



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Caracterización génica de la familia ICK/KRP de maíz

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Fernando Rodrigo Rosas Bringas

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos, Facultad de Química - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez, Instituto de Ecología – UNAM  
Dr. Eleazar Martínez Barajas, Facultad de Química - UNAM

MÉXICO, D. F. MAYO, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Reconocimientos

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

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

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química – UNAM
Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez	Instituto de Ecología – UNAM
Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química – UNAM

Se reconoce:

La asesoría técnica y discusión de resultados de la Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez del Instituto de Ecología UNAM; de la Dra. Aurora Lara Nuñez del laboratorio 114 de la Facultad de Química; del Técnico Académico del laboratorio 114, Dr. Elpidio García Ramírez; de la Técnico Académico del laboratorio 103, Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida en el asesoramiento técnico en los experimentos de purificación; así como de mis compañeros de laboratorio durante la duración del proyecto.

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

Durante la duración de la maestría gocé de una Beca de Maestría Nacional otorgada por Conacyt, así como un apoyo económico para asistencia a congreso (Xcaret 2013) otorgada por PAEP.

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

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química – UNAM
Vocal	Dra. María Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM
Vocal	Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular – UNAM
Vocal	Dra. Adriana Garay Arroyo	Instituto de Ecología – UNAM
Secretario	Dr. León Patricio Martínez Castilla	Facultad de Química – UNAM

# Agradecimientos

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

Al Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos, por la invaluable influencia en mi formación y crecimiento académico, científico y personal; por la crítica, orientación y discusión del proyecto; por todo su apoyo, entera confianza y libertad que me brindó en el desarrollo del proyecto; por ser un excelente tutor; por su valiosa amistad.

A los doctores Aurora Lara, Mary Paz Sánchez y Elpidio García por compartir conmigo sus conocimientos, críticas y experiencia en el desarrollo de este proyecto así como en mi formación en el laboratorio.

A los miembros de mi comité tutor, Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez y Dr. Eleazar Martínez Barajas por sus valiosos comentarios, críticas y discusión que enriquecieron notablemente el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Jurado, doctores Rogelio Rodríguez Sotres, María Imelda López Villaseñor, Fernando López Casillas, Adriana Garay Arroyo y Adriana Garay Arroyo por brindarme parte de su tiempo para discutir mi trabajo y aportar acertadas correcciones durante la revisión de esta tesis.

Al laboratorista Jorge Velázquez por su incansable trabajo en el laboratorio, por su apoyo en determinados experimentos, por la pláticas matutinas de deportes y por su amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio 114, Brendy, Gris, Fernanda, Cassandra, Javier, Roberto, Pablo y con mención especial a Sara, Jozz, Mingyar y Victor, por su amistad, compañerismo, apoyo en cada experimento fallido y situaciones personales desalentadoras, por sus aportaciones experimentales en la discusión de datos y desarrollo de ideas y sobre todo por hacer de mi estadía en el laboratorio una experiencia muy agradable.

A Silvia por haberme adoptado académicamente desde el primer día que llegué al laboratorio, por su invaluable amistad, por sus consejos, enseñanzas y por su apoyo en los buenos y malos momentos.

A mis tías, Irma y Chelo, a mis tíos, Adrián, Beto y Héctor y a mi abuelito Hector F por su gran apoyo personal y por su amistad.

A mi mamá María Esther y mi hermano Omar Guillermo por ser los pilares de mi vida, por su apoyo incondicional y por creer en mi.

Al Conacyt por la beca otorgada

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

# Índice

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Abreviaturas.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>3</b>
3.1 El ciclo celular.....	3
3.2 Regulación del complejo Ciclina/CDK.....	4
3.3 Inhibidores de CDKs en mamíferos.....	6
3.4 Inhibidores de CDKs en otros organismos.....	7
3.5 Inhibidores de CDKs en plantas.....	7
3.5.1 Familia ICK/KRP.....	7
3.5.1.1 Características Generales y propiedades bioquímicas.....	7
3.5.1.2 Interacción con otras proteínas del ciclo celular.....	8
3.5.1.3 Análisis filogenético y organización estructural de motivos conservados en proteínas de ICK/KRP.....	9
3.5.1.4 Regulación a nivel transcripcional de la familia ICK/KRP.....	11
3.5.1.5 Estabilidad de las proteínas ICK/KRPs y su regulación a nivel postraduccional.....	11
3.5.1.6 Localización celular.....	12
3.5.1.7 ICK/KRPs en el crecimiento y desarrollo de la planta.....	13
3.5.1.8 ICK/KRPs y endorreduplicación.....	14
3.5.1.9 Conexión entre endorreduplicación y elongación celular.....	15
3.5.2 Familia SIM/EL2.....	16
<b>4. Justificación.....</b>	<b>17</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>17</b>
6.1 Objetivo General.....	17
6.2 Objetivos particulares.....	17
<b>7. Materiales y Métodos.....</b>	<b>18</b>
7.1 Análisis <i>in silico</i> .....	18
7.1.1 Recopilación de datos.....	18
7.1.2 Obtención de las secuencias de ICK/KRPs de maíz.....	18
7.1.3 Comparación de ICK/KRPs de otras especies. Análisis filogenético.....	18
7.1.4 Identificación de dominios.....	19
7.2 Análisis de expresión de genes.....	19
7.2.1 Búsqueda <i>in silico</i> de genes expresados.....	19
7.2.2 Búsqueda experimental de transcritos en tejido de plántula y germinación.....	20
7.2.2.1 Tejidos y secciones de planta empleados.....	20
7.2.2.2 Extracción de RNA total y monitoreo de su integridad.....	21
7.2.2.3 Purificación con Dnasa.....	21
7.2.2.4 Preparación de cDNA.....	22
7.2.2.5 Amplificación por PCR.....	22
7.3 Obtención de proteínas recombinantes para ensayos de inhibición en la actividad de cinasa.....	22

7.3.1 Amplificación del cDNA de Zeama;ICK2/KRP1;1 y Zeama;ICK1/KRP4;2.....	22
7.3.2 Clonación en el vector de entrada.....	23
7.3.3 Clonación en el vector de expresión.....	24
7.3.4 Expresión de la proteína recombinante.....	24
7.3.5 Purificación de proteínas recombinantes.....	24
7.3.5.1 Proteínas fusionadas a GST.....	25
7.3.5.2 Proteínas con etiqueta de histidinas.....	25
7.3.5.3 Renaturalización de proteínas recombinantes.....	26
7.3.6 Inhibición en la actividad de cinasa.....	26
7.3.6.1 Extracción de proteína.....	26
7.3.6.2 Inmunoprecipitación.....	26
7.3.6.3 Actividad de cinasa.....	27
<b>8. Resultados.....</b>	<b>28</b>
8.1 Análisis <i>in silico</i> .....	28
8.1.1 Identificación de genes que codifican ICK/KRPs en el genoma de maíz, comparación de secuencias con sus respectivos ortólogos y posible nomenclatura.....	28
8.1.2 Identificación de motivos y dominios conservados.....	30
8.2 Análisis de expresión de genes.....	33
8.2.1 Expresión de ICK/KRPs en transcriptoma de hoja de maíz.....	33
8.2.2 Ensayos de expresión en tejidos de plántula y germinación.....	34
8.3 Obtención de proteínas recombinantes para ensayos de inhibición en la actividad de cinasa de complejos Ciclina D/CDK.....	36
8.3.1 Amplificación de los cDNAs de Zeama;KRP1;1 y Zeama;KRP4;2.....	36
8.3.2 Clonación de los cDNAs en el vector de clonación pGEM-T Easy.....	36
8.3.3 Clonación de los cDNAs en los vectores de expresión pPAL7, pGEX-4T2 y pPROEX-HTb.....	37
8.3.4 Expresión de la proteína recombinante.....	41
8.3.4.1 Expresión de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2.....	41
8.3.4.2 Expresión de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2.....	41
8.3.5 Purificación de las proteínas recombinantes.....	42
8.3.5.1 Purificación de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2.....	42
8.3.5.2 Purificación de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2.....	43
8.3.5.3 Renaturalización de las proteínas recombinantes.....	44
8.3.6 Ensayos de inhibición en la actividad de cinasa asociada a los complejos con Ciclina D2;2 y Ciclina D6;1.....	45
8.3.7 Fosforilación de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2 por parte de complejos asociados a Ciclina D2;2.....	48
<b>9. Discusión de resultados.....</b>	<b>49</b>
9.1 Análisis <i>in silico</i> .....	49
9.2 Análisis de expresión de genes.....	52
9.3 Inhibición en la actividad de cinasa.....	54
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>56</b>
<b>11. Perspectivas.....</b>	<b>57</b>
<b>12. Bibliografía.....</b>	<b>58</b>
<b>13. Anexos.....</b>	<b>66</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control.....	3
<b>Figura 2.</b> Regulación de la actividad de CDK.....	5
<b>Figura 3.</b> Motivos conservados y funcionales putativos en proteínas ICK/KRP de plantas.....	10
<b>Figura 4.</b> Modelo simplificado basado en los efectos observados en la expresión de ICK/KRP en la división celular, endorreducción, muerte celular y morfología de la planta.....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo de plántula de 14 días de germinación.....	21
<b>Figura 6.</b> Árbol filogenético de las ICK/KRPs de Arabidopsis, arroz y maíz.....	30
<b>Figura 7.</b> Representación de los motivos y dominios conservados de proteínas ICK/KRP de maíz y un miembro de arabidopsis representativo de la clase A.....	31
<b>Figura 8.</b> Niveles de expresión de genes ICK/KRP de maíz en hoja de plántula ( <i>in silico</i> ).....	33
<b>Figura 9.</b> Perfiles de expresión de los genes ICK/KRP de maíz.....	35
<b>Figura 10.</b> Amplificación de los cDNA de Zeama;KRP1;1 por PCR.....	36
<b>Figura 11.</b> Amplificación de los cDNA de Zeama;KRP4;2 por PCR.....	36
<b>Figura 12.</b> Doble digestión de las clonas candidatas de pGEM-T Easy a tener el inserto.....	37
<b>Figura 13.</b> Doble digestión de las clonas candidatas de pPAL7 a tener el inserto de Zeama;KRP1;1 y Zeama;KRP4;2 respectivamente.....	38
<b>Figura 14.</b> Doble digestión de las clonas candidatas de pGEX-4T2 a tener el inserto de Zeama;KRP1;1 y Zeama;KRP4;2 respectivamente.....	38
<b>Figura 15.</b> Doble digestión de las clonas candidatas de pPROEX-HTb a tener el inserto de Zeama;KRP1;1 y Zeama;KRP4;2 respectivamente.....	38

<b>Figura 16.</b> Alineamiento entre la secuencia teórica y experimental de las proteínas recombinantes fusionadas a GST.....	39
<b>Figura 17.</b> Alineamiento entre la secuencia teórica y experimental de las proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas.....	40
<b>Figura 18.</b> Inducción de la proteína recombinante GST-KRP1;1 y GST- KRP4;2.....	41
<b>Figura 19.</b> Inducción de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2.....	42
<b>Figura 20.</b> Purificación de la proteína recombinante GST-KRP1;1 .....	43
<b>Figura 21.</b> Purificación de la proteína recombinante GST-KRP4;2. ....	43
<b>Figura 22.</b> Purificación de la proteína recombinante His-KRP1;1 e His-KRP4;2 .....	44
<b>Figura 23.</b> Renaturalización de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2.....	44
<b>Figura 24.</b> Actividad de cinasa sobre GST-RBR-C (controles) .....	46
<b>Figura 25.</b> Efecto de Zm KRP1;1/ICK2 y Zm KRP4;2/ICK1 sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-Ciclina D2;2 y anti-Ciclina D6;1, utilizando GST-ZmRBR-C como sustrato.....	47
<b>Figura 26.</b> Fosforilación de las proteínas recombinantes ICK2/KRP1;1 e ICK1/KRP4;2.....	48

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Cebadores diseñados para amplificar los transcritos completos de ICK2/KRP1;1 e ICK1/KRP4;2.....	23
<b>Tabla 2.</b> Condiciones para amplificación de los transcritos por PCR.....	23
<b>Tabla 3.</b> Expresión de ICK/KRPs de maíz en diferentes bases de datos.....	28
<b>Tabla 4.</b> Matriz de identidad entre las secuencias proteicas de las ICK/KRPs de maíz y arroz.....	29
<b>Tabla 5.</b> Cebadores diseñados para amplificar los transcritos de la familia ICK/KRP de maíz.....	34



# 1. Resumen

En eucariontes, el ciclo celular esta estrictamente regulado por proteínas llamadas ciclinas, asociadas a cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad de las CDKs puede ser regulada positiva o negativamente por regulación transcripcional, unión de otras proteínas, fosforilación/desfosforilación y proteólisis de las ciclinas. Mientras que la unión de ciclinas activa a las CDKs, los inhibidores (CKIs), generalmente de bajo peso molecular, se unen a las CDKs e inhiben su actividad. En plantas se han descrito dos familias de CKIs. La primera ha conservado la región C terminal, que muestra una limitada similitud al inhibidor p27<sup>kip1</sup> de la familia CIP/KIP de mamíferos. Esta familia de proteínas en Arabidopsis es referida como ICKs (interactores/inhibidores de CDKs) o también llamados KRP (Kip-related proteins).

En maíz hemos descrito y estudiado a los diferentes miembros de las familias CYCD, CDKA y CDKB, así como su actividad de cinasa sobre blancos específicos. En el presente trabajo se hizo una búsqueda global de genes miembros de la familia ICK/KRP en el genoma de maíz y se identificaron al menos diez posibles genes, aunque dos de ellos podrían ser pseudogenes . De acuerdo al análisis de secuencia y filogenia, los miembros de la familia ICK/KRP de maíz únicamente están presentes en dos de las tres clases de KRPs descritas, además de presentar patrones de expresión diferenciales entre distintos tejidos de plántula y a lo largo de la germinación, sugiriendo una posible función en distintos procesos durante el desarrollo de la planta.

Finalmente, se clonaron, expresaron y purificaron las proteínas recombinantes de dos miembros de la familia ICK/KRP de maíz perteneciente a diferentes clases. Dichas proteínas recombinantes se emplearon en ensayos de inhibición en la actividad de cinasa asociada a distintas ciclinas tipo D, donde la actividad inhibitoria por parte de estas dos ICK/KRPs son diferentes y probablemente depende de los complejos formados por las ciclinas D con diferentes CDKs. De igual manera, dichos inhibidores parecen ser sustrato de fosforilación de complejos formados por Ciclina D2;2 y D6;1.

## 2. Abreviaturas

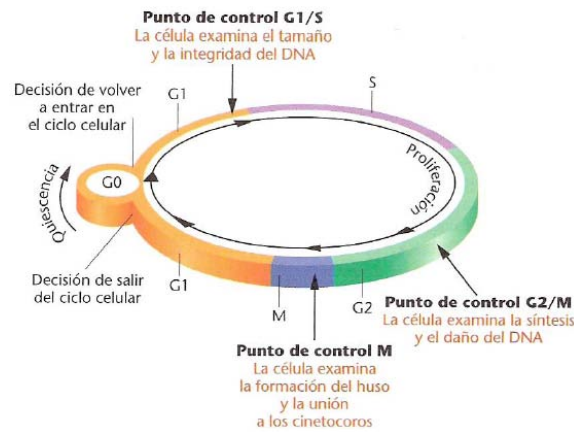
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CDC</b>	Ciclo de División Celular
<b>CDK</b>	Cinasa dependiente de Ciclina
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CID</b>	Dominio de interacción/inhibición de CDK/ciclina
<b>Cip/Kip</b>	Proteína inhibidora de CDK
<b>CYC</b>	Ciclina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>GL2</b>	GLABRA2
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>ICK</b>	Interactores/inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas
<b>INK4</b>	Inhibidor de CDK4
<b>IP</b>	Inmunoprecipitado
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>KDa</b>	kiloDalton
<b>KRP</b>	Proteínas relacionadas a Kip
<b>MCM</b>	Mantenimiento de minicromosoma
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>ORC</b>	Complejo de reconocimiento del origen
<b>RBR</b>	Proteína Relacionada a Retinoblastoma
<b>Ser</b>	Serina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>Thr</b>	Treonina
<b>Tyr</b>	Tirosina

### 3. Introducción

#### 3.1 El ciclo celular

El ciclo celular tiene un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares, incluyendo las plantas (Dewitte & Murray, 2003).

La proliferación celular requiere de la división celular y para lograrlo las células deben crecer en tamaño, duplicar sus cromosomas y, finalmente, separar los cromosomas para su exacta distribución entre las dos células hijas. Estos procesos están coordinados en el ciclo celular y consisten de diferentes fases (Figura 1). En la primera fase (G1) las células crecen y empiezan a alargarse. Después de alcanzar un cierto tamaño (en promedio alcanzan el doble del tamaño original y en el caso de organismos multicelulares esta regulado por señales procedentes de células vecinas), las células entran a la siguiente fase (S o de síntesis), en la cual ocurre la síntesis de DNA para duplicar el material hereditario. Durante la siguiente fase (G2) la célula asegura que la replicación del DNA se haya completado y sólo entonces las células se preparan para la división celular. Los cromosomas se separan durante la fase M (mitosis) y la célula se divide en dos células hijas, cada una de las cuales recibe un juego idéntico de cromosomas. Después de la división las células reingresan a la fase G1 y el ciclo celular puede recomenzar (Vázquez- Ramos y Sánchez, 2003)



**Figura 1.** Representación esquemática del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control (Klug y Cummings, 1999).

Durante la fase G1 temprana, las células integran la información externa (mediante receptores) que es derivada de estímulos mitogénicos y de la disponibilidad de nutrientes para prepararse y poder pasar a través de las distintas fases del ciclo celular. Para asegurar esta progresión apropiada, las células han desarrollado puntos de control ó checkpoints, que previenen la entrada a una nueva fase

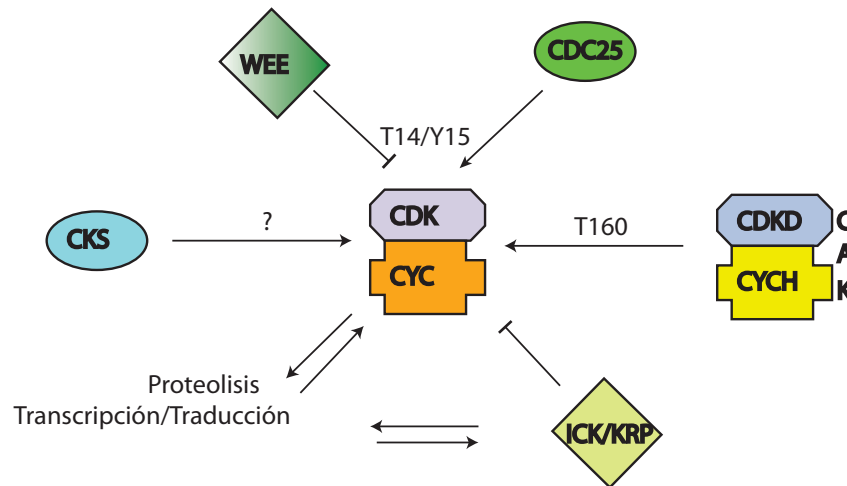
hasta que hayan completado correctamente la fase previa (Meijer y Murray, 2000; Malumbres y Barbacid, 2005), por ejemplo, si la duplicación del material genético (Fase S) no ha sido completada correctamente, el ciclo celular no avanzará y se detendrá en la transición G2/M.

La progresión del ciclo celular es controlada por una maquinaria molecular universalmente conservada y gobernada por una serie de proteínas cinasas de Ser/Thr, conocidas como CDKs (cinasas dependientes de ciclina), las cuales se activan mediante su asociación con proteínas regulatorias conocidas como ciclinas (Vidal y Kofit, 2000; Vandepoele *et al.*, 2002). Las ciclinas fueron identificadas primero como proteínas que mostraban un patrón cíclico de acumulación y destrucción durante la división celular (Renaudin *et al.*, 1996). Las ciclinas muestran oscilaciones en su abundancia durante el ciclo celular, la cual está controlada de manera tanto transcripcional como a nivel traduccional y también por degradación proteolítica (Larkins *et al.*, 2001).

La fosforilación y desfosforilación de proteínas clave es un mecanismo fundamental para la regulación del ciclo celular, permitiendo que éste avance. Los complejos ciclina/CDK son las moléculas que conducen la progresión del ciclo celular, regulando las diferentes transiciones, así como la salida del ciclo celular (Boniotti y Griffith, 2002). Se ha propuesto que la regulación de la expresión de genes en diferentes fases, específicamente en los puntos de control críticos en donde las células pasan de la fase G1 a S y de G2 a M, es un mecanismo importante para controlar la progresión del ciclo celular. Estos genes frecuentemente muestran una regulación dependiente de la posición del ciclo celular (Zhang *et al.*, 2005) y son requeridos para progresión de este mismo. Por ejemplo, para poder comenzar la Fase S se requiere la expresión de genes tales como Ciclina A, genes de Histonas y genes involucrados en la síntesis de DNA, como la DNA polimerasa  $\delta$ , la dihidrofolato reductasa, CDC6, ORC1, ORC3, MCM, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la ribonucleótido reductasa y una subunidad de la polimerasa  $\delta$  (Ramírez-Parra *et al.*, 2003).

### **3.2 Regulación del complejo Ciclina/CDK**

Las ciclinas no solamente activan a las CDKs al cambiar la conformación de sus sitios catalíticos, sino que también contribuyen a la selección de sustratos específicos, localización subcelular (Booher *et al.*, 1989) y regulación de la estabilidad del complejo (Wang *et al.*, 2004). Indirectamente, la actividad de cinasa en el complejo ciclina-CDK es también inhibida por la degradación controlada de su respectiva subunidad de ciclina (Murray, 2004; Figura 2).



**Figura 2.** Regulación de la actividad de CDK. ⊥ representa eventos inhibitorios, → representa eventos activadores.

Dentro de los eventos inhibitorios se encuentra la fosforilación de los residuos Thr-14 y Tyr-15 por la cinasa Wee así como la unión de proteínas inhibidoras denominadas ICK/KRPs. Los eventos activadores están representados por la desfosforilación de los residuos Thr-14 y Tyr-15 por parte de la fosfatasa CDC25 y la fosforilación del residuo Thr-160 por parte de la cinasa CAK. Tanto las Ciclinas como algunas KRPs son reguladas por síntesis o por proteólisis mediada por ubiquitina.

La actividad de las CDKs es regulada de una manera compleja, pues son fosforiladas/desfosforiladas por cinasas/fosfatasas específicas. Una de estas modificaciones la realiza la cinasa activadora de CDK (CAK). Este complejo proteico está compuesto de la ciclina H, la cinasa CDK7 y la proteína de ensamblaje Mat1, el cual activa al complejo ciclina/CDK por fosforilación en el residuo Thr-161 (Ciemerych y Sicinski, 2005). La fosforilación de los residuos Thr-14 y Tyr-15 por la cinasa Wee1 interfiere con la correcta unión de ATP y, por lo tanto, inhibe la actividad de las CDKs. En el caso de plantas, sólo se ha descrito la fosforilación de dichos residuos sobre CDKA (Dissmeyer *et al.*, 2009). Estas fosforilaciones inhibitorias son eliminadas por la acción de la fosfatasa Cdc25 (Larkins *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, mientras que Cdc25B y Cdc25C controlan la transición G2/M (Ciemerych y Sicinski, 2005). En el caso de plantas, no se ha identificado una secuencia homóloga, no obstante, en arabisopsis se ha identificado una CDC25-related, la cual tiene actividad de arsenato reductasa y fosfatasa (Landrieu *et al.*, 2004; Bleeker *et al.*, 2006).

Otro punto de regulación de las CDKs lo llevan a cabo proteínas que se unen al complejo ciclina/CDK para regular negativamente su actividad en la fase G1. Este grupo de proteínas se

conoce como inhibidores de cinasa dependientes de ciclina (ICK) y se describiran más adelante (De Veylder *et al.*, 2001)

### **3.3 Inhibidores de CDKs en mamíferos**

En adición a los mecanismos ya señalados, la actividad de las CDKs es regulada por pequeñas proteínas, generalmente conocidas como CKIs, las cuales inducen el arresto del ciclo celular (detención del ciclo celular) o retrasan la progresión del ciclo celular en respuesta a señales intracelulares o extracelulares (Verkest *et al.*, 2005).

En mamíferos, las CKIs están bien caracterizadas e inducen el arresto del ciclo celular en respuesta a señales antiproliferativas como inhibición por contacto, carencia de suero y diferenciación celular (Leibovith *et al.*, 2003). De acuerdo con su estructura y especificidad de acción, las CKIs se dividen en dos familias: INK4 (inhibitors of CDK4) y Cip/kip (kinase inhibitory protein) (Sherr y Robert, 1999; Rank *et al.*, 2000). La primera clase incluye a las proteínas p15, p16, p18 y p19, son exclusivas de la fase G1 y tienen la habilidad de formar complejos con, e inhibir a CDK4 y CDK6 (Pavletich, 1999; Thullberg, 2000). Los inhibidores INK4 son proteínas de bajo peso molecular en cuya secuencia se encuentran muchas repeticiones de ankirina y sólo se unen a la subunidad con actividad de cinasa, pero no a las ciclinas (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) y forman complejos ternarios con ciclina B/CDC2, ciclina A/CDK2, ciclina E/CDK2, ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6. La región N-terminal de estos inhibidores contiene un dominio de aproximadamente 65 residuos, el cual consiste de dos subdominios separables para unirse a la ciclina y a la CDK (Chen *et al.*, 1995).

Los inhibidores Cip/Kip también funcionan como ensambladores y estabilizadores de los complejos ciclina D-CDK4/6 en el citoplasma y los tres miembros de la familia dirigen la acumulación de los complejos ciclina/CDK al núcleo de la célula, debido a que tanto las ciclinas tipo D como la CDK4 carecen de señales de localización nuclear (NLS; Mangeng, 1999). Por lo tanto, estos inhibidores regulan la proliferación celular a través de sus interacciones físicas con las CDKs en el núcleo (Coqueret, 2003; Leibovith *et al.*, 2003; Lacy *et al.*, 2004) y se requieren en bajas concentraciones para la formación del complejo ciclina/CDK y a altas concentraciones para inhibir la actividad de la CDK (Zhou *et al.*, 2003).

Varios estudios han establecido que las proteínas Cip/Kip podrían desempeñar funciones adicionales como factores potenciales de ensamblaje, reguladores de apoptosis o migración celular, y como factores transcripcionales (Coqueret, 2003). La expresión de estas dos grandes familias de inhibidores depende del estado metabólico o de desarrollo de las células, o aún de la integridad del genoma, implicando que diferentes efectores controlan su presencia y acumulación (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

La expresión de los genes individuales de los inhibidores de CDKs está diferencialmente regulada por diferentes señales antiproliferativas. La proteína p53 activa potencialmente la expresión de p21, pRB reprime la transcripción de p16, y el tratamiento por TGF- $\beta$  estimula la transcripción de p15. Los niveles de proteína de p21 y p27 oscilan durante el ciclo celular y se acumulan durante G1 (Pei y Xiong, 2005).

### **3.4 Inhibidores de CDKs en otros organismos**

Las proteínas CKIs han sido identificadas en muchos organismos diferentes y, aunque la mayoría de ellas muestra actividad de CKI, controlan un amplio espectro de procesos fisiológicos especie-específicos (Coelho *et al.*, 2005). En levaduras de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*) se han identificado tres CKIs; FAR1 inhibe a las CDKs de G1; Sic1 juega un papel importante en la sincronización del comienzo de la fase S al inhibir a los complejos ciclina/CDK de la fase G1/S y Pho81 inactiva a los complejos ciclina/CDK que controlan la expresión de genes en condiciones deficientes de fosfato. En levaduras de fisión (*Schizosaccharomyces pombe*), una CKI llamada Rum1 inhibe a los complejos de CDK mitóticos y tiene una función central en la regulación de la fase G1 (Coelho *et al.*, 2005; Verkest *et al.*, 2005)

### **3.5 Inhibidores de CDKs en plantas**

#### **3.5.1 Familia ICK/KRP**

##### **3.5.1.1 Características Generales y propiedades bioquímicas**

En plantas, dos familias de inhibidores de CDKs se conocen hasta ahora. La primera familia posee conservado 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 p27<sup>Kip1</sup> (Wang *et al.*,

1997). Esta familia de proteínas identificadas en *Arabidopsis* es referida como ICKs (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). La nomenclatura actual se refiere como "familia ICK/KRP" (Wang *et al.*, 2006, 2007). Además 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).

Algunos miembros de la familia ICK/KRP han sido aislados mediante la técnica de doble híbrido en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 1997; Lui *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002), tabaco (Jasinski *et al.*, 2002a, 2003) y alfalfa (Pettko-Szandtner *et al.*, 2006), o se han identificado mediante estudios *in silico* del genoma de *Arabidopsis* (De Veylder *et al.*, 2001), maíz (Coelho *et al.*, 2005), arroz (Barroco *et al.*, 2006) y tomate (Bibis *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente un análisis filogenético reveló la presencia de secuencias relacionadas con la familia ICK/KRP en más de 60 especies de plantas vasculares, que parece estar ausentes en briofitas y algas (Torres Acosta *et al.*, 2011). *In vitro* se ha demostrado la inhibición de la actividad de CDK empleando proteínas recombinantes de ICK/KRP para inhibir los complejos de CDK obtenidos mediante ensayos de *pull down* con p13Suc1 conjugado para proteínas ICK/KRP de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 1997, 1998; Lui *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2006; Verkest *et al.*, 2005), así como proteínas ICK/KRP de tabaco (Jasinski *et al.*, 2002b), maíz (Coelho *et al.*, 2005; De Jesús-Juárez *et al.*, 2008), alfalfa (Pettko-Szandtner *et al.*, 2006) y tomate (Bisbis *et al.*, 2006).

### **3.5.1.2 Interacción con otras proteínas del ciclo celular**

Para comprender la especificidad funcional de estas proteínas ICK/KRP y su rol en las vías de señalización para regular el ciclo celular es útil el conocer sus interacciones con otras proteínas, particularmente del ciclo celular. Estudios de mapeo de dominios han demostrado 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 (Wang *et al.*, 1998; Lui *et al.* 2000; Jasinski *et al.*, 2002b). Sin embargo, en un reporte reciente de Nafati *et al.*, 2010, se demostró un motivo adicional en la región central de la proteína SlKRP1 de jitomate, que le permite interactuar con CYCD3 incluso con la carencia de la región conservada carboxilo terminal. Los siete inhibidores de CDK de *Arabidopsis* y uno de tabaco interactúan con ciclinas tipo D (De Veylder *et al.*, 2001; Jasinki *et al.*, 2002a; Zhou *et al.*, 2002). No obstante algunos reportes han mostrado que algunas ICK/KRPs también pueden interactuar con otros complejos CDK/ciclina



diferentes a los complejos CDKA/CYCD, incluyendo CDKB/CYCD2, complejos con CDKB2;1 y CYCA (Nakai *et al.*, 2006; Pettko-Szandtner *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2005). Sin embargo, no fue posible identificar interacciones de las ICKs/KRPs de Arabidopsis con CDKB;1 mediante ensayos de doble híbrido (De Veylder *et al.*, 2001; Jasinski *et al.*, 2002a; Zhou *et al.* 2002).

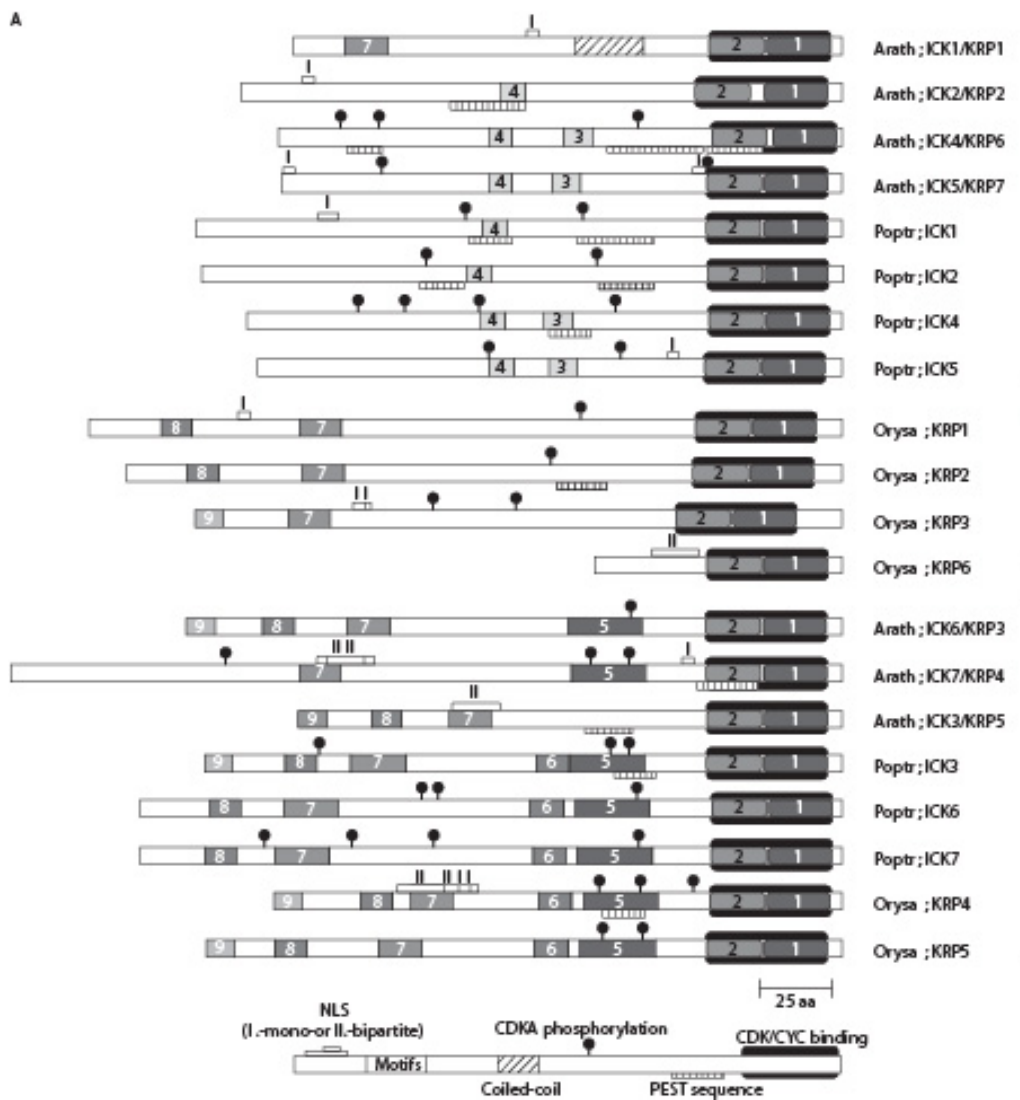
Hay varias posibles razones por las que las plantas podrían tener múltiples inhibidores de CDK. Estas podrían regular distintas clases de complejos ciclina/CDK, o bien podrían regular la actividad de las CDKs en respuesta a diferentes señales ambientales y de desarrollo o podrían tener una acción tejido-específica (Lui *et al.*, 2000).

### **3.5.1.3 Análisis filogenético y organización estructural de motivos conservados en proteínas de ICK/KRP**

Basándose en el alineamiento de secuencias de proteínas putativas y la construcción de un árbol filogenético mediante el método de *neighbour-joining* se pueden distinguir tres principales clases. La clase A contiene proteínas únicamente de plantas dicotiledóneas, mientras que la clase B sólo de plantas monocotiledóneas. En el caso de la clase C contiene tanto a plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas (Torres Acosta *et al.*, 2011; Anexo 6).

Empleando como base las secuencias proteicas de ICK/KRPs de Arabidopsis, álamo y arroz se han identificado motivos conservados que pueden ser de ayuda para su estudio funcional. En base a ese análisis, fueron identificados 9 motivos consenso en las secuencias de ICK/KRP provenientes de las tres plantas modelo mencionadas anteriormente (Figura 3). La distribución de los motivos corresponde a la clasificación filogenética; los motivos 1 y 2 están presentes en todas las proteínas ICK/KRP; los motivos 3-4 y 5-6 están solo presentes, respectivamente, en miembros de las clases A- y B, mientras que los motivos 7, 8 y 9 están presentes tanto en los miembros de la clase B como de la clase C. La función de muy pocos de estos motivos es conocida (Torres Acosta *et al.*, 2011). El motivo 1 en ICK1 es requerido para interactuar con CDKA (Wang *et al.*, 1998) y para inhibición de la actividad de CDK en plantas (Zhou *et al.*, 2003b). La importancia funcional de este motivo en la interacción e inhibición de CDK podría explicar por qué este motivo es el más conservado entre todas las proteínas ICK/KRP. El motivo 2 es una región que parece ser importante para la interacción con CYCD3 (Wang *et al.*, 1998). La reciente descripción de la familia SIM/EL2 de CKIs que se describirá más adelante, también contiene una versión corta de este motivo y su función para interactuar con ciclinas tipo D ha sido establecida (Peres *et al.*, 2007). El motivo 7 de

ICK/KRP de *Arabidopsis* confiere localización nuclear a proteínas fusionadas con la proteína verde fluorescente (GFP ; Zhou *et al.*, 2006; Bird *et al.*, 2007). Este motivo también especifica un patrón de localización subnuclear puntual (Jakoby *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006). Recientemente, Nafati *et al.* (2010) demostraron que otro motivo de la proteína SIKRP1 de tomate (correspondiente al motivo 8 reportado por Torres Acosta *et al.*, 2011) funciona redundantemente con el motivo 7 para conferir una localización nuclear puntual. Por último, el motivo 5 contiene al menos un sitio de fosforilación putativa por CDK, sin embargo la fosforilación en cualquiera de estos sitios aun no ha sido demostrada. El significado funcional que tienen los motivos 3-6 y 9 se desconoce (Torres Acosta *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Motivos putativamente conservados y putativamente funcionales en proteínas ICK/KRP de plantas. Los motivos putativamente funcionales están representados por símbolos y los motivos putativamente conservados están indicados en rectángulos. (Torres Acosta *et al.*, 2011).

#### **3.5.1.4 Regulación a nivel transcripcional de la familia ICK/KRP**

Las ICKs de levadura y las de mamíferos están fuertemente reguladas a niveles transcripcional, traduccional y postraduccional por mecanismos que afectan tanto su abundancia como su actividad intrínseca. Muchos de los tejidos de plantas coexpresan varios miembros ICK/KRP, aunque con diversas intensidades en sus niveles de mRNA, sugiriendo diferentes mecanismos regulatorios para su transcripción y, probablemente, teniendo diferentes funciones dentro de un solo tejido (Wang *et al.*, 1998; De Veylder *et al.*, 2001, Jasinski *et al.*, 2002b; Ormenese *et al.*, 2004). La información de su expresión preferencial en tejidos específicos puede ser útil para enfocar nuestra atención en tejidos donde una o más ICK/KRPs son predominantemente expresadas (Torres- Acosta *et al.*, 2011).

El rol de las ICK/KRPs durante el ciclo celular sugiere que presentan una regulación temporal dependiendo de la fase del ciclo celular observada (Menges *et al.*, 2005). Cabe destacar que la expresión de los genes ICK/KRP también son regulados por fitohormonas, bajas temperaturas (Wang *et al.*, 1998) y por estrés salino (Ruggiero *et al.*, 2004).

Adicionalmente, los niveles de transcrito de NtKIS1a y de AtKRP1 se acumulan en brotes florales y hojas envejecidas, respectivamente (Wang *et al.*, 1998; Jasinski *et al.*, 2002b). Este incremento temporal de transcritos durante el arresto del curso del ciclo celular y la diferenciación celular sugiere posibles funciones para estos ICK/KRPs en el desarrollo.

Los niveles de expresión para los genes de la familia ICK/KRP no son sólo controlados de manera espacial y temporal, también a través de la generación de variantes por splicing alternativo, como se ha reportado con el locus de NtKIS1 que genera dos variantes de splicing, NtKIS1a o NtKIS1b en *Nicotiana tomentosiformis* (Jasinski *et al.*, 2002b). La variante de splicing NtKIS1b carece de la mayor parte del dominio C-terminal encontrado en NtKIS1a y otras CKIs de plantas. Consecuentemente, NtKIS1b no interacciona con CDKs tipo A y ciclinas tipo D y es incapaz de inhibir la actividad de CDK *in vitro* e *in vivo*.

#### **3.5.1.5 Estabilidad de las proteínas ICK/KRPs y su regulación a nivel postraduccional**

Actualmente, poco se conoce sobre la regulación de las ICKs de plantas a nivel proteico. No obstante, como evidencia se tiene que algunas ICK/KRPs de plantas son reguladas a través de proteólisis. Análisis funcionales de los dominios de Arath;KRP1 indican la presencia de un motivo

regulador para la inestabilidad de la proteína en la región amino-terminal (Zhou *et al.*, 2003a, Weinl *et al.*, 2005). Adicionalmente, tanto Zeama;KRP2 y Arath;KRP2 son reguladas a nivel postraduccional durante el desarrollo de endospermo de maíz (*Zea mays*) y el desarrollo de hoja en Arabidopsis respectivamente, demostrado por la alteración de los niveles de proteína, mientras que los niveles de transcrito permanecen constantes (Coelho *et al.*, 2005; Verkest *et al.*, 2005). En el caso de Arath;KRP2, la estabilidad de la proteína está regulada por el proteosoma. Estudios *in vitro* han demostrado que Arath;KRP2 es un sustrato del complejo CDK/ciclina y esa fosforilación es en parte responsable de la proteólisis de Arath;KRP2 (Verkest *et al.*, 2005). A pesar de que tanto los complejos de Arath;CDKA1 y Arath;CDKB1;1 fosforilan a Arath;KRP2, actualmente no se conoce en qué fase del ciclo celular ocurren estos eventos y cual ubiquitin-ligasa es la responsable de la degradación de Arath;KRP2 (si alguna lo es).

Otro mecanismo de regulación postraduccional ha sido identificado a través de un análisis comparativo entre las variantes de splicing de NtKIS1a y NtKIS1b de tabaco (Jasinski *et al.*, 2002b). Aunque la forma de splicing NtKIS1b no interacciona con NtCDKA;1 y ciclinas tipo D, NtKIS1b contrarresta la capacidad de NtKIS1a para inhibir la actividad de CDK *in vitro*. Las dos variantes de splicing poseen diferentes patrones de expresión transcripcional, donde NtKIS1a se presenta constitutivamente durante el ciclo celular, mientras que los niveles de transcrito de NtKIS1b presenta un pico en la transición G2/M. Esta información, en cooperación con la localización subcelular, sugiere que NtKIS1b antagoniza la inhibición de NtKIS1a en la actividad de CDK en la transición G2/M. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre.

### **3.5.1.6 Localización celular**

La localización en un compartimento particular o en una región celular es importante para el funcionamiento de reguladores del ciclo celular (Pines 1999). Experimentalmente, resultados obtenidos a partir de la fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) demostraron que las siete ICK/KRPs de Arabidopsis se localizaban exclusivamente en el núcleo (Bird *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Resultados similares fueron obtenidos con dos proteínas ICK/KRP tanto de tabaco y jitomate, así como dos de arroz (Jasinski *et al.*, 2002a ; Nafati *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). En el caso de Arabidopsis, aunque todas las ICK/KRPs tienen localización nuclear (sólo algunas de ellas poseen señal de localización nuclear putativa), pueden ser agrupadas dentro de dos categorías basadas en su distribución sub-nuclear: KRP2, KRP6 y KRP7 presentan un patrón homogéneo en el nucleoplasma, mientras KRP1, KRP3, KRP4 y KRP5 tienen un patrón puntual de distribución (Bird

*et al.*, 2007). Este patrón moteado ha sido asociado con cromocentros (Jakoby *et al.*, 2006) sugiriendo que algunas KRPs tengan algún papel en la función de la heterocromatina.

Adicionalmente, algunas ICK/KRPs son capaces de transportar a proteínas como CDKA o CYCD dentro del núcleo mediante su asociación previa en el citoplasma (Zhou *et al.*, 2006; Nafati *et al.*, 2010; Sanz *et al.*, 2011).

Por otra parte, otro estudio indica que la proteína *Arath;ICK1* no es autónoma de la célula ya que puede moverse de tricomas a células vecinas (Weinl *et al.* 2005). Esta observación sugiere que probablemente la expresión de *Arath;ICK1* puede afectar a células adyacentes en plantas, dependiendo del nivel de expresión de la célula que lo está generando. Este movimiento podría permitir que las células vecinas tengan una mayor interdependencia en la regulación de la proliferación celular (Wang *et al.*, 2006).

### **3.5.1.7 ICK/KRPs en el crecimiento y desarrollo de la planta**

Diferentes estudios han demostrado que la sobreexpresión de genes ICK/KRP en plantas presentan algunos fenotipos comunes, incluyendo la reducción en el tamaño de la planta (hojas, tallo, raíces y órganos florales), hojas aserradas, reducción en el número celular y alargamiento de las mismas (Wang *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Jasinski *et al.*, 2002a, 2003; Barroco *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007; Bemis and Torii, 2007). La sobreexpresión de genes ICK/KRPs también tiene efectos específicos en la morfología de la planta y en la diferenciación celular. Además de las hojas aserradas, consistentemente observadas en varios estudios (Wang *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Jasinski *et al.*, 2002b), también se ha observado una reducción en la fertilidad en líneas de *Arabidopsis* que expresan ICK1 bajo el control de un promotor específico de polen (Zhou *et al.*, 2002), o en líneas que sobreexpresan *Oryza;KRP1* en arroz (Barroco *et al.*, 2006). La expresión dirigida de ICK1 en tricomas de *Arabidopsis* bajo el control del promotor GL2 (promotor específico de tricomas) causa reducción tanto del tamaño como en el número de ramificaciones del tricoma (Schnittger *et al.*, 2003). Interesantemente, estos tricomas senescen y mueren tempranamente comparado con las plantas silvestres. Adicionalmente, los efectos fenotípicos de líneas sobreexpresantes de ICK/KRP pueden ser atenuadas mediante la co-expresión de ciclinas tipo D que se sabe interactúan con ICK/KRPs (Schnittger *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003a), por lo que se ha propuesto que dichas ciclinas secuestran a los inhibidores, impidiendo su acción (Jasinski *et al.*, 2002a)

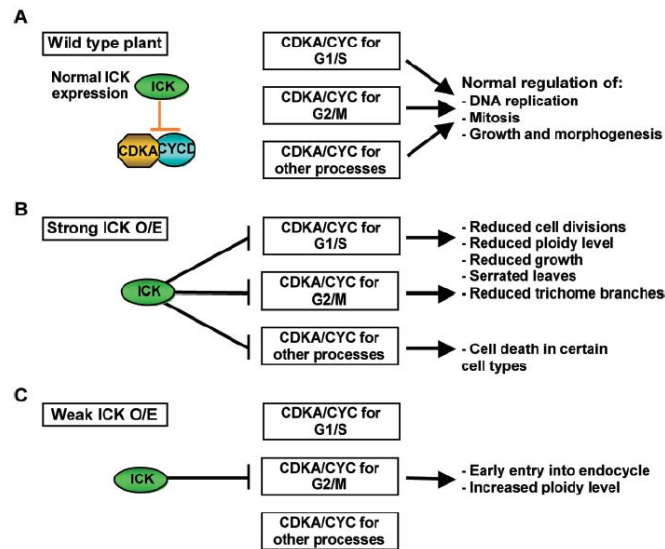
Poco se conoce sobre las funciones específicas de los diferentes genes ICK/KRP *in planta* ya que mutantes en un solo miembro de esta familia no muestran fenotipos evidentes sugiriendo la presencia de redundancia entre los diversos miembros. No obstante, recientemente se han generado mutantes múltiples en la familia ICK/KRP presentando diversos cambios morfológicos como alargamiento de cotiledones, hojas, pétalos y semillas en comparación a las plantas wild-type de *Arabidopsis*. A nivel celular, las mutantes múltiples de ICK/KRPs presentan mayor número de células pero de menor tamaño en todos los órganos examinados (Cheng *et al.*, 2013). Si bien el fenotipo presente en múltiples mutantes de ICK/KRPs en *Arabidopsis* no es del todo evidente, estas líneas exhiben fenotipos pleiotrópicos durante la germinación y desarrollo tardío, lo que sugiere que los efectos combinatorios en la expresión de ICK/KRPs interfieren con la morfogénesis de la planta. Cabe resaltar que una fracción significativa de plantas silenciadas en KRPs, después de incubar en medio regular de crecimiento, espontáneamente empiezan a formar tejido tipo callo, mientras que ninguna de las plantas silvestre presentan dicho fenotipo. De acuerdo a la función preestablecida de las ICK/KRPs como reguladores negativos de la proliferación celular, la regulación negativa en la expresión de estos genes parece promover desdiferenciación y crecimiento hiperplásico (Moulinier *et al.*, 2010).

#### **3.5.1.8 ICK/KRPs y endorreduplicación**

La endorreduplicación ocurre en la mayoría de las plantas angiospermas y está asociada a diversos procesos biológicos tales como diferenciación celular, expansión celular y aumento en la actividad metabólica (Traas *et al.*, 1998). Se ha especulado que una función de la endorreduplicación podría ser la modulación de la actividad transcripcional al incrementar la disponibilidad de templados de DNA (aumento en el número de copia de genes) para la expresión génica y por consiguiente una modulación en la traducción y actividades metabólicas (Bourdon M *et al.*, 2010). El contenido de DNA también se ha sugerido como un factor para controlar el tamaño celular (Kondorosi *et al.*, 2000). Durante la endorreduplicación, el genoma nuclear es replicado, sin embargo las células no entran a mitosis.

A nivel celular, la microinyección de la proteína ICK1 recombinante dentro de células del estambre de *Tradescantia virginiana* retrasan la mitosis por el incremento en el tiempo de transición de metafase a anafase (Cleary *et al.*, 2002). Mientras que plantas transgénicas con un fenotipo fuerte poseen reducido nivel de ploidía debido a la inhibición de la endorreduplicación (De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Jasinski *et al.*, 2002, 2003a; Barroco *et al.*, 2006), en plantas transgénicas

con una sobreexpresión débil de ICK1 o ICK2, las células son inducidas a entrar tempranamente a endorreduplicación, resultando en altos niveles de ploidía (Verkest *et al.*, 2005; Weinl *et al.*, 2005). Estas observaciones sugieren que una fuerte sobreexpresión de ICK1 o ICK2 inhibe la progresión del ciclo celular tanto en la transición G1/S como en la G2/M, resultando en un nivel reducido de ploidía y número celular, por otro lado, la sobreexpresión débil de ICK1 o ICK2 preferencialmente inhibe mitosis y promueve la entrada a la endorreduplicación (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de los efectos observados en la expresión de ICK/KRP en la división celular, endorreduplicación, muerte celular y morfología de la planta. (A) En plantas normales, la expresión de ICK/KRP contribuye en la regulación de CYCD, CDKA y otros complejos, que parecen jugar papeles tanto en la transición G1-S como G2-M. (B) En células que sobreexpresan fuertemente ICK1 e ICK2 (ICK O/E), las transiciones G1-S y G2-M son afectadas. Se ha observado un número de fenotipos asociado con reducción en la división celular y endorreduplicación reducida. Además, en ciertos tipos celulares se ha observado muerte celular. (C) En células que sobreexpresan débilmente ICK1 e ICK2, los complejos CDK-ciclina del ciclo mitótico son preferentemente afectados. Las divisiones celulares mitóticas están inhibidas, mientras que se da la endorreduplicación, permitiendo una entrada temprana al endociclo (Imagen tomada de Wang *et al.*, 2006).

### 3.5.1.9 Conexión entre endorreduplicación y elongación celular

Interesantemente, varias ICK/KRPs poseen una distribución puntual en el núcleo, sugiriendo que están asociadas con heterocromatina. En un estudio reciente, *Arath:KRP5*, uno de los miembros de la familia ICK/KRP unidos a cromatina, es expresado en células en endorreduplicación y la pérdida de su función reduce la endorreduplicación, indicando que *Arath:KRP5* es un regulador positivo para este proceso; esta regulación depende de varios mecanismos: además de su función en la inhibición de cinasa de los complejos ciclina/ CDK, previamente descrita. Datos de *Chip-seq* junto

con la cuantificación de transcritos provee evidencia que KRP5 regula la transcripción de genes involucrados en la organización de la pared celular. Adicionalmente, la sobreexpresión de KRP5 incrementa la descondensación de cromocentros. Por lo tanto, KRP5 podría unirse a la cromatina para coordinar el control de la endoreduplicación, estructura de la cromatina y permitir la expresión de genes requeridos para la elongación (Jégu *et al.*, 2013).

### **3.5.2 Familia SIM/EL2**

Recientemente, una segunda familia de CKIs fue descrita y está representada por SIAMESE (SIM) de *Arabidopsis* (Churchman *et al.*, 2006) y EL2 de arroz (Peres *et al.*, 2007). Ambos genes son referidos como la familia SIM/EL2, dado que fueron los dos miembros reportados inicialmente. SIM/EL2s son proteínas pequeñas (alrededor de 14 KDa) y en su región carboxilo terminal comparte la secuencia EIEDFF que está conservada con las proteínas de la familia ICK/KRP (Churchman *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2007).



## **4. Justificación**

En maíz, se han descrito algunos miembros de la vía de regulación de la transición G1-S del ciclo celular, incluyendo proteínas ciclinas A y D, CDKA y B, la fosforilación de RBR y dos inhibidores (ICK/KRPs). Sin embargo, se conoce poco sobre la presencia y función de la familia completa de ICK/KRPs en esta especie. Por otra parte, se ha generalizado que la actividad inhibitoria de estas proteínas es semejante entre complejos formados por ciclinas del mismo tipo, sin embargo, experimentalmente no ha sido comprobado. Por lo tanto, el presente proyecto plantea la caracterización de esta familia de inhibidores a distintos niveles.

## **5. Hipótesis**

Los genes de la familia ICK/KRP de maíz se expresarán diferencialmente a nivel de mRNA en un tiempo y/o lugar específico y sus productos proteicos inhibirán diferencialmente la actividad de cinasa de complejos ciclina D/CDK.

## **6. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General.**

- Caracterizar la familia génica de ICKs/KRPs de maíz.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Identificar los genes que codifican ICKs/KRPs en el genoma de maíz.
- Comparar sus secuencias proteicas con las de sus respectivos homólogos en secuencia de otras plantas.
- Conocer sus perfiles de expresión génica durante la germinación y en diferentes tejidos.
- Determinar el grado de inhibición en la actividad de cinasa de los complejos ciclina/CDK.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Análisis *in silico*

#### 7.1.1 Recopilación de datos

Las secuencias de los 7 genes de ICK/KRPs de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) y de los 6 genes de ICK/KRP de arroz (*Oryza sativa*) fueron obtenidas de The Arabidopsis Information Resource (TAIR) [<http://www.arabidopsis.org>] y The Institute for Genomic Research (TIGR) Rice Genome Annotation [<http://rice.tigr.org>] respectivamente. Las secuencias de los 2 genes de ICK/KRPs de maíz (*Zea mays*) reportados previamente fueron obtenidos del GenBank en la página web de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ; Anexo 1).

#### 7.1.2 Obtención de las secuencias de ICK/KRPs de maíz

Para conocer la totalidad de genes que codifican ICK/KRPs en el genoma de maíz, se realizó una búsqueda mediante BLAST (BLASTp) en la base de datos del genoma de maíz (<http://www.maizesequence.org>) empleando las secuencias proteicas de cada una de las ICK/KRPs de Arabidopsis y arroz como secuencias *query*. Se eligieron aquellas secuencias con mayor porcentaje de identidad. Se consideraron sólo las variantes de *splice* (en caso de que las hubiera) correspondientes al transcrito más largo y se verificó que cada variante tuviera un codón de inicio y un codón de término de la traducción. No obstante, el primer criterio que se tomó en cuenta fue la presencia del dominio de interacción/inhibición de CDK/ciclina (referido como CID) dado que es uno de los requisitos necesarios para definir si es un miembro de la familia ICK/KRP. También, se obtuvieron la ubicación cromosomal y la organización genómica de cada gen (Anexo 2).

#### 7.1.3 Comparación con ICK/KRPs de otras especies. Análisis filogenético

Se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas de todas las ICK/KRPs de maíz, arroz y Arabidopsis utilizando Clustal W Multiple Alignment (Thompson *et al.*, 1994) en BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.8 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>); estos alineamientos múltiples de secuencias, en formato FASTA, fueron importados en MEGA5.0 (<http://en.bio-soft.net/tree/MEGA.html>) y analizados con el método *Neighbor – Joining* utilizando las condiciones predeterminadas, es decir, el modelo de sustitución de corrección de Poisson, Pairwise

deletion y 500 réplicas de análisis Bootstrap para la generación de árboles filogenéticos. Posteriormente se empleo el programa FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) para modificar la apariencia del árbol filogenético.

La matriz de identidad de secuencias fue obtenida utilizando BioEdit y luego transformada a porcentajes (Anexo 3).

#### *7.1.4 Identificación de dominios*

Para identificar dominios específicos de ICK/KRP las secuencias fueron analizadas en el sitio web PFAM 26.0 (<http://pfam.janelia.org/search>). La identificación de todos los motivos fue determinada mediante el análisis de la secuencia y comparándola con las secuencias consenso que fueron reportadas por Torres Acosta *et al.*, (2011). La presencia de regiones PEST fue detectada usando EMBOSS: epestfind (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>); los sitios de fosforilación putativos por CDKs fueron encontrados utilizando el programa GPS 2.0 (Group-based Prediction System ; Xue *et al.*, 2008). Las señales de localización nuclear (NLS) fueron obtenidas mediante el programa cNLS Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) ; Kosugi *et al.*, 2009 ; Anexos 4 y 5).

## **7.2 Análisis de expresión de genes**

### *7.2.1 Búsqueda in silico de genes expresados*

Para corroborar si algunos de los genes candidatos eran funcionales o posibles pseudogenes, se recurrió a la base de datos Expressed Sequence Tags (ESTs) de maíz en el sitio web del NCBI, para encontrar información mediante BLAST de posibles reportes con clonas que incluyeran alguna de las secuencias putativas expresadas a nivel de mRNA. Por otro lado, también se revisó la base de datos Maize eFP Browser (Li *et al.*, 2010) para buscar patrones de expresión de los genes encontrados en hoja de plántula. Los valores obtenidos fueron valores absolutos en unidades arbitrarias y que fueron utilizados sin normalización.

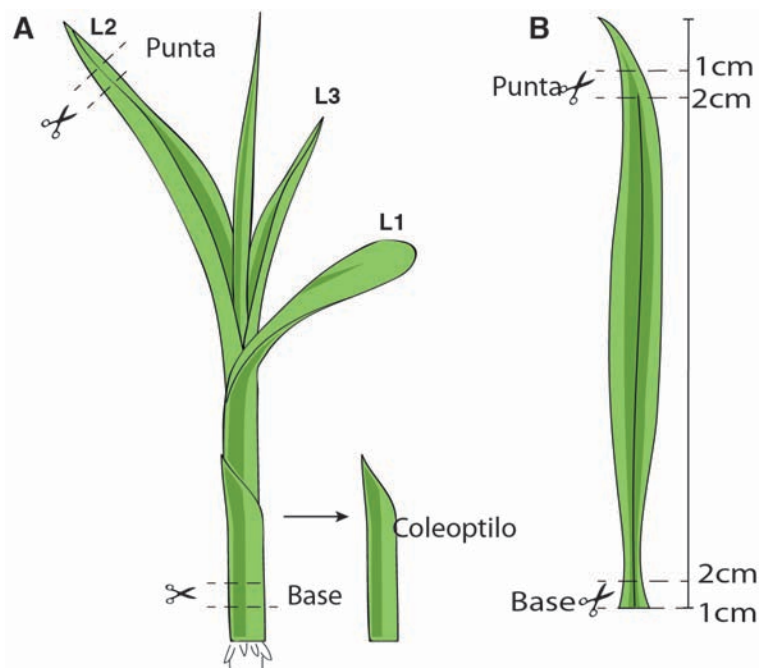
## *7.2.2 Búsqueda experimental de transcritos en tejido de plántula y germinación.*

### *7.2.2.1 Tejidos y secciones de planta empleados*

Para realizar las extracciones de RNA se eligieron distintos tejidos de plántula (dos secciones de hoja que se describen más adelante, raíz y coleoptilo), además de cinco tiempos de germinación (0H, 6H, 12H, 18H y 24H). Se emplearon lotes de 10 semillas de maíz V. Chalqueño (cosecha febrero 2013) que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio 3% durante 5 min en agitación manual constante y enjuagadas con agua desionizada hasta eliminar el exceso de hipoclorito. Una vez eliminado el olor del hipoclorito, se lavaron durante 5 min en una solución de Sin-Bac® (bromo cloro dimetil hidantoina) 5% en agua desionizada por un periodo de 5 min en agitación manual constante. Posteriormente, los lotes fueron colocados en toallas de papel, se enrollaron y se humedecieron con la misma solución. Se colocaron en un vaso de precipitado de 1 L y se le añadieron 250 ml de agua desionizada, manteniendo constante este volumen de agua durante el periodo de incubación.

En el caso de germinación, a las semillas se les extrajo el eje embrionario en el tiempo establecido para poder llevar a cabo la extracción de RNA total.

Por otra parte, 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 seleccionaron dos secciones de hoja empleando como base el diseño experimental de Li y col. (2010), sin embargo, se empleó la segunda hoja porque era la que presentaba las dimensiones reportadas (~14 cm de largo). Se escogieron dichas secciones ya que representan un tejido en proliferación y otro de diferenciación . Adicionalmente a las secciones de hoja, se tomaron los primeros 2mm tanto del ápice de la raíz primaria, raíces laterales así como seminales (raíces que surgen en las etapas tempranas de desarrollo, la cuales cumplen funciones de sostén y captación de nutrientes), las cuales se molieron juntas. Por último, el tejido del coleoptilo que envuelve al tallo también se recuperó para las extracciones pertinentes (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema representativo de plántula de 14 días de germinación. **A.** Se indican las regiones de las diferentes estructuras elegidas para realizar la extracción de RNA. El primer corte se realizó justo sobre las raíces de corona, un centímetro por encima de éstas se tomó el primer cm (Base) de la hoja dos (L2). **B.** Esquema de la hoja 2 desprendida del tallo, donde se señalan las medidas tomadas para la toma de muestra de cada sección. Además se tomó el tejido del coleoptilo (Col). L1, hoja 1; L2, hoja 2, L3, hoja 3.

#### 7.2.2.2 Extracción de RNA total y monitoreo de su integridad

El RNA total se extrajo de lotes de las secciones pertenecientes a 10 plántulas cada uno y en el caso de germinación se utilizaron 10 ejes embrionarios por tiempo, empleando el protocolo de extracción con TRIzol® Reagent (Invitrogen). Se partió de aproximadamente 100 mg del tejido correspondiente, el cual se congeló en nitrógeno líquido una vez obtenido, posteriormente, se homogenizó y se le añadió 1 ml de TRIzol. En este paso se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta proseguir con la extracción. Los pasos a seguir para la correspondiente extracción del RNA total fue considerando las indicaciones del proveedor (Invitrogen) con la única diferencia de que se realizó una doble extracción con cloroformo. Todas las muestras se cuantificaron y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Para monitorear la integridad del RNA purificado se realizó una electroforesis desnaturizante en gel de agarosa 1%, formaldehído 8% v/v, MAE 1X (40 mM MOPS, 10 mM Acetato de Na, 1 mM EDTA pH 8.3), teñido con bromuro de etidio. Se cargaron  $2\ \mu\text{l}$  de RNA (previamente cuantificados) con  $2\ \mu\text{l}$  de formamida y se separó durante 20 min a  $\sim 80\ \text{V}$  en buffer MAE 1X. El gel fue observado bajo luz UV empleando un transiluminador.

#### 7.2.2.3 Purificación con DNAsa

Previamente a la preparación del cDNA se realizó la calibración del RNA cargando 400 ng cuantificados y se hizo densitometría del gel considerando ambas bandas de las subunidades

ribosomales. El volumen a cargar se ajustó hasta presentar una variación menor al 10% entre los valores de densitometría extremos y se recalculó la concentración.

Con el objetivo de evitar o disminuir contaminación con DNA genómico, el RNA fue tratado con DNasa RQ1 (Promega). Cada reacción se preparó con 1 u de Dnasa por  $\mu\text{g}$  de RNA (12-25  $\mu\text{g}$  por reacción), 2  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción 10X, se llevó a un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  con agua DEPC y se incubó a 37° C por 30 min. Una vez terminada la incubación, se adicionó 2  $\mu\text{l}$  de *RQ1 Dnase Stop Solution* y luego se calentó por 10 minutos a 60° C para inactivar la enzima.

#### *7.2.2.4 Preparación de cDNA*

Una vez calibrado, se sintetizó el cDNA utilizando 1  $\mu\text{g}$  de RNA en una reacción de 30  $\mu\text{l}$  con el kit Improm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante, utilizando como cebador oligo (dT)<sub>15</sub>. Una vez terminada la reacción, se llevó a un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , quedando a una concentración de ~20 ng/ $\mu\text{l}$ .

#### *7.2.2.5 Amplificación por PCR*

Para permitir diferenciar los transcritos de los 8 posibles genes de la familia ICK/KRP identificados en el genoma de maíz, se diseñaron cebadores específicos (Anexo 7). La reacción de PCR se realizó con la enzima JumpStart<sup>TM</sup> Taq ReadyMix<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich). Para conocer las condiciones experimentales de amplificación de los cebadores se realizó un gradiente de temperatura empleando tres temperaturas distintas, correspondientes a  $T_m - 2^\circ\text{C}$ ,  $T_m$  y  $T_m + 2^\circ\text{C}$  (la  $T_m$  para la amplificación de cada transcrito fue calculada en el programa AmplifX 1.5.4) con 35 ciclos de amplificación. Como molde se empleó 1  $\mu\text{l}$  (20 ng) del cDNA correspondiente sintetizado previamente.

### ***7.3 Obtención de proteínas recombinantes para ensayos de inhibición de la actividad de cinasa.***

#### *7.3.1 Amplificación del cDNA de Zeama;ICK2/KRP1;1 y de Zeama;ICK1/KRP4;2*

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando los siguientes cebadores:

Gen	Cebador Forward 5'-3'	Cebador Reverse 5'-3'	Amplicon pb
<b>ICK2/KRP1;1</b>	TTTGGATCCTTGCGTCAGATGGG GAAGTA	AGCGGCCGCTTCAGATGCTGACCA	790
<b>ICK1/KRP4;2</b>	TAAGGATCCCTCCGGGCCATGGG CAAGTA	TAAGGATCCCTCCGGGCCATGGGC AAGTA	649

**Tabla 1.** Cebadores diseñados para amplificar los transcritos completos de los genes estudiados.

Como templado se utilizó 1µl de cDNA sintetizado a partir de RNA total de hoja (400 ng) con el kit (ImProm II Reverse Transcripción system) como se indica en el protocolo. A la reacción se adicionó 10µM de cada uno de los oligonucleótidos, dNTPs 10 mM, buffer de reacción 5X Q5 y 0.5 U de DNA polimerasa Q5 high-Fidelity (NEB). Las condiciones de amplificación fueron de acuerdo a la tabla 2.

Paso	Temperatura		Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C		30 s
32 ciclos	98°C		10 s
	KRP1;1 59.0 °C	KRP4;2 61.1°C	30 s
	72°C		30 s
Extensión final	72°C		2 min

**Tabla 2.** Condiciones para amplificación de los transcritos por PCR.

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.0%, se cortó la banda correspondiente al cDNA de cada ICK/KRP y se purificó con el Kit GenElute™ Gel Extraction como se indica en el protocolo.

### 7.3.2 Clonación en el vector de entrada

El cDNA purificado se ligó en el vector pGEM-T-EASY (Promega) con el procedimiento establecido por el fabricante. Posteriormente, se realizó la transformación en células competentes de *E. coli*, XL1-blue con el producto de la reacción de ligación bajo las siguientes condiciones: 45 min/4°C, 2 min/ 42°C y 5 min/4°C. Se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó 1 h / 37°C. Se concentraron las bacterias por centrifugación por 30 segundos a 12000 rpm y se eliminó el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 µl de medio LB para resuspender el botón bacteriano, éste se sembró en agar LB/Ampicilina (100µg/µL) suplementado con X-Gal e IPTG (0.5 mM).

Se seleccionaron cinco a diez colonias candidatas y se crecieron por 12 h/37°C en medio LB/Ampicilina. Se centrifugó todo el extracto celular perteneciente a cada colonia y se aisló el plásmido usando el Kit Zyppy™ Plasmid Miniprep como se indica en el protocolo. Para verificar la presencia de los insertos correspondientes se realizó la digestión de cada plásmido con la enzima de restricción EcoRI ya que permite liberar el inserto del vector pGem-T Easy. No obstante, los plásmidos positivos para la enzima de restricción EcoRI fueron confirmados por doble restricción con las enzimas NotI (NEB) y BamHI (Invitrogen) así como por PCR.

### 7.3.3 Clonación en el vector de expresión

Después de purificar el plásmido pGem-T Easy con el inserto de DNA codificante para la ICK1/KRP4;2, o el correspondiente a ICK2/KRP1;1, se hizo una reacción de digestión con las enzimas BamHI (NEB) y NotI (Invitrogen) a 37°C por 2 h para cada uno de los plásmidos. Los fragmentos escindidos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% y se purificaron a partir de las bandas del gel. Los fragmentos purificados (insertos) se ligaron en los vectores pPAL7, pGEX-4T2 y pPROEX HTb (Anexo 8) previamente digeridos con las mismas enzimas colocando en la reacción el inserto y el vector en una relación 3:1 e incubando toda la noche a 4°C con la enzima T4 DNA ligase (Promega). Los productos de ligación se emplearon para transformar células competentes XL1-blue. Al siguiente día se inoculó 3 mL de medio LB con una colonia de células transformantes y se incubó 12 h a 37°C para purificar plásmido. La verificación de la presencia de los insertos correspondientes se realizó con la doble restricción descrita anteriormente. Hecho esto se envió a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM para validar que el plásmido tuviera, en el correcto marco de lectura, la secuencia codificante para la proteína recombinante fusionada a la etiqueta correspondiente. Para la secuenciación, se emplearon los oligonucleótidos recomendados en el manual del vector (las construcciones en pPROEX HTb se secuenciaron con los oligos diseñados para su amplificación). El resultado de la secuenciación de DNA se tradujo en el marco de lectura adecuado con la herramienta *Translate de ExPASy Bioinformatics Resource Portal* (<http://expasy.org/tools/>) y la secuencia de aminoácidos se comparó con la teórica en un alineamiento múltiple Clustal W en BioEdit.

### 7.3.4 Expresión de las proteínas recombinantes

Los plásmidos pPAL7, pGEX-4T2 y pPROEX HTb con el inserto correspondiente se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21 codon plus (DE3)-RIL. La expresión de las proteínas recombinantes fue evaluada mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM a un cultivo bacteriano de *E. coli* BL21 con una densidad óptica entre 0.4 – 0.7 leída a 600 nm.



Una vez adicionado el IPTG se dejó incubando por 3 h a 37°C en agitación constante, se tomó una muestra de 1 ml a las 2 h y 3 h respectivamente. Cada una de las muestras se verificaron en un gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie con el objetivo de observar la expresión de la proteína recombinante.

### 7.3.5 Purificación de proteínas recombinantes

#### 7.3.5.1 Proteínas fusionadas a GST

La producción de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2 se llevó a cabo en un volumen total de 100 ml de medio LB, donde la inducción se realizó por 3 h a 37°C con una concentración de 1 mM de IPTG. Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante el empleo de la resina glutatión sefarosa (Sigma, St. Louis) como a continuación se describe: después de centrifugar el extracto bacteriano a 6000 rpm durante 15 minutos, el pellet obtenido se resuspendió con buffer de lisis (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0) al cual se adicionó en fresco 1 mM de DTT (ditiotreitól), 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 1X del cocktail de inhibidores de proteasas *Complete EDTA free*, y se incubó por 30 minutos en hielo con 1 mg/mL de lisozima. Posteriormente, se adicionó 1% de N-lauril sarcosinato de sodio (Sarcosyl), el lisado se sonicó tres veces por 30 s, después se adicionó 2% de Triton X-100 y 20 mM de CHAPS, y se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y se aplicó a la columna equilibrada de glutatión sefarosa. Dos lavados se llevaron a cabo con buffer de lisis que contenían 0.5% y 0.1% Triton X-100, respectivamente. Las proteínas recombinantes fueron eluidas con 50mM de Tris-Glutatión pH 8.0 (1 ml de Tris-Glutatión/ml de resina).

#### 7.3.5.2 Proteínas con etiqueta de Histidinas

La producción de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 y His-KRP4;2 se llevó a cabo en un volumen total de 100 ml de medio LB, donde la inducción se realizó por 3 h a 37°C con una concentración de 0.5 mM de IPTG. Las proteínas recombinantes fueron purificadas empleando la resina Ni-NTA agarosa (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de centrifugar el extracto bacteriano a 6000 rpm durante 15 minutos, el pellet obtenido se resuspendió en 5ml de buffer B (100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl y 8M de Urea, ajustado a un pH de 8.0 con NaOH) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación ligera. Posteriormente, el lisado se centrifugó 12000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se aplicó a la columna equilibrada de Ni-NTA y se mezcló por un periodo de 1 hora a temperatura ambiente en

agitación constante. A continuación, se realizaron dos lavados de 4 ml cada uno, con el Buffer C (100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl y 8M de Urea, ajustado a un pH de 6.3 con HCl ). Las proteínas recombinantes fueron eluidas con 2 ml de buffer E (100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl y 8M de Urea, ajustado a un pH de 4.5 con HCl).

#### 7.3.5.3 Renaturalización de proteínas recombinantes

La renaturalización de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 y His-KRP4;2 se llevó a cabo mediante un protocolo de diálisis. El protocolo consistió en dializar de manera gradual (6 M, 4M, 2M de urea) las eluciones en el Buffer de renaturalización (25mM de Tris pH 7.5, 0.25M de NaCl, 0.15% de CHAPS, 0.5mM de DTT y 2.5% de glicerol) por un periodo de 6 horas entre cada diálisis. La última diálisis se realizó en el Buffer de cinasa descrito en la **sección 7.3.6.3**. Las proteínas recombinantes se monitorearon en un gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie y se inmunodetectaron mediante un ensayo de Western Blot con anti-ICK (De Jesús-Juárez *et al.*, 2008).

### 7.3.6 Inhibición en la actividad de cinasa

#### 7.3.6.1 Extracción de proteína

Para realizar la extracción de proteína total se eligieron cinco tiempos de germinación (0H, 6H, 12H, 18H y 24H) de ejes embrionarios de maíz. Se empleó el mismo protocolo de desinfección y extracción de ejes embrionarios en los tiempos establecidos, descrito en la **sección 7.2.2.1**. Una vez obtenidos los ejes embrionarios de cada respectivo tiempo, se homogenizaron con nitrógeno líquido en un mortero con buffer de extracción de proteínas (70 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de KCl, 5 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0.25 mM de sacarosa, 7.5 mM de DTT, 0.1% de Triton X-100, 60 mM de β-glicerol fosfato, 50 mM de NaF, 200 μM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM de EGTA y una tableta de inhibidor de proteasas), la muestra se centrifugó a 16000 g por una hora a 4°C y se determinó su concentración de proteína por el método de Bradford (1976).

#### 7.3.6.2 Inmunoprecipitación

Los anticuerpos anti-CycD2;2 y anti-CycD6;1 fueron conjugados con proteína agarosa A (dilución 6:20 ) por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó una mezcla de extractos proteicos correspondiente a los cinco tiempos de germinación (150 μg totales) y la mezcla se incubó por 24 horas a 4°C en agitación. La muestra se centrifugó en una microcentrífuga y los pellets obtenidos se lavaron por triplicado con Buffer A ( 25mM de Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 2.5

mM de EDTA pH 8.0, 2.5 mM de EGTA, 2.5 mM de NaF y 0.1% de Triton X-100). Las proteínas resultantes se utilizaron como fuente de actividad de cinasa.

#### 7.3.6.3 Actividad de cinasa

Las proteínas asociadas a Ciclina D2;2 y Ciclina D6;1 fueron resuspendidas en 15  $\mu$ L de Buffer de cinasa ( 50mM de Tris pH 7.4, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de EGTA, 2 mM de DTT y una tableta de inhibidor de proteasas por cada 15 ml de buffer). En el caso de los ensayos de inhibición de la actividad de cinasa, las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2 se adicionaron y se incubaron por 1.5 horas a 4°C. La reacción de cinasa se inició mediante la incorporación del sustrato GST-ZmRBR-C (3  $\mu$ g por reacción), 25  $\mu$ M de ATP y 5  $\mu$ Ci ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP durante 25 min a 30 °C y, posteriormente, se paró con 15  $\mu$ L de buffer de carga (con SDS) para proteína. Las muestras se desnaturalizaron a 90 °C por 15 min y se separaron mediante SDS-PAGE. La proteína GST-ZmRBR-C se purificó de acuerdo a Ramírez-Parra *et al.* (1999).

## 8. Resultados

### 8.1 Análisis *in silico*

#### 6.1.1 Identificación de genes que codifican ICK/KRPs en el genoma de maíz, comparación de secuencias con sus respectivos ortólogos y posible nomenclatura.

La búsqueda de genes de maíz homólogos en secuencia a los genes de ICK/KRPs de Arabidopsis, arroz y considerando la presencia del dominio CID (Wang *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000; Jasinski *et al.*, 2002b), indicó la presencia inicial de diez posibles miembros de la familia ICK/KRP de maíz. Realizando un análisis más a detalle, se buscaron los diez genes en bases de ESTs y en la base de datos del transcriptoma de hoja de maíz y de planta completa (Li *et al.*, 2010; Sekhon, 2011), donde nueve de los transcritos fueron encontrados en al menos una base de datos (Tabla 3). No obstante, dos de estos miembros podrían considerarse pseudogenes debido a que uno de ellos (marcada con \*) no presenta codón de inicio y no fue encontrado en ninguna base de datos, sin embargo, no puede descartarse un error en la secuencia. Por otro lado el gen (marcada con \*\*) fue traducido *in silico*, encontrando múltiples codones de paro de la traducción en su secuencia, razón por la cual en la base de datos del genoma de maíz es señalado como una posible mutación a nivel de secuencia (Schnable *et al.*, 2009).

ID	Transcriptoma Hoja	Planta completa	ESTs NCBI
GRMZM2G101613	✓	✓	✓
GRMZM2G084570	✓	✓	✓
GRMZM2G343769	✓	✓	x
GRMZM2G154414	✓	x	✓
GRMZM2G037926	✓	✓	✓
GRMZM2G116885	✓	✓	✓
GRMZM5G804137*	x	x	x
GRMZM2G358931	x	✓	✓
GRMZM2G157510	✓	✓	✓
GRMZM5G854731**	x	✓	x

**Tabla 3.** Expresión de ICK/KRPs de maíz en diferentes bases de datos.

Una vez obtenidas las secuencias proteicas de las diferentes ICK/KRPs se realizaron múltiples alineamientos para tratar de encontrar relación entre estas secuencias con respecto a Arabidopsis y

arroz, debido a la existencia de una nomenclatura existente para ambas plantas. A continuación se procedió a realizar los árboles filogenéticos (Figura 5), mismos que junto con los porcentajes de identidad (Tabla 4) permitieron proporcionar una posible nomenclatura. Los porcentajes de identidad entre las mismas secuencias de maíz pueden observarse en el anexo 1.

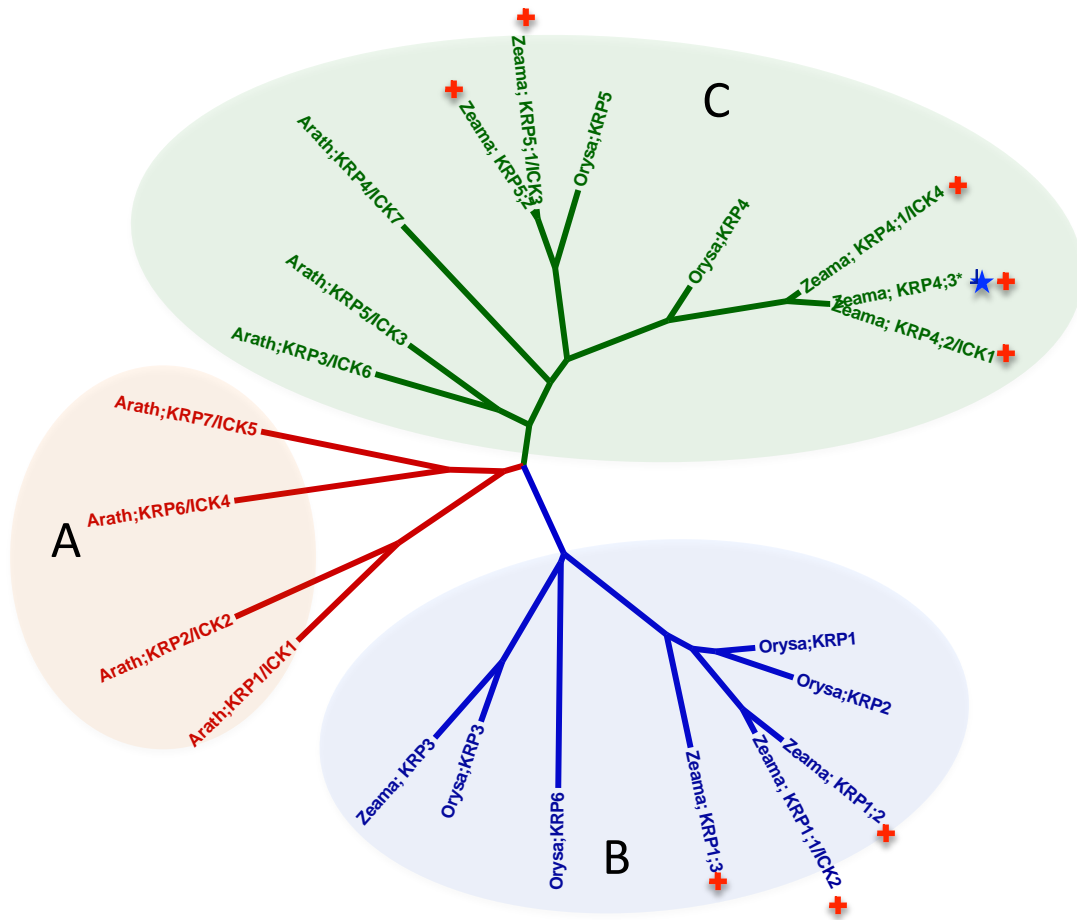
	Oryza;KRP1	Oryza;KRP2	Oryza;KRP3	Oryza;KRP4	Oryza;KRP5	Oryza;KRP6
GRMZM2G101613 ICK2 (KRP1;1)	<b>58.50%</b>	25.20%	17.20%	20.20%	23.50%	11.40%
GRMZM2G084570 (KRP1;2)	<b>57.00%</b>	23.70%	17.30%	18.50%	21.90%	10.20%
GRMZM2G343769 (KRP1;3)	<b>38.70%</b>	24.40%	19.40%	19.80%	20.80%	9.80%
GRMZM2G154414 (KRP3)	15.70%	17.30%	<b>31.80%</b>	15.80%	12.40%	11.50%
GRMZM2G037926 ICK4 (KRP4;1)	18.90%	15.90%	11.40%	<b>62.70%</b>	52.20%	7.80%
GRMZM2G116885 ICK1 (KRP4;2)	18.60%	14.10%	11.90%	<b>60.20%</b>	49.50%	6.90%
GRMZM5G804137 (KRP4;3)*	6.80%	6.70%	7.80%	<b>21.60%</b>	13.90%	14.20%
GRMZM2G358931_P02 (KRP5;1)	20.60%	16.90%	12.70%	50.60%	<b>69.70%</b>	8.10%
GRMZM2G157510 ICK3 (KRP5;2)	20.90%	16.90%	12.70%	49.70%	<b>68.50%</b>	8.10%

**Tabla 4.** Matriz de identidad entre las secuencias proteicas de las ICK/KRPs de maíz y arroz. Se ha omitido la matriz de identidad respecto a Arabidopsis dado que el porcentaje de identidad que presentan es muy pequeño (Anexo 3). En rojo se resalta la máxima identidad con su ortólogo respectivo en arroz.

Con base en la relación filogenética con los genes de Arabidopsis, arroz y maíz es posible observar tres clases bien definidas que previamente han sido reportadas en un análisis filogenético con 40 diferentes especies de plantas (Torres Acosta *et al.*, 2011; Anexo 6), donde los posibles genes de ICK/KRPs de maíz únicamente se encuentran en la clase B que es exclusiva de plantas monocotiledóneas y en la clase C que pertenece a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

De acuerdo a su relación filogenética y a su mayor identidad con los genes de arroz, se propuso una nomenclatura (Tabla 4 y Figura 6) en las que las tres secuencias parecen estar más cercanas a Orysa;KRP1 (incluyendo a Zeama;ICK2 que ya fue reportada), una secuencia a Orysa;KRP3, tres secuencias a Orysa;KRP4 (incluyendo a Zeama;ICK1 que ya fue reportada y al posible pseudogen) y dos secuencias a Orysa;KRP5. En base a este análisis no fue posible encontrar genes de maíz relacionados a Orysa;KRP2 y Orysa;KRP6 (ambos pertenecen a la clase B). Hasta el momento, no se ha descrito alguna correlación entre la clase a la que pertenece esta familia de inhibidores y su implicación funcional.

La nomenclatura propuesta hasta el momento no es definitiva, sin embargo es de gran ayuda para la identificación y análisis de cada uno de los posibles candidatos de ICK/KRPs de maíz. Cabe señalar que aquellas secuencias a las cuales ya se les había asignado una nomenclatura, se les dejó la misma con la abreviatura ICK y se adicionó la nueva nomenclatura con la abreviatura KRP, por ejemplo Zeama;ICK2/KRP1;1.



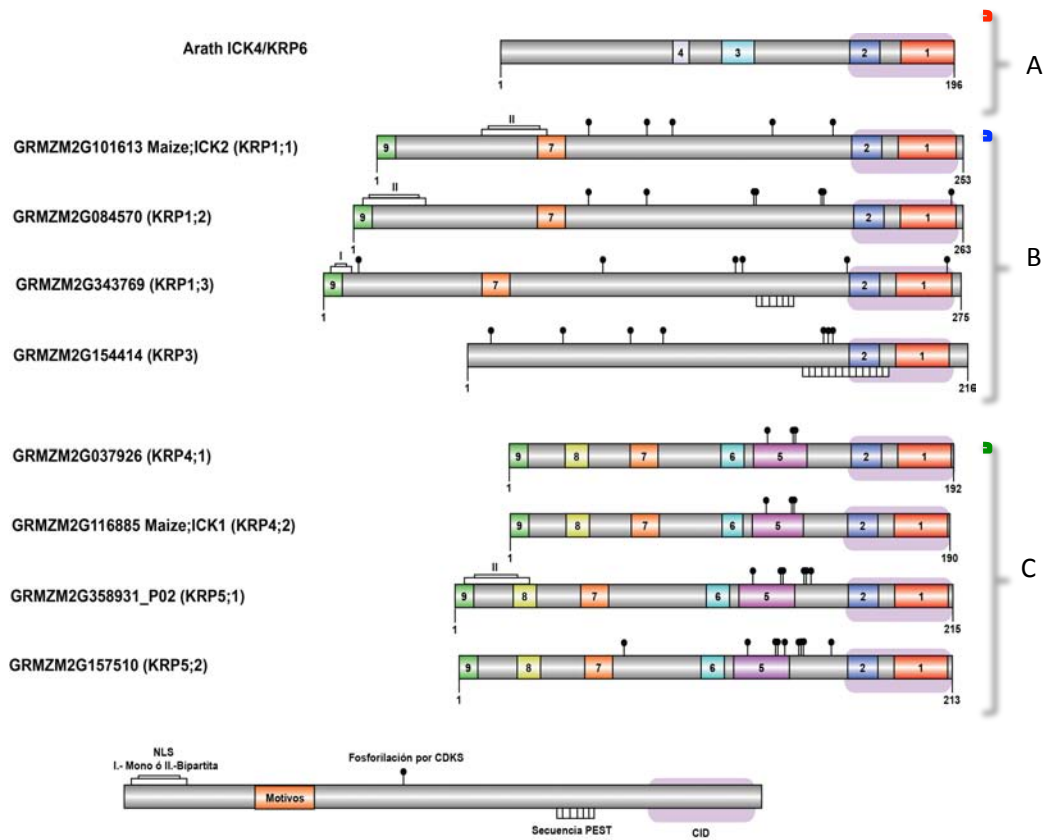
**Figura 6.** Árbol filogenético de las ICK/KRPs de Arabidopsis, arroz y maíz. Cada clase de ICK/KRPs está indicada con un color distinto. Los genes de maíz se encuentran marcados con +. ★ Posible Pseudogen.

### 8.1.2 Identificación de motivos y dominios conservados.

Mediante el análisis de las secuencias peptídicas de las ICK/KRPs de maíz, fue posible determinar algunos de los motivos presentes en otras ICK/KRPs de acuerdo a las secuencias consenso reportadas para ICK/KRPs (Torres Acosta *et al.*, 2011), así como el dominio CID obtenido de PFAM (Figura 7 y Anexo 4).

Siete de los nueve motivos reportados por Torres Acosta *et al.* (2011) están presentes en la familia ICK/KRP de maíz. Los dos motivos faltantes (4 y 3) pertenecientes a la clase A no fueron encontrados en ninguna de las secuencias de maíz. Por otra parte, los motivos 5, 6 y 8 parecen ser exclusivos de las ICK/KRPs de maíz pertenecientes a la clase C, lo que podría deberse a que desempeñan funciones diferenciales entre las clases filogenéticas en que se agrupan. Cabe destacar que dichos motivos en el caso de arroz se encuentran distribuidos tanto en la clase B como en la C (Torres-Acosta *et al.*, 2011; Figura 3). En el caso particular del motivo 7, este se encuentra

distribuido tanto en la clase B como en la C, con excepción de la proteína KRP3.



**Figura 7.** Representación de los motivos y dominios conservados de proteínas ICK/KRP de maíz y un miembro representativo de la clase A de Arabidopsis. El dominio CID está esquematizado de manera sombreada mientras que los motivos están representados por cajas de colores (cada motivo se encuentra explicado en la sección 1.5.1.3). Los motivos putativamente funcionales están representados por símbolos.

Los motivos 1 y 2 se encuentran conservados en todas las secuencias analizadas, lo cual no es sorprendente dado que su presencia está involucrada en la interacción con CDKs y la inhibición de la actividad de cinasa (motivo 1; Wang *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2003b), además de su interacción con ciclinas D (Motivo 2; Wang *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002, 2003a; Jasinski *et al.*, 2002a, b, 2003; Schnittger *et al.*, 2003; Pettko-Szandtner *et al.*, 2006; Bisbis *et al.*, 2006; Jakoby *et al.*, 2006). No obstante, no se conoce si su interacción es diferencial entre todas las ciclinas D y si los complejos formados por dichas ciclinas son inhibidos con el mismo grado.

Por otra parte, en Arabidopsis, el motivo 7 de las ICK/KRPs confiere localización nuclear a las proteínas fusionadas con GFP, así como un patrón de localización nuclear puntual (Jakoby *et al.*,

2006; Zhou *et al.*, 2006; Bird *et al.*, 2007). No existe información experimental de la función que los demás motivos puedan estar efectuando.

Adicionalmente se identificaron motivos putativamente funcionales además de los motivos conservados. Este análisis mostró que la mitad de las secuencias analizadas contienen una señal de localización nuclear ya sea monopartita o bipartita (Figura 7 y Anexo 5). Para el caso de Arabidopsis y arroz, sus secuencias fueron estudiadas previamente (Torres-Acosta *et al.*, 2011) y su análisis puede observarse en la Figura 3 del presente trabajo.

Para la progresión normal del ciclo celular es importante remover a los inhibidores de CDKs en el tiempo adecuado (Schnittger *et al.*, 2003). En este sentido, se buscaron sitios putativos PEST que han sido relacionados con la degradación de ciclinas (Rogers *et al.*, 1986), dado que esto nos podría ayudar a identificar aquellas ICK/KRPs cuya degradación sea vía ubiquitina-proteosoma. Cabe destacar que sólo dos ICK/KRPs de maíz tienen sitios PEST potenciales, mientras que todos los demás presentan al menos un sitio PEST pobre (motivo PEST “valido” con puntaje menor al puntaje umbral específico; Anexo 5).

Otra forma de regulación que es esencial para la progresión del ciclo celular son los eventos reversibles de fosforilación y desfosforilación (Nurse, 1994). De acuerdo al análisis realizado con las ocho ICK/KRPs de maíz, se encontraron varios sitios de fosforilación putativa por parte de CDKs (Figura 6 y Anexo 5). En el caso de Zeama;KRP3, se identificaron varios sitios de fosforilación putativa dentro de su región PEST, lo que sugiere que tales fosforilaciones podrían estar implicadas en la regulación de la degradación del inhibidor. Por otra parte, se puede observar que el motivo 5, único del grupo C, posee al menos un sitio de fosforilación como lo describe Torres Acosta *et al.*, (2011).

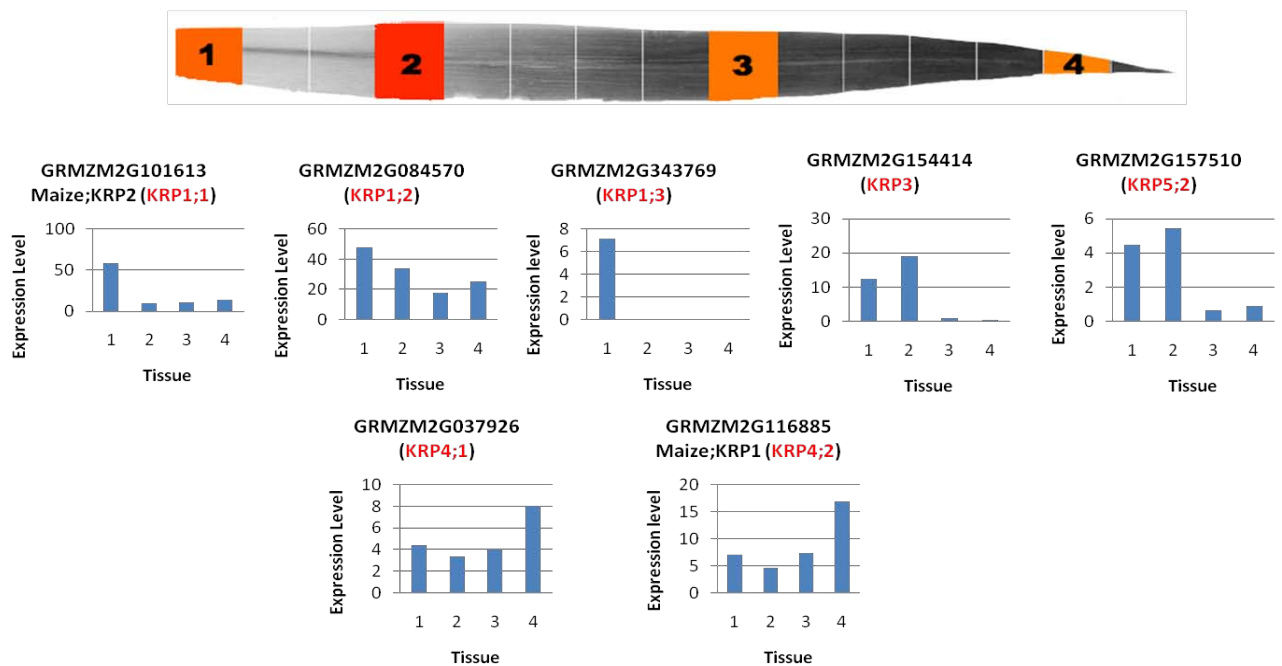


## 8.2 Análisis de expresión de genes

### 8.2.1 Expresión de ICK/KRPs en el transcriptoma de hoja de maíz

Se realizó un análisis de la base de datos del transcriptoma de maíz con el objetivo de tener una aproximación sobre qué genes podrían ser funcionales. Esta base de datos muestra de manera gráfica y esquemática los perfiles de expresión del gen deseado en distintos tejidos, en particular hoja y diferentes etapas del desarrollo de maíz (Li *et al.*, 2010; Sekhon *et al.*, 2011). Dichos resultados se basan en microarreglos realizados de manera masiva, lo cual permitió obtener los transcriptomas durante desarrollo y bajo distintas condiciones ambientales.

Otro de los aspectos importantes por el que se realizó el presente estudio de manera visual, fue para relacionar la expresión de genes ICK/KRP con su probable función, no obstante, previamente se ha demostrado que los niveles de mRNA no correlacionan precisamente con la presencia de la proteína y en menor medida con su actividad biológica. Los resultados obtenidos muestran patrones de expresión en donde los genes ICK2/KRP1;1, KRP1;2, KRP1;3, KRP3 e ICK3/KRP5;2 se expresan más en zonas de proliferación, mientras que los genes ICK4/KRP4;1 e ICK1/KRP4;2 se observan más representados en la zona de diferenciación (Figura 8). No obstante, no se observa correlación alguna entre sus perfiles de expresión y la clase a la que pertenecen.



**Figura 8.** Niveles de expresión de genes ICK/KRP de maíz en hoja de plántula (*in silico*) obtenidos de la base de datos Maize eFP Browser. No se encontró expresión de KRP4;3 y KRP5;1. Se pueden observar patrones diferenciales a lo largo del gradiente de proliferación (1) a la zona de diferenciación (4).

Cabe destacar que no se encontró expresión de los genes KRP4;3\* y KRP5;1 en esta base de datos. En el caso particular de la KRP4;3\*, la ausencia de amplificado coincide con la propuesta de que es un posible pseudogen.

### 8.2.2 Ensayos de expresión en tejidos de plántula y en germinación.

Con el objetivo de buscar los transcritos más viables de los posibles genes, únicamente se tomaron los más largos de cada uno y se realizó un alineamiento múltiple con la finalidad de buscar las regiones más variables para diseñar cebadores que fueran específicos para cada gen; adicionalmente se emplearon cebadores específicos para amplificar una región del rRNA 18S reportado por Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos (2006) lo que se usó como control de carga (Tabla 5).

Gen	Cebador <i>Forward</i> 5' - 3'	Cebador <i>Reverse</i> 5' - 3'	Amplicon gDNA pb	Amplicon mRNA pb	Variante de <i>splicing</i> pb
<b>ICK2/KRP1;1</b>	CGCATGCTGTTTCATGGCAC	AAGCAAGGCATTTGGACGAG	1157	688	---
<b>KRP1;2</b>	GCAAGCGAGAAGAAGGCAGT	CGCTGTCATTCTACAAGTCTACTCC	1489	1020	---
<b>KRP1;3</b>	CCAGGCACGGGTAGATCGTC	TTTATCGTCTGTACGCTCGTCCCA	596	402	---
<b>KRP3</b>	TTCGCAGAGGCGTACAATTACGAC*	GCACCATCAGCTGCATATACGCTA	---	318	---
<b>KRP4;1</b>	GTCCCGACCTCTTCTCTCCTA	TGGGAAGAGTGGCTGGATCTTGTT	2597	591	---
<b>ICK1/KRP4;2</b>	AGACGCAGTGGGAGGAAGGTGCT	AGCGGGGAGTGAGTTCCATTCCAT	2595	503	---
<b>KRP5;1</b>	TCGCAGGATGGAAACCTCAGTC	TAGGCCTACGCTACTTGAGATGGAT	539	439	539
<b>KRP5;2</b>	TTATTCCCAGGATTCCCCTTGCGA	CTCGGTATGAACCGGCAGCTC	2638	628	---

**Tabla 5.** Cebadores diseñados para amplificar los transcritos de los genes estudiados. \*Cebadores diseñados en exon junctions (Anexo 7).

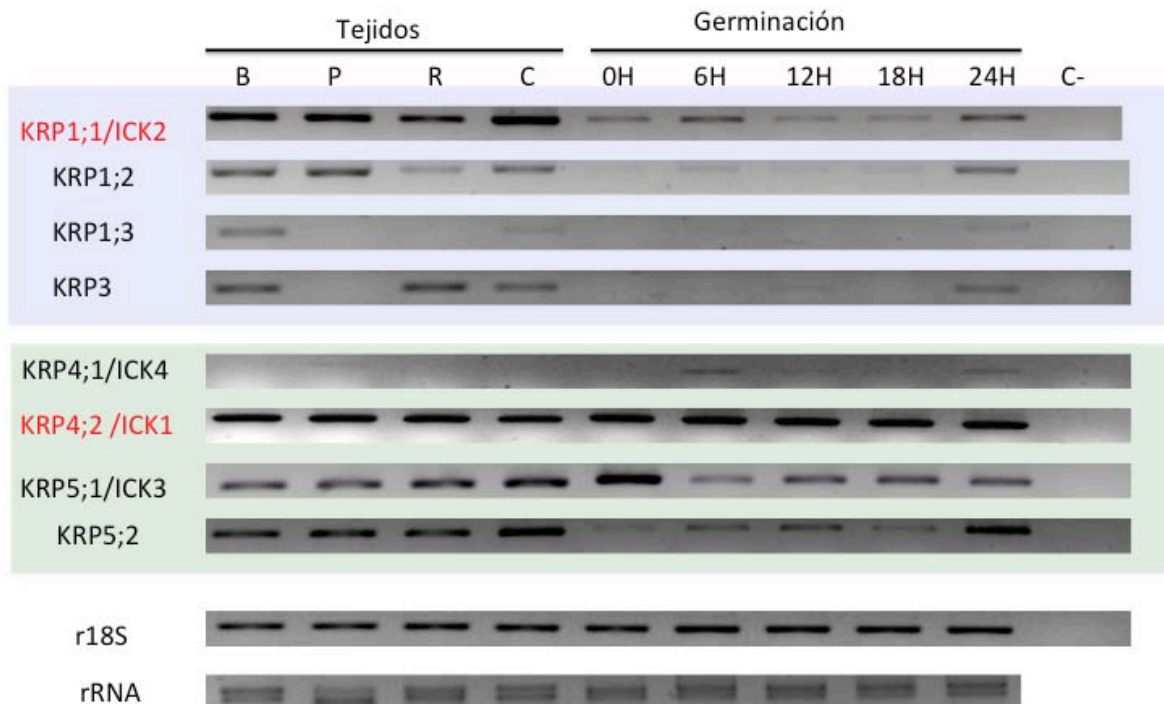
Los transcritos fueron buscados mediante RT-PCR en las dos secciones de hoja mencionadas en la metodología, en ápices de raíz, en coleoptilo y en cinco tiempos de germinación (Figura 9).

En primera instancia, se detectó la presencia de transcritos de las 8 ICK/KRPs de maíz estudiadas hasta el momento, en al menos un tejido y a lo largo de la germinación. De manera general, la expresión de todos los genes ICK/KRP parece tener un comportamiento distinto, sin embargo algunos de ellos presentan patrones semejantes de expresión. ICK2/KRP1;1, KRP1;2, KRP4;2, ICK3/KRP5;1 y KRP5;2 se expresan de manera general en los cuatro tejidos analizados, mientras que KRP1;3 y KRP3 se expresan específicamente en la base de la hoja (tejido de proliferación);

ICK4/KRP4;1 se expresa en niveles muy bajos exclusivamente en la punta de la hoja (tejido de diferenciación).

Por otra parte, en el caso de germinación se puede observar que los ocho genes estudiados se encuentran expresados a las 24H, mientras que ICK1/KRP4;2 y KRP5;1 parecen expresarse de manera constante a lo largo de la germinación. ICK1/KRP4;2 mostró un patrón similar al reportado previamente por De Jesús-Juárez y Vázquez-Ramos (2008). Otra característica interesante es una cantidad de transcritos indetectable de KRP1;2, KRP1;3, KRP3 e ICK4/KRP4;1, en semilla seca. También, cabe señalar la aparición o aumento de transcritos a las 6H de germinación por parte de ICK2/KRP1;1, KRP1;2, KRP1;3, ICK4/KRP4;1 y KRP5;2.

Los perfiles observados para todas las ICK/KRP de maíz nos indican que no parece existir una correlación de expresión entre las dos clases a las que pertenecen.



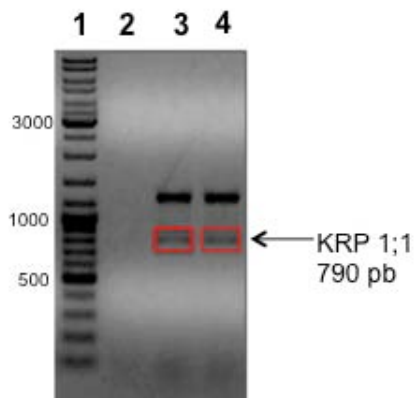
**Figura 9.** Perfiles de expresión de los genes ICK/KRP de maíz. Patrones de expresión obtenidos de experimentos de RT-PCR semicuantitativos en base de Hoja (B), punta de Hoja (P), puntas de raíz (R), coleoptilo (C) de plántulas de 14 días y en germinación de ejes embrionarios de 0H – 24H. Como controles se emplearon la calibración de las muestras de RNA y la amplificación de una región del rRNA 18S. Los genes pertenecientes a la clase B se encuentran marcados en azul, mientras los de la clase C se encuentran resaltados en verde.\* Para el caso de KRP4;1/ICK4 se empleó el doble de templado dado que sus niveles fueron indetectables con 20ng de cDNA. Se muestran las imágenes más representativas de tres réplicas biológicas independientes.

## 8.3 Obtención de proteínas recombinantes para ensayos de inhibición de la actividad de cinasa de complejos Ciclina D/CDK

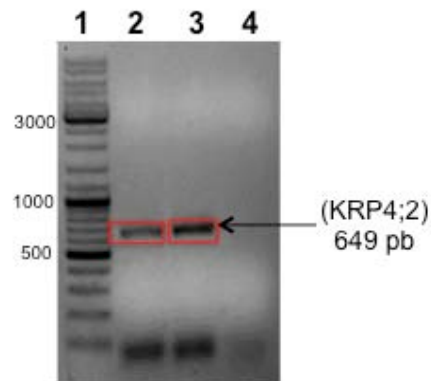
### 8.3.1 Amplificación de los cDNAs de *Zeama;KRP1;1* y *Zeama;KRP4;2*

La razón por la cual se seleccionaron estos dos miembros de la familia ICK/KRP de maíz para ser clonados fue que cada uno de ellos pertenece a una diferente clase, de acuerdo a su relación filogenética, presentan distintos motivos proteicos y su patrón de expresión es diferencial, por lo que probablemente tienen características y funciones diferentes.

Para obtener la secuencia codificante de las proteínas *Zeama;KRP1;1* y *Zeama;KRP4;2* se usó la estrategia ya descrita. Los fragmentos amplificados deben tener una longitud total de 790 nucleótidos para *Zeama;KRP1;1* (Figura 10) y 649 nucleótidos para *Zeama;KRP4;2* (Figura 11) dado el diseño de los oligonucleótidos.



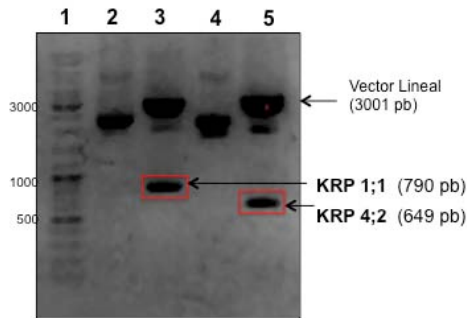
**Figura 10.** Amplificación del cDNA de *Zeama;KRP1;1* por PCR. Carril 1, marcador de tamaño DNA. Carril 2, control negativo para oligonucleótidos de *Zeama;KRP1;1* (Sin templado). Carriles 3-4, PCR a 59.0°C como temperatura de alineamiento



**Figura 11.** Amplificación del cDNA de *Zeama;KRP4;2* por PCR. Carril 1, marcador de tamaño DNA. Carriles 2-3, PCR a 61.1°C como temperatura de alineamiento. Carril 4, control negativo para oligonucleótidos de *Zeama;KRP4;2* (Sin templado).

En el caso de la Figura 10, se puede observar una segunda banda que podría deberse a la amplificación de *Zeama;KRP1;1* a partir de DNA genómico contaminante (longitud total de 1259 nucleótidos).

### 8.3.2 Clonación de los cDNAs en el vector de clonación pGem-T Easy.

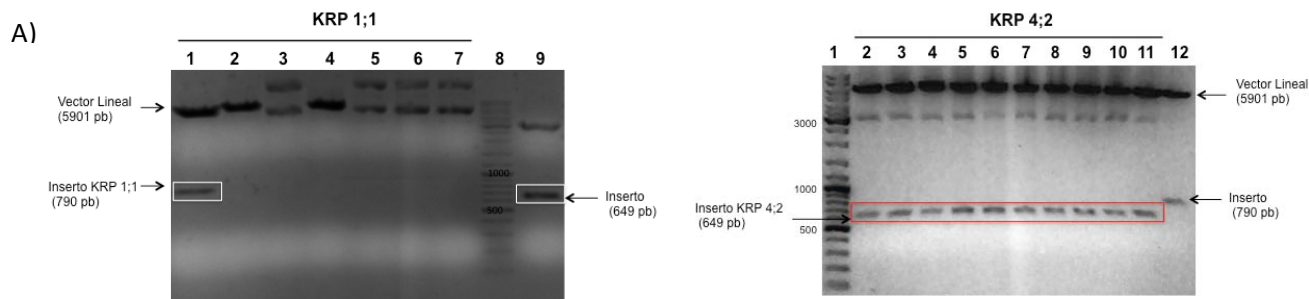


**Figura 12.** Doble digestión con BamHI y NotI de las clonas candidatas de pGEM-T Easy a tener el inserto. Carril 1, marcador de tamaño de DNA. Carril 2, clona candidata de Zeama;KRP4;2 sin digerir. Carril 3, clona candidata de Zeama;KRP4;2 digerida. Carril 4, clona candidata de Zeama;KRP1;1 sin digerir. Carril 5, clona candidata de Zeama;KRP1;1 digerida.

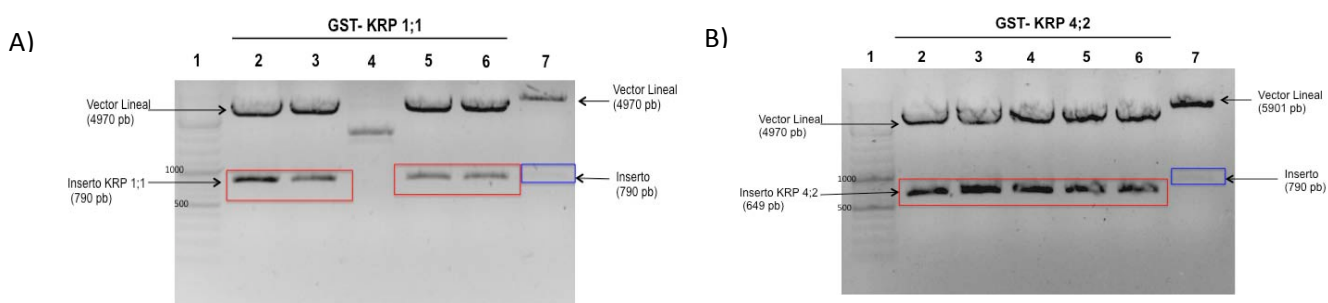
El producto de la amplificación de los cDNAs se ligó en el vector pGEM-T Easy (promega) y se verificó la clonación mediante una doble digestión con las enzimas BamHI y NotI como se describió en la metodología. El fragmento esperado de la digestión era 649 pb para Zeama;KRP4;2 y 790 pb para Zeama;KRP1;1. En la Figura 12 se muestra el gel de la doble digestión que se hizo al plásmido proveniente de una colonia que fue evaluada previamente mediante la digestión con EcoRI.

### 8.3.3 Clonación de los cDNAs en los vectores de expresión pPAL7, pGEX-4T2 y pPROEX HTb.

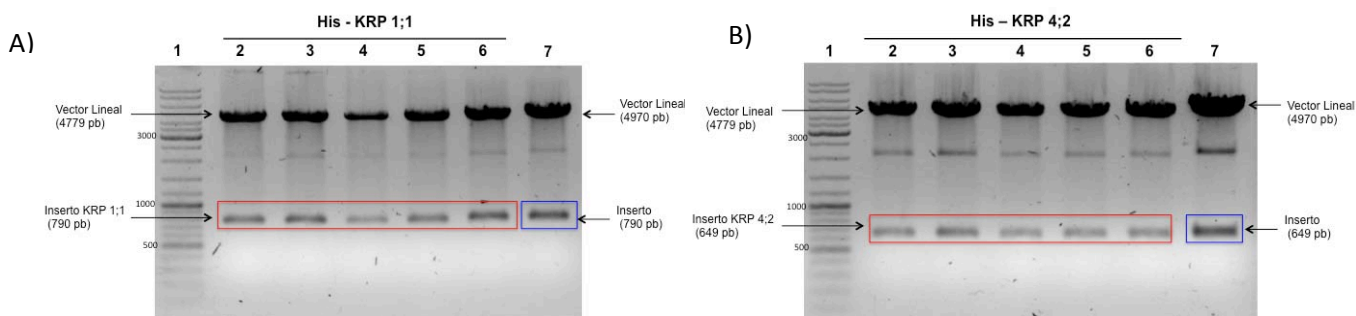
Una vez que se tuvo clonado el inserto de la secuencia codificante en el vector de clonación, este se cortó con las enzimas de restricción BamHI y NotI para poder hacer una clonación dirigida en los plásmidos pPAL7, pGEX-4T2 y pPROEX HTb, los cuales también se cortaron en los mismos sitios, de modo que al ligarlos resultó en la secuencia codificante para la proteína recombinante correspondiente. Después de la reacción de ligación y la transformación de células competentes, se picaron varias colonias para inocular en medio de cultivo y extraer el plásmido.



**Figura 13.** Doble digestión con BamHI y NotI de las clonas candidatas de pAL7 a tener los insertos de Zeama;KRP1;1 y Zeama;KRP4;2. **A)** Carril 1-7, doble digestión de 7 colonias candidatas a tener el inserto Zeama;KRP1;1. Carril 8, marcador de tamaño de DNA. Carril 9, doble digestión de Zeama;KRP4;2 en el vector de clonación pGEM-T Easy empleado como referencia de la reacción. **B)** Carril 1, marcador de tamaño de DNA. Carril 2-11, doble digestión de 10 colonias candidatas a tener el inserto Zeama;KRP4;2. Carril 12, doble digestión de Zeama;KRP1;1 en el vector de clonación pAL7 empleado como referencia de la reacción.

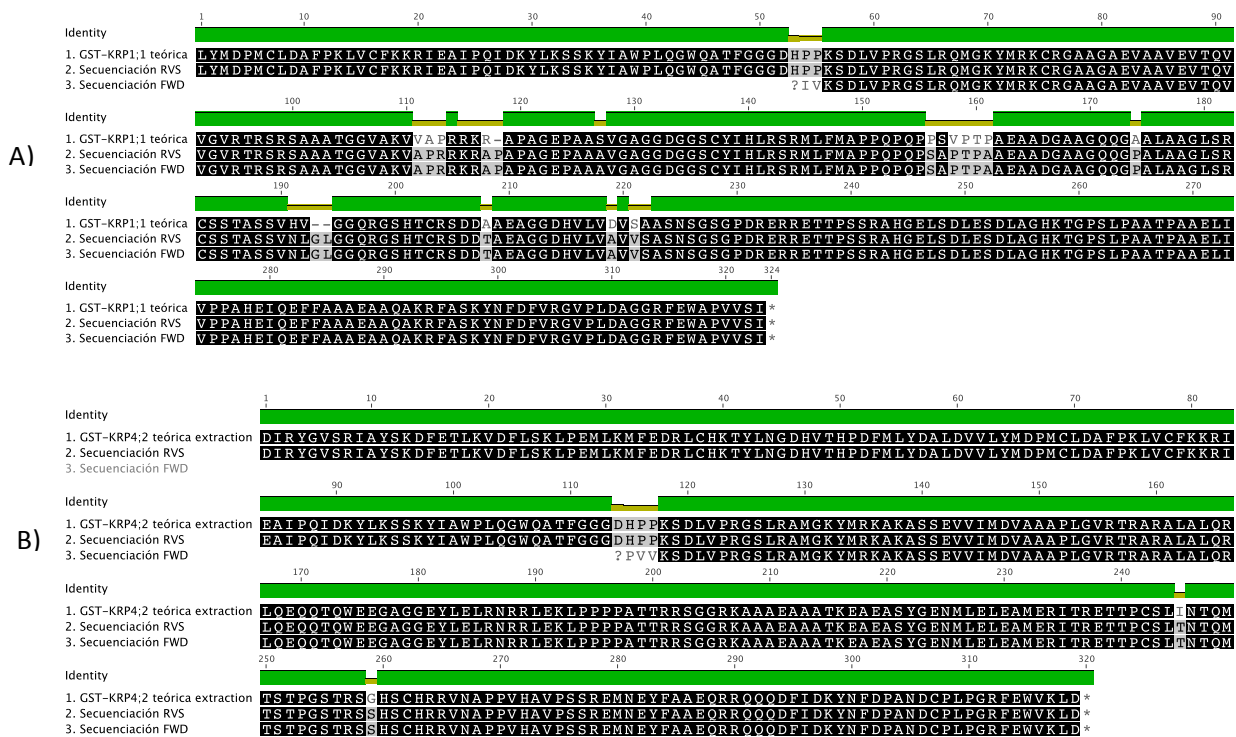


**Figura 14.** Doble digestión con BamHI y NotI de las clonas candidatas de pGEX-4T2 a tener los insertos de Zeama;KRP1;1 y Zeama;KRP4;2. **A)** Carril 1, marcador de tamaño de DNA. Carril 2-6, doble digestión de 5 colonias candidatas a tener el inserto Zeama;KRP1;1. Carril 7, doble digestión de Zeama;KRP1;1 en el vector de clonación pAL7 empleado como referencia de la reacción. **B)** Carril 1, marcador de tamaño de DNA. Carril 2-6, doble digestión de 5 colonias candidatas a tener el inserto Zeama;KRP4;2. Carril 7, doble digestión de Zeama;KRP1;1 en el vector de clonación pAL7 empleado como referencia de la reacción.

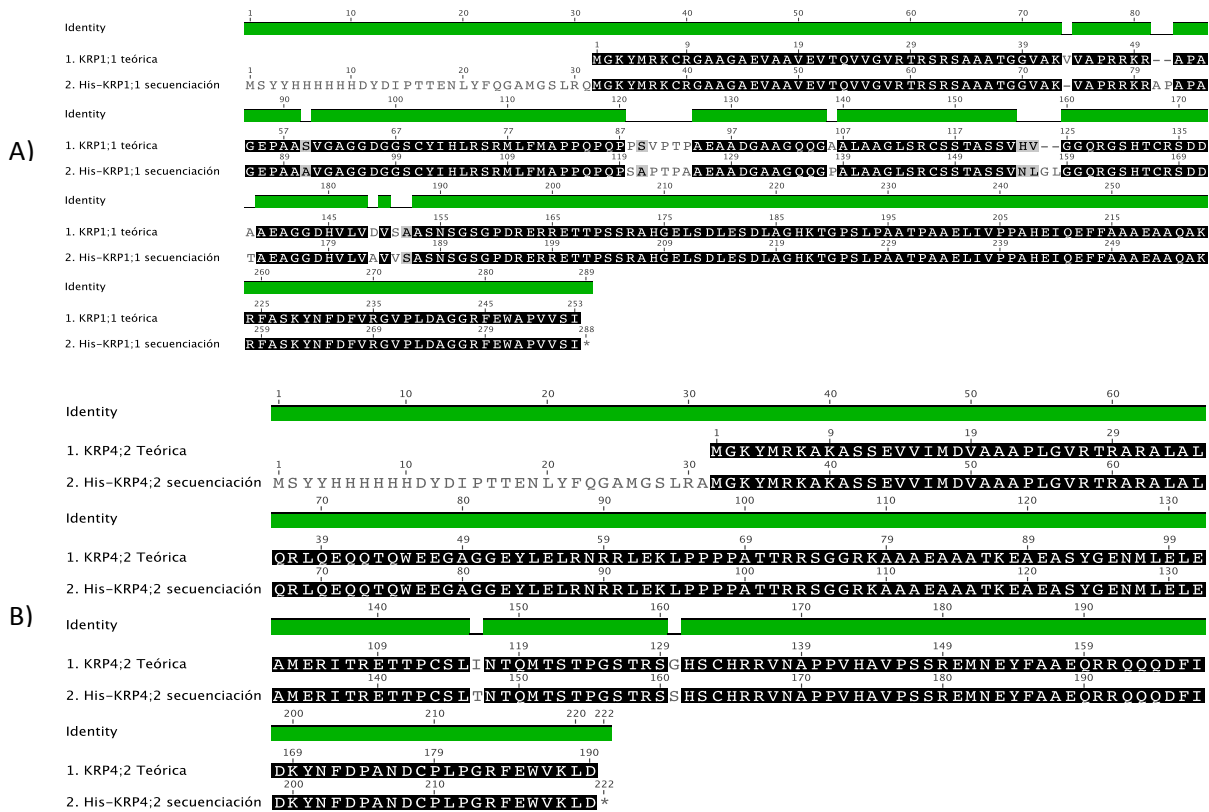


**Figura 15.** Doble digestión con BamHI y NotI de las clonas candidatas de pPROEX HTb a tener los insertos de Zeama;KRP1;1 y Zeama;KRP4;2. **A)** Carril 1, marcador de tamaño de DNA. Carril 2-6, doble digestión de 5 colonias candidatas a tener el inserto Zeama;KRP1;1. Carril 7, doble digestión de Zeama;KRP1;1 en el vector de clonación pGEX-4T2 empleado como referencia de la reacción. **B)** Carril 1, marcador de tamaño de DNA. Carril 2-6, doble digestión de 5 colonias candidatas a tener el inserto Zeama;KRP4;2. Carril 7, doble digestión de Zeama;KRP4;2 en el vector de clonación pGEX-4T2 empleado como referencia de la reacción.

Se verificó la clonación en los diferentes vectores de expresión por doble digestión con las enzimas *BamHI* y *NotI* (Figura 13, 14 y 15). Las clonas que resultaron positivas para la doble digestión (dos para Zeama;KRP4;2 y una para Zeama;KRP1;1) se enviaron a secuenciar para demostrar que la clonación se realizó con éxito. El resultado de la secuenciación se tradujo a aminoácidos y se comparó con la secuencia teórica (Figuras 16 y 17). Únicamente se muestran los alineamientos de las construcciones con los vectores pGEX-4T2 y pPROEX-HTb dado que la expresión de las proteínas recombinantes y su purificación en las construcciones con el vector pPAL7 resultaron negativas.



**Figura 16.** Alineamiento entre las secuencias teórica y experimental de las proteínas recombinantes fusionadas a GST. **A)** Alineamiento con ClustalW entre la secuencia teórica de la proteína GST-KRP1;1 y la resultante de la secuenciación en ambos sentidos, Forward (FWD) y Reverse (RVS). **B)** Alineamiento con ClustalW entre la secuencia teórica de la proteína GST-KRP4;2 y la resultante de la secuenciación en ambos sentidos, Forward (FWD) y Reverse (RVS).



**Figura 17.** Alineamiento entre las secuencias teórica y experimental de las proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas. **A)** Alineamiento con ClustalW entre la secuencia teórica de la proteína His-KRP1;1 y la resultante de la secuenciación. **B)** Alineamiento con ClustalW entre la secuencia teórica de la proteína His-KRP4;2 y la resultante de la secuenciación.

La Figura 16 muestra el alineamiento del resultado de secuenciación con la proteína KRP1;1 fusionada a GST, mientras que la Figura 17 muestra el alineamiento del resultado de secuenciación con la proteína KRP1;1 con etiqueta de Histidinas. En ambas figuras podemos observar que se encuentran en el correcto marco de lectura para producir las proteínas de fusión adecuadas. Sin embargo, existen varias regiones que difieren con la secuencia teórica ya sea por el cambio en algún aminoácido (en determinados casos estos cambios no están conservados) o por la adición de alguno, no obstante, el marco de lectura no se modifica. Es probable que estos cambios se deban a polimorfismos que existen entre las variedades de maíz, dado que la secuencia reportada fue extraída de la base de datos (<http://www.maizesequence.org>) que emplea la variedad de maíz B73.

Por otra parte, del alineamiento del resultado de la secuenciación con la secuencia teórica de la proteína KRP4;2 fusionada a GST (Figura 16) y del correspondiente alineamiento con la proteína KRP4;2 con etiqueta de Histidinas, podemos observar que se encuentran en el correcto marco de

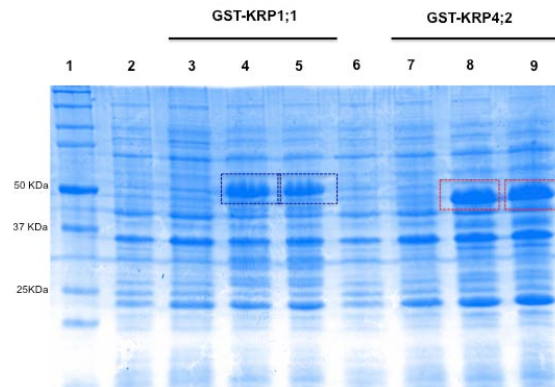


lectura para producir la proteína de fusión adecuada. Adicionalmente, sólo dos aminoácidos difieren de la secuencia reportada.

### 8.3.4 Expresión de proteínas recombinantes

#### 8.3.4.1 Expresión de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2.

Para expresar las proteínas recombinantes usamos como fondo genético la cepa *E. coli* BL21 codon plus sin el plásmido correspondiente a cada construcción con el objetivo de visualizar las proteínas propias de la cepa. La predicción en el programa PeptideMass (Expasy) para la masa molecular de la proteína recombinante GST-KRP4;2 es 47.7 KDa y para GST-KRP1;1 es 52.2 KDa. La expresión de la proteína se monitoreó en SDS-PAGE (Figura 18).

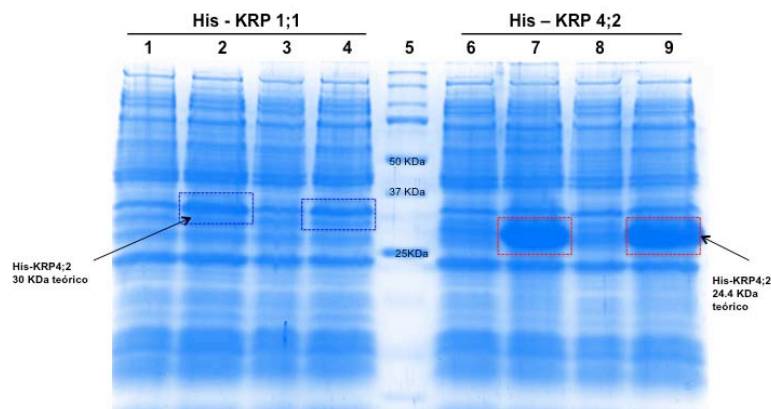


**Figura 18.** Inducción de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST- KRP4;2. Carril 1, marcador de masa molecular. Carriles 2 y 6, BL21 codon plus sin plásmido. Carril 3, construcción con GST-KRP1;1 sin inducir. Carriles 4 y 5, construcción con GST-KRP1;1 inducida por 2 y 3 h, respectivamente. Carril 7, construcción con GST-KRP4;2 sin inducir. Carriles 8 y 9, construcción con GST-KRP1;1 inducida por 2 y 3 h, respectivamente. Los cuadros representan la expresión de las proteínas recombinantes.

La proteína GST-KRP1;1 se expresa menos que la GST-KRP4;2, sin embargo ambas presentan el tamaño esperado.

#### 8.3.4.2 Expresión de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2.

De acuerdo a la predicción del programa PeptideMass (Expasy) para las masas moleculares de las proteínas recombinantes, His-KRP1;1 e His-KRP4;2 fueron de 30 KDa y 24.4 KDa, respectivamente. La expresión de la proteína se monitoreó en SDS-PAGE (Figura 19).



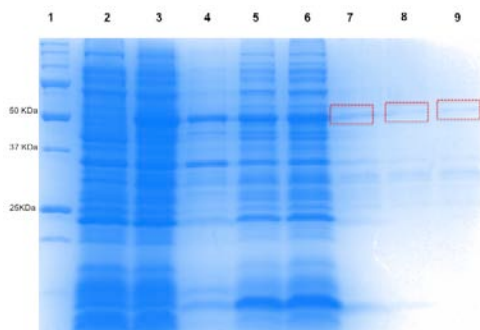
**Figura 19.** Inducción de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2. Carril 1, construcción con His-KRP1;1 sin inducir (colonia 1). Carril 2, construcción con His-KRP1;1 inducido a las 2 horas (colonia 1). Carril 3, construcción con His-KRP1;1 sin inducir (colonia 2). Carril 4, construcción con His-KRP1;1 inducido a las 2 horas (colonia 2). Carril 5, marcador de masa molecular. Carril 6, construcción con His-KRP4;2 sin inducir (colonia 1). Carril 7, construcción con His-KRP4;2 inducido a las 2 horas (colonia 1). Carril 8, construcción con His-KRP4;2 sin inducir (colonia 2). Carril 9, construcción con His-KRP4;2 inducido a las 2 horas (colonia 2). Los cuadros representan la expresión de la proteínas recombinantes.

La proteína His-KRP1;1, se expresa menos que His-KRP4;2 y ambas presentan un corrimiento electroforético ligeramente mayor a la masa molecular estimada. Cabe señalar que miembros de la familia Kip/Cip de mamíferos e ICK/KRP de plantas han sido catalogados como proteínas intrínsecamente desordenadas, por lo cual, el patrón de corrimiento electroforético podría no coincidir a la masa molecular calculada.

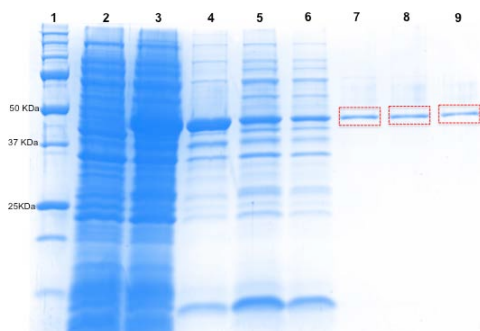
### 8.3.5 Purificación de las proteínas recombinantes

#### 8.3.5.1 Purificación de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2

Para poder estudiar la función de la proteína se requiere de su purificación. Dada la insolubilidad de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2, se probaron diferentes protocolos de purificación así como condiciones de inducción. Sólo uno resultó con mayor rendimiento, sin embargo, las cantidades de proteína obtenidas fueron insuficientes para realizar los ensayos de inhibición en la actividad de cinasa (Figura 20 y 21).



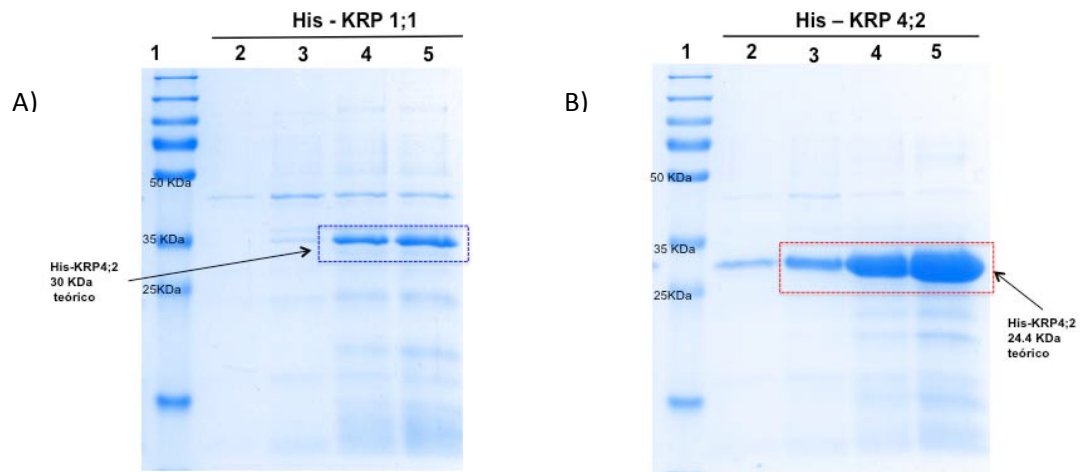
**Figura 20.** Purificación de la proteína recombinante GST-KRP1;1. Carril 1, Marcador de masa molecular. Carril 2, GST-KRP1;1 sin inducir. Carril 3, GST-KRP1;1 inducido por 3 h. Carril 4, fracción insoluble. Carril 5, fracción soluble Carril 6 , lavados. Carriles 7 – 9, tres eluciones con glutatión reducido.



**Figura 21.** Purificación de la proteína recombinante GST-KRP4;2. Carril 1, Marcador de masa molecular. Carril 2, GST-KRP4;2 sin inducir. Carril 3, GST-KRP4;2 inducido por 3 h. Carril 4, fracción insoluble. Carril 5, fracción soluble. Carril 6 , lavados. Carriles 7 – 9, tres eluciones con glutatión reducido.

### 8.3.5.2 Purificación de las proteínas recombinantes *His-KRP1;1* e *His-KRP4;2*

En base a la insolubilidad de ambas proteínas recombinantes se empleó un método desnaturizante con urea, el cual resultó positivo y con un alto rendimiento de proteína purificada para poder llevar a cabo el proceso de renaturalización, antes de realizar los ensayos de actividad de cinasa (Figura 22).

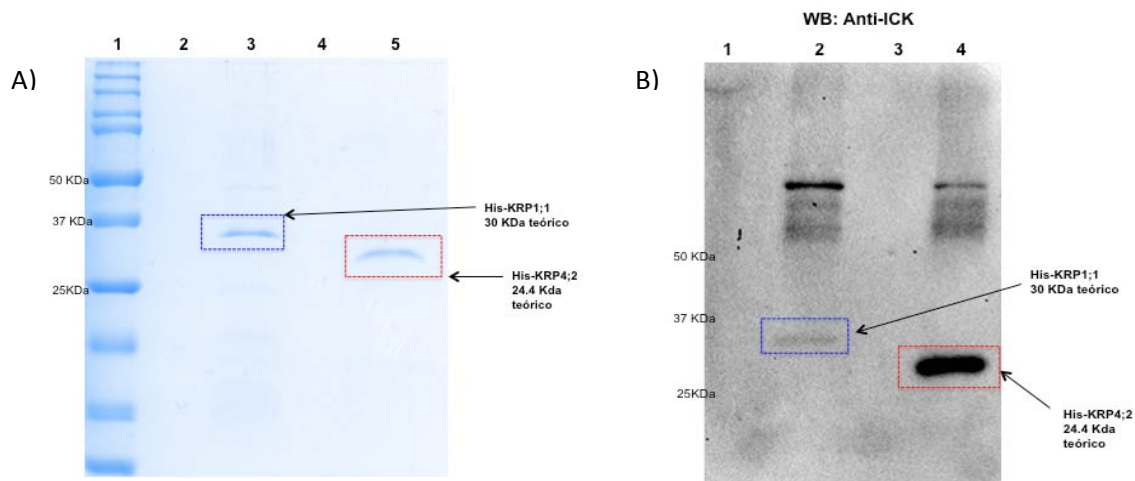


**Figura 22.** Purificación de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2. **A)** Carril 1, marcador de masa molecular. Carriles 2-5, cuatro eluciones de His-KRP1;1 con Buffer E. **B)** Carril 1, marcador de masa molecular. Carriles 2-5, cuatro eluciones de His-KRP4;2 con Buffer E.

Como se puede observar en la Figura 22, la purificación de la proteína His-KRP4;2 fue más eficiente que la de la proteína His-KRP1;1, sin embargo, la cantidad de proteína purificada aumentó considerablemente en relación a la purificación de GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2.

### 8.3.5.3 Renaturalización de las proteínas recombinantes

Una vez purificadas las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2, se dializaron con el objetivo de eliminar la urea y permitir la posible renaturalización de ambas. Una vez finalizada la diálisis, dichas proteínas se monitorearon e inmunodetectaron (Figura 23) para poder verificar la integridad de las mismas, así como permitir su cuantificación.



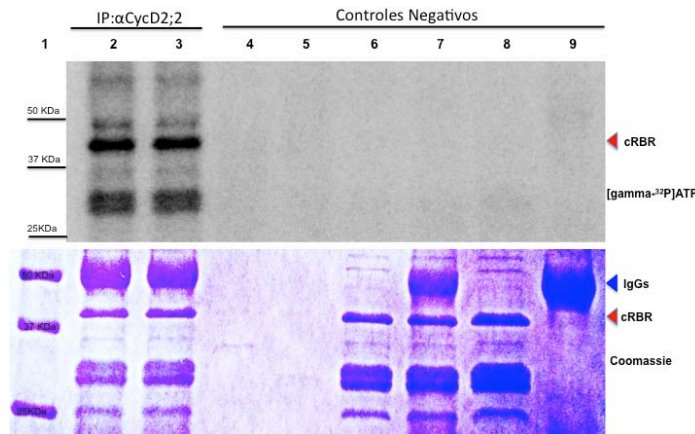
**Figura 23.** Renaturalización de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2. **A)** Monitoreo de las proteínas recombinantes en SDS-PAGE después de dializar (Coomassie). Carril 1, marcador de masa molecular. Carriles 3 y 5, His-KRP1;1 e His-KRP4;2 respectivamente. Carriles 2 y 4, vacíos. **B)** Western Blot con anti - ICK de las proteínas recombinantes. Carriles 2 y 4, His-KRP1;1 e His-KRP4;2 respectivamente. Carriles 1 y 3, vacíos.

De acuerdo a la Figura 23A, ambas proteínas se encuentran íntegras y fueron dializadas en el buffer de actividad de cinasa, para poder ser empleadas directamente en los ensayos de actividad. Por otra parte, el anticuerpo anti-ICK (anticuerpo generado contra la región carboxilo terminal de Zeama ICK1/KRP4;2) identificó ambas proteínas recombinantes (Figura 23B), lo cual no es sorprendente, ya que la región contra la que se generó el anticuerpo es la más conservada entre toda la familia ICK/KRP. No obstante, el anticuerpo detectó con mayor afinidad la proteína recombinante His-KRP4;2 en comparación con la proteína His-KRP1;1. Adicionalmente, la identificación de las proteínas permitió corroborar que ambas proteínas recombinantes se traducen completamente y en el marco de lectura adecuado.

### 8.3.6 Ensayos de inhibición en la actividad de cinasa asociada a los complejos con Ciclina D2;2 y Ciclina D6;1.

Mediante ensayos de actividad de cinasa *in vitro* se determinó el efecto inhibitorio de las proteínas ZmKRP1;1/ICK2 y ZmKRP4;2/ICK1 recombinantes sobre la actividad de cinasa asociada a Ciclina D2;2 y a Ciclina D6;1, empleando como sustrato a GST-ZmRBR-C y como fuente de CDKs, inmunoprecipitados de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz. Para estos ensayos, se utilizó una mezcla de extractos proteicos de ejes embrionarios germinados en cinco diferentes tiempos (0h, 6h, 12h, 18h y 24h) como fuente de complejos Ciclina/CDK.

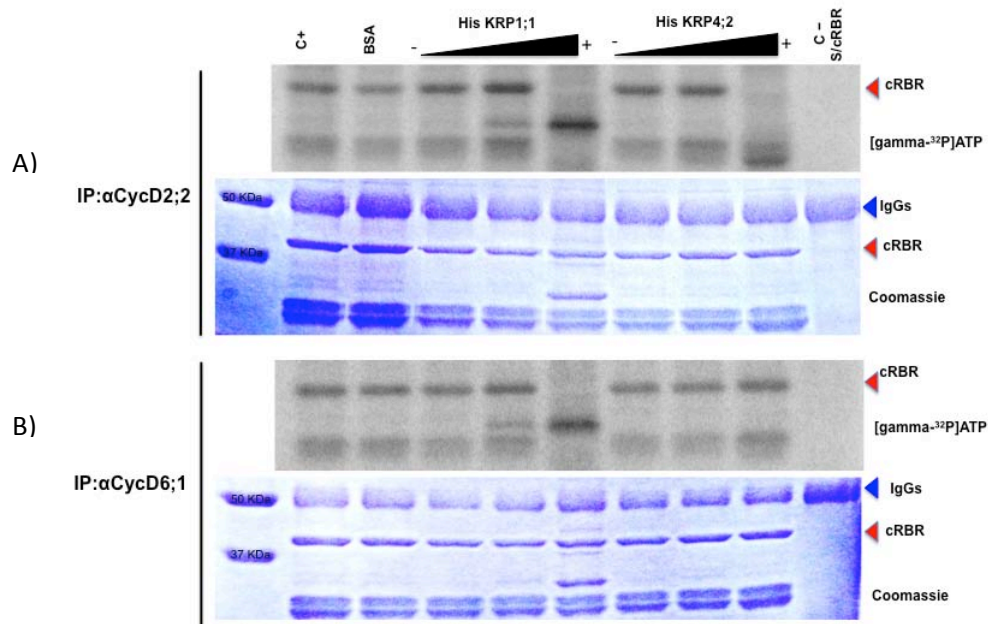
En la Figura 24 se muestran los controles pertinentes para los ensayos de inhibición de la actividad de cinasa, en los cuales, todos los controles positivos presentaron la fosforilación del sustrato GST-ZmRBR-C, mientras que ninguno de los controles negativos la presentó, permitiendo así la validación del método. Por otra parte, se emplearon las distintas proteínas recombinantes en el buffer de reacción (carriles 4, 5 y 8) con el objetivo de determinar si dichas proteínas se pueden autofosforilar.



**Figura 24.** Actividad de cinasa con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  sobre GST-RBR-C (controles). Carril 1, marcadores de masa molecular. Carril 2, IP con anti-Ciclina D2;2. Carril 3, IP con anti-Ciclina D2;2 previamente incubado con BSA. Carril 4, His-KRP1;1 con Buffer de cinasa (mezcla de reacción). Carril 5, His-KRP4;2 con Buffer de cinasa (mezcla de reacción). Carril 6, Agarosa A sin anti-Ciclina D2;2, con extracto proteico. Carril 7, Agarosa A con anti-Ciclina D2;2, sin extracto proteico. Carril 8, GST-ZmRBR-C con Buffer de cinasa (mezcla de reacción). Carril 9, IP con anti-Ciclina D2;2 sin sustrato (GST-ZmRBR-C). La flecha roja indica la banda correspondiente a la proteína GST-ZmRBR-C y la flecha azul indica las inmunoglobulinas tipo G como control de carga.

En la Figura 25A y B, se muestra la fosforilación de GST-ZmRBR-C por las cinasas asociadas a Ciclina D2;2 y Ciclina D6;1, donde se observó un efecto inhibitorio de carácter dosis-dependiente por parte de KRP1;1/ICK2 sobre la actividad de cinasa encontrada en inmunoprecipitados de ambas ciclinas. La actividad de cinasa en los complejos formados con Ciclina D2;2 fue indetectable en presencia de la mayor concentración de la proteína KRP1;1 recombinante (5  $\mu\text{g}$ , carril 6A). Por otra parte, los complejos asociados a Ciclina D6;1 presentaron una disminución en la actividad de cinasa semejante a los complejos formados con Ciclina D2;2 en relación al aumento en la concentración de la proteína KRP1;1 recombinante (0.25-5  $\mu\text{g}$ , Carriles 4-6 B) y fue total en la mayor concentración.

En la Figura 25A y B se muestra la fosforilación de GST-ZmRBR-C por las cinasas asociadas a Ciclina D2;2 y Ciclina D6;1, observándose un efecto inhibitorio de carácter dosis-dependiente por parte de KRP4;2/ICK1 sobre la actividad de cinasa encontrada en inmunoprecipitados de Ciclina D2;2 pero no así en inmunoprecipitados de Ciclina D6;1. La actividad de cinasa en los complejos asociados a Ciclina D2;2 fue indetectable en presencia de la mayor concentración de la proteína recombinante (5  $\mu\text{g}$ , carril 9A). Por otra parte, la actividad asociada a Ciclina D6;1 parece mantenerse constante en las tres concentraciones de KRP4;2/ICK1 utilizadas (carriles 7-9).



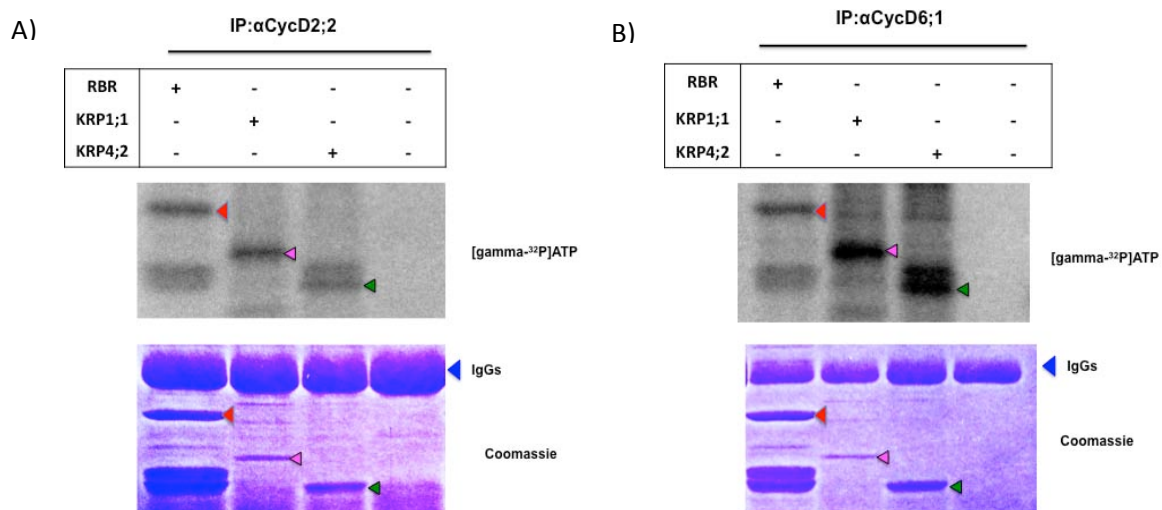
**Figura 25.** Efecto de Zm KRP1;1/ICK2 y Zm KRP4;2/ICK1 sobre la actividad de cinasa con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en inmunoprecipitados de anti-Ciclina D2;2 y anti-Ciclina D6;1, utilizando GST-ZmRBR-C como sustrato. **A)** Efecto dosis-respuesta de la proteína recombinante KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1 sobre los complejos asociados a Ciclina D2;2. Carril 1, marcadores de masa molecular. Carril 2 IP con anti-Ciclina D2;2. Carril 3, IP con anti-Ciclina D2;2 e incubado con 5.0  $\mu\text{g}$  de BSA. Carriles 4-6, IPs con anti-Ciclina D2;2 e incubado con 0.25, 2.5 y 5.0  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante KRP1;1/ICK2. Carriles 7-9, IP con anti-Ciclina D2;2 e incubado con 0.25, 2.5 y 5.0  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante KRP4;2/ICK1. Carril 10, IP con anti-Ciclina D2;2 sin GST-ZmRBR-C **B)** Efecto dosis-respuesta de la proteína recombinante KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1 sobre los complejos asociados a Ciclina D6;1. Carril 1, marcadores de masa molecular. Carril 2, IP con Ciclina D6;1. Carril 3, IP con Ciclina D6;1 e incubado con 5.0  $\mu\text{g}$  de BSA. Carriles 4-6, IPs con anti-Ciclina D6;1 e incubado con 0.25, 2.5 y 5.0  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante KRP1;1/ICK2. Carriles 7-9, IPs con anti-Ciclina D6;1 e incubado 0.25, 2.5 y 5.0  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante KRP4;2/ICK1. Carril 10, IP con anti-Ciclina D6;1 sin GST-ZmRBR-C. La flecha roja indica la banda correspondiente a la proteína GST-ZmRBR-C y la flecha azul indica las inmunoglobulinas tipo G como control de carga.

Cabe destacar, que el comportamiento inhibitorio de KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1 no es el mismo y parece depender del tipo de ciclina con el que se realice el inmunoprecipitado. Adicionalmente, en la Figura 25 A y B, se puede observar la presencia de una banda no relacionada a la proteína GST-ZmRBR-C (Carril 6 y 9), lo que sugiere la posible fosforilación de las proteínas recombinantes KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1 dado que sus masas moleculares coinciden con las bandas observadas, por lo que fue preciso emplear ambas proteínas como sustratos de complejos asociados a ciclina D2;2 y ciclina D6;1.



8.3.7 Fosforilación de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 e His-KRP4;2 por parte de complejos asociados a Ciclina D2;2.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad de cinasa y la presencia de sitios putativos de fosforilación para las CDKs en el análisis *in silico* (sección 5.1.2), se optó por emplear a las proteínas recombinantes His-KRP1;1 y His-KRP4;2 como posibles sustratos de los complejos Ciclina/CDK.



**Figura 26.** Fosforilación de las proteínas recombinantes KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1 por parte de complejos asociados a Ciclina D2;2 y D6;1. **A)** Fosforilación de KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1 por parte de los complejos asociados a Ciclina D2;2. Carril 1, con proteína recombinante GST-ZmRBR-C, sin KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1. Carril 2, con proteína recombinante KRP1;1/ICK2, sin GST-ZmRBR-C y KRP4;2/ICK1. Carril 3, con proteína recombinante KRP4;2/ICK1, sin GST-ZmRBR-C y KRP1;1/ICK2. Carril 4, sin proteínas recombinantes. **B)** Fosforilación de KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1 por parte de los complejos asociados a Ciclina D6;1. Carril 1, con proteína recombinante GST-ZmRBR-C, sin KRP1;1/ICK2 y KRP4;2/ICK1. Carril 2, con proteína recombinante KRP1;1/ICK2, sin GST-ZmRBR-C y KRP4;2/ICK1. Carril 3, con proteína recombinante KRP4;2/ICK1, sin GST-ZmRBR-C y KRP1;1/ICK2. Carril 4, sin proteínas recombinantes.

En la Figura 26 A y B, se puede observar la fosforilación de His-KRP1;1 e His-KRP4;2 respectivamente (Carriles 2 y 3) por parte de los complejos formados por la ciclina D2;2 y D6;1, sin embargo, en el caso de la fosforilación de His-KRP4;2 se observa la presencia de dos bandas fosforiladas.



## 9. Discusión de resultados

### 9.1 Análisis *in silico*

El análisis *in silico* permitió dilucidar la existencia de al menos 10 genes pertenecientes a la familia ICK/KRP en el genoma de maíz; dos de ellos son considerados como posibles pseudogenes por sus características a nivel de estructura génica (falta de codón de inicio o presencia de múltiples codones de paro); mientras que cuatro de ellos corresponden a las ICK/KRPs previamente reportadas como Zeama;ICK1, Zeama;ICK2 (Coelho *et al.*, 2005; De Jesús-Juárez *et al.*, 2008), Zeama;ICK3 y Zeama;ICK4 (Torres Acosta *et al.*, 2011). Esta riqueza en genes de ICK/KRPs es común en plantas (7 genes en *Arabidopsis* y 6 en arroz), sin embargo, el genoma de maíz es el que presenta mayor cantidad de genes ICK/KRPs, probablemente debido a eventos de duplicación génica mediado por transposones, lo cual es relativamente común en maíz. Considerando que los mamíferos poseen múltiples inhibidores de CDKs, los cuales pueden interaccionar con distintos complejos ciclinas-CDKs, y el hecho de que las plantas también poseen múltiples CDKs y ciclinas, no es extraño que también existieran múltiples inhibidores de CDKs, como ocurre con la familia ICK/KRP.

Por otra parte, el análisis filogenético permitió clasificar los genes de ICK/KRPs de maíz, junto con los de otras angiospermas, en tres clases, donde los genes correspondientes a la familia ICK/KRP de maíz únicamente se encuentran dentro de la clase B (perteneciente a secuencias de plantas monocotiledóneas) y de la clase C (perteneciente a secuencias de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), mientras que ninguna de las secuencias se agrupan con los de la clase A (pertenecientes a secuencias de plantas dicotiledóneas; Torres Acosta *et al.*, 2011; Anexo 6). Cabe señalar que la distribución entre las distintas clases podría ser una marca distintiva para su función de esta familia de inhibidores ya sea dentro o fuera del ciclo celular. Sin embargo, no existe información disponible sobre una posible correlación entre las tres clases en que se distribuye esta familia de inhibidores y su posible función. De igual forma, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se enfocan en genes individuales de la familia ICK/KRP por lo que es difícil dilucidar si todos los miembros de la misma clase presentan características similares que permita relacionar su función con su clasificación filogenética.

Los genes de la familia ICK/KRP en diferentes plantas han sido nombrados por diferentes laboratorios de manera cronológica, razón por la cual se ha propuesto darles una nomenclatura en relación a especies modelo como son *Arabidopsis* y arroz, dado que los miembros de estas especies ya han sido nombrados. Además, esta clasificación evitaría posible confusión en el futuro con

respecto a su numeración y nombre. Si bien, algunos de los miembros de la familia ICK/KRP de maíz ya habían sido descritos y nombrados, la clasificación propuesta permitió adicionar la nueva nomenclatura sin modificar la precedente como es el caso de los genes ICK1/KRP4;2, ICK2/KRP1;1 (Coelho *et al.*, 2005; De Jesús-Juárez *et al.*, 2008), ICK3/KRP5;1 e ICK4/KRP4;1 (Torres Acosta *et al.*, 2011). Dado que el genoma de la variedad de maíz B73 está secuenciado y anotado en su totalidad, se espera que la nomenclatura propuesta no sufra mayores modificaciones. De igual manera, es conveniente analizar la secuencia de los genomas de otras variedades de maíz y/o de otras especies del género *Zea* una vez que estén disponibles para poder determinar si la nomenclatura propuesta también se cumple para ellas. Un aspecto importante a señalar es la ausencia de ICK/KRPs de maíz con mayor relación filogenética e identidad con los miembros KRP2 y KRP6 de arroz, por lo que quizás también algunos tipos de ICK/KRPs sean exclusivos de ciertos géneros.

Otro aspecto analizado fue la presencia de dominios y motivos conservados en las secuencias de aminoácidos para cada una de las ICK/KRP encontradas en el genoma de maíz. En cada uno de los miembros de la familia ICK/KRP de maíz se encontró la marca específica para poder pertenecer a esta familia de inhibidores, correspondiente al dominio de inhibición de CDKs (CID) (Wang *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000; Jasinski *et al.*, 2002b). Por otra parte, algunos de los motivos conservados parecen distribuirse de acuerdo a su clasificación filogenética por lo que probablemente la diferencia entre la presencia o ausencia de estos motivos en una clase u otra, proporcione funciones que sean diferenciales entre cada clado.

Los motivos 1 y 2, que abarcan al dominio CID, son las secuencias más conservadas entre todos los miembros de la familia ICK/KRP de plantas. Esto no es sorprendente dado que el motivo 1 ha sido descrito como el principal componente para la interacción con CDKs e inhibición en su actividad (Wang *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 2003b). A pesar de su relativo nivel de conservación, los miembros de la familia ICK/KRP de *Arabidopsis* muestran diferencias en cuanto a su capacidad de unión a los diferentes tipos de CDK (Zhou *et al.*, 2002), por lo que se desconoce si sus diferencias residen en la variación con respecto a la secuencia consenso o de las secuencias que lo rodean. Por otra parte, en el motivo 2 reside la capacidad de unión a ciclinas descrito en la ICK1 de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 1998) y como característica particular es que todas las proteínas ICK/KRP estudiadas hasta el momento pueden interaccionar con ciclinas D (Wang *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002, 2003a; Jasinski *et al.*, 2002a, b, 2003; Schnittger *et al.*, 2003; Pettko-Szandtner *et al.*, 2006; Bisbis *et al.*, 2006; Jakoby *et al.*, 2006). Adicionalmente, la función que tiene este motivo en la interacción con ciclinas tipo D ha sido confirmado con el miembro EL2 de

arroz perteneciente a la familia SIAMESE/EL2 (Peres *et al.*, 2007). Sin embargo, se ignora si la interacción de estos inhibidores con las distintas ciclinas tipo D es diferencial entre cada una de ellas.

El motivo 7 se encontró distribuido en las secuencias ICK/KRP de maíz tanto de la clase B como de la C, el cual parece conferirle, en Arabidopsis, localización nuclear, así como presentar un patrón subnuclear característico (Jacoby *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Bird *et al.*, 2007). Un aspecto interesante a dilucidar sería estudiar la localización subcelular de la proteína ICK3/KRP3 dado que carece de este motivo y de alguna señal de localización nuclear putativa.

Hasta el momento no existe información disponible sobre las funciones de los otros motivos, sin embargo, dado que los motivos 3 y 4 solo están presentes en la clase A, mientras que los motivos 5 y 6 no se encuentran en la clase B, esto podría ser un indicio de la probable diferencia funcional entre las tres clases de la familia ICK/KRP (Torres Acosta *et al.*, 2011).

Por otra parte, este análisis mostró que solo la mitad de las secuencias analizadas contienen una señal de localización nuclear, ya sea monopartita o bipartita, a pesar de que varios estudios han demostrado que todas las proteínas ICK/KRPs analizadas experimentalmente hasta el momento, se localizan en el núcleo (Jasinski *et al.*, 2002a, 2003; Zhou *et al.*, 2003b; Bird *et al.*, 2007; Nafati *et al.*, 2010). Esto sugiere que podrían existir otras secuencias involucradas en el transporte al núcleo.

Uno de los aspectos importantes para la progresión normal del ciclo celular es la eliminación de inhibidores de CDKs en el tiempo adecuado (Schnittger *et al.*, 2003). En este sentido, se buscaron sitios putativos PEST que han sido relacionados con la degradación de ciclinas vía ubiquitina-proteosoma (Rogers *et al.*, 1986), y se encontró que la mayoría de los miembros de la familia ICK/KRP de maíz carece de esta caja, lo que sugiere que serían proteínas estables o bien su regulación podría estar dada por otros mecanismos. Hasta el momento no se conoce a gran detalle el papel que juega la degradación de los miembros de la familia ICK/KRP en el desarrollo de las plantas, no obstante, la degradación de ICK4/KRP6 e ICK5/KRP7 en Arabidopsis parece ser esencial en la gametogénesis masculina (Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Figura 3).

Otra forma de regulación que es esencial para la progresión del ciclo celular son los eventos reversibles de fosforilación y desfosforilación (Nurse, 1994), donde las ocho ICK/KRPs de maíz analizadas muestran al menos un sitio putativo de fosforilación, lo que implicaría que varias de ellas podrían ser fosforiladas, como es el caso de las ICK1/KRP4;2 e ICK2/KRP1;1, cuya fosforilación fue comprobada *in vitro*, sin embargo se desconoce si la fosforilación de ambos inhibidores se

localiza en los sitios predeterminados *in silico*. En el caso de plantas, se ha demostrado que existen diversas fosforilaciones en los miembros de la familia ICK/KRP cuya modificación postraducciona puede afectar su estabilidad o actividad. Se ha demostrado que Arath;ICK2/KRP2 puede ser fosforilada tanto por CDKA;1 como por CDKB1;1, y una mutante con menor actividad de CDKB incrementa los niveles de Arath;ICK2/KRP2, sugiriendo que la fosforilación de Arath;ICK2/KRP2 por CDKB decreta su estabilidad (Verkest *et al.*, 2005). Adicionalmente, un miembro de la familia ICK/KRP de alfalfa (KRPMt) puede ser fosforilado *in vitro* por una proteína cinasa recombinante que contiene un dominio tipo calmodulina y esta fosforilación aumenta la capacidad inhibitoria de KRPMt (Pettko-Szandtner *et al.*, 2006). De igual manera, *in vitro*, los inhibidores Arath;ICK4/KRP6 y Arath;ICK5/KRP7 son fosforilados por la proteína recombinante de una subunidad catalítica de SnRK1 (AtSnRK1 $\alpha$ 1), fosforilación que disminuye la capacidad inhibitoria de ambas proteínas (Guérinier *et al.*, 2013). Se ha descrito que AtSnRK1 participa principalmente en el control del metabolismo, balance energético, crecimiento y supervivencia de la planta (Baena-González *et al.*, 2007), lo que sugiere que SnRK1 contribuye al control de la proliferación celular mediante la fosforilación de ICK/KRPs.

## 9.2 Análisis de expresión de genes

Los patrones de expresión de la familia ICK/KRP de maíz fueron analizados con el objetivo de determinar si son genes funcionales, además de buscar si existe alguna asociación entre su expresión y ciertos tejidos, así como estudiar su patrón de expresión a lo largo de la germinación. Se detectó la presencia de transcritos de las 8 ICK/KRPs de maíz estudiadas hasta el momento en ejes embrionario en germinación y en al menos un tejido de plántulas de 14 días. Si bien el patrón de expresión entre los mismos miembros de las clases B y C no es semejante, se realizaron varias observaciones que fueron interesantes. La primera de ellas es la expresión de seis ICK/KRPs en la punta de la hoja, cuya característica principal es ser un tejido en diferenciación. Es probable que estos inhibidores estén implicados en el arresto del ciclo celular y quizás de esa manera promuevan diferenciación celular como se ha descrito en determinados tipos celulares de mamíferos. Esta sugerencia es apoyada por las observaciones de varios estudios en los que se muestra un incremento en la expresión de Arath;ICK1/KRP1 y Arath;ICK2/KRP2 cuando la progresión del ciclo celular es detenida (Menges *et al.*, 2005) y también se han visto implicadas en promover endoreduplicación cuando Arath;ICK1/KRP1 se sobre-expresa débilmente (Verkest *et al.*, 2005; Weinl *et al.*, 2004). Algunos de los procesos donde se ha estudiado la relación entre endoreduplicación y la

diferenciación celular han sido en la formación de células epidérmicas de hojas maduras (Melaragno *et al.*, 1993), durante el desarrollo del hipocótilo en donde los niveles de ploidía varían de acuerdo a las condiciones de luz (Gendreau *et al.*, 1997), así como en el desarrollo de tricomas (Larkin *et al.*, 2007) sugiere que dichos eventos pueden estar relacionados con la actividad inhibitoria de la familia ICK/KRP.

Por otra parte, siete de la ICK/KRPs estudiadas se expresan en la base de la hoja y en meristemas de raíz (con excepción de KRP1;3), dichas regiones representan tejidos proliferativos por lo que su presencia no es clara en cuanto al papel que puedan estar desarrollando en dichas regiones. No obstante, estudios realizados sobre la familia Cip/Kip de mamíferos han propuesto que dichos inhibidores también actúan como reguladores positivos de los complejos ciclina D- CDK4/6 al estabilizar estos heterodímeros (Sherr y Roberts., 1999), por lo que estas proteínas en tejidos proliferativos podrían estar desempeñando una función semejante. Otra posible especulación, es que estos inhibidores también podrían estar participando en la regulación subcelular de complejos ciclina/CDK (Sanz *et al.*, 2011) y así controlar la progresión del ciclo celular. También cabe señalar que las siete ICK/KRPs presentes en la base de la hoja fueron encontradas en coleoptilo, el cual es un órgano tipo vaina, característico de pastos y representa un buen modelo para estudiar crecimiento y elongación celular (Burstin , 2000), además de ser un tejido diferenciado. En *Arabidopsis* se ha observado que la ICK3/KRP5 promueve elongación celular en la raíz (Jégu *et al.*, 2013), por lo que probablemente la expresión de alguno o todos los genes de la familia ICK/KRP de maíz en coleoptilo podría regular este proceso.

Los transcritos de todas las ICK/KRP de maíz se presentaron en tiempos tardíos de la germinación, mientras que cinco de ellos aparecen o presentan un aumento a las 6 H, por lo que dichos genes podrían estar implicados en el control de las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular. Se ha reportado que durante la germinación de maíz, la fase S del ciclo celular comienza alrededor de las 12 horas de imbibición, tiempo en el que se observa una acumulación de PCNA y un incremento en los niveles de DNA nuclear marcado (Baíza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991; Herrera *et al.*, 2000), mientras que las células entran a la fase M después de 28 a 32 horas de imbibición, lo que concuerda con la protrusión de la radícula (Baíza *et al.*, 1989). Si bien, se ha reportado que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour y Jacquard, 1974; Masubele *et al.*, 2005), es importante señalar que el modelo de estudio no es completamente sincrónico por lo que la presencia o ausencia de transcritos en determinados tiempos de germinación puede deberse a células que se encuentren en otra fase del ciclo celular. Otro aspecto a destacar, es la presencia de transcritos de la mitad de ICK/KRPs de

maíz en semilla seca, por lo que sería conveniente determinar si estos transcritos son producto de acumulación de etapas previas de desarrollo o son sintetizados *de novo*.

Se ha reportado que los niveles de mRNA no necesariamente correlacionan con los niveles proteicos y aún menos con su actividad biológica, de tal forma que es difícil dilucidar o asignarle alguna probable función a cada uno de los miembros de la familia ICK/KRP de maíz únicamente con sus patrones de expresión. De igual forma, a pesar del progreso significativo para comprender la función que tienen los inhibidores en plantas, poco se conoce sobre las funciones específicas y sus efectos fisiológicos en plantas.

### 9.3 Inhibición de la actividad de cinasa

Uno de los puntos principales de este trabajo era determinar la funcionalidad de estos inhibidores por lo que se decidió clonar y expresar dos miembros de la familia ICK/KRP de maíz, pertenecientes a diferentes clases y con distintos patrones de expresión, con el objetivo a determinar si poseen la misma capacidad inhibitoria entre los complejos con actividad de cinasa formados por ciclinas D. Estudios anteriores han determinado que la familia ICK/KRP interacciona con ciclinas D (Wang *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002, 2003a; Jasinski *et al.*, 2002a, b, 2003; Schnittger *et al.*, 2003; Pettko-Szandtner *et al.*, 2006; Bisbis *et al.*, 2006; Jakoby *et al.*, 2006 ) e inhiben la actividad de cinasa asociada a estos complejos (Coelho *et al.*, 2005; De Jesús-Juárez *et al.*, 2008); no obstante, poco se conoce sobre la especificidad que tienen estos inhibidores sobre distintos blancos y mucho menos con complejos formados entre ciclinas del mismo tipo.

Se determinó la funcionalidad de las proteínas recombinantes ZmICK2/KRP1;1 y ZmICK1/KRP4;2 probando su efecto inhibitorio *in vitro* sobre la actividad de CDK asociada a las ciclinas D2;2 y D6;1 con extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz. Ambas proteínas ejercen un efecto inhibitorio diferencial en la actividad de cinasa dependiente de la ciclina D que este asociada. El efecto inhibitorio de la proteína ICK2/KRP1;1 sobre la actividad de cinasa asociada a ciclina D6;1 es semejante a como sucede para la cinasa asociada a ciclina D2;2 (Figura 25A y B), donde a concentraciones menores a 5 µg de proteína recombinante no existe un efecto inhibitorio. En cambio, la proteína ICK1/KRP4;2 no presenta efecto inhibitorio en ninguna de las concentraciones empleadas sobre la actividad de cinasa asociada a ciclina D6;1, diferente a lo observado para la cinasa asociada a ciclina D2;2, la cual presenta un efecto inhibitorio semejante al ejercido por la

proteína ICK2/KRP1;1 (Figura 25A y B). Estos resultados indican que algunos de los complejos ciclina D/CDK son más sensibles que otros, además de depender del tipo de inhibidor al que se enfrenten, por lo que se podría sugerir que la composición de los complejos es diferente, es decir, depende del tipo de CDK asociado a las ciclinas o bien, la especificidad del inhibidor también podría estar dada por la naturaleza de cada ciclina D.

Se ha reportado que la familia ICK/KRP puede interaccionar con ciclinas D y A, así como con CDKs tipo A en plantas, mientras que es controversial si estos inhibidores interaccionan con CDKs tipo B, ya que algunos reportes muestran resultados contradictorios en relación a esta asociación (De Veylder *et al.*, 2001; Jasinski *et al.*, 2002a; Zhou *et al.*, 2002). Probablemente la especificidad en la inhibición de la actividad de cinasa de estos complejos pueda residir en el tipo de CDK asociada a las ciclinas D, por lo que sería muy interesante determinar el efecto de estos inhibidores sobre complejos diferenciales de un tipo de ciclina D asociado a un solo tipo de CDK. Hasta el momento, se ha reportado la asociación de ciclina D2;2 de maíz a CDKA y CDKB1;1, así como su correspondiente actividad de cinasa a lo largo de la germinación en ejes embrionarios (Godínez-Palma *et al.*, 2013). En el caso de la ciclina D6;1 de maíz, datos preliminares indican su posible asociación a CDKA (datos no publicados), mientras que se desconoce su asociación a CDKB, por lo que sería importante determinar dicha interacción y evaluar el efecto de los inhibidores sobre complejos aislados de ciclina D2;2/CDK A o B y ciclina D6;1/CDK A o B.

La fosforilación es una modificación postraduccional importante en la regulación de muchas proteínas, incluidos los inhibidores. En el caso de plantas, se ha demostrado la existencia de modificación por fosforilación en los miembros de la familia ICK/KRP que pudiera afectar su estabilidad o actividad. En *Arabidopsis* se ha observado que la fosforilación de ICK2/KRP2 puede deberse a las CDKA;1 y CDKB1;1, donde la fosforilación por parte de CDKB1;1 está relacionada con la degradación del inhibidor (Verkest *et al.*, 2005).

En este trabajo se demostró la fosforilación de ambos inhibidores por parte de complejos formados con Ciclina D2;2 y Ciclina D6;1. Dicha fosforilación parece ser preferencial para ICK2/KRP1;1, sin embargo sería interesante determinar si esta fosforilación es diferencial entre complejos formados por distintas ciclinas D y por los dos tipos de CDKs involucrados en el ciclo celular en plantas. Es probable que estas fosforilaciones estén implicadas en algún paso de la regulación de ambos inhibidores, por lo que sería necesario determinar la función de dicha modificación.

## 10. Conclusiones

- El genoma de maíz contiene al menos ocho genes que codifican para ICK/KRPs y se propuso una nomenclatura que permite identificar a los candidatos de la familia génica completa en base a la identidad y relación filogenética con los genes de arroz.
- Se determinó que la familia de genes de ICK/KRPs de maíz se expresan diferencialmente a nivel de mRNA, sugiriendo una posible función en distintos procesos durante el desarrollo de la planta.
- Se determinó que el efecto inhibitorio de ICK2/KRP1;1 e ICK1/KRP4;2 no es el mismo y probablemente dependa de los complejos formados por ciclina D2;2 y D6;1 con diferentes CDKs.
- Las proteínas ICK2/KRP1;1 e ICK1/KRP4;2 son sustrato de fosforilación de complejos formados por ciclina D2;2 y D6;1 por lo que esta modificación podría ser un mecanismo de regulación postraduccional para estos inhibidores.



## 11. Perspectivas

El presente trabajo permitió la identificación de la familia completa de genes que codifican para ICK/KRPs en maíz por lo que abre un panorama mucho más complicado de la regulación del ciclo celular en maíz; sin embargo, esto abre muchas vertientes para continuar esclareciendo la función y regulación de esta familia de inhibidores.

-La expresión, a nivel de transcritos de la familia ICK/KRP de maíz parece ser diferencial entre los distintos tejidos y durante la germinación; sin embargo es importante conocer si la expresión de estos inhibidores esta determinada por fitohormonas y bajo otras condiciones ambientales, tales como distintos tipos de estrés.

-Otra forma de buscar especificidad en la función de las ICK/KRPs es estudiar sus regiones promotoras mediante la búsqueda *in silico* de elementos *cis* reguladores y su posterior confirmación experimental.

-En los siguientes trabajos será necesario conocer la regulación de dichas ICK/KRPs a nivel de proteína e interacción con otras proteínas.

- El efecto inhibitorio de ICK2/KRP1;1 e ICK1/KRP4;2 es distinto y probablemente dependa de los complejos formados por las ciclinas D2;2 y D6;1 por lo que resulta interesante determinar si otras ciclinas D presentan el mismo comportamiento. Además, será importante dilucidar si el efecto inhibitorio observado se debe al tipo de CDK asociado a la ciclina D o es independiente de esta.

-También será interesante determinar si las proteínas ICK2/KRP1;1 e ICK1/KRP4;2 son sustratos de fosforilación de complejos formados por otras ciclinas D.

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

-Las ICK/KRPs también podrían ser específicas de ciertos tipos celulares y subcelulares, por lo que será interesante investigar su presencia mediante ensayos de inmunolocalización.

## 12. Referencias Bibliográficas

- **Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007) A Central Integrator of Transcription Networks in Plant Stress and Energy Signalling. *Nature* 448: 938–42.
- **Baíza AM, 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 RM, Peres A, Droual AM, et al.** (2006). The cyclin-dependent kinase inhibitor Orysa KRP1 plays an important role in seed development of *Oryza sativa*. *Plant Physiology* 142: 1053–1064.
- **Bemis SM, Torii KU.** (2007). Autonomy of cell proliferation and developmental programs during *Arabidopsis* aboveground organ morphogenesis. *Developmental Biology* 304: 367–381.
- **Bird DA, Buruiana MM, Zhou Y, Fowke LC, Wang H.** (2007). *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase inhibitors are nuclear-localized and show different localization patterns within the nucleoplasm. *Plant Cell Reports* 26: 861–872.
- **Bisbis B, Delmas F, Joubes J, et al.** (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors regulate the CDK/cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit. *Journal of Biological Chemistry* 281: 7374–7383.
- **Bleeker PM, Hakvoort HW, Blik M, Souer E, Schat H.** (2006). Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal* 45: 917–929.
- **Boniotti MB, Griffith ME.** (2002). “Cross-Talk” between cell division cycle and development in plant. *The Plant Cell* 14, 11-16.
- **Booher RN, Alfa CE, Hyams JS, Beach DH.** (1989). The fission yeast *cdc2/cdc13/suc* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58: 485-497
- **Bourdon M, Frangne N, Mathieu-Rivet E, Nafati M, Cheniclet C, Renaudin JP, Chevalier C.** (2010). Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. *Progress in Botany* 71: 101-132.
- **Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A.** (1995). *Nature* 374: 386-388.
- **Cheng Y, Cao L, Wang S, Li Y, Shi X, Liu H, Li L, Zhang Z, Fowke LC, Wang H, Zhou Y.** (2013). Down-regulation of multiple CDK inhibitor *ICK/KRP* genes up-regulates E2F pathway and increases cell proliferation, organ and seed sizes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. ‘Accepted Article’, doi: 10.1111/tpj.12228.

- **Churchman ML, Brown ML, Kato N, et al.** (2006). SIAMESE, a plant specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3145–3157.
- **Ciemerych MA, Sicinski P.** (2005). Cell cycle in mouse development. *Oncogene* 24: 2877-2898.
- **Cleary AL, Fowke LC, Wang H, John PCL.** (2002). The effect of ICK1, a plant cyclin-dependent kinase inhibitor, on mitosis in living plant cells. *Plant Cell Reports* 20: 814–820.
- **Coelho CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins A.** (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiology* 238: 2323-2336.
- **Coqueret O.** (2003). New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment. *Trends in Cell Biology* 13: 65-70.
- **De Veylder L, Beekman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, Van der Shueren E, Maes S, Naudts M, Inzé D.** (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 1653-1667.
- **Dewitte W, Murray JAH.** (2003). The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54: 235-264
- **Dissmeyer N, Weimer AK, Pusch S, De Schutter K, Alvim CL, Nowack M, 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. *The Plant Cell* 21: 3641-3654.
- **Gendreau E, Höfte H, Grandjean O, Brown S, Traas J** (1998) Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant Journal* 13:221–230
- **Godínez-Palma SK, García E, Sánchez MP, Rosas F, Vázquez-Ramos JM.** (2013) Complexes of D-Type Cyclins with CDKs during Maize Germination. *Journal of Experimental Botany* 64: 5661–71
- **Guérinier T, Millan L, Crozet P, Oury C, Rey F, Valot B, Mathieu C, Vidal J, Hodges M, Thomas M, Glab N.** (2013). Phosphorylation of p27Kip1 homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. *The Plant Journal* 75: 515 – 525.
- **Herrera I, Sánchez MP, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM** (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize. Regulation by phytohormones during seed development and germination and its association with a putative cyclin D protein. *Physiologia Plantarum* 110: 127-134

- **Jakoby MJ, Weini C, Pusch S, et al.** (2006). Analysis of the subcellular localization, function and proteolytic control of the Arabidopsis CDK inhibitor ICK1/KRP1. *Plant Physiology* 141: 1293–1305.
- **Jasinski S, Perennes C, Bergounioux C, Glab N.** (2002b). Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. *Plant Physiology* 130: 1871–1882.
- **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. *Journal of Cell Science* 115: 973–982.
- **Jasinski S, Saraiva L, Perennes C, et al.** (2003). NtKIS2, a novel tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor is differentially expressed during the cell cycle and plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 503–676.
- **Jégu T, Latrassé D, Delarue M, Mazubert C, Bourge M, Hudik E, Blanchet S, Soler M-N, Charon C, De Veylder L, Raynaud C, Bergounioux C and Benhamed M.** Multiple functions of KRP5 connect endoreduplication and cell elongation. *Plant Physiology*. 161(4): 1694-705
- **Kang J, Mizukami Y, Wang H, Fowke L, Dengler NG.** (2007). Modification of cell proliferation patterns alters leaf vein architecture in Arabidopsis thaliana. *Planta* 226: 1207–1218.
- **Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, et al.** (2008). Control of plant germline proliferation by SCF (FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* 455: 1134–1137.
- **Klug SW, Cumming MR.** (1999). Conceptos de genética. Ed. Prentice Hall, Madrid, pp 43.
- **Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H.** (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *PNAS* 106: 10171 - 10176
- **Kondorosi, E., Roudier, F., and Gendreau, E.** (2000). Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 488–492.
- **Lacy ER, Filippov I, Lewis WS, Oieno S, Xiao L, Hengst L, Kriwacki RW.** (2004). *Nature Structural & Molecular Biology* 11: 358-367.
- **Landrieu I, da Costa M, De Veylder L, et al.** (2004). A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101:13380–13385.

- **Larkin JC, Brown ML, Churchman ML.** (2007) Insights into the endocycle from trichome development. In: Inzé D (ed) Cell cycle control and plant development. *Annual plant reviews*, vol 32: 249–268.
- **Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y.** (2001). Investigating the how and why of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* 52: 183-192.
- **Leibovitch MP, Kannengiesser C, Leibovitch SA.** (2003). Signal-induced ubiquitination of p57<sup>kip2</sup> is independent of the C-terminal consensus CDK phosphorylation site. *FEBS letters* 543: 125-128.
- **Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta S, Kebrom T, Provart N, Patel R, Myers C, Reidel E, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell P.** (2010). The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature Genetics* 42: 1060–1067.
- **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 Journal* 21: 379–385.
- **Malumbres M, Barbacid M.** (2005). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Review Cancer* 1: 221-231.
- **Masubele 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 National Academy of Sciences of USA* 102: 15694 – 15699.
- **Meijer M, Murray, JA.** (2000). The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology* 43: 621-633.
- **Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW.** (1993) Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of Arabidopsis. *Plant Cell* 5:1661–1668
- **Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JAH** (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
- **Murray WA.** (2004). Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* 116: 221-234.
- **Nafati M, Frangne N, Hernould M, Chevalier C, Ge'vaudant F.** (2010). Functional characterization of the tomato cyclin-dependent kinase inhibitor SIKRP1 domains involved in protein–protein interactions. *New Phytologist* 188: 136–149.

- **Nakai T, Kato K, Shinmyo A, Sekine M.** (2006). Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Letters* 580: 336–340.
- **Nurse P.** (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547 – 550.
- **De Jesús N, Mancilla A, García, Vázquez-Ramos JM.** (2008) Expression and activity of a Kip-related protein, Zeama;KRP1, during maize germination. *Seed Science Research* 18: 67–75
- **Deltour R, Jacquard A.** (1974). Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays L.* *Annals of Botany* 102: 425-433
- **Ormenese S, de Almeida Engler J, De Groodt R, De Veylder L, Inzé D, Jacquard A** (2004) Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* **93**: 575-580
- **Pei X-HW, Xiong Y.** (2005). Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 24: 2787-2795.
- **Peres A, Churchman ML, Hariharan S, et al.** (2007). Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *Journal of Biological Chemistry* 282: 25588–25596.
- **Pettko-Szandtner A, Meszaros T, Horvath GV, et al.** (2006). Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant Journal* 46: 111–123.
- **Pines J.** (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal* 308: 697–711.
- **Plavletich NP.** (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structure Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 287: 821-828.
- **Ramírez-Parra E, Frundt C, Gutiérrez C.** (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *The Plant Journal* 33: 801- 811.
- **Rank KB, Evans DB, Sharma SK.** (2000). The N-terminal domains of cyclin-dependent kinase inhibitory protein block the phosphorylation of cdk2/cyclin E by the CDK-activating kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271: 469-473.
- **Renaudin J-P, Donan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi H, Rouzé P, Sauter M, Saviouré A, Sorrel DA, Sundaresan, Murray JAH.** (1996). Plant

cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology* 32: 1003-1018.

- **Reyes J, Jiménez-García LF, González M, Vázquez-Ramos JM** (1991) Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Research* 1; 113-117
- **Rogers S, Wells R, Rechsteiner M.** (1986). Amino Acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364–368.
- **Ruggiero B, Koiwa H, Manabe Y, Quist TM, Inan G, Saccardo F, Joly RJ, Hasegawa PM, Bressan RA, and Maggio A.** (2004). Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **136**: 3134–3147. doi:10.1104/pp.104.046169.
- **Sanz L, Dewitte W, Forzani C, Patell F, Nieuwland J, Wen B, Quelhas P, De Jager S, Titmus C, and Campilho A.** (2011). The Arabidopsis D-type cyclin CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *Plant Cell*, **23**, 641-660.
- **Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddelloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H,**

- Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK.** (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-1115
- **Schnittger A, Weigl C, Bouyer D, Schobinger U, Hulskamp M.** (2003). Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1 in single-celled Arabidopsis trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell* 15: 303–315.
  - **Sekhon R, Lin H, Childs K, Hansey C, Buell C, de Leon N, Kaeppler S.** (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* 66: 553-563.
  - **Sherr CJ, Roberts JM.** (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* 13: 1501-1512.
  - **Stals H, Inzé D.** (2001). When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science* 6: 359-364.
  - **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
  - **Torres-Acosta JA, Fowke LC, Wang H.** (2011). Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Annals of Botany* 107: 1141–1157.
  - **Traas, J., Hulskamp, M., Gendreau, E., and Hofte, H.** (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr.Opin. Plant Biol.* 1: 498–503.
  - **Vanderpoole K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inés D.** (2002). Genome wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* 14: 903-916.
  - **Vázquez-Ramos J, Sánchez M.** (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* 13: 113-130.
  - **Verkest A, Weigl C, Inzé D, De Veylder L, Schnittger A.** (2005). Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiology* 139: 1099-1106.
  - **Vidal A, Koff A** (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247: 1-15.
  - **Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang W, Atman N, dePamphilis CW, Ma H.** (2004). Genome-Wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of the plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology* 135: 1084-1099.
  - **Wang H, Fowke LC, Crosby WL.** (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 386: 451–452.



- **Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC.** (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant Journal* 15: 501–510.
- **Wang H, Zhou Y, Fowke LC.** (2006). The emerging importance of cyclin dependent kinase inhibitors in the regulation of the plant cell cycle and related processes. *Canadian Journal of Botany* 84: 640–650.
- **Wang H, Zhou Y, Torres-Acosta L, Fowke LC.** (2007). CDK inhibitors. In: Inze D, ed. Cell cycle control and plant development. *Oxford: Blackwell Publishing*: 62–86.
- **Weinl C, Marquardt S, Kuijt SJH, et al.** (2005). Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* 17: 1704–1722.
- **Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X.** (2008). GPS 2.0: Prediction of Kinase-Specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7: 1598- 1608.
- **Yang R, Tang Q, Wang H, Zhang X, Pan G, Wang H, Tu J.** (2011). Analyses of two rice (*Oryza sativa*) cyclin-dependent kinase inhibitors and effects of transgenic expression of OsICK6 on plant growth and development. *Annals of Botany* 107: 1087-1101.
- **Zhang WK, Shen Y-G, He X-J, Du B-X, Xie Z-M, Luo G-Z, Zhang J-S, Chen S-Y.** (2005). Characterization of a novel cell cycle-related gene from *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*: 1-10.
- **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.
- **Zhou Y, Niu H, Brandizzi F, Fowke L, Wang H.** (2006). Molecular control of nuclear and subnuclear targeting of the plant CDK inhibitor ICK1 and ICK1-mediated nuclear transport of CDKA. *Plant Molecular Biology* 62: 261–278.
- **Zhou Y, Wang H, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC.** (2003a). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 604–613.
- **Zhou Y, Li G, Brandizzi F, Fowke LC, Wang H.** (2003b). The plant cyclin- dependent kinase inhibitor ICK1 has distinct functional domains for in vivo kinase inhibition, protein instability and nuclear localization. *Plant Journal* 35: 476 – 489.

### 13. Anexos

**Anexo 1.** Números de acceso de ICK/KRPs reportadas de Arabidopsis thaliana TAIR-The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org>) y arroz NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Planta	Nombre	Número de acceso	Fuente
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arath; ICK1/KRP1	Q67Y93	TAIR
	Arath; ICK2/KRP2	Q9SCR2	TAIR
	Arath; ICK3/KRP5	Q9LRY0	TAIR
	Arath; ICK4/KRP6	Q0WNX9	TAIR
	Arath; ICK5/KRP7	Q94CL9	TAIR
	Arath; ICK6/KRP3	Q9FKB5	TAIR
	Arath; ICK7/KRP4	Q8GYJ3	TAIR
<i>Oryza Sativa (subesp. Japonica)</i>	Oryza; KRP1	ABB70058	NCBI
	Oryza; KRP2	ABB70059	NCBI
	Oryza; KRP3	ABB70060	NCBI
	Oryza; KRP4	ABB70061	NCBI
	Oryza; KRP5	ABB70062	NCBI
	Oryza; KRP6	ACT53244	NCBI

**Anexo 2.** Números de acceso en Maize Sequence Database que corresponden a cada ICK/KRP de maíz.

ICK/KRP	Número de acceso en Maize Sequence	Clona	Ubicación	Longitud (aa)
<b>ICK2/KRP1;1</b>	GRMZM2G101613_P01	AC210721.4-Contig34	Chromosome 5: 209,721,762-209,723,507 forward strand	253
<b>KRP1;2</b>	GRMZM2G084570_P01	AC183914.3-Contig55	Chromosome 4: 178,744,162-178,745,897 reverse strand.	263
<b>KRP1;3</b>	GRMZM2G343769_P01	AC209339.3-Contig23	Chromosome 9: 7,869,191-7,870,616 forward strand.	275
<b>KRP3</b>	GRMZM2G154414_P01	AC210175.3-Contig24	Chromosome 4: 5,405,531-5,406,955 reverse strand.	216
<b>ICK4/KRP4;1</b>	GRMZM2G037926_P01	AC210175.3-Contig25	Chromosome 5: 29,621,966-29,625,374 reverse strand.	192
<b>ICK1/KRP4;2</b>	GRMZM2G116885_P01	AC185516.3-Contig28	Chromosome 1: 232,918,113-232,921,288 forward strand.	190
<b>ICK3/KRP5;1</b>	GRMZM2G358931_P02	AC194161.3-Contig105	Chromosome 9: 151,985,979-151,989,464 forward strand.	215
<b>KRP5;2</b>	GRMZM2G157510_P01	AC194863.3-Contig103	Chromosome 1: 8,447,465-8,451,013 forward strand.	213

**Anexo 3.** Matriz de identidad entre las secuencias proteicas de ICK/KRPs de maíz, arroz y Arabidopsis.

En rojo se resalta el mayor porcentaje de identidad de cada ICK/KRP con su ortólogo respectivo. En negro se resalta el mayor porcentaje de identidad entre cada ICK/KRP de maíz con sus respectivos parálogos.

	<i>Zeama;</i> <i>KRP1;1/ICK2</i>	<i>Zeama;</i> <i>KRP1;2</i>	<i>Zeama;</i> <i>KRP1;3</i>	<i>Zeama;</i> <i>KRP3</i>	<i>Zeama;</i> <i>KRP4;1</i>	<i>Zeama;</i> <i>KRP4;2/ICK1</i>	<i>Zeama;</i> <i>KRP5;1</i>	<i>Zeama;</i> <i>KRP5;2/ICK3</i>
<i>Arath;KRP1</i>	11.6%	11.5%	14.8%	15.4%	14.4%	14.0%	15.1%	15.5%
<i>Arath;KRP2</i>	12.2%	12.2%	12.7%	13.3%	14.6%	15.0%	14.8%	15.3%
<i>Arath;KRP3</i>	20.2%	19.2%	19.5%	15.1%	32.3%	30.3%	34.8%	33.8%
<i>Arath;KRP4</i>	16.9%	17.9%	16.3%	11.4%	28.3%	27.6%	30.0%	30.0%
<i>Arath;KRP5</i>	15.8%	14.0%	16.3%	13.6%	28.0%	25.3%	24.2%	24.1%
<i>Arath;KRP6</i>	11.1%	12.6%	14.5%	13.0%	14.3%	12.1%	15.8%	16.7%
<i>Arath;KRP7</i>	11.2%	12.3%	13.9%	15.0%	16.8%	14.1%	16.9%	17.0%
<i>Oryza;KRP1</i>	<b>58.5%</b>	<b>57.0%</b>	<b>38.7%</b>	15.7%	18.9%	18.6%	20.6%	20.9%
<i>Oryza;KRP2</i>	25.2%	23.7%	24.4%	17.3%	15.9%	14.1%	16.9%	16.9%
<i>Oryza;KRP3</i>	17.2%	17.3%	19.4%	<b>31.8%</b>	11.4%	11.9%	12.7%	12.7%
<i>Oryza;KRP4</i>	20.2%	18.5%	19.8%	15.8%	<b>62.7%</b>	<b>60.2%</b>	50.6%	49.7%
<i>Oryza;KRP5</i>	23.5%	21.9%	20.8%	12.4%	52.2%	49.5%	<b>69.7%</b>	<b>68.5%</b>
<i>Oryza;KRP6</i>	11.4%	10.2%	9.8%	11.5%	7.8%	6.9%	8.1%	8.1%
<i>Zeama;KRP1;1</i> <i>/ICK2</i>	ID	<b>73.9%</b>	37.4%	12.6%	20.8%	20.5%	22.3%	21.1%
<i>Zeama;KRP1;2</i>	<b>73.9%</b>	ID	36.8%	14.0%	20.5%	19.4%	21.0%	20.0%
<i>Zeama;KRP1;3</i>	<b>37.4%</b>	36.8%	ID	14.6%	18.4%	18.4%	19.3%	18.4%
<i>Zeama;KRP3</i>	12.6%	14.0%	14.6%	ID	<b>15.9%</b>	<b>15.9%</b>	13.1%	14.3%
<i>Zeama;KRP4;1</i> <i>/ICK4</i>	20.8%	20.5%	18.4%	15.9%	ID	<b>82.8%</b>	52.0%	51.3%
<i>Zeama;KRP4;2</i> <i>/ICK1</i>	20.5%	19.4%	18.4%	15.9%	<b>82.8%</b>	ID	50.2%	49.5%
<i>Zeama;KRP5;1</i>	22.3%	21.0%	19.3%	13.1%	52.0%	50.2%	ID	<b>88.4%</b>
<i>Zeama;KRP5;2</i> <i>/ICK3</i>	21.1%	20.0%	18.4%	14.3%	51.3%	49.5%	<b>88.4%</b>	ID

## Anexo 4. Motivos conservados en secuencia.

### Motivo 1

```

Arath;KRP1  FKKKYNFDPEKQEPLEGG--RREWVKQNP-----
Arath;KRP2  CSMKYNFDPEKQEPLEGG--RREWVKQNP-----
Arath;KRP3  FMEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVQKQP-----
Arath;KRP4  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQDD-----
Arath;KRP5  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQMP-----
Arath;KRP6  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQMP-----
Arath;KRP7  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQMP-----
Oryza;KRP1  FAKKYNFDVVRGVPLDAG--RREWVTPVSSRS-----
Oryza;KRP2  FAKKYNFDVVRGVPLDAGGAGREWTA--GSG-----
Oryza;KRP3  FAEKYNFDIALRPLGG--RREWEPTVPNFDVAKDVTDM
Oryza;KRP4  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQDD-----
Oryza;KRP5  FREKYNFCPVNQPPLSG--RREWVTRDC-----
Oryza;KRP6  FAKKYNFDIVKQAPLDC--RREWVTRDP-----
GRMZM2G101613 KRP1;1  FASKYNFDVVRGVPLDAGG--RREWVAPVSI-----
GRMZM2G084570 KRP1;2  FASKYNFDVVRGVPLDAG--RREWVTPGVSI-----
GRMZM2G343769 KRP1;3  FASKYNFDVARGPLDAG--RREWVTPVSGW-----
GRMZM2G154414 KRP3  FAEKYNFDIALRPLGG--RREWVTPVLTGGRRW-----
GRMZM2G037926 KRP4;1  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQDD-----
GRMZM2G116885 KRP4;2  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQDD-----
GRMZM5G804137 KRP4;3*  FIEKYNFDIVNQPPLSG--RREWVKQDD-----
GRMZM2G358931_P02 KRP5;1  FREKYNFCPVNQPPLSG--RREWVTRDC-----
GRMZM2G157510 KRP5;2  FREKYNFCPVNQPPLSG--RREWVTRDC-----

```

Motivo1 Consenso **FKKKYNFDPEKQEPLEGG--RREWVKQNP-----**

### Motivo 2

```

Arath;KRP1  MPTSEIIEIDFFVEAEKQL
Arath;KRP2  TVKAELEIDFFQVAEKDL
Arath;KRP3  IETTSEMEEFFAYAEQQQ
Arath;KRP4  RPTTPEMDEFFFCABEEQ
Arath;KRP5  --IQSEIIEIDFFSABEQQQ
Arath;KRP6  TETAAEIIEIDFFSELSSQD
Arath;KRP7  SPTQAELEIDFFSABERYE
Oryza;KRP1  ITPPAABIEIAFFAAAEAE
Oryza;KRP2  PAAAAEIEEFLAAERSE
Oryza;KRP3  SPEAEIEIAFFAAELAE
Oryza;KRP4  IPASAEIEIAFFAAEQORQ
Oryza;KRP5  VPSSLEMEEFFFAAEQQQ
Oryza;KRP6  ---EBEVEAFLAAESSV
GRMZM2G101613 KRP1;1  VTPPAHEIQEFFFABAAQ
GRMZM2G084570 KRP1;2  VTPPAEQIQEFFFABAAH
GRMZM2G343769 KRP1;3  TTPABEIEQFFAAEKAQ
GRMZM2G154414 KRP3  PPTETEIEIAFFDAELAE
GRMZM2G037926 KRP4;1  IPSSTEIEIEIAEARRQ
GRMZM2G116885 KRP4;2  VPSSREIEIEIAEARRQ
GRMZM5G804137 KRP4;3*  IPSSREIEIEIAEARRQ
GRMZM2G358931_P02 KRP5;1  IPSSLEMEEFFFAAEQQE
GRMZM2G157510 KRP5;2  IPSSLEMEEFFFAAEQQE

```

Motivo2 Consenso **MPTSEIIEIDFFVEAEKQL**

### Motivo 5

```

Arath;KRP3  VCTREITPCNFVEDMEIMVTPGSSSTRS
Arath;KRP4  RITREITPCSLIRRPEIMVTPGSSSTRS
Oryza;KRP4  RNTREITPCSLIRDPDITSTPGSSSTRS
Oryza;KRP5  RSTREITPCSLIRSSSEMISTPGSSSTRS
GRMZM2G037926 KRP4;1  RNTREITPCSLIN-SEMISTPGSSSTRS
GRMZM2G116885 KRP4;2  RITREITPCSLIN-TOMISTPGSSSTRS
GRMZM2G358931_P02 KRP5;1  RSTREITPCSLIRNPEIMISTPGSSSTRS
GRMZM2G157510 KRP5;2  MSTREITPCSLIRNPEIMISTPGSSSTRS

```

Motivo 5 Consenso **RCTREITPCNFXRXXEEXXTPGSSSTRS**

### Motivo 6

```

Oryza;KRP4  VSGGENVLELD
Oryza;KRP5  VSG-ENVLELD
GRMZM2G037926 KRP4;1  ASYG-ENVLESE
GRMZM2G116885 KRP4;2  ASYG-ENVLELD
GRMZM2G358931_P02 KRP5;1  VSG-ENVLELD

```

GRMZM2G157510 KRP5;2

VSG-ENVLELD

Motivo 6 Consenso

VSG-ENVLELD

### Motivo 7

```

Arath;KRP1  YLQLRSRRLVYVR
Arath;KRP3  YLQLRSRRLKPS
Arath;KRP4  YLQLRSRRLKQP
Arath;KRP5  YLQLRSRRLVGLP
Oryza;KRP1  YLQLRSRRLFMAP
Oryza;KRP2  YLQLRSRRLPFV
Oryza;KRP3  YLQLRSRRLVPA
Oryza;KRP4  YLQLRSRRLK
Oryza;KRP5  YLQLRSRRLKPP
GRMZM2G101613 KRP1;1  YLQLRSRRLFMAP
GRMZM2G084570 KRP1;2  YLQLRSRRLFMMA
GRMZM2G343769 KRP1;3  YLQLRSRRLFLP
GRMZM2G037926 KRP4;1  YLQLRSRRLK
GRMZM2G116885 KRP4;2  YLQLRSRRLK
GRMZM2G358931_P02 KRP5;1  YLQLRSRRLKPP
GRMZM2G157510 KRP5;2  YLQLRSRRLKPH

```

Motivo 7 Consenso

YLQLRSRRLKPP

### Motivo 8

```

Arath;KRP3  GVRTRAAKTLA
Arath;KRP4  GVLTRASLAL
Arath;KRP5  GVRTRAAAKN
Oryza;KRP1  GVRTRSSAAA
Oryza;KRP2  GVRTRAAVTAR
Oryza;KRP4  GVRTRASLAL
Oryza;KRP5  GVRTRRTLAL
GRMZM2G037926 KRP4;1  GVRTRAPALAL
GRMZM2G116885 KRP4;2  GVRTRAPALAL
GRMZM2G358931_P02 KRP5;1  GVRTRSRRLAL
GRMZM2G157510 KRP5;2  GVRTRSRRLAL

```

Motivo 8 Consenso

GVRTRAXXAL

### Motivo 9

```

Arath;KRP3  MGKYMRRKSK
Arath;KRP4  MGKYMRRKSK
Arath;KRP5  MGKYMRRKSK
Oryza;KRP1  MGKYMRRKSK
Oryza;KRP2  MGKYMRRKSK
Oryza;KRP3  MGKYMRRSSC
Oryza;KRP4  MGKYMRRKAK
Oryza;KRP5  MGKYMRRKSK
GRMZM2G101613 KRP1;1  MGKYMRRKSK
GRMZM2G084570 KRP1;2  MGKYMRRKSK
GRMZM2G343769 KRP1;3  MGKYMRRKSK
GRMZM2G037926 KRP4;1  MGKYMRRKSK
GRMZM2G116885 KRP4;2  MGKYMRRKSK
GRMZM2G358931_P02 KRP5;1  MGKYMRRKSK
GRMZM2G157510 KRP5;2  MGKYMRRKSK

```

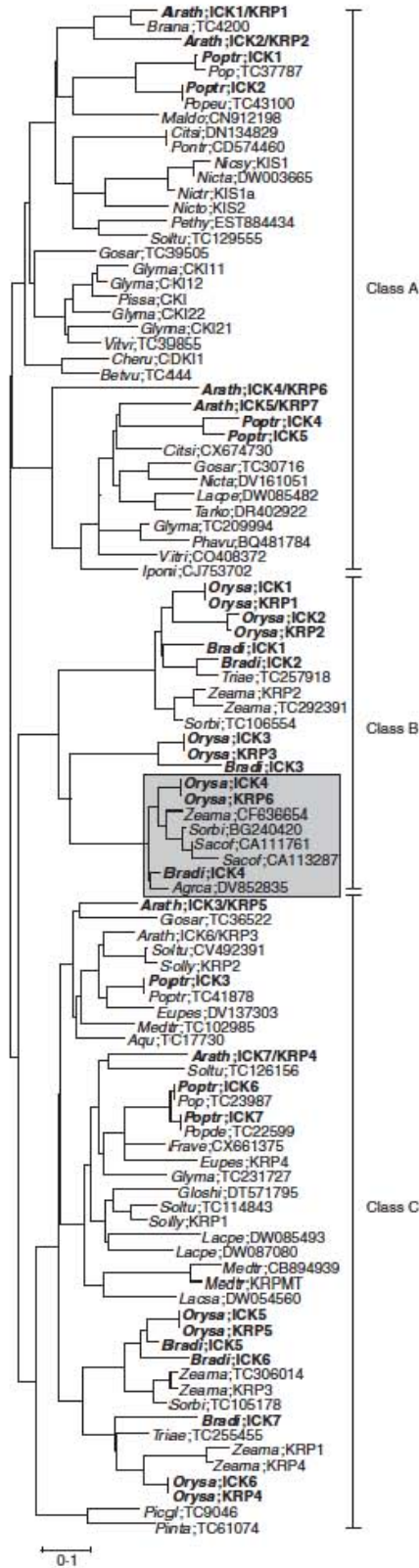
Motivo 9 Consenso

MGKYMRRKSK

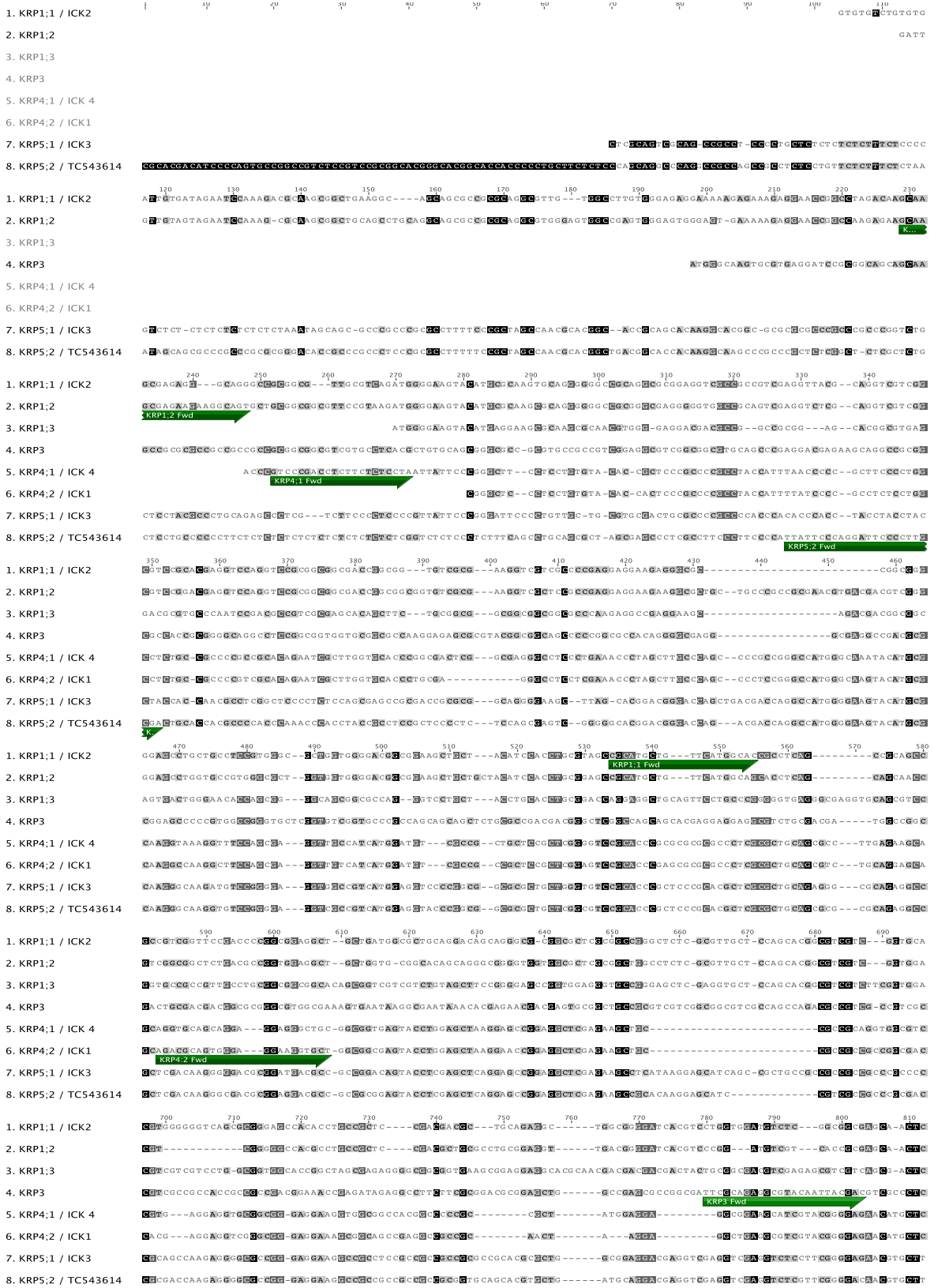
**Anexo 5.** Sitios funcionales putativos encontrados en las secuencias proteicas de la familia ICK/KRP de maíz.

ICK/KRP	NLS monopartita (aa, Score)	NLS Bipartita (aa, Score)	PEST potencial (aa, score)	PEST pobre (aa, score)	Sitios de fosforilación por CDKs putativos (aa)
KRP1;1	---	46 - 75 ( 5.0)	---	76 - 114 (-8.50), 50 - 72 (-15.34), 188 - 208 (-7.08), 145 - 162 (-10.05)	T92, S117,T168, S171, T197
KRP1;2	---	5 - 33 (5.9)	---	87 - 124 (-19.21), 197 - 232 (-2.65), 51 - 82 (-15.21), 152- 168 (-4.60), 140- 152 (0.65)	T102, S127, T173, T174, S202, S203, T258
KRP1;3	4 - 13 (12.0)	---	187 - 203 (7.28)	118-140 (-9.00), 26 -45 (-14.78), 101 -118 (1.12), 224-241 (-4.81)	T16, S121, T178, S181, T226, T269
KRP3	---	---	145 - 182 (7.73)	31 - 44 (-4.30), 202 - 214 (-20.56)	S11, S42, S71, S85, T154, S156, S158, S160
KRP4;1	---	---	---	78 - 106 (-4.55), 109 - 130 (4.63), 9 - 27 (-22.80), 145 - 162 (-6.71)	T112, S123, T124
KRP4;2	---	---	---	108 - 128 (4.05), 9-27 (-22.80)	T111, S122, T123
KRP5;1	---	5 - 34 (5.2)	---	167 - 188 (-3.58), 9 - 28 (-24.74), 135 - 148 (2.18)	T129, S141, T142, T151, S152, S154
KRP5;2	---	---	---	165-186 (-3.58), 9 - 28 (-25.29)	S72, T125, S137, T138, S141, T147, S148, S149, T161

**Anexo 6.** Árbol filogenético de la familia ICK/KRP de 40 distintas especies de plantas (Torres-Acosta *et al.*, 2011)



## Anexo 7. Alineamiento de los cDNAs de la familia ICK/KRP de maíz para el diseño de primers.







**Anexo 8.** Vectores empleados para la clonación de KRP1;1 y KRP4;2. **A- B,** Clonación de KRP1;1 y KRP4;2 en el vector de expresión pAL7 (proteína recombinante fusionada a etiqueta de *Profinity*). **C-D,** Clonación de KRP1;1 y KRP4;2 en el vector de expresión pGEX4T2 (proteína recombinante fusionada a GST). **E-F,** Clonación de KRP1;1 y KRP4;2 en el vector de expresión pPROEX HTb (proteína recombinante fusionada a etiqueta de Histidinas).

