



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Facultad de Química**

“Modulación de los complejos CycD3;1/CDKs por fitohormonas y sacarosa durante la germinación de maíz”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Sara Margarita Garza Aguilar

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Herminia Loza Tavera, Facultad de Química, UNAM
Dr. Félix Recillas Targa, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Enero, 2018



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.

Dedicada a la memoria de Ma. Socorro Aguilar Marmolejo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química, al Posgrado de Ciencias Bioquímicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos, supervisor del proyecto, por sus críticas constates, sus enseñanzas académicas y profesionales, su confianza y su apoyo incondicional.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Herminia Loza Tavera, el Dr. Félix Recillas Targa y el Dr. Jorge M. Vázquez Ramos que supervisó y evaluó el desarrollo de esta tesis.

A mi comité tutorial Ampliado integrado por los doctores: Roberto Coria Ortega, Carlos Leonardo Peraza Reyes, Herminia Loza Tavera, Félix Recillas Targa y Jorge M. Vázquez Ramos.

Al jurado del examen doctoral integrado por los doctores: Rocío Cruz Ortega, Eleazar Martínez Barajas, Imelda López Villaseñor, Adriana Garay Arroyo y Joseph Dubrotsky por sus revisiones, aportaciones e ideas que enriquecieron este manuscrito.

A la Dra. Aurora Lara Núñez por sus críticas, aportaciones y apoyo personal y profesional. Particularmente por el apoyo en la realización de los experimentos del efecto de sacarosa en la expresión de genes y la estabilidad de la proteína CycD3;1.

Al Dr. Elpidio García Ramírez por su apoyo técnico y críticas durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por la revisión y críticas del artículo "Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination".

Al MVZ Atonatuh E. Gómez Martínez por su asistencia técnica en la producción de los anticuerpos.

Al Biólogo Víctor A. Sánchez Camargo (cuasi doctor) por sus críticas, aportaciones y apoyo técnico en la edición de imágenes.

Al "Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado" (PAEP) por el apoyo para la asistencia a los congresos *The Cell Signaling Networks Conference* (2011) y *XV Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la SMB* (2013).

Durante la realización de este trabajo conté con una beca otorgada por el CONACyT.

Este trabajo se realizó con el financiamiento obtenido de los proyectos CONACyT CB220661 y 252001, PAPIIT IN215316 y IA204817 y PAIP 5000-9124 y 5000-9130.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	11
Semillas y Germinación.....	11
Ciclo celular.....	15
CDKs y Ciclinas de plantas.....	17
Transición G1/S	19
Proteínas del ciclo celular	22
Fitohormonas y Azúcares	23
Auxinas.....	24
Ácido abscísico	25
Sacarosa y Glucosa	26
ANTECEDENTES INMEDIATOS	28
JUSTIFICACIÓN.....	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
METODOLOGÍA.....	33
RESULTADOS.....	39
I. Asociaciones de CycD3;1 con CDKA, CDKB1;1 y PCNA.	39
La proteína CycD3;1 de maíz.....	39
Complejos CycD3;1/CDKs durante la germinación de maíz.	42
Masa Molecular de complejos CycD3;1/CDKs durante la germinación	45
II. Los complejos CDKs/CycD3;1 son modulados por fitohormonas y sacarosa.....	49
Efecto de fitohormonas (IAA y ABA)	49
Efecto de las fitohormonas (IAA y ABA) en los complejos CycD3;1/CDKs	50
Efecto de la Sacarosa en los complejos CycD3;1/CDKs	53
La estabilidad de la proteína CycD3;1 es modulada por sacarosa durante la germinación.....	56
DISCUSIÓN.....	58
La CycD3;1 de maíz y sus asociaciones con CDKA, CDKB1;1 y PCNA	59
Complejos CycD/CDKs modulados por fitohormonas y sacarosa	62

CONCLUSIONES.....	67
PERSPECTIVAS	68
REFERENCIAS	69
ANEXOS.....	77

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Índice de figuras

Figura	Nombre de la figura
1	Estructura de la semilla de maíz.
2	Fases de la germinación de semillas respecto al contenido de agua.
3	Ciclo celular.
4	Transición G1/S del ciclo celular en plantas.
5	Estructura de las fitohormonas.
6	Efecto de señales del desarrollo en el ciclo celular durante la germinación.
7	Validación del anticuerpo anti-CycD3;1.
8	Acumulación de la proteína CycD3;1 durante la germinación.
9	Asociación de CycD3;1 de maíz con CDKA y CDKB1;1.
10	Asociación de PCNA con CycD3;1, CDKA y CDKB1;1.
11	Competencia de proteínas detectadas por anti-PCNA.
12	PCNA es un homotrímero.
13	Co-elución de CycD3;1, CDKs y PCNA en complejos de diferente masa molecular.
14	Efecto de la sacarosa y las fitohormonas IAA y ABA en la morfología, masa y longitud de ejes embrionarios.
15	Efecto de IAA y ABA en los niveles de proteína de CycD3;1, CDKA y CDKB1;1 durante la germinación.
16	Efecto de IAA y ABA en la actividad de cinasa asociada a la CycD3;1 durante la germinación.
17	Efecto de la sacarosa en los niveles de proteína de CycD3;1, CDKA y CDKB1;1 durante la germinación.
18	Efecto de la sacarosa en la actividad de cinasa asociada a la CycD3;1 durante la germinación.
19	Regulación de la estabilidad de la CycD3;1 por sacarosa durante la germinación.

- 20 Modelo de la presencia de complejos CycD3;1/CDKs-PCNA en el transcurso de la germinación.
- 21 Modelo del efecto de IAA y ABA en los complejos CycD3;1/CDKA(B1;1).
- 22 Modelo del efecto de sacarosa en los complejos CycD3;1/CDKA(B1;1).

Índice de Tablas

Tabla	Contenido de la tabla
1	Número de genes relacionados con el ciclo celular de diferentes organismos.
2	Oligonucleótidos.
3	Esquema de inmunización.
4	Títulos de anticuerpos usados.

Índice de Figuras Anexas

Anexo	Contenido del anexo
1	Secuencia antigénica de CycD3;1 de maíz.
2	Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-CycD3;1.
3	Inmunodetección de la proteína recombinante GST-CycD3;1 por suero inmune (anti-CycD3;1).
4	Calibración de la columna y Perfil de elución de extractos de 0, 12 y 24 h de germinación.
5	Secuencia antigénica de CycD3;1 y alineamiento con las otras CycD de maíz.
6	Imágenes completas de los IPs de la figura 9.
7	Imágenes completas de los IPs de la figura 10.
8	Control de carga de las figuras 15 y 17.
9	Efecto de sacarosa en la expresión de genes <i>CycD3;1a</i> y <i>CycD3;1b</i> de maíz en la germinación.
10	Artículos científicos publicados durante este estudio

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABA	Ácido abscísico
BA	Benziladenina
CDK	Cinasa dependiente de Ciclina
CKS	Subunidad de CDK
Cyc	Ciclina
ES	Error estándar
GST	Glutación-S-transferasa
IAA	Ácido indolacético
IP	Inmunoprecipitar
MW	Marcador de masa molecular
MPF	Factor promotor de mitosis
Nt	Nucleótidos
Suc	Sacarosa
Zeama	<i>Zea mays</i> (maíz)

RESUMEN

La germinación comprende un proceso de entrada de agua a la semilla que implica el paso de un estado metabólico inactivo a uno activo, así como el reinicio del ciclo celular. Estos eventos son necesarios para el establecimiento de la plántula, desarrollo y formación de una nueva generación de semillas. Además, la germinación es un proceso regulado por condiciones ambientales y hormonales, lo que implica que dichas señales también afectan el ciclo celular. La germinación de maíz es regulada positivamente por fitohormonas como citocininas, IAA y tratamientos como osmocondicionamiento, mientras que es inhibida por ABA.

Las ciclinas D son las proteínas que integran la señalización desencadenada por condiciones medioambientales y su función consiste en asociarse con una cinasa dependiente de ciclina que activará el inicio y la progresión del ciclo celular. En la germinación de maíz se activa la expresión de genes de ciclinas D, y dicha expresión se modifica por señales del desarrollo como la presencia de fitohormonas. Entre los genes de ciclinas D afectados están los de *CycD3;1* de maíz que son regulados a nivel transcripcional por IAA y ABA.

En este trabajo se desarrolló un anticuerpo policlonal específico para estudiar a la proteína *CycD3;1* de maíz. Esta proteína se acumula en las primeras horas de germinación y se asocia a CDKA y CDKB1;1 formando complejos con actividad de cinasa sobre histona H1. *CycD3;1* y las CDKs también interactúan con PCNA, lo que indica que complejos heterodiméricos *CycD3;1*/CDKs pueden asociarse al homotrímero de PCNA en la germinación. Estos complejos parecen formar parte de complejos de masa molecular mayor a la del heterodímero, que varían en tamaño conforme a la progresión de la germinación, sugiriendo asociaciones con diferentes conjuntos de proteínas, además de PCNA.

Para evaluar el efecto de las fitohormonas (IAA y ABA) y de una fuente carbonada como sacarosa en la expresión de *CycD3;1* y su asociación con CDKs en la germinación de maíz, ejes embrionarios fueron embebidos en presencia y ausencia de dichas hormonas o de sacarosa.

En presencia de IAA, los niveles de la proteína *CycD3;1* disminuyen a las 18 h de imbibición, mientras que con ABA no se observaron diferencias significativas. Los niveles

de CDKA incrementan en presencia de IAA y disminuyen en presencia de ABA, mientras que los niveles de CDKB1;1 aumentan cuando se adicionan ambas fitohormonas, IAA y ABA, en las primeras horas de germinación. La actividad de cinasa asociada a la CycD3;1 se reduce solamente a las 24 h de germinación en presencia de ambas fitohormonas, aunque probablemente los mecanismos involucrados sean diferentes como se revisará en la discusión.

Por otro lado, cuando ejes embrionarios son embebidos en un medio sin sacarosa se reducen fuertemente los niveles de CycD3;1, pero no se afectan los de CDKA y CDKB1;1; por lo tanto, la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 es severamente disminuida. La estabilidad de la proteína CycD3;1 parece ser regulada por sacarosa en la germinación.

ABSTRACT

Seed germination starts after imbibition in water which triggers metabolic processes that allow cells in embryo axes to undergo the first round of cell division. Cyclin proteins are regulatory subunits of cyclin-dependent kinases (CDK); together, they play fundamental roles in cell cycle control. Like in mammals, plant D-type cyclins are required for re-entry into the cell cycle in response to extracellular signals (nutrients and hormones), and there are several types of these cyclins. The role of CycD3;1 for cell proliferation and development in *Arabidopsis* and tobacco has been established. However, knowledge in maize is scarce. Maize CycD3;1 associates to CDKA, CDKB1;1 and PCNA proteins during germination and the complexes formed develop kinase activity. These complexes appear to vary in size as germination proceeds, suggesting association to different sets of proteins. CycD3;1 and associated CDK proteins respond to phytohormones and sucrose. Results revealed a reduction in the CycD3;1 protein amount during germination in the presence of indoleacetic acid (IAA) or abscisic acid (ABA), although in the latter protein levels recovered at the end of germination. While the levels of CDKA increase in the presence IAA, these decrease in the presence ABA. Both phytohormones, IAA and ABA, increase levels of CDKB1;1 only during the early germination times. CycD3;1 associated kinase activity is reduced by both phytohormones towards the end of the germination period. On the other hand, lack of sucrose in the imbibition medium strongly reduces CycD3;1 protein levels without affecting the levels of either CDKA or CDKB1;1. The corresponding CycD3;1 associated kinase activity is also severely decreased. The presence of sucrose in the medium appears to stabilize the CycD3;1 protein levels.

INTRODUCCIÓN

Semillas y Germinación

Importancia del maíz

El maíz es la especie más importante de México, su domesticación, hace miles de años la convirtió en una planta apta para proporcionar a los grupos humanos cantidades de granos suficientes para alimentarse, a lo que contribuye el descubrimiento, también milenario, de los diferentes modos de prepararlos que sacan provecho de sus bondades nutritivas. Durante la época prehispánica fue tal su importancia en la dieta, que puede considerarse uno de los factores que propiciaron el tránsito de sociedades nómadas de cazadores recolectores a otras de agricultores sedentarios, de hecho, del maíz derivaron gran parte de las características económicas, sociales y religiosas de los pueblos mesoamericanos. Hoy en día sigue siendo el principal alimento de los mexicanos (Vela, 2011).

Alrededor del 70% del alimento para consumo humano proviene de las semillas (principalmente de cereales y leguminosas) y una gran proporción del resto es derivado de animales alimentados de éstas. Por ello existe una gran cantidad de literatura respecto a las propiedades químicas, estructurales y composición nutricional de semillas cultivadas que constituyen parte importante de nuestra fuente de alimentos y proporcionan muchas materias primas para la industria.

Además de los componentes químicos comunes a los de los tejidos de la planta, las semillas contienen cantidades extras de sustancias almacenadas (carbohidratos, lípidos y proteínas) como fuente de reservas de alimentos durante el desarrollo temprano de la planta.

La composición química de las semillas es determinada por factores genéticos y varía ampliamente entre especies y sus variedades y cultivos. Algunas modificaciones en la composición pueden resultar de prácticas agronómicas o condiciones ambientales prevalentes durante el desarrollo de la semilla y la maduración. Recientemente, la ingeniería genética provee de considerable investigación para la modificación y mejora de la calidad y cantidad de reservas almacenadas (Bewley et al. 2012).

Semillas de maíz

En todas las espermatofitas, las semillas se forman a partir de una fertilización, produciendo un cigoto diploide que se diferencia en un embrión y formará una planta (Bewley et al. 2012).

El maíz es una especie nativa de México, es una planta fanerógama del subtipo de las angiospermas monocotiledóneas, pertenece a la familia de las poáceas (gramíneas), es un integrante de la tribu Maydae, específicamente del género *Zea* y cuya especie *mays*, es la de mayor importancia nutricional en México.

Aunque se considera inferior a otros cereales en cuanto a sus propiedades nutrimentales, su grano es una excelente fuente de carbohidratos, debido a su alto contenido de almidón (80%). Además, la semilla de maíz como muchas otras, posee un contenido bajo de agua (aproximadamente el 10%), lo que implica un metabolismo reducido o nulo (Bewley et al. 2012).

Morfológicamente, una semilla de maíz está constituida por tres estructuras básicas: cubierta seminal o pericarpio, endospermo y embrión (Figura 1).

La cubierta seminal o pericarpio se considera una de las estructuras más importantes de la semilla, ya que de su composición y permeabilidad depende la interacción de la semilla con el medio ambiente y la conclusión de la germinación con éxito. El endospermo y el embrión son delimitados por el pericarpio. Esta estructura consiste en la capa más externa transparente del grano, derivada de la pared del ovario. En el extremo apical del grano, sobre el pericarpio se puede identificar el hilio; mientras que del extremo basal del grano emerge el pedúnculo (Figura 1) (Bewley et al. 2012, Vincent, 2002).

El endospermo es la capa que rodea al embrión, contribuye con aproximadamente el 85% de la masa del grano de la semilla y funciona como la reserva energética del embrión durante algunos días después de la germinación. Estas reservas se encuentran en forma de granos de almidón y cuerpos proteicos intracelulares. La capa más externa del endospermo llamada aleurona comprende una sola capa de células especializadas y es la única parte capaz de producir pigmentos (Figura 1) (Vincent, 2002).

El embrión consiste de un eje embrionario y su escutelo. El eje contiene en su extremo basal la radícula (raíz primaria embrionaria) y en el extremo apical el ápice del tallo (que dará lugar al tallo). El escutelo (considerado como equivalente al cotiledón) está unido por el nodo escutelar y su función es digerir y absorber al endospermo durante la germinación. El coleoptilo (estructura tipo hoja) actúa como una cubierta para la plúmula, la cual se convertirá en el tallo y las hojas de la planta. El primer internodo del tallo (mesocotilo), entre los nodos del escutelo y coleoptilo, se elonga durante la germinación y sirve (de base) para levantar el coleoptilo. El meristemo apical de la raíz (RAM, que formará la raíz primaria) está envuelta por una estructura llamada coleorriza (Figura 1).

El eje embrionario es el tejido que formará la planta adulta, el cual está compuesto por (Figura 1):

- 🌱 la radícula (raíz embrionaria),
- 🌱 la caliptra (tejido que recubre el meristemo radicular),
- 🌱 la coleorriza (tejido que cubre la caliptra, raíz primaria suprimida),
- 🌱 la plúmula (tejido que se convertirá en el tallo y las hojas de las plantas) y finalmente,
- 🌱 el coleoptilo, que en el eje embrionario es el sitio al que se une el escutelo.

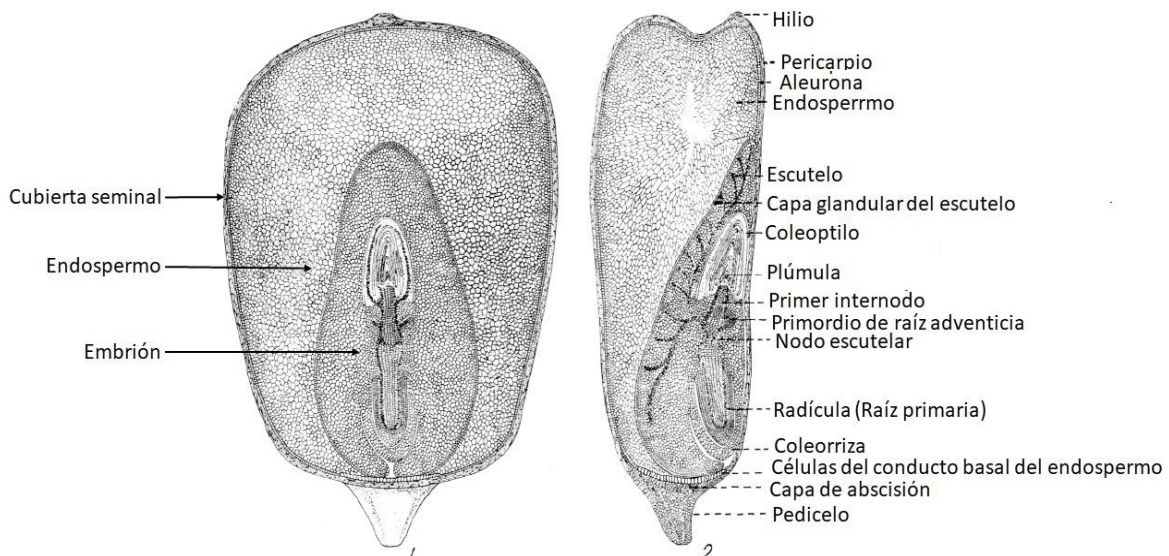


Figura 1. Estructura de la semilla de maíz. Secciones verticales de un grano de maíz visto de frente y de lado (Modificado de Coe EH, 2001).

Germinación

La germinación involucra el despertar metabólico de una semilla latente y la reanudación del desarrollo para el establecimiento de una nueva planta y el origen de nuevas semillas. De forma clásica, la germinación se define como un proceso que inicia con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la emergencia del eje embrionario, usualmente la radícula, a través de las estructuras que lo rodean, “germinación visible” (Bewley et al. 2012). Para nuestro estudio, la germinación es definida como un proceso que inicia con la imbibición o entrada de agua a la semilla que desencadena la activación metabólica y molecular, seguidas de la elongación celular de los tejidos de la semilla y culmina con la primera ronda exitosa de divisiones celulares, siendo la germinación un proceso preparativo para el posterior desarrollo y proliferación de las células en los tejidos que más adelante formarán la planta (Vázquez-Ramos & Sánchez 2003).

En sentido estricto, la germinación no incluye el crecimiento de la plántula, éste comienza cuando la germinación termina. Cuando una semilla seca es embebida, una cadena de eventos metabólicos y moleculares inicia conforme aumenta el contenido de agua en la semilla, para que la germinación se complete y se establezca la plántula (Figura 2). Los cambios celulares que ocurren son complejos. La primera fase (I) inicia con una absorción rápida de agua como un proceso físico que activa el metabolismo que permite la recuperación de daños estructurales debidos al proceso de maduración de la semilla y oxidación, lo cual implica reestructuración y reparación de membranas, DNA, mitocondrias y ribosomas. También inicia la síntesis de proteínas a partir de mRNAs pre-existentes y se reestablecen actividades celulares basales. Durante la segunda fase (II) el contenido de agua es constante y las actividades metabólicas se incrementan: hay movilización de reservas, transcripción de nuevos genes, síntesis de proteínas derivadas de nuevos mRNAs y replicación de DNA (Fase S del ciclo celular). En la fase III (o post-germinación) se presenta una nueva entrada de agua a medida que la plántula se establece utilizando las principales reservas almacenadas (Bewley et al. 2012).

Los procesos moleculares descritos en las primeras horas de la germinación como transcripción de genes y síntesis de proteínas sugieren que hay un momento preparativo de la fase G1, seguido de la síntesis de DNA; ambos incluyen eventos que indican el progreso del ciclo celular, el cual es determinante para una germinación exitosa y el establecimiento de la planta.

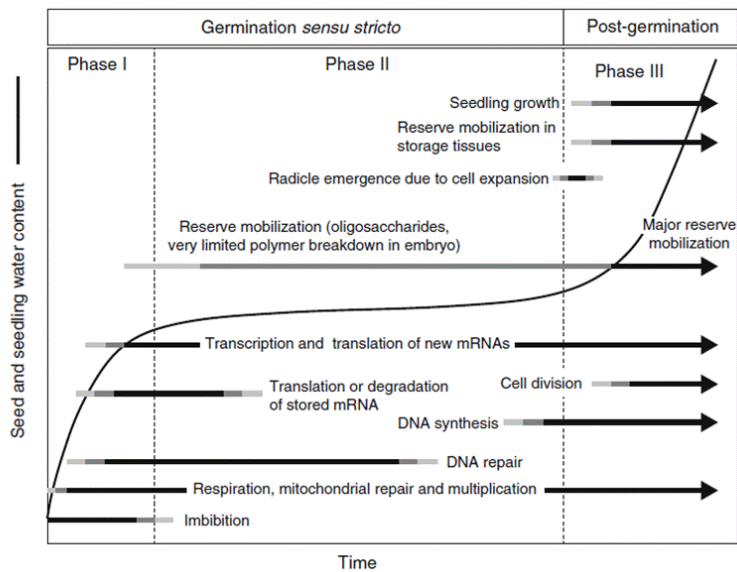


Figura 2. Fases de la germinación de semillas respecto al contenido de agua (Bewley et al. 2012).

Ciclo celular

El ciclo celular típico es una serie de eventos moleculares coordinados y unidireccionales cuya función es la duplicación del DNA para la generación de una nueva célula a partir de una existente, cada una, con una copia idéntica de material genético. En este proceso se identifican dos etapas: la interfase y la mitosis (Figura 3). La interfase comprende tres fases: G1, S y G2. Durante la fase G1 (Gap1), la célula percibe las condiciones ambientales (nutrientes y hormonas) que desencadenan señales para que ésta se prepare a iniciar el ciclo celular y se comprometa a la siguiente fase. La fase S (Síntesis) o fase replicativa, es donde se lleva a cabo la duplicación del material genético el cual será repartido en dos nuevas células. En la fase G2 (Gap2) se verifica que la duplicación del DNA se realizó de manera completa y sin errores. Finalmente, en la fase M o mitosis se lleva a cabo la segregación de cromátidas en dos células que serán genéticamente idénticas (Alberts et al. 1994, Vázquez-Ramos, 2003).

La mitosis sucede en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase/citocinesis. Durante la profase ocurre la ruptura de la membrana nuclear y la condensación de cromatina para formar los cromosomas (cromátidas hermanas unidas por el centrómero). En la metafase, los cromosomas se localizan en el plano ecuatorial de la célula mediante el huso mitótico. En anafase, las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula. Finalmente, en la telofase, las dos nuevas envolturas

nucleares rodean a cada juego de los cromosomas separados, éstos se descondensan y expanden en el nuevo núcleo generando dos células hijas mediante un proceso denominado citocinesis (Alberts et al. 1994, Magyar et al. 2013).

Durante el ciclo celular existen tres puntos principales de control: (1) la entrada a fase S (transición G1/S), (2) la entrada a mitosis (transición G2/M) y (3) la salida de mitosis (el paso de metafase a anafase). El progreso del ciclo celular es regulado por la actividad de cinasa de complejos proteicos heterodiméricos formados por una sub-unidad catalítica, denominada cinasa dependiente de ciclina (CDK) y una sub-unidad regulatoria, llamada ciclina (Cyc). Los complejos Cyc/CDKs son los encargados de fosforilar una gran variedad de proteínas blanco que controlan las transiciones de G1/S, de G2/M y de metafase a anafase durante la mitosis (Alberts et al. 1994, Magyar et al. 2013).

En levaduras, la regulación de las tres transiciones es mediada por la actividad de cinasa de solo una enzima CDK. En animales y plantas superiores, el avance del ciclo celular es más complejo debido al gran número de genes reguladores de ciclo celular como CDKs y Cycs contenidos en sus genomas (Tabla 1) (De Clerq & Inzé, 20006, Magyar et al. 2013). Esto sugiere que existe una dinámica y diversidad de formación (ensamble y desensamble) de heterodímeros Cyc/CDK más compleja en el progreso y regulación del ciclo celular.

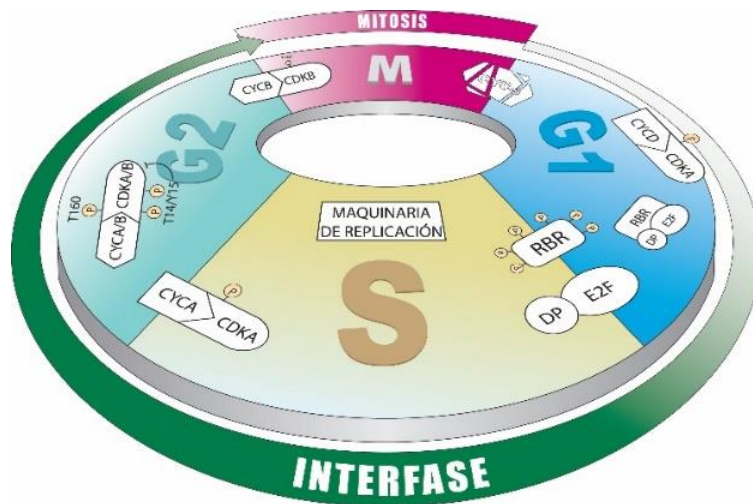


Figura 3. Ciclo Celular. Esquema general del ciclo celular, sus fases y los principales componentes que participan en cada fase. Cyc, ciclina; CDK, cinasa dependiente de ciclina; RBR, proteína relacionada a Retinoblastoma; E2F/DP, factores de transcripción (Modificado de Garza-Aguilar et al. 2014).

CDKs y Ciclinas de plantas

Las CDKs fueron descritas por primera vez cuando su actividad de cinasa mostró ser el componente activo del factor promotor de mitosis (MPF), es decir, el componente proteico que conduce una célula de interfase a mitosis (Gautier et al. 1988). Por el mismo tiempo, estudios genéticos que utilizaron mutantes del ciclo de división celular de las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae* definieron una CDK, producto de los genes *cdc2/CDC28* como reguladores maestros de la progresión del ciclo celular (Hartwell et al. 1974, Vázquez-Ramos, 2003, Doonan & Kitsios, 2009).

Las CDKs son proteínas cinasas de serinas y treoninas (Ser/Thr) y en plantas se clasifican en 8 grupos de acuerdo al motivo de unión a la ciclina: de CDKA a CDKG y CDKL (Vandepoele et al. 2002, Menges et al. 2005). No todas las CDKs están directamente involucradas en el control del ciclo celular en plantas, dos grupos principales son los más estudiados, las CDKs tipo A y B (Menges et al. 2005, Inze & De Veylder, 2006).

El grupo de CDKAs se caracteriza por presentar un motivo canónico, conocido como PSTAIRE, de unión a ciclina, altamente conservado y estructuralmente homólogo a las proteínas cinasas CDK1/p34cdc2 de mamíferos y levaduras, respectivamente (Vandepoele et al. 2002, Inzé, 2007). En estudios del ciclo celular de distintas especies vegetales, los niveles de CDKAs tanto de transcrito como de proteína son constantes en todas las fases del ciclo celular, sugiriendo una función dual de la proteína tanto en la progresión de la fase S como en el paso a la mitosis. Esto indica que las CDKAs tienen un papel preponderante en la proliferación celular durante el desarrollo de la planta (Inzé, 2007). Estas cinasas se asocian a ciclinas tipo D, A y B (Pines, 1995).

Las CDKs tipo B son específicas de plantas ya que carecen de homólogos en levaduras y mamíferos. Éstas poseen un motivo de unión a ciclinas divergente, PPTALRE para CDKB1 o PPTTLRE para CDKB2 (Magyar et al, 1997). Durante el ciclo celular de distintas especies vegetales, el gen de *CDKB* se expresa desde la fase S tardía hasta la transición de G2/M, lo que ha sugerido que actúa en dichas etapas. Estas proteínas cinasas se unen a las ciclinas tipo A o B (Inzé, 2007, Magyar et al. 2013).

El estado de fosforilación de las CDKs es fundamental para la actividad del complejo que forman (Pines, 1995). Su activación está determinada por la fosforilación de un residuo de

treonina conservado en la zona central de la proteína (Treonina 160), mientras que la inhibición se da por la fosforilación de un residuo de treonina o de un residuo de tirosina en la región amino terminal (Treonina 14 y Tirosina 15).

Las ciclinas (Cyc, subunidad regulatoria de las CDKs) denominadas así porque se acumulan y degradan cíclicamente durante el ciclo celular, son el principal factor que determina el tiempo de actividad de las CDKs (Pines, 1995). Regulan la especificidad del sustrato de complejos Cyc/CDK y dirigen a la CDK a un espacio subcelular. Las ciclinas son proteínas típicamente inestables, con un alto número de recambio y vida media corta, ya que algunas poseen una caja de destrucción, y un motivo denominado PEST, que las marca para ser degradadas por el proteasoma 26S, y por lo tanto les confiere inestabilidad (Tyers et al. 1992). Dependiendo de la similitud estructural y de los patrones de acumulación periódicos durante el ciclo celular, estas proteínas se agrupan en ciclinas de G1 (tipo D en eucariontes superiores) y ciclinas mitóticas (tipos A y B) (Pines, 1995, Inzé & De Veylder, 2006).

En plantas existen cinco clases de ciclinas de acuerdo con su similitud con las de mamíferos: A, B, C, H y L, y siete clases exclusivas de plantas: CYL, SDS, D, Q, T, P y F. Las más estudiadas durante la regulación del ciclo celular son las tipo A, B y D (Vandepoele et al. 2002, Inzé & De Veylder 2006). Las ciclinas tipo A pueden interactuar con CDKA y CDKB, actuando en la fase S y en la transición G2/M; las ciclinas tipo B controlan la progresión del ciclo celular durante la mitosis, y se asocian con CDKBs (Van Leene et al. 2010). Las ciclinas tipo D de plantas, así como las de mamíferos y levaduras son fundamentales en el inicio o re-inicio del ciclo celular por las señales que desencadenan en respuesta a señales externas como fitohormonas, factores de estrés, tipo y concentración de azúcares, y a señales internas como velocidad de crecimiento o tamaño de la célula. Se asocian con CDKA y actúan en G1 y en la transición G1/S (Figura 4).

Estructuralmente las Cyc D contienen una región conservada de 250 aminoácidos denominada caja de Ciclina (Hunt, 1991) que consiste de dos dominios: el N-terminal que comprende una región de unos 100 residuos de aminoácidos conservados (caja de ciclina), y el C-terminal, menos conservado y a veces ausente en algunas ciclinas. Además, casi todas presentan el motivo conservado LxCxE (donde x representa cualquier residuo de aminoácido) cerca del extremo amino terminal, el cual es responsable de la

interacción con la proteína RBR, sustrato de complejos CycD/CDKA en la transición G1/S (Inzé & De Veylder, 2006).

Regulación de complejos Cyc/CDKs

Los complejos Cyc/CDKs son regulados a diferentes niveles: a nivel de expresión de genes, nivel pos-transcripcional, presencia de la proteína, modificaciones post-traduccionales, localización sub-celular, y la interacción con otras proteínas.

Se han descrito varias proteínas que se asocian directamente al complejo CycD/CDK y que están involucradas en su regulación: la proteína CKS (subunidad de CDK) que actúa como factor de acoplamiento del sustrato al complejo (Vandepoele et al. 2002); proteínas inhibitoras de CDKs (ICK), conocidas como KRPs en plantas que se unen e inhiben a los complejos en respuesta a señales de desarrollo y anti-mitógenos (De Clerq & Inzé, 2006); cinasas que fosforilan en sitios específicos que activan o inhiben a la CDKs como CAK (Cinasas activadoras de CDKs) y WEE1 respectivamente, y fosfatasa como CDC25 en animales (No se ha identificado un homólogo en plantas) entre otras (Pines, 1994). PCNA es otra proteína que se asocia a estos complejos, pero aún no se entiende el papel de esta interacción en la regulación del ciclo celular (Magyar et al. 2013, Inzé & De Veylder, 2006).

Transición G1/S

El ciclo celular es un importante punto de control en el crecimiento y desarrollo de eucariontes, donde los mecanismos moleculares básicos se conservan entre levaduras, animales y plantas; pero cada organismo presenta sus peculiaridades.

Las células en G1 perciben señales extracelulares (como nutrientes, factores de crecimiento u hormonas) que activan la expresión de genes de *CycD* (Cyc de G1), lo que desencadena que se acumule la proteína y consecuentemente se forma un complejo heterodimérico CycD/CDK. Una vez formado el complejo activo, puede fosforilar sus sustratos provocando que se inactiven los inhibidores de CDKs y se active la transcripción de genes cuyas funciones son requeridas para la transición de G1/S (como alguna CycD

con función homóloga a CycE de animales) y la progresión a fase S (Magyar et al. 2013, Inzé & De Veylder, 2006).

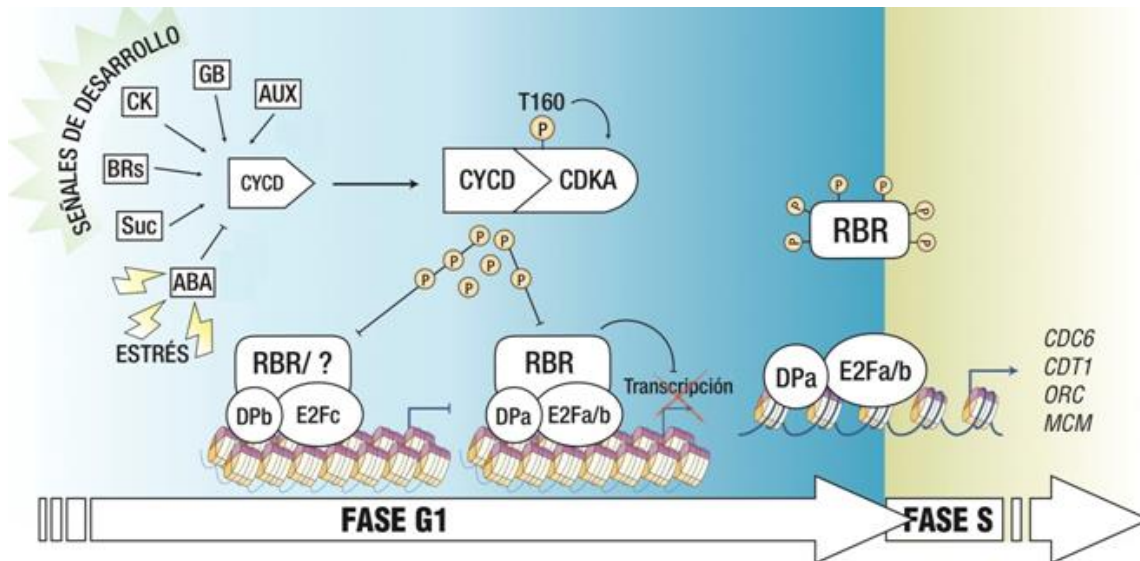


Figura 4. Transición G1/S del ciclo celular en plantas. Los transcritos y las proteínas de ciclinas se acumulan durante G1 en respuesta a fitohormonas y nutrientes, así como a la velocidad de crecimiento o el tamaño celular. Conforme avanza esta fase se forman complejos CycD/CDKA y son activados. En G1 tardía, RBR que reprime al factor transcripcional E2F, es hiperfosforilado por complejos CycD/CDKs, provocando la pérdida de afinidad por E2F y la disociación de los mismos activando por consecuencia, la transcripción de genes requeridos en el avance de la fase S (Modificado de Garza-Aguilar et al. 2014).

En plantas, durante la fase G1, los transcritos y proteína de CycD se acumulan en respuesta a señales extracelulares, lo cual provoca que se formen complejos CycD/CDKA activos conforme avanza esta fase. En G1 tardía la proteína RBR, la cual mantiene reprimido al factor transcripcional E2F, es hiperfosforilada por complejos CycD/CDKA, ocasionando la pérdida de afinidad por E2F, se disocia de éste, y consecuentemente se activa la expresión de genes necesarios para el establecimiento y avance de la fase S (Figura 4) (Doonan & Kitsios, 2009).

Los genomas vegetales codifican, en general, para un mayor número de genes que los genomas animales, lo que origina una mayor cantidad de proteínas del ciclo celular. Esto genera una alta complejidad, tanto en asociaciones como en mecanismos de regulación. Algunos de estos genes y proteínas son únicos en plantas, reflejando así la alta plasticidad que las especies vegetales requieren para enfrentarse a un estilo de vida sésil (Tabla 1).

Tabla 1. Número de genes relacionados con el ciclo celular que pertenecen a cada familia génica en diferentes organismos.

Genes	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (levadura)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura)	Mamíferos	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	<i>Zea mays</i> (Maíz)	Descripción
Cdc2/Cdk A	1 (<i>cdc2</i> ^Φ)	1 (<i>cdc28</i> ^Φ)	2 (<i>cdk1</i> y <i>cdk2</i>)	1	3	3	Cinasas de serina y treonina caracterizadas por la secuencia PSTAIRE en el motivo de unión a ciclina.
CdkB	NH	NH	NH	4	2	3	Cinasas de serina y treonina, únicas de plantas, caracterizadas por la secuencia PPTALRE/PPTTLRE.
CycA	NH	2	2	10	7	11	Ciclinas que forman complejos con CDKs durante fase S y en la transición G2/M.
CycB	1	4	3	11	7	10	Ciclinas que forman complejos con CDKs durante las transiciones G2/M e intramitóticas.
CycD	2	3	3	10	14	17	Ciclinas de G1 cuya transcripción es activada por señales extracelulares.
RB/RBR	NH	NH	3	1	2	4	Proteína que actúa como represor transcripcional de E2F durante la transición G1/S.
E2F	NH	NH	8	3	5	8*	Factores de transcripción que activan genes de ciclo celular durante la transición G1/S, principalmente.
DP	NH	NH	3	2	3	4*	Socio de dimerización de E2F.
ICK/KRP	1	3	7 (4 <i>INK</i> ^Φ y 3 <i>ICK</i> ^Φ)	7	6	9	Familia de proteínas inhibidoras de complejos CYC/CDK.
PCNA	1	1	1	2	1	2	Proteína de unión a ADN que se asocia a complejos CYCD/CDK.

^Φ Nombre del homólogo en la especie; NH, no existen homólogos. *Sánchez-Camargo, datos sin publicar.

Proteínas del ciclo celular

PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína identificada inicialmente en sueros de pacientes con lupus eritomatoso, después fue descrita como una proteína esencial durante la replicación del DNA, aunque también participa en otros procesos del metabolismo de DNA como reparación y remodelación. Además, interacciona con proteínas clave del ciclo celular como son las ciclinas D y CDKs. El análisis de PCNAs de diferentes especies (mamíferos, insectos y plantas) mostró que es una proteína altamente conservada a nivel de secuencia, estructura y función (Strzalka et al. 2011).

RBR

La proteína retinoblastoma o RB (pRB) fue descubierta por la identificación de mutaciones en diferentes posiciones de ambos alelos de un gen en tumores de retina, esto dio nombre a su producto. Posteriormente, fue descrita como una proteína supresora de tumores que regula los procesos de proliferación. En plantas la vía E2F/RB se conserva, y el homólogo de pRB es conocido como proteína relacionada a RB (RBR). Esta proteína reprime la actividad de los factores de transcripción E2F/DP durante fase G1 y es blanco de fosforilación de los complejos Cyc/CDKs para permitir el avance hacia fase S (Figura 4). Además de participar en el ciclo celular, también tiene una función reguladora en procesos de diferenciación y desarrollo (Sabelli et al. 2013).

De acuerdo con estudios filogenéticos, funcionales y de expresión de genes, la familia de genes *RBR* de cereales es más compleja que la de otras plantas. *Arabidopsis* sólo cuenta con un gen de *RBR*, mientras que en gramíneas existen al menos dos clases de genes *RBR*: *RBR1* y *RBR3*. En el genoma de maíz se conocen otros dos parálogos, *RBR2* y *RBR4*. El estudio de los dos tipos de proteínas RBR de maíz muestra que éstas se acumulan en distintas etapas de desarrollo. La proteína RBR3 participa en proliferación celular y la proteína RBR1 en procesos de diferenciación y endoreduplicación (Sabelli et al. 2005).

Inhibidores de complejos Cyc/CDKs

Las proteínas relacionadas a KIP/CIP o KRPs (nombradas así por mantener el dominio de inhibición ICK de mamíferos conservado en el extremo C-terminal), son inhibidores de complejos Cyc/CDKs de plantas, aunque también se ha encontrado que participan en el importe a núcleo de otras proteínas del ciclo celular. Esta familia de proteínas se ha aislado tanto en especies de plantas del grupo de monocotiledóneas como en dicotiledóneas (De Clerck et al. 2006, Godínez-Palma et al. 2017). La sobreexpresión de miembros de KRP resultó en fenotipos comunes, como reducción del tamaño de las plantas, disminución del número de células y células alargadas, corroborando que las KRPs funcionan como proteínas inhibitoras de ciclo celular, probablemente a nivel de las transiciones G1/S como G2/M (Torres-Acosta et al. 2011).

En *Arabidopsis* se han descrito 7 genes que codifican para KRPs (Wang et al. 1997) y el interactoma mostró que ellas co-purifican específicamente con ciclinas tipo D y CDKA;1, sugiriendo que sólo inhiben a estos complejos (Van Leene et al. 2011), mientras que en maíz se identificaron 9 genes de KRPs (Godínez-Palma et al. 2017) de los cuales KRP1;1 y KRP4;2 son capaces de inhibir la actividad de cinasa asociada a CycD2;2, CycD;4;2 y CycD5;3 (Lara-Núñez et al. 2008) y sólo KRP1;1 fue capaz de inhibir la actividad cinasa asociada a CycD6;1. Interesantemente, estas proteínas también parecen ser sustratos de complejos CycD/CDKs (Godínez-Palma et al. 2017) y dichas fosforilaciones parecen regular diferencialmente la actividad de dichos inhibidores.

Otra familia de inhibidores específicos de CDKs de plantas, son las proteínas *SIAMESE* (SIM) y *SIAMESE related* (SMR), que se han identificado en arroz, maíz, tomate, *Arabidopsis* entre otras y recientemente en el interactoma de *Arabidopsis* se observó que se unen a CDKA y CDKB, sugiriendo que pueden estar inhibiendo complejos de CDKAs ó CDKBs con ciclinas (Van Leene et al. 2011).

Fitohormonas y Azúcares

Las hormonas de plantas (fitohormonas) son estímulos endógenos clave en el desarrollo de las plantas que afectan su crecimiento en concentraciones pequeñas. Son sustancias pequeñas de naturaleza química y estructura diversas. Regulan el crecimiento y

desarrollo de las plantas en respuesta a estímulos ambientales externos a través de complejas vías de transducción de señales, que a su vez se relacionan con el control de proliferación y diferenciación celular. Se conocen como fitohormonas clásicas a las auxinas, ácido absísico, citocininas, giberelinas y etileno (Bewley et al. 2012), y recientemente, otros compuestos también se consideran hormonas, incluyendo brasinoesteroides, ácido jasmónico, ácido salicílico, óxido nítrico y estrigolactonas (Santner & Estella, 2009; Garay-Arroyo et al. 2012).

Auxinas

Las auxinas están involucradas en casi todos los estados de crecimiento y desarrollo de las plantas. Tienen un papel central en el establecimiento, organización y mantenimiento del meristemo apical de la raíz (RAM), también afectan la proliferación y elongación celular de la raíz (Santner et al. 2009, Garay-Arroyo et al. 2012).

La forma más abundante de las auxinas es el ácido-3-indolacético (IAA) (Figura 5), la cual es sintetizada por vías dependientes e independientes de triptófano. Se producen principalmente en hojas jóvenes y en el meristemo apical de tallo (SAM) y son transportadas a la raíz vía el floema, aunque también se sintetizan en la raíz (en el meristemo) (Bewley et al. 2012, Garay-Arroyo et al. 2012).

Su percepción en las células de las plantas inicia cuando las auxinas se unen a receptores nucleares como TIR1 (*Transport Inhibitor Response 1*) y AFB1-AFB5 (proteínas tipo TIR1, *Auxin Signaling F-Box Protein*). Las proteínas TIR1 y AFB1-AFB5 son subunidades con caja F del complejo ubiquitin ligasa SCF^{TIR1}. La interacción con las auxinas estabiliza la afinidad de los receptores por las proteínas AUX/IAA, los cuales son represores transcripcionales de los factores de transcripción ARF (*Auxin Response Factor*). Cuando las proteínas AUX/IAA interactúan con los receptores de auxinas, las proteínas AUX/IAA son ubiquitinadas y marcadas para degradación por proteosoma; su degradación libera proteínas ARF que ya pueden regular a sus genes blancos (Santner & Estella, 2009, Garay-Arroyo et al. 2012, Grones & Friml, 2015). La proteína ABP1 (*Auxin Binding Protein*) ha sido descrita como un receptor de auxinas (Jones, 1998, Feng & Kim, 2015) involucrada en diversos procesos del desarrollo (Chen et al. 2001), pero recientemente se encontró que no es un receptor (Gao et al. 2015), más bien podría estar

participando en la distribución subcelular de los transportadores de auxinas PIN (Robert et al. 2010, Feng & Kim. 2015).

El papel de las auxinas en la regulación de la proliferación se ha adjudicado principalmente en la preparación de la replicación (Transición G1/S). En la fase G1, las auxinas inducen la expresión de genes de ciclinas D y CDKA;1, además de participar en el ensamble y activación de complejos CycD/CDKs, mientras que la expresión de los genes de KRP1 y KRP2, que codifican inhibidores de CDKs, son regulados negativamente por auxinas (Perrot-Rechenmann, 2010; Wang & Ruan, 2012). Lo anterior sugiere la activación de la vía RB/E2F por auxinas para el progreso hacia la fase S.

Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un compuesto isoprenoide formado a partir de precursores carotenoides (Figura 5). Está involucrado en la regulación del desarrollo de la semilla, que incluye promoción de síntesis de proteínas de reserva, adquisición de tolerancia a la desecación e inducción y mantenimiento de dormancia (Wang & Zhang, 2007, Bewley et al. 2012). También regula elongación, quiescencia y diferenciación celular de la raíz. Esta hormona está presente en todos los tejidos de las plantas. Se sintetiza en casi todas las células que contienen plástidos. También es ubicua en tejido vascular y es transportada vía floema y xilema (Garay-Arroyo et al. 2012, Dong et al. 2015).

La señalización comienza cuando ABA se une a sus receptores solubles, una familia de al menos 14 proteínas conocidas como PYR/PYL/RCAR (*Pyrabactin Resistance/Pyrabactin-like/Regulatory Components of ABA Receptor*), que promueven la inhibición de fosfatasa de tipo 2C (PP2Cs) (Park et al. 2009). Estas fosfatasas son reguladores negativos de la cinasa SnRK2, por lo que su inhibición permite la activación de la SnRK2 y subsecuente fosforilación de las proteínas blanco. Se conocen algunos blancos de SnRK2 tanto en membrana plasmática como en el núcleo, éstos incluyen canales iónicos y los factores ABFs/AREB (factores de unión a elementos de respuesta a ABA). SnRK2 también reconoce proteínas que se unen a elementos de respuesta a ABA (ABRE) en la región promotora de genes inducibles por ABA (Santner & Estella, 2009, Garay-Arroyo et al. 2012, Dong et al. 2015).

El papel que desempeña el ABA regulando proliferación celular en el desarrollo de las plantas se ha asociado principalmente a nivel de modulación de expresión de genes asociados a momentos específicos del ciclo celular, particularmente en G1 (Swiatek et al. 2002). ABA activa la expresión de muchos genes por la vía ABREs en sus regiones promotoras, y se sugiere que entre ellos se encuentran la expresión de *KRP1* (Wang et al. 1998), o inhibe la expresión de genes requeridos en procesos como la germinación como son los que codifican para las α -amilasas en tejidos embrionarios (Finkelstein & Gibson, 2001).

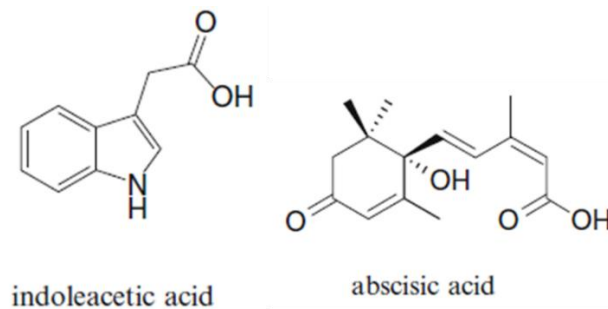


Figura 5. Estructura de las fitohormonas IAA y ABA (Bewley et al. 2012).

Sacarosa y Glucosa

Los azúcares solubles, principalmente glucosa (Glc) y sacarosa (Suc), son moléculas que además de su función como fuente de carbono y energía, actúan como señalizadores en el crecimiento y desarrollo de las plantas; regulan la expresión génica de un gran número de genes así como la traducción y las modificaciones post-traduccionales de una gran número de proteínas, entre otros procesos (Gupta & Kaur 2005, Hirano et al. 2011, Lastdrager et al. 2014).

La sacarosa es transportada a través del floema desde las hojas a órganos como la raíz, los meristemas, las flores, y durante el desarrollo del fruto y la semilla. Cuando hay niveles bajos de sacarosa en la planta, se activa la fotosíntesis, la movilización de nutrientes y el exporte; en contraste, cuando hay niveles altos de sacarosa, se inhibe la fotosíntesis, pero se estimula el crecimiento y almacén de sacarosa en tejidos no aéreos como la raíz (Rolland et al. 2006). Como molécula energética, la sacarosa es sustrato de una invertasa o de la Suc sintasa (Sus) para ser convertida en sus hexosas. Las

invertasas rompen la Suc en UDP-glucosa (UDPG) y fructosa (Fru); dichas enzimas se localizan en pared celular, vacuolas, citoplasma, y también pueden expresarse en mitocondrias, plástidos y núcleo. Las Sus presentan dos isoformas, soluble o citoplasmática e insoluble o en membrana plasmática y otros organelos intracelulares (Eveland & Jackson, 2011). Estas enzimas no sólo son esenciales para el metabolismo energético o biosintético, sino que también están involucradas en la señalización, ya que la sacarosa y las hexosas que produce son moléculas señalizadoras que regulan expresión de genes (Gibson 2005).

En plantas, la vía de señalización de azúcares por Glc es la más estudiada. Ésta es mediada por la hexocinasa (HXK) como sensor, la cual secuencialmente regula la expresión de genes a niveles transcripcional, traduccional y post-traduccional. Existen un gran número de elementos de respuesta a azúcares en promotores, identificados por aproximaciones genéticas, además de que diferentes vías de señalización promovidas por azúcares son prendidas en momentos del desarrollo específicos (Wang & Ruan 2013).

La sacarosa y la glucosa actúan como moduladores de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de plantas, principalmente en la percepción de la luz y el ciclo celular. Se han identificado elementos en *cis* conservados en diversos promotores de genes de plantas regulados por azúcares. El conocimiento del papel de los azúcares en la regulación del ciclo celular se deriva de cultivos de células en suspensión y plántulas mutantes sujetas a tratamientos con azúcar. La adición de Glc o Suc estimula la expresión de genes de *CycD2*, *CycD3*, *CycA3;2* y *CycB;1* (Riou-Khamlichi et al. 2000, Harting & Beck, 2006). Por otro lado, en *Arabidopsis*, la Glc también promueve la transición de G2/M al reprimir la transcripción de un regulador negativo, TRP-Domain Suppressor of Stimpy (TSS), por lo tanto, se activa la expresión de componentes clave del ciclo celular requeridos para la transición de G2/M como *CycB1;1* y *CDKB1;1*. Dichas observaciones sugieren que el efecto regulador de la Glc sobre el ciclo celular es debido a señalización más que a la disponibilidad de nutrientes o estatus energético (Wang & Ruan, 2012).

ANTECEDENTES INMEDIATOS

Las células de los embriones de semillas secas de diferentes especies se encuentran mayoritariamente con un contenido de DNA de fase G1 (Bewley & Black, 1994). Las células de los tejidos meristemáticos de las semillas secas son las primeras en activarse para iniciar el ciclo celular y proliferar (Vázquez-Ramos & Sánchez 2003). Durante la germinación de maíz, dos eventos importantes indican el progreso del ciclo celular, el inicio de la fase S alrededor de las 12 h de imbibición y las primeras figuras mitóticas después de las 24 h (Baiza et al. 1989). En la germinación de semillas de Arabidopsis y maíz, las células de los meristemas entran en mitosis antes de que la radícula protruya (Baiza et al. 1989, Masubelele et al. 2005). Durante la germinación de maíz, la adición de ácido abscísico (ABA) inhibe tanto el avance de la germinación como el del ciclo celular (Sánchez et al. 2005); mientras que la adición de citoquininas y el osmopriming (osmocondicionamiento) de semillas acortan el tiempo de germinación y aceleran el ciclo celular (Reyes et al. 1991, Cruz-García et al. 1995, Vázquez-Ramos & Sánchez 2003), indicando la relación entre ambos procesos (Figura 6).

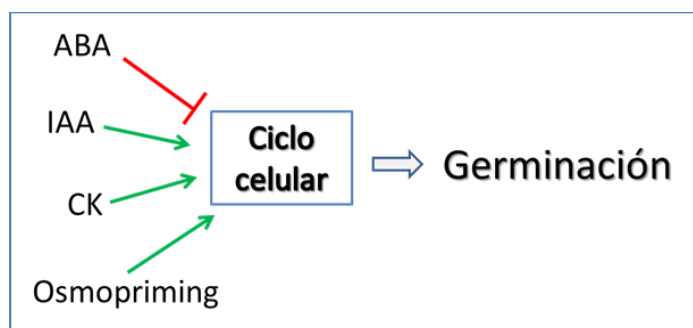


Figura 6. Efecto de señales del desarrollo en el ciclo celular durante la germinación. Flecha verde, activación y flecha roja (roma), inhibición.

Diferentes Cyc y CDKs participan en las diversas fases del ciclo celular de un modo secuencial (Magyar et al. 1997, Inzé & De Veylder 2006). En células animales, las Cyc tipo D son las responsables del establecimiento y progresión a la fase S, junto con las Cyc tipo E (Pines 1995, Doonan & Kitsios 2009). En plantas, las ciclinas tipo D son requeridas para el inicio del ciclo celular y su expresión es regulada por factores internos y externos como fitohormonas, nutrientes, azúcares, niveles de agua entre otros (Soni et al. 1995, Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000).

Arabidopsis contiene diez genes de Cyc tipo D, agrupadas en 7 subgrupos, de la D1 a la D7 (Vandepoele et al. 2002). Datos del transcriptoma de esta planta mostraron los patrones de expresión característicos para cada ciclina tipo D en diferentes tejidos. En el subgrupo de las CycD3 de *A. thaliana*, existen tres miembros (D3;1, D3;2 y D3;3), los cuales se expresan fuertemente en flores, aunque *AtCycD3;3* y *AtCycD3;2* también se expresan en raíz y tejidos aéreos, respectivamente (Menges et al. 2005). Por otro lado, la expresión ectópica del gen *AtCycD3;1* en cultivos de células en suspensión promueve la transición de G1/S, resultando en la acumulación de células en fase G2 (Menges et al. 2006). Además, la expresión del gen *AtCycD3;1* en cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis* se incrementa en respuesta a citocininas, estimulando la división celular (Riou-Khamlichi et al. 1999). En hojas y otros tejidos, la sobre expresión de *AtCycD3;1* causa hiperplasia y divisiones ectópicas, inhibiendo la elongación celular y la endoreduplicación (Dewitte et al. 2003).

Por otra parte, la expresión ectópica de la CycD3 en células sincronizadas BY-2 de *Nicotiana tabacum* mostró su presencia (un pico de expresión) en la mitosis. Los niveles de transcritos de *NtCycD3;1*, *NtCycD3;3* y *NtCycD3;5* se incrementan durante mitosis mientras que los niveles de transcritos de *NtCycD3;2* son constantes a través del ciclo celular (Sorrell et al. 1999, Kawamura et al. 2006).

La expresión de los genes *CycD2* y *CycD3* de *Arabidopsis* cambia en respuesta a la disponibilidad de carbohidratos, particularmente de sacarosa, afectando la tasa de división celular en cultivos de células en suspensión. La proteína *AtCycD3;1* y su actividad de cinasa asociada son alteradas en respuesta a la remoción de sacarosa del medio de cultivo, mientras que los niveles de otra ciclina, la *CycD2*, no son afectados (Riou-Khamlichi et al. 2000, Healy et al. 2001). La sacarosa también parece regular la estabilidad de proteínas del ciclo celular, y la *AtCycD3;1* mostró ser lábil en ausencia de sacarosa (Planchais et al. 2004).

En plantas, las Cyc tipo D se asocian principalmente a CDKA (Inzé & De Veylder 2006), sin embargo, también pueden asociarse a CDKs tipo B, cinasas relacionadas a mitosis (Kono et al. 2003, Kawamura et al. 2006, Godínez-Palma et al. 2013). *AtCycD3;1* se asocia a CDKA formando complejos activos, pero no a CDKB (Healy et al. 2001). Por otro lado, las Cycs D3 (3;3 y 3;5) de tabaco interaccionan tanto con CDKA como con CDKB *in vitro* y dichos complejos son activos y fosforilan tanto a histona H1 como a la proteína retinoblastoma NtRBR1 (Kawamura et al. 2006).

Durante la germinación de semillas de *Arabidopsis*, la sobreexpresión de genes de Cyc tipo D (D1;1 y D2;1) promueve el ciclo celular, incrementando la tasa de germinación. Sin embargo, el gen de *CycD3;1* se expresa solamente en estados post-germinativos y es incapaz de promover el ciclo celular en el meristemo radicular y por lo tanto no acelera la germinación (Masubelele et al. 2005).

Maíz contiene 17 diferentes Cycs tipo D agrupadas en 7 clases, definidas por su similitud con las Cyc de arroz y *Arabidopsis*. En la germinación de maíz, 15 de estos genes se expresan con un patrón contrastante (Quiroz-Figueroa & Vázquez-Ramos 2006, Buendía-Monreal et al. 2011). La expresión de algunos de estos genes es modulada por fitohormonas como citocininas, auxinas y ABA (Quiroz-Figueroa & Vázquez-Ramos 2006). La adición de IAA estimula la síntesis de DNA e induce la expresión de algunos genes de Cyc tipo D, entre ellos el gen de la *CycD3;1a* (Vázquez-Ramos & Lara-Núñez 2008, Buendía-Monreal et al. 2011). La adición de ABA inhibe la transición a la fase G2, disminuyendo la síntesis de DNA y reduciendo la expresión de genes de ciclinas tipo D, como el de la *CycD3;1a* (Sánchez et al. 2005, Buendía-Monreal et al. 2011), esto explica su efecto inhibitorio en la germinación del maíz (Figura 6).

En maíz, las Cycs D2;2, D4;2 y D5;3 se asocian diferencialmente a CDKA y CDKB1, formando complejos activos durante la germinación (Godínez-Palma et al. 2013) y la adición de IAA o benziladenina (BA, una citocinina) incrementa la actividad de cinasa asociada a estas ciclinas durante etapas tempranas de la germinación, sin modificar los niveles de proteína, sugiriendo que estas fitohormonas promueven la activación de complejos CycD/CDKs (Lara-Núñez et al. 2008).

Por otro lado, en la germinación de maíz, PCNA está presente en la semilla seca y su cantidad se incrementa gradualmente hacia las 18-20 horas (Herrera et al. 2000), coincidiendo con el tiempo en el que ocurre la replicación en tejidos meristemáticos del eje embrionario (Baiza et al. 1989). Por otro lado, PCNA se asocia a complejos activos CycD/CDKs en la germinación (Sánchez et al. 2005, Gutiérrez et al. 2002, Lara-Núñez et al. 2006), lo que sugiere que también regula la función de dichos complejos, aunque los mecanismos de cómo ocurre, aún no son claros. También en *Arabidopsis* PCNA se asocia a la mayoría de CycsD; aunque la unión de PCNA con *CycD3;1* y *CycD3;3* no es clara (Strzalka et al. 2015).

JUSTIFICACIÓN

La existencia de un gran número de genes de ciclinas D en plantas es poco entendida, aunque las evidencias experimentales de expresión génica y función proteica permiten suponer que las ciclinas no simplemente actúan en forma redundante. La caracterización de las ciclinas del subgrupo de las D3 de *Arabidopsis* y tabaco ha demostrado que son el prototipo de una ciclina, cuya expresión responde a factores externos e internos que modulan la progresión del ciclo celular en diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de estos organismos.

Durante la germinación de maíz, la expresión de los genes de *CycD* muestra que la función de las ciclinas podría ser específica del momento del ciclo celular en la germinación y que dichos genes responden diferencialmente al menos a las fitohormonas: IAA, ABA y citocininas. Por otro lado, la formación de complejos *CycD/CDKs* de maíz (asociados a las *Cyc D2;1*, *D4;2* y *D5;3*) también parecen ser regulados de forma particular por diferentes señales.

En *Arabidopsis*, algunos genes de *CycD* (*D1*, *D2;1*) muestran ser reguladores positivos de la germinación, pero la expresión de la *CycD3;1* sugiere que es un gen requerido en etapas post-germinativas. Por otro lado, en el proceso germinativo de maíz, la *CycD3;1* podría ser importante ya que la expresión de los genes de *CycD3;1* (a y b) presentan un patrón diferencial durante la germinación y en tejidos como raíz, hoja, mesocotilo, además de que su expresión responde a señales derivadas de la acción de fitohormonas en las primeras horas de germinación, sin embargo, se conoce poco del papel de la proteína *CycD3;1*, de los complejos que forma y del efecto de señales del desarrollo en los complejos asociados a esta ciclina durante el proceso germinativo.

HIPÓTESIS

Durante el proceso germinativo debe existir la formación de diferentes complejos transitorios CycD3;1/CDKs activos participando en el ciclo celular que son modulados por señales como fitohormonas y sacarosa.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de complejos proteicos en los que se encuentran asociados CDK/CycD3;1 durante las primeras horas de germinación de maíz y el efecto que produce la adición de fitohormonas (IAA y ABA) y sacarosa en dichos complejos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 🔑 Producir un anticuerpo policlonal específico para evaluar la acumulación de la CycD3;1 durante las primeras horas de germinación.
- 🔑 Determinar la presencia de complejos activos de CycD3;1 con CDKA y CDKB1;1 en las primeras horas de germinación de maíz.
- 🔑 Determinar la asociación de complejos CycD3;1/CDKs con PCNA.
- 🔑 Analizar por cromatografía de exclusión molecular la co-elución (las interacciones) de la CycD3;1 con CDKs y PCNA durante la germinación.
- 🔑 Establecer el efecto de las fitohormonas IAA y ABA en la actividad de los complejos CycD3;1/CDKs presentes en la germinación.
- 🔑 Establecer el efecto de sacarosa en la actividad de los complejos CycD3;1/CDKs presentes en la germinación.

METODOLOGÍA

Material Biológico

Se utilizaron ejes embrionarios extraídos manualmente de semillas de maíz (*Zea Mays*) variedad Chalqueño cosecha 2011-2015 obtenido de Chalco, Edo. de México.

Imbibición de ejes embrionarios de maíz

Los ejes embrionarios de maíz fueron desinfectados usando hipoclorito de sodio (0.5 % v/v) y lavados cuatros veces con agua destilada estéril. El exceso de agua fue removido al colocar los ejes en papel Whatman No. 1 estéril. Los ejes fueron embebidos por 0, 6, 12, 18, 24 y 48 h sobre una hoja de papel Whatman No. 1 en una caja Petri con un amortiguador de imbibición control (Con sacarosa (Suc+), 50 mM Tris-HCL pH 7.6, 58 mM (2%) Sacarosa, 10 mM MgCl₂) a 25°C en condiciones de esterilidad y en la oscuridad.

Efecto de señales (fitohormonas y sacarosa) en los niveles proteicos.

Para evaluar el efecto de fitohormonas IAA, ABA y sacarosa en la germinación, los ejes fueron embebidos en amortiguador de imbibición en presencia de IAA (1 μM), ABA (50 μM), cicloheximida (Chx, 10 μg/mL) o sin sacarosa (Suc-). La concentración de fitohormonas que se usó en este estudio fue previamente establecida en la investigación realizada por Buendía-Monreal et al., al haber identificado cambios tanto en la expresión de genes (particularmente los de *CycD3;1*) como en la incorporación de timidina tritiada (Síntesis de DNA).

Clonación y expresión de *ZmCycD3;1*

La secuencia del cDNA de *CycD3:1* de maíz fue previamente reportada (Buendía-Monreal et al. 2011). Para producir el anticuerpo policlonal específico anti-*CycD3;1* de maíz, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para amplificar el fragmento de 198 pb que codifica para la secuencia de 62 aa del C-terminal de *CycD3;1* (Anexo 1). El amplicón se purificó y clonó en el vector pGEM-T-Easy (Promega®). Después, se subclonó en el vector pGEX-4T2 (GE Healthcare®) usando los sitios de restricción BamHI y NotI y se generó una proteína de fusión en marco con la glutatión-S-transferasa (GST). La construcción fue verificada por restricción y secuenciación 1 (Anexo 1). La proteína recombinante fue inducida con 0.5 mM de Isopropil-β-D-1-galactopiranosil (IPTG) por 3 h a 32°C en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL. La proteína recombinante GST-*CycD3;1* se purificó por afinidad usando una columna de glutatión-agarosa y se eluyó con

glutación reducido. Parte de la proteína fue tratada con trombina para eliminar la porción de GST de la proteína recombinante (Anexo 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación de la CycD3;1 con sitios de restricción específicos para dirigir la clonación.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción	Tm
ZmCycD3;1F	5'AAA CTT AAG TGG CTC TGG AGA GGA CGA CA 3'	BamHI	70.29
ZmCycD3;1R	5'AAA GGA TCC GGA AAT AAG CGT AAG CAC 3'	NotI	67.98

Producción de anticuerpo anti-CycD3;1

Dos conejos fueron inmunizados siguiendo protocolos estándar. Se obtuvo suero preinmune antes de iniciar la inmunización. El esquema de inmunización se llevó a cabo como se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Esquema de inmunización de conejos para la producción de anti-CycD3;1 de maíz.

Día	Proteína	Vía de inmunización	Observación
1	GSTCycD3 + acrilamida + adyuvante incompleto de Freund	Subdérmica	500 µg Obtención de suero preinmune.
8	GSTCycD3 + acrilamida + adyuvante incompleto de Freund	Subdérmica	500 µg
23	CycD3 + acrilamida + adyuvante incompleto de Freund	Subdérmica	100 µg
30			Sangría de prueba
37	CycD3	Intravenosa	100 µg
42			Sangría de prueba
53	CycD3	Intravenosa	100 µg

59			Sangría de prueba
64	CycD3	Intravenosa	100 µg
68			Punción cardiaca

Finalmente, 4 días después de la última inmunización, el suero del conejo fue colectado y analizado mediante inmunodetección contra la proteína recombinante GST-CycD3;1 y extractos proteicos de maíz (Anexo 3). Los anticuerpos fueron purificados mediante el kit Prosep-A de Millipore.

📌 Validación del anticuerpo anti-CycD3;1

Se llevó a cabo un ensayo de competencia para validar el anticuerpo anti-CycD3;1. El anticuerpo primario fue pre-incubado con 5, 10 y 50 µg de proteína recombinante CycD3;1 (proteína competidora) y con 50 µg de BSA, respectivamente. Después el anticuerpo competido fue usado para inmunodetectar a *ZmCycD3;1* en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz (Fig. 7).

📌 Competencia de inmunodetección de las bandas correspondientes a PCNA

Las bandas identificadas con el anticuerpo anti-PCNA fueron competidas pre-incubando el anticuerpo primario anti PCNA (1:1000) con 5 µg de proteína recombinante His-PCNA (proteína competidora) y con 5 µg de BSA, respectivamente. Después el anticuerpo competido fue usado para inmunodetectar a PCNA en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz.

📌 Extracción de proteínas

Los ejes embrionarios embebidos se homogenizaron exhaustivamente en un mortero con amortiguador de extracción estéril (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 75 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 0.2 % Tritón X-100, 0.25 M sacarosa, 60 mM β-glycerol fosfato, 50 mM NaF, 200 µM Na₃VO₄, 1 mM EGTA y una minitableta de coctel de inhibidores de proteasas por 10 mL de amortiguador). Después, se procedió a centrifugar a 12 000 g por 60 min a 4°C, se retiró la fase acuosa que es la enriquecida en proteínas solubles y volvió a repetirse la centrifugación. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford M, 1976).

📌 **Cromatografía de exclusión molecular (Filtración en gel).**

La masa de complejos formados por CycD3;1 con CDKA, CDKB1;1 y PCNA fue determinada por exclusión molecular (FPLC). Se utilizó una columna Superdex 200 (GE Healthcare) de 120 mL, la cual está compuesta de una matriz de agarosa y dextran covalentemente unidos que permite separar proteínas en un rango de 10 000 a 600 000 Da. La fase móvil fue amortiguador de elución (50 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄ pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 mM PMSF y 0.1 mM 2-mercaptoetanol) a un flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 1 mL. La columna fue calibrada con los siguientes estándares de masa molecular: Ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa) y ovoalbúmina (44 kDa). El volumen vacío fue determinado con azul dextran 2000 (Anexo 4). Los estándares de masa molecular fueron adquiridos de GE Healthcare.

📌 **Inmunodetección (Western Blot)**

Las proteínas recombinantes purificadas o los extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz (40 µg) fueron resueltos en un SDS-PAGE y los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante transferencia húmeda. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de 5 % de leche baja en grasas en PBS con 0.1 % de tween 20 por 1 h a temperatura ambiente. Después, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos de maíz (Tabla 4) toda la noche en solución de bloqueo a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con PBS suplementado con 0.1 % de tween 20 y 500 mM de NaCl (PBS-Tween-NaCl) por 10 min a temperatura ambiente. Luego las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa por 1 h a temperatura ambiente (Tabla 4). Después las membranas fueron lavadas tres veces con solución de PBS-Tween-NaCl por 10 min. La reacción de peroxidasa fue detectada por el método de ECL seguido por exposición en placas de rayos X o fotodocumentando mediante el equipo Chemidoc de BioRad®. El análisis densitométrico fue realizado usando el software Image Lab.

Tabla 4. Título de anticuerpos primarios de maíz y secundarios.

Anticuerpo	Título	Bibliografía
Anti-CycD3;1	1:1500	Producido en este trabajo
Anti-CDKA	1:500	Godínez-Palma et al. 2013

Anti-CDKB1;1	1:3000	Godínez-Palma et al. 2013
Anti-PCNA	1:1500	Sánchez et al. 2002
IgG Anti-Conejo conjugado HRP	1:20 000	Santa Cruz Biotech
VeriBlot for IP	1:30000	Abcam, ab99697
Clean Blot for IP detection reagent HRP	1:1000	Thermo

📌 Ensayos de interacción proteína-proteína (Inmunoprecipitación, IP)

Los anticuerpos anti-GST-CycD3;1, anti-GST-CDKB1;1, anti-CDKA y anti-PCNA fueron conjugados por 1 h con la proteína A Agarosa-magnetizada (Dilución 1:10) a temperatura ambiente usando amortiguador de *binding* (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 % glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF y 0.02 % Triton X-100). Se adicionó la proteína de extractos de ejes embrionarios (500 µg) y la mezcla se incubó 4 h o durante toda la noche a 4°C en un agitador rotatorio a 18 giros/min (Labquake Shaker Rotisserie). Los inmunocomplejos fueron concentrados usando una gradilla magnética y lavados 5 veces con amortiguador de *binding* o TBS. Los precipitados de proteínas resultantes se usaron como fuente de actividad de cinasa, o las proteínas unidas fueron eluidas con amortiguador de carga de proteínas y preparadas para inmunodetección.

📌 Ensayos de Actividad de Cinasa (EC 2.7.11.22)

Los inmunocomplejos asociados a CycD3;1 fueron resuspendidos en 15 µl de amortiguador de cinasa (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, 20 µM ATP, 5 µCi de [γ -³²P] ATP). Como sustrato se utilizaron 15 µg de Histona H1. La reacción se llevó a cabo por 30 min a 30°C y fue detenida al adicionar amortiguador de carga de proteínas. Las muestras fueron desnaturalizadas a 85°C por 5 min y los productos de reacción se resolvieron en un SDS-PAGE. Los geles se secaron por vacío a 80°C por 1.5 h y después fueron expuestos por 12 o 24 h en placas de rayos X o fotodocumentados usando una pantalla de europio (Imaging screen-K) y el equipo Personal Molecular Imager FX (Biorad).

📌 Ensayos de estabilidad

Se adicionó cicloheximida (Chx, 10 µg/mL, introducida por vacío) a ejes embrionarios secos o embebidos por 12 h en amortiguador con sacarosa. Después se embebieron a diferentes tiempos (como se indica) en presencia o ausencia de sacarosa y finalmente se inmunodetectó a la CycD3;1.

📌 Análisis estadístico

Los datos de abundancia proteica, actividad de Cinasa asociada y masa y longitud de ejes embrionarios fueron analizados usando ANOVA de una vía y después se hizo una comparación pareada a través de la prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

I. Asociaciones de CycD3;1 con CDKA, CDKB1;1 y PCNA.

La proteína CycD3;1 de maíz

El poder acceder a los genomas de organismos modelo ha facilitado a la comunidad científica acercarnos más a la comprensión de cualquier proceso de interés. La facilidad de tener el genoma de maíz permitió saber que existen al menos 17 genes que codifican para ciclinas tipo D, que pueden agruparse en siete grupos de acuerdo con la identidad que presentan con las ciclinas de Arabidopsis y arroz. Dentro del subgrupo de las CycD3;1 de maíz, existen dos miembros, la *CycD3;1a* (GRMZM2G107377_P01) y la *CycD3;1b* (GRMZM2G161382_P02). La expresión de ambos genes muestra un patrón fluctuante dentro de las primeras 24 h de germinación (Buendía-Monreal et al. 2011), sugiriendo su participación en el proceso; sin embargo, los niveles correspondientes de proteína aún no se conocen. Para estudiar a las ciclinas D3 de maíz a nivel de proteína fue necesario producir anticuerpos policlonales específicos que permitan distinguir a las CycD3s de las otras ciclinas D de maíz. Es importante mencionar que las secuencias proteicas predichas para ambas proteínas son idénticas en un 80% (Buendía-Monreal et al. 2011).

Para producir el anticuerpo anti-CycD3;1, se eligió un péptido antigénico a partir de la estructura primaria de la CycD3;1, donde se consideraron las siguientes características en la secuencia escogida: presencia de aminoácidos hidrofílicos y ausencia de cisteínas, que se localizara en un extremo de la proteína (generalmente estas secuencias se encuentran expuestas) y preferentemente sin estructura secundaria predicha.

El anticuerpo policlonal específico anti-CycD3;1 fue generado contra una secuencia de 62 aminoácidos de la porción C-terminal de la proteína CycD3;1b correspondiente del aminoácido 360 al 422 (Anexo 5A). Debido a la alta identidad en la estructura primaria de las proteínas CycD3;1 a y b, se predijo que el anticuerpo era capaz de identificar a ambas ciclinas, pero no a las otras CycD de maíz (Anexo 5B y C).

Una vez seleccionado el péptido antigénico (Anexo 5A), se amplificó y clonó un fragmento de 186 pb (ver materiales y métodos, Anexo 1) en el vector de expresión pGEX-4T2, el

cual permite obtener proteínas recombinantes fusionadas a GST. La proteína recombinante GST-CycD3;1 (32.6 kDa) sobreexpresada y purificada fue usada como antígeno en la producción del anticuerpo policlonal anti-CycD3;1 (ver materiales y métodos). De la purificación de la proteína recombinante GST-CycD3;1 se obtuvieron 3 bandas correspondientes a masas de 32.6, 30 y 28 kDa (Anexo 2B), sugiriendo que algunas podrían ser productos truncos, esto debido al alto contenido de codones poco comunes encontrados en la secuencia codificante de la CycD3;1 para los que *E. coli* sólo cuenta con una copia.

Después de obtener títulos satisfactorios de anticuerpos anti-CycD3;1, se validó la especificidad del anticuerpo mediante un ensayo de competencia por western blot. El anticuerpo anti-CycD3;1 fue pre-incubado con concentraciones crecientes de la proteína recombinante GST-CycD3;1 (proteína competente) y después usado para identificar a la proteína CycD3;1 de extractos proteicos de maíz. La Figura 7 muestra una disminución en el reconocimiento de una proteína de alrededor de 37 kDa en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz respecto al incremento de la cantidad de proteína recombinante competente adicionada, sugiriendo que esta proteína es la CycD3;1. La proteína BSA fue usada como control negativo y no interfirió en la detección de la CycD3;1 por su anticuerpo. Se puede observar en el gel una proteína de 50 kDa que no está relacionada a la Ciclina y que no compitió. El anticuerpo anti-CycD3;1 reconoce una proteína alrededor de 37 kDa en extractos de proteínas de maíz, sin embargo, la masa predicha de la secuencia es de 40 kDa. La razón de esta diferencia es desconocida hasta el momento.

El anticuerpo validado se utilizó para seguir la presencia de la proteína CycD3;1 de maíz durante las primeras 24 h germinación. La proteína CycD3;1 está presente en extractos de ejes embrionarios de semilla seca de maíz, aumenta a las 12 h de germinación y a las 24 h disminuye ligeramente respecto a los niveles de semilla seca (Figura 8). Este comportamiento es similar al de las otras ciclinas D de maíz estudiadas durante el proceso germinativo (Gutiérrez et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2008, Godínez-Palma et al. 2013).

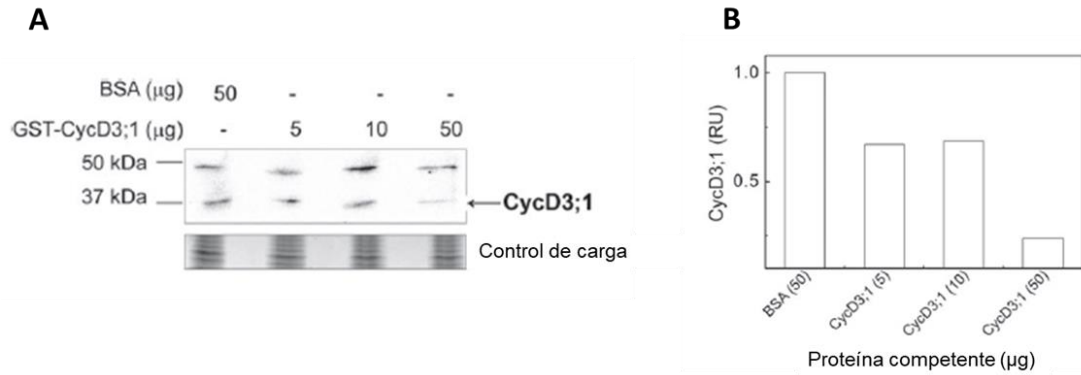


Figura 7. Validación del anticuerpo anti-CycD3;1. (A) Se realizó un ensayo de competencia para validar el anticuerpo anti-CycD3;1 usando extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 h. Para la inmunodetección de la ciclina, el anticuerpo fue pre-incubado con 5, 10 y 50 μg de proteína recombinante CycD3;1 (competente). La proteína BSA fue usada como control negativo. El SDS-PAGE muestra el control de carga (B) Los datos representan dos réplicas con resultados similares.

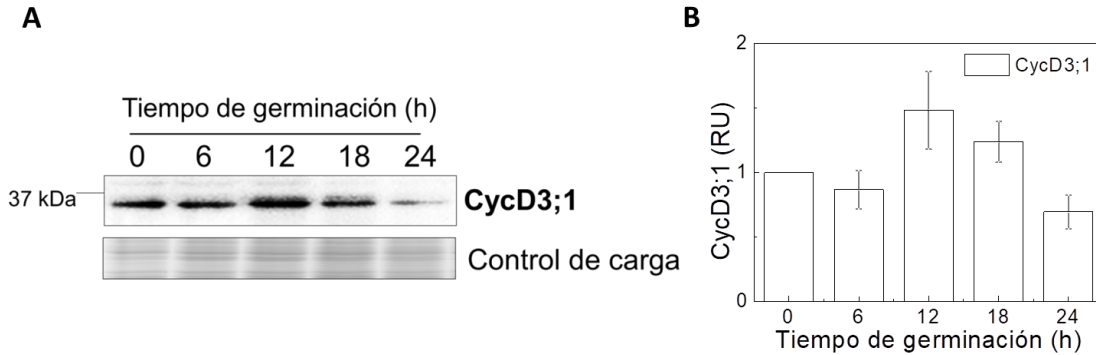


Figura 8. Acumulación de la proteína CycD3;1 durante la germinación. (A) La proteína CycD3;1 fue inmunodetectada usando anti-CycD3;1 en extractos proteicos (40 μg) de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 h. La membrana teñida con rojo de Ponceau S muestra el control de carga. (B) Se realizó el análisis densitométrico relacionando la intensidad de la banda de todas las muestras con la intensidad del control de carga y después con la intensidad de la banda de la semilla seca (0 h). Los datos son la media ± ES de cuatro experimentos independientes de 10 ejes cada uno. UR, unidades relativas.

Complejos CycD3;1/CDKs durante la germinación de maíz.

La actividad de las CDKs depende de su asociación con las ciclinas ya que la función de los complejos CycD/CDK es fosforilar diversos blancos que permiten el avance a lo largo del ciclo celular. En la germinación de maíz se forman complejos activos diferencialmente entre las Cycs D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKA ó con CDKB1;1, pero se desconoce si también se forman complejos con CycD3;1. Para determinar la presencia de complejos de CycD3;1 con las CDKs tipo A y B1;1 durante la germinación, se usaron anticuerpos contra CycD3;1, CDKA y CDKB1;1 de maíz en ensayos de inmunoprecipitación (IP). Usando anti-CDKA para inmunoprecipitar, se identificó que CycD3;1 se asocia a CDKA a las 0, 12 y 24 h de germinación. El experimento opuesto, usando anti-CycD3;1 confirmó la asociación (Figura 9A). Se detectaron dos bandas correspondientes a CDKA en 34 y 32 kDa, isoformas previamente reportadas (Sánchez et al. 2002, Godínez-Palma et al. 2013). Usando anti-CDKB1;1, se identificó que CycD3;1 se asocia a CDKB1;1 a las 0, 12 y 24 h de germinación; un resultado similar fue obtenido cuando anti-CycD3;1 fue usado para co-inmunoprecipitar a CDKB1;1 (Figura 9A). Estos resultados indican la presencia de complejos tanto CycD3;1/CDKA como CycD3;1/CDKB1;1 en la germinación; estos últimos son complejos poco usuales porque no se esperaría una asociación entre una putativa ciclina de G1 y una cinasa mitótica. Al menos en Arabidopsis no se ha identificado interacción entre una CycD3;1 con una CDKB, sin embargo, como se mencionó antes, asociaciones de ciclinas tipo D de maíz con CDKB1;1 parecen ser usuales (Godínez-Palma et al. 2013). Además, en tabaco se demostró que una CycD3 puede asociarse a una CDKB in vitro (Kawamura et al. 2006).

Para determinar si los complejos CycD3;1/CDKs formados en la germinación son activos, se llevaron a cabo ensayos de actividad de cinasa usando inmunoprecipitados con anti-CycD3;1 como fuente de cinasa e Histona H1 como sustrato. Se encontró actividad de cinasa asociada a CycD3;1 desde las 0 hasta las 24 h de germinación, sugiriendo que la actividad de cinasa puede deberse a la presencia de complejos CycD3;1/CDKA o CycD3;1/CDKB1;1 o a ambos complejos (Figura 9B).

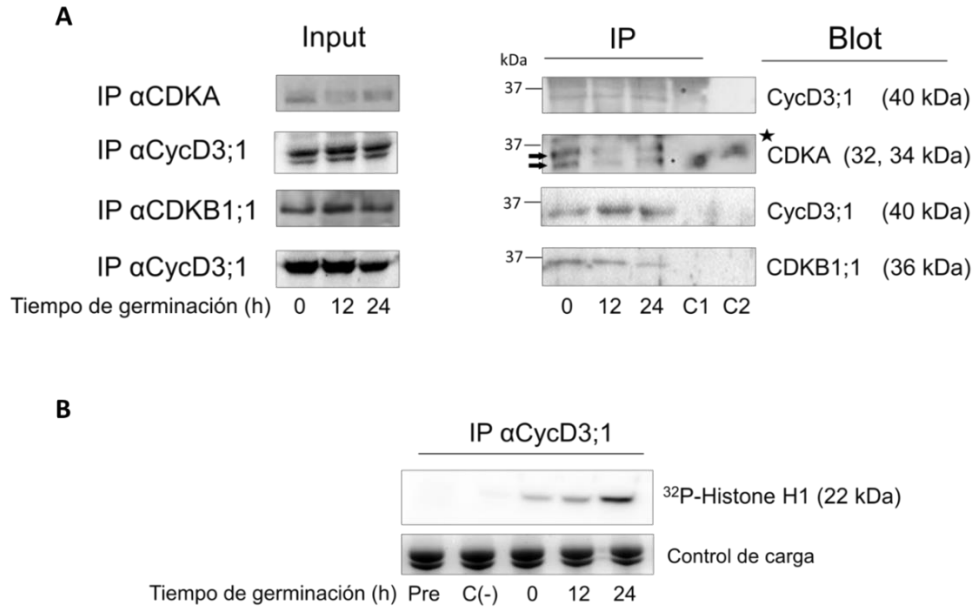


Figura 9. Asociación de CycD3;1 de maíz con CDKA y CDKB1;1. Se usaron anticuerpos específicos anti-CDKA, anti-CDKB1;1 y anti-CycD3;1 para inmunoprecipitar e identificar a las proteínas asociadas en extractos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h. (A) Input, extractos proteicos (EP) de ejes embrionarios de 0, 12 y 24 h de imbibición; IP, anticuerpo (anti-CDKA, anti-CDKB1;1 y anti-CycD3;1) + proteína A (agarosa) + EP; C1, anticuerpo + proteína A (agarosa) y C2, proteína A (agarosa) + EP. (B) Actividad de Cinasa asociada a la CycD3;1 durante la germinación. IP anti-CycD3;1 de 0, 12 y 24 h de ejes germinados embebidos se usaron como fuente de actividad de cinasa sobre histona H1 como sustrato. El resultado de la reacción se resolvió en un SDS-PAGE y las proteínas radioactivas fueron visualizadas por autoradiografía. Pre, suero preinmune + proteína A (agarosa); C(-), anti-CycD3;1 + proteína A (agarosa) e IP, anti-CycD3;1 + proteína A (agarosa) + EP. El Anexo 6 muestra las imágenes completas de los IPs.

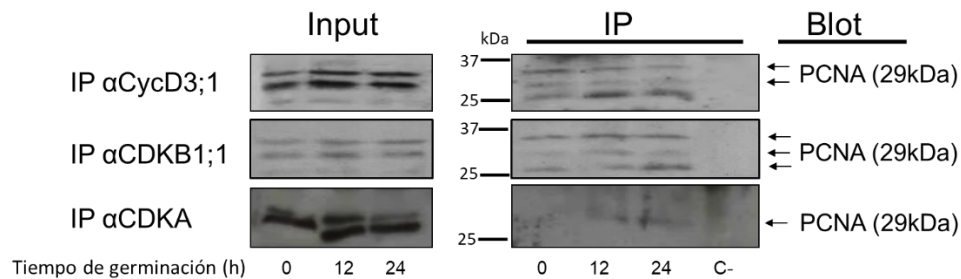


Figura 10. Asociación de PCNA con CycD3;1, CDKA y CDKB1;1. Se usaron anticuerpos específicos anti-CycD3;1, anti-CDKB1;1, anti-CDKA y anti-PCNA para inmunoprecipitar e identificar a las proteínas asociadas en extractos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h. Input, extractos proteicos (EP) de ejes embrionarios de 0, 12 y 24 h de imbibición; IP, anticuerpo (anti-CDKA, anti-CDKB1;1 y anti-CycD3;1) + proteína A (agarosa) + EP; C1, anticuerpo + proteína A (agarosa) y C2, proteína A (agarosa) + EP. El Anexo 7 muestra las imágenes completas de los IPs.

Los complejos CycD/CDKs son regulados a diferentes niveles, uno de ellos, es la interacción con otras proteínas, como proteínas inhibidoras (KRP o Siamese) y proteínas de anclaje que facilitan el reconocimiento de algún sustrato; entre éstas últimas se especula que puede estar PCNA. Para investigar la asociación de PCNA con CDKs y CycD3;1 en la germinación, se realizaron ensayos de IP (Figura 10). Usando el anti-CycD3;1 para inmunoprecipitar, se encontró que PCNA se asocia a esta ciclina a las 0, 12 y 24 h de germinación. Usando el anti-CDKB1;1 para inmunoprecipitar, se identificó que PCNA puede asociarse a esta cinasa durante la germinación. Previamente se identificó que PCNA se asocia a una CDK con secuencia PSTAIRE (Sánchez et al. 2002), en este trabajo, usando un anticuerpo anti-CDKA de maíz, corroboramos la asociación de PCNA con esta cinasa. Lo anterior indica que PCNA se asocia a complejos CycD3;1/CDKs, como también se asocia a otros complejos CycD/CDKs de maíz previamente estudiados (Gutiérrez et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2008).

La inmunodetección de PCNA en los ensayos de IPs mostró dos bandas de PCNA cuando se IP con anti-CycD3;1 y tres bandas cuando se IP con anti-CDKB1;1. Las bandas identificadas fueron competidas usando proteína recombinante His-PCNA (Figura 11), sugiriendo formas de PCNA modificadas post-traduccionalmente, como pueden ser ubiquitinación (mono o poli) o sumoilación (mono o poli). Estas modificaciones han sido identificadas en PCNA de Arabidopsis y en células animales (Hoege et al. 2002, Strzalka et al. 2011). PCNA de animales también es blanco de fosforilación (Wang et al. 2006). Resulta interesante que sólo con CycD3;1 y CDKB1;1 parecen asociarse las posibles formas modificadas de PCNA y no así con CDKA.

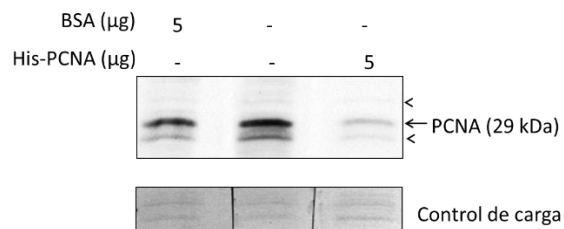


Figura 11. Competencia de proteínas detectadas por anti-PCNA. Se realizó un ensayo de competencia con el anticuerpo anti-PCNA usando extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 h. Para la inmunodetección de PCNA, el anticuerpo fue pre-incubado con 5 µg de proteína recombinante His-PCNA (competente). La proteína BSA fue usada como control negativo y la membrana teñida con rojo de Ponceau S muestra el control de carga.

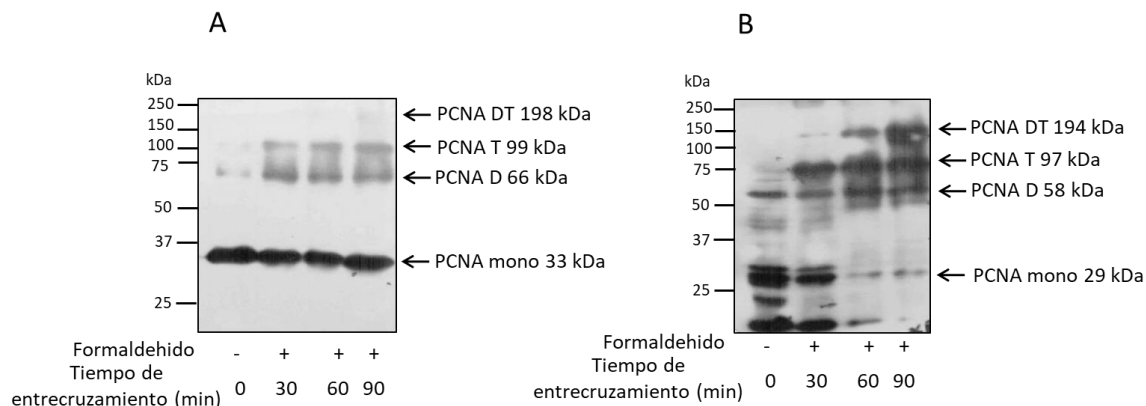


Figura 12. PCNA es un homotrímero. Proteína recombinante His-PCNA (A) y extractos proteicos de semilla seca (B) fueron entrecruzados con formaldehído durante 30, 60 y 90 min a temperatura ambiente. Después se inmunodetectó a PCNA. Mono, monómero; D, dímero; T, trímero y DT, doble trímero.

La proteína PCNA en las células presenta una estructura cuaternaria de homotrímero (un anillo) que es su forma funcional. Esta estructura le permite funcionar como pinza deslizante que da procesividad a las DNA polimerasas; además, facilita el acoplamiento o ensamble de otras proteínas (Stoimenov & Helleday 2009). Por otro lado, se propone que también puede formarse un dímero de trímeros (Naryzhny et al. 2005). Incidentalmente, durante el proceso germinativo de maíz, se describió la presencia del trímero y el doble trímero asociado a cromatina (Becerril et al. 2012). Utilizando proteína recombinante His-PCNA, o bien extractos proteicos de semilla seca de maíz entrecruzados con formaldehído por 30, 60 y 90 min, se verificó la presencia del trímero y del dímero de trímeros mediante inmunodetección (Figura 12), lo cual nos muestra la capacidad de PCNA de adquirir su estructura cuaternaria como la presencia de trímero y doble trímero tanto en extractos proteicos de maíz, así siendo proteína recombinante. Se especula que dichas estructuras pueden facilitar asociaciones entre proteínas asociadas a PCNA, lo cual implica un papel de proteína de anclaje.

Masa Molecular de complejos CycD3;1/CDKs durante la germinación

Para caracterizar la masa molecular donde se encuentran los complejos CycD3;1/CDKs formados durante la germinación (que conjuntamente serían de aproximadamente 70 kDa, 34-36 kDa de CDKs y 40 kDa de CycD3;1), se fraccionaron extractos proteicos de

ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200. Las fracciones obtenidas fueron usadas para identificar la co-elución de las proteínas CycD3;1, CDKA, CDKB1;1 y PCNA mediante inmunodetección. La columna se calibró con NaCl (1 M) y proteínas estándar de diferente masa molecular: Ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa) y ovoalbúmina (44 kDa). La calibración permitió estimar la masa molecular de las fracciones recolectadas en un rango de 582 a ~50 kDa (Anexo 4).

En extractos de ejes embrionarios de semilla seca, CycD3;1 co-eluye con CDKA, CDKB1;1 y PCNA, en complejos de masa molecular entre 420 y 580 kDa, sugiriendo la presencia de diferentes poblaciones de complejos CycD3;1/CDKA-PCNA y CycD3;1/CDKB1;1-PCNA asociados a otras proteínas. En fracciones de masa entre 157 y 250 kDa, CycD3;1 co-eluye sólo con CDKA y PCNA (Figura 13A), sugiriendo complejos ternarios entre ellas. La presencia de dichos complejos puede ser parte de la preparación de las células del embrión que van a iniciar el ciclo celular en la germinación. En algunas fracciones, se identifican dos o tres bandas correspondientes a PCNA, que pueden ser formas modificadas post-traduccionalmente, como se muestra en la Figura 11.

En extractos de ejes embrionarios embebidos por 12 h, CycD3;1 co-eluye con CDKA, CDKB1;1 y PCNA en fracciones de masas entre 170 y 270 kDa, pero no en fracciones mayores en aparente masa molecular, sugiriendo la presencia de diferentes poblaciones de asociaciones CycD3;1/CDKA-PCNA y CycD3;1/CDKB1;1-PCNA. CycD3;1 también co-eluye con CDKA y CDKB1;1 en fracciones por debajo de 100 kDa (Figura 13B), indicando la presencia de complejos heterodiméricos CycD3;1/CDKs. En este momento de la germinación, las células del eje embrionario que entraron a un ciclo celular, se encuentran iniciando fase S (Baiza et al. 1989), sugiriendo que los complejos CycD3;1/CDKs-PCNA presentes en asociaciones de menor masa respecto a los encontrados en extractos de semilla seca, podrían estar en G1 tardía y durante la transición G1/S. Por otro lado, en fracciones entre 175 y 218 kDa, dos proteínas de 32 y 34 kDa fueron inmunodetectadas con el anticuerpo anti-CDKA de maíz no detectadas en otras fracciones, que podrían corresponder a CDKA1 y CDKA2 de maíz previamente reportadas (Sánchez et al. 2002 y Godínez-Palma et al. 2013). De forma similar, dos bandas correspondientes a CDKB1;1 fueron detectadas en fracciones de 200 a 337 kDa pero no en otras fracciones (Figura 13B). Ambas proteínas parecen corresponder a CDKB1;1, ya que fueron competidas

(datos no publicados, tesis doctoral de Axosco-Marin), lo que puede indicar que son formas modificadas post-traduccionalmente de CDKB1;1, quizás por fosforilación.

En extractos de ejes embrionarios embebidos por 24 h, CycD3;1 co-eluye con CDKA y CDKB1;1 en fracciones de masa entre 400 y 580 kDa, pero no con PCNA sugiriendo la presencia de diferentes poblaciones de complejos CycD3;1/CDKA y CycD3;1/CDKB1;1 asociados a otras proteínas como podrían ser la proteína RB o el factor de transcripción E2F. En fracciones entre 150 y 380 kDa, CycD3;1 sólo coeluye con CDKA y PCNA, sugiriendo la presencia de un complejo ternario entre ellas (Figura 13C). En este punto de la germinación, se pueden detectar las primeras figuras mitóticas (Baiza et al. 1989) y, la presencia de posibles complejos PCNA-CycD3;1/CDKA en masas mayores a los identificados en 12 h (337 a 420 kDa), sugiere que las células que están terminando un ciclo celular, se preparan para iniciar uno nuevo. Es interesante que, en las fracciones obtenidas de extractos de 24 h, aparecen dos o tres proteínas de 32, 34 y 36 kDa correspondientes a CDKA.

Estos resultados sugieren que el heterodímero formado por CycD3;1 con CDKs presente a lo largo de la germinación (Figuras 9 y 10) forma parte de diferentes poblaciones de asociaciones de mayor masa molecular a la correspondiente del dímero (~70 kDa), lo cual nos habla de que dicho complejo CycD3;1/CDKs se acompaña de diferentes ~~sets~~ de proteínas (entre ellas PCNA), que van cambiando a lo largo de la germinación.

Se realizaron ensayos de IPs en las fracciones donde co-eluyeron las proteínas estudiadas, pero fue difícil determinar las interacciones, quizá debido a problemas técnicos como la baja concentración de proteínas en las fracciones, por la dilución generada durante la filtración en gel y a lo laborioso de los ensayos de IPs.

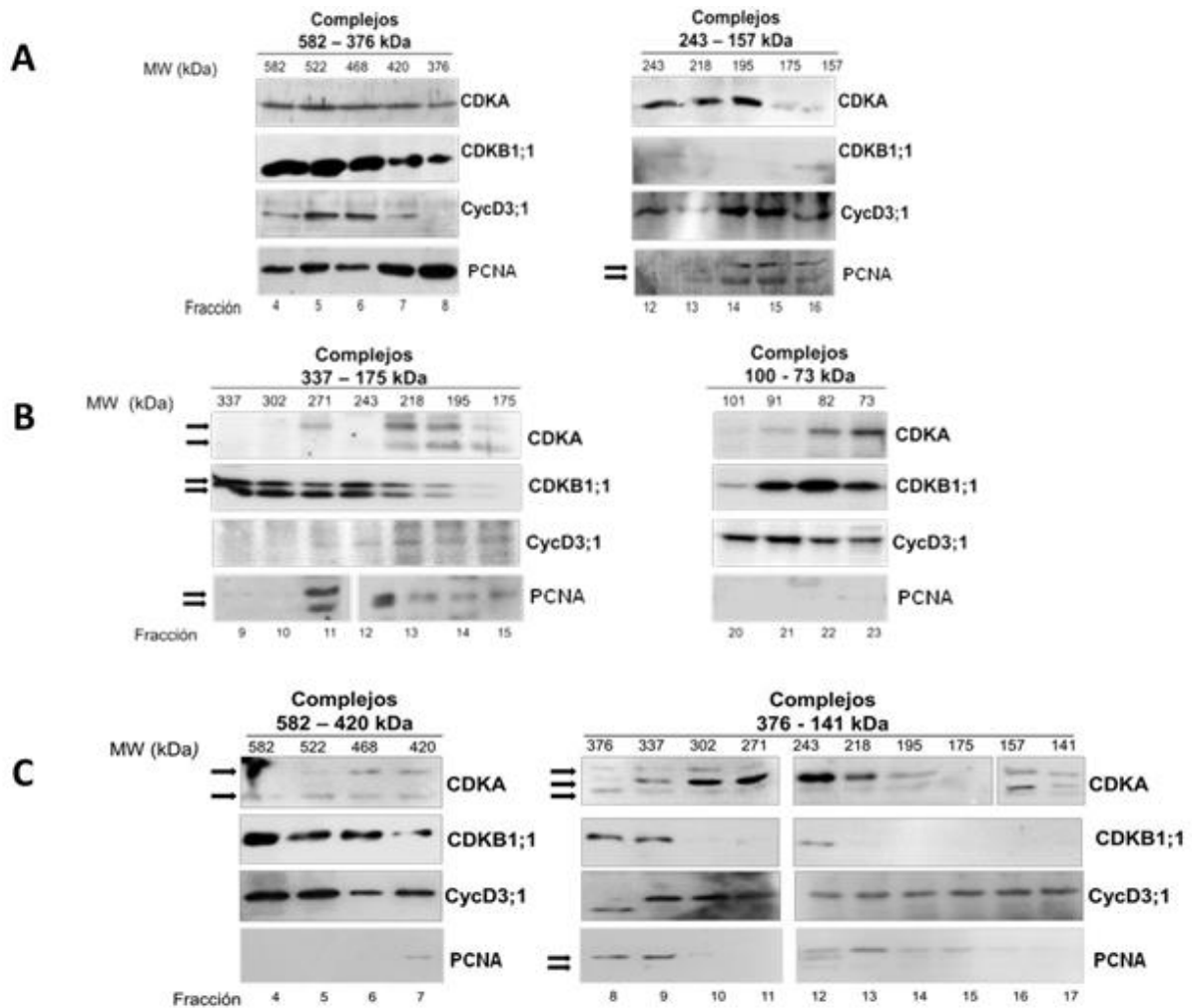


Figura 13. Co-elución de CycD3;1, CDKs y PCNA en complejos de diferente masa molecular. Extractos de proteína de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0 (A), 12 (B) y 24 (C) h fueron fraccionados por cromatografía de exclusión molecular (Anexo 4) como se indica en los métodos. Las proteínas CycD3;1, CDKA, CDKB1;1 y PCNA de maíz fueron inmunodetectadas en fracciones correspondientes a masas entre ~50 y 580 kDa. Las flechas indican posibles isoformas o proteínas modificadas post-traduccionalmente.

II. Los complejos CDKs/CycD3;1 son modulados por fitohormonas y sacarosa.

Por definición las ciclinas D se expresan en respuesta a señales ambientales y del desarrollo, lo cual se espera se refleje en la acumulación de la proteína y su función, en este caso, la actividad de cinasa de complejos CycD/CDKs que regulan la progresión del ciclo celular. Los genes de *CycD3;1* de maíz responden diferencialmente a fitohormonas en las primeras horas de germinación (Buendía-Monreal et al. 2011) y en este trabajo mostramos que la proteína está presente y forma complejos activos con CDKA y CDKB1;1. En la siguiente sección mostramos el efecto de las fitohormonas IAA y ABA, y de la sacarosa sobre la formación de los complejos CycD3;1/CDKs.

Efecto de fitohormonas (IAA y ABA)

De forma general, en el desarrollo de las plantas se puede decir que las fitohormonas IAA y ABA tienen un efecto contrario; es decir, que mientras que IAA señala de forma positiva el desarrollo y crecimiento de las plantas, ABA inhibe diferentes etapas del desarrollo que se han visto implicadas en el crecimiento. Para ver el efecto de estas hormonas en la germinación, se embebieron ejes embrionarios de maíz por 24 y 48 h en ausencia y presencia de las fitohormonas IAA y ABA.

En presencia de IAA, el peso fresco aumentó (29%) a las 24 h respecto al control y al tratamiento con ABA, pero a las 48 h de germinación, el aumento (75%) fue más significativo respecto al tratamiento con ABA, aunque no es diferente al control (Figura 14B). La longitud de los ejes embrionarios en presencia de IAA presenta una tendencia a incrementar a las 24 h respecto al control y al tratamiento con ABA, pero no es significativa, mientras que a 48 h no hay diferencias (Figura 14C). Sin embargo, a las 48 h, los ejes tratados con IAA presentaron formación de estructuras tipo callo (Figura 14A).

En presencia de ABA, el peso fresco de ejes embrionarios disminuyó (10%) a las 24 h, pero más importantemente a las 48 h de germinación comparado con el control (35%) y los ejes embrionarios tratados con IAA (43%), mientras que la longitud no fue afectada importantemente (Figura 14B). El claro efecto de ABA en el peso fresco, corrobora su papel como un inhibidor en la germinación.

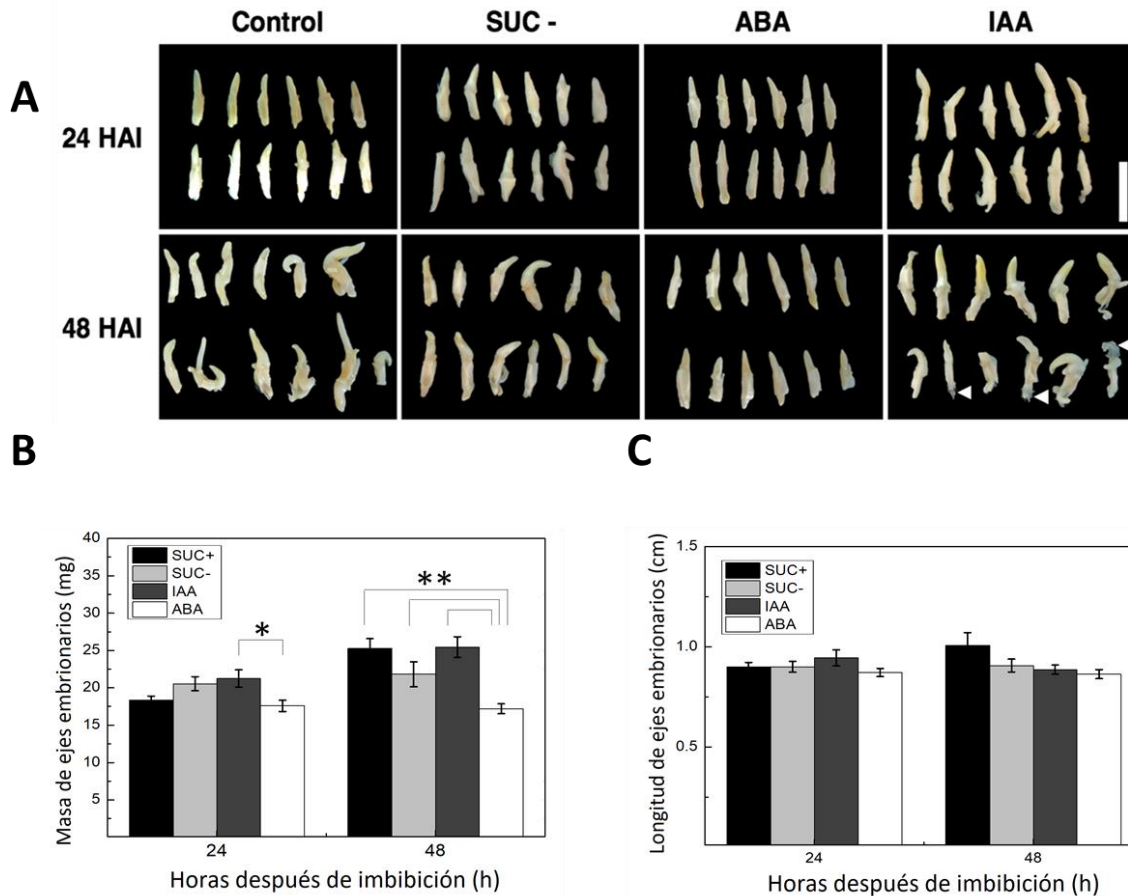


Figura 14. Efecto de la sacarosa y las fitohormonas IAA y ABA en la morfología, masa y longitud de ejes embrionarios. Fenotipo (A), masa (B) y longitud (C) de ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 y 48 h en un medio con sacarosa (Control, Suc +), sin sacarosa (Suc -), con ácido indol acético (IAA) y con ácido abscísico (ABA), respectivamente. Los datos son la media \pm ES de tres réplicas independientes (12 ejes cada una). *P < 0.05, **P < 0.01. Las puntas de flecha indican la presencia de estructuras tipo callo.

Efecto de las fitohormonas (IAA y ABA) en los complejos *CycD3;1/CDKs*

En la germinación de maíz, el IAA parece tener un papel de regulador positivo del ciclo celular al estimular la síntesis de DNA, la expresión de genes de *CycD*, entre ellos el de la *CycD3;1a* (Buendía-Monreal et al. 2011) así como la actividad de los complejos *CycD/CDKs* asociados a *CycD4* y *CycD5* (Lara-Núñez et al. 2008); mientras que el ABA actúa como regulador negativo, al inhibir el paso de células de G1 a S (Sánchez et al. 2005), disminuir la síntesis de DNA y la expresión de genes de *CycD* (Buendía-Monreal et al. 2011).

Para tratar de dilucidar el efecto de estas fitohormonas en la función de complejos asociados a *CycD3;1* en la germinación de maíz, se determinaron los niveles de proteína de *CycD3;1*, *CDKA* y *CDKB1;1* y la actividad de cinasa asociada a *CycD3;1* durante las primeras 24 h de germinación.

En ejes tratados con IAA, los niveles de proteína *CycD3;1* fueron reducidos a lo largo de la germinación, comparados con los niveles de ejes control (Figura 15A y B). Por otro lado, los niveles de *CDKA* en ejes tratados con IAA presentaron un aumento respecto a los controles en todos los tiempos estudiados (Figura 15C y D), mientras que los niveles de *CDKB1;1* aumentaron a las 6 y 12 h respecto al control y después los niveles fueron similares a los niveles del control (Figura 15E y F). La actividad de cinasa asociada a *CycD3;1* fue similar en los ejes del control y tratados con IAA entre 0 y 18 h de germinación y después ésta fue reducida a las 24 h en los ejes tratados con IAA (Figura 15A y C), congruente con la disminución de los niveles de la proteína *CycD3;1* observado en dichos extractos. La adición de IAA en las primeras horas de germinación no afecta a la *CycD3;1*, pero estimula importantemente los niveles de las CDKs, lo que podría favorecer la formación de mayor cantidad de complejos *CycD/CDKs*.

Los niveles de *CycD3;1* en ejes tratados con ABA fueron similares comparados con los niveles control durante la germinación (Figura 15A y B), mientras que los niveles de *CDKA* disminuyeron respecto al control (Figura 15C y D), resultado consistente con el reporte previo del grupo del Dr. Vázquez-Ramos (Sánchez et al. 2005). Contrariamente, los niveles de *CDKB1;1* en ejes tratados con ABA aumentaron durante la germinación respecto al control (Figura 15E y F). Sin embargo, la actividad de cinasa asociada a *CycD3;1* presentó una ligera disminución a las 6 h comparado con el control y después una reducción adicional se observó a las 24 h de germinación (Figura 16). Nuestros resultados muestran que ABA actúa como un regulador negativo en la germinación (Figura 14) y aunque disminuye la expresión del gen *CycD3;1a* en las primeras horas de imbibición (Buendía-Monreal et al. 2011) no afecta a la proteína *CycD3;1*, ni a la actividad de cinasa asociada hasta las 24 h, lo que puede deberse a la disminución en los niveles de *CDKA*, que puede ser el factor limitante. El aumento de *CDKB1;1* podría deberse a un desequilibrio del ciclo celular provocado por ABA.

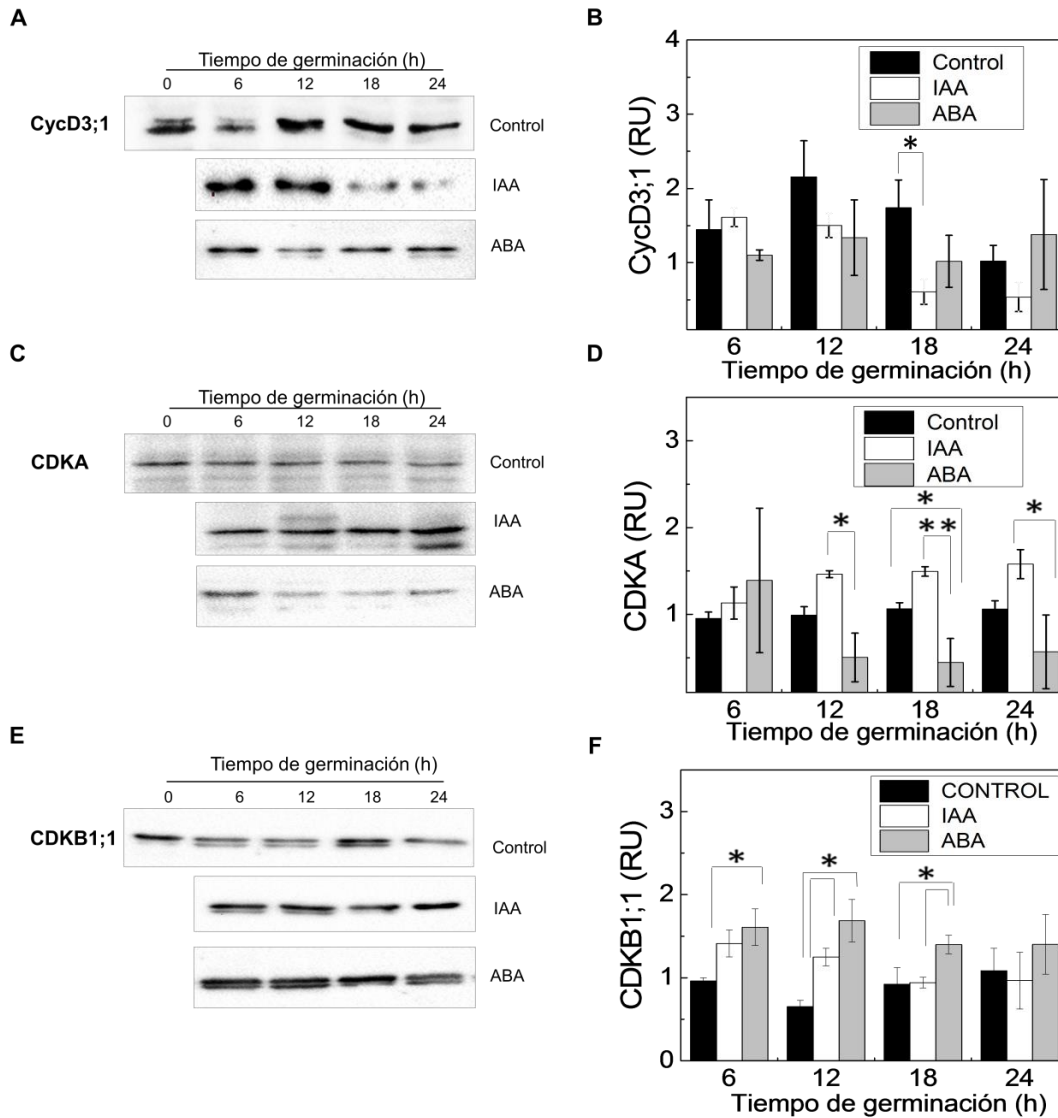


Figura 15. Efecto de IAA y ABA en los niveles de proteína de CycD3;1, CDKA y CDKB1;1 durante la germinación. Inmunodetección de las proteínas CycD3;1 (A y B), CDKA (C y D) y CDKB1;1 (E y F) usando anticuerpos específicos en extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 h en presencia o ausencia de IAA (1 μ M) y ABA (50 μ M). Las membranas teñidas con rojo de Ponceau muestran la cantidad de proteína cargada por carril (Anexo 8). El análisis densitométrico se hizo relacionando la intensidad de la banda de todas las muestras con la intensidad del control de carga y después con la intensidad de la banda de la semilla seca (0 h). Los datos son la media \pm ES de tres experimentos independientes (B, D y F). *P < 0.05, **P < 0.01. RU, Unidades relativas.

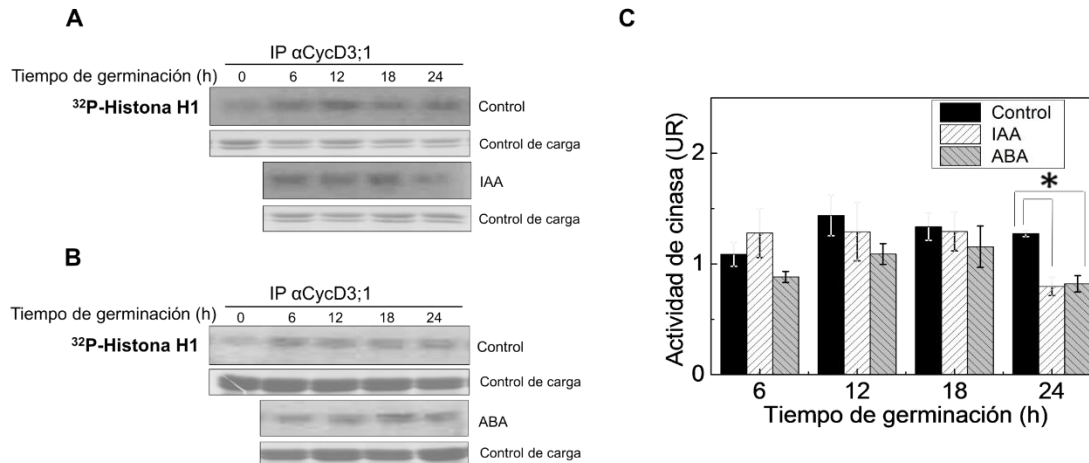


Figura 16. Efecto de IAA y ABA en la actividad de cinasa asociada a la CycD3;1 durante la germinación. La actividad de cinasa asociada a la CycD3,1 (IP anti-CycD3;1) fue determinada en extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 h en presencia o ausencia de IAA (1 μ M) y ABA (50 μ M) usando histona H1 como sustrato (A y B). El análisis densitométrico se hizo relacionando la intensidad de la banda de todas las muestras con la intensidad del control de carga y después con la intensidad de la banda de la semilla seca (0 h). Los datos son la media \pm ES de tres experimentos independientes (C). *P <0.05. UR, Unidades relativas.

Efecto de la Sacarosa en los complejos CycD3;1/CDKs

Los efectos de los azúcares en el crecimiento y desarrollo de las plantas son diversos y miles de genes responden a los niveles de azúcares (Lastdrager et al. 2014). La disponibilidad de sacarosa regula algunos procesos durante el ciclo celular como expresión de genes y niveles, actividad y estabilidad de proteínas (Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000, Healy et al. 2001, Planchais et al. 2004, Hirano et al. 2011).

Para determinar el papel de la sacarosa en el control del ciclo celular durante la germinación, y en particular su efecto en las proteínas CycD3;1 y las CDKs, y en la actividad de cinasa asociada a CycD3;1, se embebieron ejes embrionarios de maíz en presencia y ausencia de sacarosa (58 mM) por 24 y 48 h. El peso fresco y la longitud de los ejes embrionarios no mostró variaciones significativas después de la imbibición con y sin sacarosa a las 24 h, pero en ausencia de sacarosa, el peso fresco se redujo (18%) a las 48 h (Figura 14B).

La expresión de los genes *CycD3;1 a* y *b* no se alteró en ejes embebidos sin sacarosa a las 12 y 24 h, sugiriendo que la expresión de estos genes no es regulada por sacarosa (Anexo 9), contrario a la regulación de la expresión del gen *AtCycD3* (Riou-Khamlichi et al. 2000). Sin embargo, los niveles de la proteína *CycD3;1* disminuyen drásticamente en el proceso de germinación desde las 6 y hasta las 24 h de imbibición, en ejes embrionarios embebidos en ausencia de sacarosa (Figura 17A y B). Por otro lado, los niveles de CDKA y CDKB1;1 no mostraron variaciones significativas si la sacarosa está o no presente en el medio de imbibición (Figura 17C-F). Finalmente, la actividad de cinasa asociada a la *CycD3;1* disminuyó paralelamente a la reducción de los niveles proteicos de la ciclina después de las 6 h de germinación en ejes embrionarios embebidos sin sacarosa (Figura 18).

Durante la germinación, los niveles de proteína de *CycD3;1* parecen ser modulados por la presencia de sacarosa en el medio, sugiriendo un papel regulatorio a nivel traduccional y/o post-traduccional, lo cual explica la disminución de la actividad de cinasa asociada a esta ciclina.

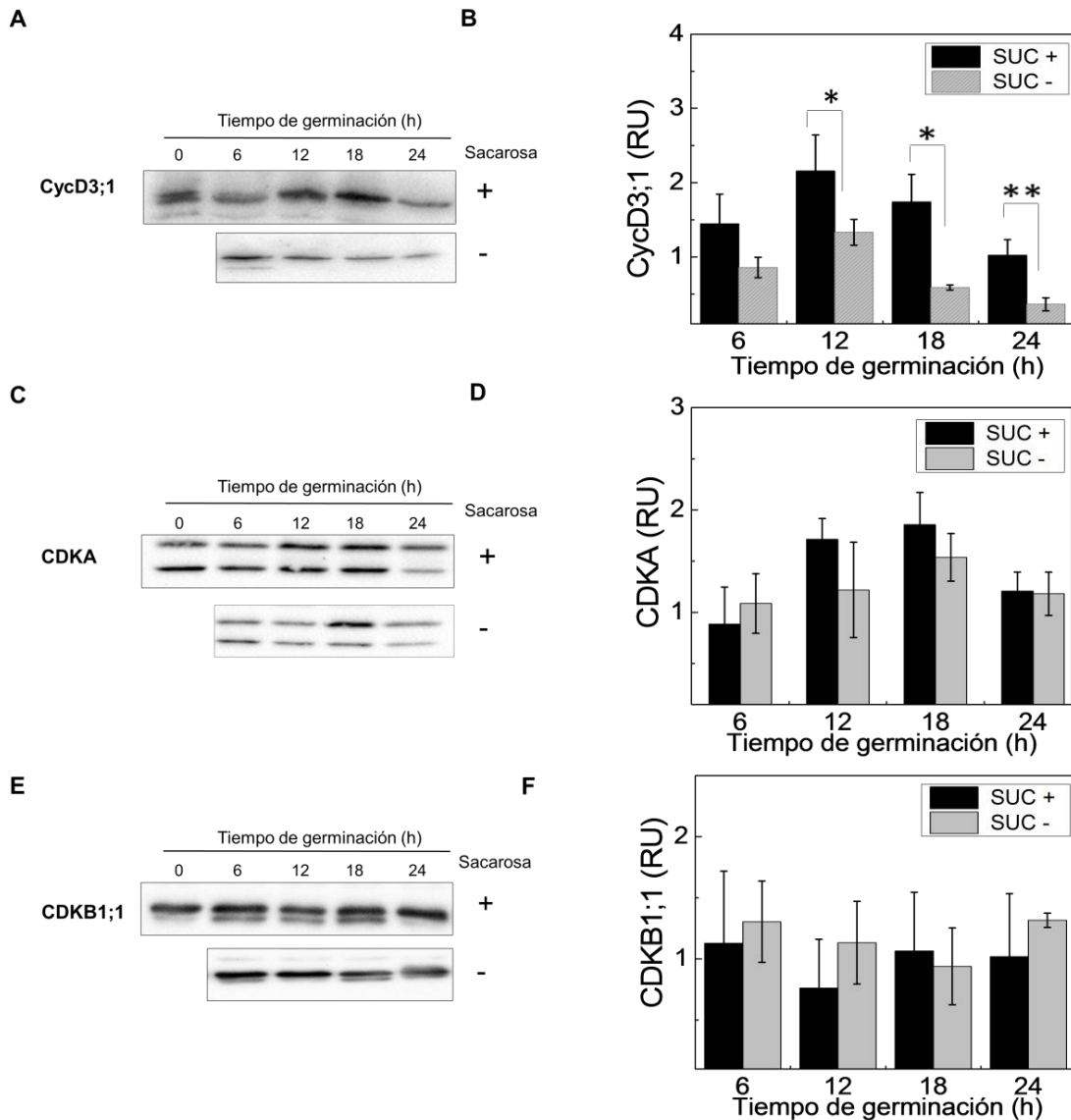


Figura 17. Efecto de la sacarosa en los niveles de proteína de CycD3;1, CDKA y CDKB1;1 durante la germinación. Inmunodetección de las proteínas CycD3;1 (A y B), CDKA (C y D) y CDKB1;1 (E y F) usando anticuerpos específicos en extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 h en presencia o ausencia de sacarosa (58 mM). Las membranas teñidas con rojo de Ponceau muestran la cantidad de proteína cargada por carril (Anexo 8). El análisis densitométrico se hizo relacionando la intensidad de la banda de todas las muestras con la intensidad del control de carga y después con la intensidad de la banda de la semilla seca (0 h). Los datos son la media \pm ES de tres experimentos independientes (B, D y F). *P <0.05, **P <0.01. RU, Unidades relativas.

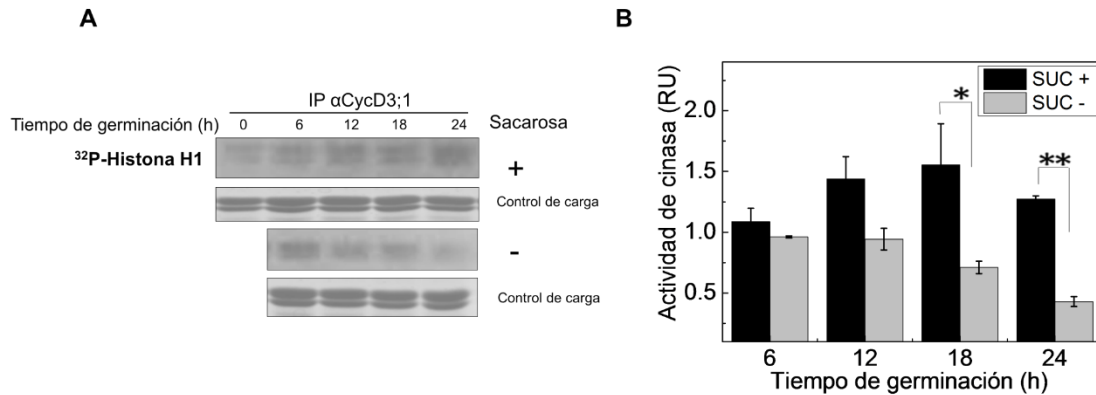


Figura 18. Efecto de sacarosa en la actividad de cinasa asociada a la CycD3;1 durante la germinación. La actividad de cinasa asociada a la CycD3;1 (IP anti-CycD3;1) fue determinada en extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 h en presencia o ausencia de sacarosa usando histona H1 como sustrato (A). El análisis densitométrico se hizo relacionando la intensidad de la banda de todas las muestras con la intensidad del control de carga y después con la intensidad de la banda de la semilla seca (0 h). Los datos son la media \pm ES de tres experimentos independientes (B). *P <0.05. RU, Unidades relativas.

La estabilidad de la proteína CycD3;1 es modulada por sacarosa durante la germinación

La reducción en los niveles proteicos de CycD3;1 en ausencia de sacarosa puede deberse tanto a la disminución de la tasa de síntesis de proteína como a la disminución de la estabilidad de la CycD3;1 (o a ambos). Para probar estas posibilidades, se embebieron ejes embrionarios de maíz por 12 h en presencia de sacarosa y después cicloheximida, (Chx, un inhibidor de la síntesis de proteínas) fue adicionada por 8 h más, tiempo en el cual los niveles de CycD3;1 fueron determinados (Figura 19A y B). En ejes re-embebidos en un medio sin sacarosa, los niveles de CycD3;1 disminuyeron a la mitad a las 14 h de germinación y en un 25% más a partir de las 16 h, comparados a los ejes con Chx y sacarosa. Estos resultados sugieren que la sacarosa puede regular la estabilidad de CycD3;1 durante la germinación de maíz.

La estabilidad de CycD3;1 también fue determinada desde el inicio de la germinación. Se embebieron ejes embrionarios de maíz en un medio con Chx y en presencia y ausencia de sacarosa desde ejes secos y hasta las 9 h de germinación. En ausencia de sacarosa, los niveles de CycD3;1 se redujeron a las 3 h de germinación y fueron virtualmente

ausentes en tiempos posteriores, mientras que los niveles no fueron alterados cuando la sacarosa está presente (Figura 19C).

Nuestros resultados sugieren que los mecanismos involucrados en mantener la estabilidad de la CycD3;1 son modulados por sacarosa y parecerían ser específicos para esta ciclina, ya que la estabilidad de otras ciclinas D de maíz no se modula por este azúcar (Godínez-Palma et al. 2013).

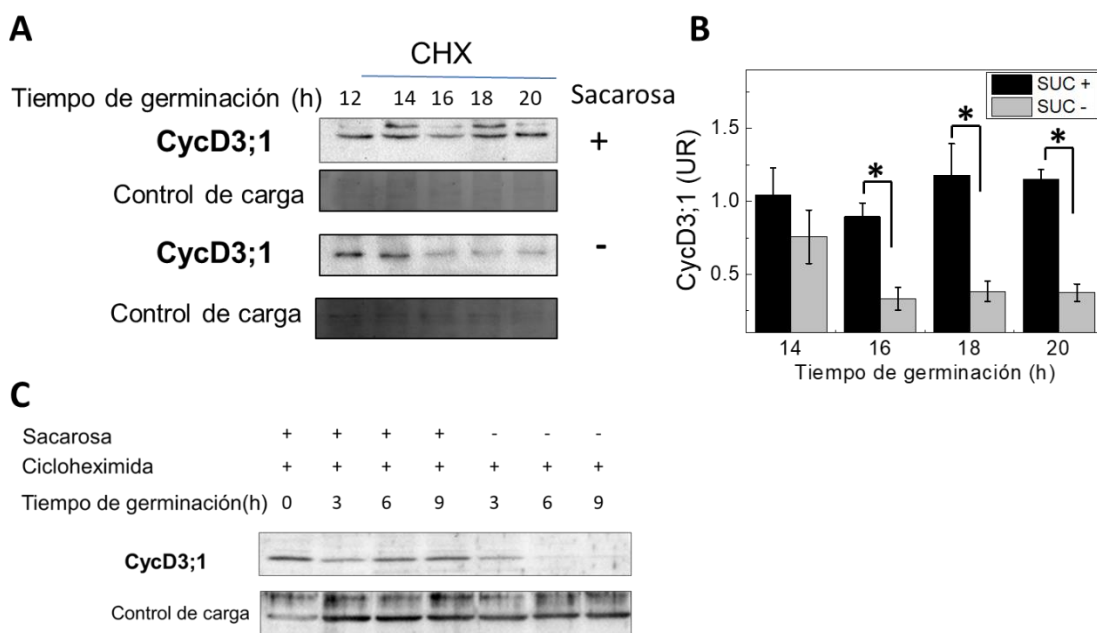


Figura 19. Regulación de la estabilidad de la CycD3;1 por sacarosa durante la germinación. Se embebieron ejes embrionarios de maíz por 12 h en presencia de sacarosa, después se adicionó cicloheximida (Chx) por vacío y la imbibición continuó por 2 (14), 4 (16), 6 (18) y 8 (20) h más en presencia o ausencia de sacarosa y se inmunodetectó a la CycD3;1 (A). El análisis densitométrico se hizo relacionando la intensidad de la banda de todas las muestras con la intensidad del control de carga y después con la intensidad de la banda de la semilla seca (12 h). Los datos son la media \pm ES de tres experimentos independientes (B). *P <0.01. Se embebieron ejes embrionarios de maíz por 3, 6 y 9 h en presencia de Chx y en presencia y ausencia de sacarosa y la CycD3;1 fue inmunodetectada (C). UR, Unidades relativas.

DISCUSIÓN

Los mecanismos básicos que regulan las transiciones del ciclo celular entre eucariontes están conservados, sin embargo, en plantas, las familias de genes contienen numerosos miembros, una característica que puede deberse a la alta plasticidad requerida por un organismo sésil para adaptarse a ambientes diferentes y frecuentemente agresivos. El gran número de miembros en las familias génicas puede representar redundancia funcional, aunque algunos estudios proveen evidencia de funciones específicas para diferentes miembros de una familia dada, por ejemplo, estudios de las familias de ciclinas tipo D y KRPs en *Arabidopsis*, han sugerido que algunas tienen funciones específicas (Masubelele et al. 2005, Inzé & De Veylder 2006).

Como en mamíferos y levaduras, las ciclinas tipo D de plantas son reguladores esenciales de la entrada al ciclo celular y que responden a señales internas y externas como fitohormonas, factores de crecimiento, señales de estrés y nutrientes, entre otros (Soni et al. 1995, Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000). La caracterización del papel de las diferentes Cyc D durante el ciclo celular de plantas sugiere que tienen funciones no redundantes; incluso para Cycls de la misma subfamilia, como las CycD3. En *Arabidopsis*, la CycD3;1 parece actuar en la transición G1-S (Soni et al. 1995) mientras que, en tabaco, la NictaCycD3;2 es una ciclina de fase G1 (Sorrel et al. 1999) y la NictaCycD3;3 parece ser una ciclina de fase M (Nakagami et al. 2000). En tejidos de maíz, la expresión de los genes de *CycD3;1a* y *CycD3;1b* difieren considerablemente: La *CycD3;1b* es expresada principalmente en raíz mientras que la *CycD3;1a* se expresa mayoritariamente en hoja y mesocotilo, pero no en raíz (Buendía-Monreal et al. 2011); por otro lado, ambos genes son expresados con un patrón fluctuante durante la germinación. Otros genes de CycD son expresados con patrones variados durante la germinación de maíz y su respuesta a fitohormonas como ABA, auxinas y citocininas es diferencial (Quiroz-Figueroa & Vázquez-Ramos 2006, Buendía-Monreal et al. 2011), de nuevo, sugiriendo que no actúan en forma redundante. En este trabajo nos enfocamos a investigar el comportamiento de la proteína CycD3;1, los complejos formados y su actividad de cinasa asociada durante la germinación y en respuesta a señales del desarrollo.

A nivel de proteína, la CycD3;1 (a y/o b, el anticuerpo no puede discriminar entre ellas) está presente en todos los tiempos de germinación analizados, un comportamiento compartido con las otras Cycls D de maíz estudiadas (Gutiérrez et al. 2005, Lara-Núñez et

al. 2008, Godínez-Palma et al. 2013), mientras que los niveles de transcritos (de ambos genes) incrementan a lo largo del proceso germinativo (Buendía-Monreal et al. 2011), indicando una regulación a nivel post-transcripcional.

La CycD3;1 de maíz y sus asociaciones con CDKA, CDKB1;1 y PCNA

En *Arabidopsis*, las CycsD se asocian a CDKA y las Cycs tipo A y B se unen a CDKB (Healy et al. 2001, Harashima & Schnittger 2012); en tabaco, una CycD3 se asocia tanto a CDKA como a CDKB (Kawamura et al. 2006). En maíz, las Cycs D (D2;2, D4;2 y D5;3) también se unen tanto a CDKA como a una CDKB (B1;1), mostrando diferentes patrones de asociación y actividad de cinasa durante la germinación (Godínez-Palma et al. 2013). La CycD3;1 de maíz también es capaz de asociarse a CDKA y CDKB1;1 en el proceso germinativo, formando complejos con actividad de cinasa sobre la histona H1 como sustrato. En las primeras horas de la germinación, se espera que los complejos CycD3;1/CDKA estén actuando en G1 y G1/S, mientras que la función de complejos entre una posible ciclina de G1 y una CDK mitótica como CycD3;1/CDKB1;1 aun no es clara. En *Arabidopsis*, la interacción entre una CycD3;1 con una CDKB *in vivo* no ha sido identificada, sin embargo, asociaciones de ciclinas tipo D de maíz con CDKB1;1 parecen ser usuales, al menos en la germinación (Godínez-Palma et al. 2013).

La proteína PCNA está altamente conservada entre eucariontes a nivel de secuencia, estructura y función. Estructuralmente es un homotrímero que actúa como factor de procesividad de las DNA polimerasas durante la replicación y en otros eventos del metabolismo del DNA (Strzalka et al. 2011), aunque en animales también participa como proteína de anclaje en otras etapas del ciclo celular, interaccionando con proteínas como el inhibidor p21 y ciclinas tipo D (Stoimenov & Helleday 2009). En *Arabidopsis* y maíz se asocia a CycD de forma diferencial (Gutiérrez et al. 2002; Lara-Núñez et al. 2008; Strzalka et al. 2015). Además, la proteína PCNA tanto de células animales como de maíz, tienen la capacidad de formar dobles trímeros cuya función aún no se entiende (Naryzhny et al. 2005, Becerril et al. 2012). En este trabajo mostramos que PCNA recombinante tiene la capacidad de adquirir su estructura cuaternaria (homotrímero), al igual que la proteína endógena de maíz (Fig. 12). Ésta última parece lograrlo más eficientemente, indicando que otras proteínas presentes en el extracto proteico pueden facilitar el ensamble, y no sólo del trímero, sino también del doble trímero.

Previamente se reportó que algunas ciclinas tipo D de maíz (D2;2, D4;2 y D5;3) y las de *Arabidopsis* se asocian a PCNA (Gutiérrez et al. 2002, Lara-Núñez et al. 2008, Strzalka et al. 2015) excepto la AtCycD3;1. Sin embargo, en la germinación de maíz, la CycD3;1 puede asociarse a PCNA (Fig. 10), y es necesario dilucidar si es particular en maíz o la respuesta se debe a este momento particular del desarrollo, pero esto queda por ser dilucidado. Por otro lado, anteriormente se mostró que PCNA se asocia a una CDK con secuencia PSTAIRE (Sánchez et al. 2002), en este trabajo, se corroboró la asociación de PCNA con CDKAs de maíz, lo que indica que PCNA se puede asociar a complejos CycD3;1/CDKs (Fig. 10), como también se asocia a otros complejos CycD/CDKs de maíz previamente encontrados (Gutiérrez et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2008). Se especula que PCNA puede estar actuando como proteína de anclaje de complejos CycD/CDKs, favoreciendo la identificación de sustratos de dichos complejos. También identificamos la asociación entre PCNA y una proteína putativa de mitosis, la CDKB1;1. Ambas proteínas se han relacionado a eventos de reparación de DNA (Hoegge et al. 2002, Endo et al. 2012), lo que sugiere una explicación de tales interacciones, donde complejos CycD/CDKB1;1 asociados a PCNA podrían fosforilar proteínas de la maquinaria de reparación; será importante estudiar dichos complejos. No obstante, tampoco puede descartarse que complejos Cyc/CDKB1;1-PCNA actúen en otro evento del ciclo celular no asociado a la reparación de DNA.

La proteína PCNA de *Arabidopsis* y de animales es blanco de diversas modificaciones post-traduccionales, como fosforilación, ubiquitinación o sumoilación (Hoegge et al. 2002, Wang et al. 2006, Strzalka et al. 2011). La identificación de dos o tres posibles bandas proteicas correspondientes a PCNA de maíz asociadas a CycD3;1 y CDKB1;1 respectivamente, indican, primero, posibles formas modificadas post-traduccionales de PCNA en la germinación de maíz, y segundo, que dichas modificaciones pueden ser importantes en la regulación de la interacción de PCNA con CycD3;1 y CDKs tipo A y B1;1; esto debido a que encontramos un patrón diferencial de las posibles formas modificadas de PCNA interaccionando con las proteínas de ciclo celular mencionadas (Fig 10).

En los ensayos de cromatografía de exclusión molecular, la CycD3;1 co-eluye con las CDKs (A y B1;1) y PCNA en fracciones de diferente masa molecular, dependiendo del momento de la germinación (Fig. 13). Si las co-eluciones son el resultado de la asociación transitoria de los complejos CycD/CDKs con posibles sustratos como la proteína RBR, el

factor de transcripción E2F y las DNA polimerasas, las proteínas inhibidoras KRPs, entre otras, esto puede explicar la alta masa molecular de los complejos y su variación a lo largo de la germinación. Estas variaciones están probablemente relacionadas a cambios funcionales asociados a los diferentes estados del ciclo celular. Previamente se observó que las CycD se asocian a PCNA o KRPs y muestran actividad de cinasa asociada (Gutiérrez et al. 2005, Sánchez et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2008); además se ha visto la fosforilación de una putativa DNA polimerasa tipo α por complejos de una PCNA y una CDK tipo PSTAIRE (Gómez-Roig & Vázquez-Ramos 2003).

En la figura 20 se resume una posible dinámica de la formación de complejos CycD3;1/CDKs-PCNA y CycD3;1/CDKs asociados a otras proteínas en el transcurso de la germinación. A las 0 h de imbibición, la mayoría de las células del embrión se encuentran en fase G1 (Bewley et al. 2012); en este momento, los posibles complejos CycD3/CDKs-PCNA (~150 kDa) se encuentran en fracciones de masas mayores (>400 kDa) que los que se forman a las 12 h de imbibición, sugiriendo que están asociados a otras proteínas y que pueden ser parte de los componentes que las células de las semillas preparan para el re-inicio del ciclo celular en la germinación. A las 12 h de imbibición, posibles asociaciones CycD3;1/CDKs-PCNA están presentes en complejos de menor masa que los identificados en la semilla seca (entre 175 y 337 kDa), lo que podría indicar que están participando en G1 tardía y quizá en la transición G1/S, ya que las células del eje embrionario se encuentran iniciando la replicación (Baiza et al. 1989). Podría especularse que los complejos CycD/CDK son más dinámicos previo a la entrada a S, y su interacción con otras proteínas es más transitoria. A las 24 h de imbibición es el momento en que aparecen las primeras figuras mitóticas (Baiza et al. 1989), y se identificaron los complejos CycD3;1/CDKs-PCNA en masas mayores a los identificados a las 12 h (entre 337 a 420 kDa), sugiriendo que las células que están terminando el ciclo celular se preparan para iniciar uno nuevo.

Por otro lado, la actividad de las CDKAs no sólo es regulada por su asociación con una ciclina, sino también por modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones; la fosforilación en la treonina 160 (T160) la activa como cinasa, mientras que fosforilaciones en las posiciones treonina 14 y tirosina 15 (T14Y15) inhiben la actividad. Se especula que también las CDKs tipo B son blanco de estas modificaciones, debido a la conservación de estos aminoácidos en su estructura primaria. La identificación de dos o tres bandas

proteicas de CDKB1;1 y CDKA respectivamente, sugiere que son formas modificadas post-traduccionalmente de estas cinasas probablemente por fosforilación.

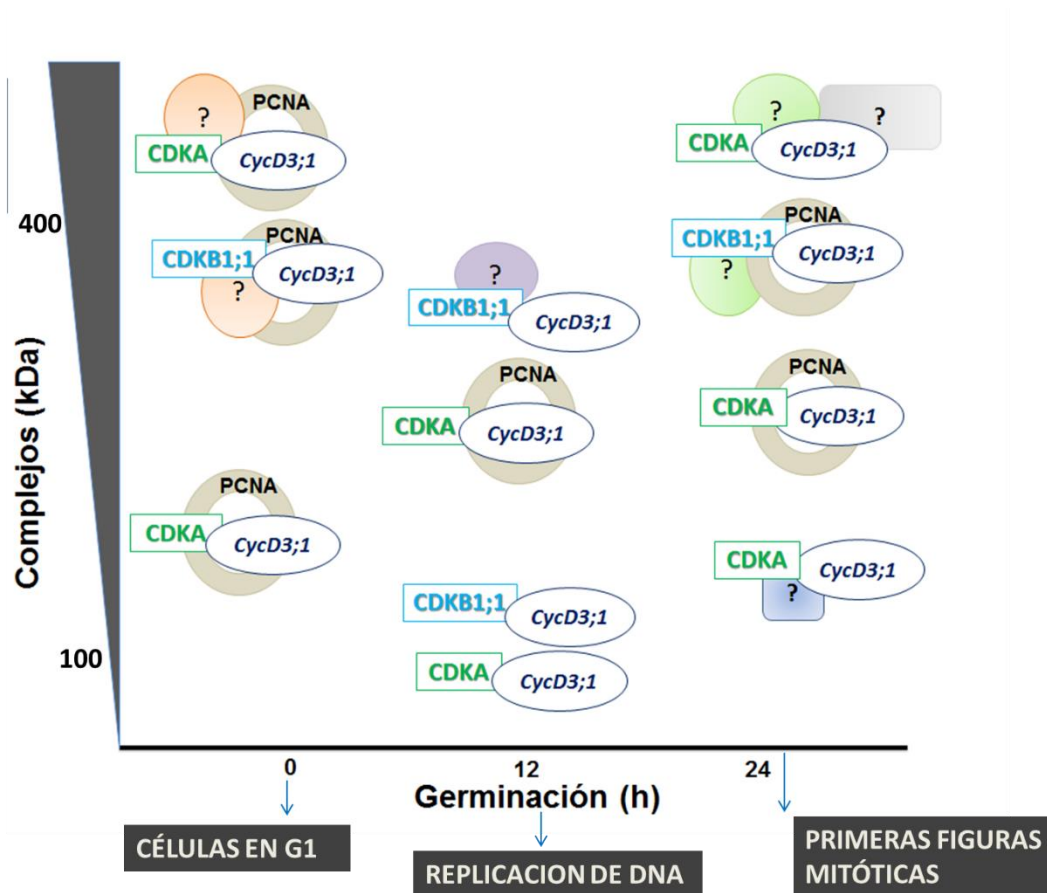


Figura 20. Modelo de la presencia de complejos CycD3;1/CDKs-PCNA en el transcurso de la germinación.

Complejos CycD/CDKs modulados por fitohormonas y sacarosa

Similar a las CycD en mamíferos, sus ortólogos en plantas median la señalización por factores endógenos y exógenos como fitohormonas y otros factores de crecimiento durante el ciclo celular. En cultivos de células en suspensión de Arabidopsis, la expresión de CycD es inducida por citocininas (Soni et al. 1995, Riou-Khamlichi et al. 1999) y fuentes de carbono (Riou-Khamlichi et al. 2000, Healy et al. 2001).

El papel de las fitohormonas durante el crecimiento y desarrollo de las plantas es esencial para mantener un equilibrio entre proliferación y diferenciación, (Garay-Arroyo et al. 2012). Las auxinas están involucradas en todos los estados del crecimiento y desarrollo de todos

los órganos de las plantas, además de regular la proliferación celular y la transición de proliferación a diferenciación en el meristemo apical de la raíz (Ishida et al. 2010, Santner et al. 2009).

En maíz, la adición de IAA incrementa la síntesis de DNA (Quiroz-Figueroa & Vázquez-Ramos 2006, Vázquez-Ramos & Lara-Núñez 2008) y la actividad de complejos CycD4;2/CDK y CycD5/CDK en las primeras horas de germinación (Lara-Núñez et al. 2008), lo que indica una activación temprana de la proliferación. Esto es consistente con el incremento en la masa de los ejes embrionarios germinados en presencia de IAA, lo que podría deberse principalmente a eventos de proliferación y no a eventos de elongación. Sin embargo, nuestros datos muestran que IAA reduce los niveles de la proteína CycD3;1 mientras la actividad de cinasa asociada no varía a lo largo de la germinación hasta las 24 h, cuando la actividad disminuye, en contraste al incremento observado en los niveles del transcrito en las primeras 16 h (Buendía-Monreal et al. 2011). Lo anterior indica una regulación a niveles traduccional y post-traduccional. Por otro lado, IAA incrementa los niveles de las cinasas CDKA y CDKB1;1, particularmente en estados tempranos de la germinación, lo que sugiere que se favorece la formación de otros complejos con otras ciclinas D de maíz, como podrían ser la CycDD4;2 y CycD5 (Lara-Núñez et al. 2006). Por lo tanto, si las auxinas estimulan algunos eventos del ciclo celular durante la germinación, la CycD3;1 podría no ser el blanco primario (Figura 21). Tampoco puede descartarse una activación de dichos complejos debida a alguna señalización desencadenada por IAA, que favorezca la fosforilación de la T160 de las CDKs. Entonces, las CDKAs y CDKB1;1 solas o en complejo con ciclinas pueden ser blanco de regulación de IAA a nivel traduccional y posiblemente post-traduccional.

El ABA es una fitohormona involucrada en la regulación del desarrollo de semillas, principalmente durante la dormancia aunque también participa en la respuesta de las plantas a estrés ambiental particularmente debido a déficit de agua (Bewley et al. 2012, Wang & Zhang, 2007). La presencia de ABA exógena durante la germinación de semillas de maíz y café detiene las células en fase G1 (Sánchez et al. 2005), y reduce la síntesis de DNA (Da Silva et al. 2008, Buendía-Monreal et al. 2011). Aquí mostramos que la fitohormona ABA previene la ganancia de masa de los ejes embrionarios de maíz, corroborando su papel como inhibidor de la germinación. Aunque el ABA, también regula negativamente la expresión de genes de *CycD* de maíz en las primeras horas de germinación, entre ellos el de *CycD3;1a* (Buendía-Monreal et al. 2011), no afecta

significativamente los niveles de la proteína CycD3;1, ni la actividad de cinasa asociada hasta las 24 h (Figura 21).

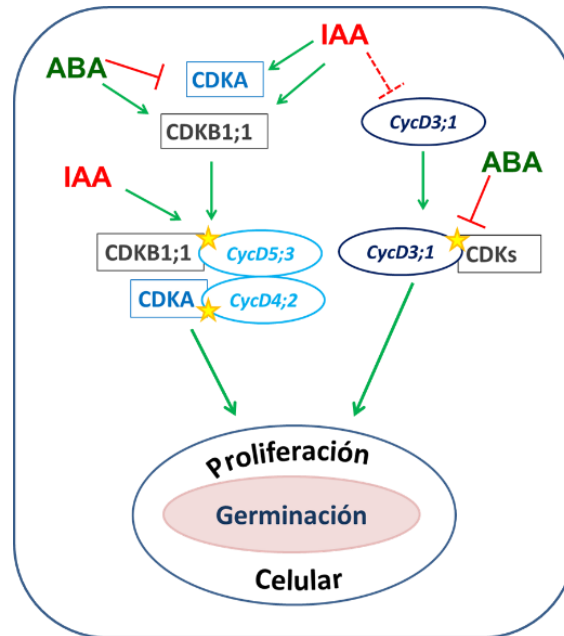


Figura 21. Modelo del efecto de IAA y ABA en los complejos CycD3;1/CDKA(B1;1). Flecha verde, activación; flecha roma roja, inhibición; estrella, complejos activos y línea punteada, posible inhibición.

Los niveles de la proteína CDKA fueron considerablemente reducidos por ABA, mientras que los niveles de CDKB1;1 incrementaron, lo que quizás explicaría la actividad de cinasa constante observada entre 0 y 18 h de germinación (Figura 21). El incremento en la cantidad de proteína CDKB1;1, un putativo marcador de G2/M, en respuesta a la adición de ABA es un rompecabezas y quizá es un indicador de la desregulación de pasos secuenciales que permiten completar un ciclo celular típico.

Por otro lado, la disminución de la actividad cinasa asociada a CycD3;1 hacia las 24 h en presencia del ABA puede deberse a dos factores: primero al decremento de complejos CycD3/CDKA activos, donde esta cinasa puede ser el factor limitante. Segundo, que el ABA desencadene señales que activen cinasas como Wee1 la cual fosforila a CDKs en T14 y Y15 y consecuentemente las inhibe.

Por otro lado, en las plantas, la sacarosa es usada como fuente de carbono y molécula señal. Ejes embrionarios de maíz embebidos sin fuente de carbono externa mostraron

una crecimiento marginal y dificultad para ganar masa a partir de las 72 h respecto a los ejes donde se adicionó sacarosa (Lara-Núñez et al. 2017); a las 48 h experimentales que nosotros probamos no observamos diferencias en la masa y longitud de los ejes embrionarios.

En contraste a los resultados de células de *Arabidopsis* donde la expresión del gen *CycD3* responde a la sacarosa del medio (Riou-Khamlichi et al. 2000), en maíz la expresión de ambos genes, *CycD3;1a* y *CycD3;1b*, no es afectada por la disponibilidad de sacarosa en el medio durante la germinación; sin embargo, es probable que haya un efecto a nivel de regulación traduccional, pues los niveles de proteína son mayores en todos los tiempos, así como la actividad cinasa asociada en presencia de sacarosa en el medio de imbibición. Los niveles proteicos de CDKA y CDKB1;1 no fueron modificados en ausencia de sacarosa. Estos datos sugieren que el incremento en la actividad de cinasa de complejos asociados a *CycD3;1* puede deberse a modificaciones post-traduccionales sobre las CDKs o a los complejos *CycD3;1/CDKs* formados o a ambos (Figura 22).

La *CycD3;1* parece ser una proteína inestable solamente en ausencia de sacarosa durante la germinación, cuando se adiciona sacarosa al medio, la proteína parece ser estable, pero cuando se remueve, se promueve la degradación de la ciclina. En este contexto, la *CycD3;1* parece regularse diferencialmente a otras *Cycs* tipo D de maíz, las cuales son degradadas gradualmente en un medio suplementado con sacarosa y cicloheximida (Godínez-Palma et al. 2013). Quizá la sacarosa actúa como una molécula señalizadora, promoviendo una modificación post-traducciona que protege a la *CycD3;1* de ser degradada (Planchais et al. 2004). Será importante identificar en que es diferente esta ciclina con respecto a las otras ciclinas.

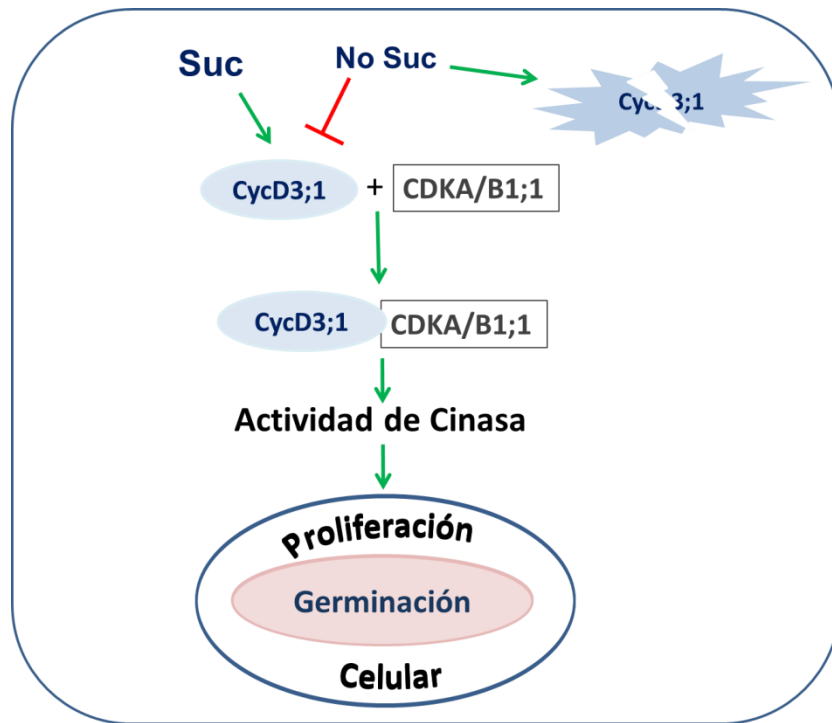


Figura 22. Modelo del efecto de sacarosa en los complejos CycD3;1/CDKA(B1;1). Flecha verde, activación y flecha roma roja, inhibición.

En las primeras horas de germinación de los ejes embebidos en ausencia de sacarosa disminuye la síntesis de DNA, y consecuentemente el número de células en el RAM (Lara-Núñez et al. 2017). Los eventos mencionados y la disminución de la proteína CycD3;1 en ausencia de sacarosa, sugieren un papel importante de esta ciclina en el primer ciclo celular del proceso germinativo.

CONCLUSIONES

Durante el proceso de germinación de maíz,

- ❖ La proteína CycD3;1 forma complejos activos con CDKA y CDKB1;1.
- ❖ PCNA se asocia a CycD3;1, a CDKA y CDKB1;1.
- ❖ Los complejos heterodiméricos CycD3;1/CDKA y CycD3;1/CDKB1;1 presentes parecen formar parte de complejos proteicos de masas moleculares mayores a 150 kDa, indicando que podrían asociarse a otras proteínas a lo largo del proceso germinativo como a PCNA, entre otras.
- ❖ IAA promueve la acumulación de la proteína CDKA desde las 12 h, lo cual puede favorecer la formación de complejos activos CycD/CDKA que pueden estar acortando los tiempos del ciclo celular.
- ❖ ABA no afecta la actividad de los complejos CycD3;1/CDKs en las primeras etapas, pero la actividad de dichos complejos es regulada negativamente en tiempos tardíos, probablemente debido a la disminución en los niveles de la proteína CDKA ó por su modificación post-traducciona l o por ambos.
- ❖ La sacarosa juega un papel importante en regular la estabilidad de la CycD3;1. En su ausencia la ciclina se degrada y como consecuencia disminuye la actividad de los complejos CycD3;1/CDKs, que pueden estar afectando la proliferación celular en el meristemo apical de la raíz de ejes embrionarios.

PERSPECTIVAS

- ✎ Estudiar el papel de los complejos CycD3;1/CDKB1;1 durante la germinación, así como identificar sus sustratos.
- ✎ Estudiar el papel de los complejos CycD/CDKB1;1-PCNA en la reparación de DNA.
- ✎ Identificar las modificaciones post-traduccionales de la que es blanco PCNA de maíz y sus efectos en la interacción con los complejos CycD/CDKs.
- ✎ Estudiar el efecto de IAA y ABA en las fosforilaciones activadoras e inhibitoras de las CDKs.
- ✎ Estudiar las modificaciones post-traduccionales que pueden regular la estabilidad de la CycD3;1.
- ✎ Estudiar los mecanismos de degradación de la proteína CycD3;1

REFERENCIAS

- ✶ **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD** (1994) In *Molecular Biology of the Cell: The Cell-Division Cycle* 3rd edition, Garland pp 863-910
- ✶ **Axosco-Marin J.** Complejos CycsD (2;2, 3;1, 4;2, 5;3)/CDKA(B1;1) de maíz. Localización subcelular, actividad de cinasa y asociación con proteínas del ciclo celular. Tesis doctoral en proceso. UNAM
- ✶ **Baiza MA, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E** (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J of Plant Physiol* 135: 416–421
- ✶ **Becerril N, Martínez MA, García E, Vazquez-Ramos JM** (2012) Chromatin Bound PCNA is Complexed with Cell Cycle Protein Regulators as Determined by Chromatin Immunoprecipitation. *J Mex Chem Soc* 56: 10–14
- ✶ **Bewley JD, Black** (1994) In *Seeds: Physiology of Development and Germination* 2nd edition, New York Plenum
- ✶ **Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H** (2012) In: *Seed: Physiology of Development* 3rd Edn, Springer-Verlag, New York, pp 247-290
- ✶ **Bradford MM** (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, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla L, García E, Vázquez-Ramos JM** (2011) The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plant* 143: 297–308
- ✶ **Coe EH** (2002) The origins of maize genetics. *Nature* 2: 898-905
- ✶ **Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM** (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev* 15(7): 902–911
- ✶ **Cruz-García F, Jiménez LF, Vázquez-Ramos JM** (1995) Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize sedes. *Seed Sci Res* 5: 15-23
- ✶ **Da Silva EAA, Toorop PE, Van Lammeren AA, Hilhorst HWM** (2008) ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. *Ann Bot* 102(3): 425–433

- 📌 **De Clerck A & Inzé D** (2006) Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41(5):293-313
- 📌 **Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy J, Jacquard A, Kilby NJ, Murray JAH** (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 15(1): 79–92
- 📌 **Dong T, Park Y, Hwang I** (2015) Abscisic acid: biosynthesis, inactivation, homeostasis and signaling. *Essays in Biochem* 58: 29-48
- 📌 **Doonan JH, Kitsios G** (2009) Functional evolution of cyclin-dependent kinases. *Mol Biotechnol* 42 (1): 14-29
- 📌 **Endo M, Nakayama S, Umeda-Hara C, Ohtsuki N, Saika H, Umeda M, Toki S** (2012) CDKB2 is involved in mitosis and DNA damage response in rice. *Plant J* 69: 967–977
- 📌 **Eveland A, Jackson DP** (2011) Sugars, signaling and development. *J Exp Bot* 63(9): 3367-3377
- 📌 **Feng M, Kim JY** (2015) Revisiting Apoplastic Auxin Signaling Mediated by AUXIN BINDING PROTEIN 1. *Mol Cells* 38(10): 829-835
- 📌 **Finkelstein RR, Gibson SI** (2001) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol* 5: 26-32
- 📌 **Gao Y, Zhanga Y, Zhanga D, Daia X, Estelle M, Zhaoa Y** (2015) Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development. *Proc Natl Acad Sci USA* 112 (7): 2275-2280
- 📌 **Garay-Arroyo A, Sánchez MP, García-Ponce B, Azpeitia E, Álvarez-Buylla ER** (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Dev Dyn* 241: 1867-1885
- 📌 **Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J** (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54: 433–439.
- 📌 **Gibson SI** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* 8: 93-102.
- 📌 **Godínez-Palma SK, García E, Sánchez MP, Rosas F, Vázquez-Ramos JM** (2013) Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J Exp Bot* 64(18): 5661–5671

- 📌 **Godínez-Palma SK, Rosas-Bringas FR, Rosas-Bringas OG, García E, Zamora-Zaragoza J, Vázquez-Ramos JM** (2017) Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D–cyclin-dependent kinase complexes. *J Exp Bot* 68(7): 1585-1597
- 📌 **Gómez-Roig E, Vázquez-Ramos JM** (2003) Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/Cdk complex. Effect of benzyladenine. *J Plant Physiol* 160: 983–990
- 📌 **Grones P, Friml J** (2015) Auxin transporters and binding proteins at a glance. *J cell science* 128: 1-7
- 📌 **Gupta AK, Kaur N** (2005) Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci* 30(5): 761-776
- 📌 **Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM** (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol* 46(1): 166–173
- 📌 **Harting K, Beck E** (2006) Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol* 8: 389–396
- 📌 **Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ** (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183: 46–51
- 📌 **Harashima H, Schnittger A** (2012) Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria. *Plant Methods* 8: 23
- 📌 **Healy JMS, Menges M, Doonan JH, Murray JAH** (2001) The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* 276: 7041–7047
- 📌 **Herrera I, Sanchez MD, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM** (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.
- 📌 **Hirano H, Shinmyo A, Sekine M** (2011) Both negative and positive G1 cell cycle regulators undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation in Arabidopsis *Plant Signal Behav* 6(9): 1394–1396
- 📌 **Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S** (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419: 135–141

- 📌 **Hunt T** (1991) Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* 2: 213-222
- 📌 **Ishida T, Adachi S, Yoshimura M, Shimizu K, Umeda M, Sugimoto K** (2010) Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in *Arabidopsis*. *Development* 137:63–71.
- 📌 **Inzé D, De Veylder L** (2006) Cell cycle regulation in plant development *Ann Rev Genet* 40: 77-105
- 📌 **Inzé D** (2007) Cell cycle and plant development. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. p 364.
- 📌 **Jones A** (1994) Auxin-binding proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:393–420.
- 📌 **Kawamura K, Murray JAH, Shinmyo A, Sekine M** (2006) Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. *Plant Mol Biol* 61: 311–327
- 📌 **Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Uchimiya H, Umeda M** (2003) *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* 132(3): 1315–1321
- 📌 **Lara-Núñez A, De Jesús N, Vázquez-Ramos JM** (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant* 132: 79–88
- 📌 **Lara-Núñez A, García-Ayala BB, Garza-Aguilar SM, Flores-Sánchez J, Sánchez-Camargo VA, Bravo-Alberto CE, Vázquez-Santana S, Vázquez-Ramos JM** (2017) Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination *Plant Physiol Biochem* 113: 20-31
- 📌 **Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S** (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot* 65: 799–807
- 📌 **Magyar Z, Ito M, Binarová P, Mohamed B, Bogre L** (2013) Cell cycle modules in plants for entry into proliferation and for mitosis. *Plant Genome Diversity* 2: 77-97
- 📌 **Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bakó L, Koncz C, Dudits D** (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9(2): 223–235
- 📌 **Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH** (2005) D-type cyclins activate division in

the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 102(43): 15694–15699

- ✶ **Menges M, De Jager SM, Gruitsem 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
- ✶ **Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH** (2006) The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. Plant Cell 18: 893–906
- ✶ **Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. Plant J 18: 243–252
- ✶ **Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A** (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. Plant Cell 14(8): 1847–1857
- ✶ **Naryzhny SN, Zhao H, Lee H** (2005) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. J Biol Chem 280(14): 13888-13894
- ✶ **Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, et al.** (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science 324: 1068–1071
- ✶ **Pines J** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. Biochem J 308: 697–711
- ✶ **Planchais S, Samland AK, Murray JAH** (2004) Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CycD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome dependent mechanism. Plant J 38: 616–625
- ✶ **Perrot-Rechenmann C** (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion Cold Spring Harb. Perspect Biol 2:a 001446
- ✶ **Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM** (2006) Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. Physiol Plant 128: 556–568

- 📌 **Reyes J, Jiménez-García LF, González MA, Vázquez-Ramos JM** (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci Res* 1: 113-117
- 📌 **Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH** (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* 283(5407): 1541-1544
- 📌 **Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH** (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* 20(13): 4513–4521
- 📌 **Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, Vanneste S, Zhang J, Simon S, Čovanová M, Hayashi K, Dhonukshe P, Yang Z, Bednarek SY, Jones AM, Luschnig C, Aniento F, Zažímalová E, Friml J,** (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* 143(1):111–121.
- 📌 **Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675–709
- 📌 **Sabelli PA, Dante RA, Leiva-Neto JT, Jung R, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA.** (2005) RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(37): 13005-13012
- 📌 **Sabelli PA, Liu Y, Dante RA, Lizarraga LE, Nguyen HN, Brown SW, Klingler JP, Yua J, LaBranta E, Layton TM, Feldman M, Larkins BA** (2013) Control of cell proliferation, endoreduplication, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA*: E1827-E1836
- 📌 **Sánchez-Camargo VA** Activación de promotores del ciclo celular mediante remodelación de cromatina asociada a E2F durante la germinación de maíz. Tesis doctoral en proceso. UNAM
- 📌 **Sánchez MP, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM** (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 (412): 515-523
- 📌 **Sánchez MP, Torres A, Boniotti MB, Gutierrez C, Vázquez-Ramos JM** (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol Biol* 50 (2): 167-175

- 📌 **Santner A, Calderon-Villalobos LI, Estelle M** (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* 5:301–307.
- 📌 **Santner A, Estelle M** (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071-1078
- 📌 **Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JA** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7(1): 85–103
- 📌 **Sorrell DA, Combettes B, Chaubet-Gigot N, Gigot C, Murray JAH** (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells *Plant Physiol* 119(1): 343–352
- 📌 **Stroimenov I, Helleday T** (2009) PCNA on the crossroad of cancer *Biochem Soc Trans* 37: 605-613
- 📌 **Strzalka WK, Ziemienowicz A** (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annal Bot* 107:1127-1140
- 📌 **Strzalka WK, Aggarwal C, Krzeszowiec W, Jakubowska A, Sztatelman O, Banas AK** (2015) Arabidopsis PCNAs form complexes with selected D-type cyclins. *Frontiers in Plant Science* 6: 516
- 📌 **Swiatek A, Lenjou M, Bockstaele DV, Inzé D, Onckelen HV** (2002) Differential Effect of Jasmonic Acid and Abscisic Acid on Cell Cycle Progression in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiol* 128: 201-211
- 📌 **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
- 📌 **Tyers M, Tokiwa G, Nash R, Futcher B** (1992) The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* 11: 1773-1784
- 📌 **Van Leene J, Boruc J, De Jaeger GD, Russinova E, De Veylder L** (2011) A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends in Plant Sci* 16:141-150.
- 📌 **Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael A, Neiryneck S, Bukkel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PC, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure JD, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Wutters E, De Jaeger G** (2010) Targeted interactomics

reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana* Mol Sys Biol 6:397

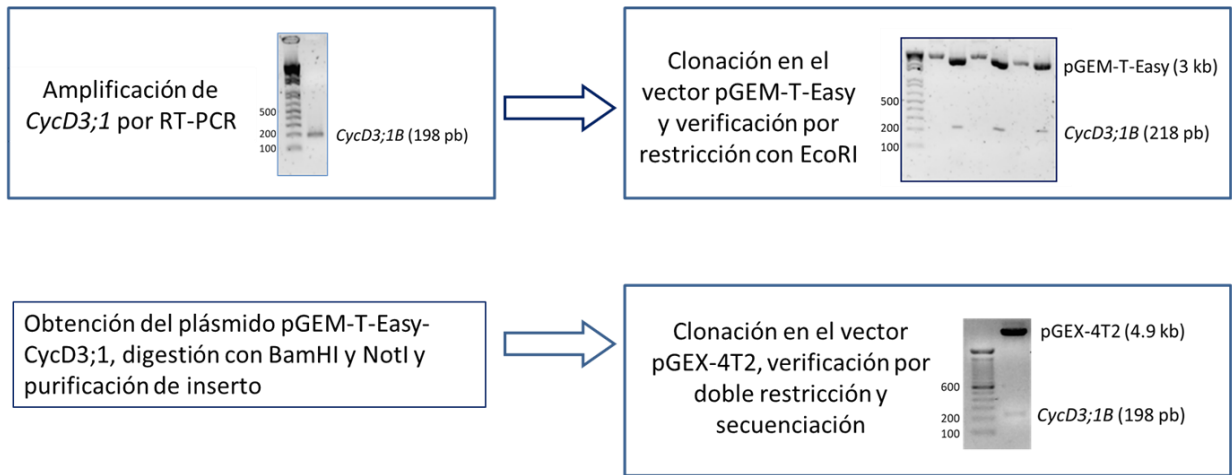
- ✶ **Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. Plant Cell 14(4): 903–916
- ✶ **Vázquez-Ramos JM** (2003) El ciclo celular En Jiménez LF (ed) Biología Celular y Molecular pp 595-616 Pearson education.
- ✶ **Vázquez-Ramos JM, Lara-Núñez A** (2008) Cyclins D, phyto regulators and cell cycle onset in germinating maize. Plant Signal Behav 3(8): 578–579
- ✶ **Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP** (2003) The cell cycle and seed germination. Seed Sci Res 13: 113-130
- ✶ **Vela E.** (2011) Arqueología Mexicana 38: 52
- ✶ **Vincent PLD** (2003) Zea mays (Maize, Corn). Encyclopedia of Life sciences 1-7
- ✶ **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 L, Ruan YL** (2012) Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. Plant Physiol 160, 777–787
- ✶ **Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, Xia W, Chen CT, Yang CC, McIntush EW, Li LY, Hawke DH, Kobayashi R, Hung MC** (2006) Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. Nat Cell Biol 8, 1359–1368
- ✶ **Wang XF, Zhang DP** (2007) Abscisic Acid Receptors: Multiple Signal-perception Sites. Annals Bot 101: 311–317

ANEXOS

A.

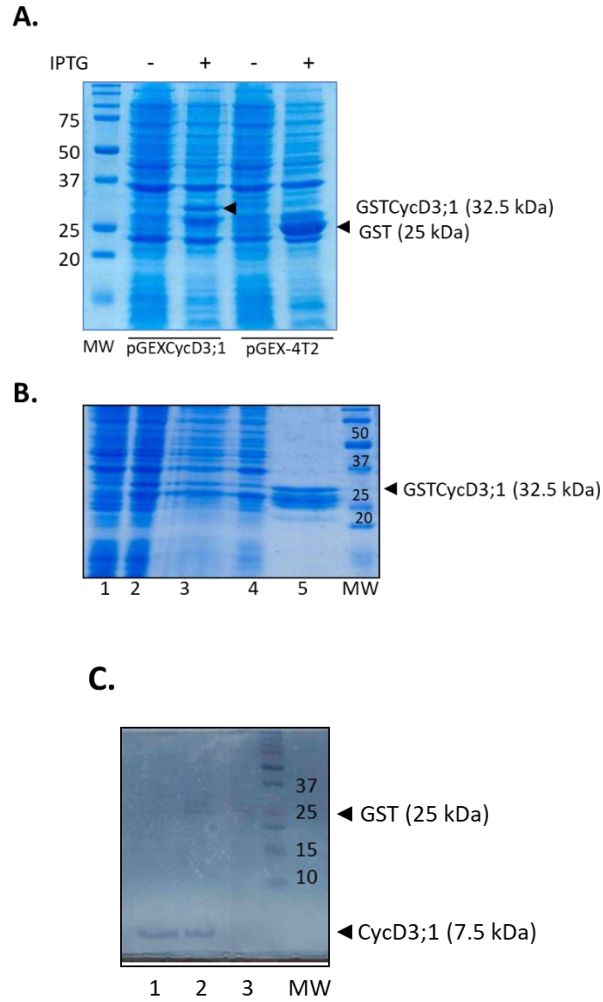
GNKRKHAAAQ LYSPPPSPSG VIGALSCFSC ESSTSATAMA AAVGPWAPSA SVSVSSSPEP PG

B.



Anexo 1. Secuencia antigénica de *CycD3;1* de maíz

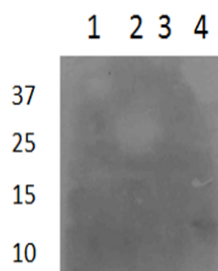
- Secuencia antigénica de *CycD3;1* (del aa 360 al 422)
- Esquema de clonación



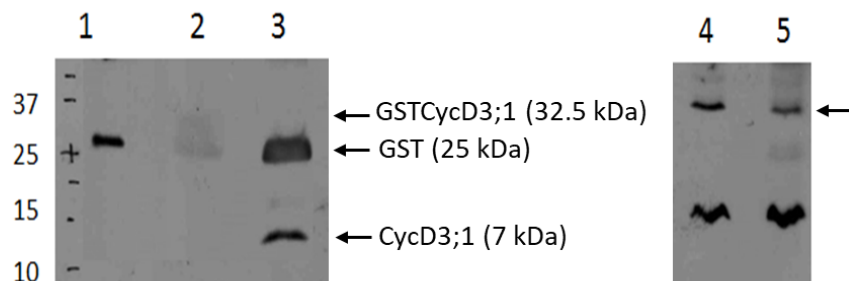
Anexo 2. Inducción y purificación de la proteína recombinante CycD3;1 y GST-CycD3;1.

- A. Inducción de la proteína recombinante.
- B. Purificación de GSTCycD3;1; proteínas de células de *E. coli* BL21 transformadas con pGEXCycD3;1 sin inducción e inducción respectivamente (1, 2); proteínas del pellet celular (insolubles, 3); proteínas de sobrenadante (solubles, 4) y proteína GSTCycD3;1 purificada.
- C. Purificación de CycD3;1. Proteína GSTCycD3;1 tratada con trombina. Eluciones de CycD3;1 (1,2 y 3).

A.



B.



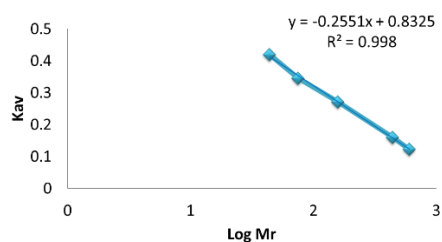
Anexo 3. Inmunodetección de la proteína recombinante GST-CycD3;1 por suero inmune (anti-CycD3;1).

- A. Inmunodetección de GST (1), GSTCycD3;1 (2), GSTCycD3 + trombina (3) y en extractos totales de semilla seca (4) por suero preinmune.
- B. Inmunodetección de GST (1), GSTCycD3;1 (2), GSTCycD3 + trombina (3); y en extractos totales de 0 y 24 h de germinación respectivamente (4 y 5) por el suero inmune (anti-CycD3;1 de maíz).

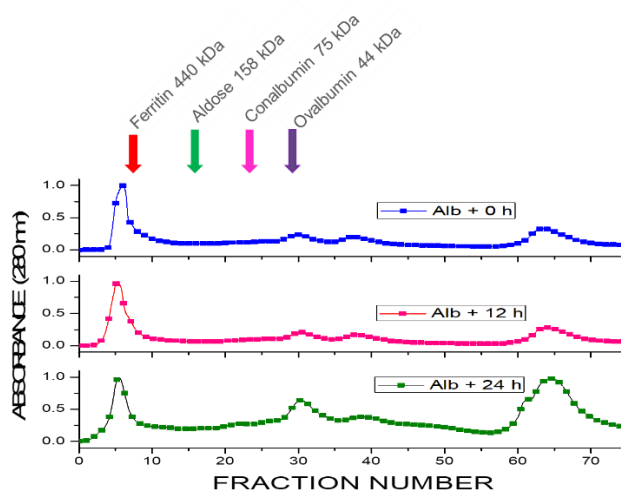
A.

Proteína	MW (kDa)	Ve (mL)	Kav
Ovoalbúmina	44	73	0.4197
Conalbúmina	75	67	0.3456
Aldosa	158	61	0.2716
Ferritina	440	52	0.1604

B.



C.



Anexo 4. Calibración de la columna y perfil de elución de extractos de 0, 12 y 24 h de germinación.

- A. Datos experimentales de los perfiles de elución de las proteínas estándar. Ve, volumen de elución y Kav, Constante de partición.
- B. Curva de calibración. El eje de las x representa el logaritmo de la masa relativa (Log Mr) y el eje de las y, el coeficiente de partición (Kav). Ecuación de la curva $y = -0.2551x + 0.8325$.
- C. Perfil de elución de extractos proteicos de 0, 12 y 24 h de germinación obtenidos por filtración en gel (Superdex 200). Las flechas indican el número de la fracción donde fueron eluidas las proteínas estándar de masa molecular. Albúmina fue adicionada como control interno de elución.

A.

GNKRKHAQAQ LYSPPPSPSG VIGALSCFSC ESSTSATAMA AAVGPWAPSA SVSVSSSPEP PG

B.

```

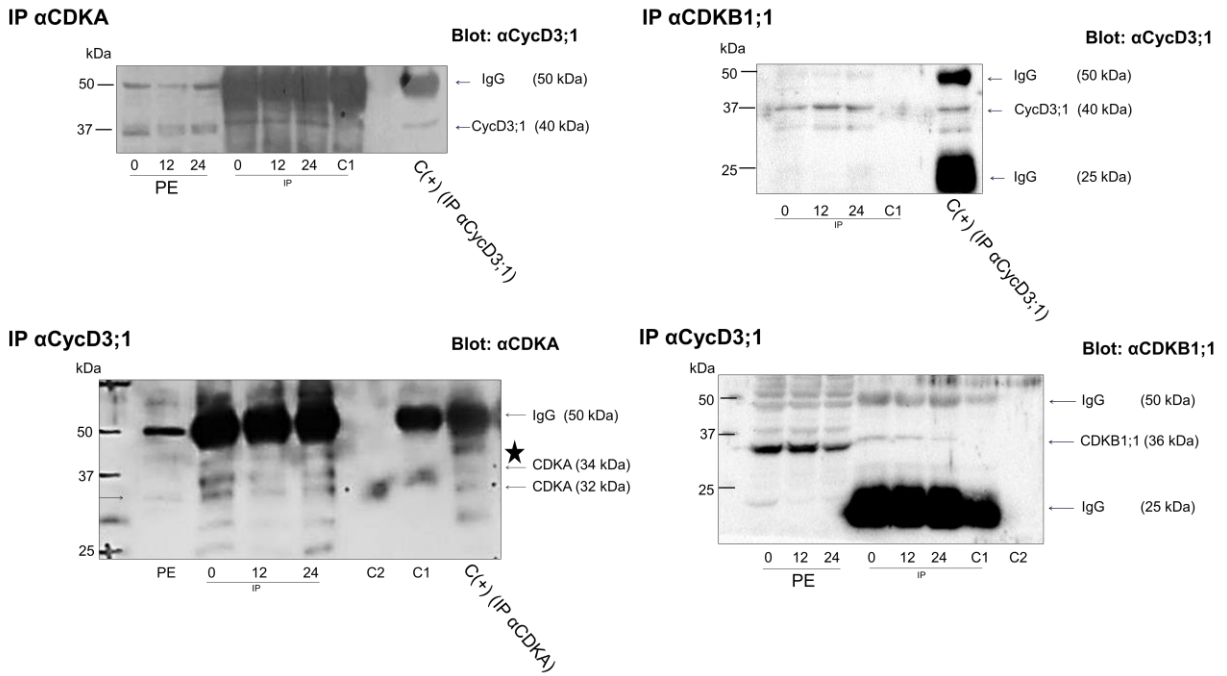
          370      380      390      400      410      420      430
ZeamaCYCD11 VRTRVAG--- -TTTITMAAV NLCCSDEALS SHSSATSSP- ----- PPAKRRKRSP
ZeamaCYCD21 TGHVNGS--- PSVPQSPIGV LDAT-CFSFR SED---ARLV SSQSNNISS- ----SSNDN QVSKRRRLSI
ZeamaCYCD23 KTDYSAS--- PSR-----V LDAS-CFSFK TDDNQTAGSS QSQANNGN- ----YNQAYS PASKRTRLDI
ZeamaCYCD22a SAGSSIS--- -SVPSPIGV LDAAACLQQ S---DDATVG SPAVCYHSS- ----- STSKRRRITR
ZeamaCYCD22b SAGSSIS--- -SVPRSPIGV LDAAACLQQ S---DDATVG SPAVCYHSS- ----- STSKRRRITR
ZeamaCYCD41 SSGRRASSSS ATVPRSPTGV LDAG-CLSFR R---AAAAA SHASSWRD- -EDDDCPPA VCSKRRKISR
ZeamaCycD4;1 SGRSRASSSS ATVPRSPTGV LDAG-CLSFR SDDAAAAAA SHASSWRD- -EDGD-CSPA VCSKRRKISR
ZeamaCYCD42 SARRRS--P VPVPQSPVGV LDAAACLQYR SEEAATATAT ATSAASHGAP GSSSSSSTSP VTSKRRKIAS
ZeamaCYCD31A NKRKHAARM YSPPLSPSGV IGAALSCFSC SLSATADR TLATAAGVG PWAPSAPVSV SSSPEPPGRA
ZeamaCYCD31B NKRKHAQAQ LYSPPPSPSG IGAALSCFSC SSTSATA--- ----MAAVG PWAPSASVSV SSSPEPPGRA
ZeamaCYCD51 SLPCSVSNE- ----- LATSTYHSVL VDDVDTAAA FATAVSA- ----- RNKRIR--LEL
ZeamaCYCD52A -LADKRPPI- ----- SSSGS---M TYESADFASS -FAATAG- ---- RSKRAR--LEM
ZeamaCYCD52B LLAARKRPAP- ----- SASGSTGAGS PYESVDADSS SFAAAD- ---- SNKRARLVEL
ZeamaCYCD53A STSTGVASSG VSVAAHAGCS GSPSPPGASV SVGANNAAGT APPATTD- ---- NRNKRRLRS
ZeamaCYCD53B ST--GVASSG VSVV---CN GSPSP---- --GANNAAGS GPPATPDSD- ----KH NHNORRLRS
ZeamaCYCD61 -RGRAAP- ---- -SADTPVTVL GHQRSASSAS ETDWINGGD- ----AKKRCMGP
ZeamaCYCD71 DQLRIGGTPI VTSSTCMSSD EQLRRSPSVS VIIRRRSCLG LKTAGGGGSR RINSSRSAVI SRRRRRLFGS
  
```

C.

Seq->	ZmCYCD11	ZmCYCD21	ZmCYCD22a	ZmCYCD22b	ZmCYCD23	ZmCYCD41	ZmCycD4;1	ZmCYCD42	ZmCYCD31a	ZmCYCD31b	ZmCYCD51	ZmCYCD52a	ZmCYCD52b	ZmCYCD53a	ZmCYCD53b	ZmCYCD61	ZmCYCD71
ZmCYCD3 0,119	0,185	0,179	0,179	0,164	0,191	0,208	0,253	ID	0,791	0,104	0,164	0,164	0,117	0,085	0,059	0,113	
ZmCYCD3 0,116	0,218	0,200	0,200	0,177	0,205	0,223	0,253	ID	0,133	0,200	0,200	0,126	0,095	0,050	0,125		

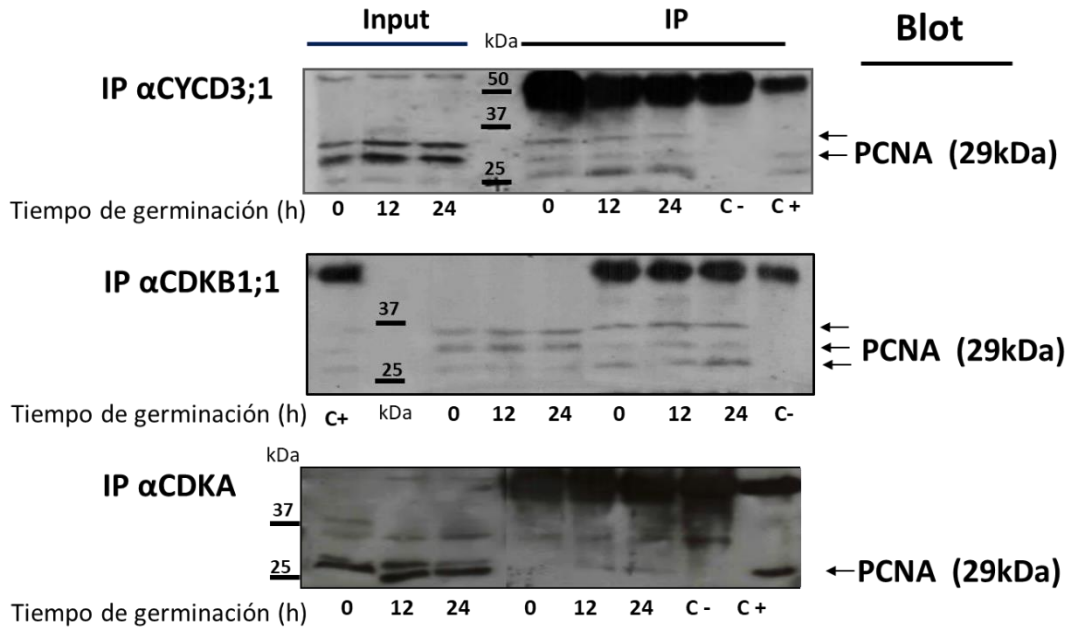
Anexo 5. Secuencia antigénica de CycD3;1 de maíz

- A. Secuencia antigénica de CycD3;1 (del aa 360 al 422).
- B. Alineamiento múltiple de las secuencias de CycD de maíz.
- C. Matriz de identidad entre la CycD3;1 y las otras CycD.



Anexo 6. Imágenes completas de los IPs de la figura 9.

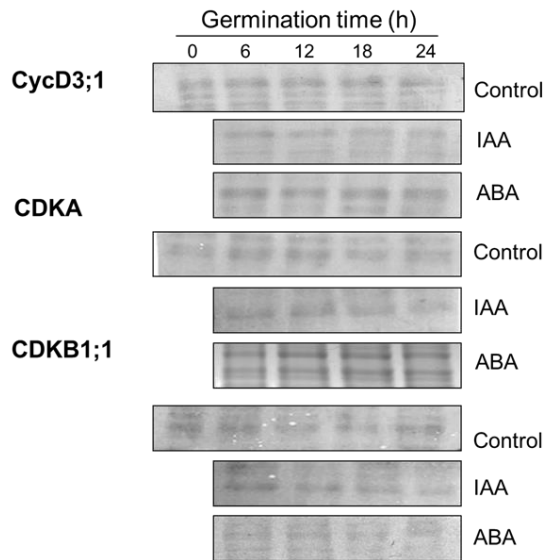
Input, extractos proteicos (PE) de 0, 12 y 24 h de ejes embrionarios de maíz; IP, anticuerpo (anti-CDKA, anti-CDKB1;1 o anti-CycD3;1) + proteína A agarosa + PE; C1, anticuerpo + proteína A agarosa y C2, Proteína A agarosa + PE. La estrella indica que en el gel, C1 es proteína A agarosa + PE y C2, anticuerpo + proteína A agarosa.



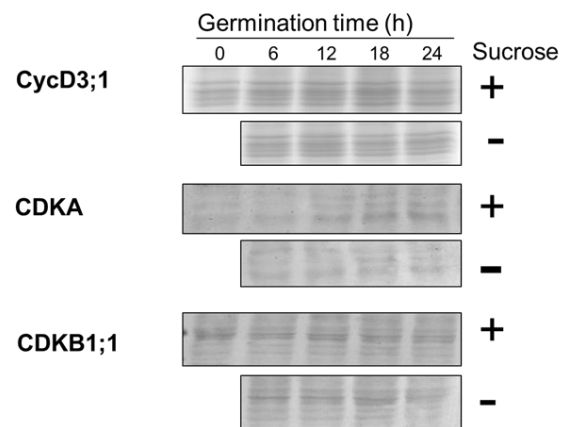
Anexo 7. Imágenes completas de los IPs de la figura 10.

Input, extractos proteicos (PE) de 0, 12 y 24 h de ejes embrionarios de maíz; IP, anticuerpo (anti-CDKA, anti-CDKB1;1 o anti-CycD3;1) + proteína A agarosa + PE; C-, anticuerpo + proteína A agarosa y C+, anticuerpo (anti-PCNA) + Proteína A agarosa + PE.

A.

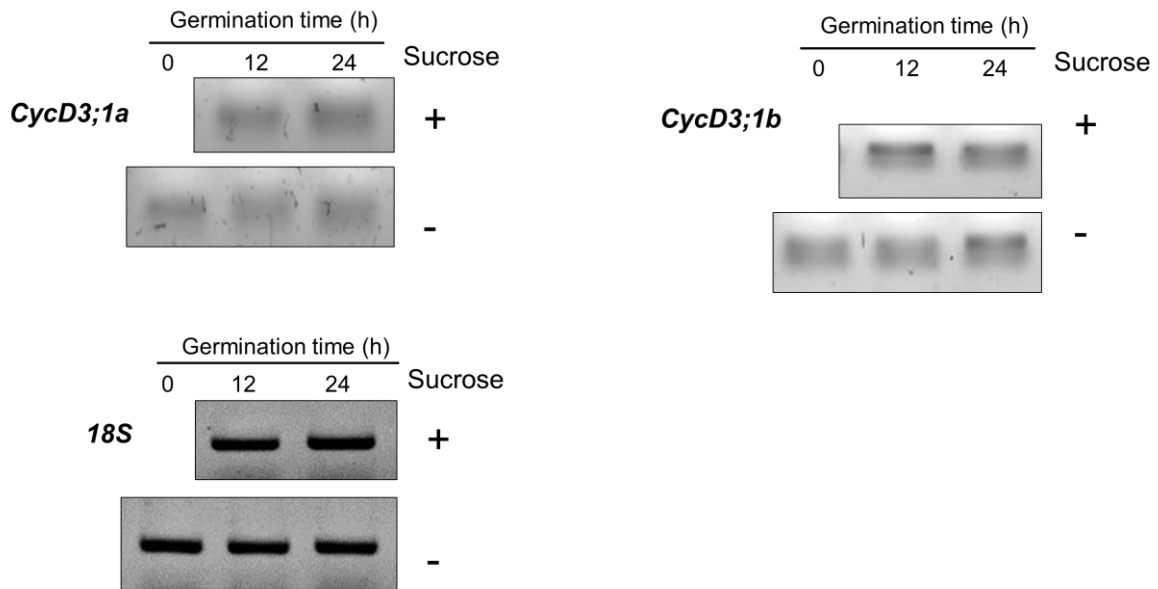


B.



Anexo 8. Control de carga de las figuras 15 y 17.

- A. Los geles indican la cantidad de proteína cargada por línea de ejes germinados con y sin IAA y ABA, respectivamente (Figura 15).
- B. Los geles indican la cantidad de proteína cargada por línea en presencia y ausencia de sacarosa (Figura 17).



Anexo 9. Efecto de sacarosa en la expresión de genes *CycD3;1a* y *CycD3;1b* de maíz en la germinación.

Amplificación de transcritos que codifican para *CycD 3;1a* y *3;1b* mediante RT-PCR semicuantitativa a partir de RNA extraído de ejes embrionarios germinados por 0, 12 y 24 h de imbibición en presencia y ausencia de sacarosa. La expresión del gen *18S ribosomal* fue usado como control de carga. Las imágenes representan el resultado de tres experimentos independientes (Trabajado realizado en colaboración con la Dra. Aurora Lara-Núñez).

Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination

Sara M. Garza-Aguilar, Aurora Lara-Núñez, Elpidio García-Ramírez and Jorge M. Vázquez-Ramos*

Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: jorman@unam.mx

Received 29 June 2016;
revised 14 November 2016

doi:10.1111/ppl.12537

Maize CycD3;1 associates to CDKA or CDKB1;1 proteins during germination and the complexes formed develop kinase activity. These complexes appear to vary in size as germination proceeds, suggesting association to different sets of proteins. CycD3;1 and associated CDK proteins respond to phytohormones and sucrose. Results revealed a reduction in the CycD3;1 protein amount along germination in the presence of indoleacetic acid (IAA) or abscisic acid (ABA), although in the latter protein levels recover at the end of germination. While the levels of CDKA increase with IAA, they decrease with ABA. Both phytohormones, IAA and ABA, increase levels of CDKB1;1 only during the early germination times. CycD3;1 associated kinase activity is only reduced by both phytohormones towards the end of the germination period. On the other hand, lack of sucrose in the imbibition medium strongly reduces CycD3;1 protein levels without affecting the levels of neither CDKA nor CDKB1;1. The corresponding CycD3;1 associated kinase activity is also severely decreased. The presence of sucrose in the medium appears to stabilize the CycD3;1 protein levels.

Introduction

The germination process involves the awakening of a latent seed and the resumption of growth leading to the establishment of a new plant that in turn will produce more seeds. For the purposes of our studies, germination has been defined as the process that starts with seed imbibition and continues with the triggering of the necessary metabolism to allow cells in embryo axes to undergo the first round of cell division. Cells in meristems are the first to be activated (Vázquez-Ramos and Sánchez 2003) and in maize, the S phase starts by 12 h of imbibition; the first evidence of mitotic figures occurs at about 24 h (Baiza et al. 1989). It has been demonstrated, both in *Arabidopsis* and in maize seeds, that cells in meristems reach the early stages of mitosis before radicle protrusion (Baiza et al. 1989, Masubelele et al. 2005), and during maize

germination, addition of abscisic acid (ABA) delays both seed germination and cell cycle advance (Sánchez et al. 2005); on the other hand, addition of cytokinins or germinating previously osmoprimed seeds shortens the germination timing and accelerates the cell cycle (Reyes et al. 1991, Cruz-García et al. 1995, Vázquez-Ramos and Sánchez 2003), indicating that both processes are closely related.

A major cell cycle regulator is the kinase activity present in heterodimers formed by cyclins (cycls) and cyclin-dependent kinases (CDKs). These protein complexes control the different phase transitions: G1 to S, G2 to M and metaphase to anaphase during mitosis. Different cycls and CDKs participate in the various cell cycle phases in a sequential mode (Magyar et al. 1997, Inzé and De Veylder 2006). In animal cells, cycls D are responsible for G1 establishment and progression into

Abbreviations – ABA, abscisic acid; CDK, cyclin dependent kinase; Chx, cycloheximide; Cyc, cyclin; HAI, hours after imbibition; IAA, indoleacetic acid; Suc, sucrose; RU, relative units.

the S phase, together with *cycs* E (Pines 1995, Doonan and Kitsios 2009). In plants, D-type *cycs* are required for the beginning of the cell cycle and their expression is regulated by internal and environmental factors such as phytohormones, sugars, levels of water, nutrients and temperature (Soni et al. 1995, Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000). At present, E-type *cycs* have not been reported in plants.

In plants, D-type *cycs* associate mainly to CDKA (Inzé and De Veylder 2006), however, a clear association to the mitosis-related CDKB, has been shown (Kono et al. 2003, Kawamura et al. 2006, Godínez-Palma et al. 2013). *Arabidopsis* cells contain 10 D-type *cycs*, comprising subgroups from *cycs*D1 to *cycs*D7 (Vandepoele et al. 2002). Transcriptomic data have revealed characteristic expression patterns for each D-type *cyc* in different plant tissues (Menges et al. 2005). There are three D3-type *cycs* in *A. thaliana* (D3;1, D3;2 and D3;3) and they are strongly expressed in flowers; however *AtCycD3;3* and *AtCycD3;2* are also expressed in roots and aerial tissues, respectively (Menges et al. 2005). Ectopic expression of the *AtCycD3;1* gene in cell suspension cultures results in accumulation of cells in G2 after promoting the G1 to S transition (Menges et al. 2006). Also, *AtCycD3;1* gene expression positively responds to cytokinins in these cultures, stimulating cell division (Riou-Khamlichi et al. 1999). *AtCycD3;1* over-expression causes hyperplasia and ectopic divisions in leaves and other tissues, inhibiting cell expansion and endoreduplication (Dewitte et al. 2003).

The ectopic expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*, Nt) D3-type *cycs* in synchronized BY-2 cells has shown their presence in mitosis. Transcript levels of NtCycD3;1, NtCycD3;3 and NtCycD3;5 increase during mitosis, while *CycD3;2* transcripts are present at a constant level throughout the cell cycle (Sorrell et al. 1999, Kawamura et al. 2006). *Cycs* D3;1, D3;3 and D3;5 associate with CDKA and these complexes phosphorylate the retinoblastoma protein, NtRBR1 during the G1 to S transition and also phosphorylate histone H1 in the G1 to S and G2 to M transitions in BY-2 cells (Nakagami et al. 1999, 2002, Kawamura et al. 2006).

Apparently, *AtCycD3;1* associates to CDKA but not to CDKB, forming active complexes (Healy et al. 2001). On the other hand, tobacco D3 *cycs* (3;3 and 3;5) *in vitro* interact with both CDKA and CDKB and when these complexes are activated, they can phosphorylate histone H1 and NtRBR1 (Kawamura et al. 2006).

During early germination of *Arabidopsis* seeds, the over-expression of several of these D-type *cyc* genes promotes the cell cycle, increasing the rate of germination. However, the *CycD3;1* gene is expressed only in the post-germination stage and does not

seem to promote activation of the root meristem (Masubelele et al. 2005).

Maize cells contain 17 different D-type *cycs*, also enclosed in the 7 subgroups defined through their similarity to *Arabidopsis* proteins. A total of 15 of them are expressed during seed germination with contrasting patterns (Buendía-Monreal et al. 2011). The expression of some *cycs* D is modulated by cytokinins, auxins and ABA (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos 2006). Addition of indoleacetic acid (IAA) stimulates DNA synthesis and also induces the expression of several D-*cyc* genes, among them the *CycD3;1a* gene (Vázquez-Ramos and Lara-Núñez 2008, Buendía-Monreal et al. 2011). Addition of ABA inhibits the transition to G2 phase, decreases DNA synthesis and reduces the expression of several D-*cyc* genes, particularly *CycD3;1a* (Sánchez et al. 2005, Buendía-Monreal et al. 2011), thus explaining its inhibitory effect on maize seed germination.

Maize *cycs* D2;2, D4;2 and D5;3 differentially associate to CDKA and CDKB1;1 forming active complexes during germination (Godínez-Palma et al. 2013). Furthermore, addition of IAA or BA increases the kinase activity associated to *cycs* D4;2 and D5;3 during early germination, without modifying protein levels, suggesting that these phytohormones promote activation of these kinase complexes (Lara-Núñez et al. 2008).

Sucrose is a molecule acting in plants as both a main carbon source, and a signal molecule for growth and development. Its regulatory effects influence gene expression, translation and post-translational protein modification, among other effects (Gupta and Kaur 2005, Hirano et al. 2011, Lastdrager et al. 2014). Expression of *Arabidopsis CycD2* and *CycD3* genes changed in response to availability of carbohydrates, particularly sucrose, affecting the cell division rate in suspension cultures. *AtCycD3;1* protein and its associated kinase activity were drastically altered in response to sucrose deprivation in cultures, whereas it did not have any effect on *CycD2* (Riou-Khamlichi et al. 2000, Healy et al. 2001). Sucrose also seems to alter the stability of cell cycle proteins and for instance *AtCycD3;1* becomes labile in its absence (Planchais et al. 2004).

The role of the different D-type *cycs* in plants is still poorly understood although evidence suggests that they do not simply act in redundant ways. Plant D3-type *cycs* seem to play important regulatory roles for growth and development in response to environmental factors. In maize, the expression of *CycD3;1* (a and b) genes differentially responds to phytohormones during seed germination. The aim of this work is to study the behavior of cyclin D3;1 protein levels, and of its associated

kinase activity, when embryo axes are incubated in the presence of different phytohormones and sucrose during germination.

Materials and methods

Materials

Protein A magnetic beads and immobilized polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were from Millipore (Billerica, MA); protease inhibitor cocktail tablets (mini Complete®) were from Roche (Indianapolis, IN); Clean-Blot IP Detection Reagent horseradish peroxidase (HRP), enhanced chemiluminescence (ECL) substrate for detection of horse radish peroxidase were from Thermo Scientific (Rockford, IL); Medical X-ray film General Purpose Blue was from Kodak Carestream Health Inc (Windsor, CO); pGEM®-T easy vector system was from Promega (Madison, WI); [γ - 32 P]-ATP was from Perkin Elmer (Boston, MA); Histone H1, DNase I, JumpStar, incomplete Freund's adjuvant, glutathione-agarose and reduced glutathione were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); anti-rabbit IgG peroxidase conjugated was from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA); Mouse monoclonal SB62a Anti-Rabbit IgG light chain (HRP) was from Abcam (Cambridge, UK); pGEX-4T2 plasmid was from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ); Superdex-200 and Gel Filtration Calibration kit were from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

Imbibition of maize embryo axes

Twenty-five maize embryo axes (250 mg dry weight) were disinfected by using sodium hypochlorite (0.5% v/v) and washed four times with sterile distilled water. Excess water was removed by blotting the axes with sterile Whatman paper No. 1. Embryo axes were imbibed for 0, 6, 12, 18 and 24 h over an absorbent sheet of Whatman paper No. 1 wetted with control imbibition buffer (Suc + 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2% w/v sucrose, 10 mM MgCl₂) at 25°C under sterile conditions in darkness. When indicated, axes were incubated in control imbibition buffer plus the presence of IAA (1 μ M), ABA (50 μ M), cycloheximide (Chx, 10 μ g ml⁻¹) or without sucrose (Suc-).

Cloning and expression of ZmCycD3;1

The sequence of maize *CycD3;1* cDNA was previously reported (Buendía-Monreal et al. 2011). To produce a specific polyclonal antibody against CycD3;1, a sequence coding for 62 aa at the C-terminal of

CycD3;1 (Fig. S1) was cloned into the pGEM-T Easy plasmid vector. Then, it was subcloned between the *Bam*HI and *Not*I restriction sites in a pGEX-4T2 plasmid vector in frame with the glutathione S-transferase (GST). The construction was verified by sequencing. The recombinant protein was induced with 0.5 mM isopropyl- β -D-1-galactopyranoside (IPTG) for 3 h at 32°C in BL21 (DE3) RIL *Escherichia coli* transformed strain. Recombinant protein GST-CycD3;1 was affinity-purified using a glutathione-agarose column and eluted with reduced glutathione. Part of the eluted protein was treated with thrombin to eliminate the GST portion of the recombinant protein.

Total RNA extraction and semiquantitative RT-PCR

RNA was extracted from 10 embryo axes imbibed for 0, 12 and 24 h using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following supplier's instructions. Synthesis of cDNA was performed from 2.5 μ g of total RNA by two step way: (1) reverse transcriptase (M-MLV Reverse transcriptase, Promega®, Madison, WI) reaction was performed after degrading DNA utilizing DNase I; (2) PCR reactions were performed with specific primers to *CycD3;1a* and *CycD3;1b* genes (Buendía-Monreal et al. 2011) from cDNA equivalent to 100 ng of RNA following manufacturer's instructions (JumpStart). The PCR cycle number in the linear range was as reported by Buendía-Monreal et al. (2011). PCR products were analyzed on 1% (w/v) agarose gels with 0.5 μ g ml⁻¹ ethidium bromide. Gels were scanned in a Chemidoc MP System and analyzed by Image Lab software (both by Bio-Rad, Hercules, CA).

Polyclonal antibody production

Two rabbits were immunized following standard protocols. Pre-immune serum was collected prior to immunization. Rabbits were injected subdermally three times with purified GST-CycD3;1 protein (two times with 500 μ g and the last one with 100 μ g) and incomplete Freund's adjuvant at 1 week intervals. Then, they were injected intravenously three more times with CycD3;1 protein (100 μ g) at 10 day intervals. Finally, 5 days after the last injection, rabbit antisera were collected and tested using western blot against GST-CycD3;1 recombinant protein and maize protein extracts. Antibodies were purified using the Prosep-A kit from Millipore. A competence assay was performed to validate the anti-CycD3;1 antibody. The primary antibody was pre-incubated with 5, 10 and 50 μ g of CycD3;1 recombinant protein (competing protein) or 50 μ g of BSA. Then, competed antibodies were used to immunodetect *ZmCycD3;1* in protein extracts from maize embryo axes (Fig. 1).

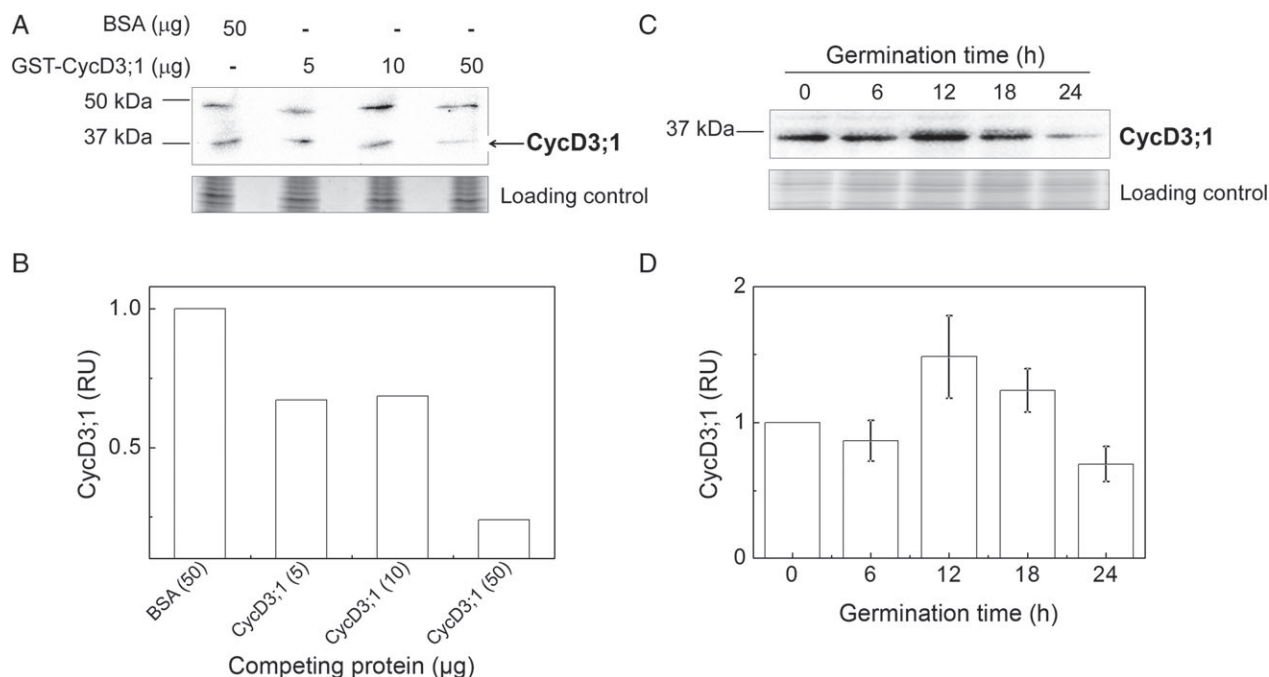


Fig. 1. ZmCycD3;1 protein accumulation during maize germination; antibody validation. A competition assay was performed in order to validate the anti-CycD3;1 antibody, using protein extracts from maize embryo axes imbibed for 24 h. For immunodetection, anti-CycD3;1 antibodies were pre-incubated with the CycD3;1 recombinant competing protein in three different amounts, 5, 10 and 50 µg. BSA was used as a negative competing protein. Gels indicate the amount of loaded protein per lane (A). Data represent experiments replicated two times with similar results. (B) CycD protein accumulation during germination. Protein extracts from 0, 6, 12, 18 and 24 h imbibed maize embryo axes were loaded onto SDS gels and CycD3;1 protein was immunodetected using anti-CycD3;1 antibodies. Gels indicate the amount of loaded protein per lane. (C) Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loaded protein per lane. (D) Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the dry seed band (0 h). Data are the mean \pm SE of four independent experiments (D). RU, relative units.

Protein extraction

After maize embryo axes imbibition, protein extracts were obtained with extraction buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 75 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8.0, 1 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 0.25 M sucrose, 60 mM β-glycerol phosphate, 50 mM NaF, 200 µM Na₃VO₄, 1 mM Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) and a minitab of protease inhibitor cocktail per 10 ml buffer). Protein extracts were centrifuged at 12 000 g for 60 min at 4°C and protein concentration was determined by the Bradford method.

Superdex 200 gel filtration

The size of protein complexes formed by CycD3;1 with CDKA or CDKB1;1 was determined by size-exclusion FPLC. A Superdex 200 column was used. The mobile phase was phosphate buffer (50 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄ pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 mM PMSF and 0.1 mM 2-mercaptoethanol) at a 0.5 ml min⁻¹

flow rate. Molecular weight standards were ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75 kDa) and ovalbumin (44 kDa). The void volume was determined by blue dextran 2000 (Fig. S2). These were acquired from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

Immunoblot

Maize protein samples (40 µg) were resolved by SDS-PAGE (12%) and gels were blotted onto PVDF membranes by wet transfer. Membranes were blocked with 5% low fat milk dilution in PBS and 0.1% Tween 20 for 1 h. Then, membranes were incubated with anti-maize CycD3;1 polyclonal antibody (1:1500 dilution), anti-maize CDKB1;1 polyclonal antibody (1:3000 dilution) or anti-maize CDKA polyclonal antibody (1:500 dilution) overnight at 4°C. Membranes were washed three times with PBS and 0.1% Tween 20 for 10 min. For anti-CycD3;1 antibody, a membrane wash was performed with PBS, 0.5 M NaCl and 0.1% Tween 20. Then, membranes were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody at a 1:20 000 dilution or a VeriBlot for IP secondary antibody

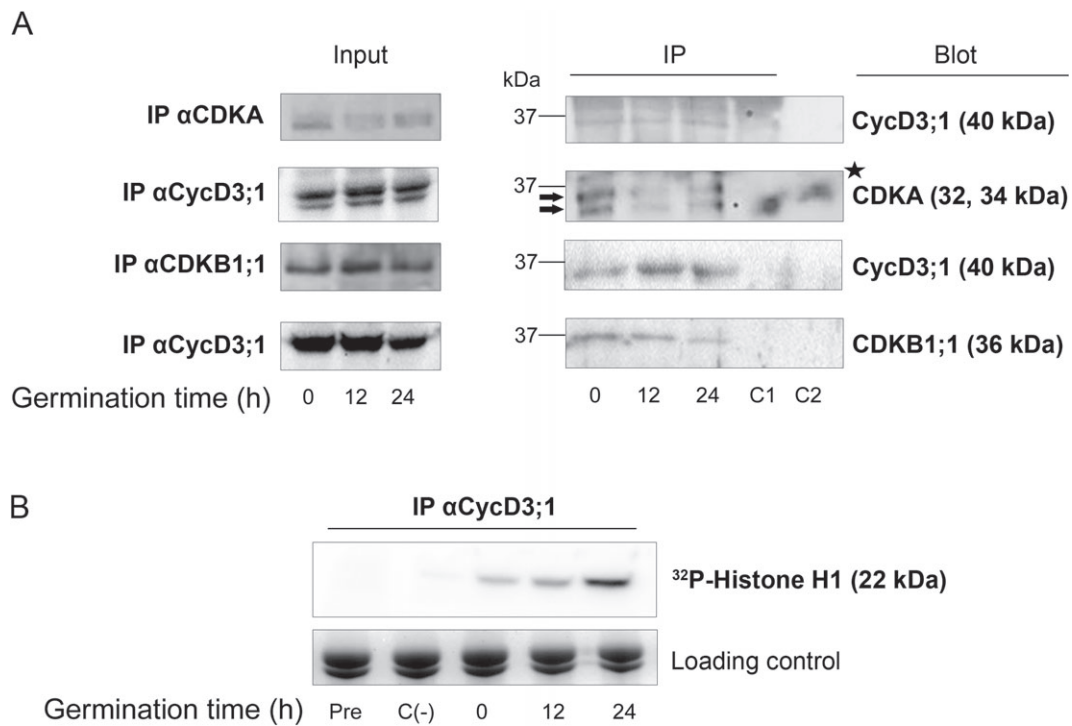


Fig. 2. Association of maize CycD3;1 with CDKA and CDKB1;1 during germination. Specific antibodies anti-CDKA, anti-CDKB1;1 (Godínez-Palma et al. 2013) and anti-CycD3;1 were used for immunoprecipitation and identification of associated proteins in crude extracts from 0, 12 and 24 h of germinated axes. (A) Input, maize protein extract (PE) at 0, 12 and 24 h of germinated embryo axes; IP, antibody (anti-CDKA, anti-CDKB1;1 or anti-CycD3;1) + protein A agarose + PE; C1, antibody + protein A agarose and C2, protein A agarose + PE. (B) Kinase activity associated to CycD3;1 during germination. Anti-CycD3;1 immunoprecipitates from 0, 12 and 24 h of germinated embryo axes were used to assay kinase activity over histone H1 as substrate. After separating proteins by SDS-PAGE, radioactive protein bands were visualized using autoradiography. Pre, pre-immune serum + protein A agarose; C(-), anti-CycD3;1 + protein A agarose and IP, anti-CycD3;1 + protein A agarose + maize PE. Fig. S3 shows complete images of IPs. The star indicates a switch position: C1 is protein A agarose + PE and C2 is antibody + protein A agarose.

(1:30 000, Abcam, ab99697) for 1 h or Clean-Blot IP Detection Reagent HRP (1:1000) for 2 h. Membranes were washed again three times with PBS, 0.5 M NaCl and 0.1% Tween 20 for 10 min. Peroxidase reaction was detected by the ECL method followed by exposure to either X-ray film or photo documentation using the ChemiDoc MP System. Densitometric analysis was performed using the Image Lab software.

Immunoprecipitation

Anti-GST-CycD3;1, anti-GST-CDKB1;1 and anti-CDKA antibodies (previously reported by Godínez-Palma et al. 2013) were conjugated for 1 h with magnetized protein A agarose (1:10 dilution) at room temperature using binding buffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.02% Triton X-100). Protein from extracts (500 µg) was added and the mixture was incubated 4 h or overnight at 4°C in a Labquake Shaker Rotisserie. The immunocomplexes were pelleted using a magnet rack and washed five times

with TBS buffer. The resulting protein precipitates were used as the source of kinase activity, or bound proteins were eluted with SDS loading buffer and prepared for immunoblotting, as described above.

Kinase assays

Immunocomplexes were resuspended in 15 µl of kinase buffer (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, 20 µM ATP, 5 µCi of [γ -³²P] ATP). As substrate, 15 µg of Histone H1 was added. Reactions were allowed to run for 30 min, at 30°C, and then stopped by adding SDS loading buffer. After boiling for 5 min, the reaction products were separated by SDS-PAGE. The gels were vacuum-dried at 80°C for 1.5 h and then were exposed for 12 to 24 h to X-ray film or photo documentation using Imaging screen-K and Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad, Hercules, CA). GBX developer and GBX fixer (Kodak, Rochester, NY) were used to develop films.

Stability assays

Chx ($10\ \mu\text{g ml}^{-1}$) was added (introduced by means of vacuum) to dry embryo axes or imbibed embryo axes for 12 h in presence of sucrose, then imbibition was followed by different times (as indicated) in the presence or absence of sucrose and finally CycD3;1 was immunodetected.

Statistical analysis

Data from protein abundance analysis, associated kinase activity and embryo axes growth and length were analyzed using one-way ANOVA, and then a paired comparison by Tukey's test was performed to assess significant differences at $P < 0.05$.

Results

CycD3;1/CDKA or CDKB1;1 complexes during maize germination

There are two genes within the maize CycD3;1 subgroup, *CycD3;1a* (GRMZM2G107377_P01) and *CycD3;1b* (GRMZM2G161382_P02). Both are expressed with a fluctuating pattern in the first 24 h of germination (Buendía-Monreal et al. 2011). Their predicted protein sequences are 80% identical. A polyclonal antibody was raised against a 63 aa peptide (Fig. S1A, corresponding to amino acids 360 to 422) of the carboxy terminal portion of the sequence, and this serum was expected to recognize Cyc D3;1a and D3;1b but not any other maize cyc D (Fig. S1B and S1C). Antibody specificity was validated by western blot in an assay using increasing concentrations of the recombinant 62 aa GST-CycD3;1b peptide. Figure 1A and B show a decreasing signal for the CycD3;1 in protein extracts from maize embryo axes as the amount of the competing recombinant peptide added to primary antibody was increased. BSA was used as a negative control and this protein did not interfere with CycD3;1 detection by its antibody. The band at 50 kDa, not related to CycD3;1b was not competed.

The anti-CycD3;1 antibody recognized a protein slightly below 37 kDa in maize protein extracts; however, the predicted mass from the sequence is 40 kDa. The reason for this difference is unknown at the moment. ZmCycD3;1 is present in extracts of dry maize seed axes, shows a peak at 12 h of germination and then the protein amount decreases to slightly below dry seed levels at 24 h of germination (Fig. 1C, D). This is a similar pattern to the one shown by most other maize cyclins D studied during the germination process (Lara-Núñez et al. 2008, Godínez-Palma et al. 2013).

Cycs associate to CDK and to determine the presence of ZmCycD3;1 complexes with either CDKA or CDKB1;1 during maize germination, antibodies raised against ZmCycD3;1, ZmCDKA or ZmCDKB1;1 were used in immunoprecipitation experiments. Using anti-CDKA antibodies, ZmCycD3;1 was found associated to ZmCDKA at 0, 12 and 24 h of germination, and the opposite experiment, using anti-CycD3;1 antibodies confirmed the association (Fig. 2A). The two bands at 34 and 32 kDa detected match the CDKA bands previously reported (Sánchez et al. 2002, Godínez-Palma et al. 2013). Using the anti-CDKB1;1 antibody, ZmCycD3;1 was found bound to ZmCDKB1;1 at 0, 12 and 24 h of germination; a similar result was obtained when anti-CycD3;1 was used to co-immunoprecipitate ZmCDKB1;1 (Fig. 2A).

Kinase activity in these complexes was assayed in immunoprecipitates using the anti-CycD3;1 antibody and histone H1 as substrate. Kinase activity associated to ZmCycD3;1 was found from 0 to 24 h of germination, with higher activity at 24 h. This kinase activity must be due to cyc association to any one of the CDKs, or to both (Fig. 2B).

Molecular mass of CycD3;1/CDKs complexes during germination

To find out the nature of the complexes formed between ZmCycD3;1 and the CDKs during germination, size exclusion chromatography of protein extracts from embryo axes was carried out on Superdex 200. In extracts from dry seed embryo axes, CycD3;1 co-eluted with CDKA and CDKB1;1 in complexes of molecular mass between 420 and 580 kDa. However, in fractions of mass between 250 and 150 kDa, CycD3;1 co-eluted only with CDKA (Fig. 3A). In extracts from embryos after 12 h germination, CycD3;1 co-eluted with CDKA and CDKB1;1, in fractions of mass between 170 and 270 kDa, but not in fractions higher in apparent molecular mass. CycD3;1 also co-eluted with CDKA and CDKB1;1 in fractions below 100 kDa mass (Fig. 3B). In fractions between 218 and 175 kDa, 32 and 34 kDa protein bands were immunodetected using the anti-CDKA antibody, and these bands were not detected in other fractions. In a similar fashion, two CDKB1;1 protein bands were detected in fractions between 337 and 200 kDa but not in other fractions (Fig. 3B). In extracts from embryos after 24 h germination, CycD3;1 again co-eluted with both CDKA and CDKB1;1 in fractions of mass between 400 and 580 kDa, but only with CDKA in fractions between 380 and 150 kDa (Fig. 3C), showing up to three protein bands of 32, 34 and 36 kDa. These results suggest that the heterodimers formed by CycD3;1

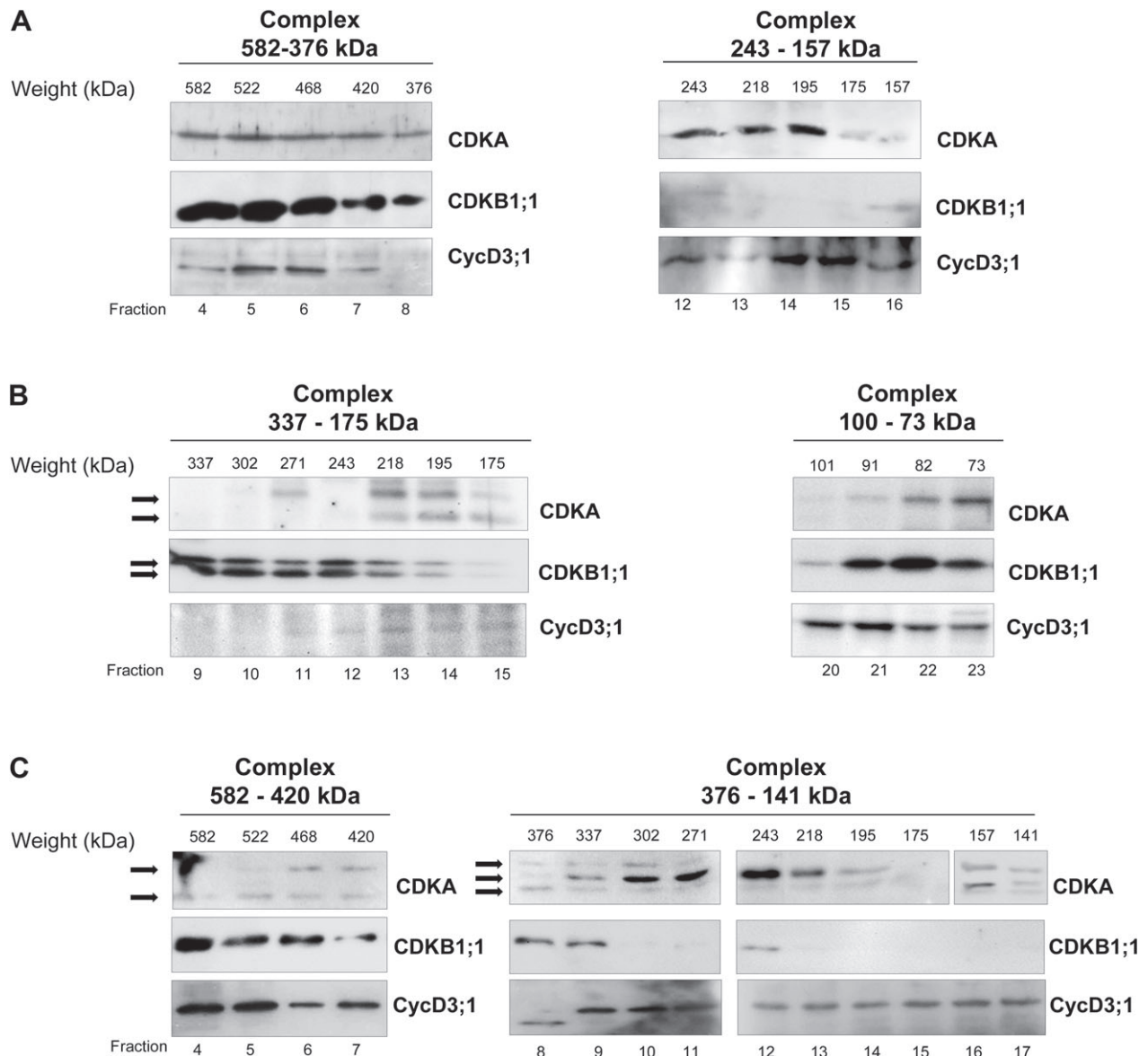


Fig. 3. Protein co-elution in complexes of different molecular mass during germination. Maize protein extracts from 0 (A), 12 (B) and 24 (C) h of germinated embryo axes were fractionated by size exclusion chromatography (Fig. S2) as indicated in methods. Maize CycD3;1, CDKA and CDKB1;1 were immunodetected in fractions corresponding to masses between 580 and ~50 kDa.

with either CDK, although present along germination (Fig. 2A), must be composed of different sets of accompanying proteins at the different germination times measured.

Effect of IAA and ABA on CycD3;1 protein levels during germination

Maize embryo axes were imbibed for 24 and 48 h in the absence or presence of phytohormones. In the presence of ABA the fresh weight of embryo axes decreased at 24 h, but more importantly at 48 h of germination

compared with control and IAA treated axes, while the length was not affected at any time under any treatment (Fig. 4, Fig. S4).

CycD3;1 protein levels in IAA-treated axes were reduced along germination, as compared to the levels in control embryos (Fig. 5A and B). On the other hand, CDKA levels in IAA-treated axes were above levels in the control at all times during germination (Fig. 5C and D), whereas CDKB1;1 levels were above control at 6 and 12 h and thereafter levels were similar to those in the control (Fig. 5E and F). CycD3;1 associated kinase

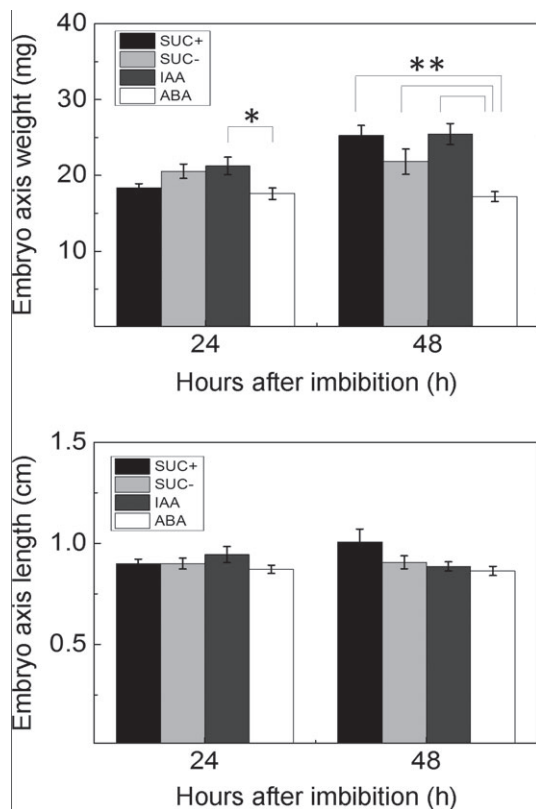


Fig. 4. Effect of sucrose and phytohormones on embryo axes weight and length. Maize embryo axes weight and length at 24 and 48 h after imbibition (hAI) with sucrose (Control, Suc+), without sucrose (Suc-), with ABA and with IAA, respectively. Data are the mean \pm SE of three independent replicates (12 axes each). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

activity was similar in control and IAA-treated axes between 0 and 18 h of germination and then it was reduced at 24 h under the IAA-treatment (Fig. 6A and C), in agreement with the reduced *CycD3;1* levels observed in these extracts.

CycD3;1 levels in ABA treated axes were similar compared with control levels during germination (Fig. 5A, B), whereas CDKA levels were lower than in the control (Fig. 5C, D), a similar trend to data previously reported by our group (Sánchez et al. 2005). On the contrary, CDKB1;1 levels were higher during germination than in control (Fig. 5E, F). However, *CycD3;1* associated kinase activity was slightly lower than in control at 6 h and then a further reduction was observed at 24 h of germination (Fig. 6B, C).

***CycD3;1* protein stability is modulated by sucrose during germination**

Sugar effects on plant growth and development are diverse and thousands of genes respond to sugar levels

(Lastdrager et al. 2014). Sucrose availability regulates some processes during the cell cycle such as gene expression, protein levels, protein activity and protein stability (Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000, Healy et al. 2001, Planchais et al. 2004, Hirano et al. 2011).

To study the role of sucrose in the control of the cell cycle during maize germination, and in particular, its effect on *cycs* and CDKs, maize embryo axes were imbibed in the presence or absence of sucrose for 24 and 48 h. The fresh weight and length of the axes did not vary after imbibition with or without sucrose at 24 h, but in the absence of sucrose fresh weight was reduced at 48 h (Fig. 4).

The expression of *CycD3;1 a* and *b* genes was not altered by imbibing axes without sucrose at 12 and 24 h suggesting that these genes are not regulated by sucrose (Fig. S6). However, *CycD3;1* protein levels strongly decreased from 6 till 24 h of germination in embryo axes imbibed in the absence of sucrose (Fig. 7A and B). Instead, CDKA and CDKB1;1 levels did not show significant variation whether sucrose was present or not (Fig. 7C–F). In agreement, kinase activity in *CycD3;1* immunoprecipitates paralleled the reduction on protein levels after 6 h of germination in embryo axes imbibed without sucrose (Fig. 8A and B).

Reduction in *CycD3;1* protein levels in the absence of sucrose could be due either to a lower rate of protein synthesis or a decreased *CycD3;1* stability (or to both). To test these possibilities, maize embryo axes were imbibed for 12 h in the presence of sucrose and then Chx (protein synthesis inhibitor) was added for 8 h more, time at which *CycD3;1* levels were measured. In axes re-imbibed in medium without sucrose, *CycD3;1* levels decreased to about half at 14 h of germination and to 25% after 16 h, compared to axes that received both sucrose and Chx (Fig. 9A and B). This result suggests that sucrose might regulate *CycD3;1* stability during maize germination.

Stability was also determined from the start of germination. In a similar experiment, maize embryo axes were imbibed in the presence or absence of sucrose from dry seed axes and up to 9 h of germination, in the presence of Chx (Fig. 9C). In the absence of sucrose, *CycD3;1* levels were reduced by 3 h of germination and it was virtually absent at later times, whereas levels were not altered when sucrose was present.

Discussion

The basic mechanisms that control cell cycle transitions in eukaryotes are well conserved; however, in plants gene families contain numerous members, a characteristic probably linked to the plasticity required by a sessile

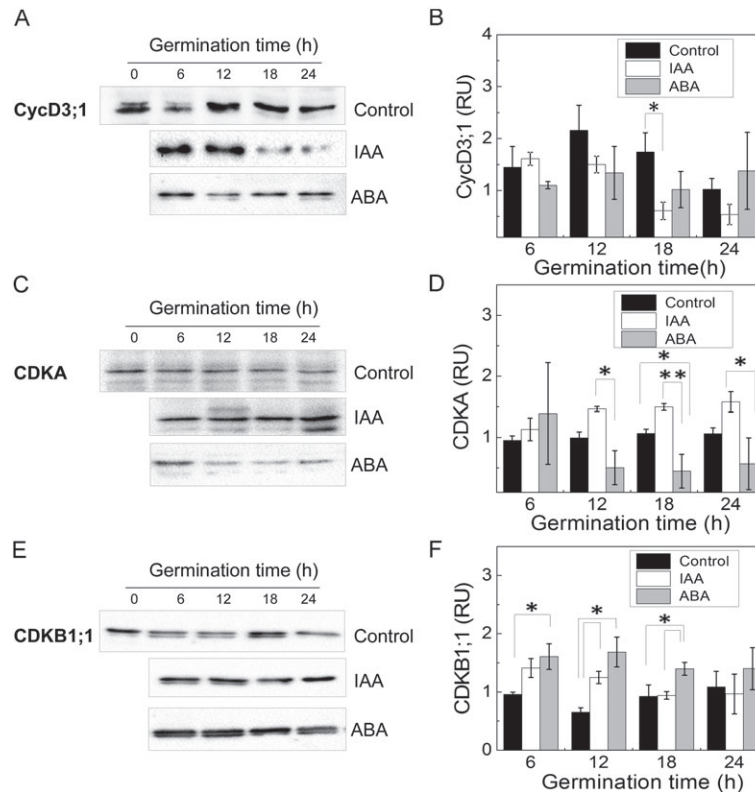


Fig. 5. Effect of phytohormones on CycD3;1, CDKA and CDKB1;1 protein levels during germination. Immunodetection of CycD3;1 (A, B), CDKA (C, D) and CDKB1;1 (E, F) proteins using specific antibodies in protein extracts from 0, 6, 12, 18 and 24 h of germination in the presence or absence of IAA (1 μ M) and ABA (50 μ M). Gels indicate the amount of loaded protein per lane (Fig. S5A). Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control and then to the dry seed band (0 h). Data are the mean \pm SE of three independent experiments (B, D, F). * P < 0.05, ** P < 0.01.

organism to adapt to different, frequently aggressive environments. While these multiple gene family members may also represent functional redundancy, several studies have provided evidence of specific functions for different individual members of a given family (Masubelele et al. 2005, Inzé and De Veylder 2006).

D-type *cycs*, both in animals and plants, are essential regulators of entry into the cell cycle as they respond to external and internal cues like phytohormones, growth factors, nutrients, stress signals and others (Soni et al. 1995, Riou-Khamlichi et al. 1999, 2000). Characterization of the role of D-type *cycs* during the cell cycle suggests that they are not redundant, even considering those in the same subfamily, for example, *CycsD3*. In *Arabidopsis*, *CycD3;1* seems to be a G1-S *cyc* (Soni et al. 1995). In tobacco, *CycD3;2* is a G1 *cyc* (Sorrell et al. 1999) whereas *CycD3;3* seems to be a M phase *cyc* (Nakagami et al. 2002). In maize tissues, expression of *CycD3;1a* and *CycD3;1b* genes differs considerably: *CycD3;1b* is mainly expressed in root tissues while *CycD3;1a* is mainly expressed in leaf and mesocotile,

but not in root (Buendía-Monreal et al. 2011); on the other hand, both *cyc* genes behave similarly during germination. Other *CycD* genes are expressed, with varied patterns during maize germination and their response to phytohormones like ABA, auxins and cytokinins is differential (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos 2006, Buendía-Monreal et al. 2011), again providing evidence against redundancy. In this work we have focused on the behavior of *CycD3;1* protein, complexes formed and its associated kinase activity, during germination and in response to environmental signals.

At the level of protein, *CycD3;1* (a and/or b, as the antibody cannot discriminate between them) is present at all times during germination, a behavior that is shared by most maize *cycs* D (Gutiérrez et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2008, Godínez-Palma et al. 2013), whereas transcript levels (of both genes) increase along the same process (Buendía-Monreal et al. 2011).

In *Arabidopsis*, *cycs* D bind CDKA and *cycs* A and B bind CDKB (Healy et al. 2001, Harashima and Schnittger 2012); in tobacco, *cycs* D also bind CDKB (Kawamura

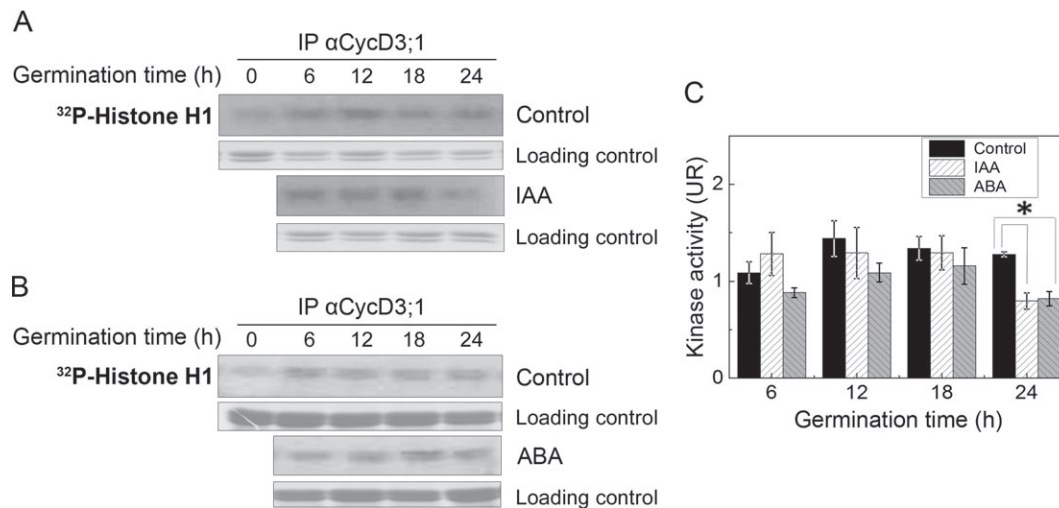


Fig. 6. Effect of phytohormones on kinase activity associated to CycD3;1 during germination. Kinase activity associated to CycD3;1 (IP antiCycD3;1) was determined in protein extracts from 0, 6, 12, 18 and 24 h of germination in the presence or absence of IAA and ABA, using histone H1 as substrate (A, B). Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control and then to intensity in the dry seed band (0 h). Data are the mean \pm SE of three independent experiments (C). * $P < 0.05$. RU, relative units.

et al. 2006). In maize, *cycs D* (D2;2, D4;2 and D5;3) bind to both, A and B type CDKs showing different patterns of association and kinase activity during germination (Godínez-Palma et al. 2013). Maize CycD3;1 is also able to bind CDKA and CDKB1;1 and to develop kinase activity using histone H1 as substrate (Fig. 2 A and B).

Noteworthy, in size exclusion chromatography, Cyc D3;1 co-elutes with either CDK in fractions of different molecular mass, depending on the germination time (Fig. 3A–C). We have observed maize *cycs D* associate to PCNA, or KRPs and showing an associated kinase activity (Gutiérrez et al. 2005, Sánchez et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2008, Godínez et al. unpublished data); if these co-elutions were the result of transient association of CycDs to possible targets such as the RBR protein, E2F transcription factors and DNA polymerases, among others, this could explain the high molecular mass of the complexes and their variation along germination. These variations are probably related to functional changes associated to the different stages of the cell cycle. Phosphorylation of a putative α -type DNA polymerase by a complex composed of PCNA and a PSTAIRE-containing CDK has been reported (Gómez-Roig and Vázquez-Ramos 2003).

Similar to *cycs D* in mammals, their orthologs in plants mediate signaling activated by endogenous or exogenous factors such as phytohormones or growth factors during the cell cycle. In *Arabidopsis* cell suspension cultures, expression of *cycs D* is induced by cytokinins and carbon source (Soni et al. 1995, Riou-Khamlichi et al. 2000, Healy et al. 2001). In maize, addition

of IAA increases DNA synthesis (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos 2006, Vázquez-Ramos and Lara-Núñez 2008) and activity of CycD4;1 and D5/CDK complexes in the first hours of germination (Lara-Núñez et al. 2008), suggesting an early cell cycle activation. This is consistent with the increase in weight observed in germinated embryo axes in the presence of IAA (Fig. 4). However, our data show that IAA reduces CycD3;1 protein levels while the associated kinase activity does not vary along germination until 24 h, when activity drops (Fig. 6), in contrast to the observed increase in transcript levels (Buendía-Monreal et al. 2011).

On the contrary, IAA increases levels of both CDKA and CDKB1;1 proteins, particularly at early germination times, which are very likely also forming active complexes with other D-type *cycs* like CycD4;1 and D5, as noted above. Therefore, if auxins are stimulating early cell cycle events during germination, Cyc D3;1 may not be the primary target.

ABA regulates dormancy in seeds (Bewley et al. 2012, Garay-Sánchez et al. 2012). Addition of ABA to germinating maize seeds stops cells in G1 phase (Sánchez et al. 2005), and reduces DNA synthesis (Da Silva et al. 2008, Buendía-Monreal et al. 2011). Here ABA was found to prevent the weight gain of the germinating axes (Fig. 4), corroborating its role as a germination inhibitor. Although ABA also negatively regulates *CycD3;1a* gene transcription (Buendía-Monreal et al. 2011), it did not reduce significantly the CycD3;1 protein levels and the associated kinase activity was not importantly affected until 24 h (Fig. 6). Since CDKA protein levels were

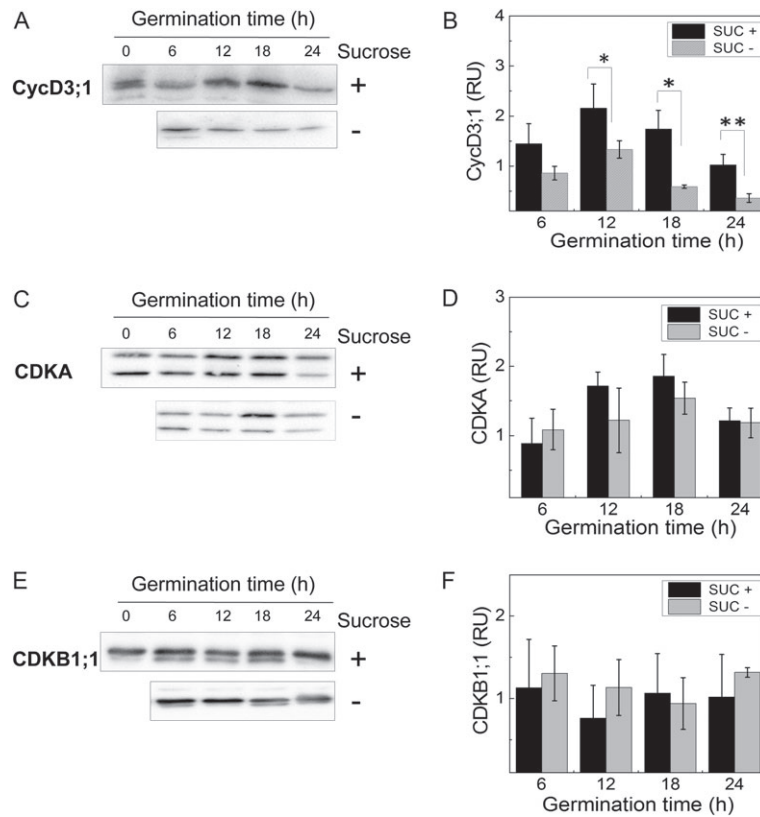


Fig. 7. Effect of sucrose on CycD3;1, CDKA and CDKB1;1 protein levels during germination. Immunodetection of CycD3;1 (A, B), CDKA (C, D) and CDKB1;1 (E, F) proteins was followed using specific antibodies in protein extracts from 0, 6, 12, 18 and 24 h of germination in the presence or absence of sucrose. Gels indicate the amount of loaded protein per lane (Fig. S5B). Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control and then to the dry seed band (0 h). Data are the mean \pm SE of three independent experiments (B, D, F). * P < 0.05, ** P < 0.01.

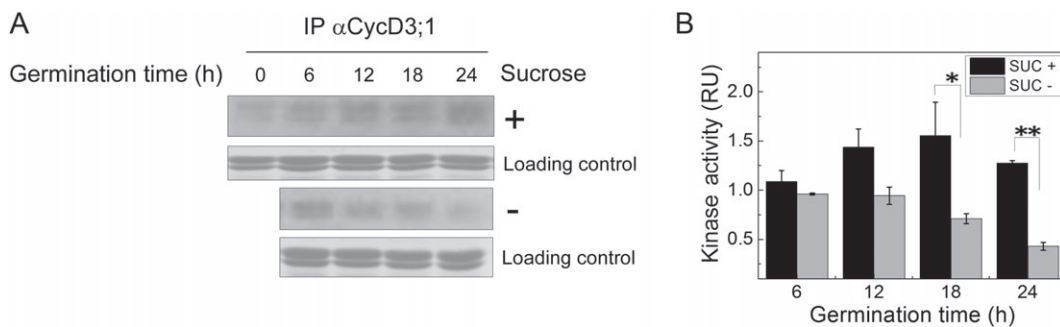


Fig. 8. Effect of sucrose on kinase activity associated to CycD3;1 during germination. Kinase activity associated to CycD3;1 (IP anti-CycD3;1) was determined using protein extracts from 0, 6, 12, 18 and 24 h of germination in the presence or absence of sucrose on histone H1 as substrate (A). Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control and then to intensity in the dry seed band (0 h). Data are the mean \pm SE of three independent experiments (B). * P < 0.05, ** P < 0.01. RU, relative units.

considerably reduced by ABA while CDKB1;1 levels were increased, this may explain the constant kinase activity along germination observed between 0 and 18 h of germination. Such increase in the amount of CDKB1;1 protein, a putative G2/M marker, in response to ABA

addition is puzzling and perhaps it is an indication of a deregulation of the sequential steps that lead to the completion of a typical cell cycle.

In contrast to results reported for Arabidopsis cells indicating an increased expression of *CycD3* gene in

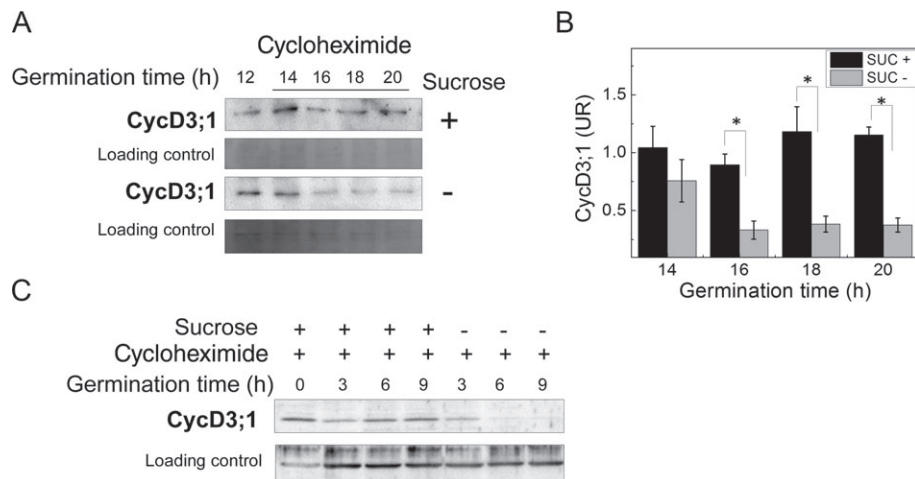


Fig. 9. Regulation of CycD3;1 stability by sucrose during germination. Maize embryo axes were imbibed for 12 h in the presence of sucrose, then cycloheximide was added (Chx; introduced by means of vacuum), and imbibition was followed for 2 (14), 4 (16), 6 (18) or 8 (20) more hours in the presence or absence of sucrose; CycD3;1 was immunodetected in protein extracts (A). Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control and then to intensity in the dry seed band (12 h). Data are the mean \pm SE of three independent experiments. * $P < 0.01$. (B) Maize embryo axes were imbibed for 0, 3, 6 and 9 h of germination in the presence of Chx as before and in the presence or absence of sucrose and CycD3;1 was immunodetected by using anti-CycD3;1 antibodies (C). RU, relative units.

response to sucrose addition (Riou-Khamlichi et al. 2000), expression of maize *CycD3;1a* and *CycD3;1b* genes was not altered by sucrose addition during germination. However, CycD3;1 protein levels are higher at all times as also was the associated kinase activity when sucrose was added to the imbibition medium, despite the fact that neither CDKA nor CDKB1;1 protein levels are modified. These data suggest that the increase in kinase activity must be due to posttranslational modifications of CDKs, or to more CycD3-CDK complexes formed, or to both.

Finally, CycD3;1 seems to be an unstable protein only in the absence of sucrose during early and late germination times since even in the presence of cycloheximide, when there is sucrose in the medium the protein appears to be stable, but its removal promotes a rapid degradation. In this context, CycD3;1 would seem to be regulated differently to other maize D cys, that are degraded gradually in media supplemented with sucrose and Chx (Godínez-Palma et al. 2013). Perhaps sucrose, acting as a signaling molecule, promotes a posttranslational modification that protects CycD3;1 from being degraded (Plan-chais et al. 2004). It would certainly be very interesting to find out what is different in this cys from the others.

Author contributions

Sara M. Garza-Aguilar designed experiments, performed research, analyzed and interpreted data, wrote the manuscript and critically read the manuscript. Aurora

Lara-Núñez performed research, interpreted data and critically read the manuscript. Elpidio García analyzed and interpreted data. Jorge M. Vázquez-Ramos was responsible for the design of research line, analyzed and interpreted data, wrote and critically read the manuscript.

Acknowledgements—This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grants number CB 220661 and 252001); Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (grants number IN 215316 and IA201814); Programa de Apoyo a Investigación y Posgrado (grant number 5000–9124 and 5000–9130); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología–PhD grant and Sistema Nacional de Investigadores – level III grant (to S.M.G.A.). We thank PhD Rogelio Rodríguez-Sotres for critical revision of this manuscript. We thank MVZ Atonatiuh E. Gómez-Martínez for technical assistance.

References

- Baiza MA, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* 135: 416–421
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2012) Dormancy and the control of germination. In: *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edn. Springer-Verlag, New York, pp 247–290

- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla L, García E, Vázquez-Ramos JM (2011) The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plant* 143: 297–308
- Cruz-García F, Jiménez LF, Vázquez-Ramos JM (1995) Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds. *Seed Sci Res* 5: 15–23
- Da Silva EAA, Toorop PE, Van Lammeren AAM, Hillhorst HWM (2008) ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. *Ann Bot* 102: 425–433
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacqumard A, Kilby NJ, Murray JAH (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 151: 79–92
- Doonan JH, Kitsios G (2009) Functional evolution of cyclin-dependent kinases. *Mol Biotechnol* 42: 14–29
- Garay-Sánchez A, Sánchez MP, García-Ponce B, Azpeitia E, Álvarez-Buylla ER (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Dev Dyn* 241: 1867–1885
- Godínez-Palma SK, García E, Sánchez MP, Rosas F, Vázquez-Ramos JM (2013) Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J Exp Bot* 64: 5661–5671
- Gómez-Roig E, Vázquez-Ramos JM (2003) Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/Cdk complex. Effect of benzyladenine. *J Plant Physiol* 160: 983–990
- Gupta AK, Kaur N (2005) Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci* 30: 761–776
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol* 46: 166–173
- Harashima H, Schnittger A (2012) Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria. *Plant Methods* 8: 23
- Healy JMS, Menges M, Doonan JH, Murray JAH (2001) The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* 276: 7041–7047
- Hirano H, Shinmyo A, Sekine M (2011) Both negative and positive G₁ cell cycle regulators undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 6: 1394–1396
- Inzé D, De Veylder L (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40: 77–105
- Kawamura K, Murray JAH, Shinmyo A, Sekine M (2006) Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. *Plant Mol Biol* 61: 311–327
- Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Uchimiya H, Umeda M (2003) *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* 132: 1315–1321
- Lara-Núñez A, De Jesús N, Vázquez-Ramos JM (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant* 132: 79–88
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot* 65: 799–807
- Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bakó L, Koncz C, Dudits D (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9: 223–235
- Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH (2005) D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15694–15699
- 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
- Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH (2006) The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 893–906
- Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J* 18: 243–252
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 14: 1847–1857
- Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308: 697–711
- Planchais S, Samland AK, Murray JAH (2004) Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins: CycD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* 38: 616–625
- Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM (2006) Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant* 128: 556–568
- Reyes J, Jiménez-García LF, González MA, Vázquez-Ramos JM (1991) Benzyladenine-stimulation

- of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci Res* 1: 113–117
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmar A, Murray JAH (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541–1544
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* 20: 4513–4521
- Sánchez MP, Torres A, Boniotti MB, Gutierrez C, Vázquez-Ramos JM (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol Biol* 50: 167–175
- Sánchez MP, Gurusinge SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM (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
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JA (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85–103
- Sorrell DA, Combettes B, Chaubet-Gigot N, Gigot C, Murray JAH (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* 119: 343–352
- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 903–916
- Vázquez-Ramos JM, Lara-Nuñez A (2008) Cyclins D, phytohormones and cell cycle onset in germinating maize. *Plant Signal Behav* 3: 578–579
- Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res* 13: 113–130

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Antigenic sequence of CycD3;1 and alignment to other maize cycs D.

Fig. S2. Elution profile of protein extracts at 0, 12 and 24 h of germination.

Fig. S3. Complete images of IPs.

Fig. S4. Maize embryo axes phenotype at 24 and 48 hours after imbibition (HAI).

Fig. S5. Loading control corresponding to Figs. 5 and 7.

Fig. S6. Effect of sucrose on gene expression of *CycD3;1a* and *CycD3;1b*.



Research article

Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination



Aurora Lara-Núñez ^{a,*}, Brendy B. García-Ayala ^a, Sara M. Garza-Aguilar ^a,
 Jesús Flores-Sánchez ^a, Víctor A. Sánchez-Camargo ^a, Carlos E. Bravo-Alberto ^a,
 Sonia Vázquez-Santana ^b, Jorge M. Vázquez-Ramos ^a

^a Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

^b Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Comparada, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2016

Received in revised form

19 December 2016

Accepted 20 January 2017

Available online 21 January 2017

Keywords:

CDKs

Cell cycle

Cyclins

Germination

Glucose

Maize

Sucrose

ABSTRACT

Glucose and sucrose play a dual role: as carbon and energy sources and as signaling molecules. In order to address the impact that sugars may have on maize seeds during germination, embryo axes were incubated with or without either of the two sugars. Expression of key cell cycle markers and protein abundance, cell patterning and *de novo* DNA synthesis in root meristem zones were analyzed. Embryo axes without added sugars in imbibition medium were unable to grow after 7 days; in sucrose, embryo axes developed seminal and primary roots with numerous root hairs, whereas in glucose axes showed a twisted morphology, no root hair formation but callus-like structures on adventitious and primary seminal roots. More and smaller cells were observed with glucose treatment in root apical meristems. *de novo* DNA synthesis was stimulated more by glucose than by sucrose. At 24 h of imbibition, expression of *ZmCycD2;2a* and *ZmCycD4;2* was increased by sucrose and reduced by glucose. *CDKA1;1* and *CDKA2;1* expression was stimulated equally by both sugars. Protein abundance patterns were modified by sugars: *ZmCycD2* showed peaks on glucose at 12 and 36 h of imbibition whereas sucrose promoted *ZmCycD3* protein accumulation. In presence of glucose *ZmCycD3*, *ZmCycD4* and *ZmCycD6* protein abundance was reduced after 24 h. Finally, both sugars stimulated *ZmCDKA* protein accumulation but at different times. Overall, even though glucose appears to act as a stronger mitogen stimulator, sucrose stimulated the expression of more cell cycle markers during germination. This work provides evidence of a differential response of cell cycle markers to sucrose and glucose during maize germination that may affect the developmental program during plantlet establishment.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Seed germination includes the chain of events occurring in a seed after water uptake and before root protrusion with the purpose of producing a mature plant able to reproduce and give rise to a new generation. After water uptake a plethora of metabolic events are turned on, among them, the onset of the cell cycle that

has a profound impact on a successful germination completion. The cell cycle comprises four general phases, G1, S (Synthesis), G2 and M (Mitosis) phases, with three main control points along the process: the first one in the transition of G1 to S; the second in the G2 to M transition and the third one during the metaphase to anaphase transition in Mitosis. These control points require the kinase activity of a heterodimeric complex formed by a member of a family of proteins named Cyclins (Cyc) and a member of a family of proteins named Cyclin-Dependent Kinases (CDKs, Inzé and De Veylder, 2006).

Plant Cycs have been classified into different types (A, B, C, D, H, L, T, P, Q and SDS). In general, those involved in G1 and S phase (CycDs) are responsive to signals derived from nutritional status and hormones as well as growth rate or cell size (Nieuwland et al., 2007). CycDs are unstable proteins and some of them show

Abbreviations: CDK, cyclin dependent kinase; Cyc, cyclin; Glc, glucose; HAI, hours after imbibition; RAM, root apical meristem; RE, responsive element; Suc, sucrose.

* Corresponding author. Laboratorio 114, Edificio E. Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad y Copilco C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: auroraln@unam.mx (A. Lara-Núñez).

fluctuating protein levels with a typical abundance peak between G1 and S phases. They can be regulated at different levels: transcriptional, translational, posttranslational, and also by their stability, association with other proteins and cellular localization (Nieuwland et al., 2007). A bioinformatic analysis showed that in maize there are 17 *CycD* genes within its genome; 15 of them are expressed differentially during germination as well as under the influence of hormones, suggesting they could have non-redundant functions (Buendía-Monreal et al., 2011).

CDKs are the active partners of *Cycs* and are serine/threonine protein kinases able to phosphorylate several substrates (Inzé and De Veylder, 2006), among them the retinoblastoma-related protein (RBR) and Histone H1. In plants, two CDK types, A and B, have been particularly studied. A-type CDKs present in their sequence a canonical PSTAIRE motif whereas B-type CDKs, exclusive of plants, contain a divergent sequence, either PPTALRE or PPTTLRE. CDKsA have been linked to cell cycle control at the G1/S and G2/M transitions in association mainly with *CycD*s (Inzé and De Veylder, 2006), whereas CDKsB have been associated to G2/M transitions in partnership with A or B-type *Cycs*. CDK activity can be regulated either by positive or negative phosphorylation, cellular localization or interaction with other proteins (Dudits et al., 2007).

Cell cycle control plays an essential role for a successful germination and seedling establishment. Different and complex regulatory levels converging along germination are orchestrated. By instance, the transcriptional regulation of cell cycle related genes is essential to coordinate cell cycle progression with the morphogenetic program, as well as with environmental and nutritional inputs (Sablowski and Dornelas, 2013). The nutritional status plays an important role in germination. A seed cannot germinate without proper carbon and energy inputs from storage tissues. Among nutrients, sugars have been recognized as dual components: as carbon and energy donors as well as signaling molecules. Soluble sugars could have a differential impact on germination by activating or blocking key processes. It is known that hexoses like glucose (Glc) in plant tissues trigger cell division, whereas sucrose (Suc) favors differentiation and maturation (Koch, 2004; Gibson, 2004; Eveland and Jackson, 2011; Wang and Ruan, 2013).

During *Vicia faba* seed development, high Glc concentrations were found in non-differentiated cotyledon regions with high mitotic index. In contrast, high Suc concentrations were found on starch accumulating and expanding cells (Borisjuk et al., 2003; Eveland and Jackson, 2011).

Cell cycle-related markers can be regulated at different levels by sugars: in *Arabidopsis* suspension cultures, the expression of *CycD2* and *CycD3* was stimulated by Glc and Suc; in the presence of Suc, kinase activity in *Cycs D2* and *D3/CDK* complexes increased up to six times from a threshold level (Riou-Khamlichi et al., 2000). Similarly, in maize embryo axes *CycD2;2* expression was stimulated by Suc (Gutiérrez et al., 2005) and in tobacco BY-2 cells the expression of *CycD2;1*, *D3;2*, *A3;2* and *B1;2* increased in parallel to Glc concentration and the length of S and G2 phases could be modified by varying Glc levels (Hartig, 2005; Hartig and Beck, 2006). This regulation could be due, at least partially, to the presence of the corresponding Responsive Elements (RE) on the promoter region of these cell cycle genes.

Incidentally, recent reports indicate that Target Of Rapamycin kinase (TOR kinase) plays a critical role in Glc signaling by activating the expression of different biosynthetic pathways. It was found that Glc, via TOR, activates cell division in root meristems, being the E2F transcription factor the target for TOR kinase thus activating S-phase genes for cell cycle entry (Xiong et al., 2013). TOR is a master regulator that coordinates nutrient and energy availability as well as environmental signals with growth, development and survival. Apparently TOR senses and transduces Glc signals to

control root meristem proliferation (Xiong and Sheen, 2014).

The aim of the present work is to assess the impact of adding Suc and Glc to germinating maize seeds: embryo axes morphology, cell patterning and *de novo* DNA synthesis at RAM, and on cell cycle markers at gene expression and protein abundance levels.

2. Materials and methods

2.1. Materials and treatments of maize embryo axes

Protease inhibitor cocktail tablets (Complete) were purchased from Roche (Indianapolis, IN, USA). Western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate kit and Immobilon polyvinylidene fluoride membranes were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA); anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Caryopses of *Zea mays* cv. Chalqueño (an open pollination genotype, harvested in 2014 and 2015) were acquired at Chalco, Estado de México, México. Intact embryo axes were dissected manually from the dry caryopsis removing the scutellum (the single cotyledon embryo) with a scalpel.

To follow germination (time from onset of imbibition), embryo axes (10 embryos per treatment) were disinfected by submergence in sodium hypochloride (0.5% v/v) for 15 min with occasional agitation, and rinsed four times 5 min each with sterile distilled water. Embryo axes were incubated for 6, 12, 18, 24, 30 or 36 h at 25 °C or up to 7 days in the dark on Whatman filter paper No. 1 with imbibition buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ and 120 mM Glc or 120 mM Suc, or without a carbon source (Control axes) under sterile conditions. For *de novo* DNA synthesis analysis embryo axes were incubated as before with a slight modification: four hours prior harvesting, axes were changed to imbibition medium plus 120 μM EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), vacuum was applied 3 times 10 s each with a recovery period of 1 min and axes were put back in fresh imbibition medium without EdU (Kotogány et al., 2010).

2.2. Protein extraction

Protein extracts were produced by grinding axes at 4 °C with a polytron (Janke & Kunkel, Ultra-Turrax) on extraction buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 30% (v/v) glycerol, 60 mM β-glycerol phosphate, 50 mM NaF, 200 μM Na₃VO₄, 1 mM EGTA, a mini tablet of protease inhibitor cocktail/15 mL. Protein extracts were centrifuged at 16 000 g for 1 h at 4 °C. Protein concentration was determined by the BCA method (Stoscheck, 1990).

2.3. Total RNA extraction and semi quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 10 dry embryo axes or imbibed for 12 and 24 h using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following supplier's instructions. Synthesis of cDNA and PCR were performed with 2.5 μg of total RNA by using a two-step kit. Reverse transcriptase (M-MLV Reverse transcriptase, Promega, Madison, WI) reaction was performed after DNA degradation utilizing DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

PCR reactions were performed with specific primers (Buendía-Monreal et al., 2011) from cDNA equivalent to 100 ng of total RNA following manufacturer's instructions (JumpStart, Sigma-Aldrich). The PCR cycle number in the linear range was as reported by Buendía-Monreal et al. (2011) or empirically determined.

PCR products not reported before were sequenced to confirm

their identity and were analyzed on 1% (w/v) agarose gels pre-stained with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ethidium bromide. Gels were scanned in a ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and analyzed by Image Lab software (Bio-Rad).

Maize genes analyzed in this work were: *ZmCDKA1;1*, *ZmCDK2;1*, *ZmCDKB1;1*, *ZmKRP3*, *ZmKRP5;3a*, *ZmE2FA/B*, *ZmE2FC*, *ZmCycD2;2a*, *ZmCycD3;1a*, *ZmCycD3;1b*, *ZmCycD4;2*, *ZmCycD5;3* and *ZmCycD6;1*.

2.4. Western blotting

Protein samples (25 μg) were fractionated by SDS/PAGE (12%). Gels were blotted onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, blocked with 5% dry milk and then incubated with one of the following polyclonal antibodies, developed in our laboratory: anti-ZmCycD2; 2 (Gutiérrez et al., 2005), anti-ZmCycD3; 1 (Garza-Aguilar et al., 2016), anti-ZmCyc4; 2, anti-ZmCycD5; 3 (Lara-Núñez et al., 2008), anti-ZmCycD6; 1 (Zamora-Zaragoza, 2015; Godínez-Palma et al., 2017), anti-ZmCDKB (Godínez-Palma et al., 2013). For CDKA analysis a commercial anti-PSTAIR motif antibody (Santa Cruz) was used. All antibodies were applied at a 1:1000 dilution except anti-ZmCyc4; 2, which was 1:500. Briefly, they were incubated overnight at 4 °C, washed once with PBS, a second wash with PBS plus 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, and once again with PBS, 15 min each wash. Membranes were then incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody at a 1:20,000 dilution (Santa Cruz). Subsequently, membranes were washed three times with PBS 15 min each, and peroxidase reaction was detected by ECL method (Pierce kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Signal was detected in a ChemiDoc and densitometric analysis was performed by Image Lab software.

2.5. Histological and microscopical analysis

After different imbibition periods in Suc or Glc solutions, embryo axes were fixed in 4% formaldehyde (v/v) in PBS buffer for at least 18 h, followed by rinsing in PBS five times, 15 min each, and then tissues were dehydrated in an ascending ethanol (30–100%) series and embedded in Paraplast. Longitudinal sections of tissue, 10 μm thick, were obtained using a rotary microtome. Sections were stained during 24 h with 1% (w/v) Safranin O dissolved in 95% ethanol plus 2-Methoxyethanol (methyl cellosolve), rinsed in distilled water and dehydrated for 10 s in 95% ethanol plus 0.5% picric acid, 10 s in 95% ethanol plus four drops of ammonium hydroxide and then 10 s in 100% ethanol to finish dehydration and counterstained with 0.05% Fast Green solution 10 s and rinsed with clover oil to remove excess of dye. Then samples were mounted with Entellan (Ruzin, 1999). Tissues were observed under microscope, Leica ICC50HD, and pictures were taken with a digital camera.

After 48 and 72 h imbibition (HAI) whole embryo axes or tissue sections were incubated in Lugol (IKI) solution (2.5% iodine, 5% potassium iodine) for 30 s. Excess staining solution was removed by washing with distilled water and visualized under stereomicroscope (whole embryo axes) or under optical microscope (tissue sections). Each experiment was performed three times with 15 embryo axes each.

For starch grain assessment unstained tissue sections of embryo axes were analyzed under polarized light microscopy to reveal starch granules by structure birefringent Maltese crosses (Ruzin, 1999). Images were digitally captured with the use of a Photomicroscope Olympus Provis AX70.

2.6. *de novo* DNA synthesis

For *de novo* DNA synthesis, maize embryo axes imbibed for 20 h

were incubated 4 h with 10 μM EdU in imbibition medium (Invitrogen, Click iT EdU Alexa Fluor 488 HCS assay, *cat no*: C10350) after having been previously introduced by three vacuum pulses (10 s with 1 min recovery period). The embryo axes were then fixed and treated as indicated above to obtain tissue slices to visualize on confocal microscopy. Tissue sections were treated according to manufacturer kit instructions to visualize nuclei (Hoechst 33,342) and *de novo* DNA synthesis via EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation labeled with Alexa Fluor 488). Samples were observed under a fluorescent confocal microscope Olympus™ FV 1000. For *de novo* DNA synthesis (incorporation of Alexa Fluor 488) excitation was set at 495 nm and emission was detected between 500 and 600 nm; for total DNA staining (Hoechst 33,342) excitation was set at 350 nm and emission observed between 400 and 500 nm, according to manufacturer's recommendations. Imaging specifications were as Kotogány et al. (2010).

2.7. Evaluation of cell size and number in RAM zone from maize embryo axes

For estimation of cell size and number, 1000 cells in RAM zones from 10 embryo axes (around 100/axe) per time and treatments were analyzed randomly. The selection criteria were: 1) cells that were above the quiescent center in the area corresponding to the proximal meristem, according to Jiang et al., 2010, and 2) cells that were isodiametric (Baluška et al., 1990).

For cell size estimation, cell width was measured using Leica Application Suite 3.0.0 software.

Cell number per area unit was estimated by public access ImageJ software. This parameter indicates the quantity of cells that are in 100 square micrometers (100 μm^2) at the previously defined zone. The mean and standard error of length and weight of embryo axes were calculated in 10 axes of three independent experiments.

2.8. Statistical analysis

Data from protein abundance analysis, *de novo* DNA synthesis, cell size and number, and embryo axes growth and length were analyzed using one-way ANOVA, and then a comparison by Tukey's test was performed to assess significant differences at $P < 0.05$ or 0.01.

3. Results

3.1. Effect of sugars on maize embryo axes morphology

The embryo axis from a mature dry seed possesses the genetic information and the potential to become a fully developed plant. Water uptake is required to trigger the proper signaling cascade and thus initiate the complex set of processes that will culminate with radicle protrusion. A nutritional input is also necessary to support these processes. Thus this study was based on the embryo axis as our biological model. Maize embryo axes were mechanically deprived of scutellum to eliminate any source of carbon and energy from this tissue in such a way that the effect of external sugars could be evaluated on naked embryo axes during prolonged times. Fig. 1 A shows the embryo axes morphology at 72 HAI in Control treatment (axes in imbibition medium without sugar), axes imbibed in Suc or Glc (120 mM), stained (lower panel) or not (upper panel) with lugol to visualize starch *in situ*. This figure also shows the increase of embryo axes length with time (Fig. 1 B) and the wet weight gain (Fig. 1 C) from 0 h up to 72 HAI. Control axes showed minimal growth and weight gain in spite of showing important lugol staining, suggesting that they contain, but do not efficiently use, stored sugars as starch (Fig. 1 A and Fig. S1 C). Maize embryo

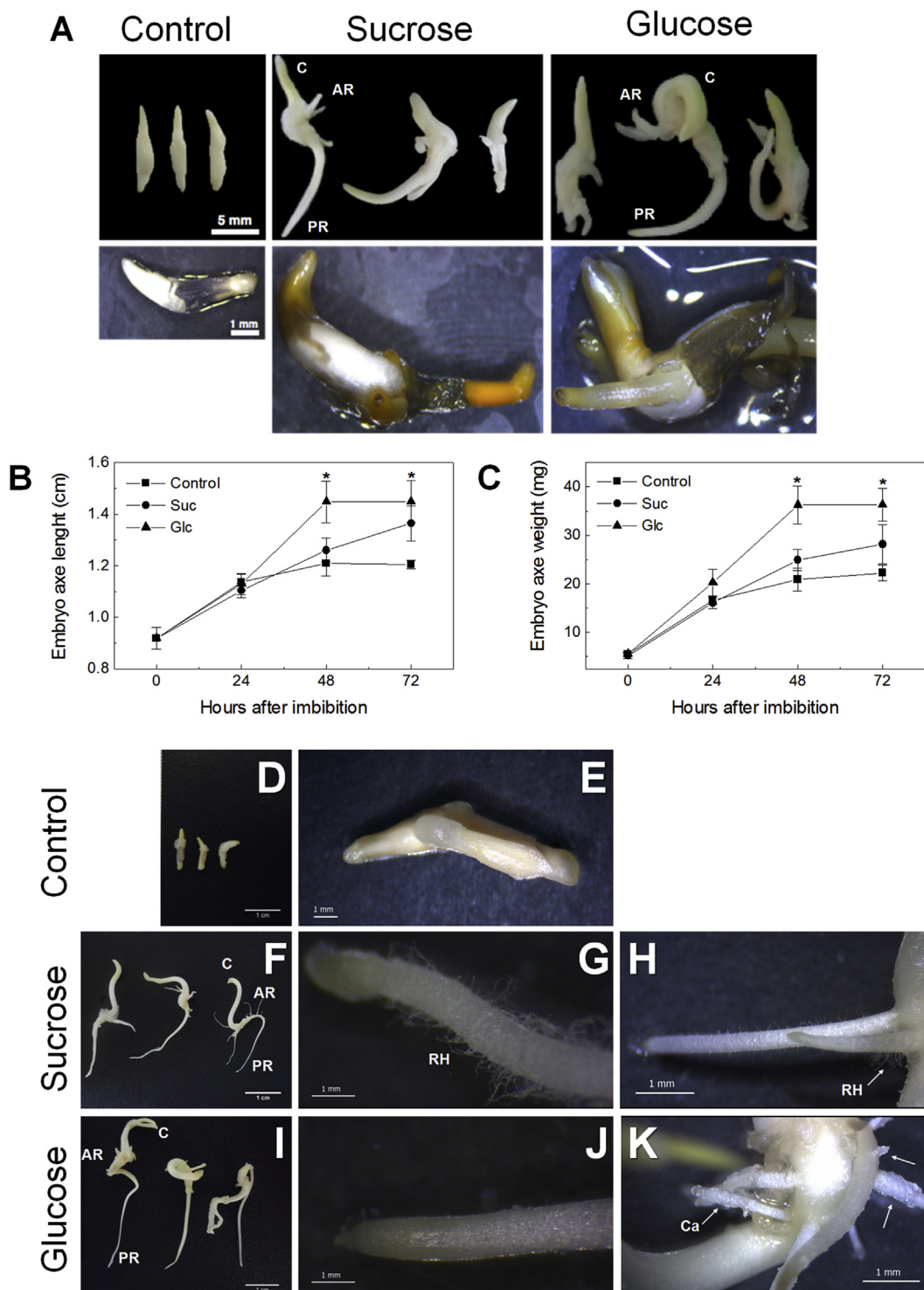


Fig. 1. Maize embryo axes morphology at 72 h imbibed without carbon source (Control), 120 mM Sucrose or Glucose (A to C) or 7 days (F to K). (A) Upper panel axes without staining; lower panels axes stained with lugol. Dark blue stains show starchy zones; yellowish stains indicate waxy starch (Ruzin, 1999). (B) Embryo axes length, and (C) Embryo axes weight from zero to 72 HAI. Bars represent means \pm SE. * indicates significant differences ($P < 0.05$). (D and E) Control axes. (F to H) Axes imbibed with 120 mM Sucrose. (F) Whole axes view. (G) Primary root amplification showing development of numerous root hairs. (H) Adventitious root zone amplification showing root hairs. (I to K) Axes imbibed with 120 mM Glucose. (I) Whole axes view. (J) Primary root amplification lacking root hairs. (K) Adventitious root zone amplification with callus-like structures. C, coleoptile; Ca, callus-like structures; PR, primary root; RH, root hairs; AR, adventitious roots. The experiment was performed three times with 15 embryo axes each replicate. Bars: A = 5 mm (upper panel); A (lower panel), E, G-K = 1 mm; D and F = 1 cm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

axes on Suc presented an enlarged morphology and constant growth as well as wet weight accumulation, whereas on Glc around

30% of axes presented a twisted morphology and showed the highest growth and weight gain rates. Axes on non-metabolizing

sugars showed a morphology similar to Control axes (see Fig. S1 in Supplementary material) discarding a pure osmotic effect of sugars on embryo growth.

After 7 days of prolonged exposition to sugars, embryo axes maintained a similar but enlarged morphology (Fig. 1 D to K). A closer observation of developed structures gave information about differentiation processes taking place on maize seedlings. Without sugars embryo axes ceased to grow; after 7 days of imbibition they showed the same morphology and size than axes at 72 HAI (Fig. 1 D and E). Embryo axes in Suc showed enlarged primary root and coleoptile and developed numerous seminal roots. The primary and seminal roots showed the emergence of abundant root hairs (Fig. 1 F, G and H). By contrast, axes in Glc conserved the twisted morphology with enlarged and thin primary roots (Fig. 1 I). No root hair formation was observed (Fig. 1 J). A marginal seminal root formation was produced on which callus type structures were evident (Fig. 1 H). These contrasting morphologies suggested that both sugars could play independent but important roles on the morphogenetic program, probably controlling proliferation and/or differentiation.

3.2. Cell patterning and structure of RAM

Maize axis growth during germination seems to be the result of cell enlargement, as there is no cell division yet (Baíza et al., 1989). In plants, cell division takes place in meristems. Cell size and density at RAM regions were analyzed at 24 and 48 HAI (around the end of germination and starting seedling establishment, respectively, Baíza et al., 1989). Meristem cells in Glc treatment showed the smallest cell diameter and the highest density; in Suc, cells had an intermediate size and number. In contrast, in Control, cells were the biggest and showed slightly less populated meristems than under Suc treatments (Fig. 2 and Table 1). This suggests a compensation mechanism to preserve organ shape (Sablowski and Dornelas, 2013).

3.3. *de novo* DNA synthesis in root apical meristems

In order to address the fact that in Glc RAM zones showed more

and smaller cells than in Control or in Suc treatment, embryo axes were exposed to EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), a thymidine analogue, to evaluate *de novo* DNA synthesis as an indirect estimation of cells in S-phase. Axes were imbibed during different time periods. Four hours before harvesting, an EdU pulse was applied. Incorporation was visualized by confocal microscopy as green spots on a blue field (nuclei stained with Hoechst 33,342). Fig. 3 shows 24 HAI RAM zones. Cells without sugars (Control) showed almost no EdU-labeled nuclei; in Suc treatment *de novo* DNA synthesis was more evident, whereas in Glc there was an important incidence of cells at S-phase. Fig. S2 shows the number of meristem cells labeled with EdU. Cells that were entering into S-phase close to the time of the pulse are visualized as big green spots (whole nuclei). In contrast, those cells that entered S-phase near to the end of the incubation period showed a spotty labeling (Kotogány et al., 2010). This phenomenon was more frequently observed in Glc-treated axes (percentage of nuclei with a spotty pattern from total EdU labeled nuclei: $58.1 \pm 3.9\%$), suggesting that the stage of the cell cycle in the population is more heterogeneous and it is possible that more cells are closer to divide at 24 HAI than those in Suc (percentage of nuclei with a spotty pattern from total EdU labeled nuclei $37.0 \pm 3.4\%$) or without sugar ($30.2 \pm 1.7\%$), in agreement with a higher cell density in RAM and a faster growth (Fig. 3, Table 1).

3.4. Promoter analysis and gene expression of cell cycle markers

A promoter region analysis was performed in order to assess whether sugars could contribute to regulate the gene expression of critical cell cycle markers (Fig. S3). The *in silico* analysis was built considering the first 2000 bp upstream of the putative translational start site identifying Responsive Elements (RE). We were able to recognize *in silico* RE to sugars, E2F binding sites and cell cycle MYB on some promoters (Fig. S3). We centered our attention mainly on genes coding for proteins against which we have developed polyclonal antibodies in our lab or that represent an interesting target to be analyzed due to their key function on cell cycle regulation.

All promoters analyzed for cell cycle related genes contained the

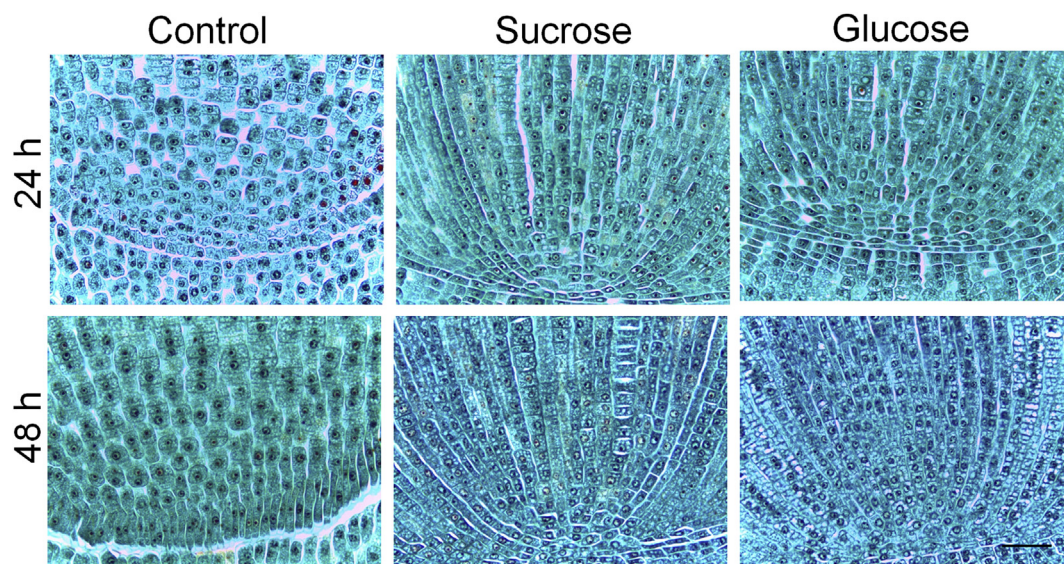


Fig. 2. RAM cell patterning in maize embryo axes at 24 and 48 h imbibed without carbon source (Control), 120 mM Sucrose or Glucose. Tissue sections were stained with safranin O and fast green. Cytoplasm and cell walls are visualized in green whereas nuclei are stained in red (Ruzin, 1999). Images are representative of ten biologically independent replicates from each time and treatment. Scale bars = 200 μ m for all images. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Cell size and number in RAM zones from maize embryo axes at different HAI with or without sugar treatment.

HAI (Hours after imbibition)	Control		Sucrose		Glucose	
	Cell size (μm)	Cell number. 100 μm^2	Cell size (μm)	Cell number. 100 μm^2	Cell size (μm)	Cell number 100 μm^2
0	7.85 \pm 1.43	9.64 \pm 1.11				
12	8.79 \pm 0.12 ^A	18.85 \pm 1.0 ^D	6.36 \pm 0.10 ^A	24.41 \pm 1.29 ^E	5.14 \pm 0.12 ^A	39.85 \pm 11.33 ^F
24	8.95 \pm 2.49 ^A	13.10 \pm 1.67 ^D	7.11 \pm 0.11 ^B	19.41 \pm 3.54 ^E	6.20 \pm 0.18 ^C	28.38 \pm 1.92 ^F
48	8.27 \pm 0.37 ^A	22.18 \pm 1.64 ^D	5.56 \pm 0.14 ^B	28.07 \pm 1.83 ^E	4.47 \pm 0.16 ^C	34.49 \pm 3.87 ^F

Treatments were analyzed by one-way ANOVA and Tukey performed paired test. ^A, ^B and ^C indicate statistical difference ($P < 0.01$) among cell size values at each time analyzed; ^D, ^E and ^F letters denote statistical difference ($P < 0.01$) among cell number/100 μm^2 values at each time analyzed.

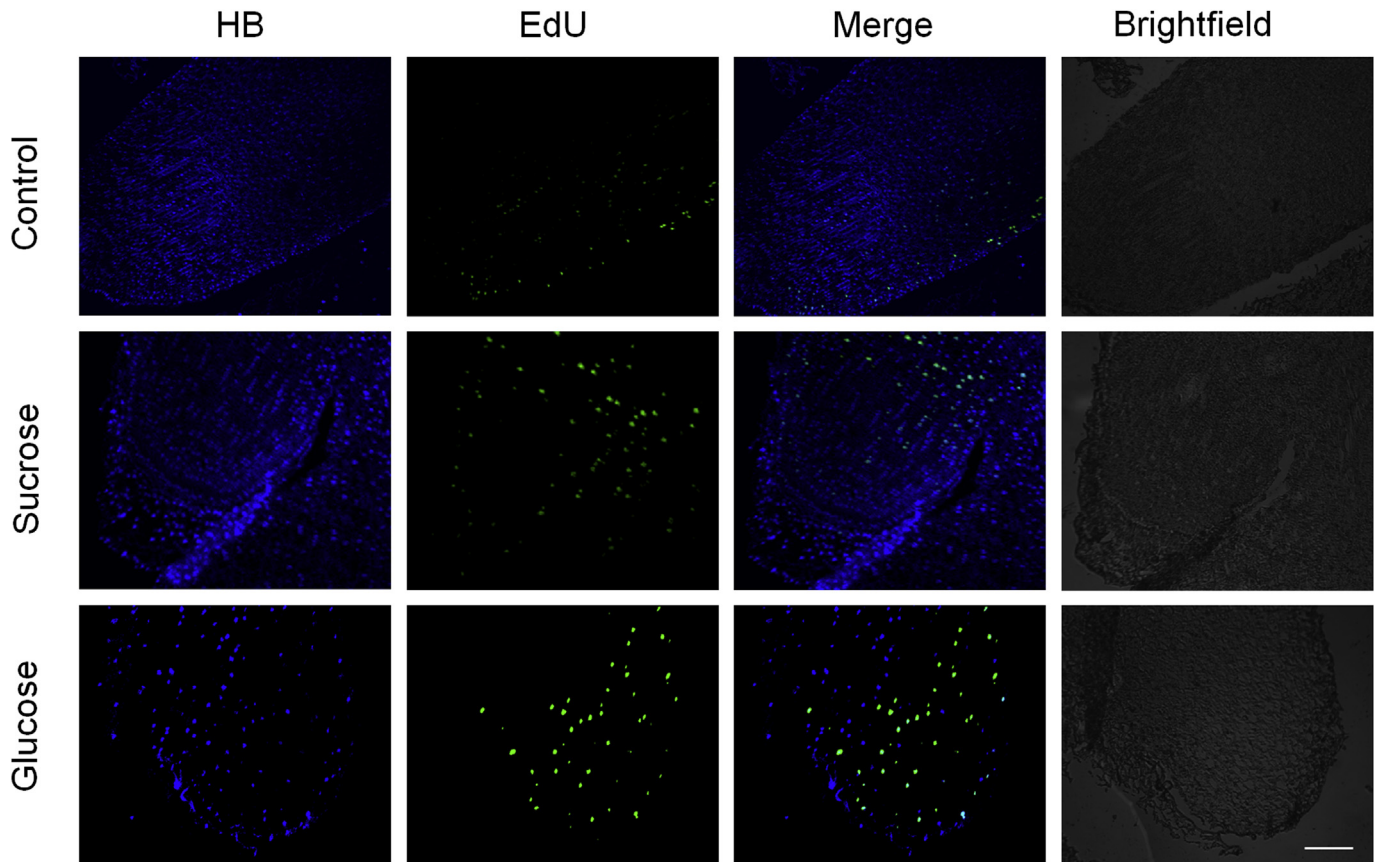


Fig. 3. *de novo* DNA synthesis in RAM from maize embryo axes at 24 h imbibed without carbon source (Control), or with 120 mM Sucrose or Glucose. 10 μM EdU was added to imbibition media 4 h prior the end of experiment. Nuclei were stained with Hoechst 33,342 (HB); *de novo* DNA synthesis was visualized via EdU incorporation (5-ethynyl-2'-deoxyuridine labeled with Alexa Fluor 488). Scale bar = 200 μm for all images. Images are representative of 10 embryo axes per treatment.

canonical cell cycle MYB RE, as expected. All *CycDs* chosen presented RE to sugars and related metabolism (α -amylase promoter, sugar repressive element and sugar starvation REs) at different positions and frequency. Interestingly, *ZmCycD6;1* (Buendía-Monreal et al., 2011), and *ZmKRP3* showed a higher density of those REs (Fig. S3). The maize genome has 3 genes coding for type A-CDKs (*ZmCDKA1;1*, *ZmCDKA1;2* and *ZmCDKA2;1*) and 2 type B-CDKs (*ZmCDKB1;1* and *ZmCDKB2;1*). All promoters from *ZmCDKAs* or *ZmCDKBs* showed a marginal number of sugar related RE on their promoter regions compared to *CycD* promoters. Overall, the in silico scrutiny suggested that sugars could regulate the expression of specific cell cycle genes.

Since our results indicated that sugars altered *de novo* DNA synthesis of cells in RAM of embryo axes, we focused our attention on key cell cycle markers wondering whether their expression could be affected by the presence of sugars. This analysis was limited to a germination window previously defined. The first

division event in maize cells takes place within the first 36 h of imbibition (Baíza et al., 1989), while DNA replication starts between 12 and 15 HAI, thus it could be assumed that before this crucial moment cells are mainly at the G1 to S transition (Baíza et al., 1989; Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003), therefore we analyzed gene expression on embryo axes at 12 and 24 HAI.

Gene expression was analyzed for six *CycDs*, two types A and one type B -CDKs, two E2F transcription factors, and two KRP genes.

Fig. 4 shows those genes whose expression in the presence of any of the sugars was different to Control axes. rRNA (18 S) was used as a loading control. Among the *CycDs* analyzed, *ZmCycD2;2a* and *ZmCycD4;2* showed higher expression at 12 and 24 HAI in Suc; in contrast, Glc reduced the expression of both *ZmCycD2;2a* and *ZmCycD4;2* at 24 HAI compared to Control. The remaining *CycDs* (*ZmCycD3;1a*, *ZmCycD3;1b*, *ZmCycD5;3a* and *ZmCycD6;1*) showed no difference compared to Control (data not shown). Both sugars importantly induced the expression of *ZmCDKA1;1*

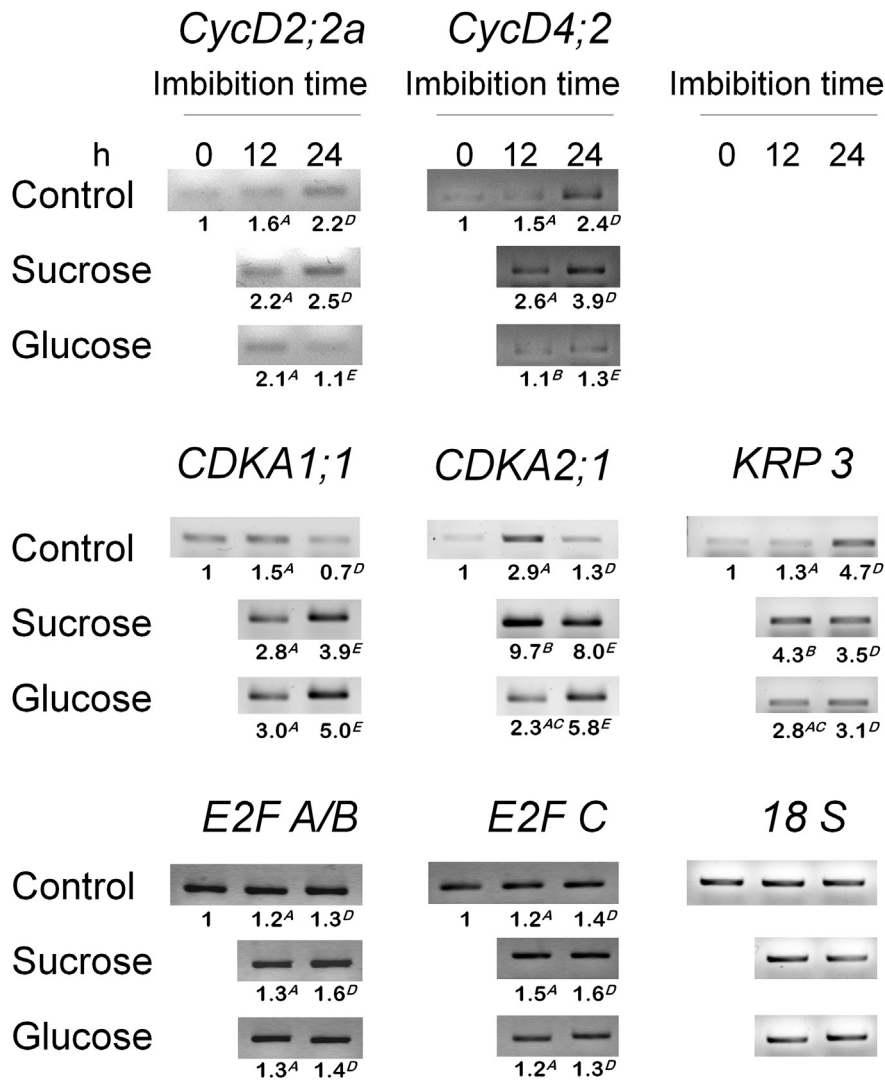


Fig. 4. Gene expression pattern of cell cycle markers in maize embryo axes without carbon source (Control), 120 mM Sucrose or Glucose imbibed for 0, 12 and 24 HAI. Gene expression was analyzed by RT-PCR. Figure shows the most representative images from three independent biological experiments. Each mRNA extraction treatment and time was made with 10 embryo axes. Densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of loading control (*18 S*) and then to the intensity of the dry seed band (0 h), which was considered as 1. Treatments were analyzed by one-way ANOVA and paired test was performed by Tukey. ^{A, B} and ^C indicate statistical difference ($P < 0.01$) among treatments at 12 h; ^{D, E} and ^F letters denote statistical difference ($P < 0.01$) among treatments at 24 HAI.

(GRMZM2G008327_T01) and *ZmCDKA2;1* (GRMZM2G174596_T01) at 12 and 24 HAI. *ZmCDKB1;1* (GRMZM2G495626_T03) expression along germination was low and showed no difference to Control (data not shown). The two E2F genes included in this work, *ZmE2FA/B1;1* and *ZmE2FC* (GRMZM2G041701 and GRMZM2G050590 respectively, our nomenclature, unpublished data) showed no response to sugars. Finally, only one of the two KRP genes studied (named *ZmKRP3* according to rice similarity, GRMZM2254414; Rosas-Bringas, 2015) was stimulated by both sugars at 12 HAI (*ZmKRP5;2* (GRMZM2G154414_T01) showed no response).

3.5. Protein abundance of cell cycle markers

To figure out whether sugar regulation could be extrapolated from gene expression to protein abundance, five maize type D Cycs (CycD2; 2, CycD3; 1, CycD4; 2, CycD5; 3 and CycD6; 1), CDKA and CDKB were analyzed by Western blot. We found differences in protein abundance on five out of the seven proteins analyzed when

comparing the Control treatment versus Suc or Glc treatments (Fig. 5). CycD5; 3 and CDKB showed no different pattern as compared with Control (data not shown).

ZmCycD2 protein pattern was similar in Control and Suc treatments, whereas an increase at 12 HAI in the presence of Glc (Fig. 5 A), similar to *CycD2;2a* gene expression, and a very noticeable peak at 36 HAI were observed. Levels of ZmCycD3 protein increased in the presence of Suc at 6 and 12 HAI. Thereafter protein levels were similar and decreasing in all treatments until 36 HAI, when there appears to be an increase in Control and further reduction in protein levels on both sugars (Fig. 5 B).

At 6 and 12 HAI there was no difference in ZmCycD4 protein levels among treatments. At 18 HAI ZmCycD4 started to decline on Glc treatment to become almost undetectable at 36 HAI in accordance to *CycD4;2* gene expression that was down regulated on Glc at 24 HAI; in contrast, its protein levels on Suc treatment remained similar to Control along germination, with the exception of 24 HAI, point that showed a significant increase (Fig. 5 C). As stated before, *CycD4;2* gene expression showed induction by Suc at 12 and 24 HAI.

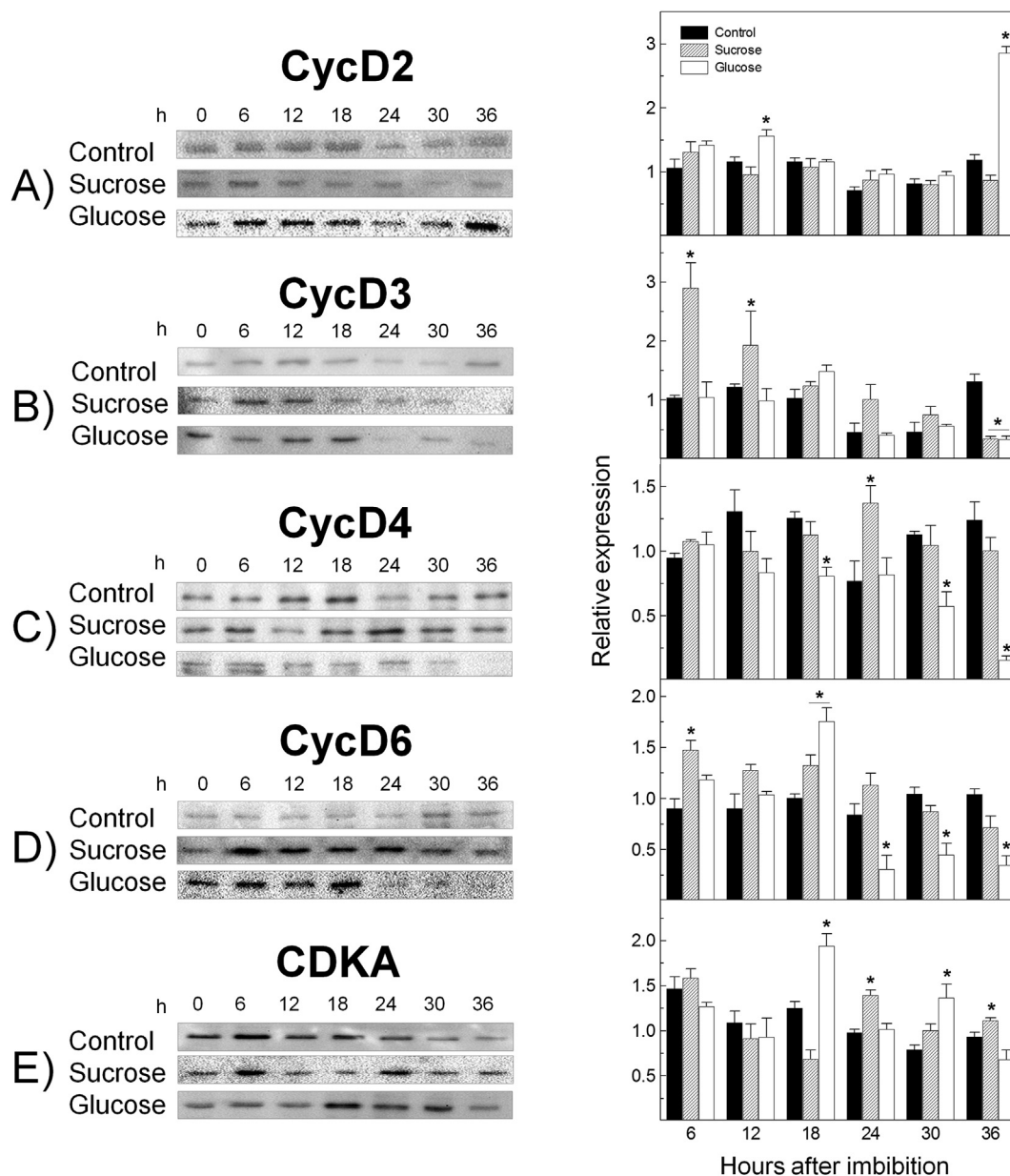


Fig. 5. Influence of carbohydrates on protein abundance during maize embryo axes germination without carbon source (Control), or with 120 mM Sucrose or Glucose. Maize D-type cyclins and CDKA were identified by western blot (left) using specific antibodies against. (A) CycD2; 2, (B) CycD3; 1, (C) CycD4; 2, (D) CycD6; 1, or (E) PSTAIRE motif in protein extracts from 0, 6, 12, 18, 24, 30 and 36 HAI embryo axes. Protein molecular mass detected is as follows: CycD2, 38 kDa; CycD3, 37 kDa; CycD4, 42 kDa; CycD6, 33 kDa; CDKA, 34 kDa. On the right, densitometry analysis was performed relating band intensity of all samples to intensity of the loading control (Appendix S6) and then to the intensity of the dry seed band (0 h), which was considered as a 1. Each bar represents the mean \pm SE from three biologically independent experiments. 10 embryo axes per time and treatment were used to prepare protein extracts. Figure shows a representative image of each replicate. * Statistical difference ($P < 0.05$) of the treatments with regard to control.

In Control, ZmCycD6 levels remained constant and similar to the dry seed level up to 36 HAI. In Suc levels were higher than Control from 6 till 24 HAI to drop as germination advanced. In Glc a similar pattern was observed: an increase from 6 to 18 HAI, and thereafter a drastic drop in protein levels toward the stage of seedling establishment (Fig. 5 D).

Regarding ZmCDKA, we analyzed the protein abundance by means of a commercial antibody against its PSTAIRE motif, a characteristic signature on CDKAs. There was a marked difference in protein abundance comparing Control to sugar treatments: protein levels declined in Control treatment as germination advanced. In Suc treatment a peak was evident at 24 HAI. In contrast, the protein increased importantly in Glc at 18 HAI and

again at 30 HAI to drop by 36 HAI (Fig. 5 F). The expression of the two CDKA genes analyzed showed increased levels at 24 HAI in both sugars when compared to Control.

4. Discussion

Embryo axes require a metabolizing carbon source to sustain cell proliferation and enlargement during germination. In maize, Glc from stored starch is mobilized until the end of germination, at the seedling phase (Srivastava, 2002). Thus, embryo axes rely on nutrients coming from the scutellum (Sánchez-Linares et al., 2012) and the axe itself during germination. Suc is the major metabolizing sugar in maize embryos followed by Glc, representing around 1 and

0.1% of total weight, respectively, in a dry embryo (Sánchez-Linares et al., 2012). During germination Suc could be converted either into Glc and fructose via invertases or into UDP-Glc and fructose via Suc synthase (Koch, 2004). The regulation of Suc metabolism could generate opposite gradient zones of Glc and Suc, similar to the differentiation events that Borisjuk et al. (2003) have reported in legume cotyledons. In maize embryos, the Suc/Glc ratio in different embryo axes zones is unknown.

In this study we focused our attention in these sugars, Suc and Glc, applied in imbibition medium at a concentration (120 mM) that is within the physiological range of a germinating seed (Yu et al., 1996; Borisjuk et al., 2003). Without an external sugar source, axes show just a marginal growth and weight gain, despite having starch (lugol staining, Fig. 1 A, Fig. S1 C) which seems not to be able to use under these conditions. Whereas Suc induced growth and differentiation, embryo axes in Glc showed important fresh weight and length gain with a contrasting morphology as shown by the trend to twist, no root hair formation even after 7 days of imbibition, and formation of callus-type structures (Fig. 1). These results suggest that under these experimental conditions, embryo axes depend on an external metabolizing carbon source to sustain growth. Additionally, a continuous Glc exposure induced axes to lose its morphological control. A similar effect has been observed in Arabidopsis seedlings (Mishra et al., 2009), attributed to a crosstalk between Glc and auxin signaling. The observed effect was beyond the osmotic influence imposed by the carbohydrate present in the imbibition medium, since axes in turanose, a non metabolizable sugar (Chen and Jones, 2004) as well as in 3-O-methylglucose (3-OMG), a transportable Glc analogue, poorly phosphorylated in maize and not perceived as a sugar (Cortés et al., 2003), and in sorbitol, showed a morphology similar to Control axes (Fig. S1).

The contrasting morphology and structure of axes imbibed in Glc or Suc suggests that these two sugars may have a differential impact as signaling molecules on the morphogenetic program, in special Glc. Lugol staining is an indicator of stored polysaccharides. The fact that Control axes presented starch accumulation (around 50% of the surface, Fig. 1 A), but still were unable to grow, may be an indication of the lack of an external signal that Suc or Glc evokes.

The evident differences on the morphology (Fig. 1) and structure of axes (Fig. 2 C, F) in Suc and Glc after 7 days suggested that maize axes have the ability to respond differentially to both sugars after a prolonged time. In that sense, maize is considerably different to Arabidopsis, in which both Suc and Glc elicited a negative effect, delaying seed germination and early seedling development (Arenas-Huertero et al., 2000; Gibson, 2005). This negative effect has been associated to *de novo* abscisic acid synthesis and is lost after approximately 48 h (Gibson, 2000; Price et al., 2003).

The unexpected finding that primary roots were unable to develop root hairs in Glc suggests that this monosaccharide may alter the morphogenetic program in maize. This sugar may modify the differentiation program in this tissue, perhaps by maintaining the proliferation program since callus formation was noticeable.

Supporting the previous idea, more and smaller cells were observed in the presence of Glc in contrast to bigger and fewer cells, per area unit, in Control, with an intermediate figure in Suc. This effect was more accentuated at 48 HAI (Fig. 2). These data would suggest that cells acquire an ordered and more compact arrangement when seeds are imbibed in the presence of sugars in meristem zones, more evident in Glc, perhaps as a result of growth. Thus, it could be anticipated that Glc could either trigger an increase in cell number via faster cell division events or cells are more compact and ordered, or both, that in Suc or Control treatments.

Moreover, at 24 HAI more nuclei were labeled with EdU at RAM from axes imbibed with Glc than with Suc or in Control axes, as seen in Fig. 3 and Fig. S2, implying that more cells were committed

to activate the S phase, and continue to cell division (Kotogány et al., 2010). Accordingly, embryo axes would need an external carbon source to activate the cell cycle.

In our experimental design, both sugars were applied to imbibition medium at the same concentration (120 mM). Expressing this concentration in absolute mass, Suc should provide roughly twice the energy than Glc, therefore the effect seen could not be explained simply by the carbon or energy input that those sugars could provide (Fig. S1). A higher glucose concentration (240 mM) in imbibition medium has a negative effect on embryo axes germination (data not shown). The evidence suggests that Suc and Glc could act differentially to induce the activation of S-phase, beyond their role as solely energy or carbon source, being Glc more prone than Suc to act as a mitogenic signal in maize during germination, based on the fact that more proliferating cells were observed when Glc was present and callus-like structures were formed only in the presence of this sugar (Fig. 1 K). In Arabidopsis, a positive correlation of Glc and Suc regulated genes has been reported in seedlings, but a negative correlation has been established in Arabidopsis adult leaf (Xiong et al., 2013). In this report, Xiong accounted that Glc-targeted genes are enriched in cell cycle and DNA synthesis genes.

As mentioned before, hexoses favor cell division whereas Suc acts as a differentiation and maturation signal (Wobus and Weber, 1999; Borisjuk et al., 2002; 2003; Koch, 2004; Gibson, 2004). For instance, in Arabidopsis cell suspension cultures, *CycD2* and *CycD3* gene expression is stimulated by both sugars in a dose-dependent manner. Suc was also effective in stimulating the expression of both *Cycs* in seedlings (Riou-Khamlichi et al., 2000). Transgenic tobacco plants over-expressing *Nicta;CycD3;4* in the presence of sugars (either Suc or Glc) showed accelerated growth and an increase in cells in the S and G2 phases; also, over-expression of *Nicta;CycD3;4* in seedlings was stimulated by the presence of high concentrations of sugars in the medium; in parallel, the expression of *PCNA*, *CDKB*, *CycA* and *CycB* was also stimulated by sugars in a dose-dependent manner, both in the over-expressing line and in WT seedlings. These results led to the conclusion that sugar availability plays a role during G1 and G1/S transition by controlling the *Nicta;CycD3;4* expression (Kwon and Wang, 2011). In maize embryo axes, *ZmCycD2;2* gene expression was stimulated by Suc during germination, response potentiated by the addition of cytokinins to the imbibition medium (Gutiérrez et al., 2005).

At the protein level little information is available regarding cell cycle regulation by sugars: the *CycD3;1* protein stability in cell suspension cultures from Arabidopsis is dependent on Suc, without this sugar in the medium, the protein is degraded within hours. In contrast, *CycD2;1* does not respond to Suc in the same system. It has been suggested that *CycD3;1* undergo proteasome-dependent degradation, thus explaining its instability, and its degradation is promoted by Suc starvation (Riou-Khamlichi et al., 2000; Planchais et al., 2004; Hirano et al., 2011).

Since Suc and Glc caused a differential morphology on maize embryo axes, an alteration on cell size and density on RAM and a *de novo* DNA synthesis stimulation, we anticipated that those sugars could also have an influence on cell cycle regulation in germination, in accordance to previous reports and together with the information that the promoter regions of maize genes (Fig. S3) presented one or more RE to sugars or sugar related metabolism within the first 2000 bp upstream of the translation starting codon.

In maize four D2-type *Cycs* have been reported (Buendía-Monreal et al., 2011). The expression of *ZmCycD2;2a* was moderately stimulated by Suc at 12 and 24 HAI and down regulated by Glc treatment at 24 HAI (Fig. 4). The anti-*CycD2;2* antibody used probably recognizes more specifically both *ZmCycD2;2a* and *ZmCycD2;2b* than the rest of *CycD2s*, since the 16 kDa N-terminal

region used to develop the polyclonal antibody (Gutiérrez et al., 2005) has low identity with the other two D-CyCs (that region is virtually identical in ZmCycD2; 2a and ZmCycD2; 2b sequences, Fig. S4). The different pattern between gene expression and protein abundance found may account for different transcriptional and translational regulation levels by sugars. ZmCycD2 has been associated to the regulation of G1 and G1/S transition (Gutiérrez et al., 2005) and as an early sugar-responsive CycD in Arabidopsis (Riou-Khamlichi et al., 2000; Masubelele et al., 2005). These results indicate that ZmCycD2; 2a/b protein accumulates during progression of the cell cycle at earlier times, and responds positively to Glc at 12 HAI and then, more importantly, at 36 HAI (Fig. 5 A). Thus, Glc could have a relevant role in the regulation of cell cycle through ZmCycD2 accumulation during early germination and in post-germination stages.

Though expression of *ZmCycD3;1a* and *b* genes (79% identical, Buendía-Monreal et al., 2011; Garza-Aguilar et al., 2016) was unaltered in the presence of sugars (not shown), at the protein level Suc induced an important early accumulation and in general higher levels than in Control axes (with the exception of 36 HAI), whereas in Glc there was little difference compared with Control axes. The antibody used very likely identifies both 3; 1a and 3; 1b proteins (Garza-Aguilar et al., 2016). Therefore, one or both CycD3; 1 proteins may be under Suc control at early hours of germination, perhaps promoting S-phase entry. The Arabidopsis homologue, AtCycD3; 1, has been described as an unstable protein after Suc starvation (Riou-Khamlichi et al., 2000; Planchais et al., 2004; Hirano et al., 2011). These results suggest that this protein gained stability mainly in Suc during maize germination (first 24 h) and thereafter is regulated negatively. The constant presence of AtCycD3; 1 was related to a continuing cell cycling (Planchais et al., 2004) and it has been suggested that this protein participates in the late G1 regulation (Riou-Khamlichi et al., 2000). If this were also true for ZmCycD3, then the fact that this protein is present at earlier times and for longer periods in axes under Suc treatment than in Control suggests that its stability is promoted by Suc and as a consequence, more cells than in Control are entering the cycle, in agreement to an increase in the *de novo* DNA synthesis and with the axe morphology observed in the presence of this sugar. Additionally, recent reports indicate AtCycD3 involvement in vascular development, emphasizing its role in organ growth mechanisms (Collins et al., 2015) and root secondary thickening in response to cytokinins (Randall et al., 2015).

Three *CycD4* genes in maize have been found (Buendía-Monreal et al., 2011). In the present work only *ZmCycD4;2* (reported before as *ZmCycD4;1*; Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006; Lara-Núñez et al., 2008) was analyzed as a representative of this group. *ZmCycD4;2* gene expression presented a contrasting behavior among treatments: in Suc an important induction at 12 and 24 HAI was evident, whereas in Glc a down regulation at 24 HAI took place. This trend was reflected at the protein abundance level during late germination: in Suc, by an important increase at 24 HAI; in Glc the protein tended to decline along germination.

These results suggest that ZmCycD4; 2 may be regulated differentially after Suc or Glc treatments at both transcriptional and translational levels. The abundance of protein detected by Western blot may be the sum of the three protein members of the ZmCycD4 family, due to high amino acid sequence identity (Fig. S5) since the antibody was raised against the full ZmCycD4; 2 protein sequence. AtCycD4; 1 has been associated with lateral root density and its expression is rate-limiting for Suc-dependent lateral root formation. This cell division regulator is expressed specifically in pericycle cells at root meristems, able to respond to Suc levels (Nieuwland et al., 2009). Since there is abundant root hair formation on Suc-treated maize primary roots, it is intriguing if

ZmCycD4; 2 would be responsible for this morphology. In contrast, in Glc the protein is underrepresented in parallel to a null root hair formation.

Only one *ZmCycD6* gene has been found in the maize genome (Buendía-Monreal et al., 2011). Though no *ZmCycD6;1* gene expression differences could be detected in Control and treatments (data not shown), at the protein level there were differences: in Suc there was a relevant protein accumulation above Control levels from 6 till 24 HAI. In comparison, in Glc accumulation was observed at 6 and 12 HAI and an important peak at 18 HAI; thereafter the protein levels fell to a level below those seen in Control and Suc treatments. These results suggest that ZmCycD6; 1 could be regulated at the translational level by the sugar type: Glc promoting an early accumulation followed by a decline whereas Suc favors its accumulation.

Finally, there are three genes coding for different type-A CDKs in the maize genome, with high identity among them (Godínez-Palma et al., 2013). The expression of two *ZmCDKAs* was evaluated in this work (*ZmCDKA1;1* and *ZmCDKA2;1*, 97% identity). These two CDKAs have dissimilar RE pattern (Fig. S3), which suggests that their expression could be regulated differentially. This was the case in Control axes, since *ZmCDKA1;1* expression was reduced as germination advanced whereas *ZmCDKA2;1* expression, although at low levels, increased at 12 HAI. However, soluble sugars were able to induce the expression of both *ZmCDKA1;1* and *ZmCDKA2;1* similarly, emphasizing the control of sugars on some cell cycle genes. Since the three maize ZmCDKA proteins are so similar, it was impossible to distinguish among them by Western blot, using the anti-PSTAIR antibody, and the abundance observed probably correspond to the sum of the three CDKAs at every time. There is a peak of a 34 kDa band in Suc at 24 HAI, and two peaks in Glc at 18 and 30 HAI, probably indicating the influence of these sugars in the G2-M transition that takes place at around those hours (Baíza et al., 1989). It would be interesting to know if sugars promote associations of CDKAs with specific D-type CyCs, and also their phosphorylation status (inhibitory or activating). No CDKB1; 1 gene expression or protein abundance was altered by sugars.

5. Conclusion

In conclusion, the presence of Suc and Glc alters the expression of key cell cycle markers: both sugars induced gene expression of *ZmCDKA1;1*, *ZmCDKA2;1* and *KRP3*, whereas Suc induced the expression of two *CycDs* (*ZmCycD2;2a* and *ZmCycD4;2*). In contrast, in the presence of Glc, the expression of two *CycD* coding genes (*ZmCycD2;2a*, *ZmCycD4;2*) was reduced, implying that the influence of Glc on cell proliferation observed might go through a different set of D-CyCs. The transcription of *E2F A/B*, *E2F C* and *KRP5;2* was unaltered by sugars, thus the control that those proteins may exert on the cell cycle must be at the protein or at a posttranslational level, if any. Antibodies against these proteins will be raised to help resolve this point.

Surprisingly, at the translational level, only CDKA was stimulated by both sugars, whereas Suc stimulated CycD3 and CycD6, particularly at early germination times, and Glc reduced the levels of all CycDs but CycD2. These results support the idea that even though there are many CycDs genes in the maize genome, they may have non-redundant functions (Buendía-Monreal et al., 2011). Though Glc acted as an important mitogenic signal during germination and beyond (promoting *de novo* DNA synthesis and altering the morphogenetic program by inducing callus-like structure formation), it is intriguing why its effect was not reflected either at the gene expression or protein abundance levels of key cell cycle markers such as D-type CyCs (D3, D4 or D6 cyclins), as would be expected, with the sole exception of D2-type Cyc protein. Perhaps it

is not a matter of protein quantity but of the associated kinase activity developed, and its cell localization, a topic to study in the future.

Acknowledgements

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CB220661 and 252001); Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT IA201814 and IN215316); Programa de Apoyo a la Investigación y al posgrado, Facultad de Química, UNAM (PAIP 5000-9130 and 5000-9124).

BBGA received a 127 program scholarship by Facultad de Química, UNAM. JFS received a scholarship from PAPIIT IN215316-UNAM. SMGA, CEB and VASC had a scholarship from CONACyT. We thank Dr. Elpidio García Ramírez, M.F.P Ana Isabel Bieler Antolín (Laboratorio de Microcine, Fac. de Ciencias, UNAM), Dr. Karina Jiménez Durán (confocal microscopy) and MVZ Atonatiuh E. Gómez-Martínez for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.018>.

Author contributions

Aurora Lara-Núñez:	Conception and design of the work, drafting the article, data collection, data analysis and interpretation, and critical revision of the article.
Brendy B. García-Ayala:	Data collection, data analysis and interpretation.
Sara M. Garza-Aguilar:	Data collection, data analysis and interpretation, and critical revision of the manuscript.
Jesús Flores-Sánchez:	Data collection, data analysis and interpretation.
Carlos E. Bravo-Alberto:	Data analysis and interpretation.
Victor A. Sánchez-Camargo:	Data analysis and interpretation, and critical revision of the article.
Sonia Vázquez-Santana:	Data analysis and interpretation.
Jorge M. Vázquez-Ramos:	Conception, data analysis and interpretation, critical revision of the article and final approval of the version to be published.

References

- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., León, P., 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev.* 14, 2085–2096.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M., Sánchez de Jiménez, E., 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135, 416–421.
- Baluška, F., Kubica, S., Hauskrecht, M., 1990. Postmitotic “isodiametric” cell growth in the maize root apex. *Planta* 181, 69–274.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Wobus, U., Weber, H., 2003. Differentiation of legume cotyledon as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J. Exp. Bot.* 54, 503–512.
- Borisjuk, L., Walenta, S., Rolletschek, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U., Weber, H., 2002. Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant J.* 29, 521–530.
- Buendía-Monreal, M., Rentería-Canett, I., Guerrero-Andrade, O., Bravo-Alberto, C.E., Martínez-Castilla, L.P., García, E., Vázquez-Ramos, J.M., 2011. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol. Plant* 143, 297–308.
- Chen, J.G., Jones, A.M., 2004. AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol.* 389, 338–350.
- Collins, C., Maruthi, N.M., Jahn, C.E., 2015. CYCD3 D-type cyclins regulate cambial cell proliferation and secondary growth in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 66, 4595–4606.
- Cortés, S., Gromova, M., Evrard, A., Roby, C., Heyraud, A., Rolin, D.B., Raymond, P., Brouquisse, R.M., 2003. In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol.* 131, 824–837.
- Dudits, D., Cserhádi, M., Miskolczi, P., Horváth, G.V., 2007. The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation. In: Inzé, D. (Ed.), *Cell Cycle Control and Plant Development*. Annual Plant Reviews, vol. 32. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 1–30.
- Eveland, A.L., Jackson, D.P., 2011. Sugars, signaling and development. *J. Exp. Bot.* 63 (9), 3367–3377.
- Garza-Aguilar, S.M., Lara-Núñez, A., García-Ramírez, E., Vázquez-Ramos, J.M., 2016. Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physiol. Plant*. <http://dx.doi.org/10.1111/ppl.12537>.
- Gibson, S.I., 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* 124, 1532–1539.
- Gibson, S.I., 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J. Exp. Bot.* 55, 253–264.
- Gibson, S.I., 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 93–102.
- Godínez-Palma, S.K., García, E., Sánchez, M.P., Rosas, F., Vázquez-Ramos, J.M., 2013. Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J. Exp. Bot.* 64, 5661–5671.
- Godínez-Palma, S.K., Rosas-Bringas, F.R., Rosas-Bringas, O.G., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J., Vázquez-Ramos, J.M., 2017. Two Members of ICK/KRP Family Proteins from *Zea mays* Are Phosphorylated by, Associate to and Inhibit Differentially Cyc D-CDK Complexes (submitted paper).
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., Vázquez-Ramos, J.M., 2005. Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol.* 46, 166–173.
- Hartig, K., 2005. Zellteilungsregulation meristematischer Wurzel-zellen (Tabak BY-2) durch Phytohormone und Zucker. DPhil Thesis. University of Bayreuth.
- Hartig, K., Beck, E., 2006. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol.* 8, 389–396.
- Hirano, H., Shinmyo, A., Sekine, M., 2011. *Arabidopsis* G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 687–691.
- Inzé, D., De Veylder, L., 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40, 77–105.
- Jiang, K., Zhu, T., Diao, Z., Huang, H., 2010. The maize root stem cell niche: a partnership between two sister cell populations. *Planta* 231, 411–424.
- Koch, K., 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 235–246.
- Kotogány, E., Dudits, D., Horváth, G.V., Ayaydin, F., 2010. A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. *Plant Methods* 6, 5.
- Kwon, H.K., Wang, M.H., 2011. The D-type cyclin gene (*Nicta*;CycD3;4) controls cell cycle progression in response to sugar availability in tobacco. *J. Plant Physiol.* 168, 133–139.
- Lara-Núñez, A., de Jesús, N., Vázquez-Ramos, J.M., 2008. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol. Plant* 132, 79–88.
- Masubelele, N.H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., Nieuwland, J., Scofield, S., Murray, J.A.H., 2005. D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *PNAS* 102, 15694–15699.
- Mishra, B.S., Singh, M., Aggrawal, P., Laxmi, A., 2009. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS One* 4 (2), e4502. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004502>.
- Nieuwland, J., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., Sanz, L., Murray, J.A.H., 2009. The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in *Arabidopsis* by affecting the basal meristem region. *PNAS* 106, 22528–22533.
- Nieuwland, J., Menges, M., Murray, J.A.H., 2007. The plant cyclins. In: Inzé, D. (Ed.), *Cell Cycle Control and Plant Development*. Annual Plant Reviews. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 31–61.
- Planchais, S., Samland, A.K., Murray, J.A.H., 2004. Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J.* 38, 616–625.
- Price, J., Li, T.C., Kang, S.G., Na, J.K., Jang, J.C., 2003. Mechanism of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant* 132, 1424–1438.
- Quiroz-Figueroa, F., 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. *Physiol. Plant* 128, 556–568.
- Randall, R.S., Miyashima, S., Blomster, T., Zhang, J., Elo, A., Kalberg, A., Immanen, J., Nieminen, K., Lee, J.Y., Kakimoto, T., Blajec, K., Melnyk, C.W., Alcasabas, A., Forzani, C., Matsumoto-Kitano, M., Mähönen, A.P., Bhalerao, R., Dewitte, W., Helariutta, Y., Murray, J.A.H., 2015. AINTEGUMENTA and the D-type cyclin CYCD3;1 regulate root secondary growth and respond to cytokinins. *Biol. Open* 4, 1229–1236. <http://dx.doi.org/10.1242/bio.013128>.
- Riou-Khamlich, C., Menges, M., Healy, J.M., Murray, J.A., 2000. Sugar control of the

- plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4513–4521.
- Rosas-Bringas, F.R., 2015. Caracterización génica de la familia ICK/KRP de maíz. Master thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ruzin, S.E., 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York, pp. 154–155.
- Sablowski, R., Dornelas, M.C., 2013. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J. Exp. Bot.* 65, 2703–2714.
- Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruiz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada-Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sánchez, R., Bernal-Lugo, I., Sánchez-Nieto, S., 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *J. Exp. Bot.* 63, 4513–4526.
- Srivastava, L.M., 2002. Seed germination, mobilization of food reserves, and seed dormancy. In: Srivastava, L.M. (Ed.), *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. Academic Press, London, UK, pp. 447–471.
- Stoscheck, C.M., 1990. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 182, 50–68.
- Vázquez-Ramos, J.M., Sánchez, M.P., 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed. Sci. Res.* 13, 113–130.
- Wang, L., Ruan, Y.L., 2013. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signalin. *Front. Plant Sci.* 4, 163.
- Wobus, U., Weber, H., 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380, 937–944.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., Sheen, J., 2013. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496, 181–186.
- Xiong, Y., Sheen, J., 2014. The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol.* 164, 499–512.
- Yu, S.M., Lee, Y.C., Fang, S.C., Chan, M.T., Hwa, S.F., Liu, L.F., 1996. Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of α -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant Mol. Biol.* 30, 1277–1289.
- Zamora-Zaragoza, J., 2015. Caracterización de la ciclina CycD6;1 de maíz y sus interacciones con otros reguladores del ciclo celular. Master thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

AVANCES RECIENTES EN EL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR EN PLANTAS*

Sara Margarita Garza Aguilar¹, Víctor Allan Sánchez Camargo¹,
Silvia Karina Godínez Palma¹ y Aurora Lara Núñez²

¹Departamento de Bioquímica ²Departamento de Bioquímica de plantas.
Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito de la Investigación. Edificio E, Facultad de
Química. Ciudad Universitaria. Col. Copilco el Alto. C.P. 04510. México D.F. México. Correo E: auroraln@unam.mx

RESUMEN

El ciclo celular, cuyo fin es la generación de células genéticamente idénticas, comprende 4 fases: G1, S, G2 y M. Durante este proceso se presentan tres puntos principales de control que se llevan a cabo en las transiciones G1/S, G2/M y en la mitosis (metafase/anafase). En estos puntos cruciales participan un conjunto de proteínas que controlan la progresión correcta del ciclo celular. Entre ellas, se encuentran varios tipos de reguladores, por ejemplo en plantas las ciclinas tipo D (CYCD) que son las que perciben las condiciones externas e internas de la célula y son muy sensibles a fitohormonas y nutrientes. También existen las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus respectivos inhibidores como, las proteínas KRPs. Otro tipo de proteínas son los factores transcripcionales E2F, la familia de las RBRs y la proteína PCNA, entre otras. Las plantas se distinguen por codificar en su genoma un mayor número de integrantes de cada una de estas familias de proteínas, en comparación con los mamíferos.

ABSTRACT

The cell cycle consists of four phases: G1, S, G2 and M, and has the purpose of generating genetically identical daughter cells. There are three major control points during the cell cycle, between G1/S, G2/M and in mitosis (metaphase/anaphase). On these checkpoints, protein families participate controlling the correct cell cycle progression. These include cyclins (CYC) of various types, being CYCDs the sensors of environmental and internal conditions of the cell (i.e., phytohormones and nutrient status), cyclin-dependent kinases (CDKs) and their inhibitors like KRP proteins, the E2F transcription factor group, the RBR family of proteins and PCNA, among others. Plant genomes encode larger cell cycle protein families than those found in mammals.

INTRODUCCIÓN

El ciclo celular es una serie de eventos moleculares secuenciales y unidireccionales cuya función es la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) para generar dos células hijas, cada una con una copia idéntica de material genético. Los pasos secuenciales que comprende el ciclo celular son cuatro: una fase en la que la célula se asegura de que existen las condiciones idóneas para poder dividirse, denominada Gap1 (G1); una fase de repli-

cación de ADN nuclear, Fase S (S); otra fase donde se verifica que la duplicación de ADN se realizó de manera completa y sin errores, denominada Gap2 (G2); y finalmente, una fase de segregación de las cromátidas (Fase M o mitosis) (Fig. 1). La mitosis, a su vez, se lleva a cabo en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase/citocinesis. Durante la profase ocurre la ruptura de la membrana nuclear y la condensación de cromatina para formar los cromosomas (cromátidas hermanas unidas por el centrómero). En la metafase, los cromosomas se

PALABRAS CLAVE:

Ciclo celular,
Ciclinas, CDK,
E2F, RBR,
Fitohormonas.

KEY WORDS:

Cell cycle,
Cyclins, CDK,
E2F, RBR,
Phytohormones.

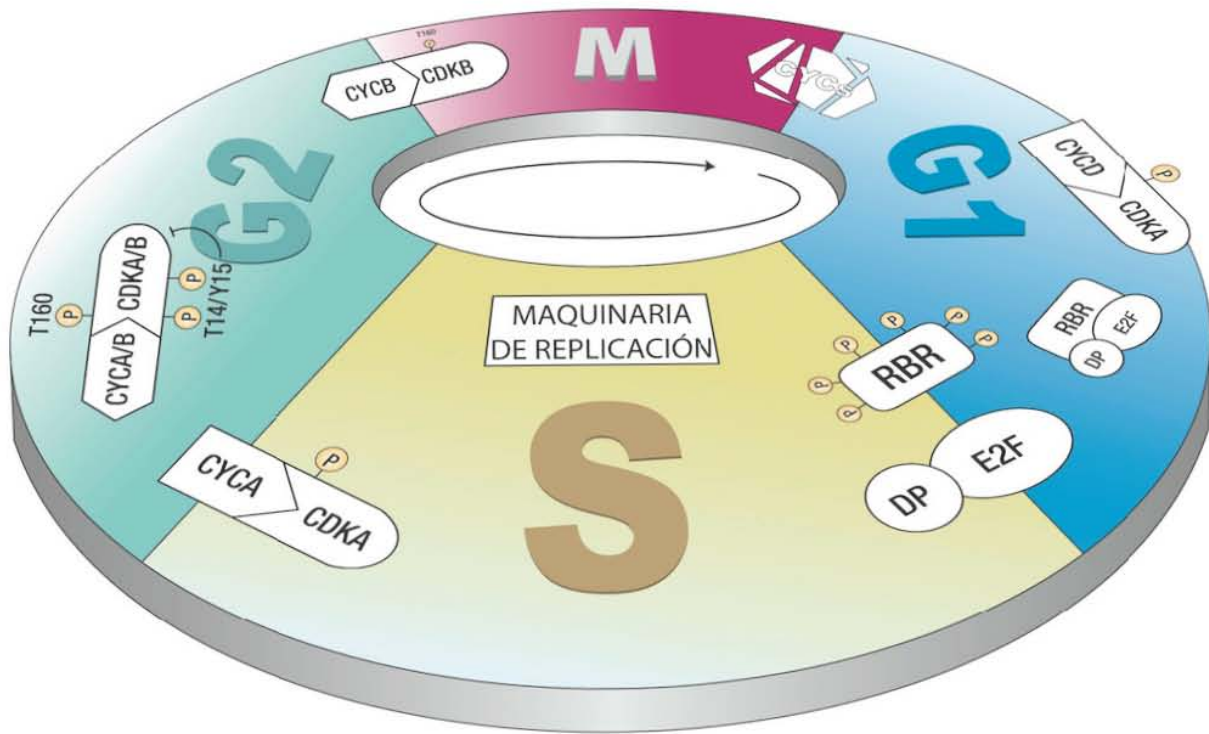


Figura 1. Esquema general de las fases del ciclo celular y principales componentes que participan en cada una de ellas. Los complejos CYCD/CDKA fosforilan a la proteína RBR en la transición G1/S, liberando al factor transcripcional E2F/DP, lo que a su vez permite la transcripción de un conjunto de actores encargados de conducir la progresión del ciclo celular. En S así como en G2 se establecen diversos complejos de CYCA/B con CDKA/B, mientras que en M sólo se han observado complejos CYCB/CDKB. Para que el ciclo funcione correctamente las ciclinas son degradadas y sintetizadas de novo al iniciar un nuevo ciclo.

localizan en el plano ecuatorial de la célula mediante el huso mitótico. En la anafase las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula. Finalmente, en la telofase, las dos nuevas envolturas nucleares rodean a cada juego de los cromosomas separados, éstos se descondensan y expanden en el nuevo núcleo generando dos células hijas mediante un proceso denominado citocinesis.

A lo largo del ciclo celular existen diversos puntos de control, los principales se presentan en las transiciones G1/S, G2/M y en la metafase/anafase de la mitosis. Durante la fase G1 la célula percibe las condiciones externas e internas (fitohormonas y nutrientes) activando mecanismos de señalización. Éstos desencadenan respuestas bioquímicas que marcan el inicio del ciclo celular. En la fase G2, la célula se asegura de que la replicación de ADN ha sido correcta, activándose la reparación de ser necesario, para poder continuar con la mitosis. Durante la mitosis, en la transición de metafase a anafase, la célula verifica que todos los cromosomas estén unidos correctamente a los microtúbulos del huso mitótico y estén alineados en el plano ecuatorial de la célula, para que posteriormente se lleve a

cabo la separación de las cromátidas hermanas y la formación de dos células genéticamente idénticas (1).

Entre eucariontes se conservan, de forma general, los mismos mecanismos moleculares de regulación del ciclo celular, incluyendo a las plantas, esto sugiere que su origen sucedió desde antes de la separación de estos taxones. Sin embargo, los genomas vegetales codifican para un mayor número de genes, lo que origina una mayor cantidad de proteínas del ciclo celular. Esto genera una alta complejidad, tanto en asociaciones como en mecanismos de regulación. Algunos de estos genes y proteínas son únicos en plantas, reflejando así la alta plasticidad que las especies vegetales requieren para enfrentarse a un estilo de vida sésil (Tabla 1).

Desde un punto de vista holístico, la maquinaria básica encargada del progreso y regulación del ciclo celular está conformada por proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que, junto con diferentes ciclinas (CYC), forman complejos heterodiméricos CYC/CDK encargados de fosforilar una gran variedad de proteínas blanco en los puntos de control G1/S, G2/M y en mitosis (1).

TABLA I

Número de genes relacionados con el ciclo celular que pertenecen a cada familia génica en diferentes organismos.

Genes	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (levadura)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura)	Mamíferos	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	<i>Zea mays</i> (Maíz)	Descripción
<i>Cdc2/CdkA</i>	1 (<i>cdc2^Φ</i>)	1 (<i>cdc28^Φ</i>)	2 (<i>cdk1</i> y <i>cdk2</i>)	1	3	3	Cinasas de serina y treonina caracterizadas por la secuencia PSTAIRE en el motivo de unión a ciclina.
<i>CdkB</i>	NH	NH	NH	4	2	3	Cinasas de serina y treonina, únicas de plantas, caracterizadas por la secuencia PPTALRE/PPTTLRE.
<i>CycA</i>	NH	2	2	10	7	11	Ciclinas que forman complejos con CDKs durante fase S y en la transición G2/M.
<i>CycB</i>	1	4	3	11	7	10	Ciclinas que forman complejos con CDKs durante las transiciones G2/M e intramitóticas.
<i>CycD</i>	2	3	3	10	14	17	Ciclinas de G1 cuya transcripción es activada por señales extracelulares.
<i>RB/RBR</i>	NH	NH	3	1	2	4	Proteína que actúa como represor transcripcional de E2F durante la transición G1/S.
<i>E2F</i>	NH	NH	8	3	5	1*	Factores de transcripción que activan genes de ciclo celular durante la transición G1/S, principalmente.
<i>DP</i>	NH	NH	3	2	3	1*	Socio de dimerización de E2F.
<i>ICK/KRP</i>	1	3	7 (4 <i>INK^Φ</i> y 3 <i>ICK^Φ</i>)	7	6	2*	Familia de proteínas inhibidoras de complejos CYC/CDK.
<i>PCNA</i>	1	1	1	2	1	2	Proteína de unión a ADN que se asocia a complejos CYCD/CDK.

*Resultados no publicados sugieren la presencia de más genes en estas familias; Φ, Nombre del homólogo en la especie; NH, no existen homólogos.

CDKs Y CICLINAS

El avance del ciclo celular es orquestado por la actividad de los complejos CYC/CDKs, los cuales pueden ser regulados a diferentes niveles como: la expresión de sus genes, síntesis y degradación proteica, modificaciones post-traduccionales, localización de los complejos, así como la interacción con otras proteínas (Fig 2).

Las CDKs son proteínas cinasas de serina y treonina que en plantas, se clasifican en 8 grupos de acuerdo al motivo de unión a la ciclina: de CDKA a CDKG y CDKL. El papel de las CDKs tipo A y B es el más estudiado en el ciclo celular de las especies vegetales. El grupo de CDKAs se caracteriza por presentar un motivo canónico de unión a ciclina, altamente conservado de 7 aminoácidos; este motivo se conoce como PSTAIRE, y estructuralmente, es homólogo a las proteínas cinasas *cdk/p34cdc2* de mamíferos y levaduras, respectivamente (2). En estudios del ciclo celular de distintas especies vegetales, los niveles de CDKAs tanto de transcrito y proteína son constantes en todas las fases del ciclo celular, sugiriendo una función dual de la proteína: tanto en la progresión de la fase S como en el paso a la mitosis, lo que indica que las CDKAs tienen un papel preponderante en la proliferación celular durante el desarrollo de la planta (2).

Las CDKs tipo B son el segundo grupo de CDKs con más representantes en el reino vegetal, carecen de homólogos en levaduras y mamíferos, y poseen un motivo de unión a ciclina divergente, PPTALRE para CDKB1 o PPTTLRE para CDKB2. Durante el ciclo celular de distintas especies vegetales, los transcritos de *CDKB* muestran un pico de expresión en G2/M. Estas proteínas cinasas son capaces de unirse a las ciclinas tipo A o B (2). No obstante, también se ha documentado la interacción de ciclina tipo D con CDKB. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, la CDKB interacciona con la Ciclina D4;1 y en *Nicotiana tabacum*, la CDKB1;1 interacciona con Ciclina D3;1 (3).

En general, el estado de fosforilación de las CDKs es fundamental para la funcionalidad del complejo. Su activación está determinada por la fosforilación de un residuo de treonina conservado en la zona central de la proteína (canónicamente treonina 160), mientras que la inhibición se da por la fosforilación de un residuo de treonina o de un residuo de tirosina en la región amino terminal (canónicamente la treonina 14 y la tirosina 15).

La reciente secuenciación de genomas de algunas especies vegetales, como los de *Arabidopsis*, arroz y maíz, entre otros, ha facilitado el estudio de los genes involucrados en el ciclo celular. Se ha encontrado un mayor número de genes relaciona-

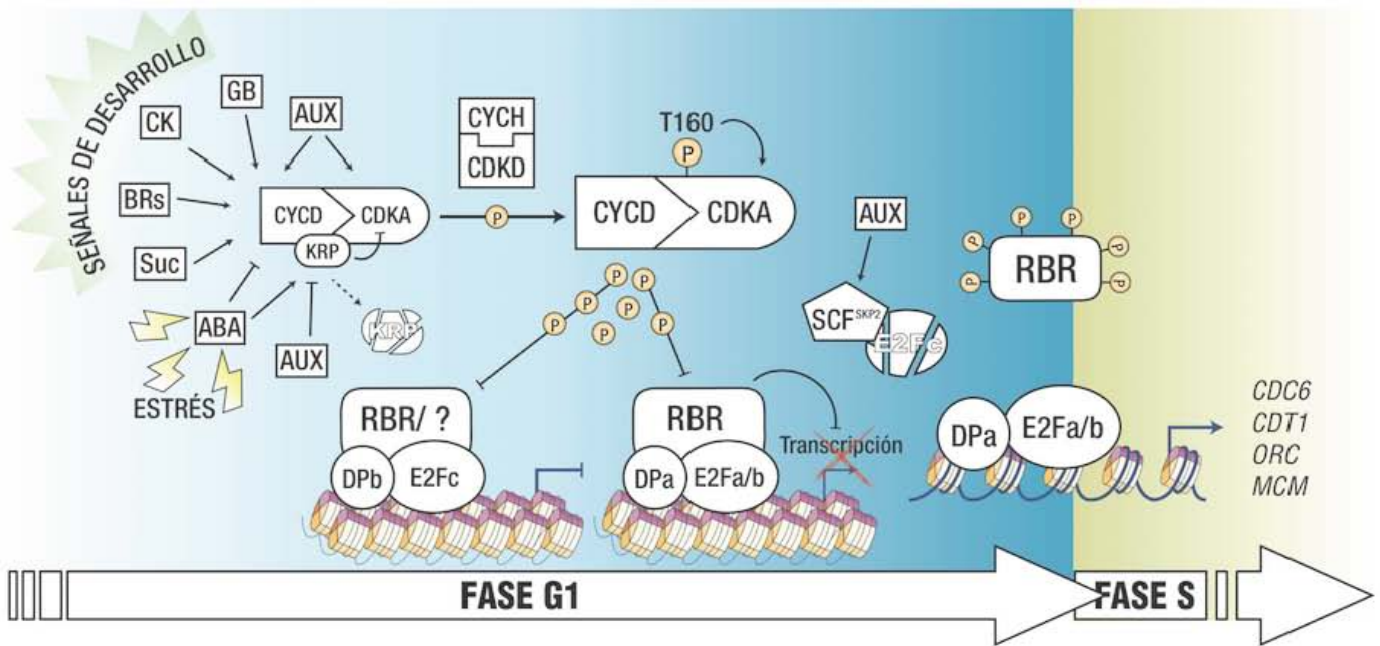


Figura 2. Regulación de la transición G1/S del ciclo celular en plantas. Los transcritos y proteínas de ciclinas y CDKs se acumulan durante G1 en respuesta a fitohormonas y nutrientes así como a la velocidad de crecimiento o el tamaño celular. Conforme avanza esta fase se forman los complejos CYCD/CDKA y son activados. En G1 tardía, RBR, la cual se encuentra reprimiendo al factor transcripcional E2F, es hiperfosforilada por CYCD/CDKA, ocasionando la pérdida de afinidad por el factor transcripcional E2F, se disocia de este, y permite la activación de genes necesarios para el establecimiento y avance de la fase S.

dos a este proceso en especies vegetales que en levaduras y mamíferos (Tabla 1), lo que sugiere una mayor complejidad en la regulación del ciclo celular. Así, en plantas se han identificado más de 100 genes de ciclinas diferentes. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se encontraron 50 posibles ciclinas de diferentes tipos, que se pueden agrupar en 12 clases, de las cuales 6 no cuentan con representantes homólogos en otros eucariontes. En general, se han identificado en plantas cinco clases de ciclinas de acuerdo con su similitud con las de mamíferos: A, B, C, H y L, y siete clases exclusivas de plantas: CYL, SDS, D, Q, T, P y F. Las más estudiadas en relación al ciclo celular son las tipo A, B y D.

Si se elimina la expresión de una sola ciclina no ocasiona cambios en el fenotipo. Es necesaria la disminución en la expresión de varias ciclinas del mismo tipo para que un cambio sea evidente, lo que apoya que algunas puedan presentar funciones redundantes.

Las ciclinas son proteínas típicamente inestables, con un alto número de recambio y vida media corta, ya que algunas poseen una caja de destrucción, y un motivo denominado PEST, que las marca para ser degradadas por el proteasoma 26S (complejo multiproteico nuclear y citoplásmico cuya función es la degradación específica de proteínas marcadas)

y por lo tanto les confiere inestabilidad.

El avance del ciclo celular continuo e irreversible, está regido por la síntesis y destrucción regulada de las ciclinas (2). Dado que las ciclinas son las unidades reguladoras de las CDKs, son las que determinan la especificidad por el blanco del complejo, fluctuando a lo largo del ciclo celular.

Las ciclinas tipo A y B comparten un alto porcentaje de identidad, incluyendo una secuencia central característica, llamada caja de ciclina, requerida para la unión con CDKs y una secuencia denominada caja de destrucción, similar a la reportada en mamíferos (Fig. 3). Se ha propuesto que la función de estas proteínas es predominante durante las fases S y G2/M. Su degradación durante la mitosis en mamíferos es esencial para un final exitoso del ciclo celular (2).

Las ciclinas tipo A pueden interaccionar con CDKA y CDKB, actuando en la fase S y en la transición G2/M; las ciclinas tipo B controlan la progresión del ciclo celular durante la mitosis, y se asocian con CDKBs (Tabla 1) (4).

Las ciclinas tipo D de plantas, así como las de mamíferos y levaduras son fundamentales en el inicio o re-inicio del ciclo celular por su respuesta a señales externas tales como fitohormonas, tipo y concentración de azúcares, y a señales internas

como puede ser la velocidad de crecimiento o el tamaño de la célula (Fig. 2). Estructuralmente las ciclinas D contienen una región conservada de 250 aminoácidos denominada caja de ciclina que consiste de dos dominios: el N-terminal que comprende una región de unos 100 residuos de aminoácidos conservados (caja de ciclina), y el C-terminal, menos conservado y a veces ausente en algunas ciclinas. Además, casi todas presentan el motivo conservado LxCxE (donde x representa cualquier residuo de aminoácido) cercano al extremo amino terminal. Este motivo es importante para la interacción de las ciclinas con la proteína RBR (en plantas).

En plantas, las ciclinas tipo D median el primer punto de control del ciclo celular en la transición G1/S al regular la fosforilación de la proteína RBR en complejos con CDKAs. Sin embargo, poco se sabe de los complejos CYCD/CDK y su función en el ciclo celular (1).

INTERACTOMAS

Para el estudio de las interacciones proteicas que se presentan en distintos momentos del ciclo celular, se han empleado principalmente tres estrategias: sistemas de doble híbrido, complementación bimolecular de la fluorescencia y purificación por afinidad en tándem.

La información generada con estas metodologías

ha permitido que en las últimas dos décadas se haya dilucidado la composición de los complejos CYC/CDKs, así como algunos aspectos de su regulación. Evidencias experimentales indican que estos complejos son parte clave en el control del ciclo celular, al menos en Arabidopsis, especie vegetal en la que más se ha estudiado este proceso. Entre los mecanismos de control predomina la asociación con inhibidores de CDKs, cinasas de CDKs y fosfatasa, la proteólisis dependiente de proteasoma 26S y el tráfico intracelular (5).

Por ejemplo, se demostró la interacción de CDKA con ciclinas tipo D durante la transición G1/S, y la interacción de CDKA con ciclinas tipo A3 en la progresión de la fase S. Así mismo, ha sido posible establecer interacciones del complejo CYCD/CDKA con inhibidores de CDK (KRPs), y la interacción de este complejo con diferentes miembros de la ruta E2F/DP/RBR. También se ha descrito que las ciclinas tipo B y tipo A2 de Arabidopsis presentan un pico de expresión en la transición G2/M (4,6) y forman complejos con CDKBs, regulando así la entrada a la fase M y la progresión de ésta.

PROTEÍNAS DE CICLO CELULAR EN MAÍZ

Se sabe que los eventos relacionados al ciclo celular en Arabidopsis marcan la pauta para extrapolar y comprender cómo se lleva a cabo el control del ciclo celular en otras plantas, sin embargo, también

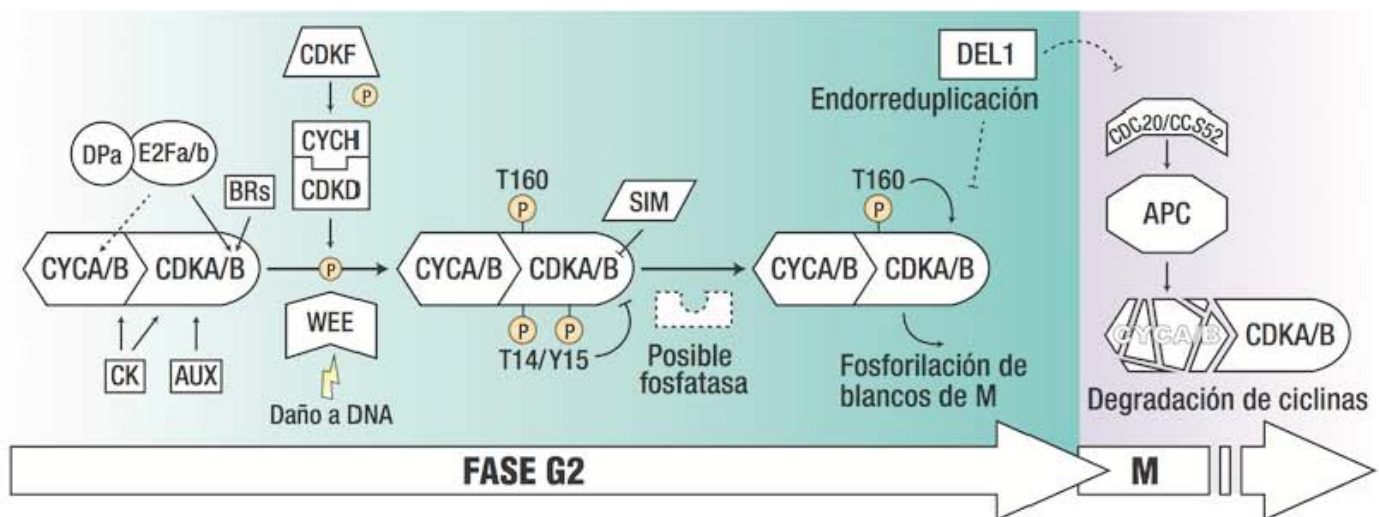


Figura 3. Principales reguladores de la transición G2/M y M. Durante la fase G2 los complejos CYC/CDK son regulados negativamente por asociación de las proteínas SIAMESE y por fosforilaciones. Como respuesta a algunos tipos de estrés, como daño al ADN o errores ocurridos durante la replicación, la cinasa WEE inactiva a CDK fosforilándola en las posiciones T14/Y15. Una vez reparados dichos errores, las fosforilaciones inhibitorias son removidas y la CDK es activada por cinasas activadoras de CDKs, mediante fosforilación en el residuo T160. Los complejos CYCB/CDKB activos fosforilan a sus blancos para el avance hacia mitosis. Durante metafase, las proteínas CDC20 y CCS52 activan al complejo promotor de anafase (APC), el cual forma parte del proteasoma 26S y dirige la degradación de ciclinas, permitiendo así la salida de mitosis.

se han realizado ensayos en arroz, tabaco y otras especies que indican que cada especie vegetal puede tener sus particularidades. El estudio del ciclo celular, en el caso particular del maíz, se facilitó considerablemente desde el año 2009, cuando se reportó la secuencia del genoma completo de esta especie. El análisis bioinformático en busca de genes homólogos relacionados filogenéticamente con ciclinas de *Arabidopsis* y arroz, en el genoma de maíz, arrojó al menos once posibles genes que codifican para ciclinas tipo A, diez para ciclinas tipo B y al menos diecisiete que codifican para ciclinas tipo D (Tabla 1). El estudio de la expresión de estos últimos durante la germinación de maíz y en tejidos de plántula (raíz, hoja y mesocotilo) mostró que 15 de ellos se expresan diferencialmente. En la zona meristemática de la raíz (grupo de células toti-potenciales y en división activa), las ciclinas D presentan niveles altos de expresión, con excepción de *CYCD3;1a*, lo que sugiere que esta ciclina podría presentar funciones específicas diferentes a las de otras ciclinas y, probablemente, estaría participando en procesos de desarrollo como diferenciación o endorreduplicación (tipo de ciclo celular alterno que evita el paso por mitosis y por lo tanto la célula aumenta su ploidía) (7). En maíz, también se han identificado tres genes que codifican para proteínas CDKA y tres para CDKB. La proteína CDKA presenta un patrón constante durante las primeras 24 horas de germinación, lo que indica su participación en diferentes puntos del control del ciclo celular.

OTRAS PROTEÍNAS REGULADORAS EN EL CICLO CELULAR

PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína que inicialmente se identificó en sueros de pacientes con lupus eritematoso, una enfermedad autoinmune; después fue descrita como una proteína esencial durante la replicación del ADN. Actualmente, se sabe que la replicación no es su única función en el ciclo celular, ya que juega un papel importante en otros procesos del metabolismo del ADN, como en reparación y remodelación de la cromatina. El análisis de PCNAs de diferentes especies (mamíferos, insectos y plantas) mostró que es una proteína altamente conservada a nivel de secuencia, estructura y función (8), que interacciona con proteínas clave del ciclo celular como son las ciclinas D y CDKs.

En maíz, durante las primeras horas de germinación, PCNA se acumula, presentando una abundancia proteica basal en semilla seca y una acumulación entre las 18 y 20 horas, lo que coincide

con el tiempo en que tiene lugar la replicación de ADN en células meristemáticas (9), lo cual sugiere que estas células se encuentran principalmente en fase S.

RBR

La proteína retinoblastoma o RB (pRB) fue descubierta por la identificación de mutaciones en diferentes posiciones de ambos alelos de un gen en tumores de retina, esto dio nombre a su producto. Posteriormente, la proteína fue descrita como una proteína supresora de tumores al regular los procesos de proliferación. En plantas la vía E2F/RB se encuentra conservada, y el homólogo de pRB es conocido como proteína relacionada a RB (RBR). Esta proteína reprime la actividad de los factores de transcripción E2F/DP durante G1 y es fosforilada por los complejos CYC/CDKs para permitir el avance hacia fase S. Además de participar en el ciclo celular de plantas, así como en el de mamíferos, también tiene una función reguladora en los procesos de diferenciación y desarrollo (10).

De acuerdo con estudios filogenéticos, funcionales y de expresión de genes, la familia de genes *RBR* de cereales es más compleja que la de otras plantas. En gramíneas existen al menos dos clases de genes *RBR*: *RBR1* y *RBR3*. En el genoma de maíz se han identificado otros dos parálogos (genes producto de duplicaciones genómicas en la misma especie) de *RBR1* y *RBR3*, más parecidos a *RBR2* y *RBR4*, respectivamente. El estudio de los dos tipos de proteínas RBR de maíz muestra que éstas se acumulan en distintas etapas de desarrollo. Por ejemplo, la proteína RBR3 participa en proliferación celular y la proteína RBR1 en procesos de diferenciación y endorreduplicación (11). Lo anterior podría sugerir que existe división de funciones, donde RBR3 participa en el control del ciclo celular y RBR1 en el control del desarrollo.

INHIBIDORES DE COMPLEJOS CYC/CDKs

Las proteínas relacionadas a KIP/CIP o KRPs, son inhibidores de la actividad de los complejos CYC/CDKs en plantas, pero también participan en el importe nuclear de otras proteínas del ciclo celular. Esta familia de proteínas ha sido aislada en especies de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. La sobreexpresión de miembros de KRP en *Arabidopsis* muestra fenotipos característicos de represión del ciclo celular como la reducción del tamaño de las plantas, disminución del número de células y células alargadas, indicando que las KRPs inhiben el ciclo celular, probablemente, tanto a nivel de las transiciones G1/S como de las G2/M (12).

En *Arabidopsis* se han descrito 7 genes que codifican para KRPs y en estudios del interactoma se reportó que estas proteínas co-purifican específicamente con ciclinas tipo D y CDKA1;1, sugiriendo que sólo inhiben a este tipo de complejos. En maíz, se observó que inhiben también la actividad de cinasa de complejos de CDKA con ciclinas tipo A y D. Otra familia de inhibidores menos caracterizados, específicos de plantas, son las proteínas *SIAMESE* (SIM) y las relacionadas a *SIAMESE* (SMR), que se han identificado en arroz, maíz, tomate y *Arabidopsis*, entre otras. Recientemente en el interactoma de *Arabidopsis* se observó que se unen a complejos de CDKA y CDKB; sugiriendo que pueden inhibir la actividad de ambas cinasas.

FAMILIA E2F/DP

Las proteínas E2F y sus socios de dimerización, las proteínas DP conforman heterodímeros que funcionan como factores transcripcionales. Los primeros estudios de la familia E2F/DP se enfocaron en entender su influencia sobre la expresión de múltiples genes requeridos para la entrada y progresión de la fase S del ciclo celular. Entre estos genes se encontraron los involucrados con la maquinaria de replicación y del metabolismo de ADN. También están involucrados en la regulación de la expresión de genes que participan en procesos biológicos como mitosis, respuesta al daño y reparación del ADN, diferenciación, desarrollo y muerte celular programada. La actividad transcripcional de E2F se modula a través de distintos mecanismos en células de mamíferos, el más conocido es a través de la interacción con pRB y otros miembros de su familia, como son p107 y p130. Al unirse pRB al heterodímero E2F/DP se reduce por impedimento estérico la interacción con proteínas co-activadoras de sus genes blanco. Tanto en animales como en plantas, la familia de E2F/DP está compuesta por tres grupos de proteínas: E2F, DEL (del inglés DP/E2F-Like protein) y DP, clasificadas por el tipo y número de dominios de unión a ADN. Las proteínas E2F y DP necesitan heterodimerizar entre ellas para unirse con alta afinidad al ADN, mientras que los miembros del grupo DEL se unen como monómero.

Las proteínas de la familia E2F/DP pueden presentar propiedades tanto de activación transcripcional como de represión. Así, en *Arabidopsis* la sobreexpresión simultánea de los activadores E2Fa y DPa en tejidos diferenciados con índices mitóticos muy bajos o nulos, promueve la reentrada al ciclo celular, y la consecuente proliferación celular mediante la activación de genes de fase S. Por otro lado, la sobreexpresión del represor E2Fc reduce la tasa de división celular y aumenta la endorre-

uplicación. Finalmente, se ha sugerido que los miembros tipo DEL funcionan como represores por competencia, ya que son capaces de reconocer la misma secuencia en el ADN que el heterodímero E2F/DP, pudiendo así, competir por ocupar los mismos promotores (12).

MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR DE PLANTAS

Los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular en especies vegetales no se han caracterizado completamente, además de que cada especie presenta características específicas, sin embargo, con los conocimientos adquiridos se pueden inferir algunos de estos.

El ciclo celular comienza cuando las señales extracelulares activan la transcripción de genes de ciclinas D durante la fase G1 temprana y al acumularse la proteína se forman complejos CYCD/CDK; estos complejos proteicos son regulados negativamente por las proteínas inhibidoras KRPs. Una vez que son liberados de esta represión, se activan por fosforilación de la treonina 160 de la CDK. Dicha fosforilación es catalizada por cinasas activadoras de CDKs (CAK), como CDKDo CDKF (Fig 2).

En la fase G1 tardía, el complejo activo CYCD/CDK fosforila a la proteína RBR, que reprime la actividad de la familia de factores transcripcionales E2F/DP. Una vez fosforilada RBR en múltiples sitios, pierde afinidad y se disocia del complejo E2F-DP permitiendo la transcripción de sus genes blanco, necesarios para el establecimiento y progresión de la fase S, como son los genes de establecimiento de origen (*ORCs*, *MCMs*, *CDT1*), de la maquinaria de replicación (*PCNA*, *DNApol*, entre otros) y de la progresión del ciclo celular (*Ciclina A*) (1, 2 y 12).

Durante la transición G2/M (Fig 3) se lleva a cabo la transcripción de los genes de *CYCA* y *CYCB* dependiente de E2F, en respuesta a una señalización provocada por hormonas. Los complejos *CYCA/B* con *CDKA/B* son regulados negativamente por proteínas inhibidoras del tipo *SIAMESE* (SIM) o KRPs y por fosforilaciones inhibidoras en la CDK (catalizadas por la cinasa *WEE*). Una vez reparados los posibles errores ocurridos durante la replicación, las fosforilaciones inhibitorias T14/Y15 son removidas por una fosfatasa putativa aún desconocida en plantas, pero ya identificada y estudiada en otros organismos. Similar a lo que ya se describió anteriormente, los complejos *CYC/CDK* se activan por la fosforilación en T160 de CDK (catalizada por la *CAK*, *CDKD/CDKF*) permitiéndole así, la fosforilación de sus proteínas blanco para entrar a la fase M. Durante la mitosis, en la

metafase, las proteínas CDC20 y CCS52 activan y dan especificidad al complejo promotor de anafase (APC), dirigiendo la degradación de ciclinas por la vía del proteasoma 26S y la consecuente salida de mitosis (Fig 3)(1, 2 y 12).

REGULACIÓN POR FITOHORMONAS Y AZÚCARES

Entre las fitohormonas u hormonas vegetales que participan en la regulación de la expresión de genes del ciclo celular y su progresión se encuentran las auxinas y las citocininas. Otras fitohormonas también tienen alguna influencia en el ciclo celular, sin embargo, han sido menos caracterizadas. Tal es el caso del ácido abscísico (ABA), el etileno, el ácido jasmónico y los brasinoesteroides (13) (Fig 2). Se ha sugerido que estas últimas fitohormonas juegan un papel en la adaptación de la actividad meristemática a las condiciones externas y al programa morfogénico vegetal.

Las auxinas juegan un papel importante en casi cualquier aspecto del desarrollo vegetal (14). Estas fitohormonas promueven la actividad del ciclo celular y, al mismo tiempo que aumentan la expresión de genes involucrados en la transición G1/S y G2/M, estimulan la degradación de proteínas inhibitoras (15). Un ejemplo de ello, es la sobreexpresión de la CYCA2;2 de alfalfa, en presencia de auxinas. La función de esta ciclina está involucrada en ciclos mitóticos meristemáticos durante el desarrollo post-embrionario.

Similar a las auxinas, las citocininas también juegan un papel esencial en el crecimiento de las plantas y su desarrollo. Estas fitohormonas retrasan la senescencia, influyen en la formación de tallo, aumentan la capacidad de atraer recursos a los tejidos vegetales y promueven proliferación al participar en el control de las transiciones G1/S y G2/M. Se ha observado que la presencia de citocininas incrementa la expresión de una CYCD3 en *Arabidopsis*, regulador clave de la transición G1/S. Adicionalmente, se ha sugerido que la expresión de ciclinas tipo B o mitóticas también puede ser regulada por la acción de esta fitohormona.

Uno de los principales puntos de control de las citocininas en el ciclo celular es, probablemente, la estimulación de la de-fosforilación de la tirosina 15 y la subsecuente activación de la CDK. Además, durante la formación de la hoja, éstas son necesarias para la celularización y desarrollo adecuado del tejido.

Las fitohormonas pueden presentar interacciones sinérgicas para generar señales que controlan la expresión génica y modulan, post-traduccionalmente, a sus proteínas blanco. Por ejemplo, las señales

generadas por auxinas y citocininas interaccionan para controlar la expresión de una CDKA y su subunidad reguladora, la CYCD3, en tallos de tabaco (15).

El ABA es otra hormona de particular importancia para el ciclo celular. Es considerada como una hormona que inhibe el crecimiento, ya que afecta a algunas enzimas específicas durante este proceso. En la mayoría de los casos, la respuesta a ABA es lenta y requiere cambios en la expresión génica. En diferentes tejidos vegetales se ha descrito que ABA es un inhibidor de ciclo celular y de la síntesis de ADN, y también se ha demostrado que su presencia induce la expresión del gen que codifica para una proteína inhibitora, KRP1, la cual se une e inhibe la actividad del complejo CYCD/CDKA. En consecuencia, las células se detienen en la transición G1/S (Fig 2).

Los azúcares son la fuente de carbono más importante para la planta, indispensables para la división celular. Las células de tejidos meristemáticos importan hexosas, mientras que los tejidos diferenciados prefieren la sacarosa. Debido a que la sacarosa es la molécula principal de transporte de carbono en plantas, los meristemas requieren invertasas extracelulares que hidrolicen al disacárido. Los azúcares presentan un efecto regulador sobre el ciclo celular, sin embargo, no es claro si dicho efecto se debe a una simple disponibilidad de energía y esqueletos de carbono, o si la concentración del azúcar per se es traducida como una señal. Por ejemplo, se ha observado una correlación positiva entre los niveles de expresión de varias ciclinas (CYCD2;1, D3;2, A3;2 y B2;1) y los niveles de monosacáridos endógenos en células en suspensión de tabaco. En dichas células la duración de la fase S y G2 puede ser modificada al variar los niveles endógenos de monosacáridos (15).

La interacción de las señales orquestadas por los azúcares y algunas fitohormonas se ha demostrado en *Arabidopsis* y tabaco. Por ejemplo, las auxinas inducen la sobreexpresión de ciclinas tipo D, pero esta expresión dependiente de auxinas es afectada de manera diferencial si también se encuentran presentes azúcares o citocininas.

Finalmente, se ha reportado que algunas proteínas importantes para el ciclo celular (RBR y E2F) son degradadas vía proteasoma 26S en *Arabidopsis* cuando la planta es sometida a deficiencia de sacarosa, provocando que se detenga el ciclo celular en la fase G2.

PERSPECTIVAS

En los últimos años se han hecho contribuciones importantes para entender los mecanismos de

regulación del ciclo celular y su relación con el desarrollo de las plantas. Se sabe, por ejemplo, que no basta solamente la presencia de cierta ciclina para desencadenar eventos dentro del ciclo celular, sino que, también son importantes las asociaciones que en ciertos momentos ésta pueda establecer con otras proteínas relevantes del ciclo celular. En este sentido, recientemente se han desarrollado

estrategias para revelar los mapas de interactomas, particularmente en *Arabidopsis*. Sin embargo, se requiere de nuevas investigaciones para entender con más profundidad el control del ciclo celular a través de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas reguladoras del ciclo celular, así como de la fina regulación por su localización subcelular, expresión génica, síntesis *de novo* y degradación.



REFERENCIAS

- Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res* 13:113-130.
- Dirk Inze (Eds.) (2007) Cell cycle and plant development. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. p 364.
- Kawamura K, Murray JA, Shinmyo A, Sekine M (2006) Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase *in vitro*. *Plant Mol Biol* 61:311-327.
- Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael A, Neiryck S, Bukkel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PC, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure JD, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Wutters E, De Jaeger G (2010) Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Sys Biol* 6:397
- Van Leene J, Boruc J, De Jaeger GD, Russinova E, De Veylder L (2011) A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends in Plant Sci* 16:141-150.
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JAH (2005) Global analysis of the 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.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM (2011) The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plantarum* 143:297-308.
- Strzalka W, Ziemienowicz A (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot* 107:1127-1140.
- Baíza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* 135:416-421.
- Sabelli PA, Liu Y, Dante RA, Lizarraga LE, Nguyen HN, Brown SW, Klingler JP, Yu, J, LaBrant E, Layton TM, Feldman M, Larkins BA (2013) Control of cell proliferation, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proc Natl Acad Sci* doi: 10.1073/pnas.1304903110.
- Sabelli PA, Dante RA, Leiva-Neto JT, Jung R, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA (2005) RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proc Natl Acad Sci* 102:13005-13012.
- Dirk Inzé and Lieven De Veylder (2006) Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Ann. Rev. Genet* 40:77-105.
- Del Pozo JC, Lopez-Matas MA, Ramírez-Parra E, Gutiérrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiol Plant* 123:173-183.
- De Veylder L, Beeckman T, Inzé D (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:655-665.
- Hartig K, Beck E (2006) Crosstalk between auxin, cytokinins and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol* 8:389-396.