman D, Lavender P, de Jager SM, Greenwood J, *et al.* The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* 1998; 37: 155–69.
- Inzé D. Green light for the cell cycle. *The EMBO Journal* 2005; 24:657–62.
- Inzé D and De Veylder L. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu. Rev. Genet* 2006; 40: 77-105.
- Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, *et al.* Physcomitrella Cyclin-Dependent Kinase A Links Cell Cycle Reactivation to Other Cellular Changes during Reprogramming of Leaf Cells. *Plant Cell* 2011; 23(8):2924-38.
- Ji P, Jiang H, Rekhman K, Bloom J, Ichetovkin M, Pagano M, Zhu L. An Rb–Skp2–p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial- penetrance Rb mutant. *Mol Cell* 2004; 16: 47–58.
- Joubès J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin JP. CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 2000; 43(5-6): 607-20.
- Kawamura K, Murray JAH, Shinmyo A, Sekine M. Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. *Plant Mol Biol* 2006; 61: 311–327.
- Kiesselbach TA. *The Structure and Reproduction of Corn. 50<sup>th</sup> Anniversary Edition*. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- Kim HY, Ahn BY, Cho Y. Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen. *EMBO J.* 2001; 20: 295–304.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; 274: 1652–9.
- Klug WS y Cummings MR. *Conceptos de Genética*. 5ª ed. España: Prentice Hall; 1998.
- Koizumi K, Gallagher KL. Identification of SHRUBBY, a SHORT-ROOT and SCARECROW interacting protein that controls root growth and radial patterning. *Development* 2013; 140(6):1292-300.
- Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Uchimiya H, Umeda M. Arabidopsis D-Type Cyclin CYCD4;1 Is a Novel Cyclin Partner of B2-Type Cyclin-Dependent Kinase. *Plant Physiol* 2003; 132: 1315–21.

- Kono A, Ohno R, Umeda-Hara C, Uchimiya H, Umeda M. A distinct type of cyclin D, CYCD4;2, involved in the activation of cell division in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 2006; 25: 540–5.
- La H, Li J, Ji Z, Cheng Y, Li X, Jiang S, *et al.* Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa* L.). *Mol Gen Genomics* 2006; 275: 374–86.
- Lara-Núñez A, de Jesús N, Vázquez-Ramos J. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plantarum* 2008; 132: 79–88.
- Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 1998; 391: 859–65.
- Lee KP, Piskurewicz U, Turecková V, Strnad M, Lopez-Molina L. A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(44):19108-13.
- Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995; 9: 639–49.
- Li P, Onnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, *et al.* The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature genetics* 2010; 42, 12: 1060-8.
- Lin DI, Barbash O, Kumar KGS, Weber JD, Harper JW, Klein-Szanto AJP, *et al.* Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Cyclin D1 by the SCFFBX4-aB Crystallin Complex. *Mol Cell* 2006; 24: 355–66.
- Liu A, Gao F, Kanno Y, Jordan MC, Kamiya Y, Seo M, Ayele BT. Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling. *PLoS One* 2013; 8(2):e56570.
- Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, *et al.* D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(43): 15694-9.
- Mayer AM and Poljakoff A. The germination of seeds. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford England: Pergamon Press; 1975.
- Menges M, Pavesi G, Morandini P, Bögre L, Murray JAH. Genomic Organization and Evolutionary Conservation of Plant D-Type Cyclins. *Plant Physiology* 2007; 145: 1558–76.
- Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH. The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell* 2006; 18: 893-906.
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/ cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 2002; 14 (8): 1847–57.
- Nakamura S, Abe F, Kawahigashi H, Nakazono K, Tagiri A, Matsumoto T, *et al.* A wheat homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 acts in the regulation of germination. *Plant Cell* 2011; 23(9):3215-29.
- Nakamura T, Sanokawa R, Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi, M, Mori N. Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res* 1995; 221: 534–42.
- Nugent JH, Alfa CE, Young T, Hymas JS. Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* 1991; 99: 669-74.
- Noble ME, Endicott JA, Brown NR, Johnson LN. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 482–7.
- Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C and Murray JA Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 357(1422): 749-60.
- Pan W, Cox S, Hoess RH, Grafström RH. A cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 binding site within the C domain of the retinoblastoma protein. *Cancer Res* 2001; 61: 2885–91.
- Perales RH. Maíz, riqueza de México. *Ciencias* 2009; 92-93: 46-55.
- Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 1995; 308: 697–711.

- Piperno DR, Ranere AJ, Holst I, Iriarte J, Dickau R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 5019-24.
- Planchais S, Samland AK, Murray JAH. Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* 2004; 38: 616–25.
- Quiroz-Figueroa F and Vázquez-Ramos JM. Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant* 2006; 128: 556-68.
- Ramirez-Parra E, Frundt C, Gutierrez C. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Journal* 2003; 33: 801–11.
- Reyes J, Jiménez-García LF, González M, Vázquez-Ramos JM. Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci Res* 1991; 1: 113–7.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JA. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* 1999; 283: 1541–4.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruiz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, *et al.* Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *J Exp Bot* 2012; 63(12): 4513-26.
- Sánchez Mde L, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM. Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J Exp Bot* 2005; 56(412): 515-23.
- Sarg B, Helliger W, Talasz, H, Forg, B, Lindner, HH. Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1. *J Biol Chem* 2006; 281, 6573-80.
- Scanlon MJ and Takacs EM. Kernel Biology, en Bennetzen JL y Hake S Eds. *Handbook of Maize: Its Biology*. New York: Springer; 2009. pp. 121-44.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, *et al.* The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 2009; 326: 1112-5.
- Sherr CJ. D-Type cyclins. *TIBS Reviews* 1995; 20: 187-90.
- Singh M, Krajewski M, Mikolajka A, Holak TA. Molecular determinants for the complex formation between the retinoblastoma protein and LXCXE sequences. *J Biol Chem* 2005; 280: 37868–76.
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 1995; 7: 85–103.
- Sorrell DA, Marchbank A, McMahon K, Dickinson JR, Rogers HJ, Francis D. A WEE1 homologue from Arabidopsis thaliana. *Planta* 2002; 215: 518–22.
- Sozzani R, Cui H, Moreno-Risueno MA, Busch W, VanNorman JM, Vernoux T, *et al.* Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 2010; 466: 128–32.
- Steber CM. DE-repression of seed germination by GA signaling, en Bradford K y Nonogaki H Eds. *Seed development, dormancy and germination*. Annual Plant Reviews, 27. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2007. pp. 248-63
- Steinborn K, Maulbetsch C, Priester B, Trautmann S, Pacher T, *et al.* The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev* 2002; 16: 959–71.
- Sun Y, Dilkes BP, Zhang C, Dante RA, Carneiro NP, *et al.* Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4180–5.

- Toyoshima H and Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67–74.
- Vandepoele K, Vlieghe K, Florquin K, Hennig L, Beemster GTS, *et al.* Genomewide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol* 2005; 139: 316–28.
- Vázquez Ramos JM. La bioquímica como herramienta para el estudio de la germinación. En: Molina Moreno J, Estrada Gómez JA, Livera Muñoz M, González Hernández VA, editores. *Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México*. 1ra ed. Chapingo, México: SOMEFI; 1990 p. 189-202.
- Vázquez Ramos JM. El ciclo celular. En: Jiménez García LF y Merchant Larios H, coords. *Biología celular y Molecular*. 1ra ed. México: Pearson educación, 2003. p. 595-616.
- Vázquez-Ramos JM and Sánchez MP. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res* 2003; 13: 113-30.
- Vela E. El Maíz. *Arqueología Mexicana* 2011; 38: 10-26.
- Vincent PLD. *Zea mays* (Maize, Corn). Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2002; 1-7.
- Wang GF, Kong HZ, Sun YJ, Zhang XH, Zhang W, Altman N, *et al.* Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* 2004; 135: 1084–99.
- Wang G, Miskimins R, Miskimins WK. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is localized to the cytosol in Swiss/3T3 cells. *Oncogene* 1999; 18: 5204– 10.
- Wang H, Fowke LC, Crosby WL. A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 1997; 386: 451–2.
- Wang L, Ruan YL. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Front Plant Sci* 2013; 4:163.
- Watanabe N, Arai H, Nishihara Y, Taniguchi M, Watanabe N, Hunter T, Osada H. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF-TrCP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(13): 4419–24.
- Weimer AK, Nowack MK, Bouyer D, Zhao X, Harashima H, Naseer S, *et al.* Retinoblastoma related1 regulates asymmetric cell divisions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012; 24(10):4083-95.
- White CN, Proebsting WM, Hedden P, Rivin CJ. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol* 2000; 122(4): 1081-8.
- White CN and Rivin CJ. Gibberellins and Seed Development in Maize. II. Gibberellin Synthesis Inhibition Enhances Abscisic Acid Signaling in Cultured Embryos. *Plant Physiol* 2000; 122: 1089–97.
- Yoshizumi T, Nagata N, Shimada H, Matsui M. An *Arabidopsis* cell cycle-dependent kinase-related gene, CDC2b, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *Plant Cell* 1999; 11: 1883–96
- Zamora Zaragoza J. Estudio de la expresión a nivel de proteína de la ciclina Zeama;CycD6;1 durante la germinación de maíz (*Zea mays*). Tesis de Licenciatura; 2012. Facultad de Química, UNAM. México.
- Zhou Y, Niu H, Brandizzi F, Fowke L, Wang H. Molecular control of nuclear and subnuclear targeting of the plant CDK inhibitor ICK1 and ICK1-mediated nuclear transport of CDKA. *Plant Molecular Biology* 2006; 62: 261–78.