



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto de fitohormonas sobre los niveles de la proteína
ZmCycD6; 1 y la actividad cinasa asociada, en la
germinación

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Pablo González Orozco



Ciudad Universitaria, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS
VOCAL: DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO
SECRETARIO: DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG
1ER. SUPLENTE: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
2° SUPLENTE: DRA. LAURA CARMONA SALAZAR

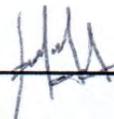
SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
LABORATORIO 114, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO
"E", FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

ASESOR DEL TEMA

DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS _____

SUPERVISOR TÉCNICO

DRA. SILVIA KARINA GODÍNEZ PALMA _____



SUSTENTANTE

PABLO GONZÁLEZ OROZCO _____

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica y la infinidad de oportunidades que brinda para nuestro crecimiento intelectual y humano. Siempre llevaré con orgullo sus colores, y donde quiera que esté, pondré su nombre en alto.

A la Facultad de química y a todos sus profesores, por hacerme concebir el universo de una forma distinta y por hacerme descubrir mi vocación.

A los programas PAPIIT (215316), PAIP (5000-9124) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; CB260661) por el financiamiento del proyecto, y ésta última además, por la beca otorgada como ayudante de investigador.

A los miembros del jurado, Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos, Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig, por la dirección del proyecto, por el tiempo dedicado y las críticas para la mejora de mi trabajo.

Al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos por la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por guiarme en mi formación académica y científica. Gracias por confiar en mi.

A los doctores Aurora Lara, Elpidio García y Silvia Godínez por su valiosa instrucción, apoyo, críticas y consejos durante mi formación en el laboratorio al realizar este proyecto.

Índice

1.0	Introducción	6
1.1	El maíz	6
1.2	La semilla del maíz	7
1.3	Germinación	9
1.4	Ciclo celular	11
1.5	Regulación del ciclo celular	14
1.5.1	Cinasas dependientes de ciclinas (CDK)	14
1.5.2	Ciclinas	15
1.5.3	Otros reguladores del ciclo celular	17
1.5.4	Via RBR/E2F-DP	17
1.6	Fitohormonas	19
2.0	Antecedentes	21
2.1	Ciclina D6;1	22
3.0	Justificación	23
4.0	Hipótesis	24
5.0	Objetivos	24
5.1	Objetivo general	24
5.2	Objetivos particulares	24
6.0	Materiales y métodos	24
6.1	Imbibición de ejes embrionarios	24
6.2	Extracción y cuantificación de proteína	25
6.3	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y western blot	26
6.4	Inmunoprecipitación	27
6.5	Actividad de cinasa	27
7.0	RESULTADOS	28
7.1	Patrón de abundancia de CycD6;1 en ausencia o presencia de fitohormonas durante la germinación	28
7.2	Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre histona H1 y RBR-Ct	32
8.0	Discusión de resultados	37
8.1	Patrón de abundancia de CycD6;1 en ausencia y presencia de fitohormonas	37
8.2	Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 en ausencia y presencia de fitohormonas	44
9.0	Conclusiones	50
10.0	Referencias	50

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
AtCycD6; 1	Ciclina D6; 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BA	Benciladenina
CAK	Cinasa activadora de CDK
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
Cyc	Ciclina
DP	Proteína de dimerización
E2F	Factor de unión al promotor E2
GST-Ct-RBR	Carboxilo terminal de RBR fusionada a GST
IAA	Ácido indol-3-acético
KRP	Kip related protein
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
RB	Proteína de Retinoblastoma
RBR	Proteína relacionada a RB
ZmCycD6; 1	Ciclina D6; 1 de maíz

Índice de figuras

Figura 1	Plantación de maíz en Sonora, México
Figura 2	Anatomía de la semilla de maíz
Figura 3	Eventos metabólicos asociados a la germinación
Figura 4	Modelo del ciclo celular en eucariotes
Figura 5	Regulación de los complejos ciclinas-CDKs
Figura 6	Estructura de RBR y su interacción con E2F-DP
Figura 7	Estructura química de las fitohormonas ABA e IAA
Figura 8	Inmunodetección y densitometría de CycD6; 1 en ausencia de fitohormonas
Figura 9	Inmunodetección y densitometría de CycD6; 1 en presencia de ABA
Figura 10	Inmunodetección y densitometría de CycD6; 1 en presencia de IAA
Figura 11	Densitometría de la CycD6; 1 en ausencia y presencia de ABA e IAA
Figura 12	Control de inmunoprecipitación de la CycD6; 1
Figura 13	Actividad de cinasa asociada a la CycD6; 1 sobre histona H1
Figura 14	Actividad de cinasa asociada a la CycD6; 1 sobre RBR

Efecto de fitohormonas sobre los niveles de la proteína ZmCycD6;1 y la actividad cinasa asociada, en la germinación

1.0 Introducción

1.1 El maíz

El maíz (*Zea mays*) es una planta originaria de las regiones del centro y sur de México. Mediante estudios arqueológicos se ha estimado que esta especie surgió hace alrededor de 6,000 años (Piperno & Flannery, 2001). Se tiene la teoría de que los antiguos pobladores de la región del Valle de México, y sus nacientes prácticas agrícolas, fueron quienes seleccionaron las semillas más grandes y más productivas de una planta silvestre llamada teocintle

(*Zea mays ssp. parviglumis*); con el paso del tiempo esta selección artificial dio origen al maíz como hoy lo conocemos (Beatle, 1980; Doebley *et al.*, 1990).

El maíz es una planta con gran valor cultural en Mesoamérica, en el pasado fue tan importante para las



Figura 1. Plantación de maíz en Sonora, México. Foto por A. Maximiliano Arana Moreno, 2017.

civilizaciones que inclusive en algunas como la Maya era considerado una divinidad, pues tenían la creencia de que los dioses habían dado origen a los primeros hombres a partir del maíz (Recinos, 1979). El maíz se convirtió en la base de alimentación de los pueblos prehispánicos, y de hecho, lo sigue siendo de nuestra sociedad moderna, pues por si

fuera poco, México es el país que más consume este cereal en todo el mundo (Aquino et al., 2000).

Los registros demuestran que, a partir del año 1998, el maíz superó al trigo y se colocó como el cereal con mayor producción a nivel mundial y en el año 2013 alcanzó más de mil millones de toneladas (FAO, 1998 y 2013). Esto lo convierte en una planta con gran valor económico para nuestra región y para el mundo entero. Adicionalmente, el maíz también ha cobrado importancia en la ciencia; durante muchos años el estudio de la biología, bioquímica y genética vegetal se ha basado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, desde hace unas décadas se han comenzado a adoptar nuevos modelos vegetales como trigo, arroz, tabaco, frijol, alfalfa, maíz, etc., los cuales tienen en común ser plantas con valor comercial (a diferencia de *Arabidopsis*), por lo que ha cobrado importancia su estudio.

En términos biológicos el maíz (*Zea mays*) es una planta vascular que cuenta con raíz, tallo y hojas. Desarrolla flor, lo cual la clasifica en la división Magnoliophyta. El maíz produce y se desarrolla a partir de semillas (Spermatophyta), pertenece a la clase Lilipsida lo cual significa que presenta sólo un cotiledón en su eje embrionario (por eso denominada una planta monocotiledónea) y se clasifica en la familia Poaceae, a la cual también pertenecen el trigo, el arroz, la caña de azúcar, etc. (Consultado en USDA).

1.2 La semilla del maíz

Las semillas se desarrollan a partir de la fertilización de los óvulos de la planta, son la estructura reproductiva y en ella se encuentra todo lo necesario para el desarrollo de un nuevo organismo, por lo que juegan un papel muy importante en la propagación y preservación de la

especie. El estudio de las semillas en general ha cobrado importancia porque además de regenerar una planta, son la principal fuente de alimento humano y de la industria ganadera (Bewley and Black, 1985).

La semilla del maíz pertenece a la categoría denominada "semillas ortodoxas", que se refiere a aquellas que son producidas por plantas anuales o bienales y se caracterizan por tener la capacidad de sobrevivir en ausencia de agua (desección), baja humedad, cambios de temperatura, y que además, pueden conservar un alto vigor y viabilidad después de ser almacenadas por largos periodos de tiempo (por lo menos hasta la siguiente cosecha a temperatura ambiente y hasta décadas a una temperatura de -18°C) (Roberts, 1973; Walters & Towill, 2004; Berjak & Pammenter, 2013).

La estructura de la semilla de maíz se compone de tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 2). El pericarpio es la capa más externa, su naturaleza es dura, transparente y se encarga de proteger a la semilla del exterior. El endospermo comprende el 85% de la masa de la semilla (Scanlon & Takacs, 2009), está compuesto de almidón y es la principal reserva de energía para el desarrollo de la plántula. Por otro lado, el embrión es una estructura mucho más compleja, está formado por el eje embrionario en el que se encuentran las células con la maquinaria genética y molecular que dará lugar al nuevo organismo, y el escutelo, que corresponde al único cotiledón que posee el maíz (pues recordemos que es una especie monocotiledónea) (Bewley et al., 2007). El eje embrionario a su vez contiene al meristemo radicular, que dará origen a la raíz primaria después de romper la coleorriza, y al meristemo apical del tallo, que junto con el coleoptilo darán lugar a la parte aérea de la plántula (el tallo y las primeras hojas respectivamente) (Scanlon & Takacs, 2009)

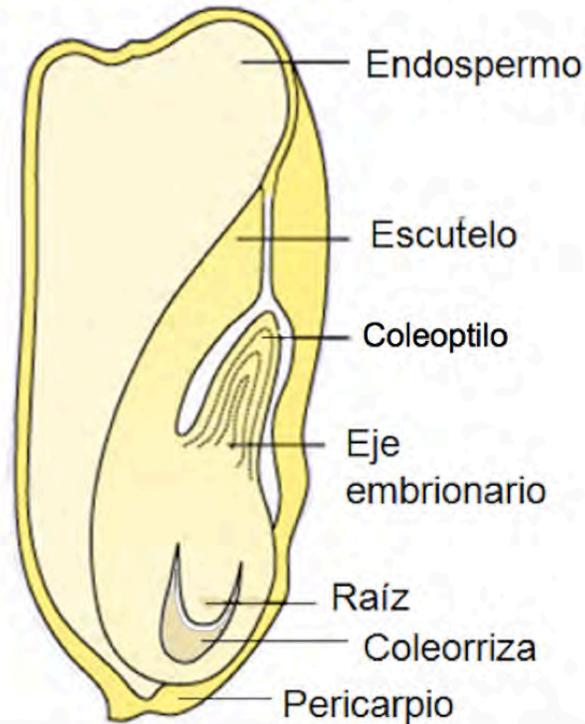


Figura 2. Anatomía de la semilla de maíz. Modificado de Corn and bean seed anatomy, 2017 (sitio web).

La semilla de maíz se ha tomado como modelo de estudio para conocer la naturaleza de varios procesos biológicos como la señalización que existe entre el endospermo y el eje embrionario, para estudios de desarrollo, y en particular uno que concierne directamente a este trabajo: el proceso germinativo.

1.3 Germinación

Canónicamente, la germinación ha sido definida como el proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla (imbibición), que provoca la activación de los procesos bioquímicos y moleculares (Figura 3) que conducen a la expansión del embrión, y termina con la emergencia de la radícula a través de las estructuras que la rodean (la coleorriza y el pericarpio) (Bewley et al., 2007; Nonogaki et al., 2010).

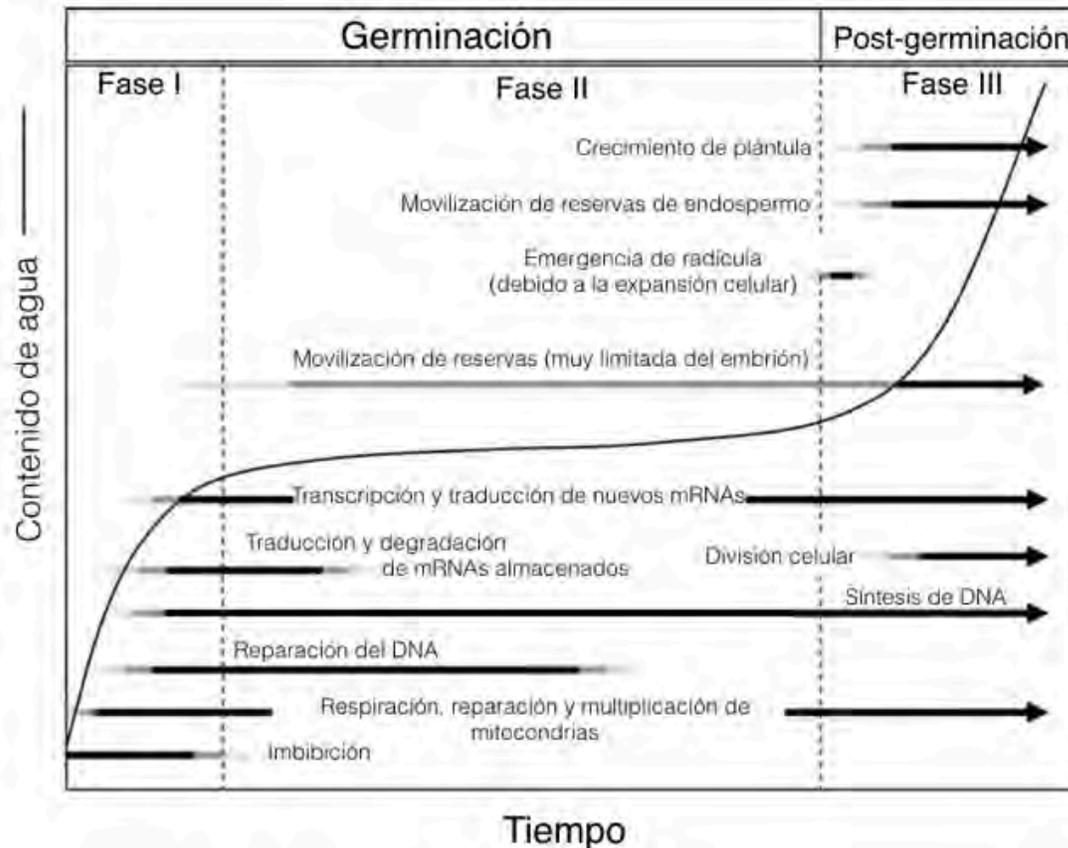


Figura 3. Curso temporal de los eventos metabólicos asociados a la germinación de semillas ortodoxas. Modificado de Nonogaki et al., 2010

Sin embargo, poco se sabe de la regulación de los mecanismos que provocan el “despertar de las semillas”. La división celular debería ser uno de los primeros eventos en activarse ya que es el proceso fundamental para dar origen a nuevos organismos, pero se ha visto en algunos sistemas de estudio que, aun bloqueando el avance del ciclo celular, la radícula es capaz de protruir. Esto sugiere que dicha protrusión puede ser un evento dependiente en gran medida de procesos físicos (hidratación de tejidos e hinchamiento de las células por la entrada de agua), no obstante, es muy claro que la división celular en los meristemos es crucial y sin ello no se podría establecer una nueva plántula (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Es por ello que nuestro grupo de investigación ha optado por ver al proceso germinativo desde un enfoque distinto, y se ha definido a la germinación como la serie de procesos bioquímicos y moleculares (desencadenados por la entrada de agua a la semilla) que permiten la culminación de la primera ronda de ciclo celular exitosa en las células meristemáticas del eje embrionario (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

1.4 Ciclo celular

En el siglo XX se estableció en la teoría celular que la célula es la unidad funcional y estructural de todos los seres vivos y que cualquier célula proviene necesariamente de otra. Desde los organismos unicelulares hasta los complejos multicelulares, son producto del crecimiento y rondas de duplicación celular. A pesar de que es un proceso universal, su complejidad está íntimamente relacionada con la naturaleza de los organismos: mientras una duplicación celular bacteriana da lugar inmediatamente a un organismo completo, el desarrollo de un mamífero requiere de millones de rondas de duplicación y una regulación muy rigurosa de éstas.

El ciclo celular es entonces un proceso ordenado y altamente regulado, mediante el cual una célula da origen a dos células hijas con la misma información genética. En eucariontes, el ciclo celular está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (Figura 4).

Fase G1. En esta fase, la célula se encarga de percibir las condiciones de su ambiente interno y externo; si son adecuadas son traducidas en señales celulares que le indican que necesita crecer, duplicar sus organelos y hacerse de los requerimientos energéticos necesarios para poder avanzar en el ciclo hacia la duplicación de su genoma. Si las condiciones no son favorables, la célula alarga esta fase hasta que lo

sean o entra en un estado de quiescencia y/o diferenciación conocido como G0.

Fase S. En esta fase se lleva a cabo uno los puntos clave del ciclo celular, la duplicación del genoma; es un proceso altamente regulado y energéticamente muy costoso (de ahí la importancia de que la célula evalúe sus condiciones en la fase G1). Cabe destacar que previo al establecimiento de la fase S, durante la transición G1-S, se encuentra un punto de control determinante para el avance del ciclo celular, determinado por la vía RBR-E2F que se describe posteriormente.

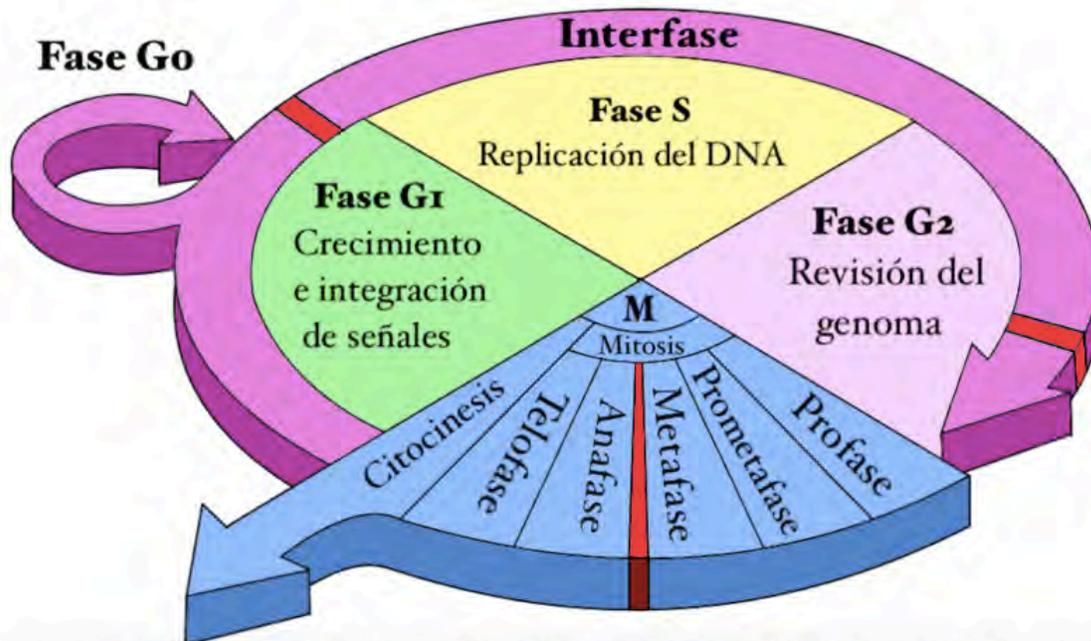


Figura 4. Modelo del ciclo celular en eucariontes. Se muestran las fases y los eventos que las caracterizan; en rojo se señalan los puntos de control del ciclo. Modificado de Mader & Windelspecht, 2016.

Fase G2. Una vez finalizada la fase S, la célula requiere asegurarse que la síntesis del DNA haya ocurrido exitosamente, ya que errores en el material genético pueden comprometer la vida de las células hijas. De esta forma, si existen daños en la información hereditaria, la célula los corrige mediante mecanismos de reparación y permite el avance del ciclo hacia la fase de mitosis. Sin embargo, si los daños son considerables e irreparables, la célula opta por la apoptosis; esta decisión es determinada en un segundo punto de control que se encuentra al término de esta fase.

Fase M. En esta última fase del ciclo celular se lleva a cabo la segregación del material genético y la división celular. La mitosis está dividida a su vez en distintas sub-fases:

- Profase. Comienza la compactación del DNA
- Prometáfase. Se desensambla la envoltura nuclear y se termina de condensar el DNA.
- Metafase. Los cromosomas se alinean en el ecuador de la célula y se sujetan a las fibras del huso mitótico.
- Anafase: Las cromátidas hermanas son separadas y se dirigen hacia los polos de la célula.
- Telofase: La célula se estira a través de las fibras del huso y se comienzan a ensamblar las membranas nucleares.
- Finalmente ocurre la Citocinesis donde la célula segrega el material genético y da origen a dos células hijas.

En la fase M se encuentra el último punto de control del ciclo celular en la transición metafase/anafase, en el cual debe haber certeza de que los cromosomas estén sujetos correctamente con el huso mitótico, previo a la separación de las cromátidas hermanas, para que la

segregación de los cromosomas sea exitosa (Alberts et al., 2008; Campbell et al., 2001).

1.5 Regulación del ciclo celular

1.5.1 Cinasas dependientes de ciclinas (CDK)

El ciclo celular en eucariontes se encuentra regulado principalmente por la actividad de una familia de proteínas que fosforilan residuos de serinas y treoninas, denominadas cinasas dependientes de ciclinas o CDKs (por su nombre en inglés, Cyclin Dependent Kinase). Por definición, estas enzimas adoptan su forma activa sólo cuando se encuentran unidas a alguna de sus proteínas regulatorias, llamadas ciclinas (y de ahí el nombre de estas cinasas) (Morgan, 1995).

En levaduras existe una sola CDK pero en eucariontes superiores se ha encontrado gran variedad de éstas. En animales se han clasificado en familias desde la CDK1 hasta la CDK13 (revisado por Malumbres et al., 2009), mientras que en plantas se les ha dado un sufijo alfabético desde la CDKA hasta la CDKG (Joubès et al., 2000; Menges et al., 2005).

Las CDKs forman complejos con distintas ciclinas y de esta forma adquieren especificidad para fosforilar sus distintos blancos en momentos específicos del ciclo celular. La actividad de los complejos ciclinas/CDKs depende de varios factores como la abundancia de las dos proteínas, modificaciones postraduccionales, localización subcelular e interacciones con otros reguladores del ciclo celular (Figura 5).

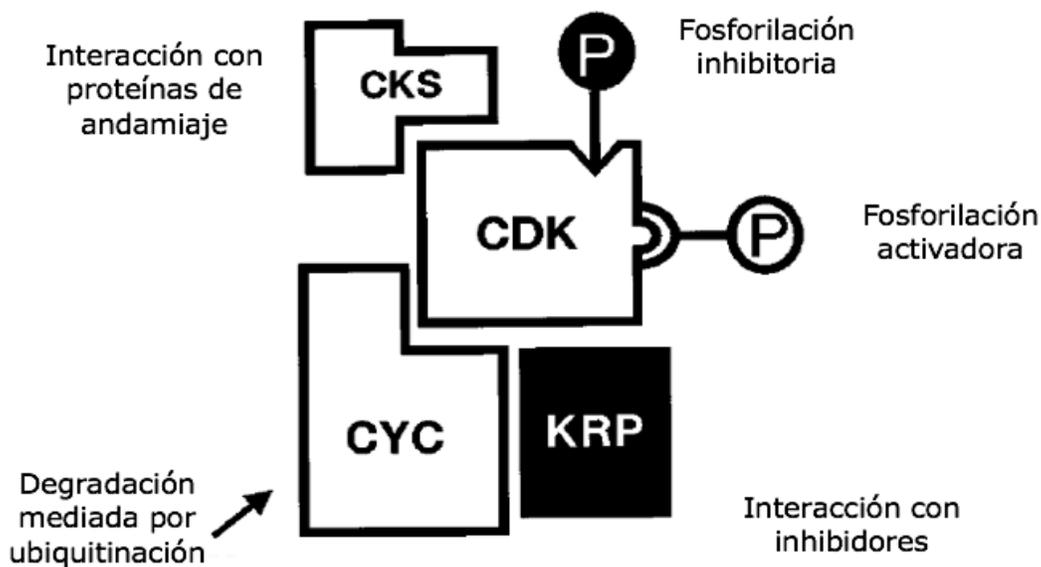


Figura 5. Regulación de los complejos ciclinas-CDKs. La actividad de los complejos está regulada a distintos niveles: desde la expresión, abundancia y degradación proteica de las ciclinas y CDKs, modificaciones postraduccionales en CDKs e interacción con proteínas inhibitorias y de andamiaje. Modificado de Dewitte & Murray, 2003

1.5.2 Ciclinas

Las ciclinas fueron descritas por primera vez en un estudio en huevos de erizo de mar, y se les dio tal nombre después de que se observara que sus niveles proteicos fluctúan conforme avanza y se reanuda el ciclo celular (Evans et al., 1983). Las ciclinas se caracterizan por una región en su secuencia proteica llamada "Cyclin box", que está compuesta por alrededor de 100 residuos de aminoácidos, y que a pesar de tener baja homología entre los miembros de la familia de una misma y diferentes especies, esta región les permite tener una función conservada y ser clasificadas como ciclinas, pues es la responsable de interaccionar con las CDKs (Hunt, 1991; Pines, 1995).

Otra característica importante de esta gran familia de proteínas es la presencia de las Cajas de Destrucción (Dbox o F-box), responsables de

la interacción con los complejos de degradación de proteínas mediada por ubiquitinación, y también por la presencia de motivos PEST, marcas que han sido asociadas a proteínas de rápida degradación (Chang *et al.*, 1996; Nieuwland *et al.*, 2007; Rechsteiner and Rogers, 1996; Wang *et al.*, 2004).

En humanos se han identificado 28 genes de ciclinas los cuales han sido agrupados en más de 10 familias (A, B, C, D, etc.) (Malumbres & Barbacid, 2005). Por otro lado, en *Arabidopsis* se han reportado y clasificado 49 ciclinas (Wang *et al.*, 2004) mientras que en maíz se han identificado 59 (Hu *et al.*, 2010). Sin embargo, no todas las ciclinas tienen un papel regulatorio sobre el ciclo celular, sólo existe evidencia contundente de que, en plantas, las ciclinas tipos A, B, D y H participan en dicho proceso (Revisado por Dewitte & Murray, 2003).

Las ciclinas D cumplen un papel muy importante en la regulación del ciclo celular, especialmente en la fase G1 y en la transición G1/S. Se ha descrito que éstas son capaces de percibir la disponibilidad de nutrientes y responder a moléculas señalizadoras como fitohormonas, azúcares, etc., lo que permite evaluar si la célula se encuentra en las condiciones apropiadas para comprometerse con la duplicación del genoma y después dividirse (Garza-Aguilar *et al.*, 2017; Gutierrez *et al.*, 2002; Lara-Núñez *et al.*, 2017; Sherr, 1994).

Las ciclinas tipo D de plantas muestran una organización estructural típica de las ciclinas, pero además de los dominios conservados de la familia, presentan una marca de aminoácidos en el amino terminal, LXCXE (en donde L=Leucina, C=Cisteína, E=Aspartato y X=cualquier aminoácido), que funciona como motivo de interacción con la proteína RBR (Buendía-Monreal *et al.*, 2011; Huntley *et al.*, 1998; Wang *et al.*,

2004) lo cual las implica en una vía importante de la regulación del ciclo celular, que más adelante se describirá.

1.5.3 Otros reguladores del ciclo celular

Como ya se mencionó antes, la actividad de cinasa de los complejos Ciclinas/CDKs puede estar regulada por la interacción con otras proteínas del ciclo celular. Las CAKs (CDK Activating Kinases), como su nombre lo indica, son capaces de regular positivamente la actividad de las CDKs mediante fosforilación. Así mismo, las CDKs también son blanco de fosforilaciones inhibitorias por la proteína WEE1 (Revisado por Dewitte & Murray, 2003).

Por otro lado, se encuentran los inhibidores de los complejos Cyc/CDKs; en animales se han clasificado dentro de las familias INK4 y Cip/Kip, mientras que en plantas se han descrito varios miembros relacionados a esta última y han sido nombrados KRPs (Kip Related Proteins). Estas proteínas, por medio de su interacción con los complejos Cyc/CDKs son capaces de inhibir su actividad de cinasa (Godínez-Palma et al., 2017; Wang et al., 2007).

1.5.4 Vía RBR/E2F-DP

Otro regulador importante del ciclo celular en eucariontes es la proteína de Retinoblastoma (RB), nombrada así originalmente por haber sido identificada en pacientes con Retinoblastoma (cáncer de retina), padecimiento en el cual se encuentra desregulada. Se sabe que RB funciona como regulador negativo del ciclo celular (específicamente en el punto de restricción entre las fases G1 y S) ya que reprime a una familia de factores transcripcionales llamados E2F-DP, encargados de promover la expresión de genes importantes para para la progresión del ciclo. RB está conservada en plantas, se le ha denominado RBR

(Retinoblastome Related), se conoce su secuencia y se ha determinado que es homóloga en función a la proteína de mamíferos (Weinberg, 1995).

La proteína RBR tiene en su estructura tres dominios importantes: el amino, el pocket y el carboxilo. El dominio pocket (que a su vez está conformado por dos subdominios denominados A y B) es el responsable de la interacción con el dominio de transactivación de E2F-DP y por la cual el heterodímero no puede promover la transcripción de sus genes blanco. En el subdominio B del pocket se encuentra la secuencia de aminoácidos que interactúan con el motivo LXCXE (de las ciclinas) y el dominio carboxilo terminal de la RBR (Ct-RBR) se caracteriza por ser una región rica en sitios de fosforilación por CDKs. Cuando RBR está hiperfosforilada, es incapaz de reprimir a E2F-DP (Gutzat et al., 2012) (Figura 6).

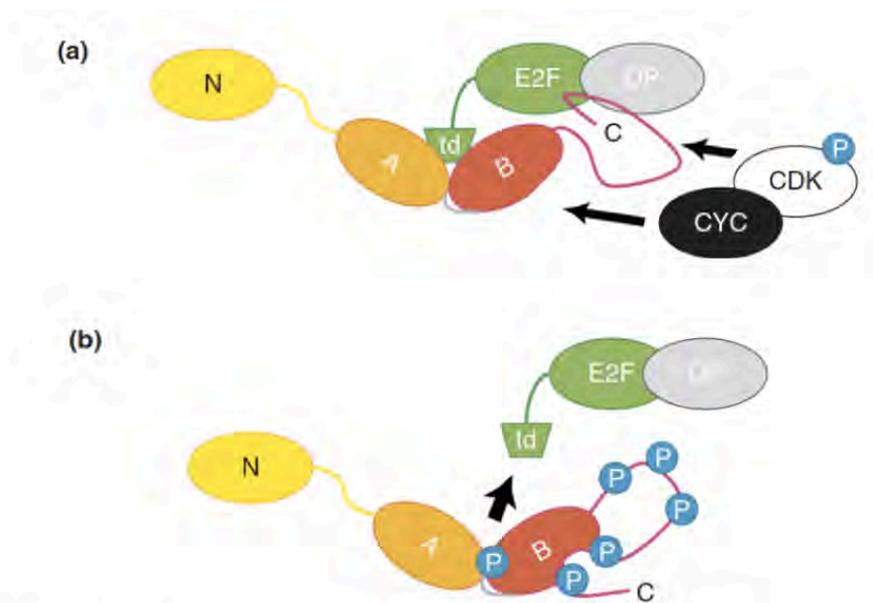


Figura 6. Estructura de RBR y su interacción con E2F-DP. (a) Cuando RBR no está fosforilada es capaz de interactuar con el dominio de transactivación (td) de E2F-DP, (b) pero cuando RBR es fosforilada por complejos Cyc/CDKs se libera el factor de transcripción. Modificado de Gutzat et al., 2012.

Anteriormente se ha hecho referencia de la importancia de las ciclinas D en la fase G1 y transición G1/S. En plantas se sabe que esta familia de ciclinas son las principales responsables de la formación de complejos con CDKs para que, mediante la fosforilación de RBR, E2F-DP sea liberado y funcione como factor transcripcional de sus genes blanco (Gutierrez et al., 2002).

1.6 Fitohormonas

Las hormonas vegetales, fitohormonas o fitorreguladores, son moléculas señalizadoras que regulan diversos procesos en las plantas como crecimiento, desarrollo, proliferación, diferenciación y dormancia, entre otros. Análogamente a las hormonas de mamíferos, las fitohormonas son capaces de activar sus vías de señalización correspondientes mediante receptores (membranales, citoplásmicos y nucleares). Existe toda una variedad de estas moléculas y las diferencias en su naturaleza química, su concentración y la células afectoras, son los factores más importantes que determinan su efecto (Bewley et al., 2007; Garay-Arroyo et al., 2012).

A partir de su estructura química y efecto fisiológico, los fitorreguladores se han clasificado en 6 clases: Ácido abscísico (ABA), Auxinas (AUX), Giberelinas, Etileno, Citocininas y Brasinoesteroides. Para fines particulares de esta tesis, se revisarán con más amplitud a las auxinas y al ácido abscísico, aunque no se dejarán de lado a las demás, debido a que se ha especulado que existen interacciones entre sus vías de señalización.

Las auxinas son una familia de fitohormonas que regulan el desarrollo y crecimiento de las plantas; el miembro representativo de esta familia es el ácido indol-3-acético (IAA) debido a que es el más abundante y

bioactivo. Se ha estudiado que en *Arabidopsis* las auxinas son capaces de regular la morfología de la raíz, inhibiendo su elongación, incrementando la formación de raíces secundarias y promoviendo raíces adventicias (Revisado por Woodward & Bartel, 2005). En maíz se sabe que las auxinas promueven la formación de raíces laterales (Martínez de la Cruz, 2012).

A nivel molecular, se ha visto que las auxinas tienen efecto sobre diferentes reguladores implicados en la degradación de proteínas (como componentes de SCF y APC); esto las hace partícipe de una gran variedad de vías de señalización o procesos celulares (Del Pozo *et al.*, 2005).

El Ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal y fue nombrada así al haber sido identificada por primera vez como un compuesto que promovía la caída de las hojas (evento conocido como abscisión) en la

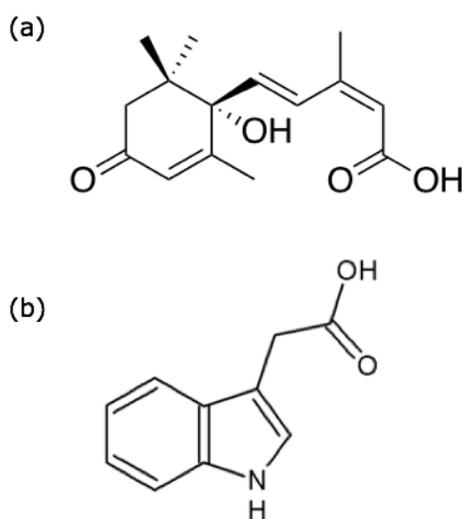


Figura 7. Estructura química de las fitohormonas (a) ABA (b) e IAA.

planta de algodón (Ohkuma *et al.*, 1963). Esta molécula señalizadora se le ha caracterizado por su capacidad de responder a estrés (como sequía y desecación) (Robertson *et al.*, 1985); también se sabe que es capaz de inhibir la división celular y la síntesis de DNA (Robertson *et al.*, 1990) y además se ha reportado que puede inhibir la germinación de semillas de *Arabidopsis* (Garcíarrubio *et al.*, 1997).

De las otras clases de fitohormonas se puede decir que también participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos vegetales,

como por ejemplo, en el desarrollo de órganos reproductivos (brasinoesteroides y giberelinas), proliferación celular (brasinoesteroides, etileno y citocininas), rompimiento de dormancia, promoción de germinación, desarrollo de raíz y flores (giberelinas), entre otros (Revisado por Miransari & Smith, 2014; Del Pozo et al., 2005).

2.0 Antecedentes

A partir del año 2000, con la llegada de las nuevas tecnologías en secuenciación, cada vez se tuvieron más herramientas para el estudio de los diferentes reguladores del ciclo celular en el maíz; con ellas se logró la clonación de genes de interés, la expresión de proteínas, el desarrollo de anticuerpos y, consecuentemente, la caracterización de las proteínas endógenas de este sistema biológico.

En maíz se han realizado varios estudios del efecto de fitohormonas sobre proteínas reguladoras del ciclo celular. Baiza y Sánchez-de-Jiménez (1989) estudiaron el efecto de una auxina sintética y encontraron que es capaz de estimular la proliferación de las células del mesocotilo. También se ha evaluado el efecto de algunas fitohormonas como benciladenina, IAA o ABA sobre la expresión génica, abundancia proteica y actividad de cinasa de CDKs tipo A y B, de las ciclinas D2;1, D3;1, D4;1, D5, de KRP1;1 y también de PCNA (Garza-Aguilar et al., 2017; Herrera et al., 2000; Lara-Nuñez et al., 2008; Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006). En estos trabajos se ha observado que las hormonas vegetales provocan cambios y además tienen efectos diferenciales sobre la expresión génica, la proteína o la actividad de cinasa.

También se ha demostrado (mediante citometría de flujo) que las fitohormonas ABA y BA tienen impacto sobre el avance del ciclo celular durante la germinación de maíz pues modifican las poblaciones de células en G1 y G2, respecto a un control (Sánchez Jiménez et al., 2002).

En 2009, con la liberación del genoma completo de maíz (Schnable et al., 2009), se tuvieron aún más herramientas para el estudio de las proteínas que regulan el ciclo celular en este cereal y de esto derivaron más trabajos en nuestro grupo de investigación. Uno de los más importantes fue el realizado por Buendía-Monreal y colaboradores (2011) en el cuál se caracterizó filogenéticamente a las 17 ciclinas que conforman la familia de las ciclinas D de maíz y se estudió la expresión génica y regulación por fitohormonas (ABA, IAA y BA) de 12 de éstas, incluida la CycD6;1 (cuyos resultados se explicarán enseguida).

2.1 Ciclina D6;1

La CycD6;1 es un miembro atípico de la familia de ciclinas D en plantas ya que, tanto la de arroz, *Arabidopsis* y maíz, carece del motivo canónico de unión a RBR (LXCXE) y por esta particularidad es que ha despertado interés para su estudio.

En 2012, Cruz-Ramírez y colaboradores encontraron en *Arabidopsis thaliana* que la CycD6;1, a pesar de carecer de dicho motivo, es capaz de interaccionar con RBR; también se observó que puede formar complejos con CDKB1 (pero no con CDKA;1) y en ensayos de actividad de cinasa se demostró que dicho complejo CycD6;1/CDKB1 es capaz de fosforilar al dominio pocket de RBR, pero no el carboxilo terminal. No obstante, Weimer y colaboradores (2012) reportaron que AtCycD6;1 puede formar complejos tanto con CDKB1;1 como con CDKA;1, pero en

su estudio encontraron que el complejo con CDKB1;1 no es activo, y sólo con CDKA;1 es capaz de fosforilar a la histona H1.

Por otra parte, se ha estudiado muy poco sobre su regulación por fitohormonas; se sabe que IAA afecta positivamente la expresión (medida mediante la fusión de la proteína GFP al promotor de la ciclina) en la zona meristemática de *A. thaliana* (Cruz-Ramírez et al., 2012). En maíz, la Ciclina D6;1 comenzó a estudiarse a partir del trabajo de Buendía Monreal y colaboradores (2011), en el cual se estudió su expresión génica en presencia de ABA e IAA. Se observó que los niveles de transcrito disminuyeron significativamente por la presencia de ABA, mientras que con IAA no hubo diferencia respecto al control.

Con el desarrollo de anticuerpos específicos contra CycD6;1 se comenzó su estudio a nivel proteico durante la germinación del maíz; se reportó que es capaz de co-inmunoprecipitar con CDKs tipo A en extractos proteicos (Zamora Zaragoza, 2012) y además los complejos formados presentan actividad de cinasa sobre Histona H1 (a lo largo de la germinación) y sobre Ct-RBR (en un sólo tiempo estudiado) (Zamora Zaragoza, 2015). También se sabe que la ciclina interacciona *in vitro* con CDKB1;1 (Neri Flores, 2015).

3.0 Justificación

Las ciclinas D de plantas cumplen un papel importante en la integración de señales para regular el ciclo celular especialmente en la fase G1 y transición G1/S. En maíz la CycD6;1 es un miembro atípico de la familia por carecer del motivo LXCXE y se ha reportado que en su secuencia promotora presenta elementos de respuesta a ABA e IAA. Aunque se ha estudiado su expresión génica en presencia de estas moléculas, no se

sabe nada de la regulación fitohormonal a nivel de proteína y resulta importante conocer su comportamiento durante la germinación de maíz.

4.0 Hipótesis

Debido a que las ciclinas son capaces de responder a diferentes señales ambientales e integrar estímulos para regular el ciclo celular, el tratamiento con fitohormonas, ABA y IAA, puede causar cambios en el patrón de acumulación de ZmCycD6 y también podría modificar su actividad de cinasa asociada durante la germinación.

5.0 Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de las fitohormonas ABA e IAA sobre la proteína CycD6;1 durante la germinación de maíz

5.2 Objetivos particulares

- Determinar mediante western blot el patrón de acumulación de la proteína CycD6;1 en ausencia y presencia de ABA e IAA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz
- Realizar inmunoprecipitados y ensayar la actividad de cinasa asociada a la CycD6;1 usando dos diferentes sustratos: GST-Ct-RBR e Histona H1

6.0 Materiales y métodos

6.1 Imbibición de ejes embrionarios

A partir de semillas secas de maíz (variedad Chalqueño) se extrajeron los ejes embrionarios y se desinfectaron con una disolución de hipoclorito de sodio al 10%, sumergiéndolos en 10mL por 10min en

agitación constante. Posteriormente, en condiciones estériles, se enjuagaron con abundante agua desionizada hasta eliminar los residuos del hipoclorito de sodio.

Los ejes embrionarios se colocaron en cajas de Petri de 60x15mm (5 ejes por cada caja) sobre una cama de papel filtro (Whatman 3mm Chr) y se agregó 1mL de buffer de imbibición (Tris-HCl 50mM pH 7.4, KCl 50mM, MgCl₂ 10mM, sacarosa 0.058mM) para el tratamiento control y adicionado con ABA (50μM) o IAA (1μM) para el caso de los tratamientos con fitohormonas. Las cajas se sellaron con una película autoadherente y se incubaron en condiciones de oscuridad a 25°C en una estufa (Thermolyne 41900) durante 6, 12, 18, 24 y 30h según correspondiera.

6.2 Extracción y cuantificación de proteína

Después del tiempo de incubación, los ejes se retiraron de las cajas Petri y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, cinco en cada uno (AXIGEN MCT-150-C). Se maceraron los ejes embrionarios en el mismo tubo con la ayuda de una punta plástica adaptada a un taladro y después se agregaron 800μL de buffer de extracción (Tris-HCl 25mM pH 7.5, MgCl₂, KCl 25mM, EDTA 5mM pH 8, sacarosa 250mM, DTT 1mM, Triton X-100 2% y un coctel de inhibidores Complete Mini Roché, 1 tableta por cada 15mL) para finalmente triturar y homogeneizar empleando un polytron Ultra-Turrax.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). Primero se realizó una dilución 1:20 de las muestras, luego se colocó 1μL de éstas en los pozos de una microplaca y se completó a un volumen de 100μL; después se llevó a cabo una curva patrón con estándares de albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés)

(Quick start BSA standart set BIO-RAD 500-0207) en un intervalo de 1.25 a 20µg/mL y se agregaron 150µL de reactivo Bradford (Dye Reagent Concentrate BIO-RAD 500-0006) a todas las muestras. La placa se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente para finalmente realizar la lectura en el equipo EPOCH a 595nm. Con los cálculos pertinentes se obtuvo la concentración de cada una de las muestras, las cuales rondaban a los 10µg/µL.

6.3 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y western blot

Una vez determinada la concentración de cada muestra, primero se realizó el control de carga mediante SDS-PAGE (con geles al 12%) y tinción de Coomassie; una vez estandarizada la cantidad de proteína a cargar se realizaron SDS-PAGE y se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF; ésta se bloqueó con una disolución de leche en polvo (Svelty Nestle 0% grasas) al 5% en PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.8mM) durante 1h a temperatura ambiente y en agitación; después se agregó el anticuerpo primario anti-CycD6;1 (validado en la tesis de licenciatura de Zamora Zaragoza, 2012) en una dilución de 1:1,500 en PBS y 5% de leche y se dejó incubar toda la noche a 4°C en agitación.

Después de la incubación del anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 15min, el primero y el tercero con PBS, y el segundo con PBS suplementado con Tween 20 0.1% y NaCl 0.5M; luego se agregó el anticuerpo secundario comercial anti-conejo acoplado a la peroxidasa en una disolución de 1:15,000 en PBS y se dejó incubar por 1h a temperatura ambiente y agitación. Después se hicieron nuevamente 3 lavados de 15min y por último se procedió a revelar la membrana con la

adición de luminol y peróxido de hidrogeno 50:50 utilizando el fotodocumentador CHEMIDOC (BIO-RAD).

6.4 Inmunoprecipitación

Se colocaron 20µL de la resina Proteína A-agarosa al 50% (Roche 11134515001) en tubos de microcentrífuga de 0.6mL, se agregaron 7µL del suero anti-CycD6;1 y se incubó durante 2h a temperatura ambiente en rotación. Después de cumplido el tiempo, se adicionaron 500µg de proteína extraída de los ejes embebidos con o sin fitohormonas; los tubos se dejaron en rotación toda la noche y después se centrifugaron para hacerles 3 lavados de 200µL con buffer A (Tris-HCl 25mM pH 7.5, NaCl 125mM, EDTA 2.5mM pH 8, EGTA 2.5mM, NaF 2.5mM, Triton X-100 0.1%).

6.5 Actividad de cinasa

Al retirar el volumen del último lavado de buffer A, se montó el medio de reacción agregando buffer de cinasa (Tris-HCl 25mM pH 7.5, MgCl₂ 10mM, NaCl 150mM, DTT 1mM, EGTA 1mM, ATP 20µM) adicionando después 5µCi de [gamma ³²P] ATP. Como sustrato se emplearon 6µg de la región carboxilo terminal de RBR de maíz fusionada a GST (GST-RBR-Ct) previamente purificada como se describe en (Ramirez-Parra et al., 1999). Por otro lado, también se empleó como sustrato a la histona H1 de la cual se agregó 1µg. La reacción se dejó incubando 30min a 30°C.

Al término de la incubación, se agregó buffer de carga para desnaturalizar las muestras (a 80°C) y se realizó SDS-PAGE. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se secaron usando calor (70°C) y una bomba de vacío; los geles secos se dejaron expuestos a una placa de europio (BIO-RAD) en oscuridad por 48h y se reveló en el equipo Molecular Imager FX BIO-RAD.

7.0 RESULTADOS

7.1 Patrón de abundancia de CycD6;1 en ausencia o presencia de fitohormonas durante la germinación

Para determinar el patrón de abundancia de CycD6;1 primero se embebieron los ejes embrionarios de maíz a 0, 6, 12, 18, 24 y 30h, en ausencia o presencia de las fitohormonas, posteriormente se extrajo la proteína, se realizó SDS-PAGE y por último se hizo western blot usando un anticuerpo específico para CycD6;1 (validado por Zamora Zaragoza, 2012).

El anticuerpo reconoce en el blot una banda en aproximadamente 33kDa y se usó como control de carga una tinción con rojo de Ponceau de la misma membrana revelada con el anticuerpo. El blot de las figuras es el representativo de tres experimentos independientes y la densitometría se realizó con el promedio de éstos tomando en cuenta el control de carga. Para el análisis estadístico se hizo una prueba ANOVA de una vía y posteriormente una prueba Tukey para evaluar diferencias respecto al tiempo de 0h.

En la Figura 8, se puede observar que en condiciones estándar (sin fitohormonas) los niveles de CycD6;1 no presentan cambios importantes en los primeros tiempos, pero conforme avanza la germinación muestran una tendencia a disminuir hasta que a las 24 y 30h la caída de la proteína se vuelve estadísticamente significativa, respecto a la semilla seca (0h). Lo anterior coincide con el patrón encontrado por Zamora Zaragoza en el 2012.

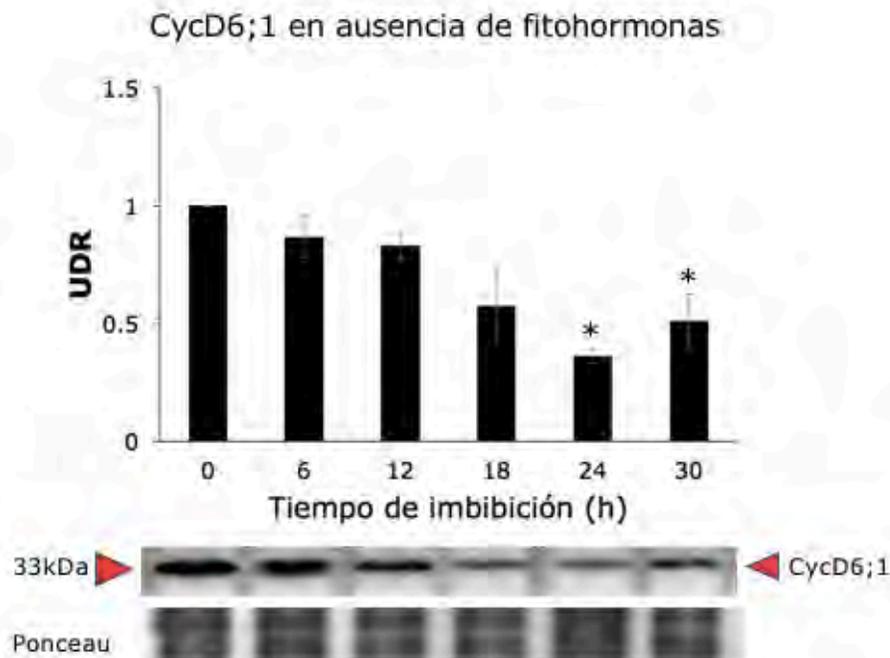


Figura 8. Inmunodetección y densitometría de CycD6;1 que muestran el patrón de abundancia proteica en el tratamiento control durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. UDR, Unidades de densidad relativa \pm Error estándar; $n=3$; $*P<0.05$.

Sin embargo, la adición de las fitohormonas al medio de imbibición parece alterar el patrón de acumulación de la proteína ya que como se observa en las Figuras 9 y 10, la presencia de ABA e IAA provocaron que los niveles proteicos se mantuvieran constantes en todos los tiempos de estudio. Esto lo podemos observar claramente en las densitometrías de dichas figuras en donde no se observan cambios estadísticamente significativos entre ninguno de los tiempos de estudio respecto a la abundancia de la ciclina a las 0h.

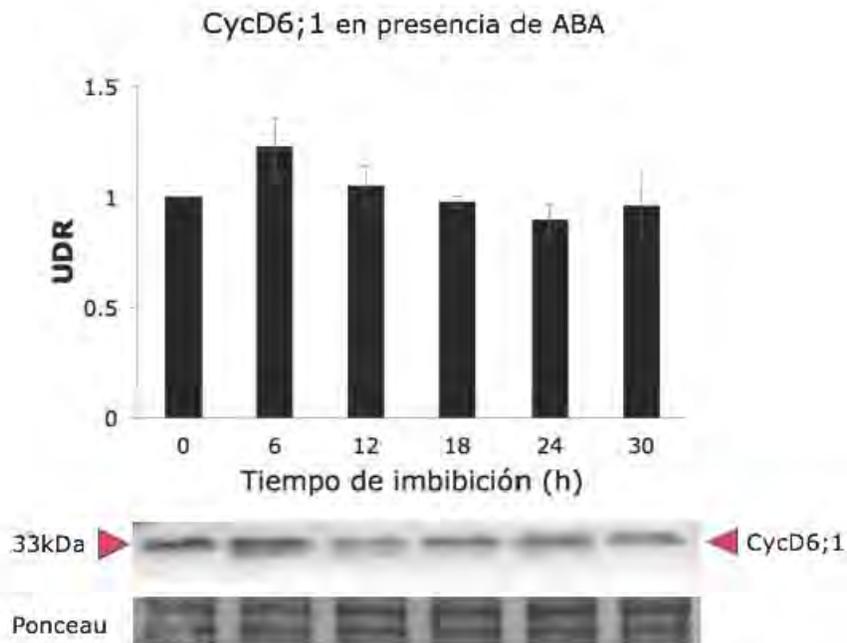


Figura 9. Inmunodetección y densitometría de CycD6;1 que muestran el patrón de abundancia proteica en el tratamiento con ABA (50 μ M) durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. UDR, Unidades de densidad relativa \pm Error estándar; n=3; *P<0.05.

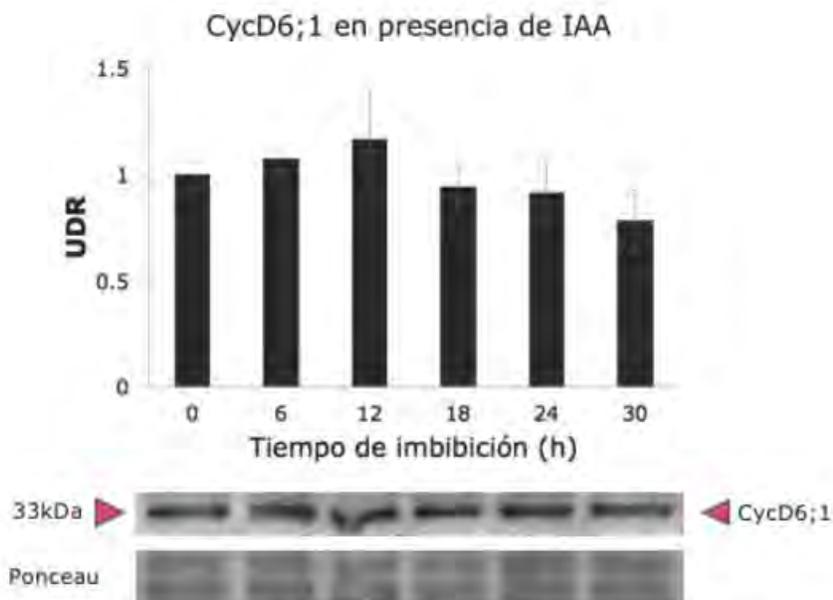


Figura 10. Inmunodetección y densitometría de CycD6;1 que muestran el patrón de abundancia proteica en el tratamiento con IAA (1 μ M) durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. UDR, Unidades de densidad relativa \pm Error estándar; n=3; *P<0.05.

Después de observar estos resultados, se decidió hacer un análisis para comparar cada tiempo de los dos tratamientos con fitohormonas, con su respectivo control sin fitohormonas. De esta forma, se construyó un gráfico en donde las pruebas estadísticas revelaron que en ambos tratamientos existen diferencias significativas a las 24h de imbibición. (Figura 11). Si bien sólo a este tiempo se registra una diferencia estadística, no deja de llamar la atención la tendencia de ABA e IAA a estabilizar los niveles de la proteína CycD6;1.

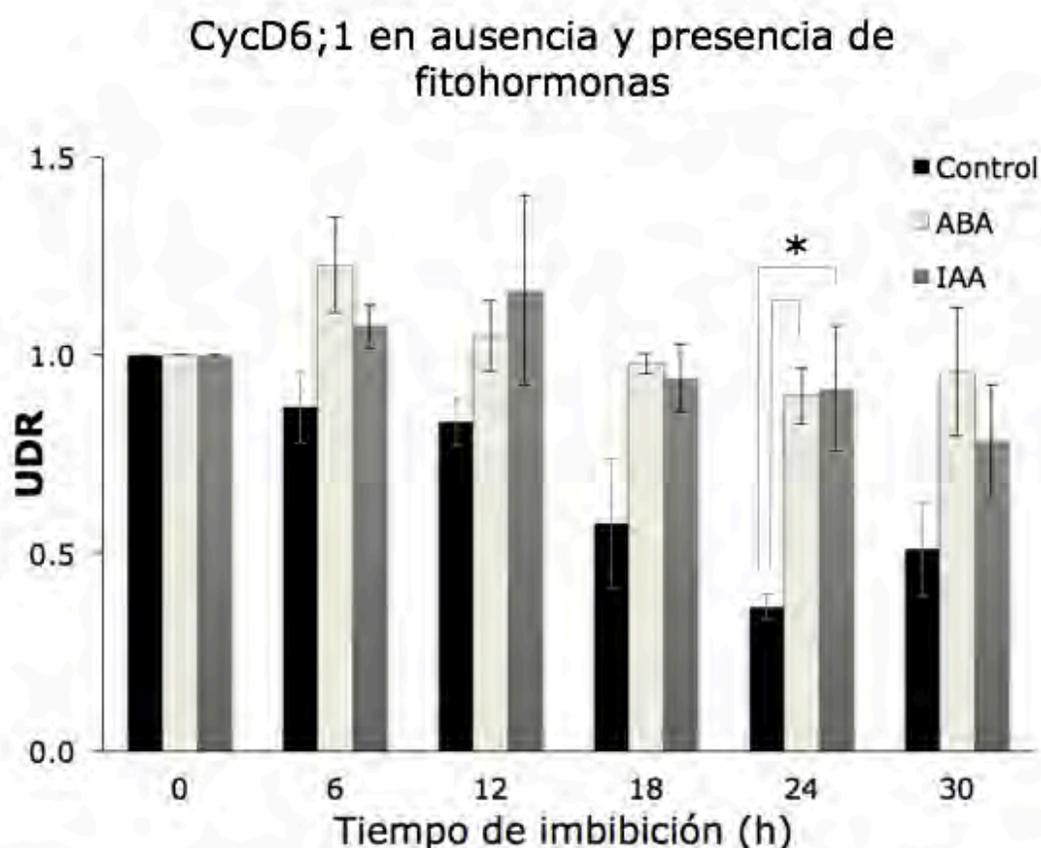


Figura 11. Densitometría de CycD6;1 de los tratamientos Control, ABA e IAA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. UDR, Unidades de densidad relativa \pm Error estándar; n=3; *P<0.05.

7.2 Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre histona H1 y RBR-Ct

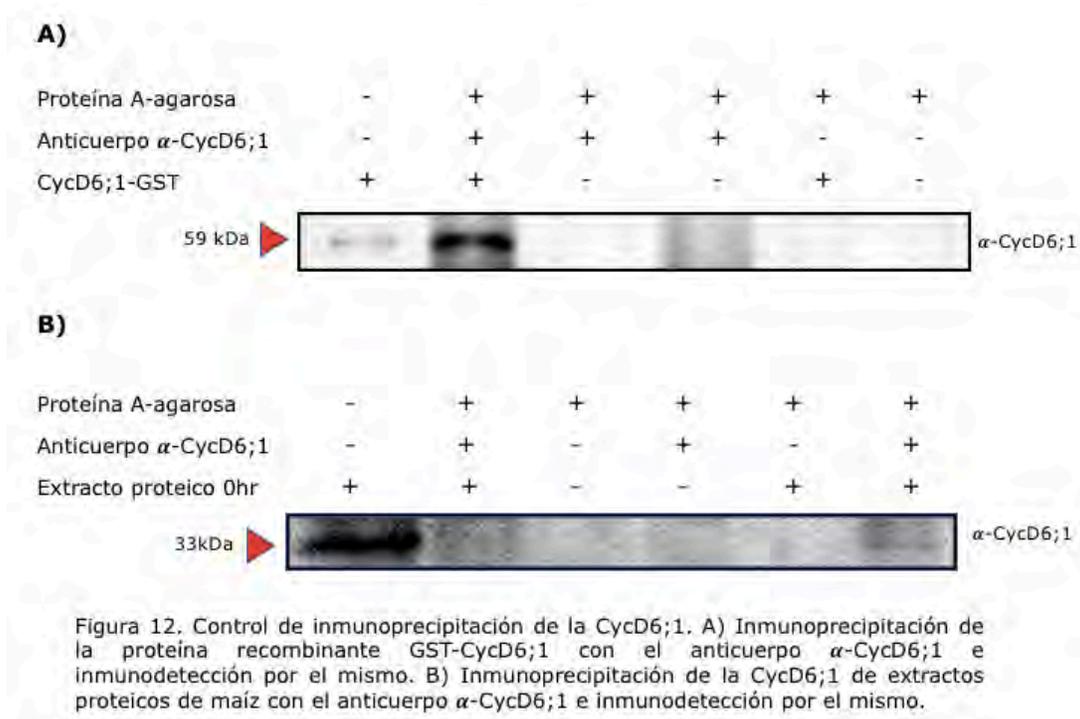
En maíz se sabe que la abundancia proteica de la mayoría de las ciclinas tipo D no se ve afectada de manera importante cuando se adicionan fitohormonas al medio de imbibición (en el caso particular de D6;1 ya vimos que sólo se modifica en los últimos tiempos de imbibición). Sin embargo, se ha observado que el efecto de este tipo de moléculas señalizadoras, es más evidente en la actividad de cinasa de los complejos CycsD/CDKs.

Para ensayar la actividad de cinasa asociada a CycD6;1 se decidió tomar los tiempos de 0, 12 y 24h como tiempos representativos de la germinación, y mediante la técnica de inmunoprecipitación y el uso de [gamma ³²P] ATP, se ensayó la actividad de cinasa de los complejos CycD6;1/CDKs sobre dos diferentes sustratos: el carboxilo terminal de RBR e histona H1.

Como primer paso fue necesario establecer las condiciones para la inmunoprecipitación, entonces se procedió a corroborar que el anticuerpo α -CycD6;1 era capaz de inmunoprecipitar a la proteína recombinante GST-CycD6;1 purificada, así como a la proteína endógena del extracto de semilla seca de maíz. Como se señala en la metodología, para la técnica de inmunoprecipitación se empleó Proteína A-agarosa, la cual es una resina diseñada para fijar los anticuerpos por su región Fc, éstos a su vez son capaces de reconocer específicamente a la proteína de interés (CycD6;1, junto con las proteínas que vengan asociadas a ella). Una vez aislado lo que el anticuerpo inmunoprecipitó se realizó SDS-PAGE y mediante western blot se detectó a la misma CycD6;1 como control positivo.

En la Figura 12A puede observarse que la proteína recombinante GST-CycD6;1 (que tiene una masa molecular de 59kDa debido a la suma de las dos proteínas: 26kDa de GST y 33kDa de CycD6;1) es precipitada y luego reconocida por el mismo anticuerpo. Lo mismo ocurre cuando se usa extracto proteico de maíz, en donde CycD6;1 endógena es reconocida a 33kDa (Figura 12B). Como controles negativos se realizan combinaciones de los componentes del ensayo; en uno se coloca la resina y el anticuerpo, pero no así la proteína recombinante (o el extracto de maíz), por lo cual no aparece la señal en el western blot; en otro control se coloca la proteína recombinante (o extracto proteico) sólo con la resina, para descartar interacciones inespecíficas entre la proteína A-agarosa y la proteína de interés. Por último, poner la resina sola nos asegura que no produce artificios que puedan generar ruido en el experimento.

Immunoprecipitación de la CycD6;1



Debido a que ya se había reportado con anterioridad que CycD6;1 es capaz de co-inmunoprecipitar con CDKs A (Zamora-Zaragoza, 2015), se procedió a realizar los ensayos de actividad de cinasa asociada a la ciclina sobre dos sustratos: la histona H1 y RBR-Ct. Para estos ensayos se usaron los mismos controles negativos a los mencionados en la técnica de inmunoprecipitación y como control de carga se muestran los geles con tinción de Coomassie correspondientes a las auto-radiografías representativas (Figuras 13B y 13C). Cabe agregar también que la densitometría de la fosforilación sobre RBR-Ct no cuenta con su análisis estadístico completo debido a que algunos experimentos sólo se realizaron por duplicado y aunque no se puede decir si hay (o no) diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos y/o tratamientos, se pueden observar ciertas tendencias que iremos mencionando y discutiendo a lo largo de las siguientes secciones.

En el ensayo de la actividad de cinasa sobre la histona H1 (Figura 13), se puede observar que en el control hay un aumento de la fosforilación de esta proteína a las 24h; dicho patrón se modifica en el tratamiento con IAA pues se observa un pico de actividad a las 12h y una clara disminución a las 24h. Por otro lado, con ABA la actividad se mantiene prácticamente constante durante los tiempos estudiados.

En la actividad de cinasa sobre RBR-Ct se observó un patrón diferente (Figura 14). Se puede observar que en las condiciones control, la fosforilación no varía en los tiempos estudiados, pero con la adición de IAA parece mostrar una ligera tendencia de aumento hacia las 24h. En cambio, la actividad de cinasa de los complejos en tratamiento con ácido abscísico presentan una disminución desde las 12h y alcanzar niveles prácticamente indetectables a las 24h.

Actividad de cinasa sobre histona H1

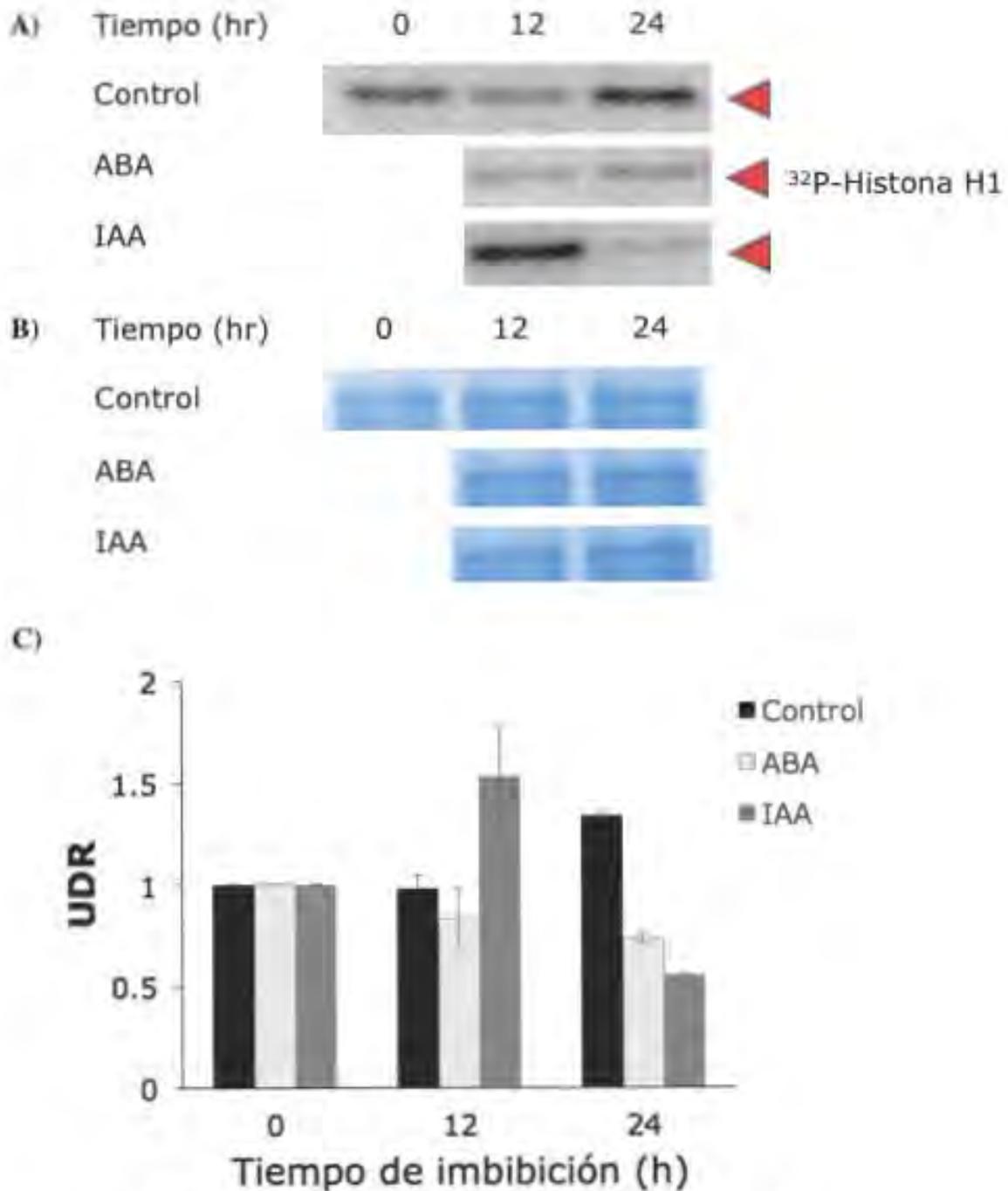


Figura 13. Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre Histona H1 en presencia y ausencia de las fitohormonas ABA e IAA. A) Autoradiografía. B) Control de carga. C) Densitometría. UDR, Unidades de densidad relativa \pm Error estándar; n=3.

Actividad de cinasa sobre RBR

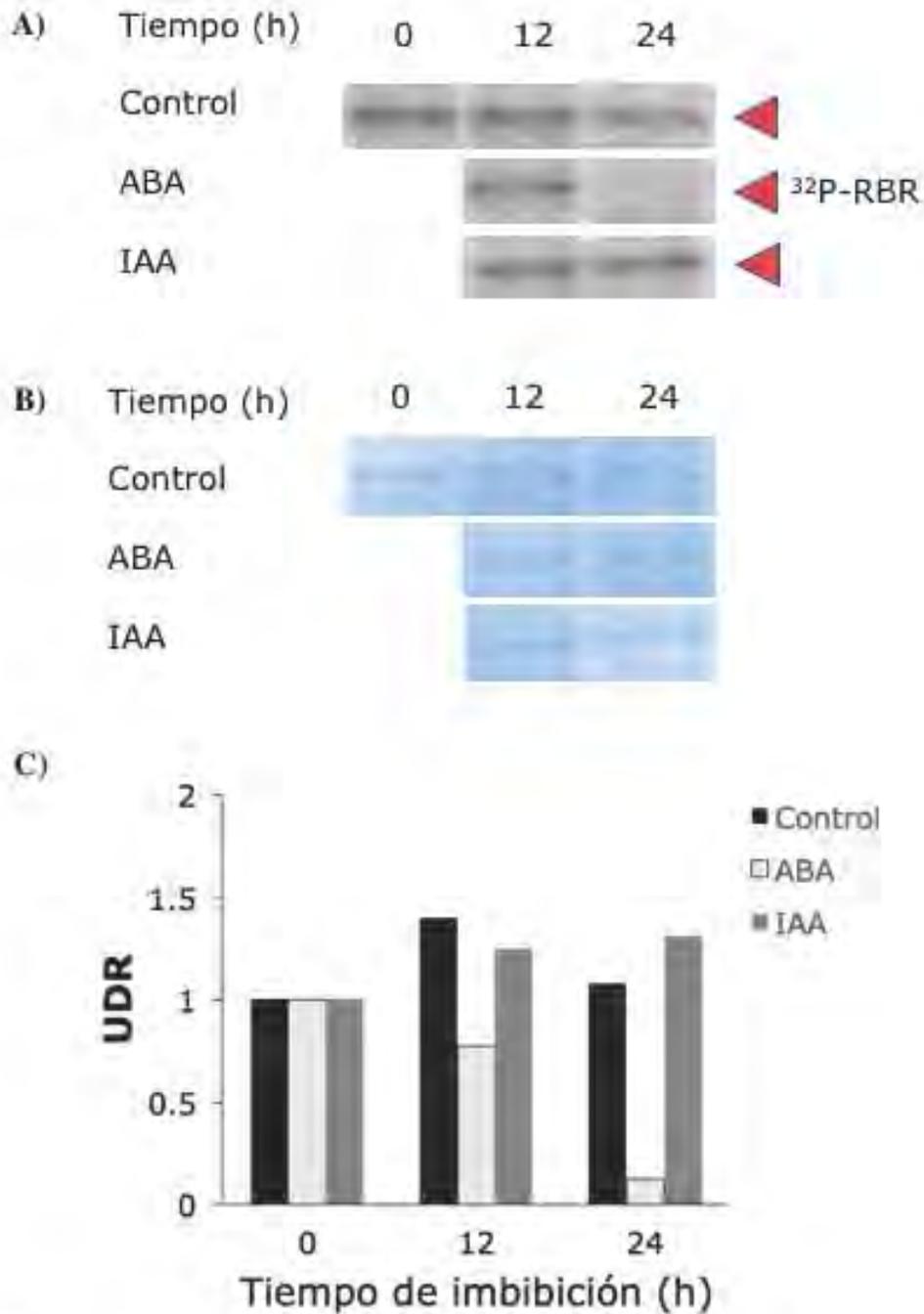


Figura 14. Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre GST-RBR-Ct en presencia y ausencia de las fitohormonas ABA e IAA. A) Autoradiografía. B) Control de carga. C) Densitometría. UDR, Unidades de densidad relativa; n=2.

8.0 Discusión de resultados

La caracterización de CycD6;1, como se menciona en los antecedentes de este trabajo, comenzó con el estudio de su expresión génica en ausencia y presencia de las fitohormonas ABA e IAA durante la germinación de ejes embrionarios maíz, encontrándose que tienen un efecto diferencial sobre la acumulación del transcrito (Buendía Monreal *et al.*, 2011). Posteriormente, con el desarrollo de anticuerpos específicos para CycD6;1 se incursionó hacia el estudio a nivel de proteína con el objetivo de conocer su patrón de acumulación durante la germinación, interacciones, localización subcelular y actividad de cinasa asociada (Zamora Zaragoza, 2012 y 2015).

8.1 Patrón de abundancia de CycD6;1 en ausencia y presencia de fitohormonas

El patrón de abundancia de CycD6;1 durante la germinación de ejes embrionarios en ausencia de fitohormonas, presenta una tendencia de disminución hasta alcanzar los niveles más bajos (y estadísticamente significativos) a las 24 y 30h de imbibición (Figuras 8 y 11). Este resultado coincide con lo reportado por Zamora Zaragoza (2012), no obstante, en un estudio posterior también se encontró que cuando los ejes se germinan dentro de la semilla, los niveles de CycD6;1 caen a tiempos más tardíos (36h) (Zamora Zaragoza, 2015).

Sin embargo, el objetivo de este trabajo fue observar el comportamiento de CycD6;1 en presencia de fitohormonas, y como ya se mencionó en los resultados, la adición de estas moléculas provocó la modificación del patrón de acumulación de la proteína de estudio durante la germinación. Para ambos casos, la adición de IAA o ABA, provocaron que CycD6;1 se mantuviera más estable durante los tiempos estudiados, especialmente

a las 24h (donde en el control se obtenían los niveles más bajos) (Figuras 11).

Dado que con anterioridad se había estudiado el efecto de fitohormonas sobre CycD6;1, pero a nivel de expresión génica (Buendía-Monreal et al., 2011), fue posible contrastar algunos resultados con los niveles de proteína CycD6;1 estudiados en este trabajo. Aunque no se usaron los mismos tiempos de experimentación (ya que fueron 0, 8 y 16h para los estudios de expresión y 0, 6, 12, 18, 24 y 30h para el estudio de la proteína), las tendencias nos pueden dar información. En primer lugar, se reportó que el efecto de la auxina (IAA) sobre los niveles de expresión de la ciclina fue prácticamente nulo (respecto a su control) en los tiempos estudiados (0, 8 y 16h); mientras tanto, en la Figura 10 se puede observar que en el intervalo de 0 a 18h, el IAA tampoco tiene un efecto significativo sobre la proteína.

Por otro lado, Buendía-Monreal y colaboradores observan que el tratamiento con ABA si provoca una disminución significativa de los niveles de expresión génica de CycD6;1 (a las 8 y 16h) respecto al control sin la fitohormona, no obstante, los resultados de este trabajo muestran que a nivel de proteína en el tratamiento con ABA, la ciclina mantiene una abundancia similar a la del control (Figura 9).

Con el contraste de estos datos llama la atención el hecho de que en el trabajo donde se midió la expresión génica en presencia de ABA haya cierto nivel de transcrito a las 0h y después disminuya significativamente hacia las 8 y 16h, en cambio, en este estudio se observa que con el mismo tratamiento los niveles de proteína se mantienen similares a las 0, 8, 12 y 18h, lo que indica que, a diferencia del transcrito) la proteína permanece abundante y estable.

Se sabe que durante el desarrollo de la semilla, se hacen reservas de muchas proteínas (y otras biomoléculas) que después serán necesarias para el despertar bioquímico de las células durante la germinación (Nonogaki *et al.*, 2010); en nuestro grupo de investigación se han realizado varios trabajos de estabilidad proteica y se ha observado que todas las proteínas reguladoras del ciclo celular (estudiadas hasta el momento), están presentes desde la semilla seca y que ciclinas como D2;2, D4;2 y D5;3 son estables hasta las 6h en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas (Garza-Aguilar *et al.*, 2016; Godínez-Palma *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2005; De Jesús-Juárez, 2008; Lara-Nuñez *et al.*, 2008; Sánchez Jiménez *et al.*, 2005, 2002). Se especula entonces que los niveles de la proteína CycD6;1, al menos en los primeros tiempos de germinación, pueden corresponder en gran medida a lo que ya se había sintetizado desde el periodo de desarrollo de la semilla. Sin embargo, la CycD6;1 en presencia de ABA muestra niveles constantes hasta las 18h, por lo cual sería interesante hacer estudios sobre su estabilidad.

Por otra parte, como se observa en los resultados (Figuras 9, 10 y 11), las diferencias importantes en cuanto a niveles de CycD6;1 con los tratamientos con fitohormonas, se observaron hacia los tiempos tardíos de la germinación (24 y 30h). No obstante, a esos tiempos no conocemos los niveles de expresión y por lo tanto no tenemos una referencia para contrastar los datos, así como se hizo en los párrafos anteriores. Es por eso que sería interesante ampliar el trabajo y estudiar el efecto de estas fitohormonas sobre la expresión génica de CycD6;1 en estos tiempos tardíos.

Ahora bien, cuando se decidió trabajar con las fitohormonas ABA e IAA había ciertas hipótesis sobre el efecto que podían tener sobre la

abundancia de CycD6;1. La primera y más sencilla de todas era que debían tener un efecto diferencial ya que se trata de fitohormonas que en varios sentidos son antagónicas, sin embargo, como ya se ha observado en los resultados, las moléculas mostraron un efecto similar.

Con la adición de IAA al medio de imbibición se observó que fue capaz de estabilizar los niveles de CycD6;1, lo que coincide con la evidencia de que esta familia de fitohormonas (auxinas) tienen un impacto positivo en la proliferación celular (especialmente en la raíz), y se especula que puede ser mediante la regulación, precisamente, de las ciclinas tipo D y otras proteínas reguladoras del ciclo celular (Cruz-Ramírez et al., 2012; Martínez de la Cruz et al., 2015).

Por otro lado, se sabe que la vía de señalización de auxinas consiste primero en la unión de la hormona con sus receptores nucleares (TIR1 y AFB1-5), los cuales son también subunidades F-box del complejo SCF^{TIR1}; con ello se promueve la interacción del complejo con las proteínas AUX/IAA provocando su ubiquitinación y degradación. Las proteínas AUX/IAA son represores de los factores transcripcionales de respuesta a auxinas o ARFs (Auxin Response Factor), y al ser liberados, pueden reconocer sus secuencias específicas (AREs, Auxin Response Elements) en los promotores de ciertos genes, promoviendo su expresión. De esta forma es como las auxinas tienen un efecto regulatorio sobre varios procesos celulares en las plantas (Revisado por Garay-Arroyo et al., 2012).

Se ha descrito que al igual que muchas de las secuencias promotoras de los genes de ciclinas D, la de CycD6;1 presenta varios elementos de respuesta a auxinas (Buendía-Monreal, 2011b; Bravo-Alberto, datos no publicados); así, la presencia de IAA en el medio de imbibición pudiera estar regulando positivamente tanto el gen de la ciclina y/o también

estar promoviendo la síntesis de más proteína, evitando que sus niveles caigan hacia las 24h.

Con anterioridad también se ha estudiado el efecto de IAA sobre algunos reguladores del ciclo celular en maíz; Lara-Núñez y colaboradores (2007) encontraron que las ciclinas D4;1 y D5 muestran niveles con una tendencia a disminuir hacia las 18 y 24h respecto a su control, contrario a lo que sucede con CycD6;1, pues en esta última el IAA provoca que se estabilice. Por otro lado, Garza-Aguilar y colaboradores (2017) estudiaron el efecto de IAA sobre CycD3;1, CDKA y CDKB1;1. La ciclina D3;1 presentó niveles muy similares a excepción de las 18h (donde la proteína disminuyó de manera importante), en cambio, sobre CDK A tuvo un efecto positivo pues sus niveles estuvieron por encima del control en todos los tiempos estudiados. Por último, CDKB1;1 presentó un ligero aumento a las 6 y 12h, pero después mantuvo niveles muy similares a su referencia. Todos estos resultados hacen evidente que el IAA puede tener efectos diferenciales sobre distintos reguladores del ciclo celular.

Por otro lado, el ácido abscísico es un fitorregulador al que se ha asociado con estrés, y que además se ha comprobado que tiene efectos negativos sobre el ciclo celular y la germinación (Garcarrubio *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 1990). Por lo tanto, en este trabajo se hubiera podido esperar que ABA tuviera un efecto negativo sobre los niveles de la CycD6;1, sin embargo, como ya se ha mencionado, se observó que la fitohormona provocó una estabilización de la proteína en los tiempos en los que ésta presenta sus niveles más bajos en condiciones normales.

Hasta el momento no se sabe el motivo de este efecto, pero se tiene la hipótesis de que la adición de ABA puede estar teniendo un efecto negativo en el metabolismo general y esté alentando los procesos

celulares; en estudios con citometría de flujo en maíz y en café, se reportó que ABA es capaz de retrasar el ciclo celular, pues aumenta la cantidad de núcleos característicos de G1 (con contenido 2C de DNA) y disminuye los de fase G2 (4C) (Lavras et al., 2008; Sánchez et al., 2005).

En otros trabajos en maíz donde se midió la incorporación de timidina tritiada durante la síntesis de DNA, se observó que la presencia de ABA en el medio de imbibición tiene un efecto negativo en la fase de replicación (Buendía-Monreal, 2011b; Miller et al., 1994). De esta forma, se podría sugerir que los niveles de CycD6;1 no disminuyen en los tiempos estudiados porque la presencia de ácido abscísico provoca que las células del eje embrionario tengan un retraso metabólico y arresto del ciclo celular, lo cual podría modificar los tiempos de degradación de la proteína en estudio.

Se han estudiado otros reguladores del ciclo celular en maíz bajo el efecto de ABA. De Jesús-Juárez y colaboradores (2008) reportaron que la KRP1 (renombrada recientemente como KRP4;2) no parece estar regulada por ABA dado que sus niveles proteicos no varían a lo largo de la germinación, sin embargo, en un análisis más completo de las KRPs de maíz se encontró que el carboxilo terminal de todos los miembros de la familia está altamente conservado (Godínez-Palma et al., 2017) y ahora se sabe que los resultados encontrados en el otro estudio no representan el comportamiento específico de KRP4;2 porque el anticuerpo usado para ese estudio fue desarrollado precisamente para esta región. Actualmente en nuestro grupo de investigación se han desarrollado anticuerpos específicos para algunas KRPs y se está estudiando el efecto tanto de fitohormonas como de azúcares, sobre

estos reguladores del ciclo celular (Nava-Lara y Romero-Sánchez, datos sin publicar).

Por otro lado, PCNA responde negativamente al tratamiento con ABA pues sus niveles proteicos disminuyen; CDKA también presenta una tendencia a la baja (aunque no es estadísticamente significativa), y en contraste, CDK B se incrementa durante la germinación (Garza-Aguilar *et al.*, 2017; Sánchez Jiménez *et al.*, 2005). La disminución de PCNA y CDKA provocada por ABA concuerdan y pueden explicar el arresto del ciclo celular, pues las dos proteínas son necesarias para su progresión. Sin embargo, así como sucede con CycD6;1, ABA tiene un efecto positivo sobre CDKB.

En cuanto al efecto de ABA sobre las ciclinas D de maíz, se sabe que CycD2;1 no parece estar regulada por esta molécula, pues tanto en el tratamiento con la fitohormona como en el control, la proteína mantiene patrones muy similares. La CycD3;1 tampoco responde significativamente a la presencia de ABA (Garza-Aguilar *et al.*, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2005).

Una pregunta que nuestro grupo de investigación ha tratado de responder respecto a las ciclinas tipo D, es si cada una de ellas tiene un papel específico en el ciclo celular o hay redundancia entre ellas. Con lo que se ha observado hasta el momento se sugiere que, al menos en lo que respecta a su regulación fitohormonal, todo apunta a que pueden responder diferencialmente a ciertos estímulos a nivel de expresión y abundancia proteica. Sin embargo, también se debe tomar en cuenta que existen muchos más niveles de regulación como modificaciones postraduccionales, interacción con otras proteínas, la localización celular, la actividad de cinasa, etc.

En varios estudios con fitohormonas se ha visto que aunque se modifiquen o no los patrones de abundancia proteica de ciclinas y CDKs, al momento de estudiar su actividad de cinasa (directa o asociada) se pueden observar cambios más evidentes, lo que constituye un área importante de estudio, ya que la actividad de una proteína o un complejo, está más cerca de brindarnos información para entender los mecanismos de regulación del ciclo celular en respuesta a distintos estímulos.

8.2 Actividad de cinasa asociada a CycD6;1 en ausencia y presencia de fitohormonas

A lo largo del estudio de las proteínas reguladoras del ciclo celular en plantas, se ha visto que existe una gran red de interacción entre ellas y se ha demostrado que muchas de estas interacciones convergen o están relacionadas en la modulación de la actividad de cinasa de los complejos Cycs/CDKs, pues a través de ellos, se integran, se amplifican, y a su vez se hacen específicos los efectos que derivan de señales del ambiente y estadio celular. En este trabajo de investigación se evaluó la actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre histona H1 y RBR-Ct, con el objetivo de revisar el efecto causado por las fitohormonas ABA e IAA.

En el patrón de actividad de cinasa asociada a CycD6;1 sobre histona H1 en el tratamiento control, la fosforilación en 12h es muy similar a la referencia de 0h, pero a 24h se presenta un aumento (Figura 13); esto discrepa de lo reportado por Zamora Zaragoza (2012), quien observa una disminución significativa a las 12h y una recuperación a las 24h; sin embargo, a diferencia de la metodología usada anteriormente, los experimentos para este trabajo se tuvieron que realizar a partir de la imbibición de ejes embrionarios y no de semillas completas (como en el de Zamora Zaragoza), ya que no se hubiera podido tener control de la

cantidad de fitorreguladores que entra en contacto con el eje. Esta diferencia de condiciones es la causa más probable de la disparidad de los resultados.

Ahora bien, si recordamos el patrón de abundancia de CycD6;1 y analizamos el patrón de actividad cinasa asociada en el control, podemos observar que no concuerdan ya que en las condiciones estándar los niveles de CycD6;1 llegan a un mínimo a las 24h pero la actividad de cinasa aumenta en este mismo tiempo (Figura 8 y 11). Este resultado pone en evidencia que la actividad de los complejos no está determinada sólo por la presencia y abundancia de la ciclina.

Si los niveles de CycD6;1 son bajos a las 24h, se podría especular que el aumento en la actividad de cinasa podría deberse a un aumento en la abundancia de las CDKs; sin embargo, se ha reportado que los niveles de las CDKs A y CDKB1;1 son relativamente constantes durante toda la germinación (o al menos no presentan subidas importantes a las 24h), (Garza-Aguilar et al., 2017; Godínez-Palma et al., 2013)

Si la CycD6;1 tiene niveles proteicos muy bajos a las 24h y no hay aumentos significativos en las CDKs hacia ese tiempo de estudio que justifiquen el aumento de la fosforilación de la histona, significa que los complejos CycD6;1/CDKs que se forman en ese momento de la geminación son poco abundantes pero muy activos. Estos altos niveles en la actividad de los complejos podrían ser causados por fosforilaciones de cinasas activadoras de CDKs; recientemente en el grupo ya se ha observado que, en ensayos *in vitro*, los complejos GST-CycD6;1/His-CDKA y CycD2;2-MBP/His-CDKA aumentan su actividad de cinasa en presencia de CAK1 (de *Saccharomyces cerevisiae*) mediante la fosforilación de la CDKA (Godínez-Palma et al., 2017; López-Hernández, datos sin publicar).

Por otro lado, se observó que la presencia de fitohormonas modificó el patrón de fosforilación de la histona respecto al control. Con IAA se presenta un pico de actividad a las 12h y cae hacia las 24h (recordando que en el control el aumento se daba a las 24h); este pico temprano de actividad empata bien con el hecho de que ésta fitohormona es capaz de promover la proliferación y acelerar el ciclo celular. Mientras tanto, con ABA se puede observar que la actividad de cinasa se mantiene constante a las 12h pero disminuye hacia las 24h, es decir, el ABA si parece tener un efecto negativo en la actividad de cinasa de los complejos CycD6;1/CDKs.

En éste trabajo se empleó histona H1 de humano y a pesar de que solo tiene un 36% de identidad (en secuencia proteica) con la de maíz, se ha utilizado como un sustrato para los complejos pues posee sitios consenso de fosforilación por CDKs (Garcia et al., 2004) y es muy común utilizarla para estos ensayos.

Un par de trabajos en tabaco y arroz han demostrado que las fitohormonas tienen la capacidad de modificar la fosforilación de la histona H1. En el reporte de tabaco encontraron que la presencia de una auxina en combinación con una citocinina, promueven la activación CDKs, provocando un aumento en la fosforilación de histona (Zhang et al., 1996). En el otro reporte, se observó que la presencia de giberelinas promueven el aumento de la actividad de cinasa de p34cdc2/CDC28-like y la entrada a mitosis de las células en los meristemos internodales de arroz (Sauter et al., 1995).

Como bien sabemos, la regulación de las CDKs está dada en primera instancia por el tipo de ciclina con la que se encuentran asociadas, pero además ya se ha mencionado también, que las ciclinas (en especial las tipo D) responden diferencialmente a fitorreguladores; esto podría

sugerir que es de esta manera como las ciclinas integran señales ambientales y después regulan la actividad de cinasa de los complejos con CDKs, para finalmente modular la progresión del ciclo celular.

Por otro lado, también se utilizó como sustrato a la región carboxilo terminal de la proteína RBR de maíz (fusionada a GST); éste péptido funge como el sustrato fisiológico por excelencia de los complejos CycD/CDKs, pues RBR necesita ser fosforilado (en sus sitios consenso ubicados en el carboxilo terminal) para liberar al heterodímero transcripcional E2F-DP y que éste pueda regular positivamente la transcripción de genes para la progresión del ciclo celular. En éste contexto, los resultados obtenidos sobre el sustrato RBR-Ct pueden tener interpretaciones fisiológicas muy interesantes.

El patrón de actividad de cinasa sobre RBR en el tratamiento control muestra un ligero aumento a las 12h de germinación; se sabe que en nuestro sistema de estudio la fase S del ciclo celular inicia poco después de las 14h (Baíza *et al.*, 1989) y entonces podría sugerirse que dicho aumento en la actividad está relacionado con el momento fisiológico en el que las células quitan el freno establecido por RBR para permitir el paso hacia la fase replicativa. Cabe mencionar que, así como en histona H1, la actividad registrada a las 24h sobre RBR sigue llamando la atención puesto que está muy bien representada, recordando que CycD6;1 tiene niveles muy bajos en ese tiempo de estudio.

Comparando la actividad asociada a CycD6;1 (en condiciones estándar sobre RBR) con la de otras ciclinas, se puede observar que el patrón de fosforilación de los inmunoprecipitados de las ciclinas D2;1, D4;1 y D5 son similares, pues presentan aumentos entre las 12 y 15h y después regresan a niveles parecidos a las 0h (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-

Nuñez *et al.*, 2008). De esto se puede interpretar que la célula utiliza muchas de las ciclinas D para su función canónica en la transición G1/S.

Sin embargo, la adición de ABA al medio de imbibición de los ejes provocó que la actividad de los complejos CycD6;1/CDKs se viera enormemente disminuida hacia las 24h de la germinación, mientras que en el tratamiento con IAA no se observó esta disminución en la actividad de cinasa; estos resultados hacen evidente la respuesta diferencial a la presencia de éstos señalizadores (que no se pudo observar a nivel de proteína).

Dichos resultados son los más interesantes en este trabajo, pues como ya se había mencionado, inesperadamente se observó que los niveles de la proteína CycD6;1 se estabilizaron con ambas fitohormonas, especialmente en los últimos tiempos de estudio, sin embargo, los ensayos de actividad nos están indicando que aunque CycD6;1 y las CDKs tipo A se encuentren presentes a las 24h de germinación (Garza-Aguilar *et al.*, 2017; Godínez-Palma *et al.*, 2013; Sánchez Jiménez *et al.*, 2005), a diferencia de IAA, en el tratamiento con ABA los complejos podrían no estarse formando o son prácticamente inactivos.

Existen varios mecanismos de regulación negativa en los complejos Cyc/CDKs. Por ejemplo, la proteína WEE1 (ya también descrita en maíz) es capaz de inhibir la actividad de los complejos (Sun *et al.*, 1999; López-Hernández, datos sin publicar), o bien, por la presencia e interacción de las proteínas inhibidoras KRPs (Godínez-Palma *et al.*, 2017; De Jesús-Juárez *et al.*, 2008; Lara-Nuñez *et al.*, 2008).

En *Arabidopsis* se ha observado que el ácido abscísico promueve la expresión de la KRP1 (Wang *et al.*, 1998); por otro lado, se ha reportado que la CycD6;1 de maíz interacciona *in vitro* con KRP1;1 y

que además es capaz de inhibir la actividad de cinasa de los complejos CycD6;1/CDKs obtenidos de inmunoprecipitados en extractos de maíz (Godínez-Palma *et al.*, 2017). Las KRPs de maíz también podrían responder a fitohormonas ya que tienen elementos de respuesta en sus secuencias promotoras (Nava-Lara, datos sin publicar) y de ésta forma, podría explicar que la disminución en la actividad de cinasa asociada a la CycD6;1 sea causa de la interacción con alguna (o algunas) de las 9 KRPs de maíz.

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, la CycD6;1 es distinta a las otras 16 ciclinas D de maíz, debido a que no posee el motivo canónico de unión a RBR. Sin embargo, como ya se revisó también, la CycD6;1 es capaz de interaccionar y fosforilar (asociada a CDKs) a éste represor transcripcional. Esta propiedad puede darle una gran ventaja a la maquinaria de regulación del ciclo celular ya que, si RBR está interaccionando con otras proteínas por medio del motivo LXCXE, o por si misma adopta una conformación que deje inaccesible éste sitio, la CycD6;1 sería la única capaz de mediar la fosforilación de RBR, porque no depende de dicha marca para hacerlo.

Todo esto en conjunto pone en evidencia la gran dinámica y complejidad del ciclo celular; en todos los niveles (desde la expresión génica, síntesis/degradación de proteína, interacciones, localización celular, modificaciones postraduccionales) existe una regulación muy fina de las proteínas que orquestan la progresión de este proceso. Sin embargo, quedan muchos mecanismos por elucidar tanto en plantas, como en animales.

9.0 Conclusiones

Las fitohormonas, ABA e IAA, provocaron un cambio en el patrón de abundancia de la CycD6;1 durante la germinación de maíz, ya que ambos fitorreguladores estabilizaron los niveles de la proteína en los últimos tiempos de imbibición, respecto al control sin fitohormonas.

A pesar de no observarse una respuesta diferencial a las fitohormonas a nivel de proteína, si se encontraron patrones distintos en la actividad de cinasa asociada a la CycD6;1, y además, los patrones de fosforilación sobre histona H1 y RBR fueron diferenciales, lo que sugiere una especificidad de sustrato por los complejos CycD6;1/CDKs.

La capacidad de integrar señales del medio ambiente (como fitohormonas) y la naturaleza única de la CycD6;1 (interaccionar y mediar la fosforilación de RBR sin la necesidad del motivo LXCXE), podrían hacerle jugar un papel muy importante en la regulación del ciclo celular.

10.0 Referencias

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2008) Molecular biology of the cell, 5th edition.
- Aquino, P., Carrión, F., Calvo, R., Flores, D., Asia, S., and Asia, E. (2000). Part 4. 45–57.
- Baiza, A.M., and Sanchez-de-Jiménez, E. (1989). Effect of the auxin , 2- (2-methyl-4-chloro-phenoxy) propionic acid , on cell cycle regulation in maize embryonic tissues. 261–266.
- Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, M., and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. J. Plant Physiol. 135, 416–421.

- Beadle, G.W. (1980). The ancestry of corn. *Sci. Am.* 242 (1), 112–119.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., and Nonogaki, H. (2007). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buendía-Monreal, M. (2011). *Caracterización Filogenética Y De Expresión Génica De Las Ciclinas Tipo D De Maíz*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Buendía-Monreal, M., Rentería-Canett, I., Guerrero-Andrade, O., Bravo-Alberto, C.E., Martínez-Castilla, L.P., García, E., and Vázquez-Ramos, J.M. (2011). The family of maize D-type cyclins: Genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol. Plant.* 143, 297–308.
- Chang, B., Partha, S., Hofmann, K., Lei, M., Goebel, M., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263–274.
- Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., et al. (2012). A Bistable Circuit Involving SCARECROW- RETINOBLASTOMA Integrates Cues to Inform Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* 150, 1002–1015.
- Dewitte, W., and Murray, J.A.H. (2003). The plant cell cycle. 54, 235–264.
- Doebley, J., Stec, a, Wendel, J., and Edwards, M. (1990). Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

87, 9888–9892.

- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin - a Protein Specified By Maternal Messenger-Rna in Sea-Urchin Eggs That Is Destroyed At Each Cleavage Division. *Cell* 33, 389–396.
- Garay-Arroyo, A., Sánchez, M.D.L.P., García-Ponce, B., Azpeitia, E., and Álvarez-Buylla, E.R. (2012). Hormone Symphony During Root Growth and Development. *Wiley Period. Inc.* 241, 1867–1885.
- García, B.A., Busby, S.A., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Allis, C.D., and Hunt, D.F. (2004). Characterization of phosphorylation sites on histone H1 isoforms by tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 3, 1219–1227.
- Garcarrubio, A., Legaria, J.P., and Covarrubias, A.A. (1997). Abscisic acid inhibits germination of mature Arabidopsis seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203, 182–187.
- Garza-Aguilar, S.M., Lara-Núñez, A., Ramírez, E.G., and Vázquez-Ramos, J.M. (2016). Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physiol. Plant.*
- Garza-Aguilar, S.M., Lara-Núñez, A., García-Ramírez, E., and Vázquez-Ramos, J.M. (2017). Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physiol. Plant.*
- Godínez-Palma, S.K., García, E., Sánchez Jiménez, M.D.L.P., and Rosas, F. (2013). Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *64*, 5661–5671.
- Godínez-Palma, S.K., Rosas-Bringas, F.R., Rosas-Bringas, O.G., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J., and Vázquez-Ramos,

- J.M. (2017). Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D–cyclin-dependent kinase complexes. *J. Exp. Bot.*
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., and Del Pozo, J.C. (2002). G 1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 480–486.
 - Gutiérrez, R., Quiroz-figueroa, F., and Vázquez-ramos, J.M. (2005). Maize Cyclin D2 Expression , Associated Kinase Activity and Effect of Phytohormones During Germination. 46, 166–173.
 - Gutzat, R., Borghi, L., and Gruissem, W. (2012). Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci.* 17, 139–148.
 - Herrera, I., Sánchez, M.D.L.P., Molina, J., Plasencia, J., and Vázquez-Ramos, J.M. (2000). Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 110, 127–134.
 - Hu, X., Cheng, X., Jiang, H., Zhu, S., Cheng, B., and Xiang, Y. (2010). Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*). *Genet. Mol. Res.* 9, 1490–1503.
 - Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., Jager, S. de, Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., et al. (1998). The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.* 37, 155–169.
 - De Jesús-Juárez, N. (2008). Estudios Sobre La Proteína Ick De Maíz. 81.
 - De Jesús-Juárez, N., Mancilla-Flores, A.F., García, E., and Vázquez-Ramos, J.M. (2008). Expression and activity of a Kip-

related protein, Zeama;KRP1, during maize germination. *Seed Sci. Res.* 18, 67–75.

- Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., and Renaudin, J.-P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43, 607–620.
- Lara-Nuñez, A., De Jesus, N., and Vázquez-Ramos, J.M. (2008). Maize D4; 1 and D5 cyclin proteins in germinating maize . Associated kinase activity and regulation by phytohormones. 79–88.
- Lara-Núñez, A., García-Ayala, B.B., Garza-Aguilar, S.M., Flores-Sánchez, J., Sánchez-Camargo, V.A., Bravo-Alberto, C.E., Vázquez-Santana, S., and Vázquez-Ramos, J.M. (2017). Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination. *Plant Physiol. Biochem.* 113, 20–31.
- Lavras, U.F. De, Gardens, R.B., Place, W., and Heath, H. (2008). ABA Inhibits Embryo Cell Expansion and Early Cell Division Events During Coffee (*Coffea arabica* " Rubi ") Seed Germination. *Oxford Journals. Ann. Bot.* 425–433.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.-H., and Wolgemuth, D.J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat. Cell Biol.* 11, 1275–1276.
- Martínez de la Cruz, E. (2012). Regulación de la arquitectura de la raíz de maíz (*Zea Mays* L.) en respuesta a auxinas y su efecto sobre proteínas del ciclo celular. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Martínez de la Cruz, E., García-Ramírez, E., Vázquez-Ramos, J.M., Reyes de la Cruz, H., and López-Bucio, J. (2015). Auxins

differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings. *J. Plant Physiol.* 176, 147–156.

- Menges, M., de Jager, S.M., Gruijssem, W., and Murray, J.A.H. (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.
- Miiller, M.L., Barlow, P.W., and Pilet, P.-E. (1994). Effect of abscisic acid on the cell cycle in the growing maize root. 41, 10–16.
- Miransari, M., and Smith, D.L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99, 110–121.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131–134.
- Nieuwland, J., Menges, M., and Murray, J.A.H. (2007). The Plant Cyclins. *Cell Cycle Control Plant Dev.* 32, 31–61.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W., and Bewley, J.D. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Sci.* 179, 574–581.
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T., and Smith, O.E. (1963). Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* (80-.). 142, 1592–1593.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. 711, 697–711.
- Piperno, D.R., and Flannery, K. V (2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2101–2103.
- Del Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E., and Gutierrez, C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiol. Plant.* 123, 173–183.

- Quiroz-Figueroa, F., and Vázquez-Ramos, J.M. (2006). Expression of maize D-type cyclins: comparison , regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. 556–568.
- Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B., and Gutierrez, C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res.* 27, 3527–3533.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267–271.
- Recinos, A. (1979). *Popol Vuh. Las antiguas historias del Quiché.* México Fondo Cult. ... 1–69.
- Robertson, J.M., Pharis, R.P., Huang, Y.Y., Reid, D.M., and Yeung, E.C. (1985). Drought-induced increases in abscisic Acid levels in the root apex of sunflower. *Plant Physiol.* 79, 1086–1089.
- Robertson, J.M., Hubick, K.T., Yeung, E.C., and Reid, D.M. (1990). Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots: I. Root growth, apical anatomy, osmotic adjustment. *J. Exp. Bot.* 41, 325–327.
- Sánchez Jiménez, M. de la P., Gurusinghe, S.H., Bradford, K.J., and Vázquez-Ramos, J.M. (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* 56, 515–523.
- Sánchez Jiménez, M.D.L.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C., and Vázquez-Ramos, J.M. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* 50, 167–175.
- Sauter, M., Mekhedov, S.L., and Kende, H. (1995). Gibberellin promotes histone H1 kinase activity and the expression of cdc2

and cyclin genes during the induction of rapid growth in deepwater rice internodes. *Plant J.* 7, 623–632.

- Scanlon, M.J., and Takacs, E.M. (2009). *Handbook of Maize: Its biology.*
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., Stein, J.C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T.A., et al. (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* (80-.). 326, 1112–1115.
- Sherr, C.J. (1994). G1 Phase Progression: Cycling on Cue. *Cell* 79, 551–555.
- Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R. a, Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., and Larkins, B. a (1999). Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4180–4185.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inze, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 903–916.
- Vázquez-Ramos, J.M., and Sánchez Jiménez, M.D.L.P. (2003). The cell cycle and seed germination. 113–130.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., Claude, W., and Ma, H. (2004). Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in *Arabidopsis* and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins 1 [w]. 135, 1084–1099.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., and Fowke, L.C. (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 J.* 15, 501–510.
- Wang, H., Zhou, Y., Torres-Acosta, J.A., and Fowke, L.C. (2007).

3 CDK inhibitors. *Cell Cycle Control Plant Dev.* 62–86.

- Weinberg, R.A. (1995). The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* 81, 323–330.
- Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, action and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707–735.
- Zamora-Zaragoza, J. (2015). Caracterización De La Ciclina *Cycd6;1* De Maíz Y Sus Interacciones Con Otros Reguladores Del Ciclo Celular. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zhang, K., Letham, D.S., and John, P.C. (1996). Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200, 2–12.