



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación de los complejos ciclinas D-CDKs durante la
germinación del maíz

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Silvia Karina Godínez Palma

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge M. Vázquez Ramos, Facultad de Química-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

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

Dr. Roberto Coria Ortega, Instituto de fisiología Celular-UNAM

MÉXICO, D. F. mayo, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Jorga Manuel Vázquez Ramos.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dra. Imelda López Villaseñor Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Dr. Roberto Coria Ortega Instituto de Fisiología Celular- UNAM

Dr. Jorge Vázquez Ramos Facultad de Química-UNAM

Se reconoce:

La colaboración, 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 y del Dr. Elpidio García Ramírez, Técnico Académico del laboratorio 114.

El financiamiento para la realización de los experimentos por parte del PAPIIT (2125-12) y PAIP (6290-11). A la SMB (Sociedad Mexicana de Bioquímica) por la media beca como apoyo al Congreso de Bioquímica, Chiapas, 2010 y al Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) por el financiamiento para un congreso internacional y uno nacional (España 2011 e Xcaret 2013).

Durante la duración de mi estancia doctoral gocé de una Beca de doctorado Nacional otorgada por el CONACyT, con número de CVU 236065, por el periodo de agosto 2010 a julio 2014.

El jurado del examen de Doctorado estuvo constituido por:

Presidente Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Vocal Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Vocal Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Vocal Dra. Rocío Cruz Ortega

Secretario Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, por acogerme en ella, brindándome todo lo que puedo requerir para mi desarrollo profesional, intelectual, cultural y personal. A la Facultad de Química por ser mi hogar durante muchos años, por toda mi formación como estudiante y profesional

Al Dr. Jorge Vázquez, por la dirección de esta tesis, por ser un gran tutor y un ejemplo, por sus sabios consejos que hicieron mantenerme reflexionando todo el tiempo, por su confianza, su paciencia y sus charlas. Gracias por no solo ser mi tutor sino un verdadero amigo, al que le tengo cariño, respeto y admiración.

A mi Comité Tutor, a la Dra. Imelda López Villaseñor y Dr. Roberto Coria Ortega, por su valiosa crítica y comentarios acerca de esta tesis y el apoyo brindado durante todo el proceso de revisión.

A mi Jurado de tesis, al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, a la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, a la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, a la Dra. Rocío Cruz Ortega y a la Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez, por sus oportunos consejos y revisión de este trabajo.

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 Leticia García, por su paciencia, su gran trabajo, por el tiempo dedicado y sobre todo por ser una gran mujer y amiga.

A todo el personal del Conjunto E de la Facultad de Química, que hicieron mi estancia mucho más fácil.

Agradezco a las personas más importantes de mi vida y por las que yo daría todo, a mis padres, por llevarme con sabiduría, cuidado, amor, por ponerme las herramientas necesarias para que yo eligiera siempre el mejor camino. Porque el llegar no es lo más importante, sino el saber mantenerse, siempre de pie, fuerte pero con humildad. Mami, Papi, los amo con toda el alma y este esfuerzo es para ustedes, porque yo no sería quien soy sino estuvieran conmigo.

A mis hermanos, porque son los mejores compañeros de vida, por ser mis mejores amigos y darme las mejores alegrías de mi vida, por dejarme aprender de ustedes con sus esfuerzos junto con sus familias, dejándome la valiosa lección de que en esta vida todo es posible si uno lucha día con día, siempre juntos, los adoro, nunca lo olviden. A mis sobrinos: Andy, Cris, Angelita y Santy, porque ustedes me hacen la tía más feliz del mundo, por sus sonrisas y su amor.

A Francisco. Amor, gracias por enseñarme que la ciencia es maravillosa, gracias por nunca dejarme caer y dejarme apoyarme en tí, por darme la motivación en momentos críticos, por los oportunos consejos y por hacerme muy feliz, Te amo bicho.

A mi familia, por su amor incondicional, por mantenerse siempre unidos, por los consejos, por esas reuniones que siempre alimentan el alma y el corazón, gracias por su apoyo, por compartir su vida conmigo.

A mis grandes amigos del lab-114, a Jorge, Víctor, Fer, Sara y Min por hacer de este grupo el mejor, el que no solo aportó sabiduría, consejos, retos, sino también, buenos y gratos momentos; a los más pequeños, Fernanda, Brendy, Javier, Cass, Roberto, Rodrigo, Gris, Omar y Pablo, por la buena compañía. En especial a mi amigo incondicional, gracias Fernando.

A las brujas, Brenda, Pao y Liber, porque no sé que haría sin ustedes, por ser mis mejores amigas, por compartir sus vidas conmigo, las quiero mucho.

A mis amigos, a Kayum, Juan, las chochas, Ale, Eli, Heidy, Lupita, Fernanda, Rox, Alma y Edén a todos ellos por estar conmigo incondicionalmente.

A todas esas personas que mantienen mi vida llena de alegrías...

¡A TODOS, MUCHAS GRACIAS!

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ABSTRACT

RESUMEN

ABREVIATURAS

PALABRAS CLAVE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL ORIGEN DEL MAÍZ	1
1.2. ANATOMÍA DEL MAÍZ	6
1.3. EL MAÍZ Y LA GERMINACIÓN	9
1.4. EL CICLO CELULAR	11
1.5. PROTEÍNAS ESENCIALES PARA EL AVANCE CONTROLADO DEL CICLO CELULAR	14
1.5.1. CICLINAS (CYC)	15
1.5.2. CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDKs)	22
1.6. MECANISMOS GENERALES DEL CONTROL DEL CICLO CELULAR	25
1.6.1. REGULACIÓN POR SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE CICLINAS.	26
1.6.2. REGULACIÓN POR FOSFORILACIÓN Y DESFOSFORILACIÓN DE SITIOS ESPECÍFICOS	28
1.6.3. REGULACIÓN POR UNIÓN A INHIBIDORES	31
2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	33
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
5. METODOLOGÍA	37
5.1. PRODUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.	37
5.2. IMBIBICIÓN DE EJES DE EMBRIÓN DE MAÍZ.	37
5.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ.	38
5.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDOS.	38
5.5. WESTERN BLOT	39
5.6. ENSAYOS DE ESTABILIDAD	40

5.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.	40
5.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE CINASA.	40
5.9. INMUNOPRECIPITACIONES SECUENCIALES.	41
6.0. IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE LAS CDKS.	42
6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	43
6. RESULTADOS	44
6.1 VALIDACIÓN DE LOS ANTICUERPOS CONTRA CICLINAS D Y CDKS.	44
6.2. PRESENCIA Y ESTABILIDAD DE LAS CICLINAS D.	51
6.2.1 ACUMULACIÓN DE CICLINAS D Y CDKS DURANTE LA GERMINACIÓN EN EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ	51
6.2.2 ESTABILIDAD DE LAS CICLINAS D DURANTE LA GERMINACIÓN EN EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ	53
6.3 ASOCIACIÓN ENTRE LAS CICLINAS D Y CDKS	55
6.3.1 ASOCIACIÓN DE LAS CICLINAS D2;2, D4;2 Y D5;3 CON CDKA Y CDKB1;1.	55
6.4 ACTIVIDAD DIFERENCIAL DE CINASA DE LOS COMPLEJOS CICLINAS D- CDKA Y CICLINAS D-CDKB1;1 DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ.	57
6.5. ESTADOS DE FOSFORILACIÓN DE LAS CDKS UNIDAS A LAS CICLINAS D.	61
6.5.1. REGULACIÓN DE LOS COMPLEJOS CICLINAS D-CDKS POR FOSFORILACIÓN DE T160, T14 Y Y15	61
6.5.2. ESTADOS DE FOSFORILACIÓN DE LAS CDKS DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN.	67
7. DISCUSION DE RESULTADOS	69
7.1. CICLINAS D2;2, D4;2 Y D5;3 DURANTE LA GERMINACIÓN: PRESENCIA Y ESTABILIDAD.	69
7.2. LAS CICLINAS D SE UNEN A CDKA Y CDKB1;1	71
7.3. ACTIVIDAD DE CINASA ES DIFERENCIAL ENTRE LOS COMPLEJOS CICLINAS D-CDKS DURANTE LA GERMINACIÓN EN MAÍZ.	73
7.4. LAS CINASAS UNIDAS A LAS CICLINAS ESTÁN FOSFORILADAS EN LOS RESIDUOS DE REGULACIÓN T14/Y15 Y T160.	75
8. CONCLUSIONES	79
9. PERSPECTIVAS	82
10. REFERENCIAS	83
11. ANEXOS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadísticas de la producción, importación y exportación de cereales totales, maíz y arroz.

Tabla 2. Clasificación taxonómica del maíz.

Tabla 3. Nomenclatura usada en la clasificación del teocintle y el maíz.

Tabla 4. Familia de genes básicos de ciclo celular en levaduras, humanos y algunas especies de plantas.

Tabla 5. Características y funciones de las ciclinas de plantas.

Tabla 6. Características y funciones de las Cinasas Dependientes de Ciclinas en plantas.

Tabla 7. Diluciones de los anticuerpos anti ciclinas, anti-CDKs y anti p-T160/T14Y15.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia morfológica de la posible evolución de la mazorca de teocintle y el maíz.

Figura 2. Distribución de las diferentes razas de maíz en el continente americano.

Figura 3. Morfología de la semilla de maíz.

Figura 4. Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control

Figura 5. Modelo general de la regulación en la transición G1-S de ciclo celular en eucariontes.

Figura 6. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas.

Figura 7. Formación de complejos ciclinas-CDKs durante el ciclo celular de plantas.

Figura 8. Mecanismos de regulación de la actividad de CDK en mamíferos.

Figura 9. Alineamiento y porcentaje de identidad de los extremos carboxilos entre las 17 ciclinas D (CycD) de maíz, usados para la construcción de las proteínas recombinantes GST-ciclina.

Figura 10. Comparación de las secuencias de CDKs de maíz.

Figura 11. Validación de los anticuerpos producidos contra las ciclinas D y las CDKs.

Figura 12. Validación de los anticuerpos anti-CDKs en extracto proteico de maíz.

Figura 13. Especificidad de anticuerpos policlonales por la técnica de inmunoprecipitación.

Figura 14. Acumulación de las ciclinas D y CDKs durante la germinación.

Figura 15. Estabilidad de las ciclinas D.

Figura 16. Estabilidad de las ciclinas D durante la germinación.

Figura 17. Interacción de las ciclinas D con CDKs durante las 0, 6, 12, 18 y 24 h de imbibición de ejes embrionarios de maíz.

Figura 18. Método de inmunoprecipitación secuencial.

Figura 19. Actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKA o ciclina D-CDKB1;1 durante la germinación en maíz.

Figura 20. Desfosforilación de T14, Y15 y T160 de las CDKs unidas a ciclinas D.

Figura 21. Efecto de la desfosforilación de las CDKs unidas a las ciclinas D.

Figura 22. Estados de fosforilación de las CDKs unidas a las ciclinas D durante la germinación en el maíz.

Figura 23. Estados de fosforilación de las CDKs durante la germinación del maíz.

Figura 24. Fosforilación de la treonina 160 de las CDKs en tejidos.

Figura 25. Modelos propuestos de regulación de la actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación en el maíz.

ABSTRACT

The importance of cell proliferation in plant growth and development has been well documented. However the majority of cell cycle studies in plants have been supported by gene expression and much less knowledge has accumulated in terms of protein interactions and activation. In this regards, the interaction of two key proteins, cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) are fundamental for cell cycle regulation and advancement. Our aim has been to understand the role of D-type cyclins and type A and B CDKs in the cell cycle taking place during a developmental process such as maize seed germination. Results indicate that three maize D-type cyclins—D2;2, D4;2, and D5;3—(G1-S cyclins by definition) bind and activate two different types of CDK—A and B1;1—in a differential way during germination. Whereas CDKA–D type cyclin complexes are more active at early germination times than at later times, it was surprising to observe that CDKB1;1, a supposedly G2/M kinase, bound in a differential way to all D-type cyclins tested during germination. Binding to cyclin D2;2 was detectable at all germination times, forming a complex with kinase activity, whereas binding to D4;2 and D5;3 was more variable; in particular, D5;3 was only detected at late germination times. Results are discussed in terms of cell cycle advancement and its importance for seed germination.

RESUMEN

Las células vegetales han demostrado ser semejantes a las de mamíferos en cuanto a los mecanismos básicos del ciclo celular. Sin embargo, se han descrito algunas diferencias en la maquinaria de control del ciclo celular en las plantas, mostrando una variabilidad en las vías de regulación y en la cantidad de proteínas involucradas en este proceso, que refleja una especificidad de la estrategia en la vida vegetal. Al igual que en mamíferos, en plantas la asociación de una ciclina con una cinasa dependiente de ciclina (CDK), determina la progresión del ciclo celular, ya que las ciclinas modifican la estabilidad y la especificidad por el sustrato, aunque las células de las plantas presentan algunas versiones específicas de CDKs (CDKBs) y ciclinas sin homología con las humanas.

El objetivo de este trabajo está centrado en el estudio de la regulación de la actividad de cinasa de los complejos ciclinas-CDKs que regulan el ciclo celular de plantas, mediada por los niveles de la proteína ciclina, sus diferentes asociaciones con las CDKs y las fosforilaciones-desfosforilaciones de las cinasas dependientes de ciclina, sobre el proceso fisiológico de germinación. En este proceso, las células embrionarias estarán en condiciones de reiniciar la primera ronda de división celular, enfocándonos al estudio de las proteínas que determinan la entrada a la fase G1, como son las ciclinas D y su asociación y funcionalidad con las CDKs tipos A y B.

Nuestros resultados demuestran que hay asociaciones entre las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3, no solo con la prototípica CDKA, que regula la transición G1/S, sino también con la CDK tipo B, reportadas como reguladoras de G2/M. Además, se observó que la actividad de cinasa de estos complejos sobre la pRBR (proteína relacionada al Retinoblastoma) de maíz, es diferencial, la cual parece coincidir con el tipo y el tiempo de asociación (ciclinas D-CDKA y ciclinas D-CDKB1;1) y en algunos casos con el estado de fosforilación de la CDK; estos últimos resultados sugieren que los complejos ciclinas D-CDKs en maíz están siendo regulados positivamente por la fosforilación en la treonina homóloga a la 160 de la CDK de mamíferos (T161-CDKA y T191-CDKB1;1 en plantas) durante las primeras horas de germinación e interesantemente, los resultados de actividad de cinasa diferencial sugieren que la CDKB podría ser regulada principalmente por las fosforilaciones negativas (T14 y Y15) y que no por el residuo activador durante la germinación.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín-trifosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CAK	Cinasa activadora de CDK
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
Chx	Cicloheximida
CTD	Dominio carboxilo terminal
Cyc	Ciclina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etildiamino tetraacético
Fa	Fosfatasa alcalina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fig	Figura
G1	Interfase post-mitótica
G2	Interfase post-sintética
GST	Glutación S-transferasa
h	hora
IgG	Inmunoglobulinas
IP	Inmunoprecipitado
kDa	kilodalton
KRP	Proteína Relacionada a la Familia Kip/Cip
Loop-T	Loop de treonina
M	Fase de Mitosis
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular

pRBR	Proteína relacionada al Retinoblastoma
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa- transcripción reversa
S	Fase de síntesis
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacríamida con dodecilsulfato de sodio
T	Treonina
WB	Western Blot
Y	Tirosina
Zm	<i>Zea mays</i>
µg	microgramo

Palabras clave: *Ciclo celular, Ciclinas (Cyc), Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK),RBR, Fosforilaciones-Desfosforilaciones, maíz, germinación.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El origen del maíz

Cuentan los ancianos de las montañas que en tiempos lejanos llegaron a poblar estas tierras los cuatro colores del maíz en forma humana: el pinto, el blanco, el amarillo y el negro.

Estos cuatro hombres y mujeres de colores estuvieron ahí cuatro temporadas de lluvias, en las cuales iban de un lugar a otro haciéndose más y sembrando la vida, haciendo nacer comunidades, sembrando maíz en empinadas laderas y cuevas, trabajando para arrancarle lo necesario a la Madre Tierra y preservar la vida que trajeron...

(Martínez Ricardo 2008)

El maíz (*Zea mays*) es un cultivo de gran relevancia para los pueblos latinoamericanos, particularmente para México, considerado como el centro de origen y diversificación de este cereal. Desde las culturas prehispánicas, el maíz ha sido parte del alimento básico de la población mexicana y de la mayoría de los países de América Latina. Innumerables indicios históricos, genéticos y arqueológicos indican que este cultivo fue la base de la alimentación de una gran parte de la población de América precolombina, que abarca desde la actual Canadá hasta la Patagonia en el Sur. Se sabe, además, que en algunas culturas precolombinas, como la Maya, la Inca y la Azteca, el maíz era utilizado en muchas de las celebraciones rituales religiosas (Vargas, 2007; Perales y Hernández, 2005).

Investigaciones sobre el origen del maíz han proporcionado elementos para declarar que el teocintle mexicano es su ancestro. Los teocintles (granos de Dios, en Nahuatl), están representados por especies anuales, perennes diploides y por una especie tetraploide. Estas especies son plantas rústicas y silvestres que aún se encuentran en varias localidades de México y que en algunas partes se les considera como malas hierbas o maleza y en otras tantas como una fuente alterna de alimento para el ganado cuando escasea el forraje. Los teocintles son gramíneas, pero debido a la poca información sobre su utilidad agrícola y ganadera existen algunas especies en peligro de extinción (Matsuoka *et al.*, 2002; Holst *et al.*, 2007).

Según las últimas evidencias arqueológicas, el origen del maíz data de 8,700 años antes de nuestra era, originado en la región de Iguala en el estado de Guerrero, en la localidad de Tlaxmalac (Ranere *et al.*, 2009; Piperno *et al.*, 2009). La especie de teocintle más cercana al maíz actual es el *Zea mays ssp parviglumis*, que pertenece a la raza Balsas (es nombrado así porque crece en la cuenca del río Balsas) y dentro de esta raza las poblaciones que más han participado en el establecimiento del maíz fueron las ubicadas en los estados de Michoacán, Guerrero y Estado de México (Matsuoka *et al.*, 2002).

Aunque algunas especies de teocintle son distintas genética y taxonómicamente a las del maíz, y no parecen haber desempeñado ningún papel en el origen del mismo. La evidencia genética disponible confirma que una especie de teocintle, *Z. mays ssp. parviglumis*, es el antepasado directo del maíz al compartir una relación genética muy estrecha (Doebley, 1990; Matsuoka *et al.* 2002), el teocintle *Z. mays ssp. mexicana* es el contribuyente en la diversificación del maíz de la Mesa Central Mexicana (Matsuoka *et al.*, 2002) y *Z. mays ssp. parviglumis*, se establece en los valles del suroeste de México, donde crece comúnmente como una planta silvestre a lo largo de arroyos y laderas.

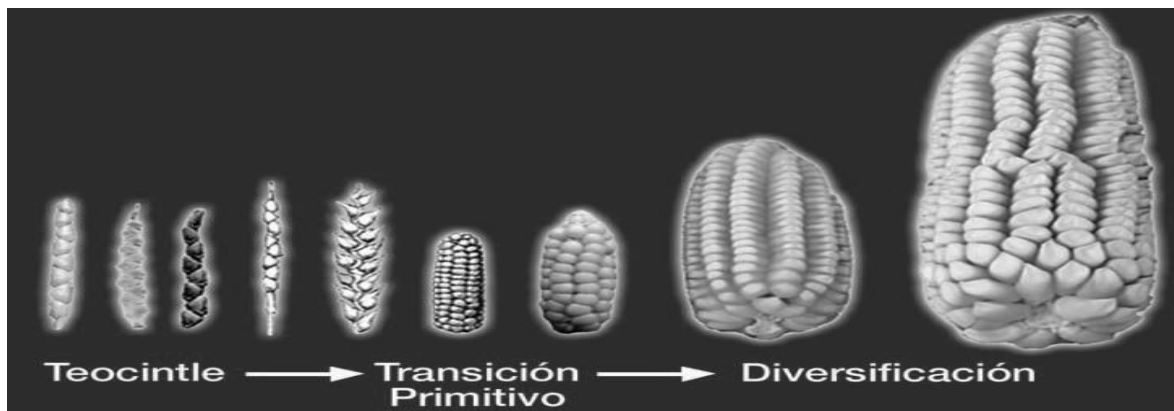


Figura 1. Secuencia morfológica de la posible evolución de la mazorca de teocintle y el maíz (Modificado de Serratos *et al.*, 1987).

La domesticación del maíz es un proceso que se inició cuando los pobladores de los bosques tropicales mesoamericanos empezaron a sembrar esta hierba silvestre (Piperno y Flanner, 2001). En un inicio recolectaban el grano como fuente de carbohidrato y luego seleccionaron los mejores ejemplares, para guardarlos, volverlos a sembrar y comenzar un nuevo ciclo de selección. A través de muchas generaciones de este trabajo se obtuvo el maíz.

El maíz es la planta cultivada con los más profundos procesos de domesticación que existe, pues es el resultado de un proceso que llevó entre 500 y 2 000 años, hasta que se obtuvo una planta con los rasgos propios de una especie cultivada [1]. Fueron las mujeres quienes, luego de un continuo proceso de experiencias acumuladas sobre el uso y transformación de las plantas útiles, de aprender dónde encontrarlas y de experimentar cómo guardarlas, iniciaron los procesos de domesticación del maíz (Doebley, 2004).

A partir de sus primeras domesticaciones, el maíz se esparció hacia el resto del continente (Figura 2), donde las comunidades continuaron cultivándolo creando diversidad, adaptándolo a sus propias necesidades ecológicas y culturales. Por eso, aunque la región mesoamericana es el centro de origen de este cultivo, hay varios centros de diversidad en todo el continente.

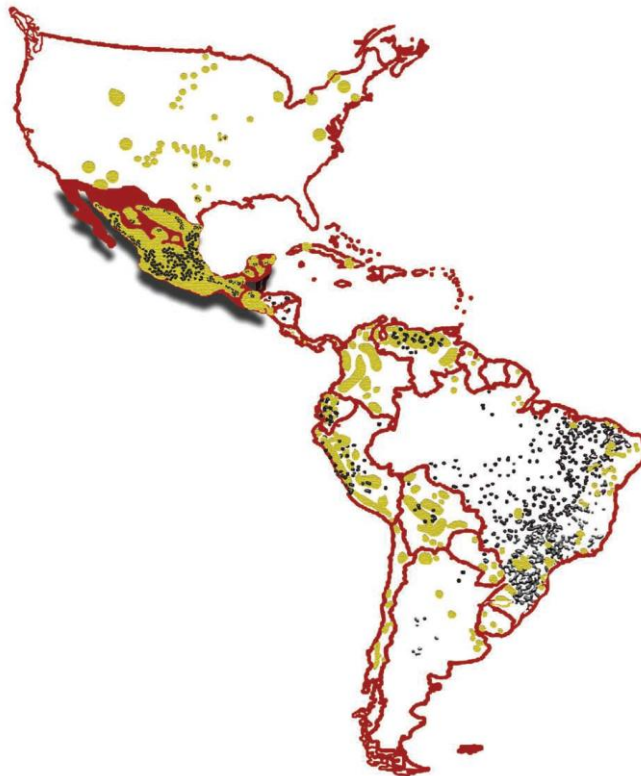


Figura 2. Distribución de las diferentes razas de maíz en el continente americano. Las áreas en color verde corresponden a las zonas en las que se ha colectado el germoplasma nativo. Los puntos negros son las zonas de producción de maíz en América Latina. (Modificado de Serratos *et al.*, 1987)

En la actualidad, el maíz sigue siendo el cereal que se cultiva preferentemente en el continente Americano, sin embargo, a pesar de ser México el país con mayor riqueza en diversidad de maíz, es Estados Unidos el país que más lo produce y exporta. En otras partes del mundo el arroz es la especie vegetal más cultivada, destacando China como el productor mayoritario de este cereal (Tabla 1).

Tabla 1. Estadísticas de la producción, importación y exportación de cereales totales, maíz y arroz (Datos obtenidos de la FAO, ONU, 2014-2015)

CEREALES TOTALES

PAIS	PRODUCCIÓN (Mt)	IMPORTACIÓN (Mt)	EXPORTACIÓN (Mt)
México	35.660	16.140	1.500
Estados Unidos de América	439.630	8.190	81.610
Brasil	95.950	8.820	24.330
China	493.570	27.230	1.170
Arabia Saudita	0.879	15.970	0

MAÍZ

PAIS	PRODUCCIÓN (Mt)	IMPORTACIÓN (Mt)	EXPORTACIÓN (Mt)
México	23.930	10.500	0.500
Estados Unidos de América	361.090	0.630	45.720
Brasil	78.750	0.900	21.500
China	215.720	7.480	0.150
Arabia Saudita	0.080	3.500	0

ARROZ

PAIS	PRODUCCIÓN (Mt)	IMPORTACIÓN (Mt)	EXPORTACIÓN (Mt)
México	0.150	0.640	0.002
Estados Unidos de América	7.060	0.670	3.400
Brasil	8.120	0.580	0.830
China	142.630	3.170	0.460
Arabia Saudita	0	1.470	0

Mt: Millones de toneladas

La semilla es un organismo vivo y como tal, está sujeto a procesos degenerativos graduales que pueden culminar con su muerte. Actualmente es difícil aplicar una clasificación de acuerdo al ciclo de vida, ya que, este parte de la necesidad de distinguir entre lotes de semillas con potenciales diferentes para producir plántulas normales, vigorosas y sanas, capaces de establecerse en el campo bajo una amplia gama de condiciones ambientales.

A pesar de que no hay una definición de vigor universalmente aceptada, existe un consenso general en el sentido de considerarlo como el factor más importante de la calidad fisiológica de la semilla (Perry, 1999).

A nivel bioquímico, el vigor involucra la capacidad que tiene un organismo en la biosíntesis de energía y compuestos metabólicos tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, todo ello asociado con la actividad celular, la integridad de las membranas celulares y el transporte o utilización de sustancias de reserva. A nivel de germinación incluye rapidez, uniformidad e intensidad, así como la tolerancia de las plántulas a condiciones ambientales desfavorables.

Por ello, la clasificación del maíz puede estar representada por la diversidad fenotípica que incluye el color del grano (rojo, blanco, morado, azul) ó por sus diferentes usos. Aunque la clasificación más común es en base al tipo de semilla (Cuevas, 2014):

- Reventador: Consiste en un núcleo de almidón suave y un endospermo duro. La humedad que queda atrapada dentro se expande para calentarse reventando la costra dura. Cultivado usualmente en Jalisco.
- Duro: Es muy parecido al tipo de maíz que se mencionó anteriormente, pero es de un grano mucho más grande, es probablemente una derivación, generación y/o evolución del tipo de maíz reventador. Este tipo de cereal es propicio para zonas frías y cuando las condiciones de almacenamiento y germinación son pobres. Cultivado usualmente en Zacatecas.
- Blando: En México se encuentra en estados como Sonora, Sinaloa y Nayarit. La selección de éste fue derivada de la cultura culinaria de la región, ya que es un maíz fácil de moler.
- Dulce: La producción comercial de este maíz es poco apreciable (menos de 1%) aunque las mazorcas logran excelentes precios como vegetales procesados para las economías industrializadas, lo que se conoce como maíz enlatado. Se cultiva en Jalisco y el Bajío.

1.2. Anatomía del maíz

La planta de maíz, a diferencia de otros cereales (sorgo, algunos tipos de *Poa*, etc), tiene sus estructuras femeninas y masculinas separadas, esta anatomía favorece la polinización cruzada, pero también es capaz de auto-polinizarse. Morfológicamente el maíz presenta un tallo central compuesto por nudos y entrenudos. De cada nudo surge una hoja que envuelve parcialmente el entrenudo y que continúa después de forma libre.

En los nudos de la parte media del tallo se encuentran las inflorescencias femeninas, y en la parte final o ápice, la inflorescencia masculina o espiga que sólo produce polen. La planta está compuesta mayoritariamente por tejido foliar; las hojas forman una vaina larga arrollada íntimamente al tallo, del cual nacen 2 ó 3 espigas o mazorcas envueltas en espatas. Cuando el polen fecunda las inflorescencias femeninas se originan las mazorcas. En cada mazorca existen filas de granos, cuyo número puede variar de 8 a 30 y su color desde amarillo claro hasta verde pardo (Vincent, 2012).

El maíz es una planta fanerógama del subtipo de las angiospermas monocotiledóneas, pertenece a la familia de las poáceas (gramíneas), es un integrante de la tribu Maydae, específicamente del género *Zea* y cuya especie *Zea mays*, está clasificada y dividida de la siguiente forma:

Tabla 2. Clasificación taxonómica del maíz

Clasificación taxonómica del maíz (CONABIO, 2008)	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i> L.
Especie	<i>Z. mays</i> L.

La clasificación del género *Zea* ha cambiado con el tiempo. En un inicio los primeros ordenamientos emplearon aspectos morfológicos resultantes de la selección humana durante el proceso de domesticación (Mangelsdorf *et al.*, 1964; Wilkes, 1967). Este ordenamiento permitió la diferenciación de dos secciones: la sección *Euchlaena* y la clasificación incluía todos los teocintles en este grupo; y por la otra parte la sección *Zea*, la cual sólo incluía al maíz. Posteriormente Doebley e Iltis (1980), elaboraron una clasificación para *Zea* con base en estructuras morfológicas neutras, aunque un elemento clave fue la descripción de las espiguillas en las dos especies, considerada como una estructura en la que el humano no interviene en su modificación. El resultado fue una nueva división que produjo dos secciones: *Luxuriantes* y *Zea* (Doebley e Iltis, 1980; Doebley, 2004; Tabla 3).

El maíz y sus parientes silvestres (teocintles) se clasifican dentro del género *Zea* y dentro de la familia de las Poáceae, la cual se compone de cerca de 700 géneros y 11,000 especies, incluyendo importantes cultivos como trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar.

Tabla 3. Nomenclatura usada en la clasificación del teocintle y el maíz

Wilkes (1967)	Iltis & Doebley (1980)	Doebley (1990)	Doebley (2003)
Sección EUCHLAENA	Sección ZEA	Sección ZEA	Sección ZEA
<i>Euchlaena mexicana</i>	<i>Zea mays</i> L.	<i>Zea mays</i> L.	<i>Zea mays</i> L.
Sin. <i>Zea Mexicana</i>	spp. <i>mexicana</i>	ssp. <i>mexicana</i>	ssp. <i>mexicana</i>
Raza Chalco	Raza Chalco	Raza Chalco	
Raza Mesa central	Raza Mesa central	Raza Mesa Central	
Raza Nobógame	Raza Nobógame	Raza Nobógame	Raza Nobógame
Raza Balsas	ssp. <i>parviglumis</i>	Raza Balsas	ssp. <i>parviglumis</i>
Raza Huehuetenango	var. <i>huehuetenangensis</i>	ssp. <i>huehuetenangensis</i>	ssp. <i>huehuetenangensis</i>
	ssp. <i>mays</i>		ssp. <i>mays</i>
	Sección LUXURIANTES	Sección LUXURIANTES	Sección LUXURIANTES
Raza Guatemala	<i>Zea luxurians</i>	<i>Zea luxurians</i>	<i>Zea luxurians</i>
<i>Zea perennis</i>	<i>Zea perennis</i>	<i>Zea perennis</i>	<i>Zea perennis</i>
	<i>Zea diploperennis</i>	<i>Zea diploperennis</i>	<i>Zea diploperennis</i>
			<i>Zea nicaraguensis</i>

Aunque el maíz se considera inferior a otros cereales (ejemplo: cebada, avena, mijo, etc) en cuanto a sus propiedades nutrimentales, su grano es una excelente fuente de carbohidratos, debido a su alto contenido de almidones (80%), además, el 9% lo constituyen proteínas y pequeñas cantidades de aceites, minerales y elementos traza. La semilla de maíz, como muchas otras, posee un contenido bajo de agua (aproximadamente el 10%), lo que implica que posee un metabolismo muy reducido o prácticamente nulo (Bewley, 1994).

Una semilla de maíz está constituida por tres estructuras básicas: embrión, endospermo y cubierta seminal o pericarpio. El tejido que formará la planta adulta es el eje embrionario que forma parte del embrión. Este se compone por: la radícula (raíz rudimentaria), la caliptra (tejido que recubre el meristemo radicular), la coleoriza (tejido que cubre la caliptra, raíz primaria), la plúmula (tejido que se convertirá en el tallo y las hojas de las plantas) y finalmente, el coleoptilo, que en el eje embrionario es el sitio al que se une el cotiledón (Figura 3; Vincent, 2012).

El escutelo ó cotiledón es la capa que mantiene en contacto al embrión con el endospermo, segrega enzimas que solubilizan las sustancias de reserva, las absorbe y las transporta al embrión. El endospermo es la capa que rodea al embrión y funciona como la reserva energética de la semilla debido a su alto contenido de carbohidratos. Finalmente se encuentra la cubierta seminal, que se considera una de las estructuras más importantes de la semilla, ya que de su composición y permeabilidad depende la interacción de la semilla con el medio ambiente y la conclusión de la germinación con éxito (Bidwell, 1979).

Las semillas son la unidad de reproducción de algunas plantas, cuya función es multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen. Para que la semilla cumpla con su objetivo, es necesario que el embrión se transforme en una plántula autótrofa, mediante mecanismos metabólicos y morfogénéticos, conocidos como proceso de germinación.

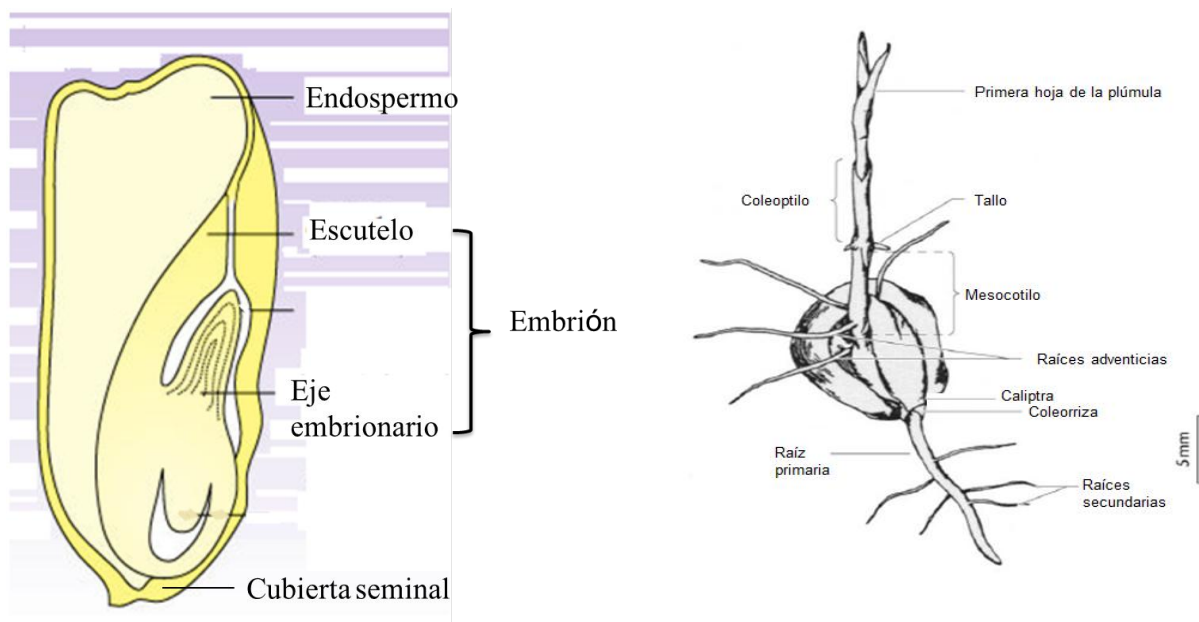


Figura 3. Morfología de la semilla de maíz. Panel derecho, estructuras principales de la semilla de maíz. Panel izquierdo, plántula de maíz joven que muestra las primeras etapas en el desarrollo. (Modificada de Freeling y Walbot, 1994).

1.3. *El maíz y la germinación*

La germinación según los agrónomos, inicia con la absorción de agua a la semilla, proceso llamado imbibición, seguida de la elongación de las células de los tejidos de las semillas y culmina con la protrusión de la radícula, 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 que se hace visible cuando éste atraviesa la cubierta de la semilla, siendo la germinación un proceso preparativo para el posterior desarrollo y proliferación de las células en los tejidos que más adelante formarán la planta (Bewley y Black 1994).

Este proceso está influenciado tanto por factores internos como externos. Dentro de los factores internos están la viabilidad del embrión, la cantidad y calidad del tejido de reserva y en algunas plantas los diferentes tipos de dormancia; algunos de los factores externos son: el grosor de la testa, la disponibilidad de agua, la temperatura y tipos de luz.

La germinación presenta tres fases: la fase inicial (I) se caracteriza por la entrada rápida de agua de manera física, produciendo rupturas en las membranas internas por el cambio estructural de los lípidos en las membranas y la salida de solutos al medio; pero al mismo tiempo se empiezan a reestructurar y reparar tanto las membranas como otros componentes, ADN, mitocondrias, ribosomas y se comienzan a sintetizar proteínas, a partir de ARNm preexistentes. En la fase II se observa una entrada mínima de agua a la semilla, durante esta fase disminuyen los procesos de reorganización celular y se incrementa el número de mitocondrias y las nuevas proteínas sintetizadas derivan de nuevos ARNm. La fase III coincide con una nueva entrada de agua relacionada con el aumento del tamaño que sufren las células de la radícula, en esta fase comienzan a movilizarse las reservas de las semillas, y en el caso particular de maíz, los carbohidratos en forma de almidón (Black *et al.*, 2006). El comienzo de la duplicación de ADN (fase S del ciclo celular) se ubica entre las fases II y III (Bewley, 1994) y finalmente se observa la protrusión radicular.

El estudio de la biología y fisiología de las semillas es de vital importancia para el hombre, ya que la mayoría de las especies cultivadas como los cereales son propagadas a partir de semillas sexuales (Russo *et al.*, 2010). Por su importancia fisiológica la germinación es un sistema interesante para el estudio del ciclo celular en plantas, debido a que la entrada de agua reactiva a las células meristemáticas del eje embrionario que se encuentran en su mayoría en la fase G1 respecto al contenido de ADN (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Desde la perspectiva molecular, la germinación puede definirse como un “proceso que engloba desde el comienzo de la imbibición de la semilla, hasta el término de la primera ronda de divisiones celulares, siendo la división celular el resultado de la ejecución de un proceso molecular altamente controlado llamado ciclo celular” (Cruz-García *et al.*, 1998).

1.4. El Ciclo celular

El ciclo celular es la base de la proliferación celular. Su función no es solamente originar dos nuevas células mediante la división de una célula progenitora, sino asegurar que el proceso se realice en forma regulada para la correcta formación de sistemas celulares complejos.

Antes de que pueda llevarse a cabo el proceso de división, para formar dos nuevas células, durante la mitosis, la célula debe duplicar su ADN cromosómico, incrementar la cantidad de histonas y otras proteínas asociadas al ADN; multiplicar el número de organelos a repartir entre las dos células hijas y ensamblar la maquinaria proteica requerida para que se puedan separar los cromosomas durante la mitosis y culminar con la citocinesis. Estos procesos preparatorios ocurren durante la interfase, la que se divide en tres diferentes etapas metabólicas, las fases G1, S y G2 (Alberts *et al.*, 2002).

La fase G1 es un período de intensa actividad bioquímica. La célula incrementa notablemente su actividad metabólica, sus organelos comienzan a duplicarse, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas; en consecuencia, la célula aumenta en tamaño. La replicación del ADN comienza cuando la célula adquiere el tamaño, la energía y todas las proteínas necesarias. La duplicación del ADN ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, momentos después de que las histonas y demás proteínas asociadas a la replicación del ADN fueron sintetizadas (ADN polimerasas, primasas, ligasas, topoisomerasas y muchas otras) (Alberts *et al.*, 2002).

Durante la fase G2 ocurre la preparación para la mitosis; todos los organelos y la maquinaria necesaria para la división de las dos células hijas idénticas se terminan de adquirir en esta etapa. La cromatina, recién duplicada, comienza a condensarse; además, la célula realiza una revisión completa del ADN duplicado anteriormente.

Durante la mitosis, la membrana nuclear se desensambla, el citoesqueleto se reorganiza y los cromosomas se mueven a los polos opuestos. La segregación cromosómica es seguida usualmente por la división celular (citocinesis). La mitosis (Fase M) está dividida en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, las cuales tienen como función promover y regular la repartición equitativa del material genético (Alberts *et al.*, 2002).

La ruptura de la envoltura nuclear marca el inicio de la profase. Cada cromosoma está formado por dos cromátidas conectadas por el centrómero, durante la metafase los cromosomas se mueven mediante el huso mitótico y finalmente se colocan en el plano ecuatorial de la célula. En la anafase, las cromátidas hermanas se separan y son conducidas a los polos opuestos en la célula, proceso mediado por el acortamiento del huso mitótico y la acción de múltiples proteínas. Al iniciarse la telofase, los cromosomas alcanzan los polos opuestos y el huso comienza a dispersarse en dímeros de tubulina; finalmente se re-ensambla la envoltura nuclear alrededor de los conjuntos de cromosomas y las células pueden volver a entrar a una fase G1 (Alberts *et al.*, 2002).

Durante la progresión del ciclo celular existen 3 puntos principales de control: 1) en la transición G1/S, la célula registra que su entorno sea favorable para comenzar a duplicar el ADN; si las condiciones no son óptimas, las células en G1 pueden detener la progresión del ciclo y entrar en un estado latente, llamado G0, donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar o en ocasiones prosiguen un proceso de diferenciación; 2) en la transición G2/M la célula detecta que la síntesis de ADN ha concluido correctamente y que no se han acumulado daños en la molécula recién sintetizada, y 3) en la transición metafase-anafase, dentro de la fase M, la célula verifica que todos los cromosomas estén unidos correctamente a los microtúbulos del huso mitótico y estén alineados en el plano de metafase antes de la separación de las cromátidas hermanas en la anafase. Durante la mitosis la célula se divide y, posteriormente, cada una de las células hijas comienza un nuevo ciclo (Figura 4; Klug y Cummings, 1999).

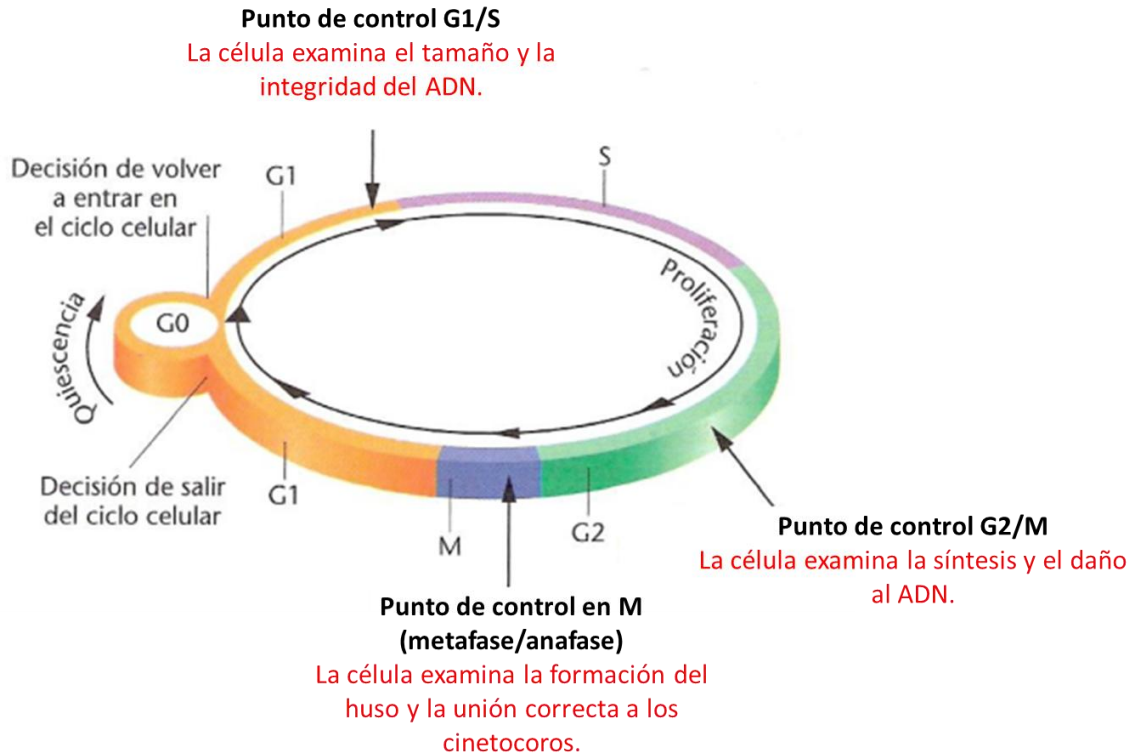


Figura 4. Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control (Modificada de Klug y Cummings, 1999).

El ciclo celular es determinante para el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares, incluyendo las plantas (Dewitte *et al.*, 2003). Este proceso altamente ordenado determina la separación entre la culminación de la germinación y el comienzo de la formación de una plántula y su posterior desarrollo, dirigido a la creación de todas aquellas estructuras requeridas para la generación de un organismo completo, por lo que la proliferación debe coordinarse de manera exacta y continua con la diferenciación celular.

Ya que nuestro grupo de trabajo está enfocado en estudiar el ciclo celular durante la germinación de maíz, hemos adoptado una definición de la germinación distinta a las anteriores basada en procesos bioquímicos, moleculares y celulares. Por lo tanto, el término de la germinación es precisamente la culminación de la primera ronda de divisiones celulares exitosas.

1.5. Proteínas esenciales para el avance controlado del ciclo celular

La maquinaria básica encargada del progreso y regulación del ciclo celular está constituida, en todos los organismos eucariotes, por Cinasas Dependientes de Ciclina (CDKs, por sus siglas en inglés) que, junto con diferentes ciclinas (Cyc), forman complejos CDK-Cyc encargados de fosforilar una gran variedad de sustratos en los puntos de control G1/S, G2/M y Metafase-Anafase (Pines, 1995; Huntley, 1999). Esto resulta en la progresión ordenada de la replicación del ADN y la mitosis. La subunidad catalítica CDK es la encargada del reconocimiento del motivo blanco de fosforilación presente en la proteína sustrato, mientras que la subunidad reguladora Cyc tiene, entre otras, la función de discriminar a distintas proteínas como sustratos (Jackman *et al.*, 2003; Inzé *et al.*, 2006).

A pesar de que los mecanismos básicos para la regulación del ciclo celular están conservados en eucariontes, las células vegetales tienen algunas diferencias en la maquinaria los mecanismos de control y en la cantidad de proteínas involucradas, que son relevantes de estudiar.

Los estudios sobre ciclo celular en plantas se han enfocado fundamentalmente en especies dicotiledóneas, principalmente *Arabidopsis thaliana*. Se conoce muy poco sobre la regulación del ciclo celular en monocotiledóneas, aunque el trabajo en arroz y maíz se ha enriquecido desde la publicación de la secuencia de sus genomas. Lo anterior indica que, en comparación con algunas especies de levadura y con el humano, para las células vegetales parece ser muy importante mantener y acumular una gran cantidad de genes y proteínas que aseguren una división celular exitosa (Wang *et al.*, 2004). La tabla 4 muestra las diferencias cualitativas y cuantitativas entre organismos modelo (levaduras, humano y plantas) de los genes que controlan el ciclo celular y que sugieren características únicas en el ciclo celular de plantas.

Por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis* se han identificado más de 90 genes que regulan la progresión del ciclo celular, los cuales pertenecen a siete familias génicas: CDK, Cyc, CKS, KRP, E2F/DP, RB, PCNA y Wee, siendo las familias de CDKs y ciclinas

las que contienen un mayor número de genes (Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Torres-Acosta *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2005).

Tabla 4. Familia de genes básicos de ciclo celular en levaduras, humanos y algunas especies de plantas.

Genes	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arroz	Maíz	Referencias
Cdc2/Cdka (PSTAIRE)	1 (cdc2)	1 (cdc28)	2 (cdk1 y cdk2)	1	3	3	Mironov et al., 1999; Segers et al., 1998.
Cdkb	NH	NH	NH	4	2	3	Magyar et al., 1997.
CycA	NH	2	2	10	7	11	Renauding et al., 1996.
CycB	1	4	3	11	7	10	Day et al., 1998.
CycD	2	3	3	10	14	17	Riou-Khamlichi et al., 1999; Renauding et al., 1996; Soni et al., 1995; De Veylder et al., 1999.
RB	NH*	NH*	3	1	2	4	Grafí et al., 1996; Huntley et al., 1998; Nakagami et al., 1999; Gutiérrez et al., 1998.
E2F	MBF	SBF/MBF	8	3	5	5	Gutiérrez et al., 1998; Wang et al., 1998.
DP			3	2	3	4	Inzé et al., 1999.
ICKs/KRPs	1	3	10	7	6	8	Wang et al., 1997; Mironov et al., 1999.
PCNA	1	1	1	2	1	2	Burssens et al., 1998

CDK: cinasas dependientes de ciclina, **Cyc,** ciclinas, **Rb:** proteína del Retinoblastoma, **E2F/DP:** factor transcripcional, **ICKs/KRPs:** proteínas relacionadas a las familias Kip/Cip (proteínas inhibidoras), **PCNA:** Antígeno Nuclear de Proliferación Celular. NH, no hay, * podría considerarse Sic 1.

1.5.1. Ciclinas (Cyc)

Las ciclinas, como su nombre lo indica, son proteínas que fluctúan a lo largo del ciclo celular y regulan la activación y direccionamiento de las CDKs hacia sus sustratos específicos (Jackman *et al.*, 2003). La actividad cinasa de las CDKs depende de la unión a las ciclinas y al igual que en los animales, las plantas tienen varios tipos de ciclinas, por lo que se forman distintos complejos involucrados en las transiciones de las diferentes fases del ciclo celular (Stals *et al.*, 2001; Oakenfull *et al.*, 2002).

Por su cercanía filogenética con genes ortólogos de otras especies, las ciclinas de *Arabidopsis* se han clasificado en los tipos A, B, C, D, H, L, T, P, SDS y J18 (Wang *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2005). Así mismo, en el genoma de arroz se han identificado 90 genes pertenecientes a dichas familias génicas, que podrían estar involucrados en el control de su ciclo celular (La *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007).

Ciclinas D

Las ciclinas D de plantas están conservadas en sus secuencias proteicas (Oakenfull *et al.*, 2002; Anexo 1), su expresión está asociada a la proliferación celular y responden fuertemente a señales mitogénicas (sacarosa, hormonas, diferentes tipos de estreses, condiciones de luz, etc) (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Menges *et al.*, 2002; Oakenfull *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2005). Al igual que otros eucariontes las ciclinas D de plantas muestra una misma organización estructural típica, con una región conservada llamada centro de ciclina, la cual consiste en dos dominios denominados amino (N) y carboxilo (C) terminal (Wang *et al.*, 2004). Otra característica de estas ciclinas es la presencia del motivo LxCxE (x es cualquier aminoácido) de unión a la proteína RB, el cual se encuentra cercano al extremo N terminal y está presente en casi todas las secuencias de las ciclinas tipo D, este motivo es determinante para la transición G1/S.

Las ciclinas D y su función en la transición G1/S

La transición G1/S es uno de los principales puntos de control en el ciclo celular. Se ha sugerido que si la célula supera dicho punto, podría comprometerse a iniciar la replicación del ADN y es probable que se supere el punto de control de entrada a la mitosis una vez que se ha completado correctamente la fase S. Estos puntos de control en G1/S, G2/M y de metafase-anafase dependen de la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas y de su correspondiente ciclina.

Las ciclinas tipo D tienen una función especial en el control de la reentrada al ciclo celular al responder a señales mitogénicas y de crecimiento externas y acoplarlas a las señales de proliferación (Inzé *et al.*, 2006). En animales, las ciclinas tipo D forman complejos con actividad de cinasa con CDK4 y CDK6, los cuales fosforilan a la proteína RB e inactivan su función de supresor sobre el factor de transcripción E2F, cuya acción es esencial para

el compromiso de la progresión de G1 hacia S (Harbour *et al.*, 2000). Las señales mitogénicas regulan, a nivel transcripcional y traduccional, a los complejos CDK-CycD y controlan la estabilidad de las proteínas y el ensamblaje e importe de los complejos hacia el núcleo (Sherr *et al.*, 2004). Subsecuentemente, los complejos activos de CDK-CycD promueven la progresión de la fase G1 a S para iniciar la proliferación celular.

En *Arabidopsis*, las ciclinas del tipo D como CycD2;1 y CyCD3;1 interactúan con una CDK tipo A, CDKA1, *in vivo* (Boniotti *et al.*, 2001). Además, el complejo CDKA/CycD3 de tabaco (*Nicotiana tabacum*), purificado a partir de células de insectos, es capaz de fosforilar *in vitro* a su proteína prototípica blanco, la proteína RBR (Relacionada a la proteína del Retinoblastoma en plantas) (Nakagami *et al.*, 1999). Estos resultados inicialmente mostraron la conservación que existe en los mecanismos de regulación de la transición G1/S entre los animales y las plantas, dado que la proteína RB en animales es un factor de control de la progresión del ciclo celular, el cual es fosforilado e inhibido por complejos de ciclinas tipo D asociadas a CDKs para permitir la progresión hacia la fase S.

Las ciclinas D de plantas, aunque muestran una baja similitud en su secuencia proteica cuando se comparan con las de animales, participan y controlan de manera similar a la proteína RBR y los factores de transcripción E2F/DP (Grafi *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996; Ramírez-Parra *et al.*, 1999).

En células arrestadas en G1, el factor E2F/DP está unido a la proteína RBR, la cual recluta desacetilasas de histonas las que, al promover la compactación de la cromatina, impiden la expresión génica. Cuando RBR es fosforilada por los complejos CycD-CDK se libera el complejo E2F/DP, que funciona como activador transcripcional permitiendo la expresión de genes requeridos para la transición de la fase G1 a S, como son, PCNA, ciclinas tipo A y B, MCM, proteínas inhibidoras, etc (Dyson 1998; Sekine *et al.*, 2007; Uemukai *et al.*, 2005; Figura 5).

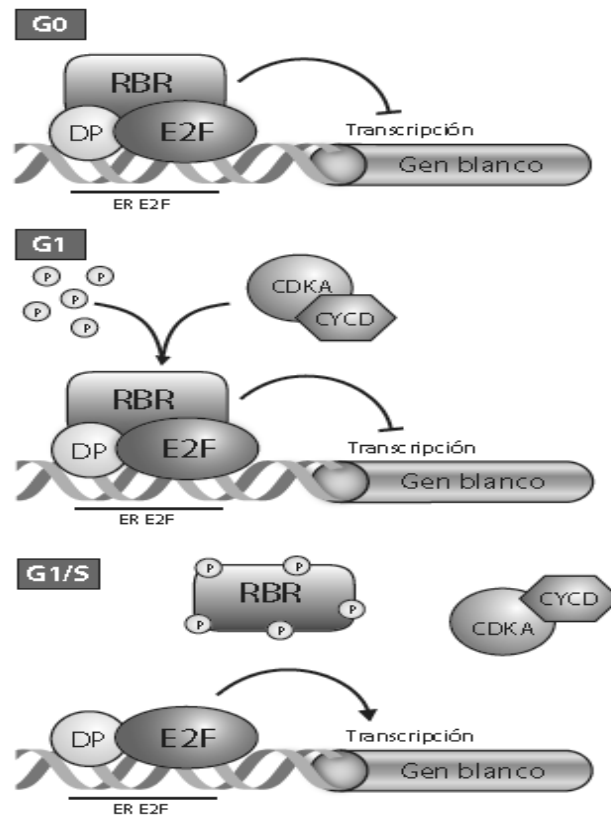


Figura 5. Modelo general de la regulación en la transición G1-S de ciclo celular en eucariontes. (Modificado de Oakenfull *et al.*, 2002)

Las secuencias de aminoácidos de las ciclinas tipo D de plantas, al igual que las de otros eucariontes, muestran una misma organización estructural típica (Figura 6), con una región conservada de 250 aminoácidos (centro de ciclina), compuesta de dos dominios amino (N) terminal y carboxilo (C) terminal (Nugent *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2005; La *et al.*, 2006). El dominio N tiene una longitud aproximada de 130 aminoácidos y dentro de esta región se encuentra una secuencia conservada de ocho aminoácidos llamada caja de ciclina, que sirve como sitio de unión a CDK. El dominio C-terminal está presente en la mayoría de las ciclinas, lo que sugiere que provee una función específica o adicional, pero quizá no crítica. Otra característica de las ciclinas tipo D es la presencia del motivo LxCxE, que media la unión a la proteína RBR, y que se encuentra cercano al extremo N, y está presente en virtualmente todas las secuencias de ciclinas tipo D. adicionalmente, algunas ciclinas tipo D de plantas también poseen cajas PEST que regula su degradación mediante el mecanismo de ubiquitinación-proteasoma (Capron *et al.*, 2003).

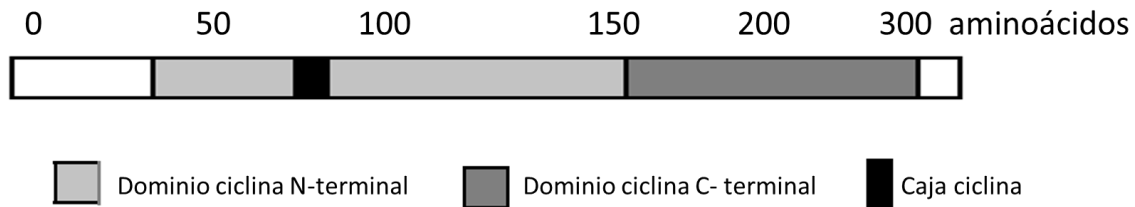


Figura 6. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas. Dominio ciclina-N-terminal, dominio ciclina-C-terminal, caja ciclina, motivo LxCxE. Escala en número de aminoácidos. (Modificado de Bravo-Alberto y Buendía-Monreal, 2008).

Mientras que en el genoma humano sólo existen 3 genes que codifican ciclinas tipo D, esta familia génica se ha diversificado en plantas. Las ciclinas tipo D de plantas se han clasificado en 7 grupos (D1-D7) de acuerdo a análisis filogenéticos realizados con miembros de esta familia génica presentes en varias especies de plantas. El genoma de *Arabidopsis* contiene 10 genes y el de arroz contiene 14 genes que codifican ciclinas tipo D, teniendo al menos un gen dentro de cada uno de los 7 grupos (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006).

Ciclinas A y B

Los genes de las ciclinas A y B han sido aisladas de algunas especies vegetales usando estrategias como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se ha encontrado que estas dos clases de ciclinas tienen su caja de ciclina conservada y los niveles de las ciclinas de tipo A, como las ciclinas de tipo B, están estrechamente controlada por proteólisis dependiente del ciclo celular (Vodermaier, 2004).

Las ciclinas A se dividen en tres subclases diferentes: CycA1, CycA2, y CycA3 (Imai *et al.*, 2006). *Arabidopsis* codifica para 10 genes de ciclinas de tipo A y arroz codifica 7 genes. El análisis de expresión en varios modelos indicó que las ciclinas de tipo A se expresan antes de ciclinas de tipo B en el ciclo celular en las plantas, comenzando su aparición en fase S (Vandepoele *et al.*, 2002; Magnard *et al.*, 2001).

En las células BY2 de tabaco, la expresión de dos Ciclinas tipo A3 son reguladas en la transición G1 / S, mientras que un gen que pertenece a las tipo A1 aparecen durante la fase S. Estos datos sugirieron que los miembros de las diferentes subclases tener diferentes funciones biológicas (Yoshizumi *et al.*, 2006).

La inducción localizada de la CycA3; 2 estimula la división celular en los primordios y órganos jóvenes en tabaco, lo que sugiere que en ciertas circunstancias la actividad de las CycAs puede ser limitante de la velocidad para la división celular.

Un estudio detallado de la cinética de expresión de las ciclinas de tipo A2 en cultivos de células en suspensión parcialmente sincronizados revelaron que los transcritos de esta ciclina se aumentan durante G2 y disminuyen en mitosis, sin embargo la actividad de cinasa asociada a esta ciclina tuvo dos fases, una aumento a la mitad de la fase S y otro en G2/M. Aunque, curiosamente, CycA2 es capaz de interactuar con la proteína del retinoblastoma de maíz en experimentos de dos híbridos actualmente el papel del complejo CycA-CDK en la transición G1 / S no se puede excluir, pero no se sabe con ciencia cierta la función biológica de esta actividad (Wang *et al.*, 2004).

La localización subcelular de CycAS durante el ciclo celular está empezando a elucidarse, durante la fase S la GFP-CycA3;1 de *Arabidopsis* se localizó en el núcleo y nucléolo, mientras que la de maíz se localiza en el núcleo hasta la profase y se une a el huso mitótica (Yu *et al.*, 2003)

Además de sus diferencias en secuencia, las ciclinas de tipo B se distinguen de ciclinas de tipo A por su patrón de expresión, estas se expresan más tarde en el ciclo celular.

Las ciclinas de tipo B identificadas se dividen en dos subclases, CycB1 y CycB2 (105), pero recientemente la presencia de un gen de ciclina de tipo B en el *Arabidopsis* podría pertenecer a una tercera subclase la CycB3 (Doerner *et al.*, 1996).

En cultivos celulares sincronizados de plantas, los transcritos de las ciclinas B están ausentes en G1 del ciclo celular, es hasta la fase S donde se comienzan a acumular y se alcanza un máximo de expresión en G2/M y declina de manera progresiva durante la

mitosis. Mutaciones de las CycB de tabaco provoca la detención del ciclo celular en G2, por lo que se le ha vinculado una importante participación en las últimas fases del ciclo celular, considerándolas como ciclinas de G2 y son las que participan directamente en la regulación del proceso mitótico (Hemerly *et al.*, 1992).

Como se mencionó anteriormente, los niveles de las ciclinas de tipo B se regulan no sólo por control transcripcional, sino también por proteólisis; la destrucción CycB por el Complejo Promotor de la Anafase (APC), marca la transición de la metafase a la anafase en mamíferos, y posiblemente este mecanismo este conservado en plantas (Vodermaier *et al.*, 2004).

La función conjunta de estos dos tipos de ciclinas, determinan la progresión del ciclo celular en la fase G2, la transición G2/M y en mitosis, permitiéndole a la célula la salida exitosa del ciclo celular y a su vez la entrada correcta a la fase G1, esta regulación esta determinada por la asociación con CDKs que participan en estas fases mediante la fosforilación de sustratos blanco que pueden incluir proteínas de huso mitótico, proteínas de unión a cromosomas, otros complejos de ciclinas-cinasas, etc (Weingartner *et al.*, 2004).

Aunque aún no se ha determinado la función de todas las ciclinas presentes en plantas, algunas de ellas tienen funciones independientes del ciclo celular, la Tabla 5 muestra algunas de las características y funciones de las ciclinas presentes en plantas.

Tabla 5. Características y funciones de las ciclinas de plantas

Ciclina	Sub- clases	Función	Referencia
A	A1, A2 y A3	Regulación del ciclo celular: G1/S, S y G2/M	Chaubet 2000; Renaudin et al., 1996.
B	B1 y B2	Regulación del ciclo celular: G2/M, M	Renaudin et al., 1996; Genschik et al., 1998; Criqui et al., 2000
D	D1,D2, D3, D4, D5, D6 y D7	Regulación del ciclo celular: G1/S	Dahl et al., 1995; De Veylder et al.,1999; Huntley and Murray 1999; Oakenfull et al., 2002
F		Incierta, solo se encuentra en monocotiledóneas	La et al., 2006
H	H1	Regulación del ciclo celular: subunidad reguladora de CAK	Vandepoele et al., 2002; Yamaguchi et al., 2000
P		Señalización de fosfato	Torres-Acosta et al., 2004
T	T1	Regulación de la transcripción: subunidad reguladora de CDKC	Cui et al., 2007
J18		Incierta	Abrahams et al., 2001
SDS		Específica de meiosis	Azumi et al., 2002

1.5.2. Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

Las cinasas dependientes de ciclinas de plantas están clasificadas en siete grandes grupos (CDKA-F) de acuerdo a la conservación del motivo de unión a ciclinas (Vandepoele *et al.*, 2002). La CDK tipo A de plantas es homóloga a cdc2 de mamíferos, ya que conserva la secuencia aminoacídica PSTAIRE (Prolina, Serina, Treonina, Alanina, Isoleucina, Arginina y Ácido glutámico) en el motivo de unión a ciclina. En este grupo de CDKs, el transcrito y los niveles de proteína no muestran una expresión preferencial en alguna fase del ciclo celular y además son detectadas, aunque en bajos niveles, en tejidos diferenciados. Estos resultados sugieren una función dual de las CDKs tipo A en plantas, actuando tanto en la progresión a S como en el paso a M (Ferreira *et al.*, 1991), por lo que estarían involucradas en la proliferación celular y en el mantenimiento de una adecuada división celular en tejidos diferenciados durante el desarrollo de la planta.

La CDKA puede unirse a las ciclinas tipo D y fosforilar a la proteína RBR para permitir la transición de G1 a S y regular el ciclo celular, sin embargo, sus funciones podrían no ser exclusivas en el ciclo celular ya que CDKA puede regular el crecimiento del tomate, modificando la placenta y el tamaño celular del fruto (Czerednik et al., 2015), además de que en *Physcomitrella* apoya la reprogramación de la diferenciación celular (Ishikawa et al., 2011).

Las CDKs tipo B poseen un motivo de unión a ciclina diferente, PPTALRE o PPTTLRE, por lo que se han dividido en dos subgrupos, CDKB1 y CDKB2; su actividad es dependiente del ciclo celular y actúan en la transición G2/M (Mironov et al., 1999). Este tipo de CDKs es único de plantas, lo que sugiere que podrían estar realizando una función regulatoria particular dentro del ciclo celular vegetal.

Estudios anteriores han mostrado que las CDKs tipo B son capaces de unirse a las ciclinas tipo A ó B. No obstante, se ha encontrado interacción de ciclinas tipo D con CDKB en *Arabidopsis thaliana* (Kono et al., 2003); particularmente se ha demostrado interacción activa entre la ciclina D4;1 y CDKB2;1 *in vitro*, lo que parece ocurrir de manera tejido-específica o localización sub-celular específica. Otros estudios han mostrado asociación de ciclina D3;1 y CDKB1;1 de *Nicotiana tabacum*, con actividad de cinasa, en purificados de células de insectos (Kawamura et al., 2006).

Las otras CDKs (C, D, E y F) han sido poco caracterizadas y su función en el ciclo celular aún no es muy clara. La CDKC co-localiza con los factores encargados del splicing alternativo y la co-localización depende del estado transcripcional y la actividad de esta cinasa. En las plantas el complejo ciclina T-CDKC sugiere una función parecida a la del complejo ciclina T-CDK9 en animales, siendo este complejo un regulador positivo de la transcripción del factor de elongación b (Kobor et al., 2002; Barroco et al., 2003).

Las CDKs tipos D y F de plantas son homólogas a las cinasas que tienen como función activar a otras CDKs (CAKs); tienen una secuencia NPTALRE en su dominio de unión a ciclinas y presentan similitud con CDK7 de humanos. Las proteínas ortólogas en arroz son capaces de fosforilar a la CDKA de arroz, a CDK2 de humanos y al dominio C-terminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II de *A. thaliana* (Shimotohno et al., 2006; Sekine et al., 2007). Finalmente, las cinasas tipo E, que poseen la secuencia SPTAIRE, presentan una señal débil constitutiva durante la sincronización del ciclo celular.

Tabla 6. Características y funciones de las Cinasas Dependientes de Ciclinas en plantas

Clase	Motivo de unión a ciclina	Función	Referencia
CDKA	PSTAIRE	Regulación del ciclo celular: G1 a M	Forbert et al., 1996; Menges et al., 2002; Sorrell et al., 2001.
CDKB	PPTA(T)LRE	Regulación del ciclo celular: S a M	Vandepoele et al., 2002; Menges et al., 2002; Sorrell et al., 2001.
CDKC	PITAIRE	Transcripción	Lessard et al., 1999
CDKD y CDKF	NFTALRE	Ciclo celular: Activación de otras CDKs	Vandepoele et al., 2002; Umeda et al., 1998; Sekine et al., 2007
CDKE	SPTAIRE	No es claro	Joubès et al., 2000

Así, la gran cantidad de proteínas CDKs y ciclinas se asocian para formar diferentes complejos a lo largo del ciclo celular, esta unión permite la activación de la subunidad catalítica y la fosforilación de los blancos específicos en cada uno de los puntos de control, para asegurar la continuidad, progresión e irreversibilidad de cada fase y asegurar la proliferación celular y el establecimiento de sistemas celulares completos (Figura 7).

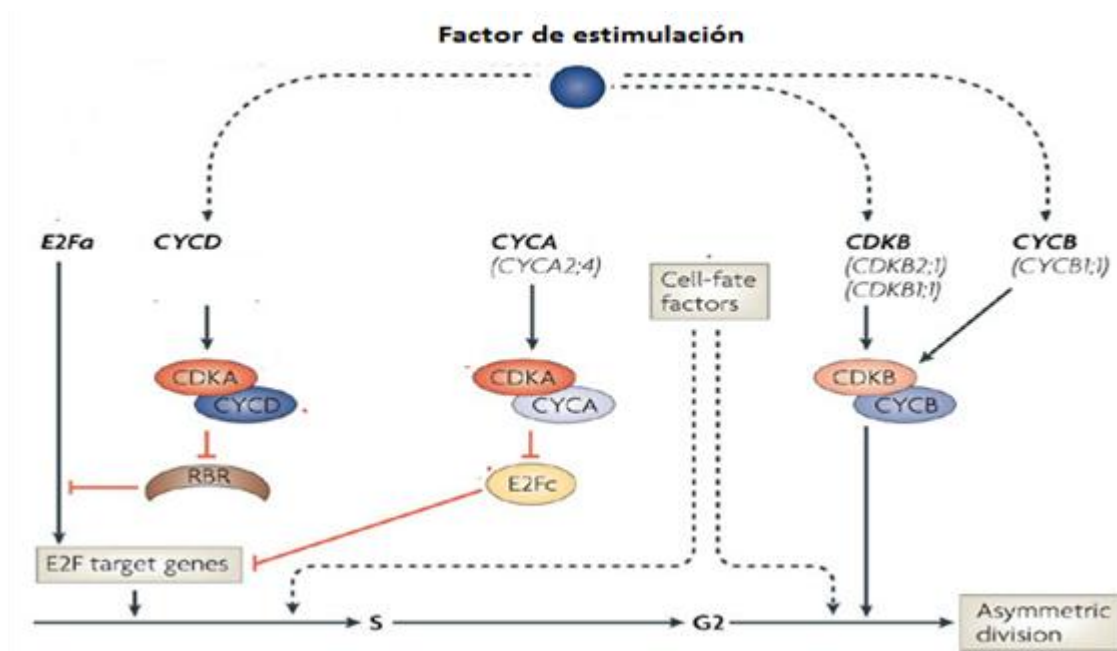


Figura 7. Formación de complejos ciclinas-CDKs durante el ciclo celular de plantas (Modificado de De Veylder et al., 2007).

1.6. Mecanismos generales del control del ciclo celular

El ciclo celular eucariótico está regulada en múltiples puntos, pero la totalidad o la mayoría de estos implican la activación de las CDKs, esto implica no solo la formación de diferentes complejos ciclinas-CDKs, sino también intervienen mecanismos de regulación de la actividad de cinasa del complejo.

En mamíferos, la CDK en forma monomérica carece de actividad, es hasta que se forma un complejo con la subunidad reguladora ciclina (Cyc) y la activación del complejo por fosforilaciones que la CDK ejerce función sobre un sustrato y controla la transición entre una fase y otra dentro del ciclo celular.

Por tanto, su actividad puede ser regulada por la abundancia de los componentes de CDK o ciclina a través de su controlada transcripción, traducción, localización intracelular, la destrucción regulada de la ciclina, o por la regulación positiva por fosforilación de la CDK mediada por otra cinasa denominada CAK (por sus siglas en inglés: Cinasa activadora de otras Cinasa). Además, la actividad puede ser inhibida por fosforilación

por la cinasa Wee1 o la unión de inhibidor de proteínas y en algunos casos la unión a otras proteínas como la subunidad de la CDK (CKS: proteínas de andamiaje) que permite la interacción con sus sustratos o la presentación del complejo a las ubiquitina ligasas para su degradación (Sorrell *et al.*, 2002)

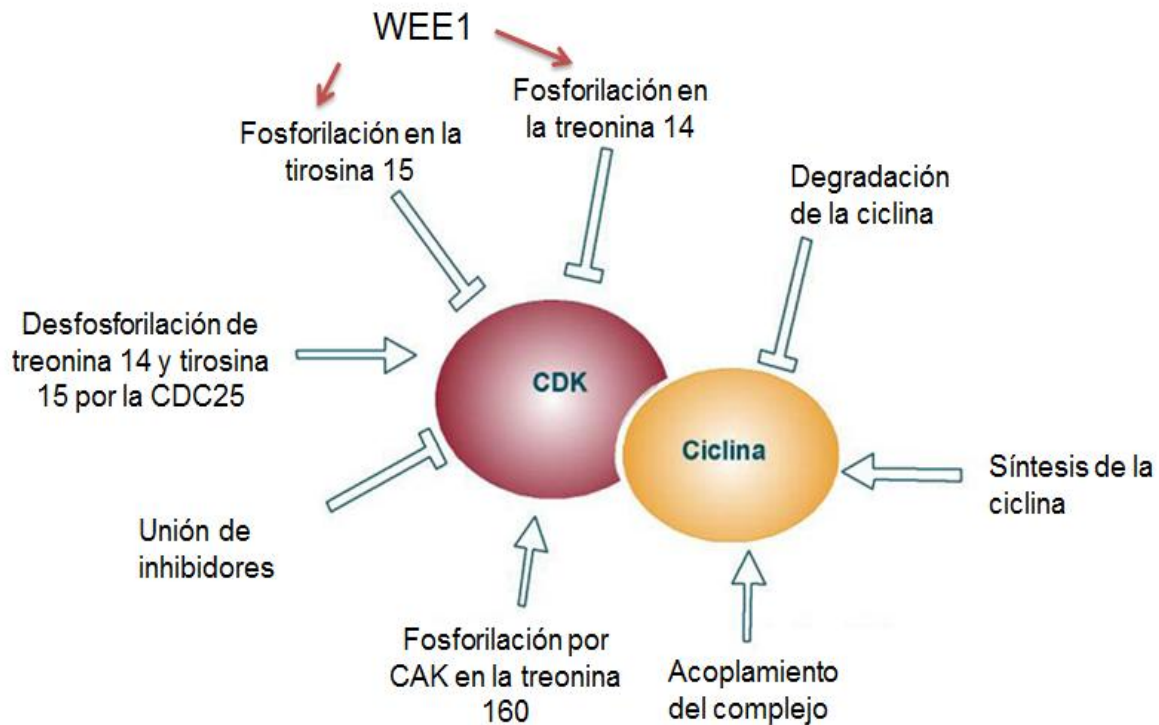


Figura 8. Mecanismos de regulación de la actividad de CDK en mamíferos. ⊥ representa eventos inhibitorios, → representa eventos activadores (Modificado de Xiong *et al.*, 1992; Bates *et al.*, 1994).

1.6.1. Regulación por síntesis y degradación de ciclinas.

Las ciclinas no solamente activan a las CDKs al cambiar la conformación de sus sitios catalíticos, también contribuyen a la selección de sustratos específicos y regulación de la estabilidad del complejo (Wang *et al.*, 2004). La actividad de cinasa en el complejo ciclina-CDK es regulada por la degradación controlada de su respectiva subunidad de ciclina en determinados tiempos del ciclo celular (Murray, 2004). De esta manera, el avance del ciclo celular está regido por la síntesis y destrucción regulada de las ciclinas (Inze *et al.*, 2007).

En la célula eucariota existen dos vías importantes de degradación de proteínas: la ruta vacuolar y la ruta citoplásmica. La ruta vacuolar es usada para la mayoría de las proteínas de larga vida media (24-72 horas, promedio) donde éstas son probablemente reconocidas y degradadas por el lisosoma.

La ruta citoplásmica es fundamental para aquellas proteínas citosólicas con un recambio elevado (esto es, con una vida media corta: entre 10 y 720 minutos), que suelen ser degradadas en el citosol por alguno de los sistemas proteolíticos existentes, como es el sistema ubiquitina-proteasoma (Planchis *et al.*, 2004).

En cuanto a la proteólisis, las ciclinas se pueden dividir en dos clases; aquellas que son inestables pero su recambio síntesis-degradación mantiene los niveles constitutivos de dichas proteínas a través del ciclo celular y cuyo nivel es determinado por la velocidad de su transcripción; y las que son inestables y se degradan en fases específicas del ciclo celular y que vuelven a acumularse en otro ciclo celular (Pines, 1995), en general, estas proteínas tienen un alto número de recambio y vida media corta, ya que algunas poseen una caja de destrucción y/o un motivo denominado PEST (Prolina, Ácido Glutámico, Serina y Treonina) que las marca para ser degradadas por el proteasoma 26S (complejo multiproteico nuclear y citoplásmico cuya función es la degradación específica de proteínas marcadas; Peters *et al.*, 1994) y por lo tanto les confiere inestabilidad (Weingartner *et al.*, 2003).

La degradación de ciclinas de G1 en algunos organismos es determinante para la regulación del ciclo celular, por ejemplo, las ciclinas de levadura (llamadas Cln) y las ciclinas D y E de mamíferos son proteínas inestables. La vida media de estas proteínas es corta y se explica por la existencia de secuencias PEST, su marcado con poli-ubiquitina-ligasas y su final destrucción vía proteasoma (Marrocco *et al.*, 2009).

Ensayos usando Cln2 y Cln3 a las que se les ha eliminado la secuencia PEST, han demostrado que el paso por el punto de control antes de S en la levadura se acelera (Cross 1988). Del mismo modo, la sobreexpresión de cualquiera de las ciclinas tipo D o E acorta moderadamente la fase G1 en células de mamíferos.

Sin embargo, las ciclinas de la fase G2 (Clbs en la levadura y las ciclinas A y B en eucariotes superiores) son destruidas específicamente en la mitosis. En levaduras esta propiedad es conferida por una caja conservada denominada “caja de destrucción” en el

amino-terminal de las proteínas (Glotzer *et al.*, 1991). Sin embargo, en mamíferos la caja de destrucción no es suficiente para llevarla a degradación, para ello, tanto la ciclina A, a la B2 y en algunas circunstancias la ciclina B1, tienen que unirse a su CDK para poder degradarse por otras proteínas en unión con la cinasa (Pérez-Pérez *et al.*, 2008; Weingartner *et al.*, 2003).

La degradación específica de algunas ciclinas está relacionada con la presencia del complejo del proteasoma y de la unión a las proteínas-ligasas específicas que aparecen o se activan en determinados tiempos del ciclo celular, sugiriendo una función tiempo-específica (Amon *et al.*, 1996).

La vía ubiquitin-proteasoma ha sido descrita como un importante factor en el proceso de desarrollo de plantas (Capron *et al.*, 2003) y para la estabilidad de los reguladores del ciclo celular, tal como las ciclinas B, las cuales se degradan por este proceso (Genschick *et al.*, 1998, Weingartner *et al.*, 2003). Además, se sabe que las ciclinas D3; 1 y D2; 1 en *Arabidopsis* tienen en su secuencia el motivo PEST, lo que sugiere una degradación por proteasoma. En maíz, el uso de inhibidores de proteasoma como el MG-132, demostró que las ciclinas B y D2; 2, tienen vida media corta en ensayos *in vitro* con extractos de endospermo y también se degradan por esta vía (Dante *et al.*, 2013).

1.6.2. Regulación por fosforilación y desfosforilación de sitios específicos

Estudios en otros organismos han demostrado que las vías de señalización que regulan la progresión del ciclo celular convergen en el control de la actividad de las CDKs. La actividad de cinasa no solo es controlada por la asociación con la ciclina, existen proteínas que se asocian a la CDK o al complejo ciclina-CDK que pueden modificar su actividad, pero no es suficiente con inhibir a las proteínas que modifican dicha actividad para que el complejo ciclina-CDK se encuentre completamente activo.

La actividad de las CDKs de mamíferos es regulada de manera compleja, las modificaciones post-traduccionales basadas en fosforilaciones y desfosforilaciones por cinasas/fosfatasa específicas culminan en la correcta activación del complejo. La fosforilación de los residuos treonina 14 (T14) y tirosina (T15) por la cinasa Wee1

interfiere con la correcta unión de ATP al sitio catalítico de la cinasa (denominado lazo T o loop T) y, por lo tanto, inhibe la actividad de las CDKs sobre el sustrato (Nigg, 1996). Estas fosforilaciones inhibitorias son eliminadas por la acción de la fosfatasa Cdc25 (Woo *et al.*, 2001). En mamíferos existen tres fosfatasas Cdc25, codificadas por tres genes relacionados, *Cdc25A*, *Cdc25B* y *Cdc25C*. *Cdc25A* regula las transiciones G1/S y G2/M, activando al complejo ciclina E-CDK2, mientras que *Cdc25B* y *Cdc25C* controlan la transición G2/M, activando el complejo ciclina B-CDK1 (Ciemerych y Sicinski, 2005).

La activación de las CDKs no solo requiere la desfosforilación de los residuos T14 y Y15, sino también la fosforilación de la CDK en una treonina (T160/T161) cercana a la región del lazo T, por parte de una cinasa activadora de CDKs o CAK (Huntley y Murray, 1999). Se ha determinado recientemente que la CAK, para al menos, CDK1, CDK2 y CDK4, es en sí misma un complejo ciclina-CDK. Esta enzima, compuesta por la ciclina H, la cinasa CDK7 y una proteína de ensamblaje llamada Mat1, activan al complejo ciclina/CDK por fosforilación en el residuo T161 en la CDK1 de mamíferos (Ciemerych y Sicinski, 2005). La fosforilación de la treonina en esta posición aumenta la actividad de la CDK muchas veces más que cuando este residuo permanece sin fosforilar.

Los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular en especies vegetales no se han caracterizado completamente y cada especie presenta características específicas. Sin embargo, el análisis de alineamientos en las secuencias aminoacídicas de las cinasas involucradas en la progresión del ciclo celular en plantas (cinasas tipo A y B), indica que estas proteínas tienen conservados los residuos de fosforilación regulatorios descritos en animales.

El ciclo celular comienza cuando las señales extracelulares (azúcares, hormonas, factores de crecimiento, etc.) activan la transcripción de genes de ciclinas D durante la fase G1 temprana y al acumularse la proteína se forman complejos CycD/CDK. Estos complejos proteicos son regulados negativamente por las proteínas inhibitorias y una vez que son liberados de esta represión (Wang *et al.*, 2004), se activan por fosforilación en la treonina 160 de la CDK. En plantas, hay dos clases de CAK (Cinasa activadora de otras Cinasas): CDKD y CDKF (Umeda *et al.*, 2005). La clase CDKD está estructuralmente relacionada con la CAK de mamíferos (CDK7) y en complejo con la ciclina H, esta cinasa fosforila la CTD de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (Serizawa *et al.*, 1995; Shiekhattar *et al.*, 1995).

En *Arabidopsis thaliana*, hay tres genes de CDKD: CDKD; 1, CDKD; 2, y CDKD; 3 que originalmente fueron llamados CAK3At, CAK4At y CAK2At respectivamente. CDKD; 2 y CDKD; 3 fosforilan a la CDK2 de humano y al CTD de la RNA polimerasa de *Arabidopsis in vitro* (Shimotohno *et al.*, 2003). Sin embargo, la actividad de cinasa de la CDKD;3 sobre CDK2 es mayor que la actividad de la CDKD;2, y al contrario, la actividad de la CDKD;2 es mayor que la de la CDKD;3 sobre el CTD de *Arabidopsis*. Este resultado sugiere que múltiples CAK regulan diferencialmente el ciclo celular y la transcripción (Shimotohno *et al.*, 2003). La actividad de cinasa de CDKD; 1 no se pudo detectar usando como sustrato tanto a la CDK2 como al CTD *in vitro* (Shimotohno *et al.*, 2004, Sekine *et al.*, 2007).

La CDKF (originalmente llamada AtCAK1) es específica de las plantas, funciona como otra CAK, y es codificada por un único gen en *Arabidopsis* (Shimotohno *et al.*, 2004,; Umeda *et al.*, 1998). La CDKF;1 puede fosforilar a la CDK2 de humano *in vitro* y a la CDKA en protoplastos de raíz de *Arabidopsis* (Shimotohno *et al.*, 2006; Sekine *et al.*, 2007). Además, CDKF;1 también fosforila a CDKD;2 y CDKD;3, activando los complejos y de este modo la actividad de cinasa de la CDKD;2 sobre el CTD (Shimotohno *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que hay una cascada de actividad cinasa que es mediada por múltiples CAK que coordinadamente regulan la transcripción basal y la progresión del ciclo celular durante el desarrollo de la planta (Umeda *et al.*, 2005).

Similar a lo que ya se describió anteriormente, los complejos Cyc/CDK deben ser activados por la fosforilación en T160 o la treonina equivalente en la CDK (catalizada por las CAK, CDKD/CDKF) permitiéndole así la fosforilación de sus proteínas blanco para entrar a la fase M.

En plantas, los complejos CycA/B con CDKA/B son regulados negativamente por proteínas inhibidoras de la CDK (catalizadas por la cinasa WEE). Una vez reparados los posibles errores ocurridos durante la replicación, los fosfatos inhibitorios en T14/Y15 son removidos por una fosfatasa aún desconocida (Dissmeyer *et al.*, 2009).

1.6.3. Regulación por unión a inhibidores

Adicional a los mecanismos ya señalados, tanto en mamíferos como en plantas, se han encontrado proteínas de bajo peso molecular (15-27 kDa) que al unirse al complejo ciclina-CDK inhiben su actividad. Estas proteínas son conocidas como CKIs, las cuales inducen el arresto del ciclo celular o retrasan su progresión en respuesta a señales intracelulares o extracelulares (Verkest *et al.*, 2005). En mamíferos, las CKIs están bien caracterizadas y detienen el ciclo celular en respuesta a señales antiproliferativas (Leibovith *et al.*, 2003).

De acuerdo con su estructura y especificidad de acción, las CKIs se dividen en dos familias: INK4 (proteínas inhibitorias de CDK4) y Cip/kip. La primera clase incluye a las proteínas p15, p16, p18 y p19, que son exclusivas de la fase G1 y pueden formar, e inhibir a, complejos con CDK4 y CDK6 (Pavletich, 1999). Los miembros de la familia Cip/Kip son p21, p27 y p57 e inhiben un amplio espectro de complejos ciclina-CDK en la transición G1/S (Stals e Inzé, 2003; Leibovitch *et al.*, 2003).

Los inhibidores CIP/KIP también ensamblan y estabilizan a los complejos ciclina D-CDK4/6 en el citoplasma y los tres miembros de la familia dirigen a los complejos ciclina/CDK al núcleo de la célula, debido a que tanto las ciclinas D como la CDK4 carecen de señales de localización nuclear (NLS) (Mangeng, 1999).

En plantas, dos familias de inhibidores de CDKs se conocen hasta ahora. La primer familia posee un dominio en la región carboxilo terminal que muestra una limitada similitud con un miembro de la familia CIP/Kip de mamíferos, específicamente el inhibidor p27Kip1 (Wang *et al.*, 1997). Esta familia de proteínas, inicialmente identificadas en *Arabidopsis*, es referida como CKIs (interactores/inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas; Wang *et al.*, 1997; Lui *et al.*, 2000), o también referidas como KRPs (Kip- related proteins; De Veylder *et al.*, 2001). Con excepción del dominio conservado en la región carboxilo terminal, las proteínas ICK/KRP son muy diferentes con respecto a las CKIs de mamíferos y levaduras (Wang *et al.*, 2006).

Miembros de la familia ICK/KRP han sido aislados mediante la técnica de doble híbrido en *Arabidopsis* (Lui *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002), tabaco (Jasinski *et al.*, 2002, 2003) y

alfalfa (Pettko-Szandtner *et al.*, 2006), o bien mediante estudios *in silico* de *Arabidopsis* (De Veylder *et al.*, 2001), maíz (Coelho *et al.*, 2005), arroz (Barroco *et al.*, 2006) y tomate (Bisbis *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente en un análisis filogenético se reportó la presencia de secuencias relacionadas a la familia ICK/KRP en más de 60 especies de plantas.

In vitro se ha demostrado la inhibición de la actividad de cinasa de CDKs empleando proteínas ICK/KRP recombinantes para inhibir los complejos obtenidos por “pull down” con p13Suc1 en *Arabidopsis* (Verkest *et al.*, 2005), tabaco (Jasinski *et al.*, 2002), maíz (Coelho *et al.*, 2005), alfalfa (Pettko-Szandtner *et al.*, 2006) y tomate (Bisbis *et al.*, 2006).

Estudios de mapeo de dominios mostraron que la interacción de ICK/KRPs con CDKs tipo A y ciclinas tipo D es a través del dominio de interacción/inhibición de CDK/ciclina (referido como CID) localizado en la región carboxilo terminal (Lui *et al.*, 2000; Jasinski *et al.*, 2002). Los siete inhibidores de CDK de *Arabidopsis* y uno de tabaco interactúan con ciclinas tipo D (De Veylder *et al.*, 2001; Jasinski *et al.*, 2002). No obstante algunos reportes desmostraron que las ICK/KRPs también pueden interactuar con otros complejos CDK/ciclina diferentes a los complejos CDKA/CycD, i.e., en alfalfa complejos con CDKB2;1 (Pettko-Szandtner *et al.*, 2006) y en maíz complejos con CYCA (Coelho *et al.*, 2005). Sin embargo, ninguna de las ICKs/KRPs de *Arabidopsis* parece interactuar con CDKB1;1 al realizar ensayos de doble híbrido (De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002).

Hay varias posibles razones por las que las plantas podrían tener múltiples inhibidores de CDK, por ejemplo, podrían unirse diferencialmente a diferentes complejos ciclina/CDK, o bien podrían participar en regular negativamente y diferente manera la actividad de las CDKs en respuesta a diferentes señales ambientales y de desarrollo (ejemplo: estrés por frío o niveles altos de ácido abscísico) o podrían tener una acción tejido-específica (Lui *et al.*, 2000).

2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Durante varios años nuestro grupo de investigación ha estado enfocado en estudios del control del ciclo celular en maíz (*Zea mays*), particularmente durante el proceso de germinación de la semilla. Los esfuerzos se han dirigido a caracterizar a las ciclinas D ya que por su papel como reguladoras fundamentales de la fase G1 del ciclo celular, estas proteínas podrían tener una función esencial en el establecimiento y avance de la germinación de semillas.

En *Arabidopsis*, la transcripción de las ciclinas tipo D se dispara en diferentes momentos de la germinación, siendo las ciclinas CycD3;2, CycD3;3 y CycD4;1 las que son activadas más tempranamente; la protrusión de la radícula se promueve en plantas que sobreexpresan estas ciclinas y se retrasa en aquellas plantas que las tienen mutadas, lo cual no ocurre con ciclinas activadas tardíamente como CycD3;1 (Masubelele *et al.*, 2005).

El genoma de maíz tiene al menos 17 genes diferentes de ciclinas D, contenidos dentro de los subgrupos D1 a D7 previamente descritos para otras plantas (Buendía *et al.*, 2011). Además, nuestro grupo ha propuesto una nomenclatura basada en los porcentajes de identidad de las ciclinas D de maíz con respecto a sus ortólogos presentes en arroz y *Arabidopsis*.

Se ha observado la expresión de al menos 15 de los 17 genes de ciclinas D durante la germinación de maíz, la mayoría de forma tal que el transcrito se acumula progresivamente según avanza la germinación. Adicionalmente, estos 15 genes se expresan también en diferentes tejidos de plántulas (mesocotilo, puntas de raíz y primera hoja), aunque dicha expresión ocurre de manera diferencial, esto es, las 15 ciclinas se expresan en por lo menos uno de los tejidos de la plántula; los mayores niveles se han encontrado en tejido de raíz (Buendía *et al.*, 2011).

El papel de cada una de las ciclinas D durante la germinación y el crecimiento de las plantas, así como su interacción con otras proteínas del ciclo celular es un tema muy relevante, ya que, es importante conocer su funcionalidad, actividad y regulación para poder entender el mecanismo de control del ciclo celular en el proceso fisiológico de

germinación y en un posible futuro aplicar estos conocimientos para lograr el mejoramiento en los cultivos de maíz.

Aunque las ciclinas tipo D se encuentran clasificadas dentro del grupo de ciclinas llamadas originalmente como proteínas de G1, se ha demostrado que algunas de las ciclinas D de plantas se expresan constitutivamente en todo el ciclo celular (Kono *et al.*, 2003). Asimismo, la asociación con CDKA es la más frecuentemente reportada, son cada vez más los reportes de asociación con CDKB, lo que sugiere un posible papel de las ciclinas D en la transición G2/M (Menges *et al.*, 2005).

Por otra parte, nuestro grupo ha reportado que durante la germinación en ejes embrionarios de maíz, complejos formados por la proteína PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular), una CDK tipo A y una ciclina D putativa, fosforilan a la Histona H1 y al homólogo de la proteína RBR de maíz; esta actividad incrementa cuando dichos complejos son sometidos a tratamientos con fitohormonas (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2005). Adicionalmente, Lara-Nuñez *et al.* (2008), reportaron que dos ciclinas D (D4;1 y D5) de maíz, podían fosforilar a RBR de maíz de manera diferencial durante las primeras 24 horas de germinación en ejes embrionarios, indicando que dichas proteínas regulaban el ciclo celular.

Se ha demostrado la presencia de diferentes ciclinas D durante la germinación de maíz y su asociación tanto con CDKs como con otras proteínas del ciclo celular. La clonación de las ciclinas D2;2, 4;2 y 5;3 permitió la obtención de péptidos que fueron utilizados para la inducción de anticuerpos específicos. Así, se pudo conocer que estas ciclinas se unen diferencialmente a dos tipos de cinasas, con las que forman complejos que se acumulan de manera diferencial durante la germinación (Godínez, 2010).

La regulación de los complejos de ciclinas con cinasas se establece a diferentes niveles:

- 1) La asociación de una ciclina con una CDK determina la estabilidad, localización y especificidad por un sustrato; la actividad de los complejos ciclina-CDK también puede variar.
- 2) El estado de fosforilación tanto de la CDK como de las ciclinas es fundamental tanto para la actividad del complejo (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999), como para la estabilidad, particularmente de las ciclinas (Fyvie *et al.*, 2002).
- 3) Otro nivel de regulación está dado por su asociación con proteínas que tienen función dual, sea de estabilizadores

de complejos o bien de inhibidores de la actividad de cinasas, o de la asociación de CDKs y ciclinas (Verkest *et al.*, 2005). Con base a los antecedentes nosotros nos hemos planteado la siguiente hipótesis.

3. HIPÓTESIS

La actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKs sobre Zm-GST-RBR durante la germinación del maíz, estará regulada a diferentes niveles: a) por los niveles de proteína de la ciclina D; b) por la asociación y acumulación de los complejos ciclinas D-CDKA y ciclinas D-CDKB1;1; c) y por los estados de fosforilación de las CDKs, con una mayor actividad al estar fosforilada en T160 y una disminución cuando la CDK se encuentre fosforilada en la T14 y Y15.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL: Estudiar la actividad, composición y regulación de los complejos de las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKA y CDKB;1 durante la germinación en el maíz.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la acumulación de las ciclinas D (D2;2, D4;2 y D5;3) y CDKs (CDKA y CDKB1;1) durante la germinación en ejes embrionarios de maíz.
2. Determinar la vida media de las ciclinas D (D2;2, D4;2 y D5;3).
3. Determinar las diferentes asociaciones entre las ciclinas D/CDKA y de las ciclinas D/CDKB1;1.
4. Determinar la actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKs sobre el sustrato GST-RBR de maíz.
5. Determinar si las CDKs unidas a las ciclinas D están fosforiladas en los sitios de regulación (T14, Y15 y T160) durante la germinación del maíz.

5. METODOLOGIA

5.1. Producción y validación de anticuerpos policlonales.

La generación de los anticuerpos se realizó en conejos raza Nueva Zelanda, los cuales fueron inyectados por vía intraperitoneal con las proteínas recombinantes purificadas GST-CycD4;2 (250 µg) o GST-CycD5;3 (250 µg), que contienen los extremos carboxilo de CycD4;2 (aminoácidos 313 a 388) y CycD5;3a (aminoácidos 249 a 354, 75.2% idéntica a CycD5; 3b en esta región polipeptídica); para CDKB1;1, un péptido que contiene los primeros 28 aminoácidos se fusionó a GST (250 µg). La CDKA (250 µg) completa, fusionada a una cola de Histidina, se usó para generar anticuerpos. Para la primera inyección de proteínas recombinantes, se mezcló con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich); una segunda inyección contenía sólo adyuvante incompleto. Las siguientes ocho administraciones se realizaron a través del ganglio poplíteo solo con los péptidos de las ciclinas (200 µg) que se purificaron por tratamiento con la proteasa trombina y después se pasaron a través de la resina de glutatión-Sefarosa 4B. Al final de este período, se obtuvo el antisuero y se evaluó su capacidad para detectar las proteínas correspondientes. Los anticuerpos contra la ciclina D2;2 se obtuvieron como se informó anteriormente (Gutiérrez *et al.*, 2005).

La validación de los anticuerpos se realizó haciendo Western Blot con las proteínas recombinantes purificadas y con inmunoprecipitaciones de todas las proteínas e identificando por Western Blot la presencia de las proteínas en las masas moleculares respectivas.

5.2. Imbibición de ejes de embrión de maíz.

Para seguir la germinación en el maíz (tiempo desde el inicio de la imbibición), se extrajeron 0.5 g de ejes embrionarios a partir de semillas maduras de maíz Chalqueño, cosechas 2008, 2010 y 2012, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% y posteriormente se lavaron tres veces con agua desionizada estéril y se dejaron secar por 10 min.

Los ejes embrionarios ya desinfectados se colocaron en cajas petri de vidrio, previamente esterilizadas y se agregó 1 ml de solución amortiguadora de imbibición (Tris HCl 50mM pH 7.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, sacarosa 2%), las cajas se colocaron en una estufa (en oscuridad) a 25°C durante 6, 12, 18 y 24 h para obtener los tiempos de germinación.

5.3. Extracción de proteínas de ejes embrionarios de maíz.

Al término de cada tiempo de imbibición los ejes se homogenizaron con nitrógeno líquido en un mortero con solución amortiguadora de extracción de proteínas (Tris- HCl 70 mM pH 7.5, MgCl₂ 1 mM, KCl 25 mM, Na₂EDTA 5 mM, sacarosa 0.25 mM, DTT 7.5 mM, Tritón X-100 al 0.1%, una tableta de inhibidor de proteasas, ROCHE, Indianapolis, IN, USA), la muestra se centrifugó a 5000 g por 30 minutos. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron en placa por el método de Bradford (1976).

5.4. Extracción de proteínas de tejidos.

Para realizar las extracciones de proteína se eligieron distintos tejidos de plántula (base de hoja, raíz y coleoptilo), el material empleado para la obtención de tejidos se mantuvo durante 3 días en oscuridad a 25°C y después se cambiaron a fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad), 25° C durante 9 días adicionales. El tejido de plántula fue obtenido a los 14 días de imbibición. Se seleccionó la base de hoja empleando como base el diseño experimental de Li y col. (2010). Adicionalmente a la sección de hoja, se tomaron los primero 2mm del ápice de la raíz primaria. Por último, el tejido del coleoptilo que envuelve al tallo también se recuperó para las extracciones pertinentes. Se escogieron dichas secciones ya que representan un tejido en proliferación.

5.5. Western Blot

Las muestras de proteína (50 µg) se fraccionaron por SDS / PAGE (12 %) y los geles se transfirieron a membranas de Immobilon-PVDF. Se bloquearon las membranas con una dilución 3:10 de suero bovino fetal / PBS 1 × (SO1520 - biowest) y se incubaron con los anticuerpos policlonales desarrollados en nuestro laboratorio: anti-CycD2;2, anti-CycD4;2, anti-CycD5;3, anti-CDKA o anti-CDKB1;1, en las diluciones descritas en la Tabla 7.

Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 ° C y posteriormente, se lavaron tres veces con PBS, NaCl 0,5 M, y 1 % de Tween 1x, durante 15 min. Las membranas se incubaron durante 1 h con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa anti-conejo (las diluciones fueron determinadas según la dilución del primario, Tabla 7). Las membranas se lavaron de nuevo tres veces con PBS, NaCl 0,5 M y 1% Tritón X - 100 durante 15 min cada uno. Se detectó con la reacción de la peroxidasa por el método de ECL. Se realizó un análisis densitométrico utilizando Fluor-S Multilmager (Bio -Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Tabla 7. Diluciones de los anticuerpos anti ciclinas, anti-CDKs y anti p-T160/T14Y15

Anticuerpo	Dilución de anticuerpo primario	Dilución de anticuerpo secundario
anti- ciclina D2;2*	1:1000	1:30000
anti-ciclina D4;2*	1:1500	1:30000
anti_ciclina D5;3*	1:2000	1:40000
anti-CDKA*	1:1000	1:25000
anti-CDKB1;1*	1:2500	1:30000
anti-pT160-CDK2 Santa Cruz- sc-101656 Lot # C1009	1:1000	1:20000
anti-pT14Y15-CDK Santa Cruz- sc- 28435-R Lot# 12210	1:1000	1:20000

* Anticuerpos desarrollados en el laboratorio

5.6. Ensayos de estabilidad

Para el ensayo de estabilidad se emplearon tres grupos con diferentes tratamientos: grupo control, ejes embrionarios de maíz con solución amortiguadora de imbibición; un segundo grupo al que solo se le expuso 5 min., al vacío y se incubó con solución amortiguadora de imbibición y un último grupo al que se le agregó 10 µg/mL de la solución de imbibición con cicloheximida (antibiótico empleado para la inhibición de proteínas) que se introdujo a los ejes embrionarios mediante vacío.

Los ejes controles y tratados fueron incubados en cajas Petri con solución amortiguadora de imbibición a 3, 6 y 9 horas a 25 °C. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de proteínas.

5.7. Inmunoprecipitación de proteínas.

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron inmovilizando el anticuerpo para cada proteína con resina que contiene proteína A agarosa (ROCHE, Lot: 70425320), después de incubar el anticuerpo con la resina por dos horas se añadieron 150 µg de extracto proteico de diferentes horas de imbibición y se incubó toda la noche a 4°C.

Posteriormente se realizaron cuatro lavados con solución amortiguadora A (25 mM Tris-HCl pH=7.5, 125 mM de NaCl, 2.5 mM EGTA, 2.5 mM EDTA pH= 8.0, 2,5 mM NaF y 0.1 % de Tritón X-100), al término de los lavados, la resina se incubó con la solución amortiguadora de desnaturalización (Tris-HCl 200mM, DTT ó β-mecaptoetanol 400 mM, SDS 8%, glicerol 40% y azul de bromofenol) a 85°C por 5 min y las proteínas unidas se fraccionaron en geles de SDS-PAGE al 12%.

5.8. Ensayos de actividad de cinasa.

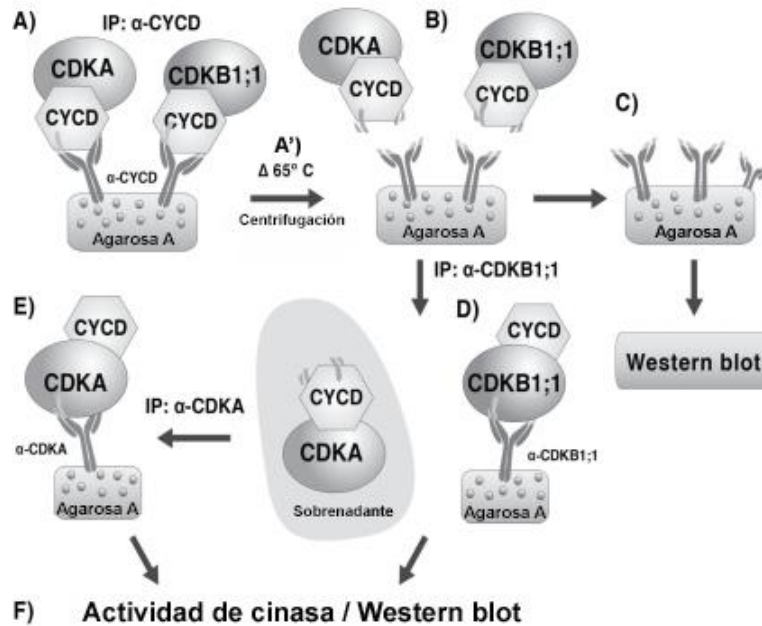
Para medir la actividad de cinasa de los complejos de ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKs, se usó el mismo método de inmunoprecipitación descrito anteriormente, sin embargo, después de lavar tres veces con el buffer de lavado, los IP fueron incubados con una solución amortiguadora de cinasa (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 150 mM, NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, 20 mM ATP, 5 mCi de [γ-³²P] ATP) y 5 µg de GST-

Rb de maíz, durante 1h a 30°C; la reacción se detuvo agregando 7,5 µL del amortiguador de carga 4x y se desnaturalizó a 85°C por 5 min.

Posteriormente, se separaron las proteínas mediante una electroforesis en geles SDS-PAGE. Al término de la electroforesis, los geles se secaron con vacío a 80 °C durante 2 h y se expusieron durante 12 h usando placas de autoradiografía Hiperfilm ECL (Kodak), de 18 x 24 cm. Para revelar las placas se usó el revelador GBX (Kodak) y fijador GBX (Kodak).

5.9. Inmunoprecipitaciones secuenciales.

A) Se realizaron las inmunoprecipitaciones de las ciclinas usando los anticuerpos específicos anti-Ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3, proteína A-agarosa y 300 µg de proteína por tiempo de germinación, después del tiempo de incubación (24 h), los inmunoprecipitados fueron lavados tres veces con solución amortiguadora A. Posteriormente A') estos inmunoprecipitados fueron incubados a 65 °C durante 3 horas y se centrifugaron durante 10 min. A continuación se separó el sobrenadante de la agarosa A, asegurando la separación de los complejos ciclinas- D-CDKs de la agarosa (B) y la fracción pesada de las IgGs. El sobrenadante se incubó (D) con anticuerpo anti-CDKB1; 1 y Agarosa A y se dejó a 4°C durante 24 h. Finalmente, el sobrenadante resultado de la inmunoprecipitación con el anti-CDKB1;1 se incubó con el anticuerpo anti-CDKA y Agarosa A durante 24 h a 4°C. El resultado de los diferentes inmunoprecipitados se lavaron y se les realizó la actividad de cinasa y los Western blots correspondientes.



Modelo de inmunoprecipitación secuencial. A) inmunoprecipitación de los complejos ciclinas D-CDKs usando los anticuerpos anti-CycD. A') calentamiento a 65°C y centrifugación para la separación de los complejos ciclinas D-CDKs de la agarosa A. B) Remoción del sobrenadante que contiene los complejos ciclinas D-CDKs después del tratamiento con calor. D) incubación del sobrenadante con agarosa A y anticuerpo anti-CDKB1;1, para la separación de los complejos ciclinas D-CDKB1;1. E) incubación del sobrenadante resultado del inmunoprecipitado con el anti CDKB1;1 con agarosa A y el anticuerpo anti-CDKA. C) Agarosa A e IgGs resultado del tratamiento con calor.

6.0. Identificación de la fosforilación de las CDKs.

Se realizaron inmunoprecipitaciones (IP) tomando 20 µL de proteína A agarosa (ROCHE) y se colocaron en tubos Eppendorf de 0.5 ml, a esta resina se le adicionó 10 µL del anticuerpo a utilizar y se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 200 µg de extracto proteico de maíz, obtenido de los extractos crudos, la mezcla se dejó incubar durante toda la noche a 4°C.

A la mezcla incubada se le realizaron tres lavados con 200 µL del amortiguador de lavado (25 mM Tris-HCL, pH 7.5, 125 mM de NaCl, 2.5 mM de EDTA, pH 8.0, 2.5 mM de NaF y 0.1% de Tritón X-100) y se centrifugó entre cada lavado en microcentrifuga durante 5 min, descartando el sobrenadante. Ya lavados, a los IP se les agregó solución amortiguadora de carga para desnaturalización y se cargó en un gel de acrilamida al 12 %;

posteriormente se usó un anticuerpo contra la CDK (pThr160-AFGVPVRTYTHEVVTLWYRA) y CDK (p-T14Y15-LEKIGEGTYGKVKALDKA) (Santa Cruz, dilución 1:1000, anti-conejo), para identificar a las fosforilaciones, activante o inhibitoria, de la cinasa mediante la técnica de Western Blot.

6.1. Análisis estadístico.

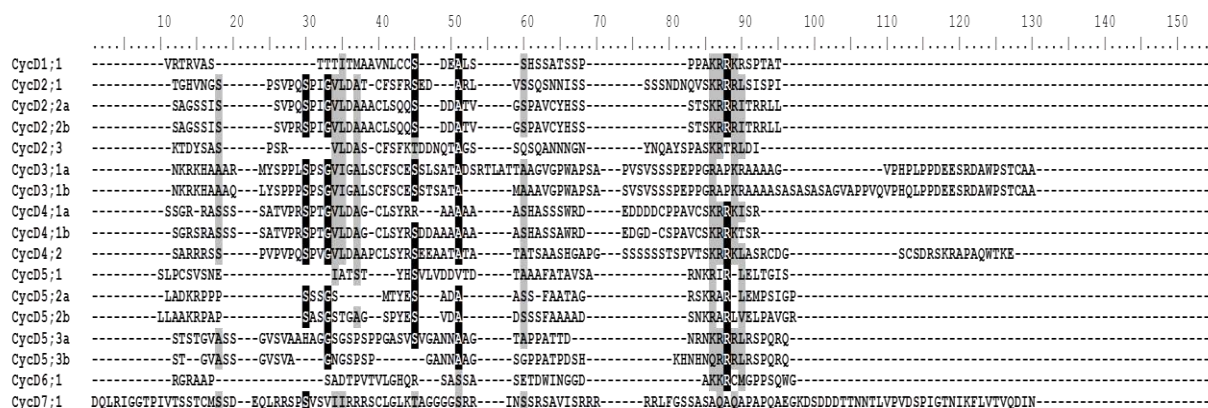
Se realizó un análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ 1,49 g, programa del National Institutes of Health, USA.

Las unidades de densitometría relativos (RDU) se calcularon dividiendo el valor de la banda densitométrico de la proteína de interés por la banda de control de carga (banda detectada por el anticuerpo anti-CycB1 de humano ó RBR recombinante) obtenido para la misma muestra en la misma membrana, y este resultado, a su vez, se dividió por el obtenido para el grupo de control (ejes embrionarios sin estar embebidos). Los resultados fueron analizados por ANOVA de un factor con post Newman Keuls Prueba. Para determinar las diferencias entre los resultados obtenidos, se usó la ANOVA de 2 vías con la prueba de Bonferron. Se realizó un análisis utilizando GraphPad Prism versión 5.0b, GraphPad Software, San Diego California, USA ,www.graphpad.com. Para las determinaciones estadísticas se realizaron al menos tres experimentos independientes y representativos biológicamente y se usó una $p \leq 0.001$ como deferencia significativa.

6. RESULTADOS

6.1 Validación de los anticuerpos contra ciclinas D y CDKs.

Recientemente, mediante estudios *in silico* y ensayos de RT-PCR, nuestro grupo de trabajo demostró que existen al menos 17 genes de ciclinas tipo D en maíz, 15 de estos genes se expresan en germinación y tejidos (hoja, raíz y mesocotilo) de manera diferencial (Buendía-Monreal *et al.*, 2011); estos resultados nos permitieron extender el estudio sobre la funcionalidad de tres ciclinas D, la ciclina D2;2, previamente caracterizada en nuestro laboratorio (Gutiérrez *et al.*, 2005) y las ciclinas D4;2 y D5;3 durante la germinación del maíz. Para ello fue necesario producir anticuerpos específicos contra las ciclinas D4;2 y D5;3. Se eligió como inmunógeno la secuencia del carboxilo terminal de las proteínas, dado que esta región es la menos conservada entre las 17 ciclinas D de maíz (alineamiento múltiple ClustalW y usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor). Este alineamiento nos permitió distinguir regiones antigénicas únicas para la producción de péptidos recombinantes y anticuerpos (Figura 9).



	CycD1;1	CycD2;1	CycD2;2a	CycD2;2b	CycD2;3	CycD3;1a	CycD3;1b	CycD4;1a	CycD4;1b	CycD4;2	CycD5;1	CycD5;2a	CycD5;2b	CycD5;3a	CycD5;3b	CycD6;1	CycD7;1
CycD4;2	12.30%	28.40%	30.60%	29.50%	17.00%	21.00%	19.40%	30.70%	32.20%	ID	8.80%	12.20%	13.10%	17.70%	13.30%	7.80%	6.60%
CycD5;3a	10.90%	14.40%	17.40%	17.40%	13.00%	7.00%	5.50%	13.60%	16.90%	17.70%	12.10%	10.70%	10.60%	ID	64.60%	6.20%	5.00%
CycD5;3b	8.00%	13.00%	15.60%	15.60%	13.80%	5.00%	4.60%	12.60%	14.00%	13.30%	3.20%	7.80%	6.10%	64.60%	ID	6.50%	4.20%

Figura 9. Alineamiento y porcentaje de identidad de los extremos carboxilos entre las 17 ciclinas D (CycD) de maíz, usados para la construcción de las proteínas recombinantes GST-ciclina. Los aminoácidos más conservados se denotan en una escala de grises, donde los aminoácidos sombreados con negro corresponden a los que se encuentran totalmente conservados y el gris más claro a los menos conservados.

La ciclina D4;2, tiene un porcentaje de identidad con las ciclinas D2;2 a y b de 30% en promedio; mientras que la ciclina D5;3a tiene un porcentaje de identidad del 65 % con la ciclina D5;3b, por lo que fue difícil distinguir entre estas dos proteínas con el anticuerpo producido.

Por otro lado, el anticuerpo anti-CDKA se produjo usando la proteína completa, por lo que es capaz de identificar a las CDKs tipo A y B. Mientras que para la producción del anticuerpo anti-CDKB1;1 solo se usaron los primeros 30 aminoácidos del extremo amino-terminal. Esta región es única en esta cinasa y está ausente en las CDKs tipo A (Figura 10, motivo 1), lo que asegura que el anticuerpo es específico para esta cinasa.

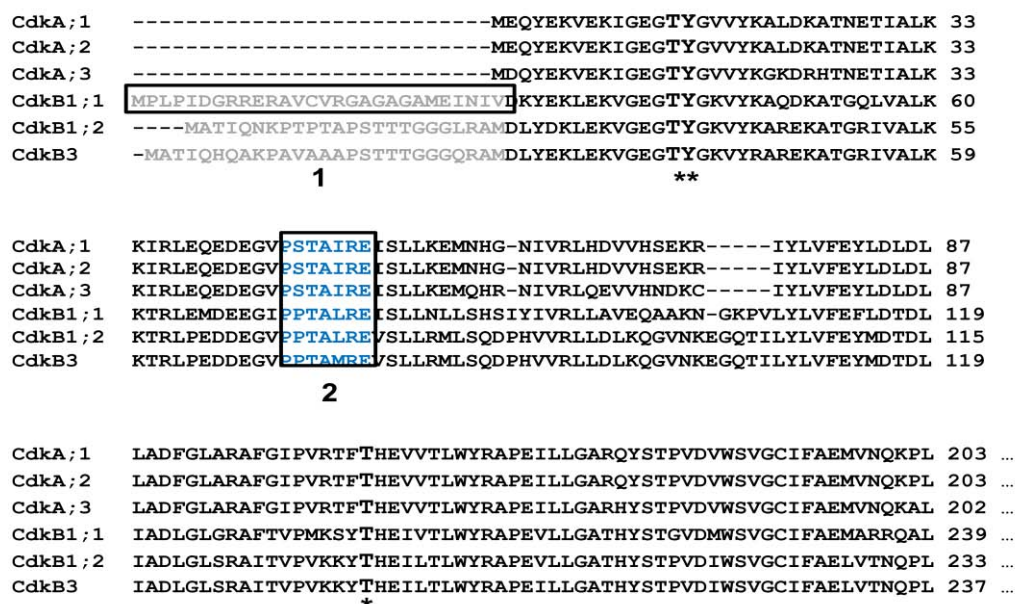


Figura 10. Comparación de las secuencias de CDKs de maíz. **Motivo 1.** Secuencia usada para producción del anticuerpo anti-CDKB1;1; **Motivo 2.** Secuencia canónica de unión a ciclina, PSTAIRE en CDKA, PPTAL(M)RE en CDKB. (*) Representación de los residuos susceptibles de fosforilación, T14, Y15 y T160 conservados en todas las CDKs. El porcentaje de identidad entre CDKA y CDKB1;1 es del 57 %

Obtenidos los anticuerpos se inició la validación de los mismos, para ello fue necesario realizar el inmuno-reconocimiento de las ciclinas D y CDKs, usando las proteínas recombinantes purificadas incubadas con el suero pre-inmune y con los anticuerpos para cada proteína (Figuras 11A y B).

Los resultados muestran que los anticuerpos producidos contra las CDKs y las ciclinas reconocieron proteínas con las masas esperadas. La proteína de fusión GST-CycD4;2, tiene una masa molecular de 33 kDa (GST: 25 kDa + ciclina D4;2: 11 kDa), que es reconocido por su anticuerpo y no así cuando se incubó con el suero pre-inmune (Figura 11A, panel izquierdo). Para la ciclina D5;3, el anticuerpo reconoce a su proteína recombinante en la masa de 33 kDa (GST: 25 kDa + ciclina D5;3: 8 kDa) (Figura 11A, panel derecho). Ambos anticuerpos reconocen a las proteínas ciclinas en extracto proteico de ejes embrionarios secos, detectando bandas únicas en 41 y 37 kDa respectivamente y que corresponden a las masas moleculares predichos por su secuencia.

Así mismo, se validaron los anticuerpos anti-CDKA y anti-CDKB1;1, usando como control positivo a su proteína recombinante, dichas construcciones tienen masas moleculares de 37 kDa para His-CDKA (His: 3 kDa + CDKA: 34 kDa) y de 28 kDa para la GST-CDKB1;1 (GST: 25 kDa + N-CDKB1;1: 3 kDa), que son identificadas únicamente cuando son incubados con su anticuerpo y no cuando están en contacto con el suero pre-inmune (Figura 11B, paneles derecho e izquierdo respectivamente).

También se realizaron ensayos de Western blot para determinar la especificidad de los anticuerpos al solo reconocer a su proteína blanco, para ello, se cargaron en un mismo gel las proteínas recombinantes de ambas ciclinas y en otro a las CDKs. Las Figuras 11C y D, muestran que los anticuerpos solo detectaron una banda correspondiente a sus proteínas recombinantes en las masas moleculares correspondientes, indicando que los anticuerpos producidos para las proteínas CycD4;2, CycD5;3, CDKA y CDKB1;1, son específicos para cada proteína.

En todos los casos se muestra como control positivo la identificación de las correspondientes proteínas en extractos proteicos de semilla seca y la tinción con rojo de Ponceau de los diferentes geles, como control de carga.

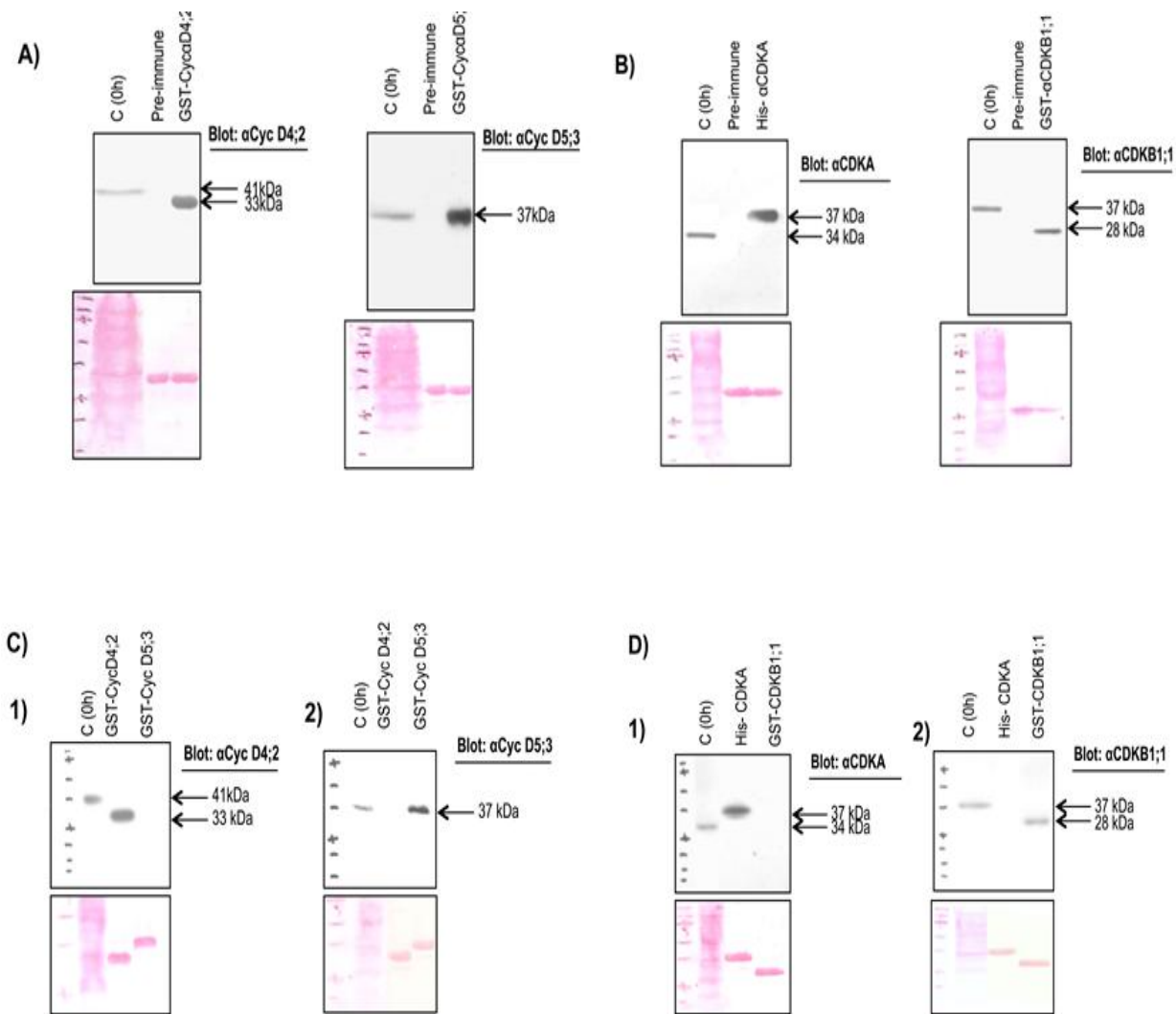


Figura 11. Validación de los anticuerpos producidos contra las ciclinas D y las CDKs. **Panel A.** Validación de los anticuerpos anti-Ciclinas. **Panel izquierdo.** Validación de el anticuerpo anti-CycD4;2 en extracto proteico de semilla seca y GST-CycD4;2 usando el suero pre-inmune y el anti-CycD4;2. **Panel derecho.** Validación de el anticuerpo anti-CycD5;3 en extracto proteico de semilla seca y GST-CycD5;3 usando el suero pre-inmune y el anti CycD5;3. **Panel B.** Validación de los anticuerpos anti-CDKs. **Panel izquierdo.** Validación de el anticuerpo anti-CDKA en extracto proteico de semilla seca e His-CDKA usando el suero pre-inmune y el anti CDKA. **Panel derecho.** Validación de el anticuerpo anti-CDKB1;1 en extracto proteico de semilla seca y GST-CDKB1;1 usando el suero pre-inmune y el anti-CDKB1;1. **Panel C.** Especificidad de los anticuerpos anti-Ciclinas. **Panel izquierdo.** Especificidad del anticuerpo anti-Cyc D4;2 en extracto proteico de semilla seca, GST-CycD4;2 y GST-CycD5;3. **Panel derecho.** Especificidad del anticuerpo anti-Cyc D5;3 en extracto proteico de semilla seca, GST-CycD4;2 y GST-CycD5;3. **Panel D.** Especificidad de los anticuerpos anti-CDKs. **Panel izquierdo.** Especificidad del anticuerpo anti-CDKA en extracto proteico de semilla seca, His-CDKA y GST-CDKB1;1. **Panel derecho.** Especificidad del anticuerpo anti-CDKB1;1 en extracto proteico de semilla seca, His-CDKA y GST-CDKB1;1.

Debido a que las CDKs de maíz tienen un alto porcentaje de identidad y que el anticuerpo anti-CDKA podría reconocer a la CDKB1;1, fue necesario validar estos anticuerpos en extractos proteicos de maíz, para ello se realizó un Western blot usando ambos anticuerpos en concentraciones crecientes de proteína (50-300 μ g).

Al realizar el Western blot usando el anticuerpo anti-CDKA, se observó una sola banda en 34 kDa en concentraciones menores a los 250 μ g de extracto (Figura 12-A1), a más altas concentraciones el anticuerpo reconoce otra banda en 37 kDa; mediante ensayos de inmunocompetencia se determinó que esa banda corresponde a la cinasa CDKB. Mientras que, a esa misma concentración, el anticuerpo anti-CDKB1;1 solo detectó una proteína a 37 kDa (Figura 12-A2). Este resultado se corroboró al realizar los inmunoprecipitados usando el anticuerpo anti-CDKA a diferentes concentraciones de proteína (100-300 μ g), donde se observan ambas bandas (34 y 37 kDa) con anti-CDKA solo a altas concentraciones proteicas, y una sola banda en el blot con anti-CDKB1;1 en 37 kDa, cuando el inmunoprecipitado es incubado con 300 μ g de proteína (Figuras 12-B1 y 2).

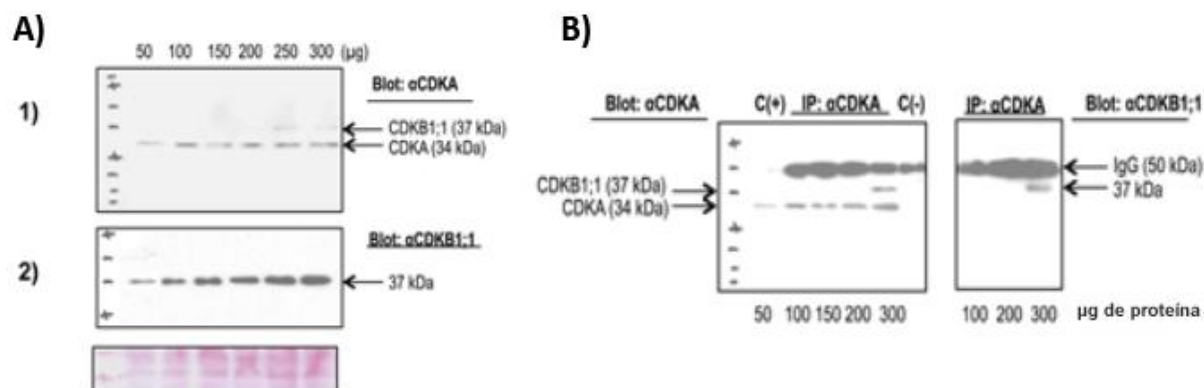


Figura 12. Validación de los anticuerpos anti-CDKs en extracto proteico de maíz. **A)** Gradiente de concentración de extractos proteicos (50-300 μ g) de ejes embrionarios de maíz no embebidos y reconocimiento de las CDKs usando los anticuerpos anti-CDKA. **A1)** y anti-CDKB1;1. **A2)** Se reconoce una banda de 37 kDa (CDKB1;1) a partir de 250 μ g de proteína A1. Las membranas se tificaron con rojo de Ponceau, como el control de carga. **B)** Inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-CDKA en concentraciones crecientes de extracto proteico de 0h (100-300 μ g). **B1)** Blot con anti-CDKA y **B2)** Blot con anti-CDKB1;1. C (-) Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-CDKA sin extracto proteico. Muestras biológicas representativas n= 3.

El ensayo anterior también se realizó para los anticuerpos anti-Ciclinas, demostrando que los anticuerpos anti-ciclinas solo detectan una sola banda en las masas moleculares correspondientes aunque se aumente la concentración de extracto proteico (datos no mostrados).

Finalmente, para concluir con la corroboración de la especificidad de cada anticuerpo, se realizaron inmunoprecipitados cruzados usando los anticuerpos contra las tres ciclinas D y las dos CDKs e incubados con extracto proteico de ejes embrionarios de maíz. En la Figura 13 se observan los Western blots usando el anticuerpo anti-CycD2;2 (Figura 13-A1), el anticuerpo reconoce una banda en 38 kDa únicamente en donde se ha inmunoprecipitado con el anti-CycD2;2. Usando el anticuerpo anti-CycD4;2, la banda que se reconoce tiene una masa molecular de 41 kDa y se observa solo en el carril 3, donde se inmunoprecipito con anti-D4;2 (Figura 13-A2); finalmente, se observa una proteína de 38 kDa en el inmunoprecipitado anti-CycD5;3, cuando se realiza el blot con anti-CycD5;3 (Figura 13-A3); en los tres casos se usó como control positivo extracto proteico de semilla seca de maíz.

El anticuerpo anti-CDKA, detectó dos bandas en 34 y 37 KDa en el inmunoprecipitado con este mismo anticuerpo (Figura 13-B1), mientras que una sola banda se observó en 37 kDa en el inmunoprecipitado usando anti-CDKB1;1 (Figura 13-B2); cuando se realizó el blot usando el anti-CDKB1;1, se observó solo una banda en 37 kDa en los inmunoprecipitados usando tanto el anticuerpo anti-CDKA, como el anti-CDKB1;1 (Figura 13-B2), lo que indica que el anticuerpo contra la cinasa tipo B1;1 es específico y no así el anticuerpo anti-CDKA.

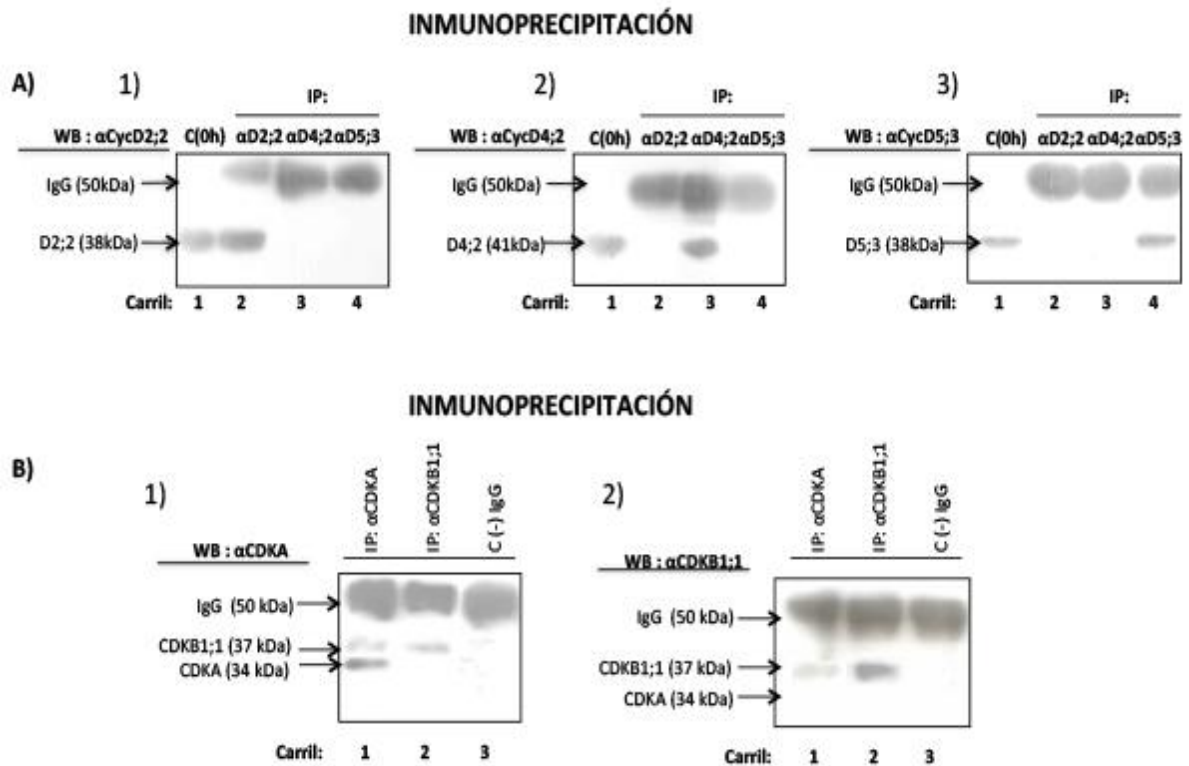


Figura 13. Especificidad de anticuerpos policlonales por la técnica de inmunoprecipitación. **A)** Western blots utilizando anticuerpos contra las ciclinas D correspondientes: **Carril 1.** Extracto de proteínas de ejes de maíz no embebido; **Carriles 2-4.** Inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-CycD2; 2, anti-CycD4; 2, y anti-CycD5; 3, respectivamente. **Paneles 1-3,** Western Blot con los anticuerpos anti-CycD2; 2, anti-CycD4; 2, y anti-CycD5; 3, respectivamente. **B)** Especificidad de los anticuerpos anti-CDK; **Carril 1.** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-CDKA; **Carril 2.** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-CDKB1;1; **Carril 3.** Inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-CDKB1;1, sin extracto de proteína. **Paneles B1 y 2,** Western blot con los anticuerpos anti-CDKA y anti-CDKB1; 1, respectivamente. Muestras biológicas representativas independientes n= 5.

6.2. Presencia y estabilidad de las ciclinas D.

6.2.1 Acumulación de ciclinas D y CDKs durante la germinación en ejes embrionarios de maíz

La regulación fase-específica de las ciclinas mediada por la síntesis y degradación en momentos definidos del ciclo celular determinan el nivel de regulación en la actividad de la cinasa asociada. La asociación de las diferentes ciclinas a las CDKs en el ciclo celular contribuye a la selección de sustratos específicos y a la estabilidad del complejo; así, la acumulación de las proteínas ciclinas y su proteólisis asegura la progresión e irreversibilidad del ciclo celular y una división celular exitosa

La estabilidad de las ciclinas D durante la germinación podría ser un primer punto de regulación en la actividad de cinasa de las CDKs de maíz, por ello, se estudió la acumulación de las ciclinas D y las CDKs durante las primeras 24 h del proceso germinativo en ejes embrionarios. El anticuerpo contra la ciclina D4;2 reconoce a la proteína de 41 kDa, mientras que el anticuerpo que detecta a la ciclina D5;3 reconoce una banda de 38 kDa. La cantidad de proteína del extracto de maíz añadida por carril fue similar en todos los casos, esto se demuestra cuando se usa un anticuerpo contra la ciclina B1 de humano, que reconoce una banda en 41 kDa en extractos proteicos de maíz; aunque no se ha definido la identidad de dicha banda, se ha demostrado que mantiene niveles constantes a lo largo del proceso germinativo, permitiéndonos usarla como patrón de carga para la realización de los estudios densitométricos (Lara-Núñez *et al.*, 2008).

Los anticuerpos anti-ciclina D2;2, detectan una banda en 38 kDa, la cantidad de dicha proteína decrece conforme se avanza en el proceso germinativo corroborando los datos previos (Figura 14A) (Gutiérrez *et al.*, 2005). La ciclina D4;2 está presente en extractos de semilla seca y sus niveles se incrementaron hasta las 18 h, decreciendo hacia las 24 h (Figura 14B). La ciclina D5;3 muestran niveles fluctuantes durante el periodo medido, teniendo un pico máximo a las 18 h (Figura 14C).

Así mismo, se evaluó la presencia de CDKA y CDKB1;1; el anticuerpo anti-CDKA detecta una banda en 34 kDa y el anti-CDKB1;1, una banda en 37 kDa. Ambas cinasas están presentes desde semilla seca y sus niveles son similares durante la germinación, con excepción de un pico de acumulación que estadísticamente es significativo a las 18 h cuando se detecta a la CDKB1;1 (Figuras 14D y E).

La cantidad de proteína utilizada para el Western blot (50 µg) permite que el anticuerpo anti-CDKA detecte una sola banda en la masa molecular correspondiente a la CDKA y no se observa a la proteína CDKB1;1.

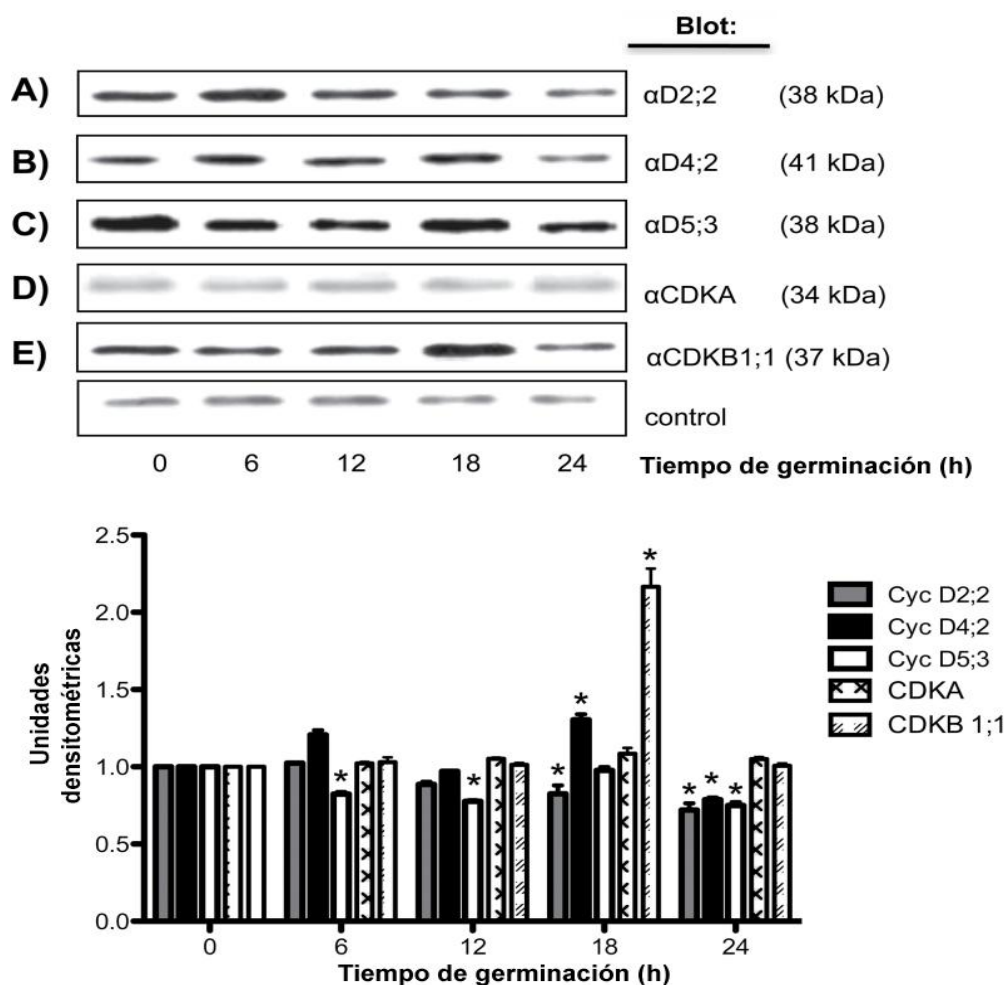


Figura 14. Acumulación de las ciclinas D y CDKs durante la germinación. Las ciclinas D y CDKs de maíz fueron identificadas por Western Blot, usando anticuerpos específicos **A)** ciclina D2;2, **B)** ciclina D4;2, **C)** ciclina D5;3, **D)** CDKA y **E)** CDKB1;1, a 0, 6, 12, 18 y 24 horas de germinación. Representación gráfica de los datos densitométricos para cada muestra. (*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con respecto al control, mediante prueba estadística Anova de una y dos vías (GraphPad Prism versión 5.0b-2007). Muestras biológicas representativas independientes $n = 5$.

6.2.2 Estabilidad de las ciclinas D durante la germinación en ejes embrionarios de maíz

Los niveles de muchos reguladores del ciclo celular, ya sean positivos o negativos en la progresión del ciclo celular en las células eucariotas están regulados por degradación. Este evento puede depender de la fase del ciclo celular o en respuesta a estímulos internos o externos (Marrocco *et al.*, 2010). De este modo, son los niveles de la proteína ciclina un importante determinante de la actividad de la CDK, y por lo tanto la degradación de la ciclina es un mecanismo fundamental en el control del ciclo celular. Por ello, mediante ensayos de estabilidad, usando cicloheximida (antibiótico que actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional; Peters *et al.*, 1994), se pudo determinar la estabilidad de las ciclinas D estudiadas.

Los resultados mostraron que la ciclina D5;3 es más inestable que las ciclinas D2;2 y D4;2, ya que después de 6 horas del tratamiento con cicloheximida la ciclina D5;3 desaparece por completo. Mientras que, a ese mismo tiempo todavía puede observarse aunque en menor cantidad la presencia de las ciclinas D2;2 y D4;2 (carril 9, Figura 15).

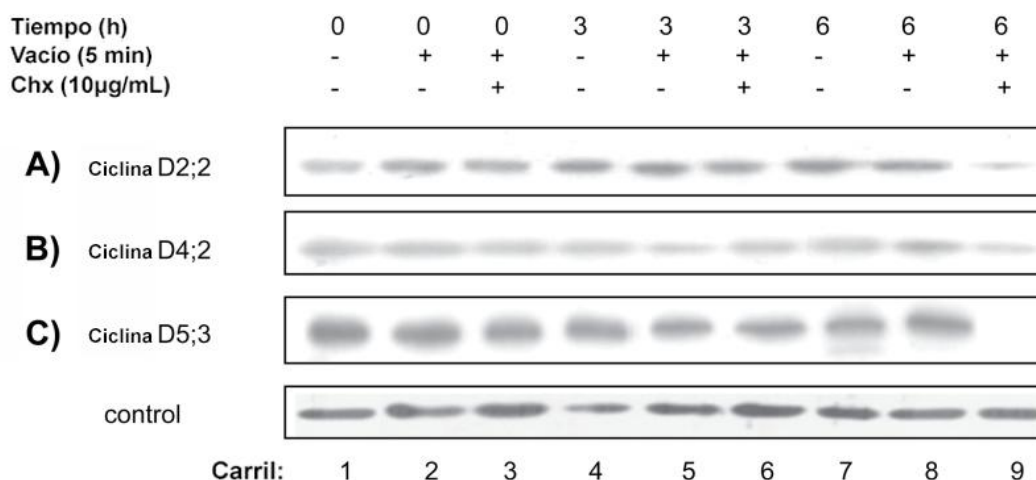


Figura 15. Estabilidad de las ciclinas D. **A)** ciclina D2;2, **B)** Ciclina D4;2 y **C)** Ciclina D5;3. **Carriles 1,4 y 7.** Extractos proteicos a 0, 3 y 6 horas sin tratamiento. **Carriles 2, 5 y 8.** Extractos proteicos tratados con vacío. **Carriles 3, 6 y 9.** Extractos proteicos tratados con vacío y cicloheximida. La proteína utilizada en cada carril es de 50 µg de proteína. Muestras biológicas representativas independientes n= 5.

Dado este resultado, se decidió incrementar el tiempo de ensayo de estabilidad hasta las 9 horas de germinación y verificar los niveles de las tres ciclinas. La Figura 16 (carriles 3, 6 y 9) indica que al agregar cicloheximida por 9 horas de germinación, las tres ciclinas desaparecen, corroborando que sus niveles durante la germinación dependen de un equilibrado proceso de síntesis-degradación.

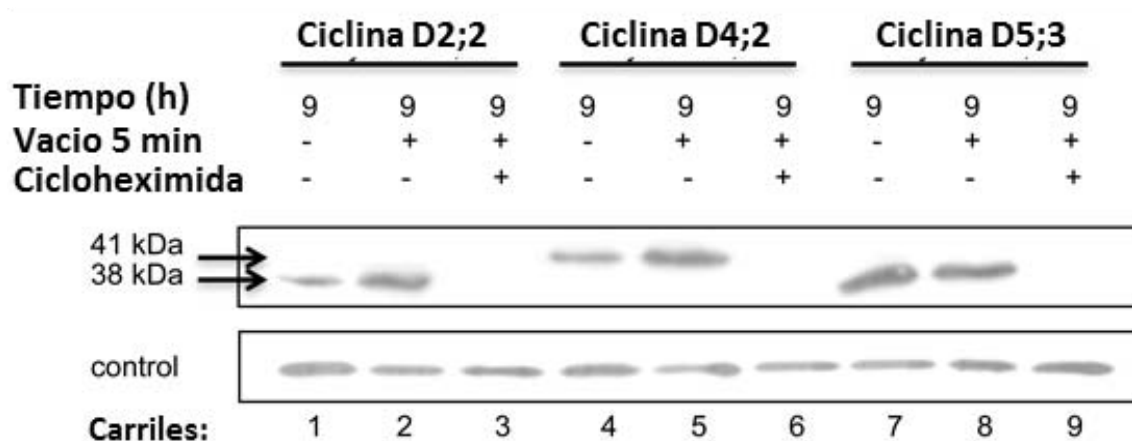


Figura 16. Estabilidad de las ciclinas D durante la germinación. Extractos de ejes embrionarios de maíz embebidos a las 9 horas de germinación. **Carriles 1, 4 y 7.** Extractos proteicos sin tratamiento. **Carriles 2, 5 y 8.** Extractos proteicos tratados con vacío y sin cicloheximida. **Carriles 3, 6 y 9.** Extractos proteicos tratados con vacío y cicloheximida. La proteína utilizada en cada carril es de 50 µg de proteína. Muestras biológicas representativas independientes n= 5.

6.3 Asociación entre las ciclinas D y CDKs

6.3.1 Asociación de las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKA y CDKB1;1.

La presencia de ciclinas D y CDKs durante las horas de imbibición estudiadas y el controlado recambio de ciclinas nos llevaron a estudiar las posibles interacciones entre las ciclinas D-CDKs como otro nivel de regulación, ya que las diferentes asociaciones pueden contribuir en la estabilidad del complejo y esto se refleja en la actividad de cinasa sobre un blanco específico.

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se logró determinar que las ciclinas D (D2;2, D4;2 y D5;3) mantienen una interacción con la CDKA (34 kDa) y con la CDKB1;1 (37 kDa) usando los anticuerpos correspondientes desarrollados y validados en nuestro laboratorio. Dicha interacción se da desde la semilla seca; como se muestra en la Figura 17 panel A), los niveles de interacción ciclina D2;2-CDKA van aumentando hasta las 12 h y posteriormente caen, mientras que los datos densitométricos indican que la interacción de la ciclina D2;2 con CDKB1;1 disminuye únicamente a las 12 h, comparando con el tiempo de 0 h (Figura 17B).

Las Figuras 17D y E muestran que la interacción de la ciclina D4;2 con la CDKA y la CDKB1;1 es muy similar. Estas interacciones se mantienen fuertemente desde las 0 a las 12 h en los mismos niveles y posteriormente disminuyen casi un 75 % comparado con lo observado en ejes embrionarios sin imbibición.

En lo que respecta a lo observado con la ciclina D5;3, la interacción con la CDKA no varía durante las primeras 18 h de germinación y solo se observa una disminución acentuada a las 24 h (Figura 17G). En la Figura 17H se observa la interacción entre la ciclina D5;3 y la CDKB1;1 de maíz, e interesantemente, solo hay presencia de estos complejos a las 18 y 24 h de la germinación.

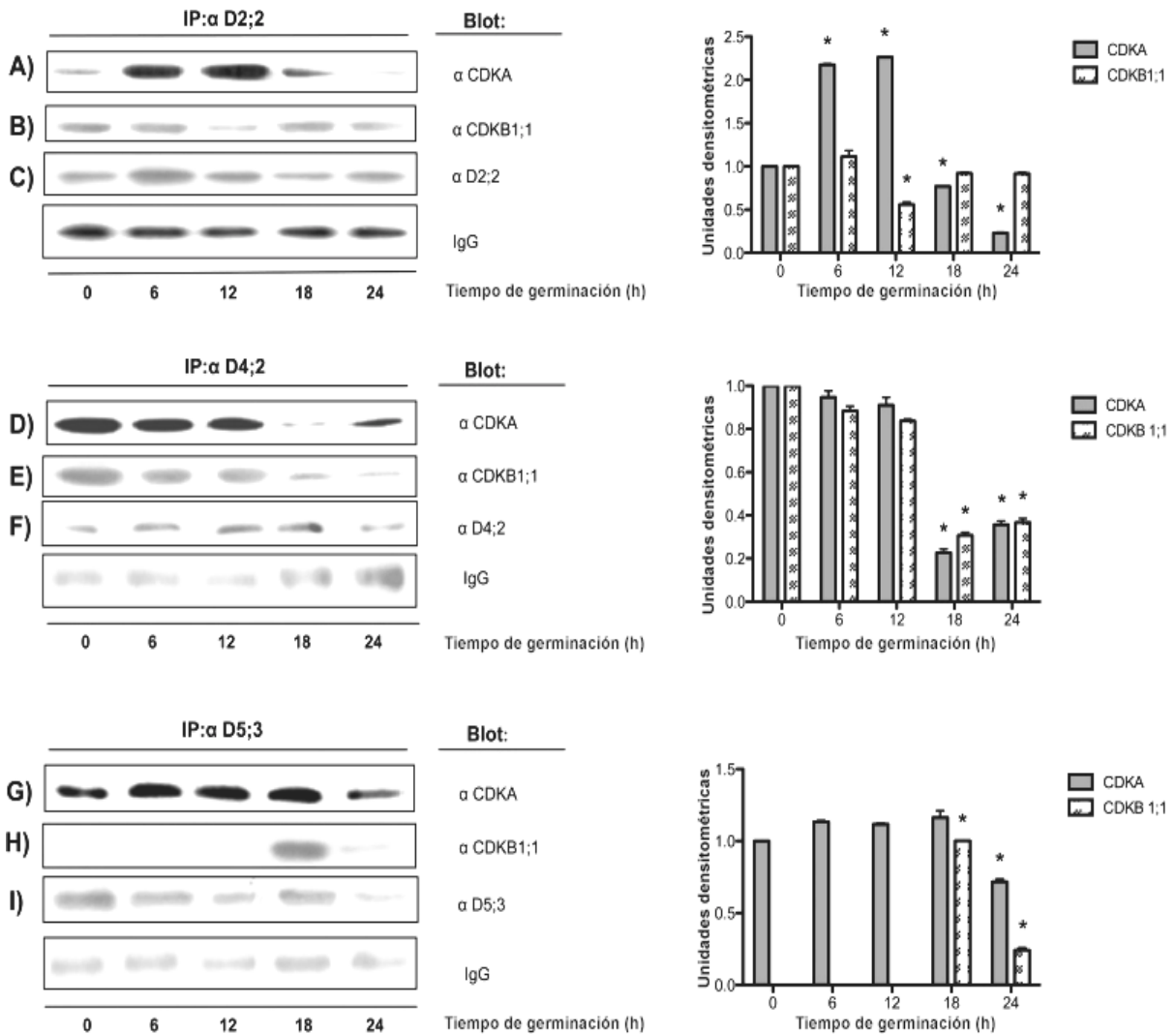


Figura 17. Interacción de las ciclinas D con CDKs durante las 0, 6, 12, 18 y 24 h de imbibición de ejes embrionarios de maíz. Acumulación de los complejos Ciclina D2;2-CDKs a lo largo de la germinación. **Panel A, D y G.** Co-inmunoprecipitación de las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKA; **Panel B, E y H.** Co-inmunoprecipitación de las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKB1;1. **Paneles C, F e I.** identificación de las ciclinas D en sus respectivos inmunoprecipitados. Identificación de las fracciones pesadas de las IgGs como control de carga. Gráficas de los valores densitométricos en relación con el control de carga y comparados con lo acumulado en la semilla seca.. (*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con respecto al control mediante prueba estadística Anova de una y dos vías (GraphPad Prism versión 5.0b-2007). Cada barra representa la media \pm ES de experimentos de muestras biológicas representativas independientes $n=4$.

6.4 Actividad diferencial de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKA y ciclinas D-CDKB1;1 durante la germinación de maíz.

Los complejos ciclina D-CDK controlan la transición de la fase G1 a la S, mediante la fosforilación de la proteína Rb y la disociación de esta proteína del factor transcripcional E2F/DP, de modo que la progresión sucesiva del ciclo celular depende de la correcta activación de este complejo. La estabilidad de los complejos depende de las diferentes asociaciones entre las diferentes ciclinas y CDKs, esta característica aumenta la afinidad por el sustrato y por lo consiguiente la eficiencia de fosforilación por la cinasa.

Dado que la función de las ciclinas D es regular al ciclo entre las fases G1 y S, mediante su interacción con las cinasas en estas fases, la evidencia previamente descrita de su asociación con una cinasa de las fases G2 y M (CDKB1;1) durante la germinación de maíz indicaría una función adicional, no conocida para este tipo de complejos (cycD-CDKB). Para determinar si estos complejos podrían ser funcionales realizamos ensayos de actividad de cinasa.

Usamos como blanco de cinasas a la proteína GST-ZmRBR, y encontramos que en los inmunoprecipitados con los anticuerpos contra cualquiera de las ciclinas D, la fosforilación de RBR no variaba con el tiempo. En estos inmunoprecipitados puede encontrarse cualquier CDK y esto podría ser la causa de tal indefinición. Por lo tanto, fue determinante implementar una técnica que nos permitiera separar los diferentes complejos y ver si en asociaciones ciclina-CDK específicas se pudiera mostrar actividad diferencial de cada complejo durante la germinación del maíz. Esto resolvería que no son solo formas redundantes de regulación.

Para ello realizamos una serie de inmunoprecipitaciones secuenciales, usando primero los anticuerpos anti-ciclinas D (Figura 18A), posteriormente los inmunoprecipitados fueron sometidos a un tratamiento con calor (65°C durante 3 horas) para disociar a los complejos ciclinas D-CDKs de la proteína A agarosa (el aumento de temperatura durante este periodo de tiempo permite separar a la fracción ligera de la fracción pesada de las IgGs, Figura 18B). El eluato resultante de la centrifugación contiene a los complejos ciclinas D-

CDKs, este sobrenadante se incubó durante toda la noche con anti-CDKB1;1 y agarosa A. La especificidad de este anticuerpo nos permitió separar a los complejos ciclinas D-CDKB1;1 (Figura 18A, B y Anexo 2), el sobrenadante de este último inmunoprecipitado se puso en contacto con la resina A pre- incubada con el anticuerpo anti-CDKA (Figura 18E), para obtener de manera indirecta los complejos ciclinas D-CDKA. El orden de estos IP se determinó de acuerdo con la especificidad de los anticuerpos, además, se realizaron los Western blots correspondientes a cada paso de la metodología para verificar que la separación de los complejos fuera la correcta (Figuras 18 C, D y E, panel derecho y Anexo 2). Al realizar la separación de las poblaciones de ciclinas D-CDKs, encontramos una diferencia significativa en la actividad de cinasa que coincide con la acumulación de los diferentes complejos formados durante los tiempos analizados de la germinación.

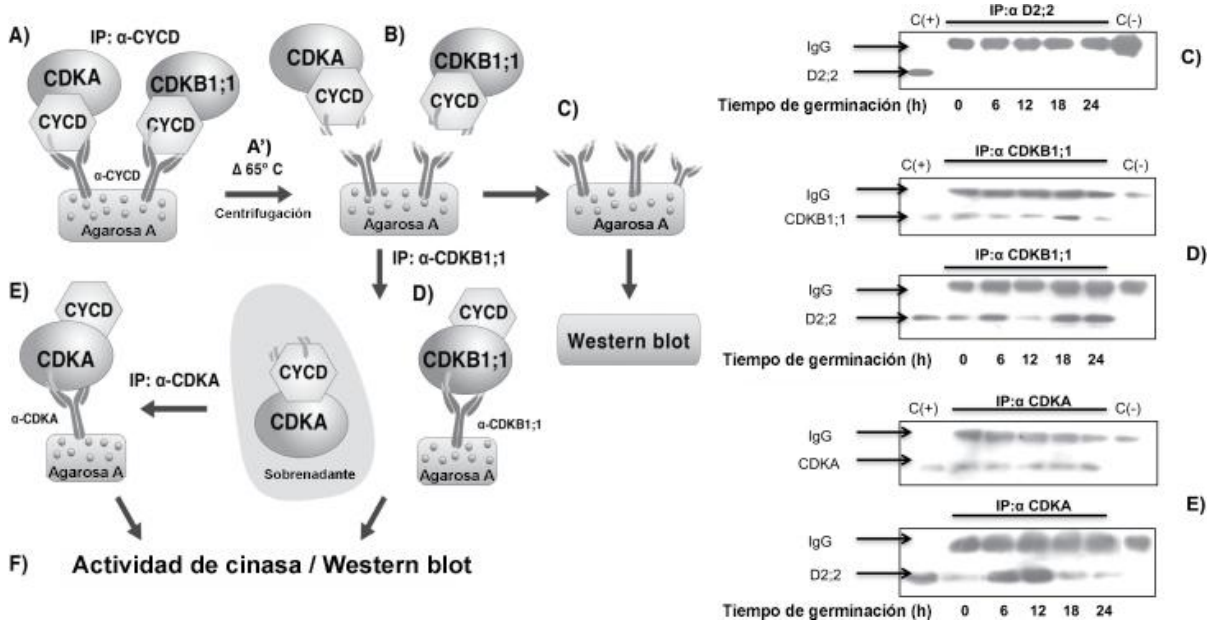


Figura 18. Método de inmunoprecipitación secuencial. Panel de la izquierda: **A)** inmunoprecipitación de las ciclinas usando los anticuerpos específicos anti-CycD. **A')** Incubación de los inmunoprecipitados a 65 °C durante 3 horas y centrifugación. **B)** Separación de los complejos ciclinas- D-CDKs de la agarosa A. **C)** Agarosa A e IgGs, resultado de la separación de los complejos ciclinas D-CDKs **(D)** Incubación con anticuerpo anti-CDKB1; 1 y Agarosa A. **E)** Incubación de sobrenadante resultante después del paso C) con anticuerpo anti-CDKA y Agarosa A. **F)** Actividad de cinasa de los inmunoprecipitados **E** y **D**. Panel derecho: la detección de proteínas blanco después de cada inmunoprecipitación. **C)** El reconocimiento de CycD2;2, en inmunoprecipitados con anti-CycD2;2. **D)** Reconocimiento de CycD2;2 y CDKB1; 1 **E)** Reconocimiento de CycD2;2 y CDKA. C (+) Extracto proteico de 12h de ejes embrionarios de maíz. C (-) Proteína A-agarosa incubada con anticuerpo y sin extracto proteico. Muestras biológicas representativas independientes n= 3.

La Figura 19 panel A, muestra la actividad de cinasa resultado de la interacción de la ciclina D2;2 con CDKA, la fosforilación de GST-RBR de maíz es similar durante las primeras 12 h, después de este tiempo de germinación la fosforilación de esta proteína se reduce en comparación con los ejes embrionarios no embebidos (0h). En el panel B, se observa la actividad de cinasa correspondiente a los complejos ciclina D2;2-CDKB1;1; los datos densitométricos y el Western blot, muestran que no hay cambios significativos en la fosforilación de la RBR durante los diferentes tiempos de imbibición.

Los complejos ciclina D4;2-CDKA mantienen una actividad de cinasa constante hasta las 12 horas de germinación, posterior a este tiempo la fosforilación de pRBR ya no se observa (Figura 19C); en los complejos formados con CDKB1;1, la actividad de cinasa cae a partir de las 12 h, pero interesantemente se vuelve a observar fosforilación de RBR de maíz a las 24 h de imbibición (Figura 19D).

Los resultados obtenidos para la actividad de cinasa en los complejos ciclina D5;3-CDKs, muestran que hay actividad de los complejos con la CDKA en todos los tiempos de germinación con una disminución significativa en la actividad a las 24 h. Sin embargo, los complejos formados con CDKB1;1 muestran que solo están activos a las 24 horas (Figuras 19 E y F); este resultado parece ser independiente de la cantidad de complejos que se forman, ya que existe una cantidad mayor de interacciones a las 18 h, según se observa en la Figura 17H.

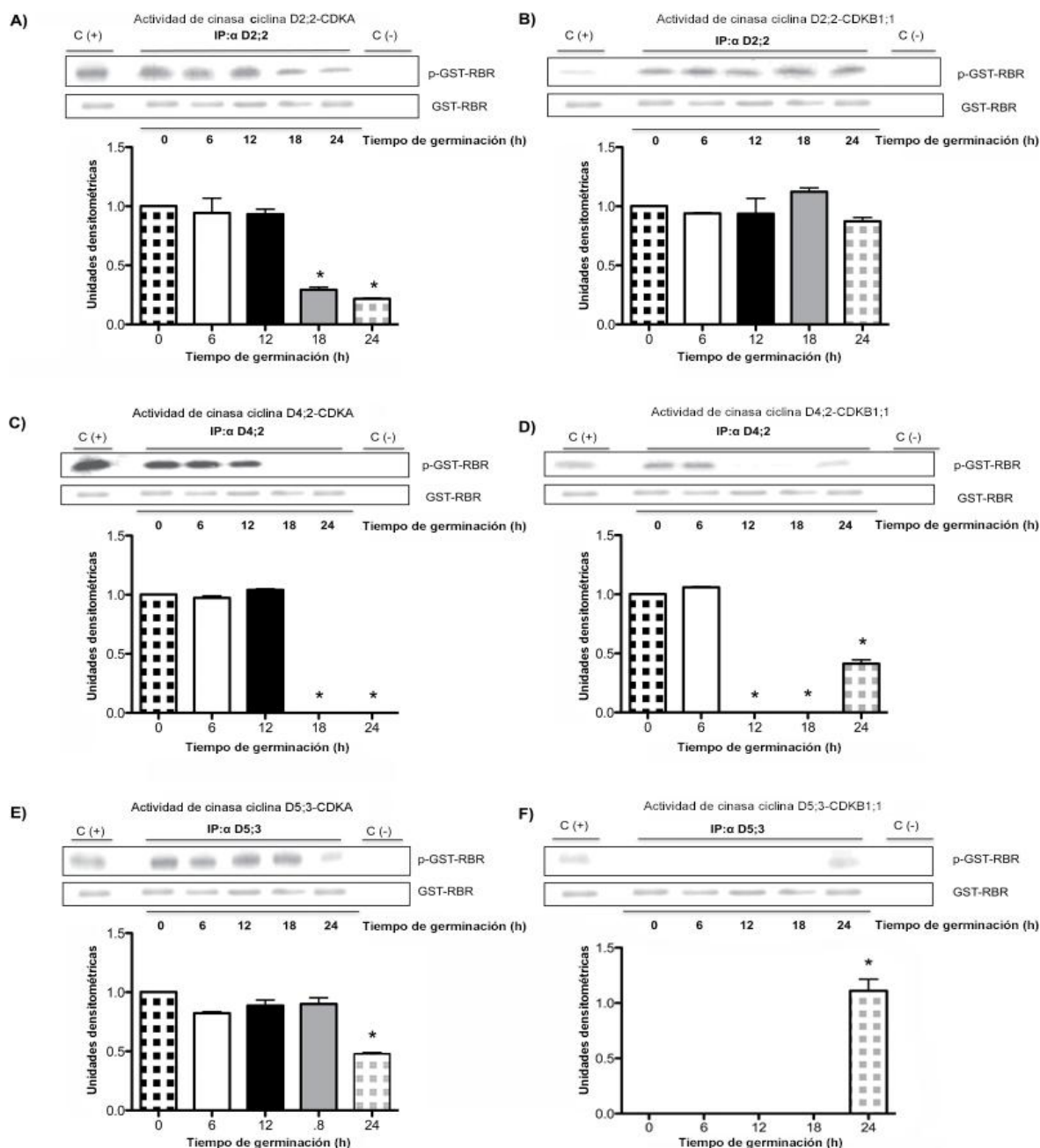


Figura 19. Actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKA o ciclina D-CDKB1;1 durante la germinación en maíz. **Paneles A, C y E.** Actividad de cinasa correspondiente a los complejos ciclinas D2;2, D4;2 o D5;3 con CDKA. **Paneles B, D y F.** Actividad de cinasa correspondiente a los complejos ciclinas D2;2, D4;2 o D5;3 con CDKB1;1. C (+) Actividad de cinasa de complejos ciclinas-CDKs unidos a la proteína CKS de maíz. C (-) Actividad de cinasa de inmunoprecipitados con anticuerpos anti-CycD sin pRBR. Gráficas de los valores densitométricos en relación con el control de carga y comparados con lo acumulado en la semilla seca. (*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con respecto al control mediante prueba estadística Anova de una y dos vías (GraphPad Prism versión 5.0b-2007). Cada barra representa la media \pm ES de experimentos de muestras biológicas representativas independientes $n=4$.

6.5. Estados de fosforilación de las CDKs unidas a las ciclinas D.

6.5.1. Regulación de los complejos ciclinas D-CDKs por fosforilación de T160, T14 y Y15

La actividad de la CDK resulta en la adición covalente de un grupo fosfato a la proteína blanco y la asociación de un tipo de ciclina específica con una CDK determina la actividad de los complejos ciclina-CDK sobre su sustrato. En mamíferos, esta actividad a su vez también es regulada por el estado de fosforilación de la CDK. La fosforilación de la treonina en la posición 161 activa la CDK aumentando la actividad de cinasa basal. Además, la fosforilación de la treonina 14 (T14) y de la tirosina 15 (Y15) por la cinasa Wee1 mantiene a la CDK inactiva, dicha fosforilación impide la entrada del ATP al sitio activo de la cinasa, situado al fondo de la hendidura catalítica de la CDK (Tsakraklides *et al.*, 2002).

Los resultados anteriores sugirieron que la actividad de cinasa diferencial de los complejos ciclinas D-CDKs sobre GST-ZmRBR en la germinación del maíz podría estar asociada al estado de fosforilación de las CDKs. Para demostrar tal mecanismo, se hizo una búsqueda *in silico* para determinar si las CDKs de maíz tenían conservados los residuos de treonina en las posiciones 14 y 160 y la tirosina en la posición 15 y si estos residuos estaban posicionados correctamente, tomando como plantilla la estructura cristalográfica de la Cdk2 de humano (Anexo 3).

Los datos muestran que para las CDKs tipo A estos residuos se encuentran conservados, pero la treonina activadora está en la posición 161, un residuo más que en la Cdk2 de mamíferos (posición T160). Por otro lado, en las CDKBs estos residuos se encuentran en las posiciones 44-45 y 190, debido a que este tipo de CDKs contienen 30 aminoácidos más en el extremo amino terminal, secuencia única para este tipo de cinasas. No obstante, al analizar las estructuras tridimensionales de ambas ciclinas se puede observar que los sitios de fosforilación T14, Y15 y T161, están posicionados de la misma forma en ambas CDKs, sugiriendo que el extendido extremo amino en CDKB1;1 no afecta la estructura tridimensional de esta cinasa (Anexo 3).

Para poder determinar si la fosforilación en T14, Y15 y T161 es importante en la activación de los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación, se realizaron ensayos de desfosforilación mediante inmunoprecipitaciones usando los anticuerpos anti-ciclina D. Estos complejos fueron tratados con una fosfatasa alcalina bajo diferentes condiciones y se observó el estado de fosforilación de las CDKs usando los anticuerpos anti-p-T160-CDK2 y anti p-T14-pY15-CDK.

En la Figura 20 se puede observar que incubando al complejo ciclina D5;3-CDK con fosfatasa alcalina durante 40 min, la banda correspondiente a la fosforilación en T14/Y15 y T161 desaparecen (Carril 3), sin embargo, se puede aún con el tratamiento la proteína CDKA está presente, lo que indica que solo una porción de la población de CDKA esta fosforilada y esta población si se desfosforila con estas condiciones.

Esto último se corroboró al incubar a la Fa con un inhibidor de fosfatasas previo a ser expuesto al IP con el anticuerpo anti- ciclina D5;3, el resultado muestra la fosforilación en los residuos regulatorios, demostrando que al inhibir a la fosfatasa alcalina está ya no ejerce función sobre las CDKs unidas a la ciclina D y se logra observar la fosforilación (Figura 20-A, carril 5 y 6).

El control positivo muestra ambas fosforilaciones porque no se expuso el IP al tratamiento, mientras que, cuando se incuba la Agarosa A, con anticuerpo y Fa ó anticuerpo con inhibidor la banda correspondiente a las fosforilaciones no se logró observar (Figura 20-A, carriles 1, 7,8 y 9).

Bajo estas condiciones se realizó el experimento de desfosforilación de los complejos ciclinas D-CDKs y se realizó la actividad de cinasa sobre GST-ZmRBR. Como se observa en la figura 20-B, al desfosforilar el complejo ciclina D2;2-CDKs por la acción de la fosfatasa, la actividad de cinasa se abate, mientras que, al incubar previamente la Fa con el inhibidor y/o el fosforo radiactivo, la fosforilación de la RBR se logra observar, así como se observa en los controles positivos (Figura 20-B, carriles 1,2,4, 6 y 7). Por último se realizó un control donde se incubó previamente a la Fa con el fósforo radiactivo y se observa como la fosfatasa alcalina hidroliza al fósforo (Figura 20-B carril 8).

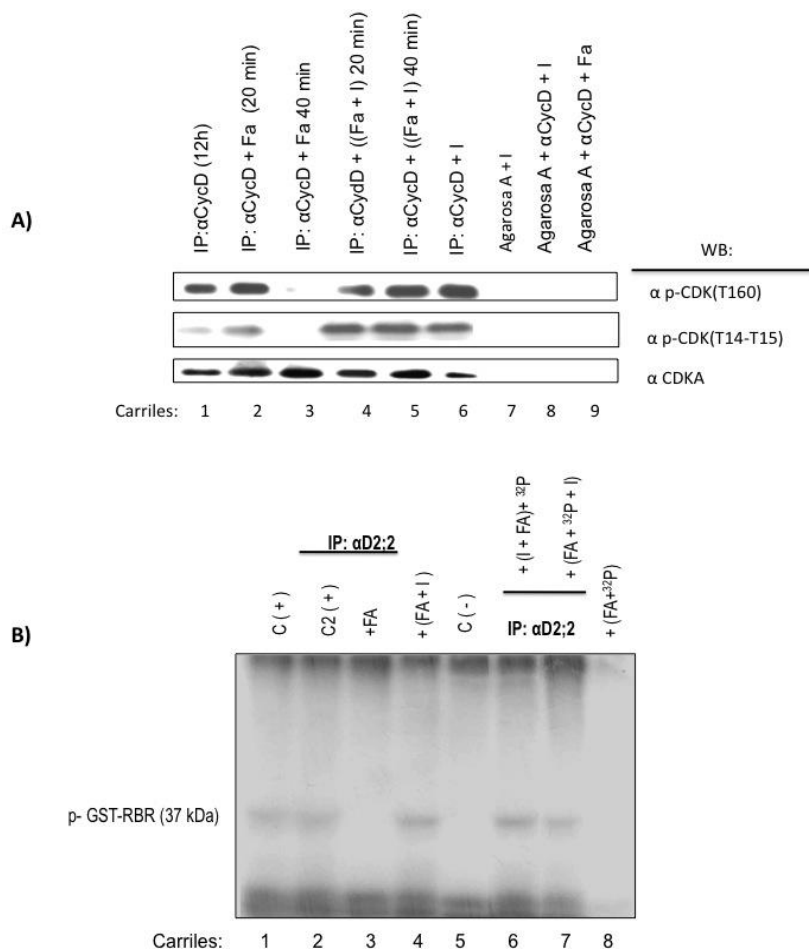


Figura 20. Desfosforilación de T14, Y15 y T160 de las CDKs unidas a ciclina D5;3. **Panel A)** Carril 1. Inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CycD5;3 y extracto proteico de semilla seca. **Carril 2.** Inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CycD5;3, tratado con 5 U de Fosfatasa alcalina (Fa) durante 20 min. **Carril 3.** Inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CycD5;3, tratado con 5 U de Fosfatasa alcalina durante 40 min. **Carril 4.** Inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CycD5;3, tratado con 5 U de Fosfatasa alcalina + inhibidor de fosfatasa (I) durante 20 min. **Carril 5.** Inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CycD5;3, tratado con 5 U de Fosfatasa alcalina + inhibidor de fosfatasa durante 40 min. **Carril 6.** Inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CycD5;3, tratado con inhibidor de fosfatasa. **Carril 7.** Proteína Agarosa A + inhibidor de fosfatasa. **Carril 8.** Proteína Agarosa A + inhibidor de fosfatasa + anticuerpo anti-CycD5;3. **Carril 9.** Proteína Agarosa A + fosfatasa alcalina + anticuerpo anti-CycD5;3. **Panel B)** Fosfatasa alcalina y actividad de CDK. **Carril 1.** C (+) Actividad de cinasa de los complejos ciclina-CDK unidos a la proteína CKS de maíz; **Carril 2,** Actividad de cinasa de inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-CycD2; 2; **Carril 3,** Desfosforilación del sustrato utilizado en el carril 2 (proteína RBR) por la fosfatasa alcalina; **Carril 4,** Inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina por 40 min pre-incubación con inhibidor y actividad de cinasa del inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-CycD2;2; **Carril 5.** C (-) Inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-CycD2; 2 sin extracto de proteína añadida; **Carril 6.** Preincubación de la fosfatasa alcalina con inhibidor (40min). A continuación se añadieron sustrato y ³²P, después de la incubación con el inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-CycD2; 2; **Carril 7,** Pre-incubación de fosfatasa alcalina con ³²P y el inhibidor y finalmente con el inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-CycD2; 2; **Carril 8,** Preincubación de la fosfatasa alcalina y ³²P (40 min).

Para determinar si la fosforilación de las proteínas en los complejos ciclina-CDK era importante para la actividad de cinasa, estos fueron tratados con Fa y se determinó la fosforilación sobre el sustrato GST-ZmRBR. La Figura 21 muestra el efecto a nivel de actividad de cinasa, del tratamiento de los complejos con Fa; en los paneles A, B y C se observa que la fosforilación de la proteína pRBR de maíz desaparece cuando se han tratado los complejos ciclina D2;2, D4;2 y D5;3-CDKs con Fa, comparado con los que no han tenido tratamiento alguno. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las cinasas asociadas a las tres ciclinas D estudiadas, podrían estar reguladas por fosforilación en los residuos T161, T14 y Y15.

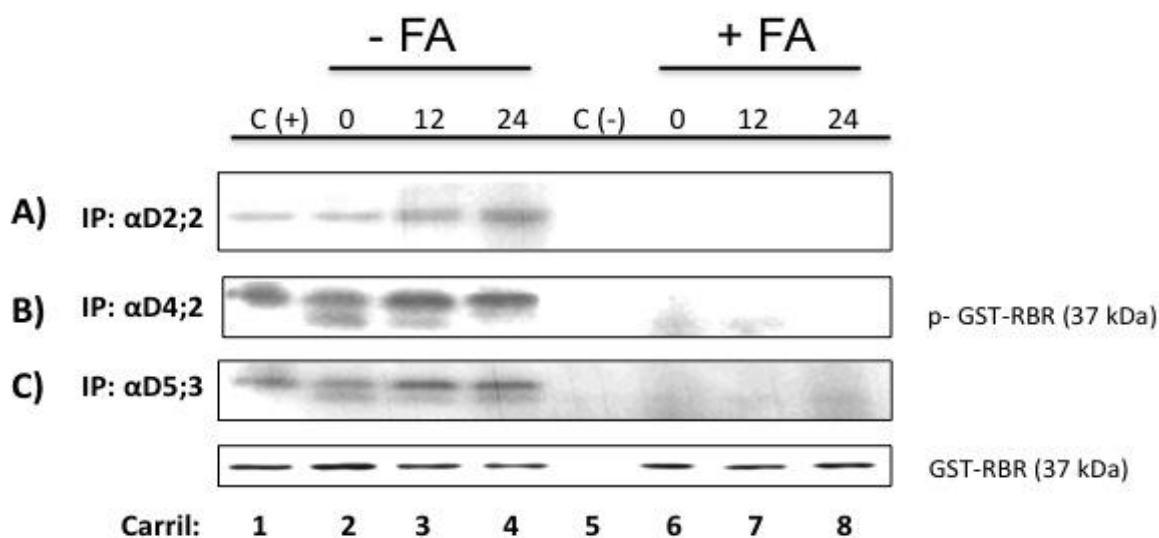


Figura 21. Efecto de la desfosforilación de las CDKs unidas a las ciclinas D. **Paneles A, B y C.** Inmunoprecipitados con los anticuerpos anti-ciclina D2;2, anti-ciclina D4;4 o anti-ciclina D5;3 con CDKs a 0, 12 y 24 h de germinación, sin y con tratamiento con fosfatasa alcalina. C (+) Actividad de cinasa asociada a la proteína CKS de maíz. El control de carga es la GST-ZmRBR purificada. C (-) Inmunoprecipitado usando el correspondiente anticuerpo anti- cycD sin sustrato (GST-RBR)

Posteriormente se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación usando los anticuerpos anti-ciclina D y los anticuerpos que reconocen a las treoninas 14 y 161 y a la tirosina 15 fosforiladas. Se observó que las CDKs unidas a las ciclinas D están fosforiladas en las tres posiciones de manera diferencial durante la germinación en el maíz.

Las CDKs unidas a la CycD2;2 se encuentran fosforiladas en la Treonina activadora (CDKA, T161 ó CDKB, T190) en todos los tiempos de germinación evaluados con un aumento a las 6 h. Posteriormente, el estado de fosforilación de las CDKs en este residuo va disminuyendo paulatinamente; además, las CDKs unidas a la ciclina D2;2 se encuentran fosforiladas en T14 y Y15 (fosforilación inactivante) varias veces más a las 18 h de germinación comparado con lo encontrado en semilla seca (Figuras 22A y B).

Los resultados para la ciclina D4;2 muestran que la fosforilación en la Treonina activadora de las CDKs unidas a esta ciclina va disminuyendo hacia las 12 h y posteriormente desaparece, mientras que la fosforilación en T14 y Y15 de las CDKs que se unen a esta ciclina es mayor a las 12 y 18 h de germinación, con respecto a lo visualizado en semilla seca (Figuras 22 C y D). Estos resultados parecen coincidir con la actividad de cinasa del complejo ciclina D4;2-CDKA, mientras que los resultados de las fosforilaciones de regulación inhibitoria parecen coincidir con los resultados de actividad de cinasa de los complejos ciclina D4;2-CDKB1;1 (Figura 22D).

Las CDKs unidas a la ciclina D5;3 se encuentran fosforiladas en la treonina activante sin ningún cambio durante las primeras horas de germinación estudiadas, después de las 12 h de imbibición la fosforilación de esta treonina disminuye ligeramente (Figura 22E). La fosforilación en T14 y Y15 de las CDKs unidas a la ciclina D5;3 tiene un incremento significativo entre las 12 y 18 h de germinación, implicando una mayor inactivación de la cinasa a estas horas de imbibición (Figura 22F).

Al comparar los resultados y haciendo un análisis más detallado con las actividades de cinasa al separar los complejos, pareciera que las fosforilaciones negativas podrían estar afectando mayoritariamente a los complejos ciclinas D-CDKB1;1 (ver resultados de ciclina D4;2-CDKB1;1 y ciclina D5;3-CDKB1;1).

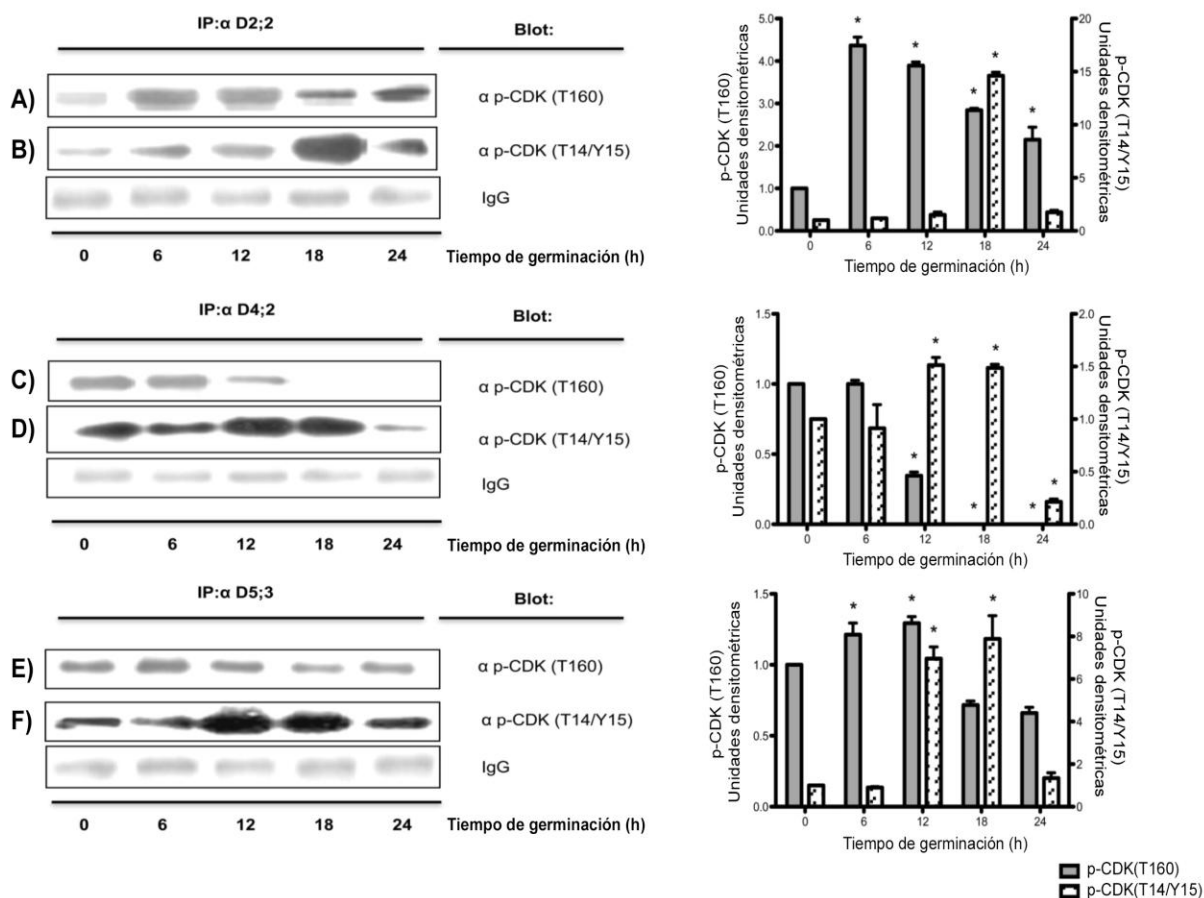


Figura 22. Estados de fosforilación de las CDKs unidas a las ciclinas D durante la germinación en el maíz. **Paneles A y B.** Fosforilaciones activadoras e inhibitoras de las CDKs unidas a la Ciclina D2;2. **Paneles C y D.** Fosforilaciones activadoras e inhibitoras de las CDKs unidas a la Ciclina D4;2. **Paneles E y F.** Fosforilaciones activadoras e inhibitoras de las CDKs unidas a la Ciclina D5;3. Identificación de las fracciones pesadas de las IgGs como control de carga. Gráficas de los valores densitométricos en relación con el control de carga y comparados con lo acumulado en la semilla seca. (*) Representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con respecto al control mediante prueba estadística Anova de una y dos vías (GraphPad Prism versión 5.0b-2007). Cada barra representa la media \pm ES de experimentos de muestras biológicas representativas independientes ($n=3$).

6.5.2. Estados de fosforilación de las CDKs de maíz durante la germinación.

Después de determinar los estados de fosforilación de las CDKs unidas a las ciclinas D, se realizaron inmunoprecipitaciones usando los anticuerpos anti-CDKA y anti-CDKB1;1, con la finalidad de conocer los estados de fosforilación de estas cinasas durante el proceso germinativo. Usando los anticuerpos anti- p-T160-CDK2 y anti- p-T14-Y15-CDK, se observó que la fosforilación de la CDKA en la treonina 161 disminuye conforme avanza el tiempo de imbibición, sin embargo, al detectar la fosforilación en T14 y Y15, solo se observó fosforilación a las 0, 18 y 24 horas de germinación (Figura 15A).

Al analizar los estados de fosforilación de la CDKB1;1, no se observó fosforilación en la T190 (T161) durante el proceso germinativo, contrariamente, se encontró que esta cinasa se encuentra fosforilada en T14 y Y15 durante todas las horas de imbibición, con un pico entre las 12-18 h (Figura 23D).

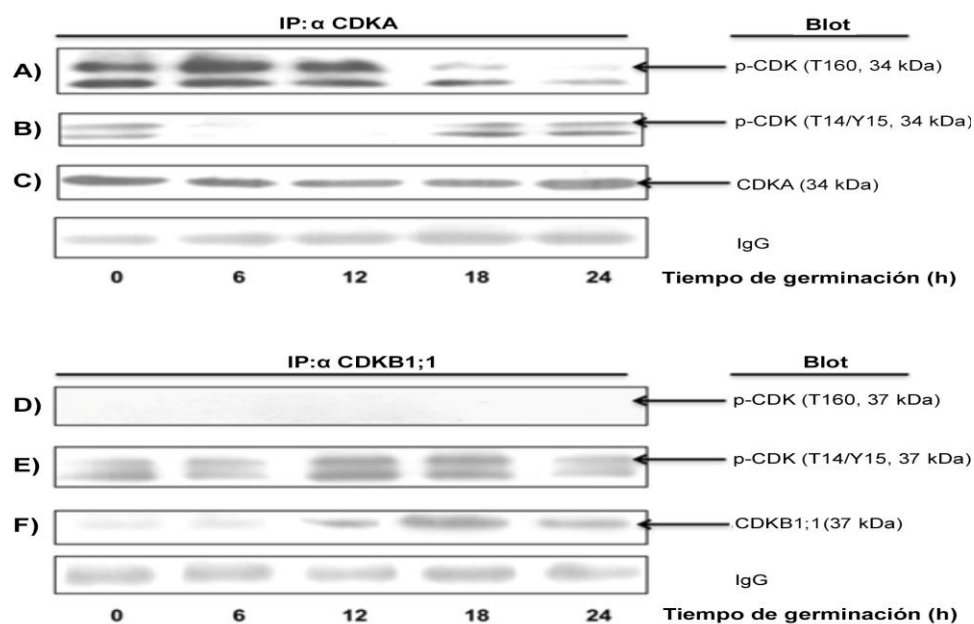


Figura 23. Estados de fosforilación de las CDKs durante la germinación del maíz. **Paneles A y B.** Estado de fosforilación de las CDKAs en extractos proteicos de maíz. **Paneles C y D.** Estado de fosforilación de la CDKB1;1 en extractos proteicos de maíz. **Paneles C y F.** identificación de las CDKs en sus respectivos inmunoprecipitados. En todos los paneles se observa como control de carga la fracción pesada de las IgGs. Muestras biológicas representativas independientes (n=3).

Para poder descartar que no se trataba de un artificio metodológico el que la CDKB1;1 no se fosforila en la treonina activadora, se realizaron inmunoprecipitaciones usando los anticuerpos anti-CDKs con extractos proteicos de tres diferentes tejidos: punta de hoja, raíz y mesocotilo. La elección de dichas secciones de los tejidos representan las zonas potencialmente en proliferación.

La Figura 24 muestra que en los inmunoprecipitados con anti-CDKB1;1, usando extractos de punta de hoja, raíz y mesocotilo, se observa una banda en 37 kDa que reconoce el anticuerpo anti-p-T160-CDK y que no se observa en extracto proteico de semilla seca; comparativamente en los inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-CDKA, el anticuerpo anti-T-160 reconoce un doblete en extracto proteico a 0h (34 kDa) y una sola banda en la misma masa molecular en punta de hoja.

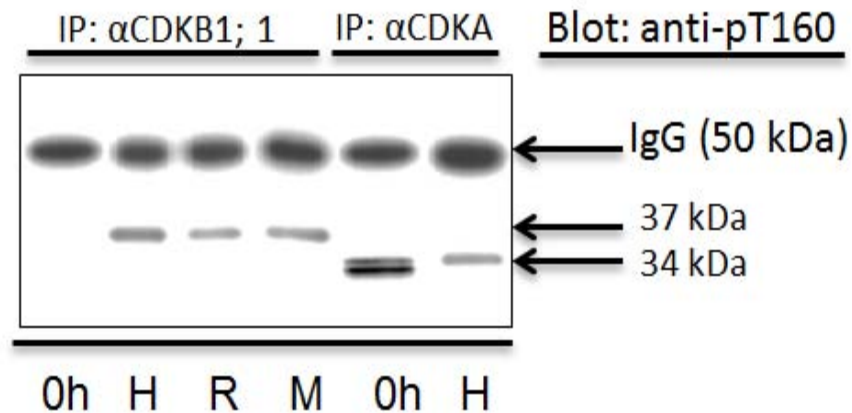


Figura 24. Fosforilación de la treonina 160 de las CDKs en tejidos. Western Blot con el anticuerpo anti-T160-CDK2 en Inmunoprecipitados con anti-CDKB1;1 en extractos de 0h de germinación, Punta de hoja (H), Raíz (R), Mesocotilo (M) y en inmunoprecipitados con anti-CDKA en extractos de 0 h de germinación y punta de hoja (H)

Estos resultados indican que la CDKA unida a las ciclinas D sí está fosforilada en la T161 en todos los tiempos de germinación estudiados, mientras que la CDKB1;1 no está fosforilada en esta treonina durante la germinación, pero sí en otros tejidos. A la fecha, en plantas no ha podido definirse con exactitud cómo se controlan la transición G2/M y la fase M, pero nuestros estudios sugieren que la regulación de las cinasas tipo B es diferente en germinación y en posteriores etapas de desarrollo.

7. DISCUSION DE RESULTADOS

7.1. Ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 durante la germinación: presencia y estabilidad.

Las ciclinas tipo D son las proteínas mediadoras entre el ambiente extracelular y el desarrollo de señales internas para la división celular; a diferencia de los mamíferos, las plantas tienen una mayor cantidad de ciclinas D, por lo que se ha sugerido que podrían tener una función redundante en la fase G1 y en la transición G1/S en complejos con CDKA. Se ha propuesto un modelo haciendo un número de predicciones con relación a la función de las ciclinas D regulando la transición G1/S que incluye que: 1) los genes y su función deben ser los responsables de modular las señales externas, 2) la actividad como proteína debe estar presente en esta transición y 3) los niveles en su actividad como subunidad reguladora deben estar limitados a G1/S (Masubelele *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos ensayos han demostrado que las ciclinas D podrían tener funciones específicas, por ejemplo, la sobreexpresión de la ciclina D3;1 en *Arabidopsis* prolonga la proliferación celular en hojas e inhibe la diferenciación (Planchais *et al.*, 2004), así mismo, la sobreexpresión de la ciclina D1;1 de *Antirrhinum* en células BY-2 de tabaco promueve las transiciones G1/S y G2/M (Schnittger *et al.*, 2002). Adicionalmente, los transcritos de las ciclinas D2;1 y D3;1 en tabaco, se acumulan predominantemente en células en mitosis, un patrón que no había sido reportado previamente en animales (Sorrell *et al.*, 2002).

El desarrollo programado en las plantas está frecuentemente relacionado a las respuestas medioambientales, señales intrínsecas y externas, que son necesarias para el control del ciclo celular a través de cambios en los niveles o actividad de las ciclinas D como subunidades regulatorias. La variación oscilante de los niveles de las ciclinas determina la formación de los distintos complejos y la especificidad por el sustrato, regulando así la actividad de cinasa de la CDK. Previamente a estos resultados, por ensayos de RT-PCR en maíz se demostró un patrón diferencial en la expresión de los mensajeros de las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 durante las primeras 24h de germinación (Quiroz *et al.*, 2006, Buendía *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que los niveles de proteína de estas ciclinas D son muy similares a lo largo de la germinación, disminuyendo solo a las 24 horas, lo cual no corresponde con lo observado a nivel de ARN mensajeros,

sugiriendo que estas ciclinas son reguladas transcripcional y traduccionalmente de manera distinta.

Por otro lado, los ensayos de estabilidad demostraron que estas ciclinas están presentes desde la semilla seca, pero a las pocas horas de imbibición (3-9 h), sus niveles disminuyen a niveles indetectables, sugiriendo que la proteína almacenada no necesariamente participa en la germinación, por lo que parte de la proteína observada en las horas iniciales, y que sería probablemente la de mayor relevancia fisiológica, debe ser producto de síntesis *de novo*. El hecho de que no se vean cambios importantes en los niveles de las ciclinas a lo largo de la germinación se explicaría por el eficiente equilibrio de síntesis-degradación que las regula durante las primeras 24 horas de imbibición.

Muchas proteínas inestables contienen un motivo PEST dentro de su secuencia, una marca de degradación vía ubiquitina-proteasoma; en las plantas las bases moleculares de la inestabilidad de proteínas con este motivo aún no son completamente claras, ya que algunas proteínas que contienen este motivo dentro de su secuencia pueden mantenerse estables por largos periodos de tiempo; un ejemplo es la ciclina D2;1 de *Arabidopsis*, que bajo tratamiento con cicloheximida o con un inhibidor del proteasoma, mantiene los mismos niveles de proteína durante periodos de tiempo largos, a pesar de tener el motivo PEST (Weingartner *et al.*, 2003).

Ensayos *in silico* han determinado que la ciclina D2;2 de maíz estudiada en este trabajo, presenta una potencial caja PEST, mientras que las ciclinas D4;2 y D5;3 carecen de esta característica (Quiroz *et al.*, 2006, Buendía *et al.*, 2011), sin embargo, nuestros resultados demuestran que tanto la ciclina D2;2 como la D4;2, parecen mantenerse más estables que la ciclina D5;3; esto nos sugiere que las plantas podrían tener otras vías de degradación específicas o diferentes a la vía clásica por proteasoma que degrada a algunas ciclinas D, como por ejemplo la aparición de otras proteasas independientes del proteasoma, o la aparición de versiones variantes del proteasoma, que contuvieran E3 ligasas que solo participan en determinados estados de desarrollo, como se ha demostrado en la vía de degradación de las KRPs (Ren *et al.*, 2008).

Mucha de la información acumulada se refiere a la expresión de estas ciclinas a nivel transcripcional y muy poca se encuentra disponible en cuanto a su función como unidades proteicas. Nuestros resultados nos permiten sugerir que estas ciclinas podrían ser fundamentales para la integración de señales externas como un primer punto de control

del ciclo celular y el desarrollo de la plántula durante la germinación, pero a diferencia de otros sistemas donde uno de los principales mecanismos de control es la destrucción específica de las ciclinas como método eficaz para regular la actividad de cinasa y, por lo consiguiente, las diferentes transiciones del ciclo celular, los niveles similares de proteína dado el eficiente recambio durante la germinación nos permite sugerir que en el maíz, las interacciones con las CDKs o con otras proteínas, podrían estar siendo el mecanismo principal regulatorio de la progresión del ciclo celular.

7.2. Las ciclinas D se unen a CDKA y CDKB1;1

En las plantas se ha determinado que dos cinasas están relacionadas directamente en la regulación y progresión del ciclo celular, la CDKA y la CDKB. La expresión y los niveles de proteína de la CDKA son constantes durante el ciclo celular, pero su actividad está regulada durante el ciclo, particularmente en las transiciones G1/S y G2/M. Por otro lado, las cinasas tipo B son incapaces de complementar en levadura la pérdida de *cdc2/CDC28*, lo que sugiere una funcionalidad planta-específica. Además, la sobreexpresión de esta cinasa en *Arabidopsis* detiene el ciclo celular en G2 y las células no entran a mitosis (Marrocco *et al.*, 2009), caracterizándola como una cinasa importante para la regulación en la transición G2/M y de la fase M.

La función predominantemente de las ciclinas tipo D en asociación con la CDKA es la regulación de la progresión del ciclo celular mediante la fosforilación de la proteína del retinoblastoma RBR. Mientras que en animales CDKs específicas regulan cada una de las fases y por lo tanto la progresión del ciclo celular, en las plantas, además de la CDKA, se ha sugerido que las CDKBs participan en la regulación de la transición G2/M en complejo con ciclinas tipo A y B. Sin embargo, una excepción a la regla es la interacción de CDKB2;1 con la ciclina D4;1 de *Arabidopsis*, que pueden formar un complejo activo cuando son expresadas en células de insecto, además, ambos transcritos se expresan en la misma fase del ciclo celular y en algunos tejidos (Kono *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que algunas ciclinas D3 de tabaco interaccionan con cinasas tipo A y B y estas asociaciones tienen actividad de cinasa sobre histona H1 y RBR *in vitro* (Kawamura *et al.*, 2006).

Nuestros resultados nos indican que hay interacción entre las ciclinas D y-CDKA ó CDKB1;1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Las variaciones

observadas en la acumulación de estos complejos sugieren una posible actividad diferencial a lo largo de la germinación; posiblemente la formación de los complejos de ciclinas D2;2, o D4;2 con CDKA podría estar estableciendo una función principal durante las primeras 12h de imbibición, mientras que para el complejo ciclina D5;3-CDKA esta función podría ser importante a tiempos más tardíos.

Mediante ensayos de doble híbrido se ha determinado que no todas la ciclinas tipo D de plantas interaccionan con CDKBs (Swaminathan *et al.*, 2000). Sin embargo, nuestros resultados indican que las tres ciclinas tipo D estudiadas mantienen una interacción diferencial con la CDKB1;1 *in vivo*, mostrando las variaciones más significativas a las 18 y 24 h de germinación. Estos resultados sugieren que las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 podrían no solo estar participando en el control de la transición G1/S cuando se encuentran asociadas a CDKA, sino también podrían contribuir al control de la transición G2/M durante el proceso germinativo. Esto último a través de la asociación con CDKB1;1 para la fosforilar proteínas blanco específicas de G2/M y M, quizás conformando una regulación del ciclo celular específica de maíz.

La aparición de complejos activos ciclina D5;3-CDKB1;1 únicamente a las 18 y 24 h de germinación podría indicar una función fase-específica de este complejo, contribuyendo al arranque de la mitosis. Esto se ha sugerido para los complejos formados por ciclinas D5;1-CDKB de *Arabidopsis* en hojas de tabaco, ya que mediante ensayos de complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC) se logró observar una unión transitoria en zonas donde se ubica el huso mitótico durante la división celular (Buroc *et al.*, 2010).

Sin embargo, no podemos descartar que las cinasas tipo B también pudieran estar adquiriendo un papel importante en la regulación de la fase G1, o en G1/S en complejo con las ciclinas D, ya que se ha descrito que en *Arabidopsis* los complejos ciclinas- CDKB *in vitro* pueden fosforilar a proteínas KRPs (Nakai *et al.*, 2005). La aparición de complejos ciclinas D-CDKA/B en los primeros tiempos de germinación podría sugerir una función dual entre las diferentes poblaciones de complejos para la regulación positiva en la progresión del ciclo celular.

Por una parte, los complejos ciclina D-CDKB1;1 podrían estar fosforilando a proteínas KRP para que los complejos ciclinas D-CDKA no sean inhibidos y pRBR pueda ser fosforilada, regulando G1/S; o bien, los complejos ciclinas D-CDKB1;1 podrían ayudar en

la hiperfosforilación de pRBR para la continuidad y regulación del ciclo celular, como se ha sugerido en mamíferos. No obstante, es de notar que varios reportes indican que estas proteínas inhibitoras no se unen a CDKB (Lui *et al.*, 2000), por lo que se vuelve fundamental resolver esta paradoja. Además, es importante analizar la localización subcelular de dichas proteínas para determinar si estos complejos se encuentran en el núcleo y sí podrían ser determinantes en la regulación de blancos esenciales para el ciclo celular.

7.3. Actividad de cinasa es diferencial entre los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación en maíz.

La unidireccionalidad del ciclo celular está determinada por las fluctuaciones en la actividad de cinasa de los complejos ciclinas-CDKs que es necesaria para la fosforilación de proteínas blanco en cada una de las transiciones. Los sustratos de los complejos ciclina-CDK incluyen reguladores de citoesqueleto, proteínas de matriz y membrana nuclear, proteínas asociadas a cromatina, reguladores transcripcionales, así como otras proteínas del ciclo celular (Joubes *et al.*, 2000).

Los resultados observados de la actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKs determinada por la fosforilación de GST-RBR de maíz, nos indicó que los complejos formados por las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKs estarían participando de manera activa a lo largo del proceso germinativo, probablemente permitiendo, entre otras cosas, la transcripción de genes importantes para la progresión del ciclo celular.

Nuestros primeros resultados de actividad de cinasa resultaron ser difíciles de interpretar, ya que, al inmunoprecipitar con los anticuerpos anti-ciclina D, la actividad de cinasa sobre la proteína RBR era el resultado de la actividad de toda la población de complejos ciclinas D-CDKs, por lo que no podíamos distinguir la actividad de cinasa de las diferentes asociaciones. Para ello, fue necesario implementar una técnica que nos permitiera separar los complejos ciclina D-CDKA y ciclina D-CDKB1;1.

El uso de inmunoprecipitaciones secuenciales nos permitió determinar diferencias entre las actividades de cinasa de las tres ciclinas tipo D con las CDKs. La actividad de cinasa asociada a los complejos ciclinas D-CDKA nos indica que las tres ciclinas D estudiadas funcionan como subunidad catalítica activando a esta cinasa, siendo para las ciclinas

D2;2 y D4;2 las primeras horas de germinación las de mayor actividad. Esto sugiere que estos complejos podrían participar en G1 y la transición hacia S, mientras que para los complejos con la ciclina D5;3 existe actividad constante, que solo disminuye hacia las 24 h, indicando que la función de este complejo podría ser importante en casi todo el proceso germinativo; estos resultados coinciden con lo observado al estudiar las asociaciones entre estas proteínas.

Se ha propuesto que la mayor parte de las células de ejes embrionarios de maíz se encuentra en la fase G1 hasta las 12 horas de imbibición, posteriormente existe un incremento en la incorporación de timidina tritiada al ADN (Baiza *et al.*, 1986) y acumulación de PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular), una proteína que se acumula durante la replicación del ADN (Herrera *et al.*, 1999) que indicarían entrada a la fase S; horas más tarde la aparición de figuras mitóticas hacia las 24 h sugiere que las células podrían estar entrando a M (Baiza *et al.*, 1986).

Las CDKs han sido implicadas en la regulación de la transcripción directamente, por la asociación y fosforilación de factores de transcripción o indirectamente, por la interacción con supresores y activadores de la transcripción que resulta en la inhibición o activación de genes (Dynlacht *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos nos indican que los complejos ciclinas D (D2;2, D4;2 y D5;3)-CDKA podrían estar participando importantemente en el control de la transición G1/S a través de la vía clásica de fosforilación, e inactivación, de la proteína RBR y como resultado, la activación de E2F-DP para la transcripción de genes importantes para la fase S. Por otro lado, la actividad de cinasa observada con los complejos ciclina D5;3-CDKA podría sugerir una participación más específica e importante durante la germinación, como la de mantener hiperfosforilado a la RBR de maíz no solo en la transición G1/S, sino en S y hasta la transición G2/M o incluso hasta las primeras fases de la mitosis, una forma de regulación a la re-entrada de un nuevo ciclo celular, similar a lo que se ha propuesto para la regulación del ciclo celular de tabaco, donde los transcritos de dos ciclinas tipo D (D2;1 y D3;1), coinciden con proteínas de G2/M (Sorrell *et al.*, 1999).

Pocos trabajos han descrito la posible funcionalidad de los complejos ciclinas D-CDKBs; en tabaco se ha reportado que los complejos formados por una CDKB y algunas ciclinas tipo D3 pueden tener actividad de cinasa sobre RBR e Histona H3. A pesar de no entenderse aún la función de los complejos ciclinas D-CDKBs en plantas, en este trabajo se encontró que las asociaciones de las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKB1;1

presentan actividad de cinasa. La fosforilación de GST-RBR de maíz mediada por ciclina D2;2-CDKB1;1 se mantiene constante durante la germinación, mientras que se encontraron diferencias significativas en la actividad de los complejos ciclina D4;2/D5;3-CDKB1;1, particularmente hacia las 18 y 24 horas de imbibición. Estos resultados sugieren que los complejos ciclinas D-CDKBs, podrían participar en promover la proliferación celular controlando la transición G2-M o bien impulsando la entrada a las primeras etapas de la mitosis permitiendo así el avance germinativo, además de también participar en los tiempos iniciales de la germinación y, por lo tanto, en las etapas iniciales del ciclo celular.

7.4. Las cinasas unidas a las ciclinas están fosforiladas en los residuos de regulación T14/Y15 y T160.

En eucariotes, la actividad de las CDKs se maximiza cuando el residuo de treonina (T-160) dentro del loop-T es fosforilado por acción de la cinasa activadora de CDKs (CAK). Además, como ha sido bien documentado en animales, las CDKs de G2/M son reguladas negativamente por la cinasa WEE y activadas por la fosfatasa CDC25 (Featherstone y Russell, 1991; Nurse, 1990). Por lo tanto, este mecanismo se ha descrito como un modelo universal de control del ciclo celular (Nurse, 1990) ya que se cumple para virtualmente todos los eucariotes, aunque su mecanística es poco conocida en plantas.

En *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* (Umeda *et al.*, 1998, Shimotohno *et al.*, 2003, Umeda *et al.*, 2005) se ha descrito que algunas ciclinas tipo H junto con CDKs tipo D, o bien la CDKF en forma monomérica, desempeñan un papel regulador del ciclo celular funcionando como CAK, enzima que cataliza la fosforilación del residuo de T (160/167), sobre los complejos ciclinas D-CDKA durante las fases G0/G1 y S, debido a que se ha observado un pico en la expresión de la ciclina H durante estas fases (Yamaguchi *et al.*, 2000; Shimotohno *et al.*, 2004).

Mutaciones puntuales en esta treonina abaten la actividad de cinasa de la CDKA en *Arabidopsis* (Dissmeyer *et al.*, 2007). Estos resultados indican que la adecuada regulación de la fosforilación de la T161 es un requisito previo para la plena actividad de CDKA y el desarrollo normal de la planta. Por otro lado, aunque se han hecho múltiples esfuerzos

en la búsqueda de la fosfatasa que en plantas sea la responsable de desfosforilar los residuos de inhibición de CDKs (T14 y Y15), no se ha podido obtener un homólogo de Cdc25 (Doonan y Kitsios, 2009; Boruc *et al.*, 2010).

La conservación de estos residuos de fosforilación en las CDKs de maíz, el conocimiento de cinasas homólogas a Wee, CAK y la inactivación de la actividad de cinasa cuando los complejos ciclina-CDK son desfosforilados por el tratamiento con fosfatasa alcalina, sugieren fuertemente que al igual que en mamíferos, las cinasas (CDKA y CDKB1;1) que forman complejos con las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3-CDKs podrían estar siendo regulados por un mecanismo semejante.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que las CDKs unidas a las ciclinas D están siendo fosforiladas en ambos residuos regulatorios, siendo la fosforilación activadora más importante durante los primeros tiempos de germinación y las fosforilaciones inhibitorias más relevantes en los últimos tiempos de germinación; no obstante, al analizar los estados de fosforilación de las CDKs a lo largo de la germinación, interesantemente se observa que solo la CDK tipo A se fosforila en la treonina 161, aunque ambos tipos de cinasas pueden estar fosforiladas en T14 y Y15.

Mediante modelados computacionales hemos podido determinar que la estructura de ambas CDKs es muy similar (Anexo 3), además de existir una gran identidad en la secuencia de aminoácidos en la zona cercana al loop-T, lo que sugiere que los residuos a fosforilarse podrían quedar expuestos de la misma forma y ser identificados por el mismo anticuerpo. Sin embargo, no fue posible encontrar la fosforilación en la treonina 161 de CDKB1;1, sugiriendo que la actividad de cinasa de los complejos de las ciclinas D-CDKB1;1 podría ser resultado de la propia interacción ciclina-CDK (una actividad de cinasa basal) y posiblemente la fosforilación en este residuo no es tan importante en la activación de estos complejos durante la germinación, aunque para corroborar esto último será necesario evaluar la actividad de cinasa en extractos de tejidos para saber si la fosforilación en la T160 cambia la actividad de la cinasa y existe alguna diferencia al fosforilar a la proteína RBR de maíz.

La inquietud por definir si las fosforilaciones en las CDKs de plantas son determinantes para la regulación del ciclo celular, ha permitido el desarrollo de técnicas usando otros

sistemas para poder dilucidar esta interrogante. En el 2012, Hirofumi *et al.* desarrollaron un sistema sencillo para purificar complejos *in vitro* de ciclinas-CDKs-CAK activos de *Arabidopsis* a partir de cultivos de *E. coli*; los resultados indicaron que los complejos CycD3;1-CDKA;1-CAK1 y CycB1;2-CDKB2;1-CAK1 podían fosforilar a la Histona H1, sin embargo no mostraron la existencia de complejos activos entre cycD-CDKBs.

Los resultados aquí mostrados nos indican que los complejos ciclinas D-CDKA parecen ser regulados por fosforilación en la T161 *in vivo*. Sin embargo, la regulación de la CDKB1;1 podría ser más compleja, ya que al no ser activada, en apariencia, por fosforilación en T161 (T190) durante la germinación, su activación podría estar mediada por otro tipo de estímulos derivados de fitohormonas (ejemplo: brasinoesteroides, auxinas, entre otras; Yoshizumi *et al.*, 1999), fuente de carbono, formación de complejos con otras ciclinas que se encuentran en abundancia después de las primeras 24 h de germinación (ejemplo: ciclinas A y B; Mészáros *et al.*, 2000), localización subcelular o bien podría estar siendo fosforilada por otro tipo de cinasa que solo se encontrara en otros tejidos y que está ausente durante la germinación.

Ha sido bien establecido que en mamíferos las CDKs de G2/M y M son reguladas por fosforilaciones inhibitorias a cargo de Wee; en plantas, Sun *et al.* (1999), describieron que al incubar a la proteína p13suc1 (que une fuertemente a CDKs) con extractos proteicos de semillas de maíz inmaduras y con la proteína recombinante Wee1 de maíz, se inhibió la fosforilación de la histona H1, proponiendo que la fosforilación de T14 y Y15 provocaba la inactivación de las CDKs de G2/M. Nuestros resultados nos indican que las fosforilaciones en los residuos T14-Y15, podrían estar regulando principalmente la actividad de CDKA en G2, ya que esta cinasa sí se fosforila en estos residuos durante la fase tardía de la germinación y la disminución o desaparición de su actividad se correlaciona con los tiempos donde hay un aumento de la fosforilación inhibitoria en la CDK. En *Arabidopsis* esta inhibición se ha logrado determinar por ensayos *in vitro*, donde al incubar a CDKA;1 con la cinasa Wee1, ya no se es posible observar la fosforilación en la Histona H1 (Hirofumi *et al.*, 2012). Por otro lado, la CDKB1;1 está fosforilada en estos residuos inhibitorios, particularmente entre las 12 y 18 horas de germinación, donde se han observado las variaciones más significativas en la actividad de cinasa, resultado de la separación de los complejos con las ciclinas D. Sin embargo, será interesante poder definir estrategias más específicas para poder dilucidar la mecanística de activación ya

que los resultados mostrados son aún difíciles de explicar. Sin embargo, lo anterior nos permite sugerir que un posible mecanismo de regulación de la progresión del ciclo celular en maíz, sería inhibir a la CDKA hacia G2/M a través de estas fosforilaciones, dejando a CDKB como la principal cinasa en esta interfase, según lo observado en los ensayos de interacción y actividad diferencial con las ciclinas D4;2 y D5;3.

Estos resultados abundan positivamente en la comprensión de la funcionalidad de proteínas claves del ciclo celular sobre el proceso de germinación en el maíz. El grado de conservación de los reguladores de G1/S entre mamíferos y plantas implica que la ruta RB-E2F-DP se ha podido conservar evolutivamente y serían las ciclinas D en maíz las proteínas que perciben las condiciones medioambientales y responden para reactivar el ciclo celular en las células embrionarias a través de esta vía. Sin embargo, este trabajo describe algunos aspectos particulares en el maíz, dado que el gran número de ciclinas presentes en esta especie sugiere fuertemente que su función regulatoria está mediada por la formación de múltiples complejos y por la capacidad de activar a la CDK asociada y no tanto por la acumulación de dichas ciclinas en tiempos específicos; esto podría repercutir en una posible conjunción de las actividades individuales de las ciclinas D a través de sus asociaciones para permitir el establecimiento y la progresión del ciclo celular y de esta forma, de la germinación.

Este trabajo describe que a diferencia de los animales, donde se ha descrito que la regulación de la cinasa de G1/S está mediada por inhibidores específicos y es en G2/M donde las fosforilaciones son el principal mecanismo de regulación, en el maíz la activación de la CDKA (que actuaría en G1/S y G2) estaría mediada por fosforilaciones, particularmente la fosforilación activadora. Por otra parte, la actividad de cinasa de CDKB1;1 (cinasa de G2/M y M), única en plantas, se regularía por mecanismos aún desconocidos.

Finalmente, el avance de la germinación depende de una proliferación exitosa de las células del eje embrionario para culminar en el establecimiento de una plántula, evento que es moderado por el avance en el ciclo celular dependiente de la función de los complejos ciclinas D-CDKs. La formación y la activación de estos complejos, integrados por diferentes ciclinas D y CDKs, no parecieran constituir una función redundante, sino más bien responder a una conducta individual, lo que sugiere que cada complejo tiene un papel diferente durante el proceso germinativo.

8. CONCLUSIONES

- Las ciclinas D se acumulan desde semilla seca y durante todo el proceso germinativo, sugiriendo un equilibrio entre la síntesis y degradación de estas proteínas.
- Los niveles de CDKA no muestra diferencias durante la germinación, mientras que los niveles de acumulación de CDKB1;1, solo se observan aumentados a 18 h
- Hay asociación de las tres ciclinas D, con CDKA y CDKB1;1 de manera diferencial, con el tipo de cinasa y durante los tiempos de germinación.
- Se logró implementar una técnica para la separación de los complejos ciclina D-CDKA y ciclina D-CDKB1;1, usando la especificidad de los anticuerpos.
- La actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKA, están siendo funcionales sobre Zm-RBR durante las primeras horas de germinación, mientras que la actividad asociada a los complejos ciclinas D-CDKB1;1, podrían sugerir una regulación diferente en G2/M
- El tratamiento con fosfatasa alcalina y la desaparición de la fosforilación en RBR, permite sugerir que dichos complejos podrían estar regulados por los estados de fosforilación de las CDKs.
- Las CDKs unidas a las ciclinas D están fosforiladas en los residuos de regulación, siendo la fosforilación en la T160 la más abundante durante las primeras horas de germinación y la fosforilación en T15/Y15 en los últimos tiempos de germinación
- La CDKB1;1 no está fosforilada en la treonina activadora (T160) durante la germinación pero sí en tejidos en proliferación (base de hoja, punta de raíz y coleoptilo)

Con la información adquirida con este trabajo, nosotros hemos planteado dos posibles mecanismos de regulación de los complejos ciclinas D-CDKs durante el ciclo celular en la germinación del maíz.

En el primero, nosotros sugerimos que los complejos ciclinas D-CDKA y ciclinas D-CDKB1;1, están fosforilando a la proteína RBR durante todo el ciclo celular, como se ha demostrado para mamíferos (un mecanismo de regulación para la entrada a un nuevo ciclo), marcando una función específica de la CDKB1;1 en las primeras etapas del ciclo celular durante la germinación en el maíz.

Esto implica la formación de diferentes complejos entre esta cinasa y las tres ciclinas D que se estudiaron, ya que tanto la asociación como la actividad de cinasa es diferencial durante las horas de imbibición.

Un segundo mecanismo, sería, por un lado además de que los complejos ciclinas D-CDKs están fosforilando a la RBR, la CDKB1;1 podría estar participando en la regulación positiva del ciclo celular en G1/S, mediante la fosforilación de los inhibidores de ciclina D-CDKA (proteínas KRP), para que dicho inhibidor no deshabilite la función de la cinasa A y está fosforile eficientemente a la proteína RBR, sin descartar que las dos poblaciones de ciclinas D-CDKs podrían estar fosforilando otros sustratos durante las fases más tardías del ciclo celular.

Sin embargo, en ambos mecanismos nosotros proponemos una forma de regulación donde la cinasa típica de G2/M (CDKB), esta participando activamente en fases tempranas del ciclo celular, aparentemente regulando la transición G1/S de manera conjunta y positiva como lo hace la cinasa tipo A.

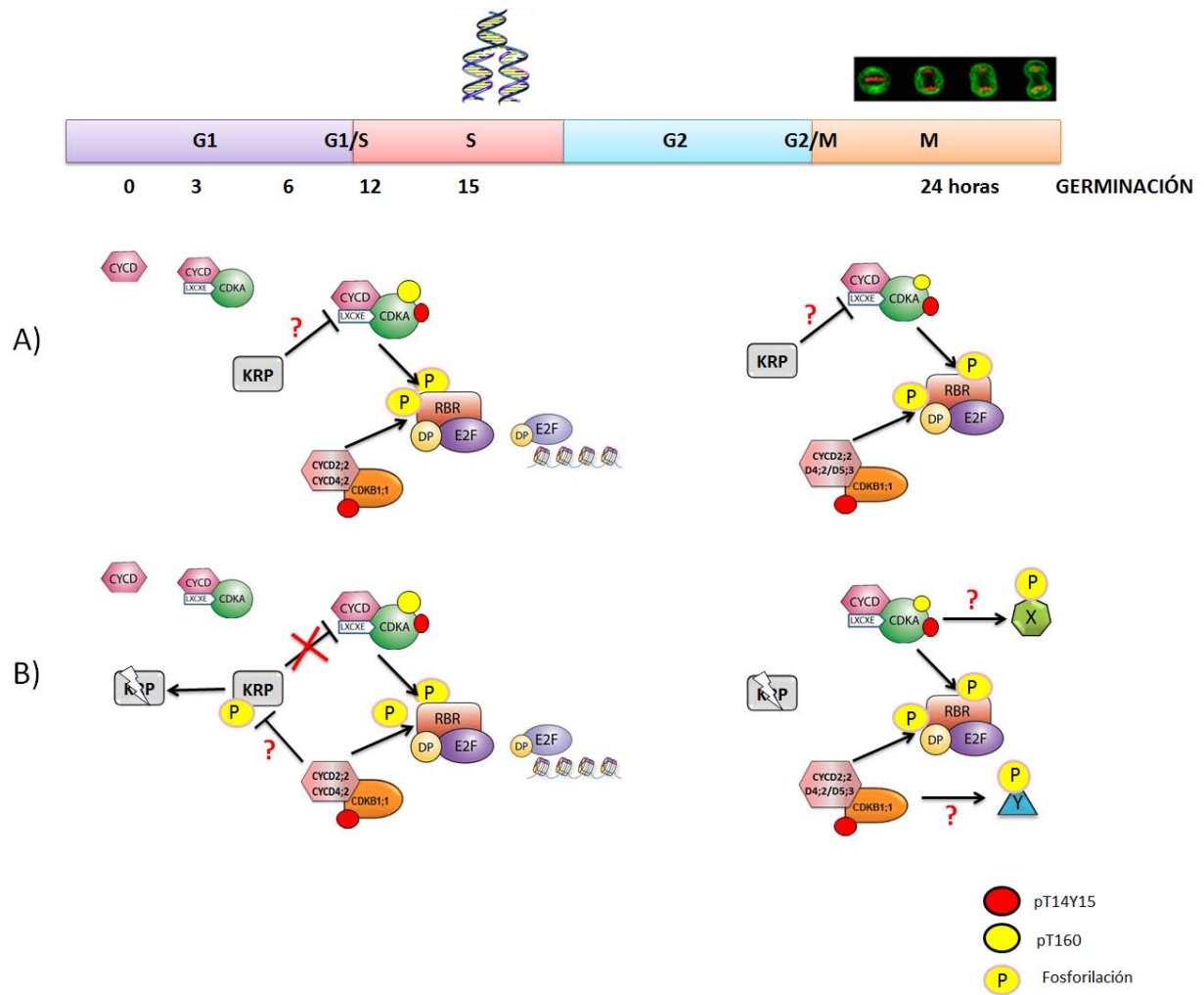


Figura 25. Modelos propuestos de regulación de la actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación en el maíz. A) regulación del complejo ciclinas D-CDKA/CDKB1;1 vía Zm-RBR-E2F-DP. B) regulación vía RBR-E2F-DP y participación de CDKB1;1 en G1/S, participación de complejos activos ciclinas D-CDKA/CDKB1;1 sobre RBR y otros posibles sustratos implicados en la regulación G2/M y M.

9. PERSPECTIVAS

Durante este trabajo se lograron esclarecer algunas de las formas de regulación de la actividad de cinasa de complejos de ciclinas D-CDKs, sin embargo aún hay algunas preguntas pendientes, que son importantes e interesantes de concretar y estudiar.

El estudio de la activación de la CDKB es fundamental para entender los mecanismos de regulación del ciclo celular en plantas, para deducir si en verdad esta cinasa es activada por otra no presente en extractos de germinación, será necesario realizar ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes que podrían ayudarnos a saber concretamente si es una CAK la proteína que pudiera estarla activando, o bien, nosotros podríamos usar estos complejos como proteínas de anclaje para unir a la cinasa activadora desde extractos proteicos de maíz y conocer a la proteína por análisis de proteómica. Adicionalmente, nosotros podríamos realizar ensayos de mutagénesis para comprobar dicha activación.

Por otro lado, el estudio de proteínas inhibitoras como KRP será otro punto fundamental, la desaparición de la fosforilación de la GST-RBR de maíz en determinados tiempo y por diferentes complejos podría ser consecuencia de la acción de estas proteínas, para determinar esto, nosotros necesitaríamos caracterizar a las KRPs de maíz y demostrar su capacidad inhibitoria sobre estos complejos.

Finalmente, será determinante evaluar la localización sub-celular de dichas proteínas, para ello necesitaremos realizar ensayos de fraccionamiento que separar a la fracción citoplasmática de la nuclear en un extracto celular e identificar a las proteínas, complejos y actividad en cada fracción. Estos ensayos podrían ser complementados con ensayos de inmunofluorescencia.

10. REFERENCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). Chapter 17. Molecular Biology of the Cell. Nueva York: *Garland Science*.pp. 238-356

Amon A. (1996). Mother and daughter are doing fine: asymmetric cell division in yeast. *Cell*. 84:651-4.

Baiza MA, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E. (1989). DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol*. 135: 416- 421.

Barrôco RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inzé D, Mironov V. (2003). Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol Life Sci*. 60:401-12.

Barroco RM, Peres A, Droual AM. (2006). The cyclin-dependent kinase inhibitor Orysa KRP1 plays an important role in seed development of *Oryza sativa*. *J. Plant Physiol*. 142: 1053–1064.

Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G. (1994). Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene*. 9:1633-40.

Bell MH, Halford NG, Ormrod JC, Francis D. (1993). Tobacco plants transformed with *Cdc25*, a mitotic inducer gene from fission yeast. *Plant Mol Biol*. 23: 445–451.

Bewley JD, Black M. (1994). Seeds: Physiology of development and germination (2nd edition). New York, Plenum.

Bewley JD. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*. 9: 1055–1066.

Bidwell RGS. (1979). Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. Segunda Edición. México. Pp. 293-309

Bisbis B, Delmas F, Joubes J. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors regulate the CDK/cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit. *J. Biol. Che*. 281: 7374–7383.

Boniotti MB, Gutiérrez C. (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J*. 28:341-350.

Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla L, García E, Vázquez-Ramos JM. (2011). The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plant*. 143: 297–308.

Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, Rombauts S, Mylle E, Hilson P, Inzé D, De Veylder L and Russinova E. (2010). Functional Modules in the *Arabidopsis* Core Cell Cycle Binary Protein–Protein Interaction Network. *Plant Cell*. 22: 1264–1280.

Capron A, Serralbo O, Fülöp K, Frugier F, Parmentier Y, Dong A, Lecureuil A, Guerche P, Kondorosi E, Scheres B, Genschik P. (2003). The *Arabidopsis* anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell*. 15(10):2370-82.

Ciemerych MA, Sicinski P. (2005). Cell cycle in mouse development. *Oncogene*. 24(17):2877-98.

Chaubet-Gigot N. (2000). Plant A-type cyclins. *Plant Mol. Biol*. 43:659–75

Coelho CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins A. (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol*. 238: 2323-2336.

Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Shen WH, Dong A, Genschik P. (2000). Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *Plant J*. 24:763–73

Cross FR. (1988). DAFI a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 8: 4675-4684.

Cross FR. (1990). Cell cycle arrest caused by CLN gene deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* resembles START-I arrest and is independent of the mating-pheromone signalling pathway. *Mol Cell Biol*. 10: 6482-6490.

Cuevas MJ. (2014) Maíz: Alimento fundamental en las tradiciones y costumbres mexicanas. *Revista de Turismo y Patrimonio Cultural*. Vol. 12: 425-432

Dahl M, Meskiene I, Bögre L, Ha DTC, Swoboda I. (1995). The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell*. 7:1847–57

Dante RA, Sabelli PA, Nguyen HN, Leiva-Neto JT, Tao Y, Lowe KS, Hoerster GJ, Gordon-Kamm WJ, Jung R, Larkins BA. (2013). Cyclin-dependent kinase complexes in developing maize endosperm: evidence for differential expression and functional specialization. *Planta*. 239:493-509.

De Veylder L, Beeckman T, Inzé D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 655-665.

De Veylder L, de Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B. (2001). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* 208:453–62

Dewitte W, Murray JAH. (2003). The plant cell cycle. *Ann Rev Plant Biol.* 54: 235–64.

Dirk Inze. (2007). Cell cycle and plant development. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. p 364-87.

Dissmeyer N, Weimer AK, Pusch S, De Schutter K, Alvim Kamei CL, Nowack MK, Novak B, Duan GL, Zhu YG, De Veylder L, Schnittger A. (2009). Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1. *Plant Cell.* 11: 3641-54.

Doebley J. (1990). Molecular evidence and the evolution of maize. *Econ. Bot.* 44: 6- 27.

Doebley J. (2004). The genetics of maize evolution. *Ann. Rev. Genet.* 38: 37-59.

Doebley JF and Iltis HH. (1980). Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I.A subgeneric classification with key to taxa. *Ame. J. Bot.* 67: 982-993

Doonan JH and Kitsios G. (2009). Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases. *Mol Biotechnol.* 42:14-29

Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C. (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380:520–23

Doonan JH and Kitsios G. (2009). Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases. *Mol Biotechnol.* 42:14-29

Draetta G, Eckstein J. (1997). Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim Biophys.* 18: 53-63.

Ducommun B, Brambilla P, Draetta G. (1991). Mutations at Sites Involved in Sucl Binding Inactivate Cdc2. *Mol Cell Biol.* 11: 6177-6184.

Dunphy WG. (1994). The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.* 4: 202–207.

Dyson N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*12: 2245-2262.

Dynlacht BD, Moberg K, Lees JA, Harlow E, Zhu L. (1997). Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 17:3867-75.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 33:389–396.

Ferreira, PCG., Hemery, A. S., Villaroel, R., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1991). The Arabidopsis functional homologue of p34 cdc2 protein kinase. *Plan Cell.* 3, 531.

Fobert PR, Gaudin V, Lunness P, Coen ES, Doonan JH. (1996). Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell.* 8:1465–76.

Fowler MR, Eyre S, Scott NW, Slater A, Elliott MC. (1998). The plant cell cycle in context. *Mol Biotechnol* 10:123-53.

Freeling MW. (1994) The Maize Handbook. New York: Springer-Verlag. Pp. 456-84.

Fyvie MJ, Murray JAH, Kilby NJ. (2002). Mosaic Analysis of GL2 Gene Expression and Cell Layer Autonomy During the Specification of Arabidopsis Leaf Trichomes. *Genesis.* 28: 68–74.

Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J. (1998). Cell cycle-dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG-132. *Plant Cell.* 10:2063-76.

Godínez-Palma SK. (2010). Interacción entre las ciclinas D-CDKs durante la germinación en el maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Química-UNAM

Guo J, Song J, Wang F, Zhang XS. (2007). Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Mol Biol.* 64: 349-360.

Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, De Caprio JA, Sellers WR, Kaelin WG Jr. (1996). A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc Nat Acad Sci USA.* 93: 8962-8967.

Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM. (2005). Maize Cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol.* 46: 166–173.

Hadwiger JA, Wittenberg C, Richardson HE, De Barros Lopes M, Reed SI. (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci.* 86: 6255-6259.

Hemerly A, Bergounioux C, Van Montagu M, Inzé D, Ferreira P. (1992). Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3295–99

Herrera-Teigeiro I, Jiménez-García LF y Vázquez Ramos JM. (1999). Benzyladenine promotes early activation of p34 cdc2-like kinase (s) during maize germination. *Seed Sci Res*. 9, 55-62

Hadwiger JA, Reed SI. (1990). Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CLN1 and CLN2 genes. *Nucl Acids Res*. 18: 4025-4032.

Harbour JW, Dean DC. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14: 2393–2409.

Harashima H, Dissmeyer N, Pusch S, Weimer A, Bramsiepe H, Bouyer D, Rademacher S, Nowack M, Novak B, Sprunck S and Schnittger A. (2012). A General G1/S-Phase Cell-Cycle Control Module in the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*. *PLOS gen*. 8:3-14

Holst I, Moreno JE. and Piperno DR. (2007). Identification of teosinte, maize, and *Tripsacum* in Mesoamerica by using pollen, starch grains, and phytoliths. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 104: 17608- 17613.

Huntley RP y Murray JAH. (1999). The plant cell cycle. *Plant Biol*. 2:440–446.

Imai KK, Ohashi Y, Tsuge T, Yoshizumi T, Matsui M, Oka A, Aoyama T. (2006). The A-type Cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in *Arabidopsis* Endoreduplication. *Plant Cell*. 18:382-396.

Inzé D, De Veylder L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Ann Rev Genet*. 40: 77–105.

Ishikawa M, Takashi M, Yoshikatsu S, Tomoaki N, Yuji H, Akihiro I, Mina K, Nagisa S, Asaka A, Yasuko Oi, William E. Mitsuyasu H, and Minoru K. (2011). Physcomitrella Cyclin-Dependent Kinase a Links Cell Cycle Reactivation to Other Cellular Changes during Reprogramming of Leaf Cells The *Plant Cell*. 23: 2924–2938.

Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*. 5: 143–148.

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

Jasinski S, Saraiva L, Perennes C. (2003). NtKIS2, a novel tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor is differentially expressed during the cell cycle and plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 503–676.

Joubés J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:607–20

Kawamura K, Murray JAH, Shinmyo A, Sekine M. (2006). Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. *Plant Mol Biol.* 61: 311-327.

Klug WS and Cummings MR. (1999). Conceptos de genética. Prentice Hall. 8va edición. Pp. 230-248

Kobor MS, and Greenblatt J. (2002). Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochem & Biophys.* 261–275

Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Ichimiya H, Umeda M. (2003). Arabidopsis Dtype cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol.* 132: 1315-1321.

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

Lacy ER, Filippov I, Lewis WS, Otieno S, Xiao L, Weiss S, Hengst L, Kriwacki RW. (2004). p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat Struct Mol Biol.* 4:358-64.

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

Leibovitch MP, Kannengiesser C, Leibovitch SA. (2003). Signal-induced ubiquitination of p57(Kip2) is independent of the C-terminal consensus Cdk phosphorylation site. *FEBS Lett.* 22 :125-8.

Lessard P, Bouly JP, Jouannic S, Kreis M, Thomas M. (1999). Identification of cdc2cAt: a new cyclin-dependent kinase expressed in *Arabidopsis thaliana* flowers. *Biochim. Biophys.* 1445:351– 58

Lipavská H, Masková P, Vojvodová P (2011). Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase *cdc25* induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis. *Ann Bot.* 107:1071-1086.

Lui H, Wang H, DeLong C, Fowke LC, Crosby WL, Fobert PR. (2000). The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J.* 21:379-85.

Mangeldorf CG. (1964). The Evolution of Corn and Culture in North America. Economy Botany. Ed. Springer, USA. Pp. 19: 350-357

Magnard JL, Yang M, Chen Y-CS, Leary M, McCormick S. (2001). The Arabidopsis gene *tardy* asynchronous meiosis is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiol.* 127:1157–66

Martínez MC, Jørgensen JE, Lawton MA, Lamb CJ, Doerner PW. (1992). Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc Natl Acad Sci.* 16 :7360-7364.

Martínez MR. (2008). Los cuatro horizontes del maíz. En: La hermandad del maíz. Ediciones Los Planes. San Salvador. 67-72

Marrocco K, Thomann A, Parmentier Y, Genschik P, Criqui MC. (2009). The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development.* 136:1475-85.

Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH. (2005). D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 15694-15699.

Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman M, Sanchez J, Buckler E and Doebley J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci.* 99: 6080-6084.

McKibbin RS, Halford NG, Francis D. (1998). Expression of fission yeast *cdc25* alters the frequency of lateral root formation in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol.* 36: 601–612.

Menges M, Murray JAH. (2002). Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell cycle gene activity. *Plant J.* 30:203–12.

Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* 41: 546-566.

Mészáros, T. et al. (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol. Biol.* 43, 595–605

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

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

Nakai T, Kato K, Shinmyo A, Sekine M. (2006). Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett.* 580:336-40.

Nash R, Tokiwa G, Anand S, Erickson K, Fitcher AB. (1988). The WHI 1⁺ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J* 7: 4335-4346.

Nigg EA, Blangy A, Lane HA. (1996). Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res.* 15:174-80.

Nugent JH, Alfa CE, Young T, Hyams JS. (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci.* 99: 669-674.

Oakenfull EA, Riou Khamlichi C, Murray J. (2002). Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Biol Science.* 357: 749-760.

Pavletich NP. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* 16:821-8.

Perales RH y Hernández JM. (2005). Diversidad del maíz en Chiapas. *Revista Diversidad Biológica.* 419-438,

Pérez-Pérez JM, Serralbo O, Vanstraelen M, González C, Criqui MC, Genschik P, Kondorosi E, Scheres B. (2008). Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J.* 53:78-89.

Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. (1994). Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 269: 7709–18.

Pettko-Szandtner A, Meszaros T, Horvath GV, et al. (2006). Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant Journal* 46: 111–123.

Pines J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem Sci* 18: 195–197.

Piperno D and Flanery K. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2101-2103

Piperno D, Ranere A, Holst I, Iriarte J, and Dickau R. (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 5019–5024.

Planchais S, Samland AK, Murray JA. (2004). Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J.* 38:616-25.

Quiroz-Figueroa F y Vázquez-Ramos JM. (2006). Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant.* 128: 556-568.

Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutierrez C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res.* 127: 3527-3533.

Ranere A, Piperno D, Holst I, Dickau I, and Iriarte J. (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 5014 –5018.

Ren QG, Yu Y, Luo X, Jie XM, Pan DJ, Wang W. (2008). Characterization of proteasome inhibition on astrocytes cell cycle. *J Mol Neurosci.* 38:57-66.

Renauding, J. P., Colasanti, J., Rime, H., Yyuan, Z. and Sundaresan V. (1994). Cloning of four cyclins from maize indicate that higher plant have three structurally distinct groups of mitotic cyclins. *Proc. Natl. acad. Sci.* 91: 7375-82.

Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D.I (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol.* 32:1003–1018.

Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH. (2000). Cytokinin Activation of Arabidopsis Cell Division Through a D-Type Cyclin. *Science*. 283:1541-1544.

Russo, S.E., W.L. Cannon, C. Elowsky, S. Tan, S.J. Davies. (2010). Variation in leaf stomatal traits of 28 tree species in relation to water-use efficiency along an edaphic gradient in Bornean rain forest. *Ame J Bot*. 97: 1109–1120.

Stals H. and Inzé D. (2003). When plant cells decide to divide. *Plant Science* 6: 359-364.

Schnittger A, Hülskamp M. (2002). Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 357:823-6.

Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A. (2007). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett*. 460: 117-122.

Serizawa H, Mäkelä TP, Conaway JW, Conaway RC, Weinberg RA, Young RA. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIID. *Nature*. 16:280-2.

Serratos A, Arnason JT, Nozzolillo C, Lambert JDH, Philogene BJR, Fulcher G, Davidson K, Peacock L, Atkinson J, Morand P. (1987). Factors contributing to resistance of exotic maize populations to maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *J Chem Ecol*. 13: 751-762.

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

Shiekhatter R, Mermelstein F, Fisher RP, Drapkin R, Dynlacht B, Wessling HC, Morgan DO, Reinberg D. (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIID. *Nature*. 16:283-7.

Shimotohno A, Matsubayashi S, Yamaguchi M, Uchimiya H. and Umeda M. (2003). Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*. 534: 69–74.

Shimotohno A, Umeda-Hara C, Bisova K, Uchimiya H, Umeda M. (2006). The plant specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation in cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16: 2954–2966.

Sorrell DA, Menges M, Healy JM, Deveaux Y, Amano C. (2002). Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow-2 cells. *Plant Physiol*. 126:1214–23.

Sun Y, Dilkes BP, Zhang C, Dante RA, Carneiro NP, Lowe KS, Jung R, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA. (1999). Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 96:4180-5.

Swaminathan K, Yang Y, Grotz N, Campisi L, Jack T. (2000). An enhancer trap line associated with a D-class cyclin gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124:1658–67.

Torres-Acosta JA, de Almeida Engler J, Raes J, Magyar Z, De Groot R, Inzé D, De Veylder L. (2004). Molecular characterization of Arabidopsis PHO80-like proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. *Cell Mol Life Sci.* 61: 1485-1497.

Tsakraklides V, Solomon MJ. (2002). Comparison of Cak1p-like Cyclin-dependent kinase-activating kinases. *J Biol Chem.* 277:33482–33489.

Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, De Jager S, Kato K, Kondorosi E, Murray JAH, Ito M, Shinmyo A, Sekine M. (2005). Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol.* 57: 83-100.

Umeda M, Bhalerao RP, Schell J, Uchimiya H, Koncz C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5021–26

Umeda M, Shimotohno A, Yamaguchi M. (2005). Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant Cell Physiol.* 46:1437-42.

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

Vargas LA. (2007). La historia incompleta del maíz y su nixtamalización. *Cuadernos de nutrición* 30: 97-102.

Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res.* 13: 113-130.

Verkest A, Weini C, Inzé D, De Veylder L, Schnittger A. (2005). Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiol.* 139: 1099–1106.

Verkest A, Lara de O Manes C, Vercruyssen S, Maes S, Van Der Schueren E. (2005). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell.* 17: 1723–1736.

Vincent P, Leszek D. (2012). Zea Mays (Maize, Corn): *the history of Zea Mays book*. USA. 345-352.

Vodermaier HC. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr. Biol.* 14:787–96

Wang Y, Magnard JL, McCormick S, Yang M. (1997). Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis* anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I. *Plant Physiol.* 136:4127–35

Wang GF, Kong HZ, Sun YJ, Zhang XH, Zhang W, Altman N, Depamphilis CW, Ma H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* 135: 1084–1099.

Wang GF, Zhang W, Altman N, Depamphilis CW, Ma H. (2007). Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* 135: 1084–1099.

Weingartner M, Pelayo HR, Binarova P, Zwerger K, Melikant B, de la Torre C, Heberle-Bors E, Bögre L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J Cell Sci.* 116:487-98.

Weingartner M, Criqui MC, M'esz'aros T, Binarova P, Schmit AC. (2004). Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of phragmoplast. *Plant Cell.* 16:643–57

Wilkes HG (1967). Teosinte: the closest relative of maize. *Department of botany, USA.* pp. 159-162

Woo YM, Hu DW, Larkins BA, Jung R. (2001). Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *Plant Cell.* 13:2297-317.

Yamaguchi M, Fabian T, Sauter M et al. (2000). Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J.* 24: 11–20.

Yoshizumi, T. (2006). An *Arabidopsis* cell cycle-dependent kinase-related gene, CDC2b, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *Plant Cell* 11, 1883–1896

Yu Y, Steinmetz A, Meyer D, Brown S, Shen WH. (2003). The tobacco A-type cyclin, *Nicta*;CYCA3;2, at the nexus of cell division and differentiation. *Plant Cell.* 15:2763–77

Xie Q, Sanz-Burgos AP, Hannon GJ, Gutiérrez C. (1996). Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15: 4900- 4908.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*. 71:505-14.

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

11. ANEXOS

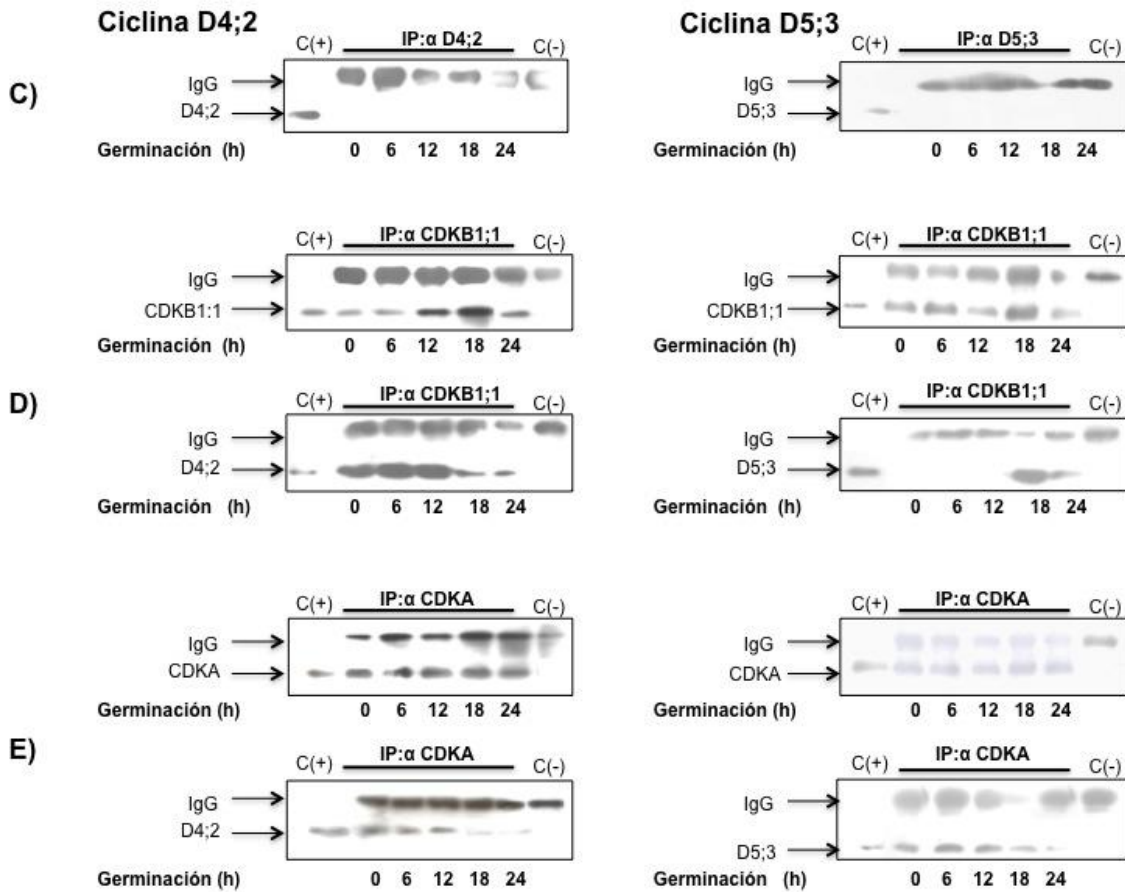
Anexo 1. Matriz de identidad entre las secuencias proteicas de las CycDs de maíz de *Arabidopsis*, arroz y *P. patens*.

En rojo se resalta la identidad de cada Cyc D de maíz con su ortólogo respectivo en arroz.

Los números en negro representan la identidad entre cada CycD de maíz con sus respectivos parálogos.

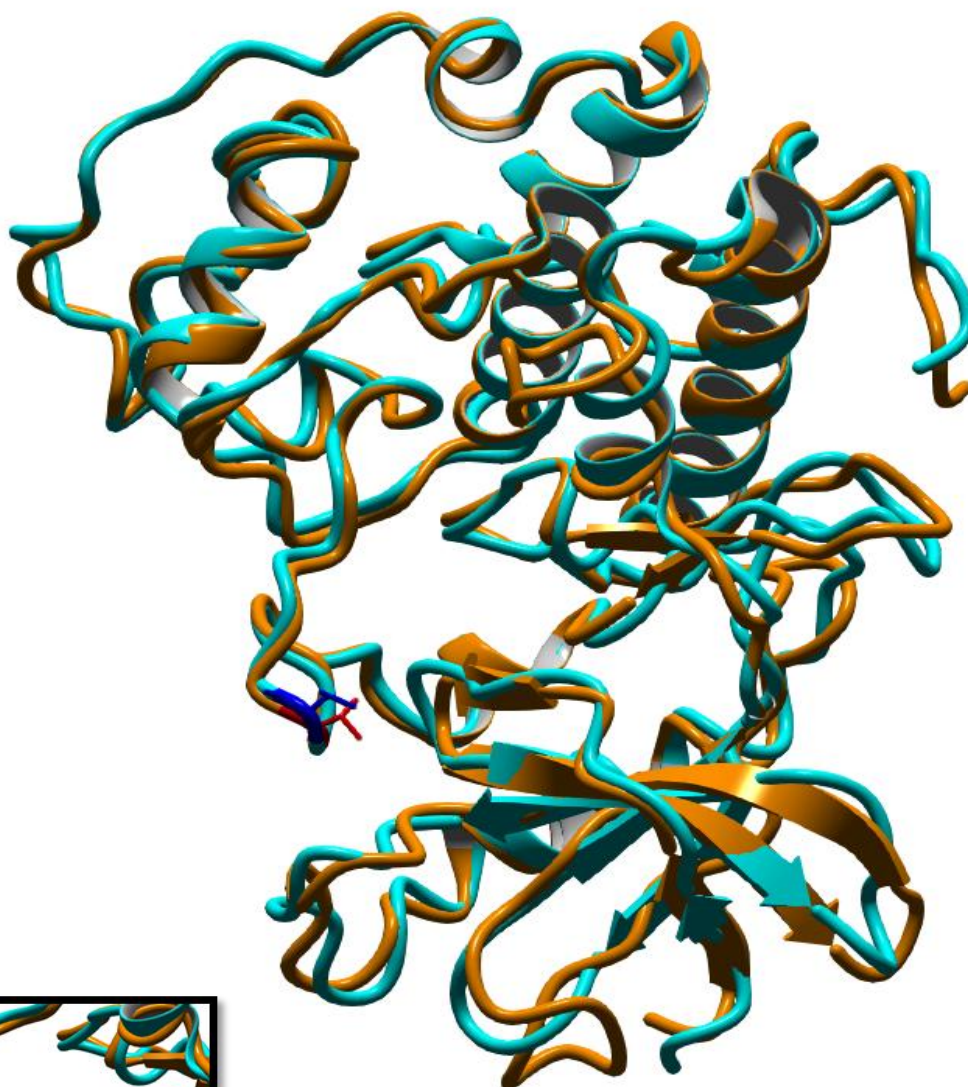
	ZmD1:1	ZmD2:1	ZmD2:2a	ZmD2:2b	ZmD2:3	ZmD4:1a	ZmD4:1b	ZmD4:2	ZmD3:1a	ZmD3:1b	ZmD5:1	ZmD5:2a	ZmD5:2b	ZmD5:3a	ZmD5:3b	ZmD6:1	ZmD7:1
Phyca;CycD	23.1%	24.8%	23.8%	23.0%	23.5%	26.7%	26.2%	22.9%	17.7%	17.7%	20.4%	19.0%	20.0%	20.9%	20.6%	23.9%	13.3%
Zeama;CycD1:1	ID	26.1%	26.2%	26.4%	24.4%	26.3%	26.6%	23.6%	18.0%	17.3%	21.0%	21.4%	21.1%	21.5%	21.2%	20.9%	15.9%
Orysa;CycD1:1	49.4%	21.1%	22.9%	23.1%	21.4%	22.8%	23.5%	20.9%	13.3%	12.6%	17.3%	16.4%	17.0%	16.8%	17.9%	18.4%	12.0%
Orysa;CycD1:2	40.2%	24.4%	21.9%	22.0%	22.0%	22.3%	23.8%	20.8%	14.6%	14.7%	20.9%	20.5%	20.3%	18.7%	19.5%	18.5%	14.9%
Orysa;CycD1:3	32.1%	25.0%	26.3%	26.1%	22.0%	25.0%	24.3%	22.1%	16.4%	16.7%	21.1%	19.2%	18.9%	19.2%	19.6%	19.0%	14.4%
Arath;CycD1:1	44.0%	25.7%	26.3%	24.8%	24.0%	23.6%	25.4%	22.6%	16.3%	15.9%	22.8%	22.2%	20.6%	20.6%	22.7%	20.0%	15.6%
Zeama;CycD2:1	26.1%	ID	40.1%	40.7%	45.0%	39.9%	39.2%	34.5%	17.7%	17.8%	20.0%	19.3%	20.1%	20.6%	21.6%	18.7%	14.6%
Zeama;CycD2:2a	26.2%	40.1%	ID	94.4%	30.3%	44.8%	45.0%	40.4%	18.4%	17.7%	18.7%	18.7%	19.4%	19.8%	20.1%	17.1%	14.8%
Zeama;CycD2:2b	26.4%	40.7%	94.4%	ID	31.0%	44.5%	44.2%	40.1%	18.7%	18.2%	18.6%	18.8%	19.0%	20.5%	20.8%	17.0%	15.5%
Zeama;CycD2:3	24.4%	45.0%	30.3%	31.0%	ID	33.5%	33.5%	30.6%	16.6%	17.2%	21.5%	19.4%	19.5%	20.9%	21.8%	17.5%	13.9%
Orysa;CycD2:1	24.9%	63.7%	41.4%	40.6%	44.9%	40.0%	39.7%	35.5%	16.6%	17.1%	19.5%	19.4%	19.5%	19.8%	20.5%	18.7%	15.2%
Orysa;CycD2:2	26.5%	39.4%	60.1%	60.1%	29.7%	43.1%	42.2%	37.6%	18.3%	17.8%	18.7%	17.2%	18.2%	19.2%	19.7%	18.9%	14.9%
Orysa;CycD2:3	23.0%	36.6%	30.6%	30.6%	42.0%	30.4%	30.6%	29.3%	17.6%	18.1%	17.6%	19.5%	19.6%	20.9%	20.6%	15.8%	15.2%
Arath;CycD2:1	22.4%	32.9%	35.3%	34.5%	27.4%	35.2%	34.2%	31.5%	16.0%	16.4%	18.3%	16.1%	16.9%	17.1%	17.6%	16.7%	13.3%
Zeama;CycD4:1a	26.3%	39.8%	44.8%	44.5%	33.5%	ID	81.8%	50.2%	19.0%	19.2%	20.1%	20.8%	20.6%	21.4%	22.0%	18.4%	16.2%
Zeama;CycD4:1b	26.6%	39.2%	45.0%	44.2%	33.5%	81.8%	ID	51.7%	19.8%	20.9%	19.6%	21.6%	20.2%	21.7%	21.8%	19.0%	15.9%
Zeama;CycD4:2	23.8%	34.5%	40.4%	40.1%	30.6%	50.2%	51.7%	ID	21.7%	22.4%	18.7%	19.7%	18.3%	21.9%	21.0%	17.9%	15.9%
Orysa;CycD4:1	26.4%	40.9%	45.0%	44.7%	32.2%	64.0%	62.7%	50.2%	18.9%	19.2%	18.9%	20.3%	20.1%	19.2%	19.8%	19.2%	14.8%
Orysa;CycD4:2	24.2%	37.3%	44.5%	43.5%	33.5%	55.0%	55.0%	50.9%	19.2%	19.9%	18.2%	19.2%	15.3%	20.9%	21.9%	18.9%	15.8%
Arath;CycD4:1	26.4%	31.6%	32.5%	32.7%	27.2%	33.7%	34.0%	29.7%	16.6%	16.9%	18.0%	18.3%	18.9%	17.4%	18.2%	17.7%	14.0%
Arath;CycD4:2	25.5%	30.6%	32.5%	32.9%	24.9%	35.1%	34.8%	29.9%	17.7%	17.7%	18.3%	17.7%	17.6%	19.5%	19.2%	17.7%	13.8%
Zeama;CycD3:1a	18.0%	17.7%	18.4%	18.7%	16.6%	19.0%	19.8%	21.7%	ID	80.2%	17.2%	17.2%	18.8%	16.6%	17.4%	15.2%	17.6%
Zeama;CycD3:1b	17.3%	17.8%	17.7%	18.2%	17.2%	19.2%	20.9%	22.4%	80.2%	ID	17.1%	17.6%	18.6%	16.6%	18.0%	14.8%	18.5%
Orysa;CycD3:1	20.1%	18.6%	21.5%	22.0%	19.4%	21.2%	21.4%	23.4%	60.9%	60.2%	20.1%	20.3%	21.8%	17.6%	18.4%	16.7%	18.4%
Arath;CycD3:1	18.9%	19.8%	21.3%	21.5%	19.3%	22.9%	22.2%	22.1%	26.9%	27.0%	18.5%	17.3%	16.4%	15.5%	16.6%	13.9%	14.7%
Arath;CycD3:2	19.2%	22.9%	23.2%	23.0%	19.5%	22.7%	22.4%	22.5%	25.8%	26.9%	17.1%	18.7%	17.7%	15.7%	15.9%	15.2%	15.8%
Arath;CycD3:3	20.6%	22.2%	24.1%	24.0%	19.8%	24.4%	23.8%	23.6%	25.6%	25.5%	18.4%	19.1%	18.2%	16.5%	17.5%	14.9%	14.9%
Zeama;CycD5:1	21.0%	20.0%	18.7%	18.6%	21.5%	20.1%	19.6%	18.7%	17.2%	17.1%	ID	44.8%	47.1%	29.0%	29.9%	16.4%	14.2%
Zeama;CycD5:2a	21.4%	19.3%	18.7%	18.8%	19.4%	20.6%	21.6%	19.7%	17.2%	17.6%	44.8%	ID	74.6%	27.9%	31.1%	18.4%	14.1%
Zeama;CycD5:2b	21.1%	20.1%	19.4%	15.0%	19.5%	20.6%	20.2%	18.3%	18.8%	18.6%	47.1%	74.6%	ID	29.3%	31.8%	17.7%	15.6%
Zeama;CycD5:3a	21.5%	20.6%	19.8%	20.5%	20.9%	21.4%	21.7%	21.9%	16.6%	16.6%	29.0%	27.9%	29.3%	ID	78.3%	14.7%	13.8%
Zeama;CycD5:3b	21.2%	21.6%	20.1%	20.8%	21.8%	22.0%	21.8%	21.0%	17.4%	18.0%	29.9%	31.1%	31.8%	78.3%	ID	15.1%	13.3%
Orysa;CycD5:1	20.4%	20.0%	17.9%	17.8%	20.3%	18.7%	20.0%	19.3%	18.2%	17.3%	70.3%	46.3%	48.8%	28.0%	29.0%	17.1%	12.7%
Orysa;CycD5:2	21.7%	20.0%	19.0%	19.1%	20.4%	21.9%	22.0%	21.9%	18.0%	17.8%	49.8%	59.2%	59.2%	29.1%	30.4%	16.4%	15.1%
Orysa;CycD5:3	18.6%	19.1%	17.8%	18.4%	18.5%	19.6%	19.7%	19.9%	16.5%	16.7%	27.7%	28.9%	30.2%	53.5%	54.6%	12.7%	12.9%
Arath;CycD5:1	18.0%	18.2%	20.4%	20.3%	18.6%	18.9%	19.0%	18.0%	15.1%	15.0%	22.1%	21.9%	19.4%	19.4%	21.4%	17.5%	11.9%
Zeama;CycD6:1	20.9%	18.7%	17.1%	17.0%	17.5%	18.4%	19.0%	17.3%	15.2%	14.8%	16.4%	18.4%	17.7%	14.7%	15.1%	ID	12.5%
Orysa;CycD6:1	20.0%	18.6%	18.0%	17.9%	19.0%	19.5%	20.9%	18.1%	15.7%	14.3%	17.1%	17.8%	18.1%	16.2%	16.7%	72.5%	12.9%
Arath;CycD6:1	20.0%	18.8%	15.8%	16.0%	18.2%	16.1%	15.7%	14.7%	12.8%	12.3%	16.5%	16.0%	16.3%	15.6%	15.6%	20.2%	12.6%
Zeama;CycD7:1	15.9%	14.6%	14.8%	15.5%	13.9%	16.2%	15.9%	15.9%	17.6%	18.5%	14.2%	14.1%	15.6%	13.8%	13.3%	12.5%	ID
Orysa;CycD7:1	15.3%	13.6%	14.2%	14.4%	15.3%	15.1%	14.9%	13.8%	17.3%	18.0%	15.1%	16.3%	15.5%	14.3%	14.3%	14.1%	36.6%
Arath;CycD7:1	17.3%	16.0%	15.1%	14.9%	14.9%	16.4%	15.7%	15.0%	14.7%	14.4%	15.6%	15.7%	15.8%	15.2%	14.5%	14.8%	17.3%

Anexo 2. Western Blots de las ciclinas D4;2 y D5;3, para cada paso de las inmunoprecipitaciones secuenciales.

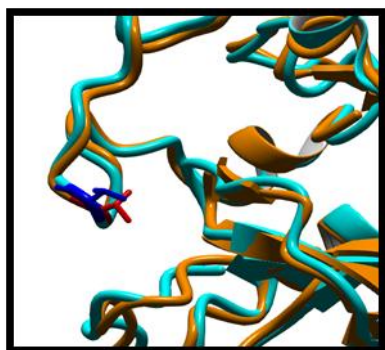


Anexo 3. Alineación de las estructuras tridimensionales de las CDKA y CDKB1;1

A)

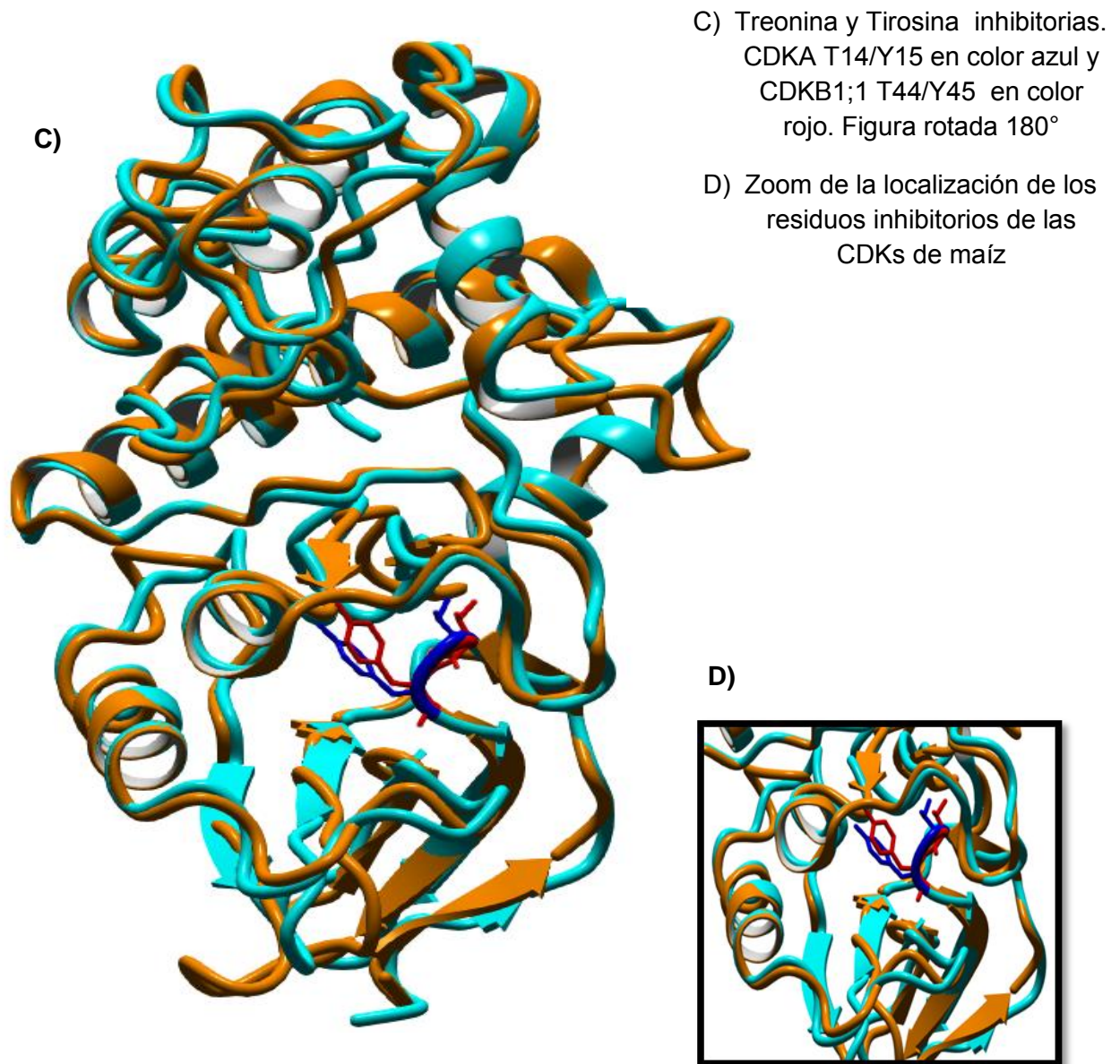


B)



A) Treonina activadora. CDKA T-161 en color azul y CDKB1;1 T-190 en color rojo

B) Zoom de la localización de la treonina activadora de las CDKs de maíz



Los modelos de ambas CDKs se generaron con ayuda de la herramienta GENO3D (Combet et al., 2002); como templado se utilizó el cristal de CDK2 de humano (Schulze-Gahmen et al., 1996) (PDB: 1HCL). Una vez generados los modelos estos se alinearon con en el algoritmo MUSTANG (Konagurthu et al., 2006) en el programa YASARA (Krieger et al., 2002). En color cian la estructura de CDKA, en amarillo la estructura de CDKB.

RESEARCH PAPER

Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination

Silvia K. Godínez-Palma¹, Elpidio García¹, María de la Paz Sánchez², Fernando Rosas¹ and Jorge M. Vázquez-Ramos^{1,*}

¹ Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, UNAM, Avenida Universidad y Copilco, México DF 04510, México

² Instituto de Ecología, UNAM, Avenida Universidad y Copilco, México DF 04510, México

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jorman@unam.mx

Received 29 August 2013; Revised 29 August 2013; Accepted 10 September 2013

Abstract

The importance of cell proliferation in plant growth and development has been well documented. The majority of studies on basic cell cycle mechanisms in plants have been at the level of gene expression and much less knowledge has accumulated in terms of protein interactions and activation. Two key proteins, cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) are fundamental for cell cycle regulation and advancement. Our aim has been to understand the role of D-type cyclins and type A and B CDKs in the cell cycle taking place during a developmental process such as maize seed germination. Results indicate that three maize D-type cyclins—D2;2, D4;2, and D5;3—(G₁-S cyclins by definition) bind and activate two different types of CDK—A and B1;1—in a differential way during germination. Whereas CDKA-D-type cyclin complexes are more active at early germination times than at later times, it was surprising to observe that CDKB1;1, a supposedly G₂-M kinase, bound in a differential way to all D-type cyclins tested during germination. Binding to cyclin D2;2 was detectable at all germination times, forming a complex with kinase activity, whereas binding to D4;2 and D5;3 was more variable; in particular, D5;3 was only detected at late germination times. Results are discussed in terms of cell cycle advancement and its importance for seed germination.

Key words: CDKA, CDKB, cell cycle, D-type cyclins, germination, maize.

Introduction

The cell cycle has a preponderant role in the growth and development of multicellular organisms, including plants (Dewitte and Murray, 2003). The basic cell cycle mechanisms are similar between plant and mammal cells, showing a high conservation throughout evolution. Nonetheless, some differences exist, particularly regarding regulatory processes and the amount of proteins involved, perhaps reflecting strategic differences in plant life.

Similar to other eukaryotes, in plant cells there are cyclin-dependent kinases (CDKs) that, in association with a cyclin, determine cell cycle progression. D-type cyclin-CDK complexes control G₁-S-phase transition due to their capacity to interact with the retinoblastoma-related (RBR) protein. This

is mediated by the presence of the LXCXE sequence in cyclins and the subsequent phosphorylation of serine and threonine residues located in the carboxy end of RBR by the CDK moiety. This provokes dissociation between RBR and the transcriptional factor E2F/DP, thus allowing transcription of those genes necessary for S-phase establishment (Renaudin *et al.*, 1996).

Cyclins, as their name suggests, fluctuate throughout the cell cycle (Evans *et al.*, 1983), in this way regulating CDK activity; moreover, cyclins are necessary for CDK activation, thus modifying the stability, location, and substrate specificity of the CDK-cyclin complex (Inzé and De Veylder 2006). Cyclin stability is mediated by proteasome degradation (Tyers

Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinase; Cyc, cyclin; GST, glutathione S-transferase; RBR, retinoblastoma-related.

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and Jorgensen 2000; Fyvie *et al.*, 2002), and CDK activity depends on its phosphorylation/dephosphorylation state (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999) and its interaction with protein kinase inhibitors (Verkest *et al.*, 2005a, 2005b).

Cyclins D act as sensors of external stimuli so their presence is a fundamental regulatory factor for cell cycle initiation (Cross 1988, 1990; Nash *et al.*, 1988; Hadwiger *et al.*, 1989; Hadwiger and Reed, 1990). Depending on their destruction mechanism, these cyclins can be constitutively unstable during the cell cycle or unstable only in certain stages of the cell cycle (Pines 1995). The degradation pathway of D-type cyclins in plants is still to be clearly defined; however, there is evidence for the action of the ubiquitin-proteasome system and in fact most D-type cyclins possess PEST sequences in their protein sequence.

The cell cycle plays a very important role in seed germination (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003). Seed germination is a physiological process that starts with water entry (imbibition) and it is thought to end when the radicle protrudes (Bewley, 1997). Some reports indicate that radicle protrusion does not require mitotic activity (Baiza *et al.*, 1989), while others demonstrate that cell division takes place before protrusion (De Castro *et al.*, 2000; Barroco *et al.*, 2005; Masubelele *et al.*, 2005). The cell cycle stage of most cells in dry seed embryos seems to be G₁ phase (Deltour and Jacquard, 1975; Conger and Carabia, 1976; Bewley and Black, 1994), and many different cell cycle proteins are already present in non-imbibed embryos, suggesting that cells are prepared to start the cycle (Bray *et al.*, 1989; Bewley, 1997; Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003); *de novo* synthesis of cell cycle proteins appears to start some hours after imbibition. Thus, in maize, DNA replication starts by 12–15 h of imbibition, as determined by ³H-thymidine incorporation, nuclear labelling, histone H1 biosynthesis, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) accumulation, and DNA polymerase, DNA ligase, and DNA primase activities (Baiza *et al.*, 1989; Georgieva *et al.*, 1994a, 1994b; García *et al.*, 1997; Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003). Mitotic figures are evident after 24–28 h of imbibition (Baiza *et al.*, 1989).

During seed germination D-type cyclins play essential roles, as indicated by work with homozygous mutants for the cyclin D1 and D4;1 genes in *Arabidopsis* that show a dramatic delay in cell division and proliferation during seed germination (Masubelele *et al.*, 2005), with a corresponding delay in radicle protrusion.

Plant cells have multiple D-type cyclins but only some of them have been studied and limited data exist on their interaction with CDKs and their function, particularly during seed germination. Maize cells contain 17 different genes coding for D-type cyclins, 15 of which are expressed during germination (Buendía-Monreal *et al.*, 2011); three of them have also been studied at the protein level (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008). The aim of this work was to study complexes formed by three maize cyclins—CycD2;2 (a or b, 94% identical), CycD4;2, and CycD5;3 (a or b, 74% identical) with CDKs (types A and B1;1) during the early stages of maize germination, following D-type cyclin protein levels,

the type of complexes formed between different cyclins and CDKs, and their activity during maize germination.

Materials and methods

Materials

Protein A-agarose and protease inhibitor cocktail tablets (Complete), were from Roche (Indianapolis, IN, USA). Western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate kit and Immobilon polyvinylidene fluoride membranes were from Millipore (Billerica, MA, USA); glutathione-Sepharose 4B and plasmid pGEX-4T2 were from Amersham Biosciences (Little Chalfont, Bucks, UK); anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate was from Santa Cruz Biotechnology (sc-2004; Santa Cruz, CA, USA); [γ -³²P]ATP was from Isotopes Co (Budapest, Hungary); reduced glutathione, calf intestinal alkaline phosphatase (1382074), and plasmid pPROEX-HTB were from Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); and phosphatase inhibitor cocktail 2 was from Sigma-Aldrich (P5726; St Louis, MO, USA).

Imbibition of maize embryo axes

To follow germination (time from onset of imbibition), maize (open pollination genotype cv. Chalqueño) embryo axes (25–30 mg dry weight) were washed four times with sterile distilled water. Excess water was removed by blotting the axes with sterile Whatman paper No. 1 and then incubated for 6, 12, 18, and 24 h at 25 °C between sterile Whatman paper No. 1 with sterile imbibition buffer containing 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 2% sucrose, and 10 mg ml⁻¹ chloramphenicol.

Protein extraction

After maize embryo axis imbibition, protein extracts were produced by grinding axes in liquid nitrogen in a mortar and then adding extraction buffer containing 25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 75 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 1 mM dithiothreitol, 0.2% Triton X-100, 0.25 M sucrose, 60 mM β -glycerol phosphate, 50 mM NaF, 200 μ M Na₃VO₄, 1 mM EGTA, a tablet of protease inhibitor cocktail/15 ml buffer, and a tablet of phosphatase inhibitor cocktail. Protein extracts were centrifuged at 16000 g for 1 h at 4 °C and protein concentration was determined by the method of Bradford (1976).

Polyclonal antibody production

Rabbits were injected intraperitoneally with purified glutathione S-transferase (GST)-CycD4;2 (33 kDa, 250 μ g) or GST-CycD5;3 (37 kDa, 250 μ g) recombinant proteins, containing the carboxyl ends of CycD4;2 (amino acids 313–388) and CycD5;3a (amino acids 249–354; sharing strong identity with CycD5;3b in this polypeptide region). For CDKB1;1, a peptide containing the first 28 amino acids fused to GST was used (28 kDa, 250 μ g). The complete CDKA polypeptide (37 kDa, 250 μ g), fused to a His-tag, was used to raise antibodies. For the first injection recombinant proteins were mixed with complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich); a second injection contained only incomplete adjuvant. Further injections (weekly for 2 months) were administered through the popliteal ganglion with only the cyclin peptides (200 μ g; purified by treating fusion proteins with thrombin protease and then passing the mixture through glutathione-Sepharose 4B to eliminate GST), the complete His-CDKA polypeptide (200 μ g), or GST-CDKB1;1 peptide (200 μ g). At the end of this period the antisera raised were collected and evaluated for their ability to detect the corresponding proteins. Antibodies against CycD2;2 were reported by Gutiérrez *et al.* (2005).

Western blotting

Protein samples (50 µg) were fractionated by SDS/PAGE (12%) and gels were blotted onto polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked with a 3:10 dilution of fetal bovine serum/PBS 1× (SO1520-biowest) and then incubated with one of these polyclonal antibodies, developed in our laboratory: anti-maize CycD2;2 (1:1000 dilution), anti-maize CycD5;3 (1:2500 dilution), anti-maize CycD4;2 (1:1000 dilution), anti-maize CDKA (1:1000 dilution), or anti-maize CDKB1;1 (1:1000 dilution). They were incubated overnight at 4 °C and washed three times with PBS, 0.5 M NaCl, and 1% Triton X-100 for 15 min. Subsequently, membranes were incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody at a 1:40 000 dilution. Membranes were washed again three times with PBS, 0.5 M NaCl, and 1% Triton X-100 for 15 min each. Peroxidase reaction was detected by the ECL method. Densitometric analysis was performed using the Fluor-S MultiImager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Anti-CDKA antibody strongly recognizes CDKA, and it also recognizes CDKB1;1, albeit weakly. Anti-CDKB1;1 antibody only recognizes CDKB1;1. Assays to demonstrate that the anti-CDKA antibody recognizes CDKB1;1 required protein concentrations above 200 µg (Fig. S2E).

Immunoprecipitation

Anti-CycD4;2, anti-CycD5;3, anti-CycD2;2, anti-CDKA, or anti-CDKB1;1 antibodies were conjugated for 2 h with protein A-agarose (6:15 dilution) at room temperature using buffer A (25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, pH 8.0, 2.5 mM EGTA, 2.5 mM NaF, and 0.1% Triton X-100). Protein from extracts (150 µg) was added and the mixture was incubated overnight at 4 °C with agitation (for experiments of antibody cross-reactivity for CDKA and CDKB1;1, protein concentrations were 100, 150, 200, and 300 µg; Fig. S2F), immunocomplexes were pelleted by centrifugation in a microfuge and washed three times with buffer A. Subsequently, antibodies against maize CDKA (1:1000 dilution) or against maize CDKB1;1 (1:1000 dilution) were added to identify the corresponding CDK by western blotting. The resulting protein precipitates were used as the source of kinase activity. The target protein was identified after every immunoprecipitation. For dephosphorylation assays, immunoprecipitates were incubated for 40 min at 36 °C with alkaline phosphatase (5 U); then phosphatase inhibitor (5:1 ratio) was added and the mixture was incubated 40 min at 36 °C. Immunoprecipitates were washed three times with Tris/HCl buffer (pH 7.5) and three times with buffer A, and then kinase activity was measured.

Kinase assay

Immunocomplexes were incubated in 10 µl of kinase buffer (70 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 5 mM EGTA, 20 mM ATP, and 5 µCi [³²P]ATP). As substrate, GST-Zm-RBR-C fusion peptide (RBR-C is the C-terminal domain of maize RBR) was added at 5 µg per sample. Purification of GST-RBR fusion peptide was performed according to Ramírez-Parra *et al.* (1999). Reactions were performed for 1 h at 30 °C and these were stopped by adding SDS loading buffer. After boiling for 5 min, the reaction products were separated by SDS/PAGE. The gels were vacuum-dried at 80 °C for 2 h and then were exposed for 12 h to Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). GBX developer and GBX fixer (Kodak, Rochester, NY, USA) were used to develop films.

Sequential immunoprecipitations

Initial immunoprecipitations were performed using anti-Cyclin D2;2, D4;2, or D5;3 antibodies, protein A-agarose, and 150 µg of protein per germination time; immunoprecipitates were washed

and subjected to treatment at 65 °C for 3 h to separate cyclin-CDK complexes from protein A-agarose. Then they were centrifuged at 5000 rpm for 10 min and supernatants were incubated for 12 h with anti-CDKB1;1 antibody, and then centrifuged again at 5000 rpm for 5 min and supernatants were immunoprecipitated with anti-CDKA antibody. Kinase activity was determined in pellets resulting from immunoprecipitation with both anti-CDKB1;1 and anti-CDKA antibodies.

Results

Specificity of antibodies against maize D-type cyclins and CDKs

Antibodies are fundamental tools with which to test the presence and associations of proteins in the cell. For this purpose, specific peptide sequences of maize cyclins D4;2 and D5;3, and CDKB1;1 and the complete protein sequence of CDKA, were purified and used to produce the corresponding polyclonal antibodies. Anti-CycD2;2 antibodies have been reported before (Gutiérrez *et al.*, 2005).

The D-type cyclin peptide sequences used were such that percentage identity between cyclins was always below 30% (BioEdit v7.2.0; Hall, 1999; Fig. S1A). Thus, no cross-reactivity was observed with the different antibodies (Fig. 1A and Fig. S2A, C). However, the corresponding antibodies cannot differentiate two very closely related cyclins D2;2 (a and b) and two closely related cyclins D5;3 (a and b).

The anti-CDKA antibody, produced against the complete protein, can recognize both CDKA and, to a lesser extent, CDKB1;1 (protein concentration above 200 µg is required), since both proteins share high identity in their sequences, with the exception of the amino tail in CDKB1;1, which is specific and not present in CDKA proteins (Fig. S1B). The anti-CDKB1;1 antibody was produced using only the CDKB1;1 amino tail (Fig. 1B and Fig. S2B, D, E, and F). Immunoprecipitations using anti-CDKA antibody show bands of 34 and 37 kDa (Fig. 1B, panel 1, lane 1) and only a band at 37 kDa in immunoprecipitations with anti-CDKB1;1 antibody; blotting using anti-CDKB1;1 antibody after immunoprecipitations using anti-CDKA and anti-CDKB1;1 antibodies only recognizes a band in 37 kDa (Fig. 1B, panel 2), demonstrating that the anti-CDKB1;1 antibody does not immunoprecipitate CDKA.

Detection of cyclins D2;2, D4;2, and D5;3 proteins during maize germination

Maize cells contain 17 genes that encode D-type cyclins, and 15 of them are expressed during germination (Buendía-Monreal *et al.*, 2011). To study the expression at the protein level, and their function during maize germination, antibodies against CycD4;2 or against CycD5;3 were used; the anti-CycD4;2 antibody recognized a 41 kDa protein that was present in embryo axes of dry seeds and levels peaked at 18 h of germination, to be reduced to about half that value at 24 h (Fig. 2B). In contrast, the antibody against CycD5;3 detected a 38 kDa protein that was also present in dry seeds and

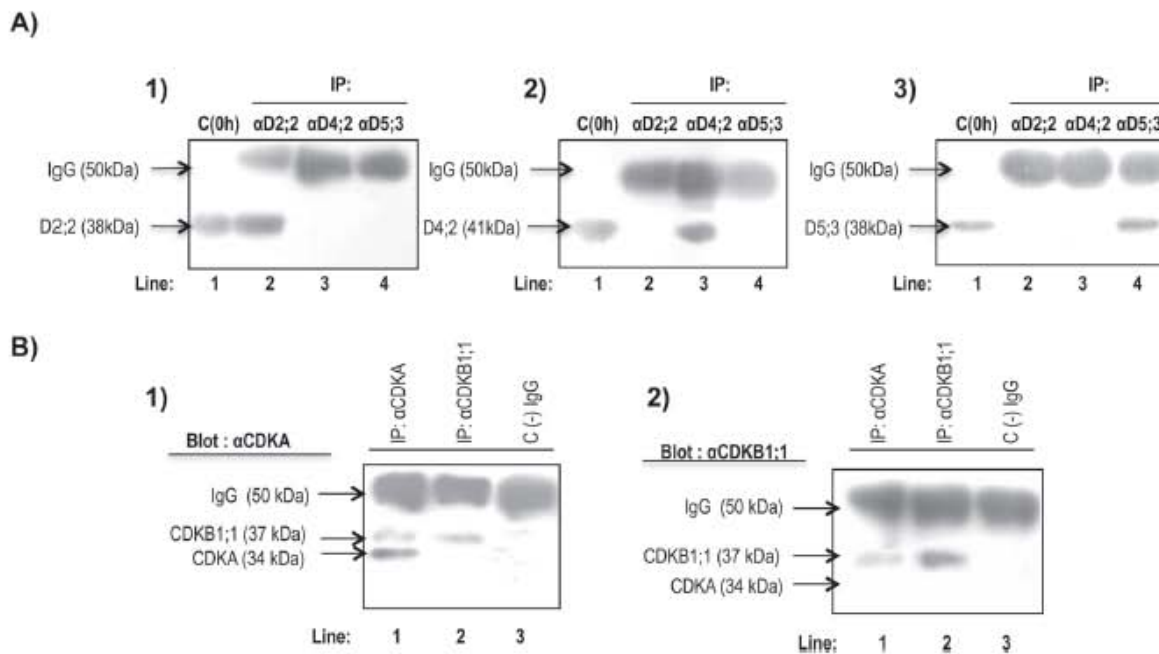


Fig. 1. Specificity of polyclonal antibodies. (A) Western blots using antibodies against the corresponding cyclins D: lanes 1, protein extracts from unimbibed maize axes; lanes 2–4, immunoprecipitation with anti-CycD2;2, anti-CycD4;2, and anti-CycD5;3 antibodies, respectively. Panels 1–3 show western blots using anti-CycD2;2, anti-CycD4;2, and anti-CycD5;3 antibodies, respectively. (B) Specificity of anti-CDK antibodies; lanes 1, immunoprecipitation with anti-CDKA antibody; lanes 2, immunoprecipitation with anti-CDKB1;1 antibody; lanes 3, immunoprecipitation with anti-CDKB1;1 antibody, but without adding protein extracts, showing only high-molecular-weight IgGs. Panels 1 and 2 show western blots using anti-CDKA and anti-CDKB1;1 antibodies, respectively.

protein levels seemed to decrease slightly during germination (Fig. 2C). The behaviour of CycD2;2 has been reported on before (Gutiérrez *et al.*, 2005) and it is very similar to that shown here (Fig. 2A). On the other hand, anti-CDKA antibodies detected a band at 34 kDa and levels did not seem to vary much (Fig. 2D), whereas anti-CDKB1;1 antibodies showed a 37 kDa protein that varied little in the first hours of germination, reaching a peak at 18 h to decrease by 24 h of germination (Fig. 2E).

Stability of D-type cyclins during maize germination

By definition, cyclins are unstable proteins; the presence at relatively constant levels of maize D-type cyclins during germination was intriguing and therefore their stability was studied. For this purpose, cycloheximide was added to germinating maize axes and the levels of each cyclin at 0, 3, and 6 h of imbibition were followed. The levels of the three D-type cyclins importantly decreased by 6 h of germination (CycD5;3 could not even be detected; Fig. 3C). As there was still a residual amount of CycD2;2 and CycD4;2 the experiment was prolonged to 9 h of germination; by this time no cyclin was detected if cycloheximide was added (Fig. S3). This result indicates that the three cyclins are targeted for degradation during early germination times and, thus, proteins observed in Fig. 2 must be the result of *de novo* synthesis, suggesting a balanced process of synthesis and degradation during maize germination.

Association of CycD2;2, CycD4;2, and CycD5;3 with CDKs during germination

Cyclins complexed with CDKs allow the latter to develop kinase activity. Antibodies were used to follow the interaction of the different D-type cyclins with CDKs using immunoprecipitation experiments. The three D-type cyclins interacted with both CDKs (Fig. 4). CycD2;2 had a peak of interaction with CDKA at 12 h of germination, strongly decreasing thereafter (Fig. 4A). On the other hand, CycD2;2 seemed to interact equally well at all times with CDKB1;1, with the only exception of the 12 h of germination time point, in which association was reduced (Fig. 4B).

Association of CycD4;2 with both CDKA and CDKB1;1 was very similar, as levels between 0 and 12 h of germination changed little and then interaction drastically decreased afterwards (Fig. 4D, E).

A very contrasting behaviour was found in the association of CycD5;3 with CDKs; whereas association with CDKA varied little during germination (Fig. 4F), with CDKB1;1 association only took place at 18 and 24 h of germination (Fig. 4G).

Separation of D-type cyclin-CDKA and D-type cyclin-CDKB1;1 complexes

The antibody against CDKA was prepared using the whole CDKA protein and recognized CDKB1;1, although poorly, when protein concentration was above 200 μ g (Fig. 1B and Fig. S2D, F); on the other hand, the antibody against CDKB1;1

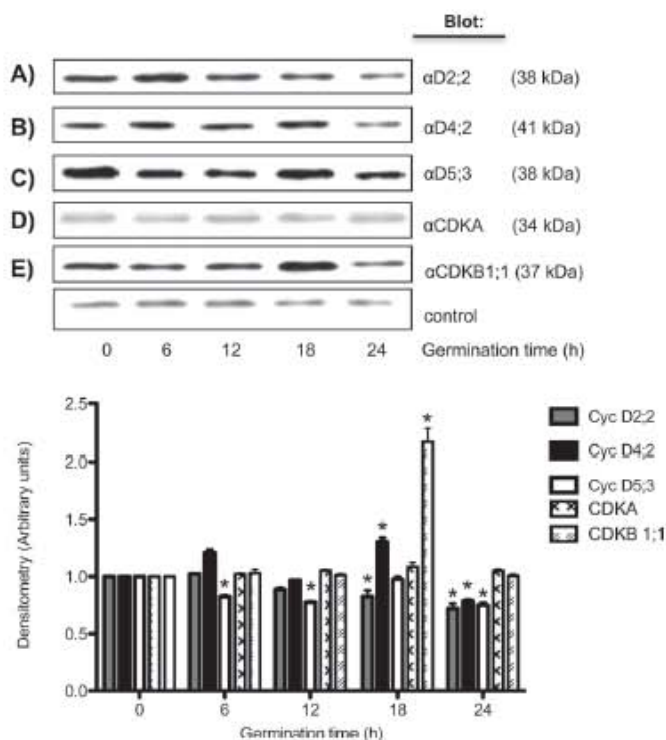


Fig. 2. Accumulation of D-type cyclins and CDKs during maize germination. Maize D-type cyclins and CDKs were identified by western blotting using specific antibodies against (A) CycD2;2, (B) CycD4;2, (C) CycD5;3, (D) CDKA, or (E) CDKB1;1 at 0, 6, 12, 18, and 24 h after germination. Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control (a 41 kDa maize protein recognized by an anti-human cyclin B antibody that is not related to maize B-type cyclin; Lara-Núñez *et al.*, 2008) and then to the dry seed band. Each bar represents the mean \pm SE from four independent experiments. *Statistically significant value ($P < 0.001$) compared to control.

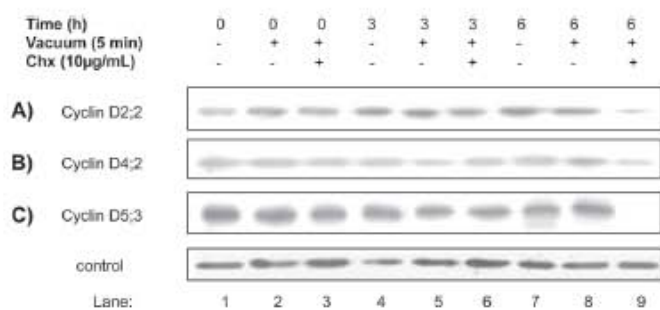


Fig. 3. Stability of D-type cyclins during germination. Maize embryo axes were imbibed for 0–6 h in the presence of cycloheximide (Chx; introduced by means of vacuum) and then the presence of D-type cyclins was followed by western blot. Lanes 1, 4, and 7, protein extracts from 0, 3, and 6 h-imbibed maize axes in the absence of cycloheximide. Lanes 2, 5, and 8, protein extracts from 0, 3, and 6 h-imbibed maize axes with a 5 min vacuum treatment at the beginning of the imbibition time. Lanes 3, 6, and 9, protein extracts from 0, 3, and 6 h-imbibed maize axes treated with vacuum and cycloheximide. Loading control as in Fig. 2.

was prepared using the N-terminal region, which is specific for this protein and therefore only recognizes CDKB1;1. Thus, a strategy was developed to separate D-type cyclins binding to one or the other CDK. As a first step, D-type cyclins were immunoprecipitated using the corresponding antibody (Fig. 5A). Then the immunoprecipitate was heated at 65 °C for 3 h to separate the D-type cyclin–CDK complex from protein A–agarose, denaturing the light and heavy chains; after spinning, the supernatant contained the pool of D-type cyclin–CDK complexes. By incubating with protein A–agarose and the anti-CDKB1;1 antibody (Fig. 5D), specific D-type cyclin–CDKB1;1 complexes were obtained in the immunoprecipitate, whereas the remaining supernatant should contain D-type cyclin–CDKA complexes that could be immunoprecipitated with anti-CDKA antibodies (Fig. 5E). Results with CycD2;2 are shown as an example of the reliability of this technique. CycD2;2 is recognized only in protein extracts, but not in immunoprecipitates when complexes have been removed (Fig. 5C, left-hand panel); CycD2;2 and CDKB1;1 are recognized when complexes are immunoprecipitated with anti-CDKB1;1 antibody (Fig. 5D, left-hand panel) and CycD2;2 and CDKA are recognized when the anti-CDKA antibody is used (Fig. 5E, left-hand panel). Assays for CycD4;2 and CycD5;3 are shown in Figure S4. The immunoprecipitate using the anti-CDKB1;1 antibody showed the presence of CDKB1;1 at all germination times (with a peak at 18 h), whereas the pattern of association with D-type cyclins was very similar to that shown in Figures 4B, E, and H. Immunoprecipitates with anti-CDKA antibody also showed the presence of CDKA at all germination times and an association pattern with D-type cyclins very similar to that shown in Figs 4A, D, and G.

Differential kinase activity in D-type cyclin–CDKA and D-type cyclin–CDKB1;1 complexes during maize germination

Using the conditions established above, D-type cyclin–CDK complexes were separated and kinase activity onto pRBR was measured in every protein complex. Kinase activity in the CycD2;2–CDKA complex did not change between 0 and 12 h of germination and then gradually decreased (Fig. 6A). However, there was no variation in kinase activity in the CycD2;2–CDKB1;1 complex during germination (Fig. 6B). In the complex formed by CycD4;2 and CDKA, again no variation in kinase activity was detected between 0 and 12 h, but after that time activity could not be detected (Fig. 6C); when complexed with CDKB1;1 kinase activity was detected at 0 and 6 h of germination, after which activity was not detectable until 24 h of germination (Fig. 6D).

In the CycD5;3–CDKA complex, kinase activity was similar between 0 and 18 h of germination and then decreased by 75% (Fig. 6E), whereas activity when containing CDKB1;1 was not detected in the 0–18 h period (Fig. 6F). Kinase activity was only detected at 24 h of germination.

As a positive control for D-type cyclin–CDK kinase activity, use was made of proteins pulled-down by the rice CKS protein (our unpublished data), an orthologue of yeast

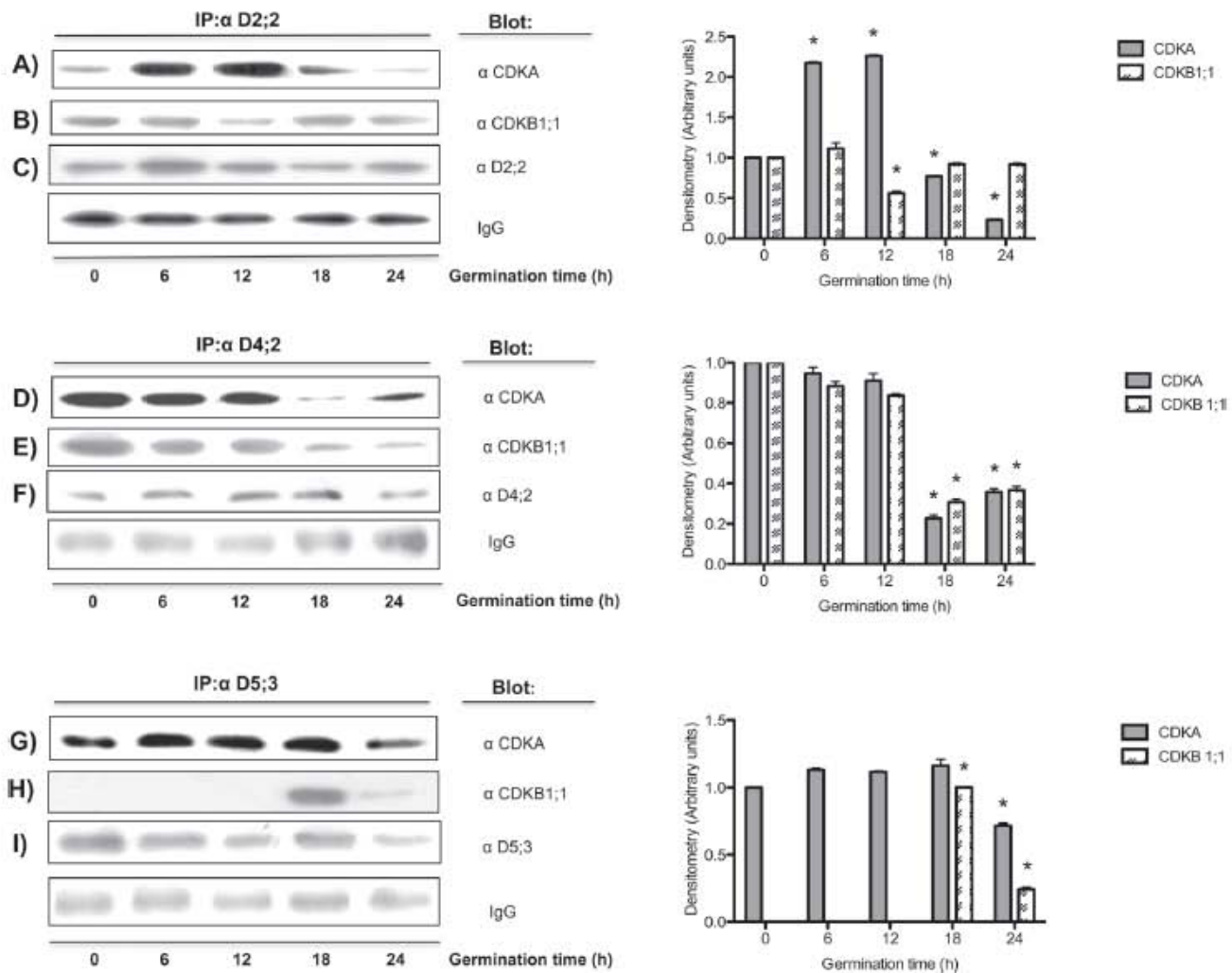


Fig. 4. Interaction of D-type cyclins with CDKs during maize germination. Antibodies against cyclins D2;2, 4;2, and 5;3 were used for immunoprecipitation and identification of the associated CDK in protein extracts from 0, 6, 12, 18, and 24 h-germinated axes. (A, B) Co-immunoprecipitation of CycD2;2 with CDKA and CDKB1;1 respectively; (D, E) co-immunoprecipitation of CycD4;2 with CDKA and CDKB1;1 respectively; (G, H) co-immunoprecipitation of CycD5;3 with CDKA and CDKB1;1 respectively. In (H) the intensity of the band at 18h was given a value of 1 as it could not be referred to the null value at time 0; thus, the band at 24h was compared to that at 18h. (C, F, I) Target proteins of the corresponding immunoprecipitating antibodies. Heavy chain IgGs were used as a loading control. Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to the intensity of the loading control and then to the dry seed band. Each bar represents the mean \pm SE from three independent experiments. *Statistically significant value ($P < 0.001$) compared to control.

p13^{Suc1}, which strongly binds Cdc2-type CDKs (Ducommun *et al.*, 1991).

Kinase activity in D-type cyclin-CDK complexes is dependent upon prior activating phosphorylation at a specific residue, Thr-160 (or the equivalent in every CDK; Fig. S1B). To test whether active D-type cyclin-CDK complexes contained activating phosphorylated residues, the three anti-D-type cyclin antibodies were used to immunoprecipitate complexes and these were treated or not with alkaline phosphatase prior to performing the kinase assay. The presence of a phosphatase totally eliminated kinase activity in all complexes, at every germination time tested, strongly suggesting that these complexes depend on a prior phosphorylation step to function (Fig. 7 and Fig. S5).

Discussion

The cell cycle is reactivated when seed germination begins. It has been reported that about 80% of cells in the dry seed are in G₁ phase (Bewley and Black, 1994), and it is in this phase that D-type cyclins should play an important role in cell cycle activation and progression. The three D-type cyclin proteins studied here—D2;2, D4;2, and D5;3—are present in dry seeds and during germination with apparently minimal fluctuation, particularly in the early stages of germination; however, the assays using cycloheximide show that these three proteins are unstable during these early hours; therefore, cyclin levels observed must be the result of a balanced process of synthesis and degradation that takes place during maize germination. It is difficult to know whether both the 'stored' and the newly

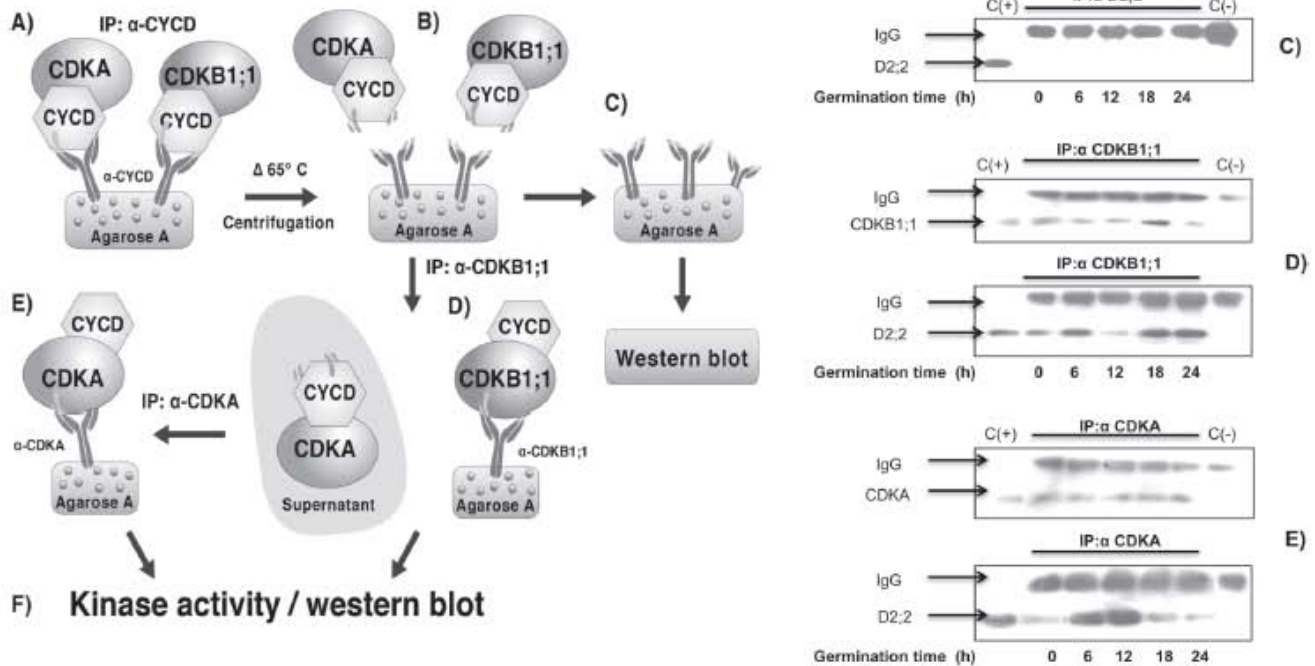


Fig. 5. Method of sequential immunoprecipitation. Left-hand panel: (A) Immunoprecipitation of D-type cyclins, (B) incubation of immunoprecipitates at 65 °C for 3 h and centrifugation, (C) D-type cyclin–CDK complex removal, (D) immunoprecipitation with anti-CDKB1;1 antibody, (E) immunoprecipitation of resulting supernatant after step (C) with anti-CDKA antibody, and (F) kinase activity in immunoprecipitates. Right-hand panel: detection of target proteins after each immunoprecipitation. (C) Recognition of CycD2;2 in immunoprecipitates with anti-CycD2;2 antibody, (D) recognition of CycD2;2 and CDKB1;1 in immunoprecipitates using anti-CDKB1;1 antibody, and (E) recognition of CycD2;2 and CDKA in immunoprecipitates using the anti-CDKA antibody. C(+), Protein extract from 12 h-imbibed maize axes; C(-), protein A–agarose+antibody (no protein extract).

synthesized D-type cyclins form useful, functional complexes with CDKs, even though it is clear that active D-type cyclin–CDK complexes are readily detectable at times when visible cyclin decay is evident, after 3–6 h of germination. It could be speculated that the active early germination ‘stored’ complexes would work to allow the accumulation of new complexes that then would take the cell cycle, and the germination process, forward. There is, however, no proof of the existence of such a cascade regulation or if the active, ‘stored’ complexes are located in physiologically relevant places so that they could help switch on the cell cycle.

All three cyclins associate with both CDKA and CDKB1;1 but show variations in association timing. Cyclins D2;2, D4;2, and D5;3 form complexes with CDKA at all times, and association is reduced by 24 h of germination, when mitosis is starting in meristem cells (Baiza *et al.*, 1989). Complexes of cyclins with CDKB1;1 show differences, but the most interesting is the lack of association with CycD5;3 during the early germination times, only to appear later; it should be recalled that the two CDKs are present throughout the germination process (Fig. 2). As will be discussed below, this differential association will necessarily be reflected in kinase activity. Since it had been reported that only a few plant D-type cyclins interacted with B-type CDKs (Swaminathan *et al.*, 2000), it becomes remarkable that all D-type cyclins studied here show interaction. Incidentally, it should be stated that maize cells appear to contain three almost identical A-type CDKs, and that our antibodies cannot distinguish among them.

Thus, regarding A-type CDKs the results reported here must be the sum of the associations and activity of the different possible D-type cyclin–CDKA complexes. There was no way we could discriminate between them.

Measuring total kinase activity in immunoprecipitates using every D-type cyclin antibody gave results that were difficult to interpret (results not shown). However, when complexes of the different cyclins with every CDK were separated by sequential immunoprecipitation, the results were revealing. As explained above, a sequential immunoprecipitation technique was applied by which an initial immunoprecipitation with anti-D-type cyclin antibodies was followed by a second immunoprecipitation with the anti-CDKB1;1 antibody. Then the remaining supernatant was immunoprecipitated with the anti-CDKA antibody (Fig. 5 and Fig. S4). These sequential immunoprecipitations showed that kinase activity in CycD2;2–CDKA complexes compared well with the amount of the corresponding complexes found at every germination time measured; but interestingly, that active CycD2;2–CDKB1;1 complexes were present throughout germination, a result that suggests roles for D-type cyclins not only in the G_1 phase, but also in G_2 –M, when B-type CDKs should be active. Evidence for D-type cyclins participating in G_2 –M processes in plants has been accumulating (Mészáros *et al.*, 2000).

Activity in CycD4;2–CDKs complexes showed some differences to that shown by CycD2;2 complexes; with CDKA there was activity up to 12 h of germination and then activity

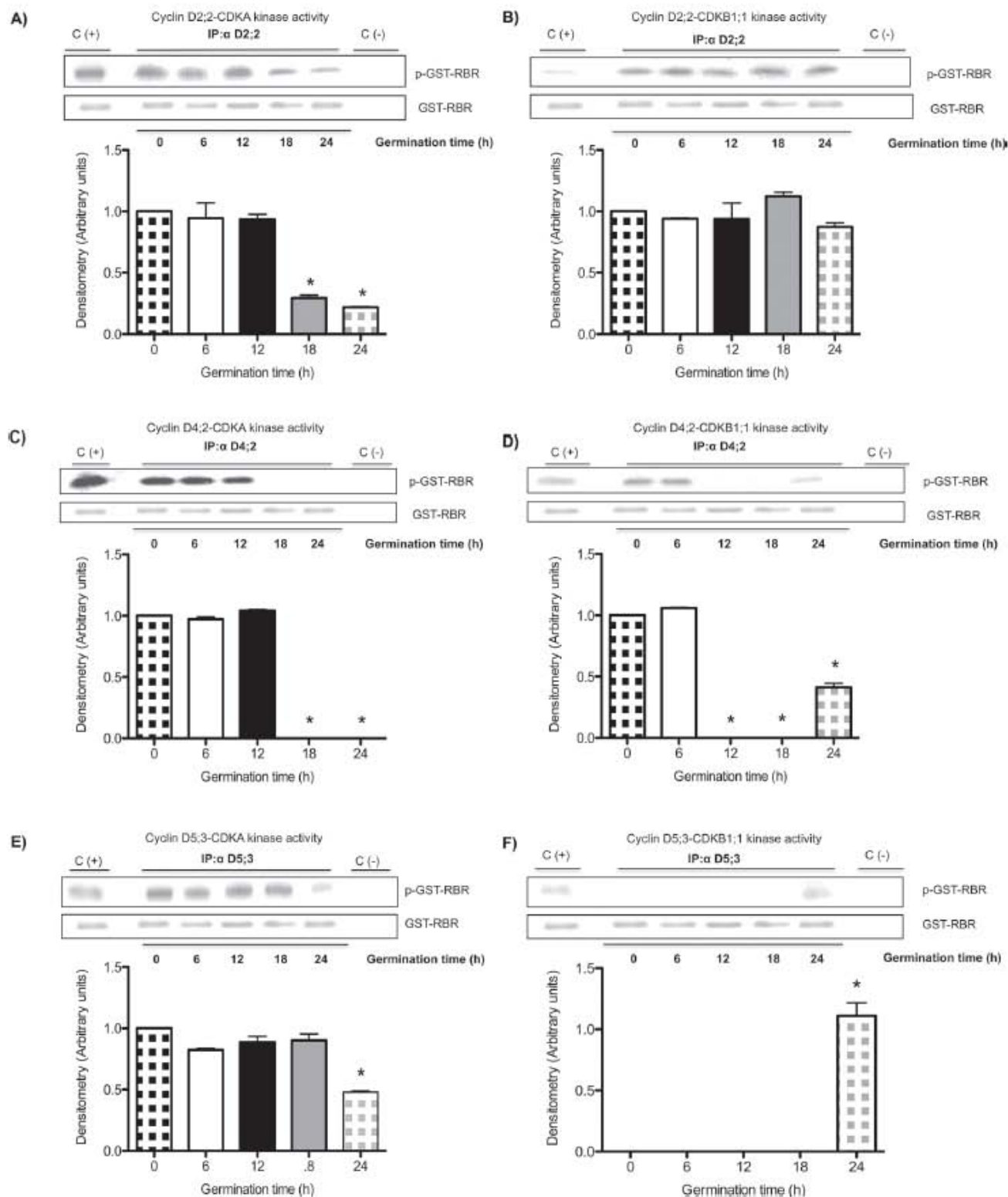


Fig. 6. Protein kinase activity in CDKA- or CDKB1;1-D-type cyclin complexes during maize germination. Activity was measured in CDKA-D-type cyclins or CDKB1;1-D-type cyclins complexes at 0, 6, 12, 18, and 24h of germination. (A, B) Kinase activity corresponding to CycD2;2 associated with CDKA or CDKB1,1 respectively. (C, D) Kinase activity corresponding to CycD4;2 associated with CDKA or CDKB1,1 respectively. (E, F) Kinase activity corresponding to CycD5;3 associated with CDKA or CDKB1,1 respectively. Again, in (F), the intensity of the band at 24h was taken as 1 as it could not be referred to the null value at time 0. The amount of GST-RBR protein (37 kDa) added as a substrate for kinase activity was used as the loading control. Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control and then to the dry seed band. C(+), Kinase activity in cyclin-CDK complexes pulled-down by rice CKS protein; C(-), D-type cyclin-CDK complexes without RBR added. Each bar represents the mean \pm SE from three independent experiments. *Statistically significant value ($P < 0.001$) compared to control.

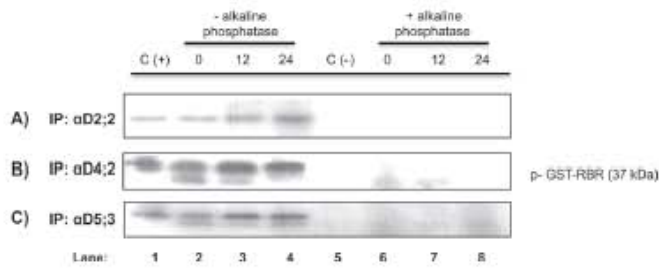


Fig. 7. Effect of alkaline phosphatase in kinase activity. (A) Anti-CycD2;2 immunoprecipitates of axes imbibed for 0, 12, and 24 h with or without alkaline phosphatase; (B) same as (A) but using the anti-CycD4;2 antibody; (C) same as (A) but using the anti-CycD5;3 antibody.

could not be detected, in close agreement with the association capacity; this result may indicate that CycD4;2-CDKA is important for the G_1 -S transition. On the other hand, with CDKB1;1 there was early activity and then no activity at all between 12 and 18 h of germination, although it reappeared at 24 h. This result may indicate that complex formation is not enough, and the possibility of regulation of kinase activity by either CDK phosphorylation status or the association with inhibitory proteins such as KIP1-related proteins (KRPs) should also be considered.

Again, CycD5;3 association with CDKs gave the more contrasting result. Whereas, when associated with CDKA there was similar kinase activity between 0 and 18 h of germination and then activity declined, following the pattern of association, exactly the opposite was observed with CDKB1;1: no activity at all was detected in the 0–18 h period and then the complex was formed, by 18 h, and activated at 24 h, prior to the onset of the M phase (Baiza *et al.*, 1989). This would be the expected result as no association of CycD5;3 with CDKB1;1 was detected during early stages of germination. Apparently, with CDKA CycD5;3 would form a G_1 -S kinase and with CDKB1;1 it would form a G_2 -M kinase.

As indicated above, in embryos of dry seeds of different species, cells in meristematic tissues, the only cell populations that proliferate, have mostly a G_1 -phase DNA content (Bewley and Black, 1994) and this is the case for maize. Although there is no absolute synchrony in cell populations, evidence indicates that by 24 h of germination cells in maize embryo axes are already in G_2 phase and by 28 h cells are getting into the M phase (Baiza *et al.*, 1989). Thus, maize D-type cyclins would appear to function with, and regulate G_1 -S and G_2 -M CDKs and these results may indicate a non-redundant but differential physiological role for every D-type cyclin-CDK complex. However, much is still ignored about the time of action, activation, associations, and location of the different D-type cyclins and CDKs in plants. The study of their location will be an important topic to follow. Also, the phosphorylation status of each CDK when bound to a cyclin could determine whether a complex is active or inhibited.

In conclusion, during maize germination the temporal differences in formation and activation of complexes integrated by different D-type cyclins and CDKs suggest partially non-redundant behaviour, indicating that every complex has some

specific role to play during the first cell cycles necessary for a seed to germinate and become a seedling.

Supplementary material

Supplementary material is available at *JXB* online.

Supplementary Fig. S1. Comparison of maize D-type cyclin sequences. (A) Alignment of carboxyl ends of the 17 maize D-type cyclins and percentage identity of Cyclins D4;2 and D5;3 compared to all maize cyclins. (B) Comparison of maize CDK sequences. Motif 1, sequence used for production of anti-CDKB1;1 antibodies; motif 2, canonical PSTAIRE-cyclin binding sequence (in Cdc2-type kinases like CDKA), PPTAL(M)RE in CDKB. (*) Represents phosphorylatable T14, Y15, and T160 residues, conserved in all CDKs.

Supplementary Fig. S2. Validation of antibodies against D-type cyclins and CDKs. (A, B) Lanes 1 and 3, protein extracts from non-imbibed maize axes and recombinant proteins incubated with the corresponding antibody; lanes 2, recombinant proteins incubated only with pre-immune serum. (A) Antibodies against GST-CycD4;2 and GST-CyclinD5;3; (B) antibodies against His-CDKA and GST-CDKB1;1. (C, D) Specificity of antibodies. (C) Lanes 1, protein extracts from non-imbibed maize axes; lanes 2, GST-CycD4;2; lanes 3, GST-CycD5;3; (C1) western blot using anti-CycD4;2 antibody; (C2) western blot using anti-CycD5;3 antibody. (D) Lanes 1, protein extracts from non-imbibed maize axes; lanes 2, His-CDKA; lanes 3, GST-CDKB1;1; (D1) western blot using anti-CDKA antibody; (D2) western blot using anti-CDKB1;1 antibody. (E, F) Recognition of CDKs. (E1) Increasing concentrations of protein extracts (50–300 μ g) from non-imbibed maize axes and recognition of CDKs using the anti-CDKA antibody. Notice the recognition of a 37 kDa band (CDKB1;1) at 250 μ g of protein; (E2) same as above but recognition with anti-CDKB1;1 antibody (only CDKB1;1 is recognized). Membranes stained with Ponceau red are shown as the loading control. (F) Immunoprecipitation with anti-CDKA antibody. (F1) Immunoprecipitation of samples with increasing concentrations of protein extracts (100–300 μ g) from non-imbibed maize axes, using anti-CDKA antibody and recognition by anti-CDKA antibodies of 34 kDa (CDKA) and 37 kDa (CDKB1;1) bands; the latter is observed only in the 300 μ g sample. (F2) Western blot using anti-CDKB1;1 antibody of proteins immunoprecipitated by anti-CDKA antibodies in samples of increasing concentrations of protein extracts from non-imbibed maize axes (150, 200, and 300 μ g). Only the 37 kDa band is detected at 300 μ g. C(+), Proteins extracts from non-imbibed axes (50 μ g); C(-), immunoprecipitation with anti-CDKA antibody, no protein extract added.

Supplementary Fig. S3. Stability of D-type cyclins during germination. Maize embryo axes were imbibed for 9 h in the presence of cycloheximide (introduced by means of a vacuum) and then the presence of D-type cyclins was followed by western blot. Lanes 1, 4, and 7, protein extracts from 9 h-imbibed maize axes in the absence of cycloheximide. Lanes 2, 5, and 8, protein extracts from 9 h-imbibed maize axes with

a 5 min vacuum treatment at the beginning of imbibition. Lane 3, 6, and 9, protein extracts from 9 h-imbibed maize axes treated with vacuum and cycloheximide. Loading control as in Fig. 2.

Supplementary Fig. S4. Validation of the sequential immunoprecipitation technique (according to Fig. 5). Lane C: immunoprecipitation (0, 6, 12, 18, and 24 h of germination) and western blot of each D-type cyclin after heat treatment (65 °C, 3 h) and removal of D-type cyclin-CDK complexes. Lane D: immunoprecipitation of CDKB1;1 from the supernatant containing D-type cyclin-CDK complexes from step B and identification of CDKB1;1 and D-type cyclins by western blot. Lane E: immunoprecipitation of CDKA from the supernatant obtained in step D and identification of CDKA and D-type cyclins by western blot. Positive control, identification of the target protein in protein extracts from non-germinated seed axes. Negative control, high-molecular-weight IgGs.

Supplementary Fig. S5. Alkaline phosphatase and CDK activity. Lane 1 (C+), kinase activity in cyclin-CDK complexes pulled down by CKS protein; lane 2, kinase activity in anti-CycD2;2 immunoprecipitate; lane 3, dephosphorylation of substrate used in lane 2 (RBR protein) by alkaline phosphatase; lane 4, inhibition of alkaline phosphatase activity by 40 min pre-incubation with inhibitor and kinase activity in anti-CycD2;2 immunoprecipitate; lane 5 (C-), anti-CycD2;2 immunoprecipitate with no protein extract added; lane 6, pre-incubation of alkaline phosphatase with inhibitor (40 min), then substrate and ³²P were added and then incubation with anti-CycD2;2 immunoprecipitate; lane 7, pre-incubation of alkaline phosphatase with ³²P and inhibitor, then the substrate and finally anti-CycD2;2 immunoprecipitate; lane 8, preincubation of alkaline phosphatase and ³²P (40 min), then the kinase assay.

Supplementary Fig. S6. Kinase activity after a high-temperature treatment. (A) Lane 1 (C+), kinase activity in cyclin-CDK complexes bound to CKS protein; lane 2, kinase activity in CycD2;2-CDKA complexes (heat-treated); lane 3, kinase activity in CycD2;2-CDKB1;1 complexes (heat-treated); lane 4, kinase activity in anti-CDKA immunoprecipitates (no heat treatment); lane 5, kinase activity in anti-CDKB1;1 immunoprecipitates (no heat treatment); lane 6 (C-), kinase activity in anti-CycD2;2 immunoprecipitates with no protein extract added. (B) Lane 1 (C+), kinase activity in cyclin-CDK complexes bound to CKS protein; lane 2, kinase activity in anti-CycD2;2 immunoprecipitates; lane 3, kinase activity in anti-CDKA immunoprecipitates; lane 4, kinase activity in anti-CDKB1;1 immunoprecipitates; lane 5, kinase activity in cyclin-CDK complexes pulled down by a p13Suc1 resin; lane 6, kinase activity in cyclin-CDK complexes pulled down by a p13Suc1 resin treated at 65 °C for 3 h; lane 7, kinase activity in anti-CycD2;2 immunoprecipitates with no protein extract added.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 79874), Programa

de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, grant numbers IN201309 and IN212512), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-MSc and PhD grants (to S.K.G.P.) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Sistema Nacional de Investigadores-level III (to F.R.).

References

- Baiza MA, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E.** 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology* **135**, 416–421.
- Barroco R, Van Poucke K, Bergervoet JHW, De Veylder L, Groot SPC, Inzé D, Engler G.** 2005. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiology* **137**, 127–140.
- Bewley JD.** 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* **9**, 1055–1066.
- Bewley JD, Black M.** 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination* (2nd edn). New York: Plenum.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bray CM, Davison PA, Ashraf M, Taylor RM.** 1989. Biochemical changes during osmopriming of leek seeds. *Annals of Botany* **63**, 185–193.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla L, García E, Vázquez-Ramos JM.** 2011. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiologia Plantarum* **143**, 297–308.
- Conger BV, Carabia JV.** 1976. Microspectrophotometric determination of the 2C and 4C nuclear complement in the root and shoot of the dormant maize embryo. *Environmental and Experimental Botany* **16**, 171–175.
- Cross FR.** 1988. DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* **8**, 4675–4684.
- Cross FR.** 1990. Cell cycle arrest caused by CLN gene deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* resembles START-I arrest and is independent of the mating-pheromone signalling pathway. *Molecular Cell Biology* **10**, 6482–6490.
- de Castro RD, van Lammeren A, Groot S, Bino R, Hihorst H.** 2000. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiology* **122**, 327–336.
- Deltour R, Jacqmard A.** 1975. Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L. *Annals of Botany* **38**, 529–534.
- Dewitte W, Murray JAH.** 2003. The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 235–64.
- Ducommun B, Brambilla P, Draetta G.** 1991. Mutations at sites involved in Suc1 binding inactivate Cdc2. *Molecular Cell Biology* **11**, 6177–6184.

- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T.** 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389–396.
- Fyvie MJ, Murray JAH, Kilby NJ.** 2002. Mosaic analysis of *GL2* gene expression and cell layer autonomy during the specification of *Arabidopsis* leaf trichomes. *Genesis* **28**, 68–74.
- García E, Orjuela D, Camacho Y, Zúñiga JJ, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM.** 1997. Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Molecular Biology* **33**, 445–455.
- Georgieva EI, López-Rodas G, Hittmair A, Feichtinger H, Brosch G, Loidl P.** 1994b. Maize embryo germination I. Cell cycle analysis. *Planta* **192**, 118–124.
- Georgieva EI, López-Rodas G, Loidl P.** 1994a. Maize embryo germination. II. Proteins related to nuclear proto-oncogene and tumor suppressor gene products. *Planta* **192**, 125–129.
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM.** 2005. Maize Cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant and Cell Physiology* **46**(1), 166–173.
- Hadwiger JA, Reed SI.** 1990. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CLN1 and CLN2 genes. *Nucleic Acids Research* **18**, 4025–4032.
- Hadwiger JA, Wittenberg C, Richardson HE, De Barros Lopes M, Reed SI.** 1989. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**, 6255–6259.
- Hall T.** 1999. *Biological Sequence Alignment Editor v.7. 2. 0*. Ibis Biosciences. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Inzé D, De Veylder L.** 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* **40**, 77–105.
- Lara-Núñez A, De Jesús N, Vázquez-Ramos JM.** 2008. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum* **132**, 79–88.
- Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH.** 2005. D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 15694–15699.
- Mészáros T, Miskolczi P, Ayaydin F, Pettkó-Szandtner A, Peres A, Magyar Z, Horváth GV, Bakó L, Fehér A, Dudits D.** 2000. Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Molecular Biology* **43**, 595–605.
- Nash R, Tokiwa G, Anand S, Erickson K, Futcher AB.** 1988. The WH1 + gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO Journal* **7**, 4335–4346.
- Pines J.** 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 195–197.
- Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutierrez C.** 1999. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G (1)/S regulators. *Nucleic Acids Research* **127**, 3527–3533.
- Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D et al.** 1996. Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology* **32**, 1003–1018.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH.** 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541–1544.
- Swaminathan K, Yang Y, Grotz N, Campisi L, Jack T.** 2000. An enhancer trap line associated with a D-class cyclin gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**, 1658–1667.
- Tyres M, Jorgensen P.** 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics and Development* **10**, 54–64.
- Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP.** 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* **13**, 113–130.
- Verkest A, Lara de O Manes C, Vercruyssen S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D, De Veylder L.** 2005a. The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *The Plant Cell* **17**, 1723–1736.
- Verkest A, Weill C, Inzé D, De Veylder L, Schnittger A.** 2005b. Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiology* **139**, 1099–1106.