



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Asociación y efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre complejos Ciclina D3;1/CDK
en la germinación de maíz”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Tomás Alberto Cortés Román

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adriana Garay Arroyo, Instituto de Ecología-UNAM

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Facultad de Química-UNAM

Ciudad de México. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Jorge M. Vázquez Ramos.

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

Dr. Jorge M. Vázquez Ramos	Facultad de Química-UNAM
Dra. Adriana Garay Arroyo	Instituto de Ecología-UNAM
Dra. Tzvetanka Dimitrova	Facultad de Química-UNAM

Al jurado asignado para la defensa del presente proyecto por su tiempo y críticas al trabajo:

Dr. Coria Ortega Roberto	PRESIDENTE
Dr. Cuevas Velázquez César Luis	VOCAL
Dr. Joseph Dubrovsky	VOCAL
Dra. Macías Silva Macias	VOCAL
Dra. Coello Coutiño Martha Patricia	SECRETARIO

Durante la duración de la maestría, gocé de una Beca de Maestría Nacional otorgada por el Conacyt.

Este trabajo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, A1-S-9076); Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT IA204817 y IN205219); Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado, Facultad de Química, UNAM (PAIP 5000-9130 y 5000-9124).

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por brindarme todas las herramientas y apoyo para mi crecimiento profesional y personal.

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por abrirme las puertas de su laboratorio. Gracias por la confianza, asesoría y apoyo constante durante toda mi estancia en su grupo de investigación.

A la doctora Aurora Lara y al doctor Elpidio García, gracias por su asesoramiento y críticas que ayudaron a mejorar y culminar el presente trabajo.

A mi comité tutor, formado por la Dra. Adriana Garay Arroyo, Dra. Tzvetanka Dimitrova y Dr. Jorge Vázquez Ramos, por sus críticas, ayuda y enseñanzas otorgadas al desarrollo del presente proyecto.

A mi jurado de tesis integrado por el Dr. Coria Ortega Roberto, Dr. Cuevas Velázquez César Luis, Dr. Joseph Dubrovsky, Dra. Macías Silva Macias Dra. Coello Coutiño Martha Patricia, por tomarse el tiempo de leer y discutir la tesis conmigo; sus críticas fueron muy valiosas para la culminación del trabajo escrito.

A todo el personal del conjunto E de la facultad de Química, pero en especial a Jorge Velázquez del L-114.

A todos mis compañeros del laboratorio 114, ya que siempre recibí ayuda, críticas y asesoramiento técnico de su parte; gracias por compartir su amistad y conocimientos conmigo. Quiero reconocer en especial al casi doctor en ciencias Javier Axosco, por sus críticas e invaluable asesoramiento técnico.

A la persona que más admiro, mi madre, quien ha sido el mejor ejemplo para siempre trabajar duro y nunca rendirme. Gracias por apoyar todos mis sueños.

A mi abuelita Josefina, por siempre cuidar de mí y apoyarme en todo.

A todos los miembros de mi familia, gracias por brindarme su cariño incondicional.

Índice

Abreviaturas	8
RESUMEN	9
Introducción	10
El maíz	10
La semilla de maíz	11
Germinación	13
Ciclo celular	15
La maquinaria del ciclo celular	17
Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)	17
Ciclinas	19
Regulación de los complejos Ciclina/CDK	20
Fosforilación de CDKs	20
Degradación	22
Regulación por la unión con proteínas inhibitorias	23
Inhibidores de CDKs en plantas	25
Familia ICK/KRP	25
Interacción proteína-proteína e inhibición de la actividad de cinasa	26
Familia SIM/SMR	28
Antecedentes inmediatos	30
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivo general	32
Objetivos particulares	32
Metodología	33
Material biológico	33
Imbibición de los ejes embrionarios	33
Extracción de proteínas	33
Ensayos de interacción por inmunoprecipitación	33
Cepas	34

Expresión de proteínas recombinantes	34
Interacción <i>In-vitro</i> de proteínas recombinantes	35
Purificación y cuantificación de KRP1;1 y KRP4;2 para ensayos de inhibición de cinasa	36
Ensayos de actividad de cinasa	37
Resultados.....	38
Interacción <i>in vitro</i> de CycD3;1a con CDKA;1 y CDKB1;1	38
Interacción <i>in-vitro</i> de CycD3;1a con KRP1;1 y KRP4;2.....	40
Interacción de la familia de inhibidores ICK/KRP con CDKB1;1 durante la germinación de maíz .42	
El anticuerpo α -ICK/KRP es capaz de inmunoprecipitar a CDKB1;1 en extractos proteicos de ejes embrionarios de 0 y 24 h	42
La familia de inhibidores ICK/KRP se asocia con CDKB1;1 a lo largo de la germinación de maíz	45
Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a complejos CYC/CDK	46
Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a complejos CYC/CDK en la germinación de maíz	49
Discusión	56
Conclusiones	63
Perspectivas	64
Bibliografía	65
Anexo	77

Índice de figuras y tablas

Índice de figuras

Figura	Nombre de la figura
1	Anatomía de la semilla de maíz
2	Curso temporal del contenido de agua y fases de una semilla en germinación
3	Representación esquemática del ciclo celular y sus fases
4	Representación de los diferentes niveles de regulación que existen sobre los complejos ciclina/CDK
5	Motivos putativos funcionales y conservados en proteínas ICK/KRP de plantas
6	Interacción <i>in-vitro</i> entre CDKA;1 y CycD3;1a
7	Interacción <i>in-vitro</i> entre CDKB1;1 y CycD3;1a
8	Interacción <i>in-vitro</i> entre KRP1;1 y CycD3;1a
9	Interacción <i>in-vitro</i> entre KRP4;2 y CycD3;1a
10	Inmunodetección de la proteína ICK/KRP en extractos proteicos de ejes embrionarios
11	ICK/KRP se asocia con CDKB1;1 en extractos proteicos de maíz
12	El anticuerpo anti-ICK/KRP es capaz de inmunoprecipitar a la proteína ICK/KRP
13	Asociación de ICK/KRP con CDKB1;1 en la germinación de maíz
14	Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc por KRP1;1 y KRP4;2
15	Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc por KRP4;2
16	Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CycD4;2/CDK y CycD5;3/CDK por KRP1;1 y KRP4;2
17	Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a CDKA en la germinación de maíz
18	Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 en la germinación de maíz
19	Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 en la germinación de maíz

Índice de Tablas

Tabla	Contenido de la tabla
1	Taxonomía del maíz
2	Número de genes relacionados con el ciclo celular en diferentes organismos

Índice de figuras Anexas

Anexo	Contenido del anexo
1	Controles de la interacción <i>in-vitro</i>
2	Control de la interacción <i>in-vitro</i>
3	Purificación de KRP1;1 y KRP4;2 para ensayos de inhibición
4	ICK/KRP se asocia a CDKB1;1 en la germinación de maíz
5	Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc usando dos cantidades de KRP1;1 y KRP4;2

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	Complejo Promotor de la Anafase
ATP	Adenosín Trifosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CAK	Cinasa Activadora de CDK
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclina
CID	Dominio de inhibición de CDK
CKIs	Inhibidor/Interactor de CDKs
CyC	Ciclina
GST	Glutación S-transferasa
ICK	Inhibidor de CDKs
IP	Inmunoprecipitado
IPTG	Isopropil B-D-tiogalactopiranosido
kDA	KiloDalton
KRP	Proteína relacionada a KIP
MBP	Proteína de unión a maltosa
mRNA	ARN mensajero
Mw	Marcador de masa molecular
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RBR	Proteína relacionada a Retinoblastoma
SCF	SKP1-CUL1-F-BOX
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato
SMR	Proteínas relacionadas a SIAMESE

RESUMEN

La familia de inhibidores ICK/KRP, participan en el control del ciclo celular en plantas mediante la inhibición de la actividad de cinasa de las CDKs. Hasta la fecha, poco se sabe acerca de la función específica de cada miembro de esta familia, por lo que es relevante investigar la asociación y efecto de estos inhibidores con otras proteínas que participan en la regulación del ciclo celular. El genoma de maíz codifica 8 proteínas de la familia ICK/KRP, y en estudios previos se ha visto que los niveles de mRNA de KRP1;1 y KRP4;2 están presentes a lo largo de la germinación. Por otra parte, en mezclas de extractos proteicos de maíz provenientes de ejes embrionarios embebidos por distintos tiempos, se reportó que la actividad de cinasa de distintos complejos ciclina D/CDK se ve inhibida diferencialmente por estas dos KRPs. A pesar de los estudios previos hechos en maíz, todavía quedan muchas incógnitas respecto a qué complejos ciclina/CDK son susceptibles de ser inhibidos, y si esta inhibición se modifica conforme avanza la germinación.

En el presente trabajo se estudiaron las asociaciones proteína-proteína entre KRP1;1 y CycD3;1a, así como la asociación entre KRP4;2 y CycD3;1a, encontrando que ambas KRPs tienen la capacidad de unirse a esta ciclina tipo D sin la necesidad de una CDK. Así mismo, mediante inmunoprecipitados usando un anticuerpo dirigido contra la región C-terminal del inhibidor KRP4;2 y realizados en extractos proteicos provenientes de ejes embrionarios de maíz, reportamos una interacción poco descrita en plantas entre un miembro de la familia ICK/KRP y la cinasa CDKB1;1. Por otra parte, también se estudió la capacidad inhibitoria de KRP1;1 y KRP4;2 sobre CDKA, CDKB1;1 y CycD3;1 a lo largo de la germinación. Los resultados mostraron que ambas KRPs tienen la capacidad de inhibir la actividad de cinasa asociada a CDKA, CDKB1;1 y CycD3;1, siendo KRP1;1 un inhibidor más potente en comparación con KRP4;2. Los resultados de la inhibición a lo largo de la germinación mostraron que los complejos ciclina/CDK que se encuentran presentes a las 24 h después de la imbibición, son más susceptibles a ser inhibidos por ambas KRPs en comparación con los complejos presentes a las 0 y 12 h. Los resultados indican que los complejos que se encuentran hacia la transición G2/M (24 h), se vuelven más susceptibles a la inhibición por ambas KRPs.

Introducción

El maíz

El maíz (*Zea mays*) es originario de las tierras altas de México, y se cree que su aparición data entre 7000 y 10,000 años atrás. Datos arqueológicos han demostrado que el maíz comenzó a cultivarse en los años 2000–2500 a.C. La evidencia paleoetnobotánica más antigua respecto a su domesticación se encuentra en un sitio arqueológico llamado "Nac Neish", ubicado en el sur del estado de Tamaulipas, México. Otros sitios arqueológicos importantes están ubicados en los estados de Puebla, Oaxaca y Valle de México. (García-Lara & Serna-Saldivar, 2019).

Se han postulados tres teorías sobre el origen evolutivo del maíz. La primera propone que el maíz es el resultado de un cruce entre teosinte y *Tripsacum*. La segunda plantea que el maíz se originó a partir de una forma silvestre de maíz tunicado, y que el teosinte es el resultado del cruce de un miembro del género *Zea* con *Tripsacum*. La tercera teoría (y la más aceptada), propone que el maíz evolucionó del teosinte debido a que: (1) en la naturaleza existen eventos de hibridación frecuentes entre el teosinte y el maíz, (2) tienen el mismo número de cromosomas ($n = 10$), los cuales muestran una estructura similar en ambas especies (longitud, relación de brazos y ubicación del centrómero, cromómeros conspicuos y presencia de nudos cromosómicos), y (3), las dos especies de plantas comparten varias características anatómicas (Galinat, 1988; J. A. Sánchez, 2011).

El género *Zea* consta de cuatro especies, de las cuales *Zea mays* L. es la especie con un mayor valor económico a nivel mundial. Las otras especies de *Zea*, denominadas teosintes, son en su mayoría pastos silvestres nativos de México y América Central.

Tabla 1. Taxonomía del maíz (CONABIO, 2008)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Genero	Zea
Especie	Zea mays

La semilla de maíz

Las gramíneas producen un tipo de grano o fruto seco indehisciente conocido como cariósipide. Este tipo de frutos se forman a partir de un único carpelo, y presentan una fusión entre la pared del ovario (integumento) y el pericarpio, lo que forma una estructura protectora.

Los granos de las gramíneas están divididos principalmente en tres partes: embrión, endospermo y cubierta seminal o pericarpio (Figura 1).

El endospermo es una estructura propia de las angiospermas y es el producto de un evento de doble fecundación. El endospermo de maíz es un gran tejido de almacenamiento, el cual constituye el 80-90% del peso fresco del grano maduro. Típicamente, las células del endospermo contienen nutrientes que ayudarán al crecimiento temprano del embrión, y en algunos casos, el endospermo persiste para acumular proteínas de almacenamiento y almidón que se usan más tarde durante la germinación (Birchler, 1993; Kowles & Phillips, 1988).

La cubierta seminal o pericarpio es la capa más externa del grano, y es un tejido materno que consta de 5 a 22 células de grosor provenientes de la pared del ovario. El pericarpio sirve como la primera barrera contra insectos y patógenos, además de

que juega un papel clave contra la humedad y tiene una papel esencial en el proceso de germinación (Morohashi et al., 2012).

El embrión está constituido por un eje embrionario y un escutelo o cotiledón. El eje embrionario se compone por (Figura 1):

- El meristemo radicular, el cual dará lugar a la raíz primaria, y en el ápice contiene al meristemo apical del brote, del cual se origina el tallo.
- Escutelo o cotiledón, está unido al embrión por el nodo escutelar, y su función es la de nutrir al embrión mediante la segregación de enzimas que solubilizan las sustancias de reserva en el endospermo, las cuales posteriormente van a ser absorbidas y transportadas al embrión durante la germinación.
- Coleoptilo (hoja modificada), es la estructura que emerge inicialmente del suelo como consecuencia del alargamiento del mesocotilo durante la germinación.
- La caliptra (tejido que recubre al meristemo radicular), la coleorriza (tejido que recubre la radícula).
- Plumula (tejido que se convertirá en el tallo y las hojas de la planta).

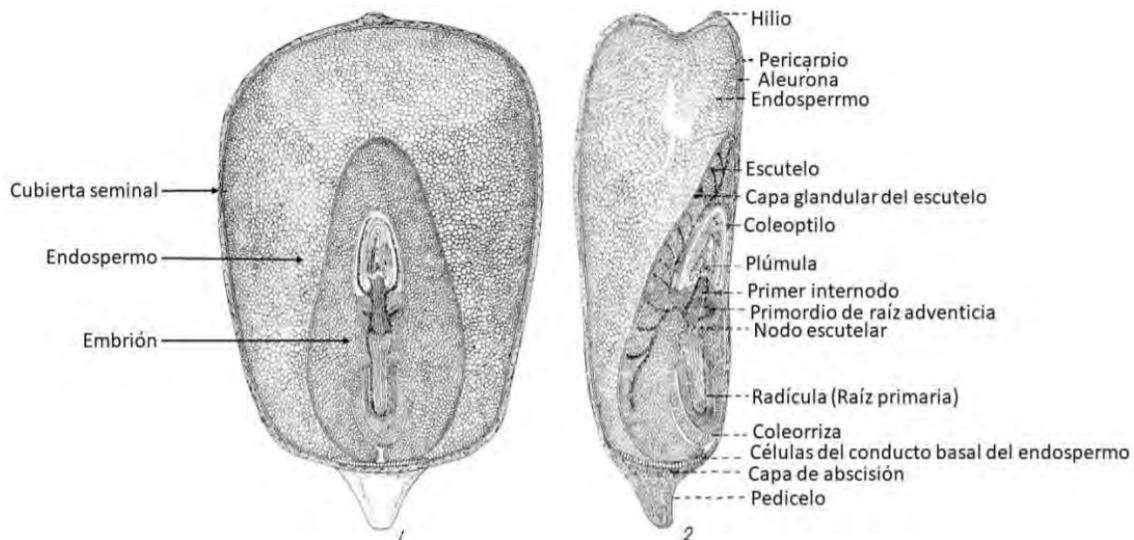


Figura 1. Anatomía de la semilla de maíz. Secciones longitudinales de un grano de maíz, visto de frente (a) y de perfil (b). Modificado de (Coe, 2001).

Germinación

Dentro del ciclo de vida de las plantas superiores, la semilla es una etapa muy importante, ya que de esta etapa depende su supervivencia como especie. La semilla es considerada como la unidad de dispersión de las plantas, la cual es capaz de sobrevivir el periodo entre la maduración de la semilla y el establecimiento de la próxima generación como plántula tras la germinación de la semilla.

La germinación es un proceso complejo que involucra el despertar metabólico de una semilla latente y durante el cual, la semilla madura embebida debe pasar rápidamente de un programa de maduración a un programa de desarrollo basado en la germinación para prepararse para el establecimiento de la plántula. Por definición, el proceso de germinación incorpora eventos que comienzan con la absorción de agua por la semilla seca madura y terminan con la protrusión de la radícula (o, más generalmente, una parte del embrión) a través de las envolturas de la semilla (Bewley et al., 2013; Rajjou et al., 2012).

Dentro del laboratorio se ha adoptado una definición más molecular para describir el proceso de germinación de las semillas de maíz, en donde la germinación es definida como un proceso que inicia con la entrada de agua a la semilla, lo cual desencadenará un despertar metabólico y molecular, seguido por la elongación celular de los tejidos de la semilla, y que culminará con la primera ronda exitosa de divisiones celulares (Vázquez-Ramos & Sánchez, M.P. 2003).

Una manera útil de describir el proceso de germinación es a través de representar de manera temporal los eventos moleculares y bioquímicos que ocurren tras la absorción de agua por una semilla en germinación, hasta el establecimiento de la plántula (eventos post-germinativos). Este modelo de la curva de toma de agua por semillas ortodoxas consta de tres fases (Nonogaki et al., 2010) (Figura 2):

- Fase 1: inicialmente ocurre una rápida toma de agua por la semilla seca hasta que todas las matrices y componentes celulares se hidratan por completo. La cinética de entrada de agua está altamente influenciada por la estructura de la semilla, ya que no puede ingresar a todas las regiones por igual. En esta etapa hay una activación del metabolismo la cual permite la reparación de daños estructurales causados por el proceso de maduración de la semilla. También comienza la síntesis de proteínas a partir de mRNAs pre-existentes y se reestablecen actividades celulares basales.
- Fase 2: en este periodo existe una absorción de agua limitada, por lo que el contenido de agua en la semilla es constante. Las actividades metabólicas aumentan: movilización de reservas, transcripción de *novo* de mRNAs y replicación del DNA.
- Fase 3: ocurre un segundo periodo de toma de agua, la cual está asociada con el aumento en el tamaño de las células de la radícula, también hay movilización de reservas que servirán para el establecimiento de la plántula.

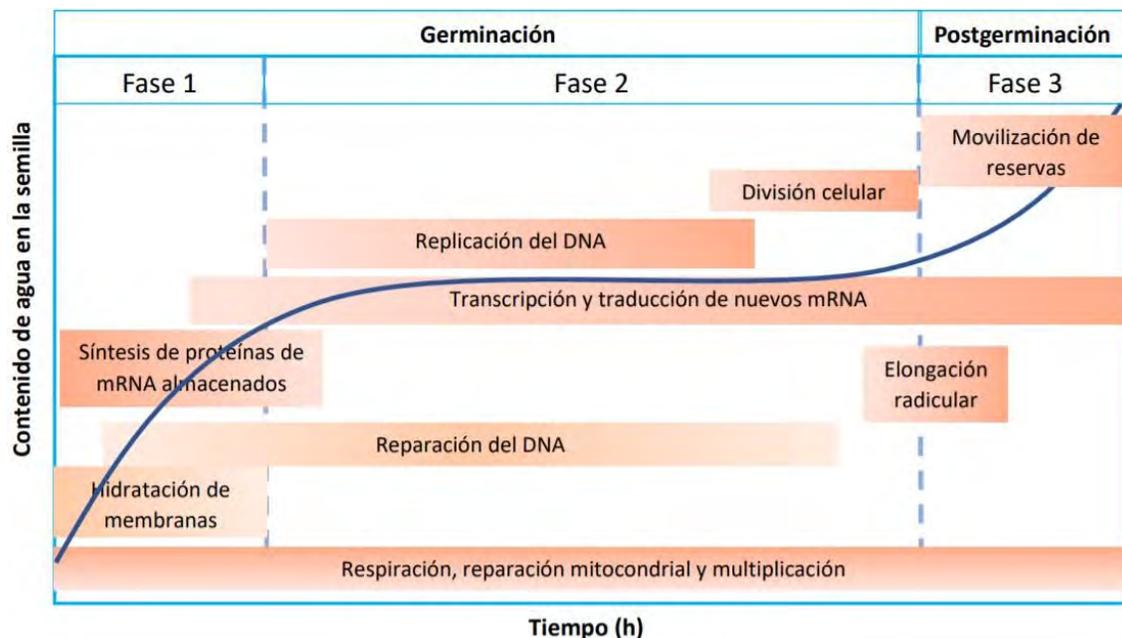


Figura 2. Curso temporal del contenido de agua y fases de una semilla en germinación. Modificado de (Nonogaki *et al.*, 2010)

Ciclo celular

El ciclo celular comprende una serie de eventos moleculares unidireccionales e irreversibles que tienen como fin la duplicación del material genético y su posterior distribución en dos células hijas. Conceptualmente se ha dividido al ciclo celular en diferentes fases. La mayor parte del ciclo celular es consumido en la interfase, la cual incluye la fase G1 (Gap1), fase de síntesis (S) y la fase G2 (G2). En eucariotas la replicación del DNA se lleva a cabo en la “fase S” o de síntesis. Después de la fase S, la segregación de los cromosomas y la división celular ocurren en la fase “M” (mitosis).

Para poder entrar tanto a la fase S como a la M, la mayoría de las células requieren de un tiempo para crecer, incrementar su contenido de proteínas y organelos requeridos para los procesos de replicación del material genético y división celular. Por este motivo existen las fases G1 (Gap1) y G2 (Gap2), que se encuentran previo a la fase S y a la fase M respectivamente (Figura 3). Estas dos fases no sólo sirven para darle tiempo a la célula para incrementar su tamaño, sino que también le proveen un tiempo para que ésta pueda monitorear sus ambientes interno y externo y se asegure que existen las condiciones adecuadas para comprometerse a las siguientes fases del ciclo.

El ciclo celular comienza en la fase G1, la cual es promovida por la estimulación de diversos factores que actúan como mitógenos. Durante la fase G1, la célula aumenta su tamaño y es aquí donde se monitorea el ambiente celular interno y externo para asegurarse de que existen las condiciones adecuadas para proseguir a la fase de síntesis del material genético, o de lo contrario, entrar en un estado de quiescencia conocido como G0 (Gap cero), el cual puede durar días, semanas o incluso años. Durante la fase G2 la célula se asegura que la duplicación del material genético se realizó de forma completa y sin errores (Alberts et al., 2002a; Vázquez-Ramos & Sánchez, M.P. 2003).

La mitosis comienza en la profase, la cual se caracteriza por un aumento en la inestabilidad de los microtúbulos. En las células animales el primer paso para la formación del huso mitótico es la aparición o nucleación de los microtúbulos

alrededor de los centrosomas para formar una estructura en forma de estrella conocida como áster, cuyos microtúbulos tienen un extremo menos (-) asociado al centrosoma y un extremo más (+) en el cual se van añadiendo dímeros de tubulina. Cada áster migra a posiciones opuestas dentro de la célula, estableciendo así los polos celulares a partir de los cuales se formará un huso mitótico bipolar. En las células de plantas superiores y otras células que carecen de centrosomas, un huso mitótico bipolar funcional se autoensambla alrededor de los cromosomas replicados. En la prometafase se da la ruptura de la envoltura nuclear, lo que permite que los cinetocoros en los cromosomas condensados capturen y estabilicen los microtúbulos provenientes de cada polo. Los microtúbulos unidos al cinetocoro tiran en direcciones opuestas en cada cromosoma duplicado creando junto con una fuerza de eyección polar, una tensión que ayuda a llevar los cromosomas al ecuador del huso para formar la placa de metafase. La anafase comienza con la degradación proteolítica de la cohesina, la cual mantiene unidas las cromátidas hermanas. La ruptura de este enlace permite que los cromosomas sean arrastrados a polos opuestos (el movimiento anafase A). Aproximadamente al mismo tiempo, los dos polos del huso se separan (el movimiento anafase B). En la telofase, la envoltura nuclear se vuelve a formar alrededor de cada grupo de cromosomas separados (Alberts et al., 2002b).

Dentro del ciclo celular existen tres puntos fundamentales de control o "checkpoints": (1) la entrada a la fase S (transición G1/S), (2) la entrada a mitosis (transición G2/M) y (3), el paso de metafase a anafase. La regulación del ciclo celular (y por lo tanto la regulación a través de cada punto de control) está dada por la actividad de cinasa de los complejos formados por una subunidad reguladora conocida como ciclina y una subunidad catalítica conocida como cinasa dependiente de ciclina o CDK, la cual es la responsable de reconocer los motivos blancos (una serina o treonina seguida por una prolina) presentes en las proteínas que sirven como sustrato. Estos complejos son los encargados de fosforilar una gran variedad de blancos a través de cada una de las fases del ciclo celular permitiendo la progresión ordenada de este proceso (Magyar et al., 2013).

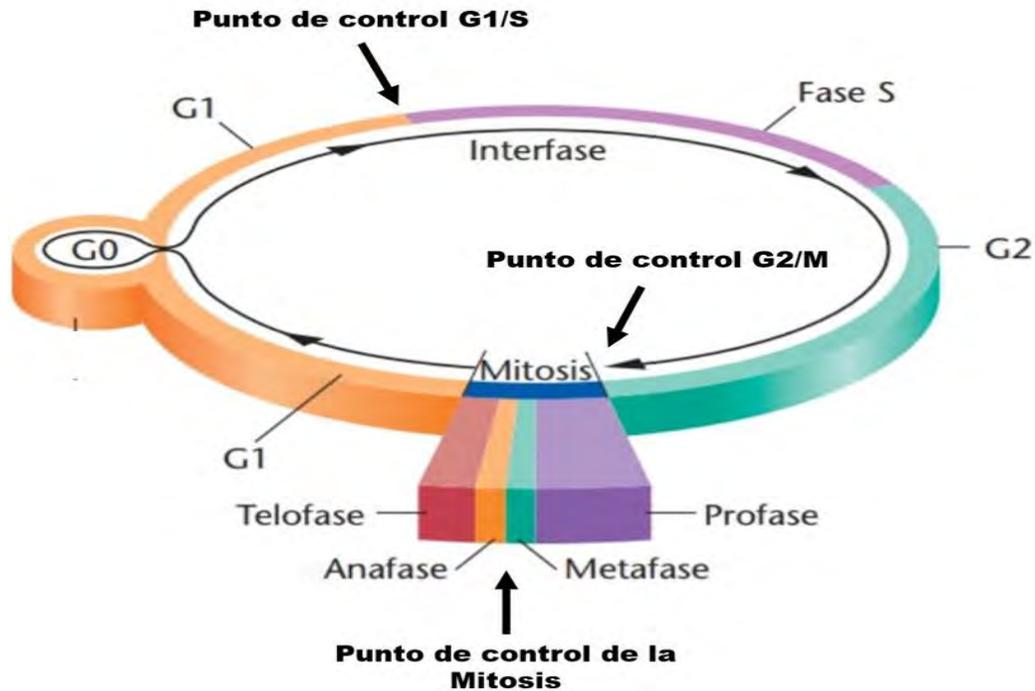


Figura 3. Representación esquemática del ciclo celular y sus fases. Modificado de (Klug et al., 2011)

La maquinaria del ciclo celular

Gracias a la secuenciación completa del genoma de diversas plantas de interés comercial y científico, se han podido identificar aquellos genes que podrían tener una función dentro del ciclo celular. Cabe destacar que el número de genes identificados en plantas con una participación en el ciclo celular es mayor en comparación con los encontrados en mamíferos y levaduras: lo que podría indicar que en plantas existe una regulación aún más compleja de este proceso, tal vez debido al hecho de que las plantas son organismos sésiles y responden de una manera distinta a los cambios en sus entornos interno y externo (Tabla 2).

Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

Podría decirse que el control y progresión del ciclo celular recae en la actividad de unas cinasas específicas de residuos de serina/treonina, conocidas como CDKs. En *A. thaliana* las CDKs se clasifican en 8 grupos de acuerdo con su motivo de unión

a ciclina (de CDKA a CDKG y CDK-Like), de las cuales sólo a CDKA y CDKB se les ha encontrado una función directa en la regulación del ciclo celular (Vandepoele et al., 2002).

Tabla 2. Número de genes relacionados con el ciclo celular en diferentes organismos

Genes	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arroz	Maíz	Referencias
Cdc2a/CDKA (PSTAIRE)	1 (cdc2)	1 (cdc28)	2 (CDK1 y CDK2)	1	3	3	Mironov et al., 1999; Segers et al., 1998
CDKB	NH	NH	NH	4	2	3	Magyar et al., 1997
CYCA	NH	2	2	10	7	11	Ranauding et al., 1996
CYCB	1	4	3	11	7	10	Day et al., 1998
CYCD	2	3	3	10	14	17	Riou-Khamlichi et al., 1999; Ranauding et al., 1996; Sony et al., 1995; De Veylder et al., 1999
RB	NH	NH	3	1	2	4	Grafpi et al., 1996; Huntley et al., 1998; Nagakami et al., 1999; Gutiérrez et al., 1998
E2F	MBF	SBF/MBF	8	3	5	12	Gutiérrez et al., 1998; Wang et al., 1998; Sánchez-Camargo et al., 2020
DP	NH	NH	3	2	3	4	Inzé et al., 1999
ICKs/KRPs	1	3	10	7	6	8	Wang et al., 1997; Mironov et al., 1999
PCNA	1	1	1	2	1	2	Burssens et al., 1998

Las CDKs tipo A de plantas presentan un motivo canónico de unión a ciclina, formado por 7 residuos de aminoácidos, el cual es conocido como PSTAIRE. La CDKA;1 de *A. thaliana* es la única CDK de plantas identificada hasta ahora que puede complementar a la mutante sensible a temperatura “cdc2” de *Schizosaccharomyces pombe* (Ferreira et al., 1991). Por otro lado, las CDKs tipo B han sido agrupadas en dos subfamilias: CDKB1 y CDKB2. Estas CDKs carecen de homólogos en levaduras y mamíferos, por lo que son exclusivas de plantas. Las CDKs tipo B poseen un motivo de unión a ciclinas divergente, PPTALRE para CDKB1 o PPTTLRE para CDKB2. Las CDKBs tienen la característica única de que su expresión está regulada de manera diferencial durante el ciclo celular; los niveles

de transcrito de CDKB1 se acumulan desde la fase S tardía hasta la fase M, mientras que la CDKB2 se expresa en un período más restringido, desde la fase G2 a la M, por lo que se les ha dado un papel preponderante en las fases G2 y M (Menges et al., 2003; Umeda et al., 1999).

Ciclinas

Las primeras ciclinas fueron identificadas estudiando huevos de erizos de mar. Estas proteínas presentaban niveles fluctuantes a lo largo del ciclo celular, por lo que fueron nombradas como ciclinas (Evans et al., 1983).

La expresión específica de ciclinas en cada una de las fases del ciclo celular produce una activación controlada de las CDKs mediante la unión directa de la ciclina a la CDK. Cada ciclina muestra un patrón de expresión específico durante el ciclo celular, y existen diversos complejos ciclina/CDK, los cuales a su vez pueden actuar y regular fases específicas del ciclo celular. La información obtenida sobre la función de cada ciclina proviene del estudio de su patrón de expresión, proteínas con las que interactúa y del efecto causado por la alteración de su expresión. Los organismos eucariotas poseen diferentes tipos de ciclinas, por ejemplo, se sabe que en células animales las ciclinas tipo B están involucradas en la entrada a la fase M (Minshull et al., 1989), mientras que las ciclinas tipo D son fundamentales para la reentrada al ciclo celular en respuesta a señales extracelulares (Charles J. Sherr, 1994); y que las ciclinas tipo E promueven la entrada a la fase S (Geng et al., 2003).

En *Arabidopsis thaliana* existen aproximadamente 50 genes putativos que codifican para ciclinas, de las cuales se sabe que 32 ciclinas tienen una función en la regulación del ciclo celular y se clasifican en: 10 tipo A, 11 tipo B, 10 tipo D y 1 ciclina tipo H (Menges et al., 2005). Típicamente se piensa que las ciclinas tipo A (CYCAs) controlan la progresión de la fase S a la fase M, por otro lado, las ciclinas tipo B (CYCBs) controlan la transición G2/M y la progresión a través de la fase M. Al igual que ocurre en células animales, las ciclinas tipo D controlan la transición G1/S y la proliferación celular en respuesta a señales externas como pueden ser fitohormonas y disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, la expresión de las ciclinas D no está restringida únicamente a la fase G1/S como ocurre en animales, ya que también se

ha visto una expresión de ciclinas D en otras fases del ciclo celular como ocurre en la fase G2/M. Por ejemplo, se ha reportado que in vitro la ciclina D4;1 de *A. thaliana* se puede unir y activar a la CDKB2;1 que es específica de la transición G2/M. Por otro lado, también se ha visto actividad cinasa asociada a ciclina D3;3 de tabaco tanto en G1/S como en G2/M. En maíz, los niveles de transcrito de la mayoría de las ciclinas D se mantienen constantes a lo largo de la germinación, lo que indica que a nivel de mensajero las ciclinas D mantienen una expresión constante a lo largo del ciclo celular (Buendía-Monreal et al., 2011; Kono et al., 2003; Nakagami et al., 2002).

Aunque las ciclinas D de plantas y mamíferos son muy distintas a nivel de homología de secuencia (excepto por un motivo en el N-terminal), sí desempeñan funciones similares ya que las ciclinas D de ambos organismos son fundamentales para el inicio o re-inicio del ciclo celular debido a su respuesta a señales externas e internas. Estructuralmente las ciclinas D contienen una región conservada de 250 aminoácidos responsable de la interacción con las CDKs denominada caja de ciclina, la cual consiste en dos dominios: el N-terminal que abarca una región de aproximadamente 100 aminoácidos conservados y la región C-terminal, la cual es menos conservada en secuencia y que no está presente en todas las ciclinas. También la mayoría de las ciclinas D contienen el motivo LxCxE, motivo importante para la interacción con la proteína RBR (Baker et al., 2005)

Regulación de los complejos Ciclina/CDK

Fosforilación de CDKs

La regulación de la actividad de los complejos ciclina/CDK se puede dar a diferentes niveles: control transcripcional, interacciones proteína-proteína, modificaciones postraduccionales, degradación y localización subcelular (figura 4).

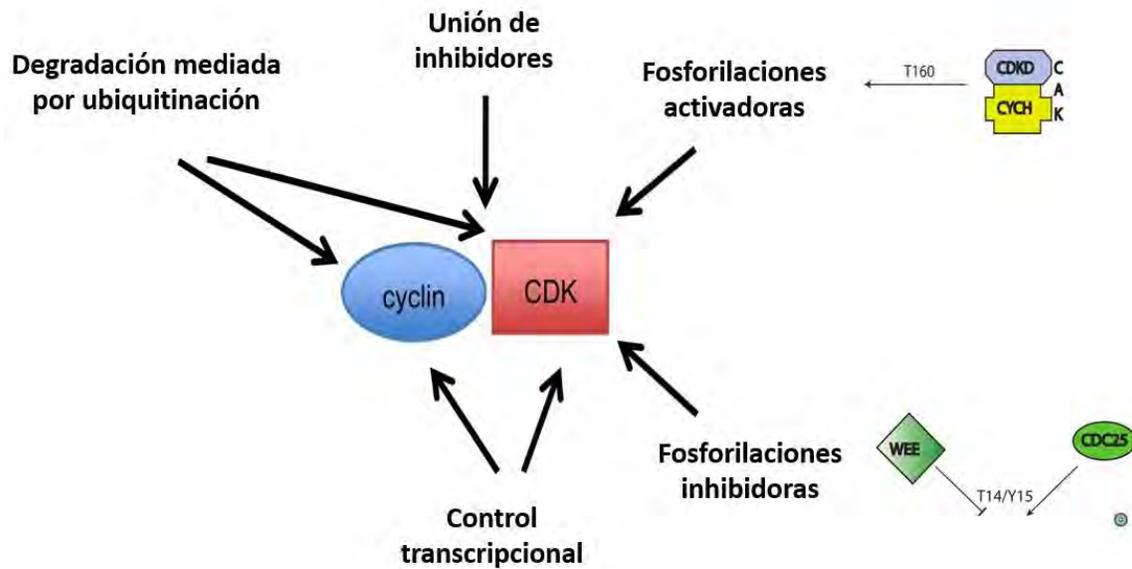


Figura 4. Representación de los diferentes niveles de regulación que existen sobre los complejos ciclina/CDK. Modificado de (Inagaki & Umeda, 2011).

Un ejemplo de regulación por modificaciones postraduccionales sobre los complejos ciclina/CDK, son las fosforilaciones activadoras o inhibitorias sobre la CDK. La fosforilación (activadora) de un residuo de treonina conservado (Thr-161 en la CDKA;1 de *A. thaliana*) en la región del loop-T de la CDK, es necesaria para el reconocimiento de su sustrato y una actividad total por parte de la CDK (Draetta, 1997). Las cinasas encargadas de llevar a cabo esta fosforilación activadora son conocidas como CAKs (Cdk activating kinase). En plantas se han identificado dos clases de CAKs: CDKD y CDKF. CDKD está funcionalmente relacionada a las CAKs de animales, mientras que CDKF es específica de plantas y es funcionalmente similar a la CAK de levaduras (Umeda et al., 2005).

En levaduras los complejos ciclina/CDK pueden presentar fosforilaciones inhibitorias en un residuo de tirosina (Tyr15) que se encuentra hacia el extremo N-terminal en la CDK. En vertebrados esta fosforilación inhibitoria se da tanto en un residuo de tirosina (Tyr15) como en uno de treonina (Thr14), los cuales corresponden al dominio de unión de ATP. La fosforilación en el residuo de tirosina es llevada a cabo por una cinasa conocida como WEE1, mientras que para

contrarrestar el efecto negativo en la actividad de la CDK por la fosforilación sobre estos dos residuos (Tyr15 y Thr14), existe una fosfatasa que en levaduras y mamíferos es conocida como CDC25, sin embargo en plantas no se ha identificado al homólogo funcional de CDC25; aunque no se descarta la posibilidad de que exista una proteína funcionalmente equivalente (Dewitte & Murray, 2003; Sorrell et al., 2002).

Degradación

El control de la degradación de los reguladores negativos o positivos del ciclo celular es uno de los mecanismos claves que aseguran la progresión exitosa del ciclo celular. Los niveles de distintas proteínas que participan dentro del ciclo celular son regulados por su degradación dependiente de la fase del ciclo celular o en respuesta a señales internas o externas.

El complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) y el complejo SCF (por Skp1-Cullin-F-box) son las principales clases de ligasas E3 de ubiquitina involucradas en el control del ciclo celular (Vodermaier, 2004).

Ya que los niveles de ciclinas tienen una función importante en la actividad de las CDKs, la degradación de esta subunidad regulatoria es un mecanismo relevante en el control del ciclo celular. Se sabe que las ciclinas tipo A y B poseen una secuencia de aminoácidos conocida como caja de destrucción (caja D) que media su degradación por el proteosoma (Genschik et al., 1988), mientras que las ciclinas D poseen cajas PEST las cuales están relacionadas con proteínas que tienen un tiempo de vida media muy corto (Rogers et al., 1986).

Un ejemplo de regulación por proteólisis es el de la CYCD3;1 de *A. thaliana*, la cual es altamente inestable, y se ha visto que sus niveles decrecen rápidamente tras la reducción de sacarosa en el medio. De hecho, los niveles de CYCD3;1 se reducen significativamente con el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida), lo que confirma que la CYCD3;1 es una proteína inestable y se necesita de la síntesis de novo para mantener los niveles de esta proteína. Por otro lado, el tratamiento con MG132 (un inhibidor del proteosoma) tanto en células en

proliferación como en células sin sacarosa, dan como resultado un aumento en los niveles de la proteína CYCD3;1. Estos resultados indican una regulación dinámica de los niveles de la proteína CYCD3;1 mediada por una proteólisis controlada en respuesta a las condiciones nutrimentales (Planchais et al., 2004).

Regulación por la unión con proteínas inhibitorias

Como se ha mencionado anteriormente, la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular es regulada por la actividad coordinada de diferentes complejos ciclina/CDK. Un nivel de regulación de estos complejos es por medio de su unión con pequeñas proteínas inhibitorias de la actividad de cinasa de las CDKs (CKIs), las cuales se ha visto que inducen el arresto del ciclo celular o retrasan la progresión del ciclo celular en respuesta a señales intracelulares o extracelulares.

Las CKIs juegan un papel muy importante en el ciclo celular de eucariotas debido a que pueden orquestar los procesos de proliferación y diferenciación celular. Hasta ahora se han encontrado a estos inhibidores de CDKs en levaduras (Mendenhall, 1998), animales (Charles J. Sherr, 1994) y plantas (Wang et al., 1997), y aunque todas muestran una actividad de CKI, controlan un amplio espectro de procesos fisiológicos específicos de la especie.

En *Schizosaccharomyces pombe* el control del ciclo celular recae en una única CDK (Cdc2). Cdc2 puede ser regulada por su unión con una CKI conocida como p25^{Rum1} (Moreno & Nurse, 1994). p25^{Rum1} desempeña una función muy importante en mantener a las células en la fase G1 al inhibir la actividad de cinasa de Cdc2, por lo que p25^{Rum1} determina el momento en el que se da la transición G1/S, manteniendo a las células en el estado pre-S(tart) hasta que hayan adquirido el tamaño celular mínimo necesario para iniciar el ciclo celular. Además, p25^{Rum1} es esencial para prevenir la entrada a mitosis en células que no han iniciado la replicación del DNA (Moreno & Nurse, 1994).

En contraste con *S. pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* tiene tres CKIs: p40^{Sic1}, Far1, y Pho81 (Mendenhall, 1998). Tanto la CKI de *S. pombe* como las CKIs de *S. cerevisiae*, son diferentes en secuencia de las CKIs de mamíferos, aunque p40^{Sic1}

comparte un dominio inhibitorio estructuralmente conservado con un inhibidor de mamíferos conocido como p27^{Kip1} (Barberis et al., 2005) y Pho81 muestra una similitud en estructura con las proteínas inhibitorias de CDKs "INK4" de mamíferos (Ogawa et al., 1993). La CKI p40^{Sic1} funciona durante la proliferación celular al prevenir el inicio prematuro de la fase S hasta que los niveles de Cdc28 (equivalente a Cdc2 en *S. cerevisiae*) y las ciclinas Cln1-2 hayan aumentado lo suficiente como para completar el inicio del brote y la duplicación del cuerpo polar del huso (Schwob et al., 1994). La segunda función de p40^{Sic1} es la regulación de la salida de mitosis y el establecimiento de la fase G1 (Donovan et al., 1994). Far1 no es necesaria para la progresión del ciclo celular, pero es necesaria para el arresto del ciclo celular y la diferenciación en respuesta a las feromonas de fusión celular (mating) (Chang & Herskowitz, 1990). Finalmente, Pho81 inhibe los complejos ciclina/CDK que controlan la expresión génica en condiciones bajas de fosfato (Schneider et al., 1994).

En mamíferos se han definido dos familias de genes CKI basándose en sus orígenes evolutivos, estructura y especificidad por diferentes CDKs. La familia de genes INK4 codifica para las proteínas inhibitoras p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Estas proteínas tienen la característica de presentar múltiples repeticiones de tipo anquirina que son necesarias para su interacción con las CDKs. El número de CDKs a las que se unen es limitado, siendo CDK4 y CDK6 sus principales blancos, las cuales son las cinasas responsables del paso a través de G1 en animales. Las proteínas INK4 se unen a las CDKs monoméricas o a complejos ciclina/CDK causando cambios alostéricos que afectan la unión de la ciclina a la CDK o conducen a la disociación del complejo ciclina/CDK respectivamente (Sherr & Roberts, 1995)

La otra familia de CKIs de mamíferos se ha denominado familia Cip/Kip y consta de los miembros: p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, los cuales a nivel de secuencia son muy distintos a los miembros de la familia INK4. Los miembros de la familia Cip/Kip son capaces de unirse tanto a la ciclina como a la CDK, y pueden modular la actividad de un amplio espectro de complejos ciclina/CDK (Sherr & Roberts, 1995). Las proteínas de la familia Cip/Kip, comparten un dominio conservado hacia su extremo

N-terminal que determina su unión con las CDKs y las ciclinas, sin embargo, en el resto de su secuencia proteica divergen mucho entre miembros, lo que sugiere que cada una de estas proteínas podrían tener funciones y regulaciones distintas.

Las proteínas Cip/Kip se caracterizaron inicialmente como inhibidores de todos los complejos ciclina/CDK, aunque muestran una menor afinidad hacia complejos ciclina B/CDK1 (Sherr & Roberts, 1999). El cristal con los dominios de unión a ciclina y a CDK presentes en el N-terminal de p27 (aa 22–106) unidos al complejo ciclina A/CDK2, reveló que p27 ocluye un dominio importante para la interacción de la ciclina con sus sustratos, y además se inserta en el sitio catalítico de la CDK interfiriendo así con la unión del ATP y la actividad catalítica (Russo et al., 1996). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que p21y p27 promueven el ensamblaje y la importación nuclear de los complejos ciclina D-CDK4/6, teniendo así una función dual en la regulación de complejos ciclina/CDK (LaBaer et al., 1997).

Inhibidores de CDKs en plantas

Familia ICK/KRP

Los primeros inhibidores de CDKs que se encontraron en plantas se obtuvieron a través de un screening por doble híbrido usando a la CYCD3;1 y a la CDKA;1 de *A. thaliana* como anzuelos. El análisis de las secuencias de las clonas positivas reveló varios genes que codificaban para una familia de proteínas relacionadas las cuales fueron nombradas como ICKs (por inhibidor/interactor de la cinasa Cdc2, ahora conocida como CDK) (Wang et al., 1997). En plantas las proteínas relacionadas con los ICKs se conocen también como KRPs (por proteínas relacionadas a la familia Kip de mamíferos), por lo que ahora la familia de inhibidores en plantas se conocen como ICK/KRPs (De Veylder et al., 2001).

La característica de la familia de inhibidores ICK/KRP es la conservación de un dominio hacia su extremo C-terminal el cual guarda una similitud con la región responsable de la unión e inhibición de los complejos ciclina/CDK del inhibidor p27^{Kip1} de mamíferos. Estudios de mapeo de dominios mostraron que la interacción de ICK/KRP con CDKs tipo A y ciclinas D es a través de este dominio en el C-

terminal el cual es conocido como dominio de interacción/inhibición de ciclina/CDK (CID) (figura 5) (Lui et al., 2000; Wang et al., 1998). En *Arabidopsis* la familia ICK/KRP tiene siete miembros (De Veylder et al., 2001), mientras que en otras plantas se han identificado ICK/KRPs por medio de ensayos de doble híbrido o por estudios *in silico* como en tabaco (Jasinski et al., 2003), maíz (Godínez-Palma et al., 2017), alfalfa (Pettkó-Szandtner et al., 2006), jitomate (Bisbis et al., 2006) y arroz (Barrôco et al., 2006). En un estudio se encontraron secuencias relacionadas con ICK/KRP en más de 60 especies de plantas vasculares e interesantemente, no encontraron secuencias relacionadas con ICK/KRP en algas y briófitas. Además, los análisis filogenéticos mostraron que las proteínas ICK/KRP pueden agruparse en tres clases principales: mientras que la clase C contiene secuencias tanto de plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas, las clases A y B contienen solo secuencias de plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas respectivamente, lo que sugiere que las clases A y B podrían haber evolucionado a partir de la clase C (Torres Acosta et al., 2011).

Excluyendo los dos motivos conservados en la región C-terminal, los inhibidores de CDKs en plantas difieren mucho entre ellos y con los inhibidores de CDKs de mamíferos y levaduras.

Interacción proteína-proteína e inhibición de la actividad de cinasa

Las proteínas ICK/KRP son reguladores centrales del ciclo celular, por lo que estudiar a qué otras proteínas del ciclo celular se pueden unir es importante para conocer su especificidad funcional. Todas las proteínas ICK/KRP de espermatofitas conservan el dominio CID (figura 5), la delección de este dominio en la ICK1/KRP1 de *Arabidopsis* tiene como resultado una inhibición reducida de la actividad de cinasa de la CDK y de la proliferación celular (Zhou et al., 2003).

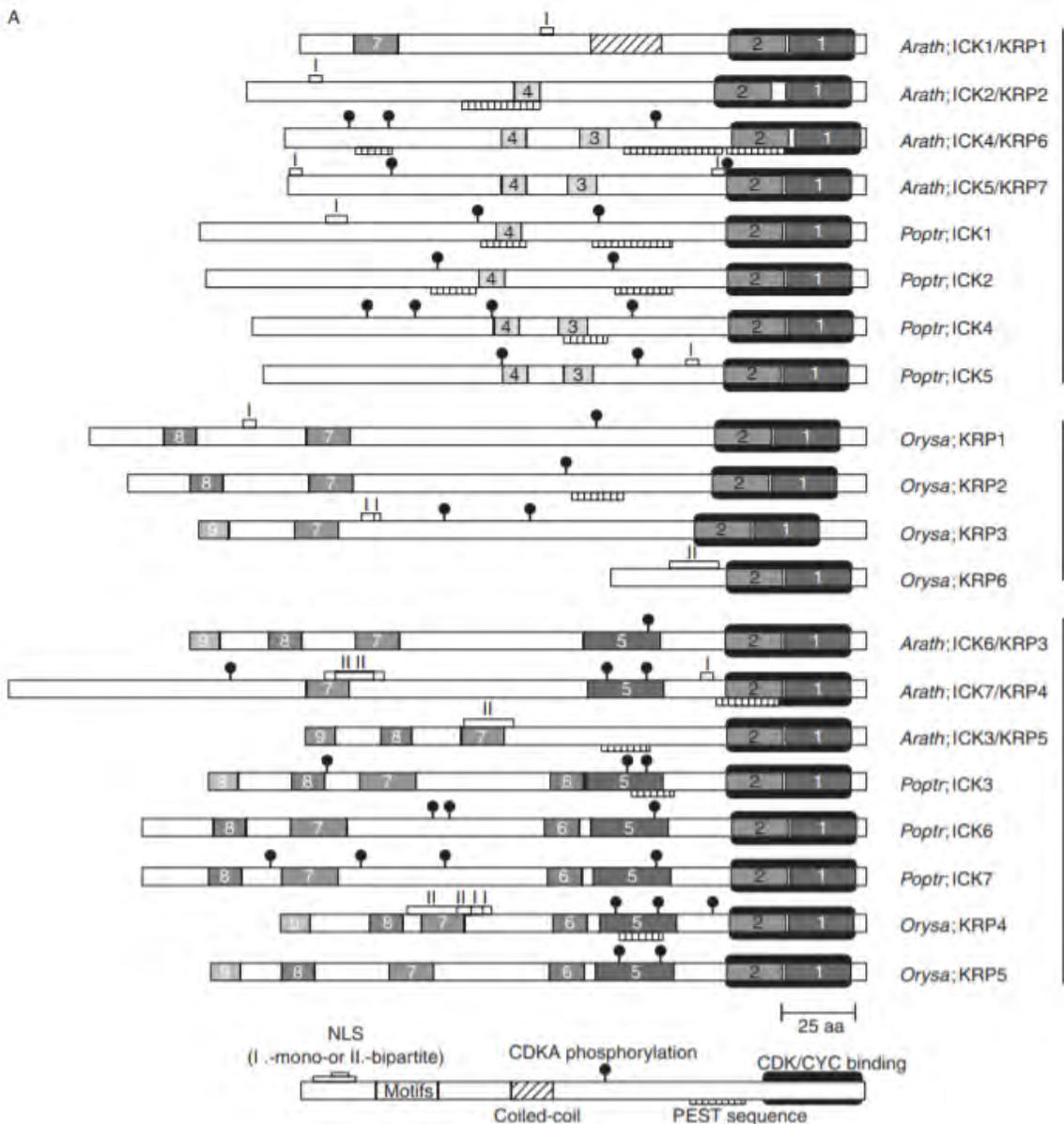


Figura 5. Motivos putativos funcionales y conservados en proteínas ICK/KRP de plantas. Los motivos putativamente funcionales están representados por símbolos, y los motivos conservados se indican con rectángulos (con la explicación de cada uno). Las secuencias se organizan de acuerdo con su relación filogenética (Torres Acosta *et al.*, 2011)

Con el sistema de doble híbrido se ha reportado que las siete ICK/KRPs de *Arabidopsis* son capaces de interactuar con las ciclinas D, sólo algunos inhibidores pueden interactuar con CDKA y ninguno con la CDKB. Consistente con esto, se ha demostrado que CDKA pero no CDKB;1 se asocia con complejos

inmunoprecipitados con anticuerpos contra la proteína recombinante HA-KRP2 expresada en plantas de *Arabidopsis* (Verkest et al., 2005). Aunque la especificidad de las interacciones de las proteínas ICK/KRP con diferentes CDKs y ciclinas no ha sido entendida completamente, se cree que los complejos CDKA/CYCD deberían ser los principales blancos de las proteínas ICK/KRP, al menos en *Arabidopsis* (De Veylder et al., 2001; Zhou et al., 2002). Sin embargo, otros informes han demostrado que las ICK/KRPs también pueden interactuar con otros complejos diferentes a los formados por CYCD/CDKA incluyendo complejos formados por CDKB/CYCD2 (Nakai et al., 2006), complejos formados por CDKB2;1/CYC en alfalfa (Pettkó-Szandtner et al., 2006) y CYCA/CDKB en maíz (Coelho et al., 2005).

Se ha demostrado el efecto inhibitorio de las proteínas recombinantes KRP1 y KRP2 de *Arabidopsis* sobre la actividad de cinasa de complejos CDK/CYC obtenidos a partir de extractos proteicos usando a la proteína P13^{Suc1} (subunidad que forma parte de los complejos ciclina/CDK) conjugada con perlas de agarosa (Lui et al., 2000; Wang et al., 1997); ensayos de inhibición mediante la adición de proteínas ICK/KRP recombinantes se han hecho también en tabaco (Jasinski, Perennes, et al., 2002), maíz (Coelho et al., 2005; Godínez-Palma et al., 2017), alfalfa (Pettkó-Szandtner et al., 2006) y jitomate (Bisbis et al., 2006).

La sobreexpresión de KRP1 en plantas de *Arabidopsis* inhibe la actividad de CDK y las divisiones celulares, lo que resulta en una reducción en el crecimiento y cambios en la morfología de hojas y flores (Wang et al., 2000). Efectos similares se observaron en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan a KRP2 o KRP6, así como ICKs de *Chenopodium rubrum* y de tabaco (Jasinski, Riou-Khamlichi, et al., 2002; De Veylder et al., 2001; Zhou et al., 2002), reflejando su función común como inhibidores de CDKs y de la división celular.

Familia SIM/SMR

La otra familia de inhibidores de CDKs en plantas es codificada por genes conocidos como SIAMESE-RELATED (SMR) (Churchman et al., 2006). SIAMESE (SIM), el primer miembro descubierto de esta familia codifica un inhibidor de CDKs que desempeña un papel clave en el establecimiento de ciclos de endoreduplicación en

tricomas de *Arabidopsis*. Otros SMRs de *Arabidopsis* han sido implicados en la unión con distintos complejos ciclina/CDK, y se ha demostrado que la proteína SMR EL2 de arroz (*Oryza sativa*) inhibe la actividad de cinasa de CDKA;1 (Peres et al., 2007). A diferencia de lo que pasa en *Arabidopsis* con las KRPs, los inhibidores SMR parecen estar exclusivamente involucrados en el establecimiento de un punto de control en G2, ya que una sobreexpresión de la proteína SIM bloquea la entrada a mitosis, induciendo un proceso en el cual se replica el DNA en ausencia de división celular, lo que resulta en un aumento en el contenido de DNA en las células. Sin embargo, nunca se ha observado que la sobreexpresión de SIM u otras SMR inhiban la replicación del DNA o causen muerte celular. Esto contrasta con lo que se ve con una fuerte sobreexpresión de la proteína ICK/KRP, la cual suprime la división celular y la replicación del DNA, y puede provocar la muerte celular (Schnittger et al., 2003). Se ha reportado que las SMR interactúan e inhiben *in vitro* e *in vivo* tanto a CDKA:1 como CDKB1;1 (Kumar et al., 2015).

Antecedentes inmediatos

El genoma de maíz contiene 9 genes que codifican para proteínas inhibidoras pertenecientes a la familia ICK/KRP, y se ha encontrado la expresión del transcrito de al menos uno de los miembros de esta familia de inhibidores en diferentes tejidos de la planta. Durante el proceso de germinación de maíz se reportó que todos los genes pertenecientes a la familia ICK/KRP se expresan a las 24 horas después de la imbibición, y que los niveles de expresión de KRP1;1 y KRP4;2 se mantienen constantes a lo largo de la germinación. Todas las proteínas ICK/KRP de maíz conservan el dominio de inhibición de cinasa (CID) hacia su C-terminal, y se clasificaron con base en análisis filogenéticos tanto en la clase B (presentes sólo en plantas monocotiledóneas) como en la C (presentes en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas) (Godínez-Palma et al., 2017).

La caracterización funcional de diferentes miembros de la familia ICK/KRP de maíz ha permitido dilucidar que entre miembros de esta familia de inhibidores existe una diferencia en cuanto a su capacidad de inhibición e interacción con otras proteínas relacionadas con el ciclo celular (principalmente complejos Ciclina/CDK), lo que sugiere que existen complejos ciclina/CDK con una mayor o menor susceptibilidad a ser inhibidos, la cual depende del inhibidor que se encuentre unido al complejo (Coelho et al., 2005; Garza-Aguilar et al., 2019; Godínez-Palma et al., 2017).

En la germinación de maíz se ha visto que un miembro de la familia ICK/KRP (nombrado como KRP4;2), presenta diferencias en su capacidad inhibitoria a lo largo de la germinación. KRP4;2 fue capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a inmunoprecipitados de PCNA y CYCD2;1, principalmente en tiempos tempranos de la germinación; mientras que los complejos obtenidos usando a p13^{Suc1}, eran más susceptibles de inhibición hacia tiempos tardíos de la germinación. Estos resultados sugieren que cada uno de estos complejos contiene una población de ciclinas o CDKs asociadas, la cual cambia conforme avanza la germinación, lo que reflejaría las diferencias en la capacidad inhibitoria de KRP4;2 a lo largo de la germinación (Juárez et al., 2008).

Es relevante mencionar que las ciclinas tipo D son fundamentales para el inicio o re-inicio del ciclo celular ya que responden a señales que promueven la entrada al ciclo celular. En maíz podemos encontrar 17 ciclinas D, siendo la D3;1 una ciclina que se encuentra presente a lo largo de la germinación de semillas de maíz y cuya estabilidad depende de la presencia de sacarosa en el medio (Buendía-Monreal et al., 2011; Garza-Aguilar et al., 2017), lo que la convierte en un importante regulador de las fases iniciales del ciclo celular durante la germinación.

Justificación

La regulación de los diferentes complejos CycD/CDKs en plantas es todavía poco entendida. Entre los reguladores de estos complejos podemos encontrar a la familia de inhibidores ICK/KRP, los cuales han mostrado una asociación e inhibición diferencial sobre distintos complejos Cyc/CDKs. Estos datos sugieren que los miembros de la familia ICK/KRP, presentan una especificidad de unión (y por lo tanto de inhibición) hacia ciertos complejos Cyc/CDKs. El presente trabajo, por lo tanto, busca aportar más datos sobre la interacción y capacidad de inhibición de dos miembros de esta familia de inhibidores sobre proteínas involucradas en el control del ciclo celular, como lo son la ciclina D3;1, CDKA y CDKB1;1; con el fin de comprender mejor los mecanismos de regulación del ciclo celular en la germinación de maíz.

Hipótesis

Existirá una asociación proteína-proteína entre KRP1;1 y CYCD3;1, así como de KRP4;2 y CYCD3;1. Por otra parte, en extractos proteicos provenientes de ejes embrionarios de maíz, CDKB1;1 será capaz de asociarse con la familia de inhibidores ICK/KRP.

Durante la germinación de maíz, los diferentes complejos formados por Ciclinas y CDKs, presentarán una inhibición diferencial de su actividad de cinasa por parte de KRP1;1 y KRP4;2.

Objetivo general

Demostrar la asociación y efecto inhibitorio de KRP1;1 y KRP4;2 sobre los distintos complejos ciclina D3;1/CDK que se forman a lo largo de la germinación de semillas de maíz.

Objetivos particulares

- Determinar la interacción entre CYCD3;1 y CDKA así como de CYCD3;1 y CDKB, mediante el uso de proteínas recombinantes.
- Determinar la interacción entre CYCD3;1 y KRP1;1 así como de CYCD3;1 y KRP4;2, mediante el uso de proteínas recombinantes.
- Determinar la interacción entre CDKB1;1 y el grupo de inhibidores de la familia ICK/KRP de maíz.
- En extractos proteicos provenientes de diferentes tiempos de la germinación de maíz, analizar el efecto inhibitorio de las proteínas recombinantes KRP1;1 y KRP4;2 sobre los complejos CDKA/CYC y CDKB1;1/CYC.
- En extractos proteicos provenientes de diferentes tiempos de la germinación de maíz, analizar el efecto inhibitorio de las proteínas recombinantes KRP1;1 y KRP4;2 sobre los complejos CYCD3;1/CDK.

Metodología

Material biológico

Se utilizaron ejes extraídos de semillas de maíz (*Zea mays var. Chalqueño*), obtenidas de Chalco, Estado de México y almacenadas a 4° C hasta su uso.

Imbibición de los ejes embrionarios

Los ejes embrionarios extraídos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (0.5 % v/v) en agitación constante por 5 min, tras este tiempo, se realizaron cinco lavados con agua desionizada estéril con el fin de quitar los restos de hipoclorito de sodio. Para eliminar el exceso de agua, los ejes fueron colocados en un papel Whatman No. 1 estéril. Posteriormente los ejes fueron embebidos por 0, 12 y 24 h sobre una hoja de papel Whatman No. 1 en una caja Petri con un amortiguador de imbibición (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl, sacarosa 2% p/v, pH 7.4) y puestos en una estufa a 25° C en oscuridad.

Extracción de proteínas

Los ejes embrionarios embebidos a diferentes horas fueron homogenizados en un mortero con un amortiguador de extracción (25 mM Tris-HCl pH 7.5.). Después de homogenizar los ejes, se centrifugó la muestra a 12 000 g por 30 min, retirando la fase acuosa enriquecida en proteínas solubles y repitiendo la centrifugación. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford.

Ensayos de interacción por inmunoprecipitación

El anticuerpo anti-GST-ICK/KRP (10 µl) fue conjugado por 3 h a 4° C con 20 µl de proteína A Agarosa-magnetizada y 500 µl de PBS 1X con 1mM de PMSF y 1mM de benzamidina. Después de las 3 h de conjugación, se retiró el sobrenadante y se lavó con 500 µl de PBS 1X con 1mM de PMSF y 1mM de benzamidina por 5 min a 4° C. Tras los 5 min, se retiró el sobrenadante y se agregaron 1.5 mg de extracto proteico de ejes embrionarios y 500 µl de PBS 1X con 1mM de PMSF y 1mM de benzamidina, y se dejó toda la noche a 4° C; este procedimiento se realizó dos

veces, ya que unas muestras se revelaron usando el anticuerpo anti-ICK/KRP y otras se revelaron usando el anticuerpo anti-CDKB1;1. Al día siguiente, las muestras que serán reveladas usando el anticuerpo anti-ICK/KRP (control usado para asegurarnos que el anti-ICK/KRP sí es capaz de inmunoprecipitar a la proteína ICK/KRP), fueron lavadas 4 veces con PBS 1X con 1mM de PMSF y 1mM de benzamidina. Mientras que las muestras que serán reveladas usando el anticuerpo anti-CDKB1;1 (para confirmar o no la presencia de CDKB1;1 en los inmunoprecipitados usando anti-ICK/KRP) fueron lavadas 4 veces con amortiguador A (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 2.5 mM EDTA pH 8.0, 2.5 mM NaF, 0.1% Tritón X-100) por 4 min. En ambos casos el anticuerpo primario contra ICK/KRP y CDKB1;1 se utilizó en una dilución 1/500. Ambos anticuerpos secundarios se usaron a una dilución 1/500.

Cepas

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RILP, transformada con el vector pGEX-4T2 para la inducción de las proteínas recombinantes ZmCDKA;1, ZmCDKB1;1, ZmKRP1;1, ZmKRP4;2 y *E. Coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RILP transformada con el vector pMal-C5x para la inducción de la proteína recombinante ZmCycD31;a.

Expresión de proteínas recombinantes

A partir de cepas de *E. coli* que sobreexpresan las diferentes proteínas (generadas previamente en nuestro grupo de investigación), se tomó una asada de cada colonia de bacterias transformadas y se inocularon en 4 ml de medio LB estéril, más el correspondiente antibiótico de selección. Los cultivos se incubaron por 12h a 37°C con agitación constante a 150 rpm en un equipo LAB-LINE Orbit. Después de la incubación se tomaron 4 ml de cada cultivo y se transfirieron a matraces de 1000 mL con 200 mL de medio LB estéril más el correspondiente antibiótico de selección. Dichos cultivos se incubaron a 37°C hasta alcanzar una D.O a 600nm de entre 0.4 y 0.6, y se les adicionó IPTG a una concentración de 0.5 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante por 3 h (para tener un control de la sobreexpresión de las proteínas se tomó 1 ml del cultivo antes de inducir con IPTG

y 1 ml del cultivo después de las 3 h de inducción). A continuación, estos medios se transfirieron a botellas de 250 mL, se centrifugaron a 6,500 rpm en un rotor Sorvall modelo SL-250T por 20 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el pellet se almacenó a -70°C para su posterior uso.

Interacción *In-vitro* de proteínas recombinantes

Después de sobreexpresar las proteínas recombinantes, el pellet de cada cultivo se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis, estos volúmenes se juntaron en un solo tubo, de tal manera que el volumen final fuera de 10 ml. Por ejemplo, si la interacción que se quiere observar es entre GST-KRP1;1 y MBP-CycD3;1a, entonces los pellets resuspendidos de cada cepa que sobreexpresa la proteína recombinante correspondiente se juntan en un solo tubo para tener un volumen final de 10 ml. Se agregó lisozima (1mg/ml) y se incubó a 4°C por 30 min. Posteriormente se lisaron las bacterias mediante sonicación en un equipo Vibra Cell VC505 a una amplitud de 20% por un min. Tras la sonicación, el lisado con las dos proteínas recombinantes se dejó una hora a 4°C en agitación para permitir la posible interacción de las proteínas. Tras la hora de incubación, el lisado se centrifugó a 12,500 rpm por 17 min a 4°C en un rotor Sorvall SL-50T. El pellet se desechó y el sobrenadante se pasó por filtros de 0.45 µm de diámetro para eliminar cualquier residuo. La fracción soluble filtrada se pasó por una columna con 1 ml de resina Glutathion-sefarosa 4B (previamente equilibrada con 10 ml de buffer de lisis), con el fin de separar a la proteína recombinante y su posible proteína de interacción por cromatografía de afinidad. La resina con la proteína recombinante unida se lavó con 50 ml de buffer de lisis + 0.1% de tritón X-100 y 50 ml de buffer de lisis sin tritón X-100. Después de los lavados se eluyó la proteína agregando 0.5 ml de buffer de elución a la resina e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente para cada elución.

Durante cada paso de la purificación se tomaron aproximadamente 1 ml de la fracción insoluble (pellet), fracción soluble, fracción no adsorbida, lavado, y cinco eluciones. Cada una de estas muestras fue corrida en un gel SDS-PAGE 12% y transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF de 45 µm) para la posterior identificación de las proteínas mediante el uso de anticuerpos.

Se realizaron los controles pertinentes de la interacción *in vitro* pasando a la proteína MBP-CycD3;1a por la columna de Glutation-sefarosa para descartar cualquier unión inespecífica de la proteína recombinante a la columna de glutatión. También se corroboró que tanto GST-KRP1;1, GST-KRP4;2, GST-CDKA;1 y CDKB1;1 no interaccionan con el tag de MBP (anexo 1 y 2). En el caso de la detección de las proteínas con GST, el anticuerpo primario se usó a una dilución 1/20,000, y para MBP fue de 1/35,000.

Purificación y cuantificación de KRP1;1 y KRP4;2 para ensayos de inhibición de cinasa

Para la inducción (como se describió anteriormente) se partió de medios de cultivo de 300 ml para KRP1;1 y 200 ml para KRP4;2. Tras la inducción de la proteína correspondiente (KRP1;1 o KRP4;2), el pellet fue resuspendido en 8 ml de buffer de lisis hasta su total homogenización. Se agregó lisozima (1mg/ml) y se incubó a 4°C por 30 min. Posteriormente se agregó 1% de lauroil sarcosinato de sodio (sarkosyl) y se dejó en agitación sobre hielo por media hora. Se lisaron las bacterias mediante sonicación en un equipo Vibra Cell VC505 a una amplitud de 20% por 1 min, para después agregarles 2% de tritón X-100 e incubar las muestras por una hora sobre hielo. El lisado se centrifugó a 12,500 rpm por 17 min a 4°C en un rotor Sorvall SL-50T. El pellet se desechó y el sobrenadante se pasó por filtros de 0.45 µm de diámetro para eliminar cualquier residuo. La fracción soluble filtrada se pasó cinco veces por una columna con 1 ml de resina Glutation-sefarosa 4B previamente equilibrada con 10 ml de buffer de lisis. La resina con la proteína recombinante unida se lavó con 50 ml de buffer de lisis + 0.1% de tritón X-100 y 50 ml de buffer de lisis sin tritón X-100. Después de los lavados, se eluyó la proteína agregando 0.5 ml de buffer de elución a la resina e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente para cada elución. Posteriormente cada elución fue concentrada utilizando filtros Amicon Ultra.0.5 ml 3 K, tal como se especifica en el manual, pero modificando la centrifugación inicial a 12,000 g x 4 min a 4 °C. Después de concentrar las eluciones, las muestras fueron corridas en un gel SDS-PAGE al 12% y fueron cuantificadas usando una curva estándar con cantidades conocidas de BSA (anexo 3), usando el software Image J.

Ensayos de actividad de cinasa

En tubos eppendorf de 1.5 ml se agregaron 20 μ l de resina (proteína A) más 7 μ l del correspondiente anticuerpo (α -CDKA, α -CDKB1:1, α -CycD4;2, α -CycD5;3 y α -CycD3;1) y se llevó a un volumen final de 500 μ l con PBS + 1mM de benzamidina + 1 mM de PMSF, y se incubó con rotación a 4 °C por 8 h. Al siguiente día se centrifugó la resina a 500 g x 1 min, se descartó el sobrenadante y se lavó con 500 μ l de PBS más inhibidores. Se volvió a centrifugar y descartó el sobrenadante, con la resina casi seca se agregó 500 μ l de PBS + inhibidores y 300 μ g del extracto proteico correspondiente, se incubó por 3 h con rotación a 4°C. Tras la incubación se realizaron 4 lavados a la resina: 2 lavados con amortiguador A, uno con PBS + inhibidores y el último con buffer de cinasa (Tris-HCl 70 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1mM, EGTA 5 mM, ATP 20 μ M). En el último lavado con buffer de cinasa se trató de dejar la resina lo más seca posible. Las muestras con los inmunoprecipitados que iban a ser usados para los ensayos de inhibición por KRP1;1 y KRP4;2 fueron incubados a 30° C por 30 min con la proteína recombinante correspondiente y en la cantidad también correspondiente. Posteriormente, todos los tubos (inhibición y no inhibición) se incubaron con 20 μ l de buffer de cinasa con 4 μ Ci de [γ -³²P]-ATP por 30 min a 30 ° C. Como sustrato de fosforilación se usó 1 μ g de histona H1 recombinante. Tras los 30 min la reacción de cinasa fue detenida agregando buffer de carga. Las muestras se desnaturalizaron a 85° C por 5 min y fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE. Tras la electroforesis los geles fueron lavados para retirar el exceso de SDS y fueron teñidos con azul de coomassie. Al siguiente día ya con los geles desteñidos, estos fueron secados al vacío a 80 ° C por una hora y media y puestos a exposición por 48 h en una placa de detección de Europio (Kodak). La lectura de la placa se realizó escaneando la placa de Europio con el equipo Personal Imager FX (Bio-Rad).

Resultados

Interacción *in vitro* de CycD3;1a con CDKA;1 y CDKB1;1

Previo a este trabajo, se había reportado mediante ensayos de inmunoprecipitación la presencia de complejos constituidos por CycD3;1/CDKA y CycD3;1/CDKB1;1 a lo largo de la germinación de maíz (Garza-Aguilar et al., 2017); sin embargo, queda por dilucidar si CycD3;1 tiene la capacidad de unirse con a estas dos CDKs sin la necesidad de una proteína que ayude a la formación del complejo, y si esto podría influir en su capacidad de ser inhibida. Mediante un ensayo de *pull down* utilizando las proteínas recombinantes GST-CDKA;1 y GST-CDKB1;1 unidas a la resina de Glutation-sefarosa, se realizó la cromatografía de afinidad para evaluar la posible interacción con la proteína recombinante MBP-CycD3;1a. Una vez llevado a cabo el ensayo de *pull-down*, se recolectaron 5 eluciones con el fin de detectar con anticuerpos específicos la presencia de las proteínas ancladas a la columna de afinidad, así como también detectar la posible co-elución de la CycD3;1a, con el fin de confirmar o no su interacción. Para el caso de GST-CDKA;1 y GST-CDKB1;1 se utilizó el anticuerpo α -GST, mientras que para detectar la proteína MBP-CycD3;1a, se utilizó el α -MBP o el α -CycD3;1 generado en un trabajo previo (Garza-Aguilar et al., 2017). Las masas moleculares esperadas de las proteínas recombinantes son las siguientes: GST-CDKA;1 (59kDa), GST-CDKB1;1 (62 kDa) y MBP-CycD3;1a (83.5 kDa). Así mismo también se recolectaron fracciones para monitorear la correcta inducción, solubilidad y pureza de las proteínas recombinantes. Como podemos observar en las figuras 6 y 7, CycD3;1a es capaz de co-eluir tanto con CDKA;1 como con CDKB1;1, confirmando la formación de los complejos heterodiméricos formados por CDKA;1/CycD3;1a y CDKB1;1/CycD3;1a. En las eluciones revelando a la proteína MBP-CycD3;1a (figura 6), podemos observar tanto la inducción como la elución de dos bandas, una banda corresponde a la masa molecular teórica esperada (83.5 kDa), y otra con una masa molecular menor, la cual podría ser una forma trunca de la proteína CycD3;1a, ya que cuando usamos el anticuerpo α -CycD3;1 (figura 7), éste es capaz de detectar también ambas bandas, confirmando que las dos bandas pertenecen a la proteína MBP-CycD3;1a.

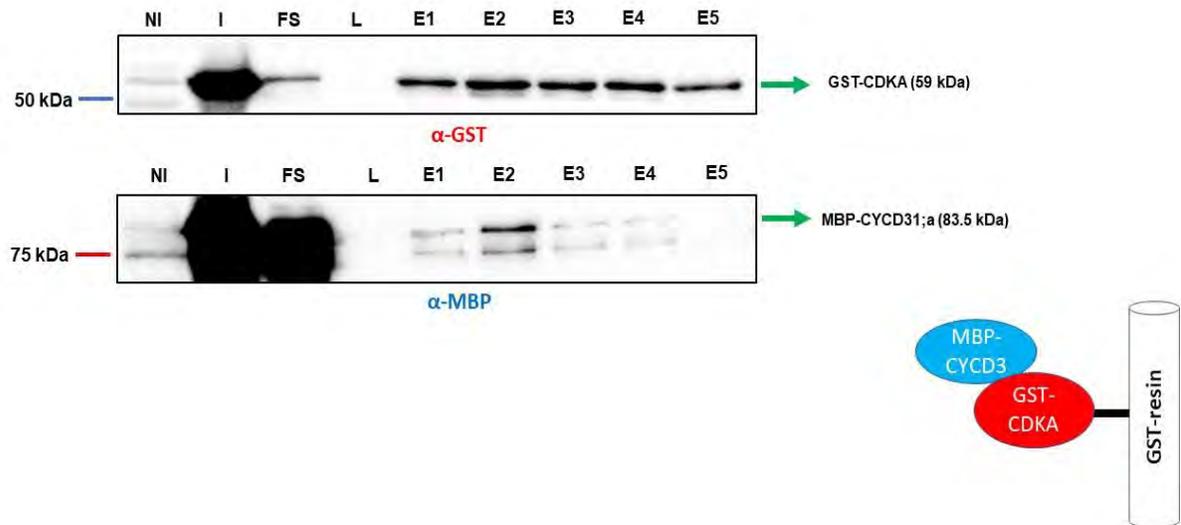


Figura 6. Interacción in-vitro entre CDKA;1 y CycD3;1a usando la resina de sefarosa glutatión para purificar y coeluir a CDKA en complejo con CycD3;1a . Se realizaron western blots utilizando anticuerpos α -GST y α -MBP para identificar a CDKA y CycD3;1a respectivamente. Las flechas indican la presencia de la proteína recombinante en las diferentes fracciones, así como su masa teórica. NI: no inducida; I: inducida; FS: fracción soluble; L: Lavado; E1...E5: 5 eluciones. Imagen representativa de tres triplicados biológicos independientes.

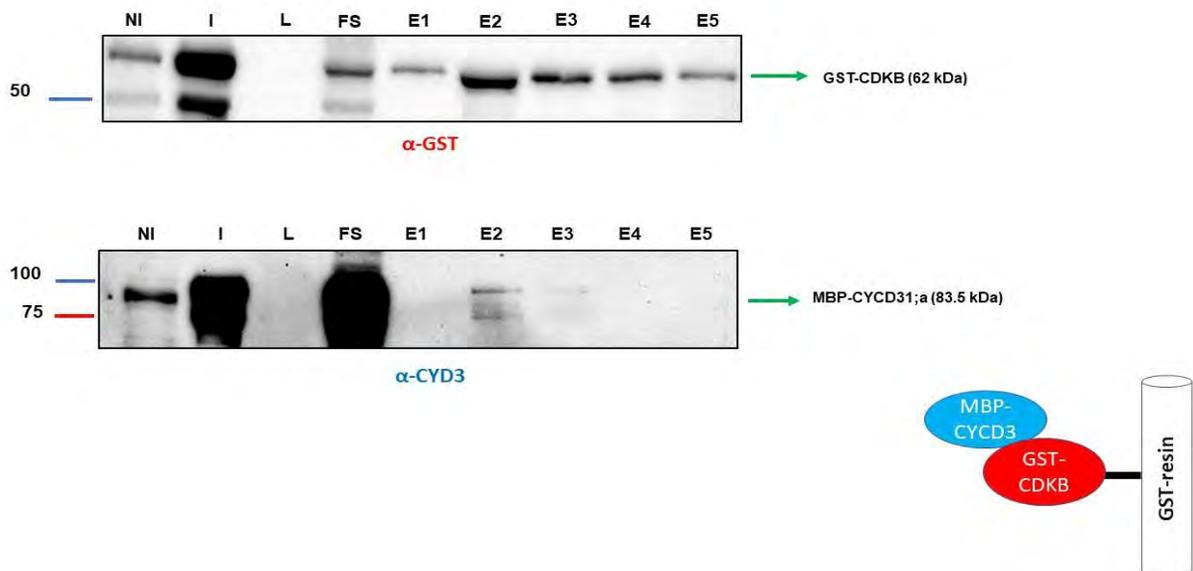


Figura 7. Interacción in-vitro entre CDKB1;1 y CycD3;1a usando la resina de sefarosa glutatión para purificar y coeluir a CDKA en complejo con CycD3;1a . Se realizaron western blots utilizando anticuerpos α -GST y α -CycD3;1 para identificar a CDKB1;1 y CycD3;1a respectivamente. Las flechas indican la presencia de la proteína recombinante en las diferentes fracciones, así como su masa teórica. NI: no inducida; I: inducida; FS: fracción soluble; L: Lavado; E1...E5: 5 eluciones. Imagen representativa de tres triplicados biológicos independientes.

Interacción *in-vitro* de CycD3;1a con KRP1;1 y KRP4;2

Con el fin de conocer más sobre las interacciones proteína-proteína entre miembros de la familia de inhibidores ICK/KRP con ciclinas tipo D de maíz, se estudió la CycD3;1a, cuya interacción con los miembros de la familia de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas no ha sido reportada previamente. En *A. thaliana* se sabe que todos los miembros de la familia ICK/KRP tienen la capacidad de interactuar proteína-proteína con todas las ciclinas D probadas, incluso las 7 KRPs de *A. thaliana* son capaces de interactuar *in-vitro* con la AtCycD3 (De Veylder et al., 2001; Zhou et al., 2002).

Mediante un ensayo de *pull-down* utilizando las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2 unidas a la resina de Glutation-sefarosa, se realizó la cromatografía de afinidad para evaluar su posible interacción con la proteína recombinante MBP-CycD3;1a. Una vez llevado a cabo el ensayo de pull-down, se recolectaron 5 eluciones con el fin de detectar con anticuerpos específicos la presencia de las proteínas ancladas a la columna de afinidad, así como también detectar la posible co-elución de la CycD3;1a con el fin de confirmar o no su interacción. Para el caso de GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2 se utilizó el anticuerpo α -GST, mientras que para la proteína MBP-CycD3;1a, se utilizó el α -MBP. Las masas moleculares esperadas de las proteínas recombinantes son las siguientes: GST-KRP1;1 (52.2kDa), GST-KRP4;2 (47.7 kDa) y MBP-CycD3;1a (83.5 kDa). Así mismo también se recolectaron fracciones para monitorear la correcta inducción, solubilidad y pureza de las proteínas recombinantes. Lo que se ilustra en las figuras 8 y 9 es la co-elución de la proteína CycD3;1a con KRP1;1 y KRP4;2, lo que confirma la interacción directa entre estos dos inhibidores y la ciclina D3;1a.

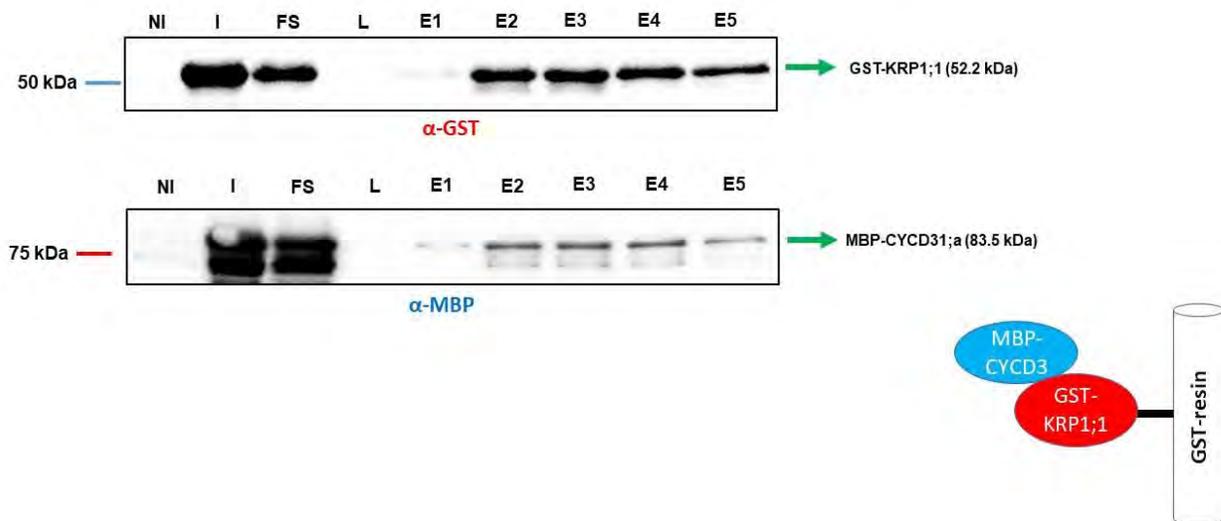


Figura 8. Interacción in-vitro entre KRP1;1 y CYD3;1a usando la resina de sefarosa glutatión para purificar y coeluir a KRP1;1 en complejo con CycD3;1a . Se realizaron western blots utilizando anticuerpos α -GST y α -MBP para identificar a KRP1;1 y CycD3;1a respectivamente. Las flechas indican la presencia de la proteína recombinante en las diferentes fracciones, así como su masa teórica. NI: no inducida; I: inducida; FS: fracción soluble; L: Lavado; E1...E5: 5 eluciones. Imagen representativa de tres triplicados biológicos independientes.

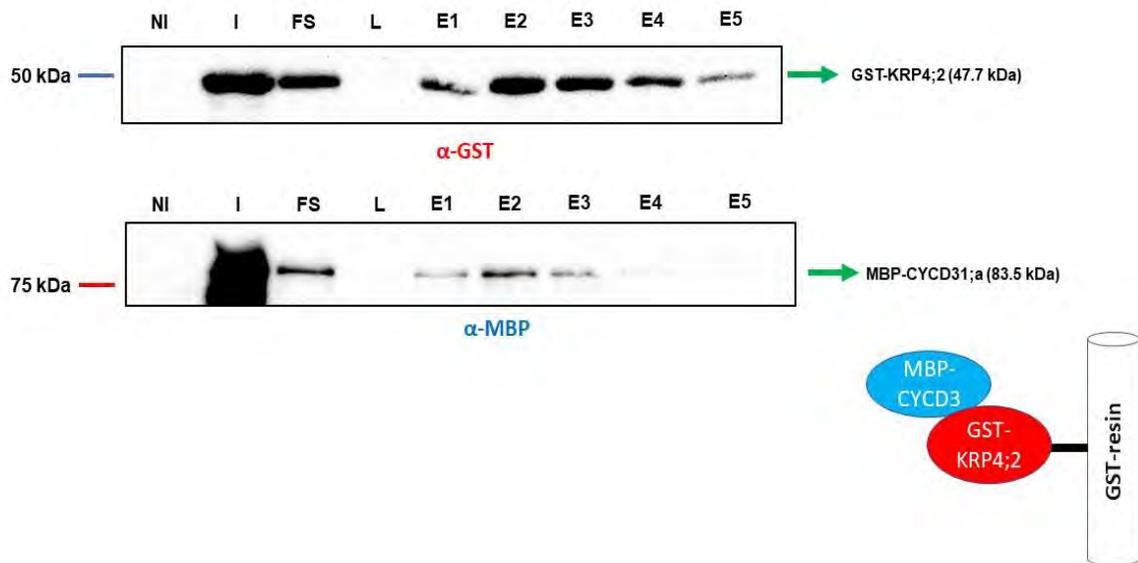


Figura 9. Interacción in-vitro entre KRP4;2 y CycD3;1a usando la resina de sefarosa glutatión para purificar y coeluir a KRP4;2 en complejo con CycD3;1a . Se realizaron western blots utilizando anticuerpos α -GST y α -MBP para identificar a KRP4;2 y CycD3;1a respectivamente. Las flechas indican la presencia de la proteína recombinante en las diferentes fracciones, así como su masa teórica. NI: no inducida; I: inducida; FS: fracción soluble; L: Lavado; E1...E5: 5 eluciones. Imagen representativa de tres triplicados biológicos independientes.

Interacción de la familia de inhibidores ICK/KRP con CDKB1;1 durante la germinación de maíz

El anticuerpo α -ICK/KRP es capaz de inmunoprecipitar a CDKB1;1 en extractos proteicos de ejes embrionarios de 0 y 24 h

Análisis proteómicos han comprobado que las siete KRPs de *Arabidopsis* copurifican únicamente con CDKs tipo A y ciclinas D (Leene et al., 2011). Sin embargo, en alfalfa se ha visto que un inhibidor de CDKs conocido como KRPMt, se une a las CDKs tipo B MtCDKB2;1 y MtCDKB1;1, y es capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a MtCDKB2;1, pero no la de MtCDKB1;1 (Pettkó-Szandtner et al., 2006). Para tener un indicio sobre la interacción de CDKB1;1 con la familia de inhibidores ICK/KRP en maíz, se optó por utilizar un anticuerpo anti-GST-ICK/KRP, el cual fue producido contra la región C-terminal de la proteína KRP4;2, la cual es la región más conservada entre los 8 miembros de la familia ICK/KRP de maíz, y por lo tanto tendría la capacidad de reconocer a todas las KRPs de maíz (Juárez et al., 2008). Se corrió un SDS-PAGE utilizando extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0 y 24 h, y se estandarizaron las condiciones de lavados de la membrana para detectar a la proteína. Se probaron 3 condiciones, siendo la mejor incubar el anticuerpo primario con PBS 1%, Tritón X-100 0.2% y 2 % de leche, con lavados con PBS 1X y Tween 0.5 %. El anticuerpo reconoce una proteína de 23 kDa correspondiente a la masa teórica de KRP4;2, aunque también es capaz de reconocer otras bandas de menor o mayor masa molecular, las cuales podrían corresponder a otros miembros de la familia ICK/KRP, o a bandas inespecíficas (Figura 10).

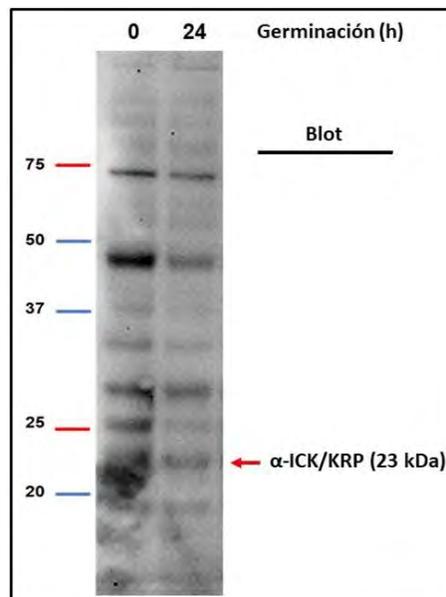


Figura 10. Inmunodetección de la proteína ICK/KRP en extractos proteicos de ejes embrionarios. A partir de una mezcla de extractos de ejes embrionarios embebidos por 0 y 24 h, se utilizó el anticuerpo anti-ICK/KRP para identificar a la proteína ICK/KRP (señalada con una flecha)

Una vez que se obtuvieron las condiciones para inmunodetectar a la proteína ICK/KRP, se usaron los anticuerpos anti-CDKB1;1 y anti-ICK/KRP para inmunoprecipitar e inmunodetectar complejos KRP/CDKB1;1 a partir de una mezcla de extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0 y 24 h. En el ensayo de inmunoprecipitación usando el anti-ICK/KRP para inmunoprecipitar, se puede observar la presencia de la proteína CDKB1;1, la cual es una proteína con una masa de 36 kDa, y que previamente en el grupo ha sido reportada como un doblete en extractos de ejes embrionarios (Godínez-Palma et al., 2013) (figura 11). Estos resultados indican que al menos uno de los miembros de la familia de inhibidores ICK/KRP de maíz es capaz de interactuar con la cinasa CDKB1;1 en extractos de ejes embrionarios de maíz. Así mismo, también se realizó un gel para corroborar la presencia de la proteína ICK/KRP en el ensayo de inmunoprecipitación, como control de que el anticuerpo es capaz de inmunoprecipitar a la proteína ICK/KRP (figura 12). Aunque el anticuerpo es capaz de reconocer varias bandas en extractos proteicos (figura 10), sólo es capaz de inmunoprecipitar la banda de 23 kDa, la cual corresponde a la masa molecular teórica de KRP4;2, por lo que podríamos especular que la interacción realmente corresponde a KRP4;2/CDKB1;1.

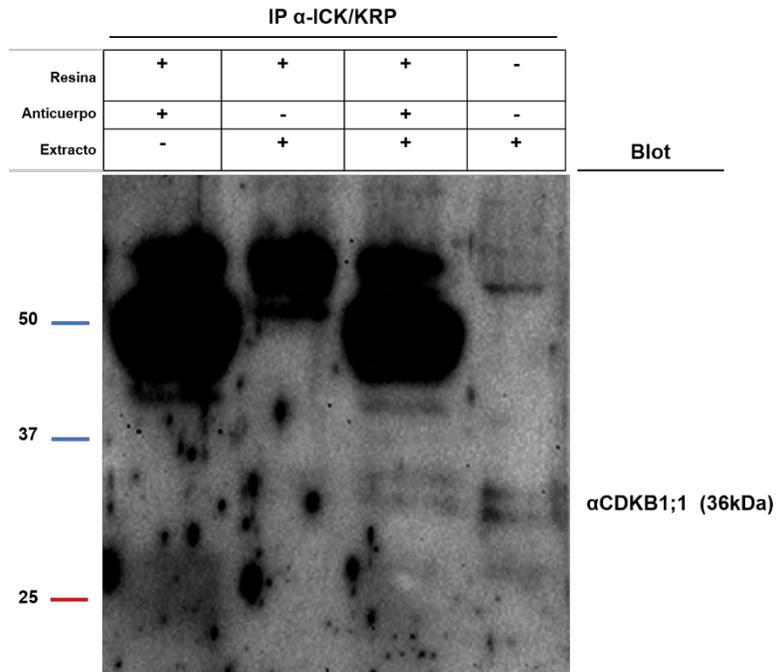


Figura 11. ICK/KRP se asocia con CDKB1;1 en extractos proteicos de maíz. Ensayo de inmunoprecipitación a partir de una mezcla de extractos de ejes embrionarios embebidos por 0 y 24 h, usando el anticuerpo anti-ICK/KRP para inmunoprecipitar y el anticuerpo anti-CDKB1;1 para identificar a la proteína CDKB1;1.

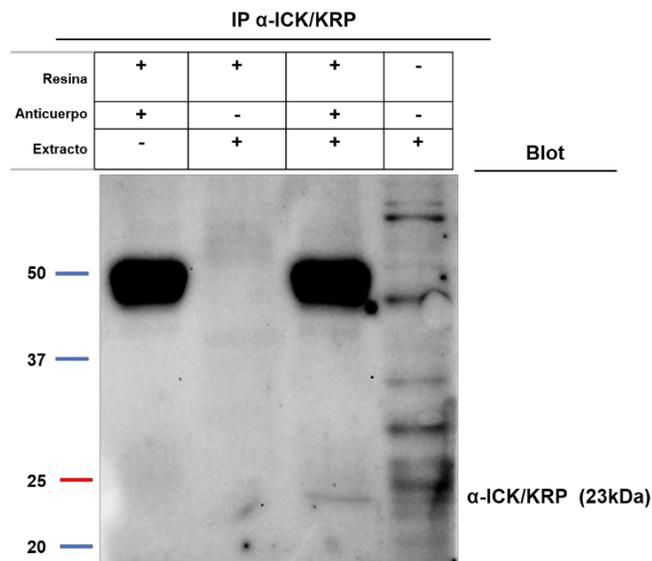


Figura 12. El anticuerpo anti-ICK/KRP es capaz de inmunoprecipitar a la proteína ICK/KRP. Ensayo de inmunoprecipitación a partir de una mezcla de extractos de ejes embrionarios embebidos por 0 y 24 h, usando el anticuerpo anti-ICK/KRP para inmunoprecipitar e identificar a la proteína ICK/KRP.

La familia de inhibidores ICK/KRP se asocia con CDKB1;1 a lo largo de la germinación de maíz

Teniendo las condiciones para inmunoprecipitar a las ICK/KRPs y co-detectar a CDKB1;1, se decidió probar si esta asociación pudiese cambiar a lo largo de la germinación. Para esto se utilizaron extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h. En la figura 13 se puede observar que el anticuerpo α -ICK/KRP es capaz de inmunoprecipitar a CDKB1;1 (36 kDa) en los tres tiempos de imbibición probados. Como se mencionó anteriormente, en el grupo de trabajo se ha reportado que el anticuerpo α -CDKB1;1 reconoce una banda correspondiente a la masa teórica de CDKB1;1 (36 kDa) y otra banda de mayor masa molecular. El anticuerpo ha sido competido y se cree que la banda de mayor masa molecular podría corresponder a una forma modificada postraduccionalmente de CDKB1;1 (datos no publicados). Algo a destacar es la presencia del doblete en los inmunoprecipitados a 0 y 12 h de imbibición, mientras que a las 24 h sólo se mantiene una de las dos bandas correspondientes a CDKB1;1. Con estos resultados podemos confirmar que la familia de inhibidores de CDKs (ICK/KRP) pueden unirse a la cinasa dependiente de ciclina CDKB1;1 de maíz a lo largo de la germinación.

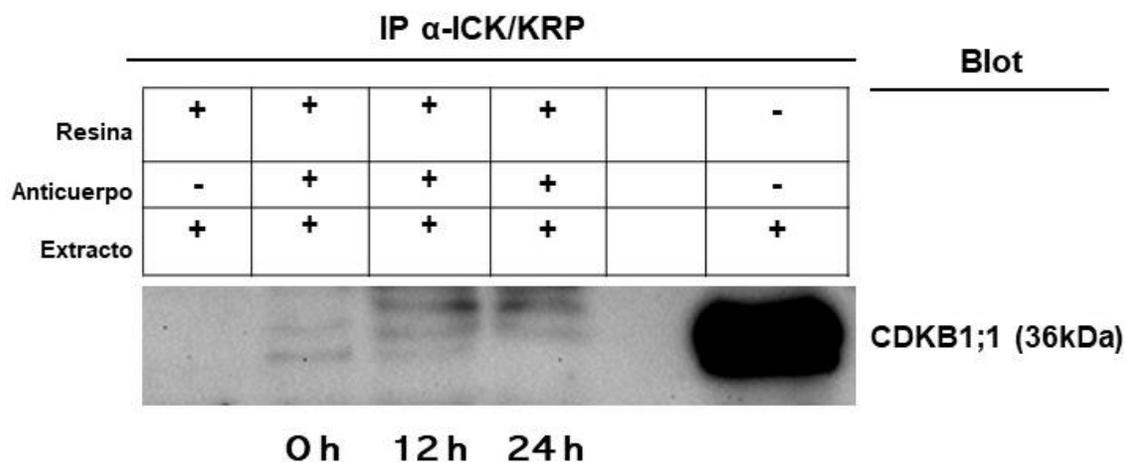


Figura 13. Asociación de ICK/KRP con CDKB1;1 en la germinación de maíz. Ensayo de inmunoprecipitación a partir de extractos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h, usando el anticuerpo anti-ICK/KRP para inmunoprecipitar y el anticuerpo anti-CDKB1;1 para identificar a la proteína CDKB1;1.

Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a complejos CYC/CDK

Se llevaron a cabo ensayos de actividad de cinasa para determinar el efecto de las proteínas recombinantes KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a inmunoprecipitados de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz con los anticuerpos anti-CDKA, anti-CDKB1;1 y anti-CycD3;1, y usando como sustrato a la proteína MBP-Histona H1.

Se decidió hacer las primeras pruebas partiendo de una mezcla de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 12 y 24 h. A partir de esta mezcla se realizaron inmunoprecipitados con anti-CDKA y anti-CDKB1;1. Para realizar los ensayos de inhibición los inmunoprecipitados con las diferentes CDKs fueron incubados por media hora a 30 °C con las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 (5 µg) y GST-KRP4;2 (5 µg de), según corresponda.

La actividad de cinasa de los complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc fue reducida al adicionar tanto KRP1;1 como KRP4;2 en comparación con los controles incubados con GST o a los cuales no se les adicionó KRP (Figura 14). Respecto a la capacidad inhibitoria, podemos observar que KRP1;1 fue capaz de abatir casi por completo la actividad de cinasa de los complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc, mientras que KRP4;2 disminuyó la actividad de cinasa de ambos complejos, pero esta disminución no fue tan dramática como la que se observa con KRP1;1. Como controles se usó resina incubada con anticuerpo e histona, pero no se agregó extracto proteico (C1); resina incubada con anticuerpo y extracto pero no se agregó histona (C2); y finalmente, un control agregando la misma cantidad de GST (5 µg) que se usó tanto de KRP1;1 como de KRP4;2 en los ensayos de inhibición, con el fin de asegurarnos que no es GST quien está afectando la actividad de cinasa de los diferentes complejos CDK/Ciclina. Cabe mencionar que la interacción reportada en este trabajo entre la familia de inhibidores y la CDKB1;1 sí podría tener una función fisiológica, ya que la actividad asociada a CDKB1;1 es susceptible de ser inhibida por ambas KRPs (Figura 14).

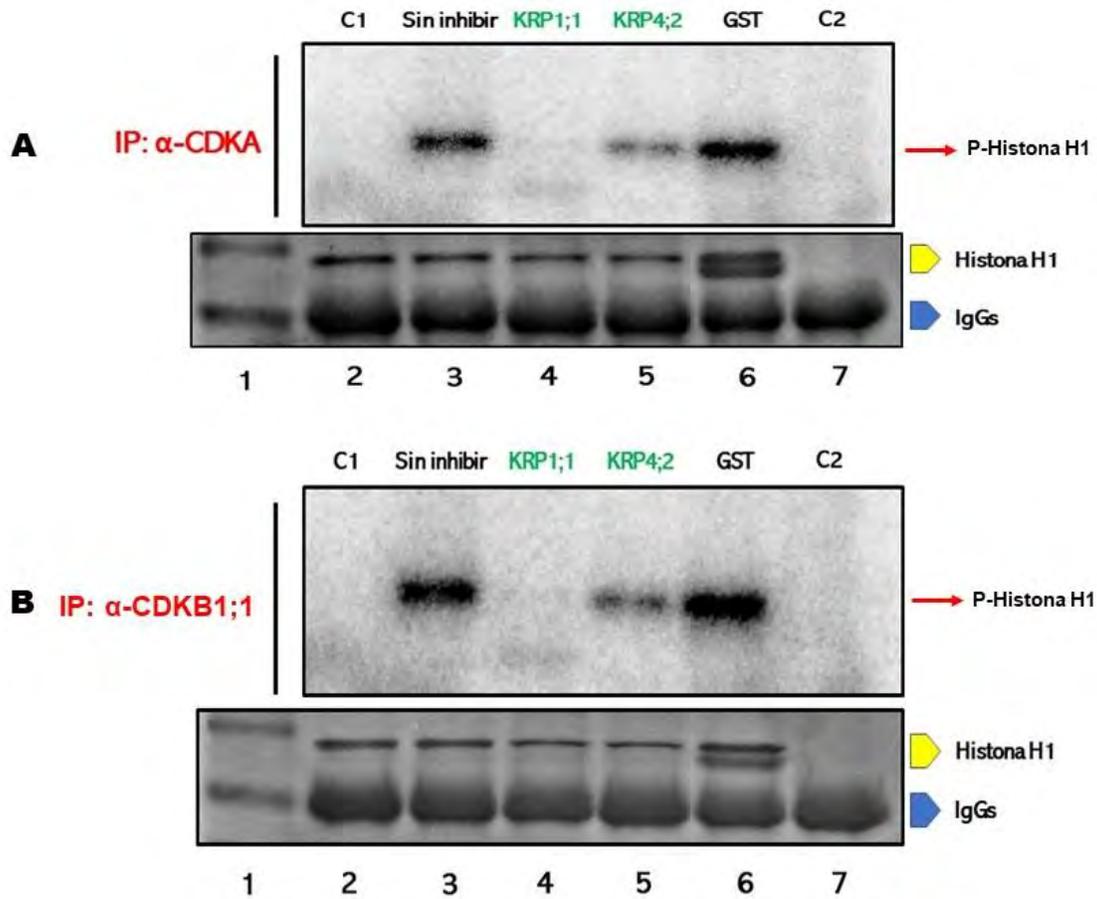


Figura 14. Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc por KRP1;1 y KRP4;2. Carril 1: marcador de masa molecular. Carril 2: control resina + anticuerpo + histona sin extracto. Carril 3: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKA (A) o α -CDKB1;1 (B) sin KRP. Carriles 4-5: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKA (A) o α -CDKB1;1 (B) e incubados con 5 μ g de KRP1;1 y KRP4;2 respectivamente. Carril 6: actividad de cinasa asociada a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKA (A) o α -CDKB1;1 (B) e incubados con 5 μ g de GST. Carril 7: control resina + anticuerpo + extracto sin histona. Se usaron geles teñidos con azul de Coomassie como control de carga.

Ahora lo que se quiso probar es si con una menor cantidad de KRP4;2 podíamos observar algún cambio en la inhibición de la actividad asociada a CDKA y CDKB1;1, ya que previamente habíamos visto que KRP1;1 era capaz de inhibir casi por completo la actividad de cinasa asociada a CDKA y CDKB1;1 sin importar si se usaba 1 μ g o 5 μ g (anexo 5). En este caso se usaron dos cantidades de KRP4;2 (1 μ g y 5 μ g). Los resultados indicaron que no importa la cantidad de KRP4;2 que se agregue, ya que no se observaron grandes diferencias al agregar 1 μ g o 5 μ g de

proteína recombinante en la inhibición de la actividad de cinasa asociada a CDKA y CDKB1;1 (figura 15).

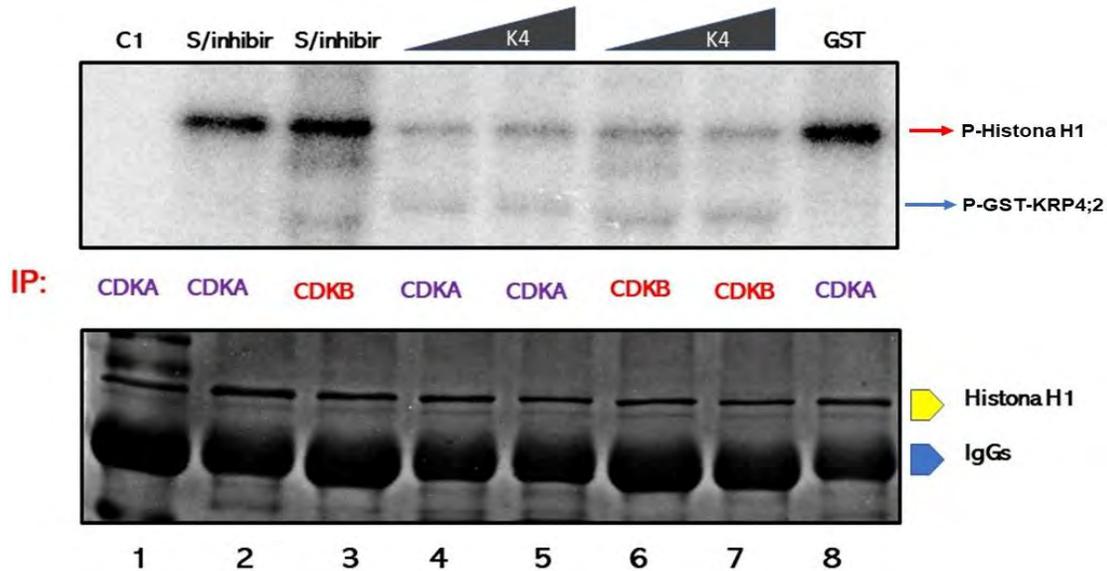


Figura 15. Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc por KRP4;2. Carril1: control resina + anticuerpo + histona sin extracto. Carril 2: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKA sin KRP. Carril 3: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKB sin KRP. Carriles 4-5: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKA e incubados con 1 μ g o 5 μ g de KRP4;2 respectivamente. Carriles 6-7: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKB1;1 e incubados con 1 μ g o 5 μ g de KRP4;2 respectivamente. Carril 8: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKA e incubados con 5 μ g GST. Se usaron geles teñidos con azul de Coomassie como control de carga.

En la figura 15, en los carriles 4 y 5, los cuales pertenecen a los ensayos de cinasa usando el anticuerpo anti-CDKA con 1 y 5 μ g de KRP4;2 respectivamente, se puede observar la fosforilación de KRP4;2, la cual no ocurre en los ensayos de cinasa usando el anticuerpo anti-CDKB1;1 (carriles 6 y 7), ya que las bandas que aparecen no corresponden a la masa de KRP4;2 y son bandas inespecíficas que aparecen también en los ensayos donde no se adicionó KRP4;2 (carril 3, control sin inhibición).

En las figuras 14 (A y B) se muestra que KRP1;1 inhibió casi por completo la actividad de cinasa asociada a CDKA y CDKB1;1, estos resultados nos indican que

muy probablemente KRP1;1 tiene la capacidad de inhibir la actividad de cinasa de cualquier complejo Ciclina/CDKA y Ciclina/CDKB1;1 presente en la mezcla de extractos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h. Para probar esta hipótesis, se decidió realizar la inhibición con las dos KRPs (5µg), usando como fuente de cinasa la actividad asociada a inmunoprecipitados con anti-Ciclina D4;2 y anti-Ciclina D5;3 proveniente de una mezcla de extractos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h. Los resultados indicaron que KRP1;1 y KRP4;2 inhiben la actividad de cinasa asociada a Ciclina D4;2 y a Ciclina D5;3 de una forma muy similar a como lo hacen sobre CDKA y CDKB1;1; mientras que KRP1;1 abatió casi por completo la actividad asociada a las ciclinas, KRP4;2 sólo abatió parcialmente la actividad de complejos Ciclina D4;2/CDK y Ciclina D5;3/CDK (figura 16). Es interesante observar que los inmunoprecipitados de ciclinas tuvieron la capacidad de fosforilar principalmente a KRP1;1 (figura 16).

Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a complejos CYC/CDK en la germinación de maíz

Los resultados anteriores demostraron que KRP1;1 y KRP4;2 inhiben la actividad de cinasa asociada a CDKA y CDKB1;1 (figura 14), y que la inhibición sobre las dos cinasas no cambia drásticamente si se adiciona 1 µg o 5 µg del inhibidor KRP4;2 (figura 15). Sin embargo, estos experimentos fueron realizados usando una mezcla de extractos proteicos provenientes de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h con el fin de estandarizar los ensayos de inhibición y la cantidad de inhibidor necesario para observar un efecto en la actividad de cinasa. Así, se decidió trabajar con un 1 µg de inhibidor para realizar los siguientes ensayos de inhibición.

Para determinar si existen cambios en la capacidad inhibitoria a lo largo de la germinación por parte de KRP1;1 y KRP4;2, se llevaron a cabo ensayos de actividad de cinasa usando como sustrato a la proteína MBP-Histona H1 y como fuente de cinasa inmunoprecipitados de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 12 y 24 h, utilizando los anticuerpos anti-CDKA, anti-CDKB1;1 y anti-CycD3;1.

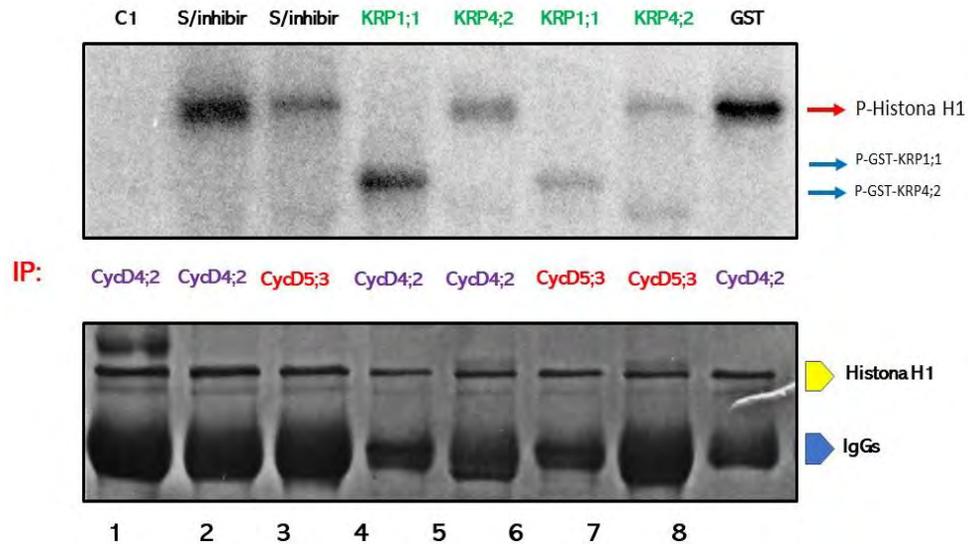


Figura 16. Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CycD4;2/CDK y CycD5;3/CDK por KRP1;1 y KRP4;2. Carril 1: control resina + anticuerpo + histona sin extracto. Carril 2: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -Cyc4;2 sin KRP. Carril 3: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -Cyc5;3 sin KRP. Carriles 4-5: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -Cyc4;2 e incubados con 5 μ g de KRP1;1 y KRP4;2 respectivamente. Carriles 6-7: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -Cyc5;3 e incubados con 5 μ g de KRP1;1 y KRP4;2 respectivamente. Carril 8: actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -Cyc4;2 e incubados con GST. Se usaron geles teñidos con azul de Coomassie como control de carga.

En la figura 17A se observa la actividad de cinasa asociada a CDKA en los tres tiempos de imbibición probados, así como el efecto de KRP1;1 y KRP4;2 en cada tiempo. Tomando como control “sin inhibición” los inmunoprecipitados incubados con la proteína GST (1 μ g), se observó que la actividad de cinasa asociada a CDKA tiende a aumentar conforme avanza la germinación (carriles 2, 5 y 8). En presencia del inhibidor KRP1;1 en el tiempo 0 h, se observó una reducción en la actividad de cinasa del 29% en comparación con el control de 0 h incubado con GST, mientras que KRP4;2 al tiempo 0 h, no fue capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a CDKA (figura 17b).

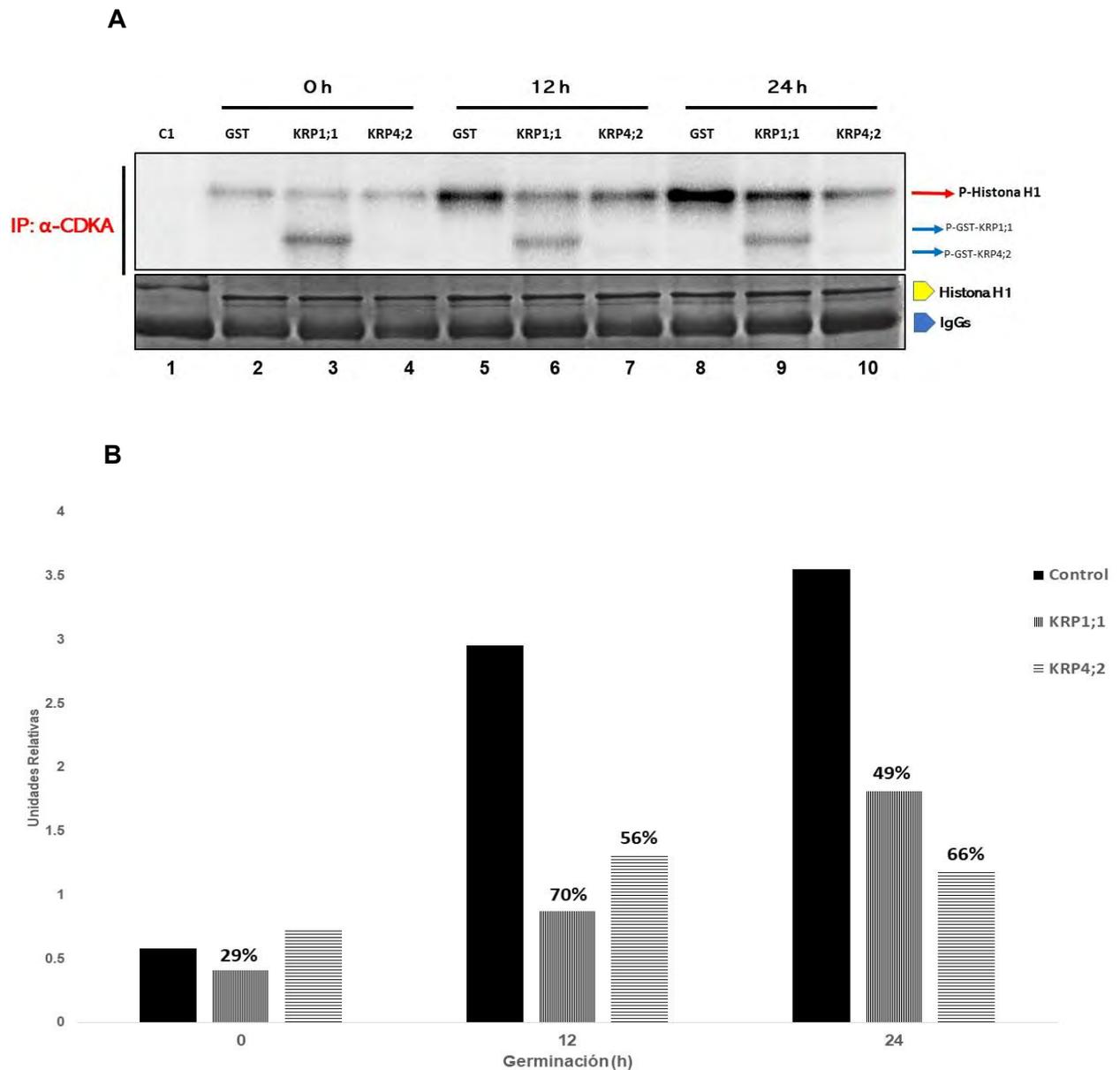


Figura 17. Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a CDKA en la germinación de maíz. La actividad de cinasa asociada a CDKA se obtuvo de IPs usando el anticuerpo anti-CDKA, a partir de extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 horas. A) los inmunoprecipitados con anti-CDKA provenientes de los diferentes tiempos de imbibición se usaron para analizar la actividad de cinasa en presencia de 1 μ g de GST (control), o 1 μ g de inhibidor (KRP1;1 o KRP4;2), usando a la Histona H1 como sustrato (flecha roja). Geles teñidos con azul de coomassie se utilizaron como control de carga. B) análisis densitométrico de la autorradiografía en A, relacionando la señal de actividad de cinasa asociada a CDKA con la cantidad de Histona H1 cargada; los números arriba de cada barra indican el porcentaje de inhibición respecto a su control sin inhibición en cada tiempo. C1: control negativo resina + anticuerpo + extracto sin Histona H1 (carril 1). Las flechas azules indican la fosforilación de KRP1;1 o KRP4;2. Las etiquetas amarillas o azules en A, indican la presencia de la histona o las IgGs respectivamente. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

A las 12 h, KRP1;1 tiende a aumentar su capacidad inhibitoria respecto a 0 h, ya que inhibió en un 70% la actividad de cinasa asociada a CDKA. Respecto a KRP4;2, a las 12 h se observó un efecto inhibitorio del 56% en la actividad de cinasa asociada a CDKA (figura 17b). Hacia las 24 h el efecto inhibitorio de KRP1;1 fue del 49%, por lo que su capacidad inhibitoria tiende a disminuir respecto a 12 h, mientras que el efecto inhibitorio de KRP4;2 tiende a aumentar hacia tiempos tardíos en la germinación, ya que a las 24 h su capacidad inhibitoria fue del 66% (figura 17b). La figura 17A muestra la fosforilación de KRP1;1 (flechas azules).

La figura 18A muestra la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 en los tres tiempos de imbibición probados (0, 12 y 24 h), así como el efecto de KRP1;1 y KRP4;2 en cada tiempo. Tomando como control “sin inhibición” los inmunoprecipitados incubados con la proteína GST (1 µg), se observó que la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1, tiende a disminuir conforme avanza la germinación (carriles 2, 5 y 8). En presencia del inhibidor KRP1;1 al tiempo 0 h, se observó una reducción en la actividad de cinasa del 36% en comparación con el control de 0 h incubado con GST, mientras que KRP4;2 al tiempo 0 h, no fue capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1, y curiosamente, en las dos replicas realizadas del experimento se observó un aumento en la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 cuando se incubaba con KRP4;2 (figura 18B). A las 12 h, KRP1;1 tiende a aumentar su capacidad inhibitoria respecto a 0 h, ya que inhibe en un 40% la actividad de cinasa asociada a CDKB. Respecto a KRP4;2, comparando las muestras de 12 h sin inhibición y con inhibición, no se observó una disminución en la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 (figura 18b). Hacia las 24 h el efecto inhibitorio de KRP1;1 fue del 57%, por lo que su capacidad inhibitoria a las 24 h tiende a aumentar respecto a los tiempos 0 y 12 h, mientras que KRP4;2 a las 24 h ya es capaz de causar un efecto inhibitorio del 24% sobre la actividad asociada a CDKB1;1 (figura 18b). La figura 18A muestra que KRP1;1 es fosforilada por la actividad asociada a los complejos CDKB1;1/ciclina (flecha azul).

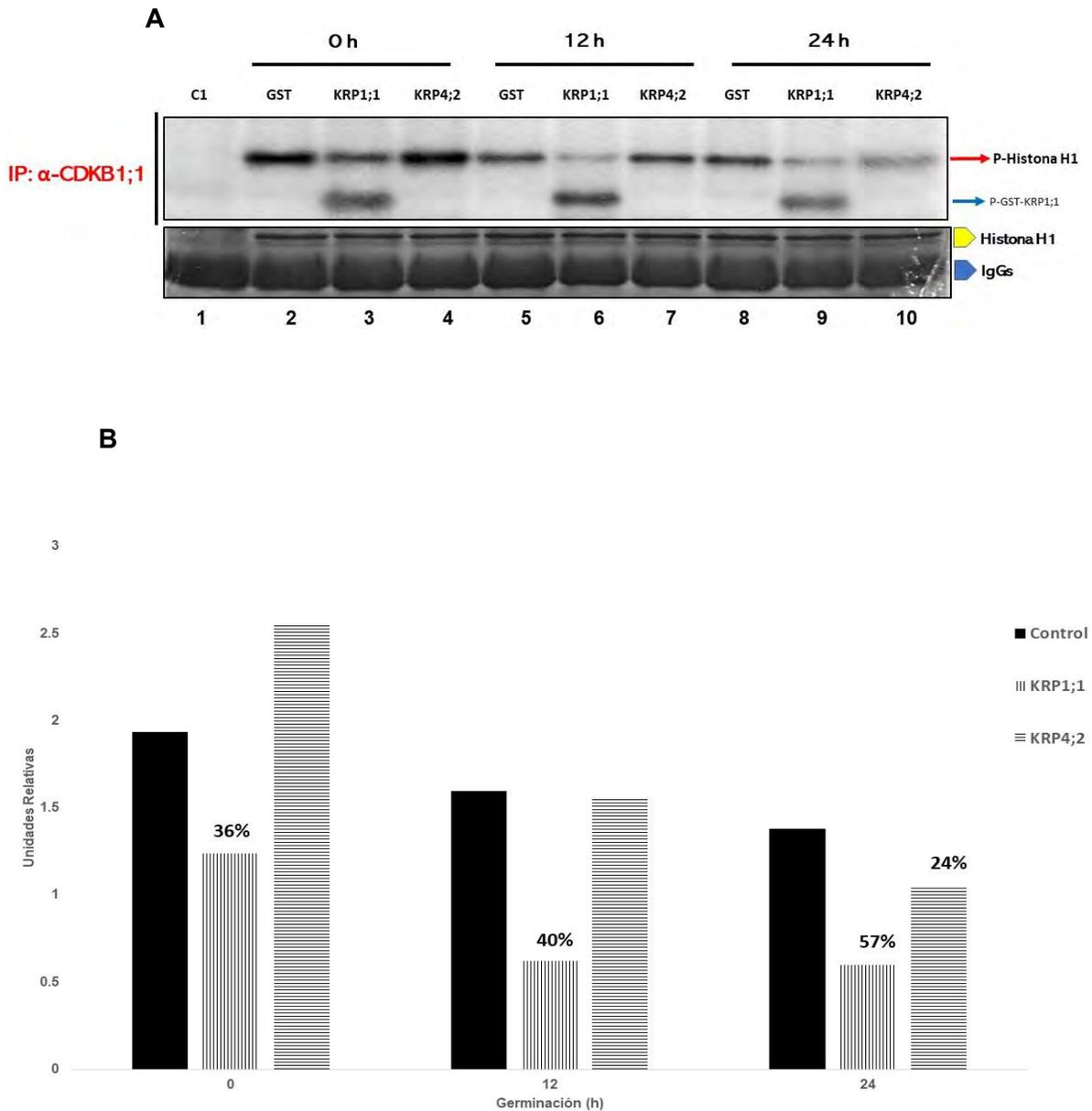


Figura 18. Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 en la germinación de maíz. La actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 se obtuvo de IPs usando el anticuerpo anti-CDKB1;1, a partir de extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 horas. A) los inmunoprecipitados con anti-CDKB1;1 provenientes de los diferentes tiempos de imbibición se usaron para analizar la actividad de cinasa en presencia de 1 μ g de GST (control), o 1 μ g de inhibidor (KRP1;1 o KRP4;2), usando a la Histona H1 como sustrato (flecha roja). Geles teñidos con azul de coomassie se utilizaron como control de carga. B) análisis densitométrico de la autorradiografía en A, relacionando la señal de actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 con la cantidad de Histona H1 cargada; los números arriba de cada barra indican el porcentaje de inhibición respecto a su control sin inhibición en cada tiempo. C1: control negativo resina + anticuerpo + extracto sin Histona H1 (carril 1). Las flechas azules indican la fosforilación de KRP1;1 o KRP4;2. Las etiquetas amarillas o azules en A, indican la presencia de la histona o las IgGs respectivamente. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

En la figura 19A, se observa la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 en los tres tiempos de imbibición probados (0, 12 y 24 h), así como el efecto de KRP1;1 y KRP4;2 en cada tiempo. Tomando como control “sin inhibición” los inmunoprecipitados incubados con la proteína GST (1 µg), se observó que la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 tiende a disminuir conforme avanza la germinación (carriles 2, 5 y 8). En presencia del inhibidor KRP1;1 al tiempo 0 h, se observó una reducción en la actividad de cinasa del 68% en comparación con el control de 0 h incubado con GST, mientras que KRP4;2 al tiempo 0 h, no fue capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 (figura 19b). A las 12 h, KRP1;1 tiende a mantener el mismo nivel de inhibición que a 0 h, mientras que KRP4;2 no fue capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 (figura 19b). Hacia las 24 h el efecto inhibitorio de KRP1;1 fue del 72%, tendiendo a aumentar su capacidad inhibitoria respecto a 0 y 12 h, mientras que a este tiempo, KRP4;2 ya fue capaz de causar un efecto inhibitorio (del 32 %) sobre la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 (figura 19b). La figura 19A muestra la fosforilación de KRP1;1 (flechas azules).

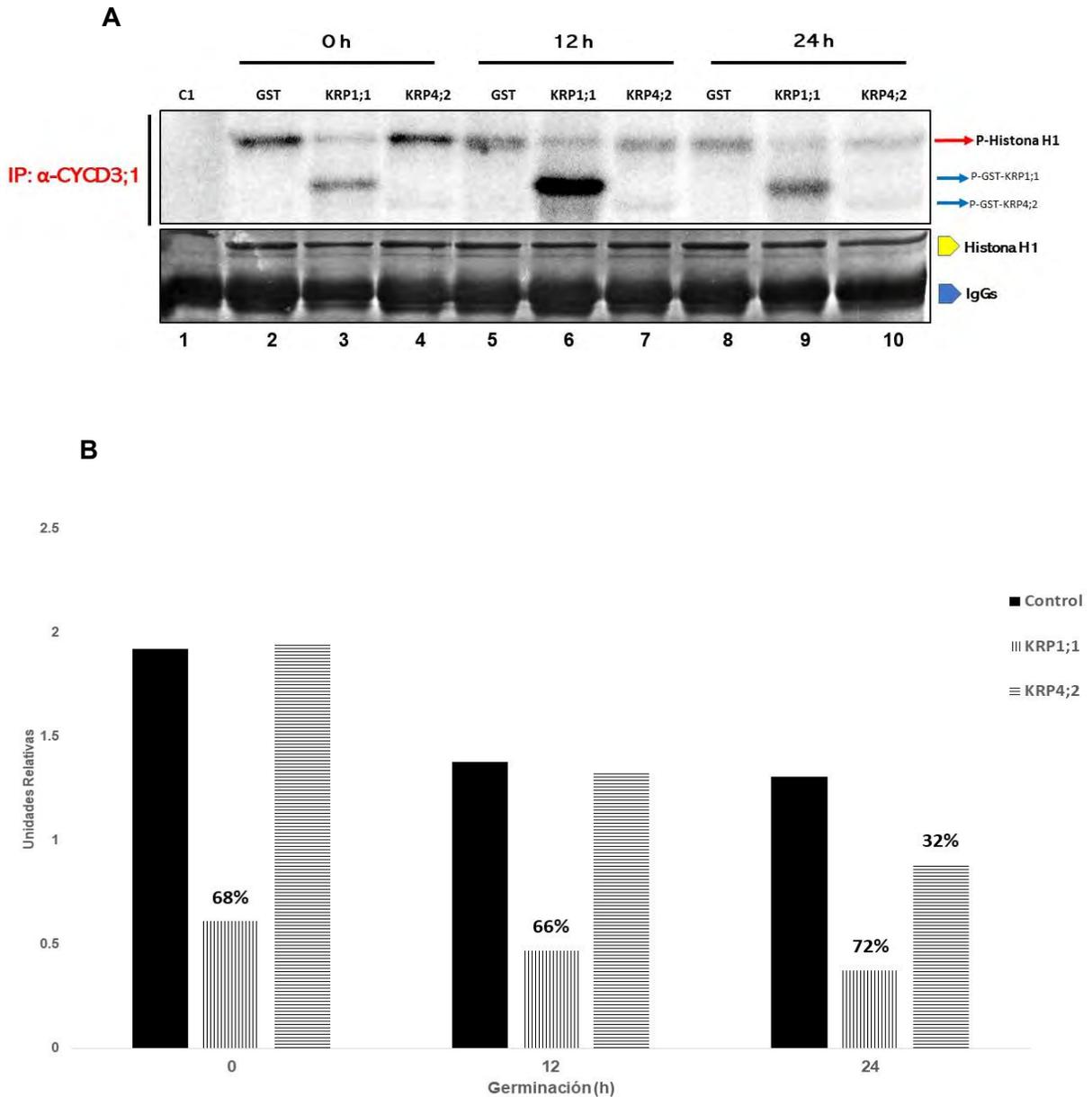


Figura 19. Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a CycD3;1 en

la germinación de maíz. La actividad de cinasa asociada a CycD3;1 se obtuvo de IPs usando el anticuerpo

anti-CycD3;1, a partir de extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 horas. A) los

inmunoprecipitados con anti-CycD3;1 provenientes de los diferentes tiempos de imbibición se usaron para

analizar la actividad de cinasa en presencia de 1 µg de GST (control), o 1 µg de inhibidor (KRP1;1 o KRP4;2),

usando a la Histona H1 como sustrato (flecha roja). Geles teñidos con azul de coomassie se utilizaron como

control de carga. B) análisis densitométrico de la autorradiografía en A, relacionando la señal de actividad de

cinasa asociada a CycD3;1 con la cantidad de Histona H1 cargada; los números arriba de cada barra indican el

porcentaje de inhibición respecto a su control sin inhibición en cada tiempo. C1: control negativo resina +

anticuerpo + extracto sin Histona H1 (línea 1). Las flechas azules indican la fosforilación de KRP1;1 o KRP4;2.

Las etiquetas amarillas o azules en A, indican la presencia de la histona o las IgGs respectivamente. Imagen

representativa de dos experimentos independientes.

Discusión

La regulación del ciclo celular en eucariotas está estrictamente controlada por una clase de cinasas de residuos de Ser/Thr conocidas como cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales forman complejos heterodiméricos con una subunidad regulatoria conocida como ciclina. Los complejos ciclina/CDK son reguladores centrales de la proliferación celular, por lo que la actividad de estos complejos se encuentra finamente regulada por diferentes mecanismos que abarcan desde modificaciones postraduccionales, como lo son las fosforilaciones, así como su proteólisis, o por su interacción con otras proteínas que regulan la actividad de estos complejos. Entre estas proteínas reguladoras podemos encontrar a los inhibidores de CDKs (ICKs), los cuales se unen directamente a los complejos ciclina/CDK para inhibir su actividad, llevando así a un arresto del ciclo celular en respuesta a señales internas y externas. En algunas ocasiones, las ICKs también pueden promover una variante del ciclo celular conocida como endoreplicación o endoreduplicación, proceso en el cual no se lleva a cabo la mitosis ni la citocinesis, pero la replicación del DNA continúa, lo que resulta en células con un aumento en su ploidía (Jasinski et al., 2002; Verkest et al., 2005).

La regulación de la actividad de las CDKs por las ICK/KRPs depende de las interacciones entre las distintas CDKs, ciclinas e inhibidores. En el presente trabajo, encontramos que tanto KRP1;1 como KRP4;2 son capaces de formar complejos heterodímeros con la ciclina D3;1a (figuras 8 y 9); esto nos indica que por sí solas tanto KRP1;1 como KRP4;2 tienen la capacidad de unirse a la ciclina D3;1a sin necesidad de otra proteína que sirva como mediador de esta interacción como lo podría ser una CDK, ya que se sabe de estudios previos en maíz que tanto KRP1;1 como KRP4;2 son capaces de unirse a la CDKA;1 *in-vitro* (Godínez-Palma et al., 2017), y como se mostró en este trabajo, la ciclina D3;1a es capaz de unirse tanto a CDKA;1 como a CDKB1;1 directamente (figuras 6 y 7). Sin embargo, *in-vivo* es posible que la interacción de estos dos inhibidores con complejos CYCD3;1a/CDK se dé tanto por la unión con la CDKA como por la unión con la CYCD3;1a, lo que haría a la CYCD3;1a un blanco fácil de ver por estas dos ICK/KRPs, ya que si la

CYCD3;1a tiene ocupados sus sitios de interacción con ICK/KRPs por otra proteína, tanto KRP1;1 como KRP4;2 podrían unirse al complejo a través de la CDKA para mediar su inhibición.

Por estudios realizados en *A. thaliana* se pensaba que las KRPs sólo inhibían complejos formados por CDKA/ciclinas, ya que en ensayos de interacción *in-vivo* e *in-vitro*, las KRPs de *A. thaliana* son incapaces de interaccionar con CDKB1;1 (Verkest et al., 2005; De Veylder et al., 2001). Ensayos de doble híbrido hechos en maíz, han demostrado que las ZmKRPs son incapaces de interaccionar con una de las tres CDKs tipo B que tiene maíz (Xiao et al., 2017). En alfalfa, por ensayos de doble híbrido se observó que las CDKs tipo B no interaccionaban directamente con el inhibidor KRPMt; sin embargo, mediante ensayos de *pull-down* se demostró que una alta proporción de CDKB2;1 presente en extractos proteicos podía unirse a la proteína His6-KRPMt, sugiriendo que una ciclina D era la responsable de mediar la interacción entre la CDKB2;1 y el inhibidor KRPMt *in-vivo* (Pettkó-Szandtner et al., 2006). En este trabajo, usando un anticuerpo contra la región C-terminal del inhibidor KRP4;2 fue posible inmunoprecipitar a la proteína KRP4;2 en complejo con CDKB1;1 (figuras 11 y 12), demostrando que al menos uno de los miembros de la familia ICK/KRP de maíz puede asociarse a la cinasa CDKB1;1. Los ensayos de interacción a lo largo de la germinación de maíz mostraron que la interacción entre ICK/KRP y CDKB1;1 se mantiene, y que dicha interacción hacia las 24 h se modifica, ya que a ese tiempo el anti-ICK/KRP sólo pudo inmunoprecipitar una de las dos bandas que corresponden a CDKB1;1 (figura 13). Hasta ahora desconocemos si el doblete que reconoce el anticuerpo anti-CDKB1;1 en extractos proteicos de maíz corresponde a una modificación postraduccional de CDKB1;1, la cual podría tener alguna repercusión en la interacción/efecto de las KRPs sobre la CDKB1;1. También desconocemos si la interacción entre estos inhibidores y la CDKB1;1 sea por unión proteína-proteína, o esté mediada por una ciclina u otra proteína, ya que como hemos visto antes, tanto KRP1;1 como KRP4;2 son capaces de unirse a la ciclina D3;1a y a su vez la ciclina D3;1a es capaz de unirse a la CDKB1;1 (figura 7).

Las interacciones *in-vitro* entre KRP1;1 con CDKA;1, y KRP4;2 con CDKA;1 (Godínez-Palma et al., 2017); y las estudiadas en este trabajo: KRP1;1 con CycD3;1a, KRP4;2 con CycD3;1a y KRP con CDKB1;1, son un indicio indirecto de que estas proteínas podrían estar reguladas por estos inhibidores. Para estudiar más a fondo el efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a CDKA, CDKB1;1 y CycD3;1, se decidió probar la sensibilidad de estas proteínas al ser incubadas con KRP1;1 o KRP4;2. Los ensayos *in-vitro* de actividad de cinasa sobre histona H1 claramente mostraron que en una mezcla de extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos, la actividad de cinasa asociada a CDKA y CDKB1;1 podía ser inhibida por KRP1;1 y KRP4;2 (figura 14), destacando que al usar 5 µg de KRP1;1 la actividad de CDKA y CDKB1;1 se abatía casi por completo, sugiriendo que KRP1;1 podría ser un inhibidor universal para cualquier complejo formado por CDKA/Cyc o CDKB1;1/Cyc. Por otro lado, al usar 5 µg de KRP4;2 en los ensayos de inhibición sobre CDKA y CDKB1;1, se observó una disminución en la actividad de ambas cinasas, sin embargo esta inhibición no fue tan dramática como la causada por KRP1;1, lo cual podría ser debido a que existen complejos CDK/Cyc que no son susceptibles a ser inhibidos por KRP4;2 (figura 14), lo cual podría explicar el porqué no observamos un aumento en la capacidad inhibitoria de KRP4;2 sobre CDKA y CDKB1;1 al usar una mayor cantidad de este inhibidor en los ensayos de inhibición (figura 15). En un estudio hecho en endospermo de maíz se observó que KRP4;2 era capaz de inhibir la actividad de cinasa de complejos ciclina D5;1/CDK, ciclina A1;3/CDK, pero no la de complejos formados por ciclina B1;3/CDK (Coelho et al., 2005), mientras que en una mezcla de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz se reportó que la actividad de cinasa asociada a CycD5;3 era más susceptible a la inhibición por parte de KRP1;1 que por KRP4;2, y que la actividad de cinasa asociada a CycD6;1 era inhibida por KRP1;1, pero no por KRP4;2 (Godínez-Palma et al., 2017).

Los experimentos de inhibición realizados hasta el momento del presente trabajo, se habían hecho utilizando una mezcla de extractos proteicos provenientes de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos. Con el fin de realizar un experimento más fino, se decidió probar la inhibición usando extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos: 0, 12 y 24 h. Estudios hechos en ejes embrionarios de maíz han determinado que la mayoría de las células en la semilla seca se encuentran en la fase G1, mientras que hacia las 12 h de imbibición las células del eje embrionario se encuentran iniciando la fase S, para posteriormente a las 24 h de imbibición sean observadas las primeras figuras mitóticas, lo que indicaría que las células están entrando en la fase M (Baíza et al., 1989; Sánchez et al., 2005). Al usar extractos provenientes de diferentes tiempos de imbibición no sólo estamos tomando poblaciones celulares en diferentes etapas del ciclo celular, sino que también tomamos poblaciones celulares que pueden variar en la cantidad y tipo de complejos ciclinas/CDKs presentes. En maíz sabemos que los niveles proteicos de CDKA no varían mucho a lo largo de la germinación, mientras que los niveles de CDKB1;1 varían muy poco en las primeras horas de germinación, alcanzando un pico a las 18 h para posteriormente a las 24 h regresar a niveles parecidos a las primeras horas de germinación (Godínez-Palma et al., 2013). Sin embargo, los niveles proteicos de las ciclinas D de maíz estudiadas hasta el momento sí muestran diferencias marcadas en sus niveles proteicos a lo largo de la germinación, reforzando la idea de que en diferentes tiempos podremos encontrar distintos complejos ciclinas/CDKs que podrían ser más o menos susceptibles a la inhibición por KRP1;1 y KRP4;2 (Sara M. Garza-Aguilar et al., 2017; Gutiérrez et al., 2005, p. 2; Lara-Núñez et al., 2008).

Nuestros resultados indican que el efecto inhibitorio de KRP1;1 y KRP4;2 sobre CDKA, CDKB1;1 y CycD3;1 incrementa conforme avanza la germinación. En general se siguió observando que KRP1;1 tiende a tener una mayor capacidad inhibitoria en comparación con KRP4;2 sobre los distintos complejos ciclina/CDK a lo largo de la germinación; incluso el efecto inhibitorio de KRP4;2 sobre CDKB1;1 y CycD3;1 sólo fue visible hasta las 24 h de la germinación (figuras 16 y 17). Estos resultados refuerzan la idea de que KRP1;1 funciona como un inhibidor universal

para los complejos ciclina/CDK, mientras que KRP4;2 es un inhibidor que se limita a ciertos complejos o fases del ciclo celular, ya que por ejemplo, el efecto inhibitorio sobre CDKA a las 24 h por parte de KRP4;2 fue más marcado (66%) en comparación con el efecto de KRP1;1 (49%) (figura 16). Siguiendo esta misma línea, aunque KRP1;1 y KRP4;2 son capaces de unirse a CycD3;1a *in-vitro* (figuras 8 y 9), KRP4;2 sólo es capaz de inhibir la actividad de CycD3;1 hasta las 24 h (figura 18), por lo que en los extractos de 0 y 12 h es posible que KRP4;2 no pueda unirse a los complejos CycD3;1/CDK para mediar su inhibición, o que a estos tiempos KRP4;2 sufra modificaciones postraduccionales causadas por la actividad asociada a los inmunoprecipitados con anti-CycD3;1, las cuales van a modificar su capacidad inhibitoria sobre CycD3;1. Es posible que la regulación de los complejos ciclina/CDK mediada por KRP1;1 y KRP4;2 no sólo se deba a la especificidad de unión de los inhibidores con complejos ciclina/CDK, sino también a modificaciones postraduccionales en el inhibidor que se dan fase específicas, las cuales van a modificar el comportamiento del inhibidor. Algo que apoya esta idea, es que tanto los niveles de RNA mensajero como de proteína de KRP4;2 se mantienen constantes a lo largo de la germinación (Godínez-Palma et al., 2017; Juárez et al., 2008), lo que indica que el inhibidor está presente en cantidades iguales, pero serían las modificaciones postraduccionales en el inhibidor, su localización celular, así como el recambio dinámico de complejos ciclina/CDK, las responsables de las diferencias vistas en la capacidad inhibitoria a lo largo de la germinación.

Es claro que ambas KRPs tienen una mayor capacidad inhibitoria mientras se avanza en la germinación (figuras 16, 17 y 18), lo que indica que los complejos que se encuentran hacia la entrada a mitosis (24 h) son más susceptibles a ser inhibidos. En *Arabidopsis* se ha visto que las KRPs juegan un papel importante en el inicio de procesos de endociclo. Por ejemplo, en líneas con una sobreexpresión fuerte de AtKRP2, la actividad de CDK es inhibida tanto en las células mitóticamente activas como en las endoreduplicantes. Por el contrario, en líneas con una sobreexpresión débil, solo se ven afectados los complejos CDK/ciclina mitóticos, ya que se bloquea la entrada a mitosis pero se permite el inicio y la progresión a través de la fase S, lo que resulta en un aumento en los niveles de ploidía. Los dos efectos vistos con una

sobreexpresión fuerte o débil de AtKRP2, pueden explicarse si suponemos que las KRPs tiene una preferencia hacia los complejos CDK/ciclina que controlan el punto de control de G2/M, como ya se ha demostrado en alfalfa (Pettkó-Szandtner et al., 2006; Verkest et al., 2005). Es curioso resaltar que hacia las 24 h de la germinación los transcritos de las 8 KRPs de maíz están presentes, y en el caso de KRP1;1 y KRP4;2 aumentan (Godínez-Palma et al., 2017). La presencia de las 8 KRPs podría provocar una inhibición ordenada de los complejos ciclina/CDK que controlan la entrada a la fase S, dando como resultado un proceso unidireccional y ordenado hacia la entrada a mitosis.

Otro resultado que pudimos observar en el presente trabajo fue la fosforilación de las KRPs por los distintos complejos ciclina/CDK. Mientras que KRP1;1 fue fosforilada por la actividad asociada a CycD3;1, CDKB1;1 y CDKA; la fosforilación sobre KRP4;2 fue nula o muy baja (figuras 15, 16,17 y 18). Sin embargo, cabe mencionar que la actividad asociada a inmunoprecipitados con el anticuerpo anti CDKB1;1 sí era capaz de fosforilar fragmentos truncos de la proteína KRP4;2 en los ensayos de actividad de cinasa (datos no mostrados). Una diferencia notoria es la capacidad que tienen los complejos ciclina/CDK para fosforilar a KRP1;1, ya que ésta se fosforila mejor en comparación con KRP4;2. Una explicación del porqué se fosforila mejor KRP1;1 podría deberse a que KRP1;1 tiene más sitios putativos de fosforilación por CDKs en comparación con KRP4;2 (Godínez-Palma et al., 2017), o que los complejos ciclina/CDKs capaces de fosforilar a KRP4;2 son limitados. Hasta ahora desconocemos si la mayor fosforilación de KRP1;1 influye en que tenga una mejor capacidad inhibitoria sobre los complejos ciclina/CDK; ya que por ejemplo, a las 12 h los complejos CycD3;1 fosforilan mejor a KRP1;1 en comparación con los complejos de 24 h; sin embargo, esta menor fosforilación en KRP1;1 hacia las 24 h no disminuye su capacidad inhibitoria, al contrario, KRP1;1 inhibe mejor a las 24 h (figura 18). Ensayos previos usando proteínas recombinantes, han demostrado que la fosforilación de ZmKRP4;2 por el complejo CycD2;2/CDKA causa un aumento en su capacidad inhibitoria sobre distintos complejos CycD/CDK, sin embargo, cuando KRP4;2 es fosforilada por el complejo CycD6;1/CDKA, su capacidad inhibitoria sobre los complejos CycD/CDK se ve

drásticamente reducida (Godínez-Palma et al., 2017). La evidencia sugiere que los residuos putativos de fosforilación en las KRPs pueden ser diferentes para cada complejo ciclina/CDK, y dependiendo de qué residuos son fosforilados, esto se verá reflejado en una modificación del comportamiento del inhibidor. Cabe la posibilidad de que la nula o poca fosforilación vista sobre KRP4;2 sea la responsable de su baja capacidad inhibitoria sobre los distintos complejos ciclina/CDK probados.

De las fosforilaciones de KRP1;1 y KRP4;2 surge una pregunta: si los complejos ciclina/CDK inhibidos por KRP1;1 y KRP4;2 no pueden fosforilar a un sustrato canónico como lo es la histona H1, ¿cómo es que sí pueden fosforilar al inhibidor? Podríamos pensar que el inhibidor está compitiendo por el sustrato (Histona H1); sin embargo, esta posibilidad queda rechazada por dos motivos, el primero es que KRP4;2 no se fosforila por CDKB1;1 y se fosforila muy poco por la actividad asociada a CycD3;1 y CDKA, y aun así tiene la capacidad de inhibir la actividad de cinasa de estos complejos. El segundo motivo para rechazar esta posibilidad, es que en un estudio previo en maíz en donde se utilizó únicamente la región C-terminal del inhibidor KRP4;2 (la cual no tiene sitios putativos de fosforilación por CDKs y por lo tanto no se fosforila), era capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a PCNA, P13^{Suc1} y CycD2;1 (Juárez et al., 2008). Posiblemente entre los complejos ciclina/CDK inmunoprecipitados, existan complejos que no son susceptibles a ser inhibidos (o se necesita una mayor cantidad de inhibidor), y que esa actividad remanente sea la responsable de fosforilar a las KRPs. Otra posibilidad es que sea otra cinasa asociada a los complejos ciclina/CDK inmunoprecipitados la responsable de fosforilar a las KRPs.

Conclusiones

- KRP1;1 y KRP4;2, pueden unirse proteína-proteína con la Ciclina D3;1a sin la necesidad de una CDK.
- La CDKB1;1 de maíz, se asocia con al menos un miembro de la familia de inhibidores ICK/KRP a lo largo de la germinación de maíz.
- La actividad de cinasa asociada a CDKA, CDKB1;1 y CycD3;1 es inhibida diferencialmente por KRP1;1 y KRP4;2, siendo KRP1;1 un inhibidor más potente.
- La inhibición por parte de KRP4;2 de la actividad de cinasa asociada a CDKA y CDKB1;1, no se ve potencializada al incrementar la cantidad de esta proteína.
- Existen diferencias en la capacidad inhibitoria entre KRP1;1 y KRP4;2 a lo largo de la germinación de maíz.
- Los complejos Cyc/CDK se vuelven más sensibles a la inhibición por parte de KRP1;1 y KRP4;2 hacia las 24 h de la germinación, por lo que hay cambios en la susceptibilidad de los complejos presentes en cada tiempo para cada inhibidor.
- KRP1;1 es fosforilada por la actividad de cinasa asociada a inmunoprecipitados con anti-CDKA, anti-CDKB1;1, anti-Ciclina D4;2, anti-Ciclina D5;3 y anti-Ciclina D3;1; mientras que la fosforilación sobre KRP4;2 es poco visible o nula.

Perspectivas

- Aún falta determinar si la unión de las KRPs con CDKB1;1 de maíz se da proteína-proteína, o se necesita de otra proteína (como una ciclina) que funcione como intermediaria de dicha interacción. Siguiendo con CDKB1;1 y las KRPs, queda por conocer el porqué la actividad de cinasa asociada a inmunoprecipitados de extractos de 0 h con anti-CDKB1;1, aumenta al adicionar KRP4;2; por lo que se vuelve importante explorar el papel de las KRPs como ensambladoras de los complejos ciclina/CDK.
- Evaluar el efecto inhibitorio de KRP1;1 y KRP4;2 sobre otros complejos ciclina D/CDK a lo largo de la germinación.
- Se podría evaluar la capacidad inhibitoria de las dos KRPs sobre ciclinas tipo B (las cuales participan en la transición G2/M), con el fin de confirmar que los complejos presentes en esta fase del ciclo celular son más susceptibles a ser inhibidos.
- Sería interesante investigar qué residuos son fosforilados en las KRPs por distintos complejos ciclina/CDK, y si la actividad de inmunoprecipitados (usando el anti-CycD3;1 p.ej.) provenientes de diferentes tiempos de germinación fosforila diferencialmente una misma KRP.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de las proteínas recombinantes: KRP1;1 y KRP4;2 sin tag; con el objetivo de asegurarnos que el tag en el N-terminal de las KRPs no está interfiriendo en su capacidad inhibitoria o su capacidad de ser fosforiladas por los complejos ciclina/CDK.
- También resulta importante evaluar la capacidad inhibitoria de ambas KRPs en diferentes comportamientos subcelulares, por ejemplo, comparar la inhibición en núcleo y citoplasma sobre un mismo complejo ciclina/CDK.

Bibliografía

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002a). An Overview of the Cell Cycle. *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002b). Mitosis. *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26934/>
- Baíza, A. M., Vázquez-Ramos, M., & Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *Journal of Plant Physiology*, 135(4), 416-421. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80097-5)
- Baker, G. L., Landis, M. W., & Hinds, P. W. (2005). Multiple Functions of D-Type Cyclins Can Antagonize pRb-Mediated Suppression of Proliferation. *Cell Cycle*, 4(2), 329-337.
<https://doi.org/10.4161/cc.4.2.1485>
- Barberis, M., De Gioia, L., Ruzzene, M., Sarno, S., Coccetti, P., Fantucci, P., Vanoni, M., & Alberghina, L. (2005). The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27Kip1 are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *Biochemical Journal*, 387(Pt 3), 639-647. <https://doi.org/10.1042/BJ20041299>
- Barrôco, R. M., Peres, A., Droual, A.-M., Veylder, L. D., Nguyen, L. S. L., Wolf, J. D., Mironov, V., Peerbolte, R., Beemster, G. T. S., Inzé, D., Broekaert, W. F., & Frankard, V. (2006). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Orysa;KRP1 Plays an Important Role in Seed Development of Rice. *Plant Physiology*, 142(3), 1053-1064.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.087056>
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H., & nonogaki, hiroyuki. (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition* (3.^a ed.). Springer-Verlag.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>

- Birchler, J. A. (1993). Dosage Analysis of Maize Endosperm Development. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 181-204. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.001145>
- Bisbis, B., Delmas, F., Joubès, J., Sicard, A., Hernould, M., Inzé, D., Mouras, A., & Chevalier, C. (2006). Cyclin-dependent Kinase (CDK) Inhibitors Regulate the CDK-Cyclin Complex Activities in Endoreduplicating Cells of Developing Tomato Fruit. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7374-7383. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506587200>
- 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. *Physiologia Plantarum*, 143(3), 297-308. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01498.x>
- Chang, F., & Herskowitz, I. (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell*, 63(5), 999-1011. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90503-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90503-7)
- Churchman, M. L., Brown, M. L., Kato, N., Kirik, V., Hülskamp, M., Inzé, D., De Veylder, L., Walker, J. D., Zheng, Z., Oppenheimer, D. G., Gwin, T., Churchman, J., & Larkin, J. C. (2006). SIAMESE, a Plant-Specific Cell Cycle Regulator, Controls Endoreplication Onset in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 18(11), 3145-3157. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044834>
- Coe, E. H. (2001). The origins of maize genetics. *Nature Reviews Genetics*, 2(11), 898-905. <https://doi.org/10.1038/35098524>
- Coelho, C. M., Dante, R. A., Sabelli, P. A., Sun, Y., Dilkes, B. P., Gordon-Kamm, W. J., & Larkins, B. A. (2005). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Maize Endosperm and Their Potential Role in Endoreduplication. *Plant Physiology*, 138(4), 2323-2336. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063917>
- Dewitte, W., & Murray, J. A. H. (2003). The Plant Cell Cycle. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 235-264. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134836>

- Donovan, J. D., Toyn, J. H., Johnson, A. L., & Johnston, L. H. (1994). P40SDB25, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 8(14), 1640-1653. <https://doi.org/10.1101/gad.8.14.1640>
- Draetta, G. F. (1997). Cell cycle: Will the real Cdk-activating kinase please stand up. *Current Biology*, 7(1), R50-R52. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00020-0)
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), 389-396. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90420-8)
- Ferreira, P. C., Hemerly, A. S., Villarroel, R., Montagu, M. V., & Inzé, D. (1991). The Arabidopsis functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *The Plant Cell*, 3(5), 531-540. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.5.531>
- Galinat, W. C. (1988). The Origin of Corn. *Corn and Corn Improvement, agronomymonogra(cornandcornimpr)*, 1-31. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr18.3ed.c1>
- García-Lara, S., & Serna-Saldivar, S. O. (2019). Chapter 1—Corn History and Culture. En S. O. Serna-Saldivar (Ed.), *Corn (Third Edition)* (pp. 1-18). AACC International Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00001-2>
- Garza-Aguilar, Sara M., Lara-Núñez, A., García-Ramírez, E., & Vázquez-Ramos, J. M. (2017). Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physiologia Plantarum*, 160(1), 84-97. <https://doi.org/10.1111/ppl.12537>
- Garza-Aguilar, Sara Margarita, Axosco-Marín, J., Lara-Núñez, A., Guerrero-Molina, E. D., Lemus-Enciso, A. T., García-Ramírez, E., & Vázquez-Ramos, J. M. (2019). Proliferating cell nuclear antigen associates to protein complexes containing cyclins/cyclin dependent kinases susceptible of inhibition by KRPs during maize germination. *Plant Science*, 280, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.020>

- Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout, W. M., Bronson, R. T., Gardner, H., & Sicinski, P. (2003). Cyclin E Ablation in the Mouse. *Cell*, *114*(4), 431-443. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00645-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00645-7)
- Genschik, P., Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., & Fleck, J. (1988). *Cell Cycle–Dependent Proteolysis in Plants: Identification of the Destruction Box Pathway and Metaphase Arrest Produced by the Proteasome Inhibitor MG132*. 13.
- Godínez-Palma, S. K., García, E., Sánchez, M. de la P., Rosas, F., & Vázquez-Ramos, J. M. (2013). Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *Journal of Experimental Botany*, *64*(18), 5661-5671. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert340>
- Godínez-Palma, S. K., Rosas-Bringas, F. R., Rosas-Bringas, O. G., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J., & Vázquez-Ramos, J. M. (2017). Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D-cyclin-dependent kinase complexes. *Journal of Experimental Botany*, *68*(7), 1585-1597. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx054>
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., & Vázquez-Ramos, J. M. (2005). Maize Cyclin D2 Expression, Associated Kinase Activity and Effect of Phytohormones During Germination. *Plant and Cell Physiology*, *46*(1), 166-173. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci007>
- Inagaki, S., & Umeda, M. (2011). Chapter Seven—Cell-Cycle Control and Plant Development. En K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 291, pp. 227-261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386035-4.00007-0>
- Jasinski, S., Leite, C. S., Domenichini, S., Stevens, R., Raynaud, C., Perennes, C., Bergounioux, C., & Glab, N. (2003). NtKIS2, a novel tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor is differentially expressed during the cell cycle and plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*, *41*(6), 667-676. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00082-2)

- Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C., & Glab, N. (2002). Comparative Molecular and Functional Analyses of the Tobacco Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor NtKIS1a and Its Spliced Variant NtKIS1b. *Plant Physiology*, *130*(4), 1871-1882.
<https://doi.org/10.1104/pp.008573>
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, C., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C., & Glab, N. (2002). The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 5), 973-982.
- Juárez, N. de J., Mancilla, A., García, E., & Vázquez-Ramos, J. M. (2008). Expression and activity of a Kip-related protein, Zeama;KRP1, during maize germination. *Seed Science Research*, *18*(2), 67-75. <https://doi.org/10.1017/S0960258508975048>
- Klug, W. S., Cummings, M. R., & Spencer, C. A. (2011). *Conceptos de genética*. Pearson Prentice Hall.
- 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 Physiology*, *132*(3), 1315-1321. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020644>
- Kowles, R. V., & Phillips, R. L. (1988). Endosperm development in maize. En *International Review of Cytology* (Vol. 112, pp. 97-136). Elsevier.
- Kumar, N., Harashima, H., Kalve, S., Bramsiepe, J., Wang, K., Sizani, B. L., Bertrand, L. L., Johnson, M. C., Faulk, C., Dale, R., Simmons, L. A., Churchman, M. L., Sugimoto, K., Kato, N., Dasanayake, M., Beemster, G., Schnittger, A., & Larkin, J. C. (2015). Functional Conservation in the SIAMESE-RELATED Family of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Land Plants. *The Plant Cell*, *27*(11), 3065-3080. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00489>

- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., & Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & Development, 11*(7), 847-862. <https://doi.org/10.1101/gad.11.7.847>
- 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. *Physiologia Plantarum, 132*(1), 79-88. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00995.x>
- Leene, J. V., Boruc, J., Jaeger, G. D., Russinova, E., & Veylder, L. D. (2011). A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends in Plant Science, 16*(3), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.004>
- Lui, H., Wang, H., DeLong, C., Fowke, L. C., Crosby, W. L., & Fobert, P. R. (2000). The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *The Plant Journal, 21*(4), 379-385. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00688.x>
- Magyar, Z., Ito, M., Binarová, P., Mohamed, B., & Bogre, L. (2013). Cell Cycle Modules in Plants for Entry into Proliferation and for Mitosis. En J. Greilhuber, J. Dolezel, & J. F. Wendel (Eds.), *Plant Genome Diversity Volume 2* (pp. 77-97). Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4_6
- Mendenhall, M. D. (1998). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. En P. K. Vogt & S. I. Reed (Eds.), *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors* (pp. 1-24). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71941-7_1
- Menges, M., Hennig, L., Grisse, W., & Murray, J. A. H. (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Molecular Biology, 53*(4), 423-442. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000019059.56489.ca>
- Menges, M., Jager, S. M. D., Grisse, W., & Murray, J. A. H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific

- profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*, 41(4), 546-566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x>
- Minshull, J., Blow, J. J., & Hunt, T. (1989). Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell*, 56(6), 947-956.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90628-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90628-4)
- Moreno, S., & Nurse, P. (1994). Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the rum1+ gene. *Trends in Genetics*, 10(5), 150. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90083-3)
- Morohashi, K., Casas, M. I., Ferreyra, M. L. F., Mejía-Guerra, M. K., Pourcel, L., Yilmaz, A., Feller, A., Carvalho, B., Emiliani, J., Rodriguez, E., Pellegrinet, S., McMullen, M., Casati, P., & Grotewold, E. (2012). A Genome-Wide Regulatory Framework Identifies Maize Pericarp Color1 Controlled Genes. *The Plant Cell*, 24(7), 2745-2764.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.098004>
- 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. *The Plant Cell*, 14(8), 1847-1857.
<https://doi.org/10.1105/tpc.002550>
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., & Sekine, M. (2006). Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Letters*, 580(1), 336-340.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.018>
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- Ogawa, N., Noguchi, K., Yamashita, Y., Yasuhara, T., Hayashi, N., Yoshida, K., & Oshima, Y. (1993). Promoter analysis of the PHO81 gene encoding a 134 kDa protein bearing ankyrin repeats

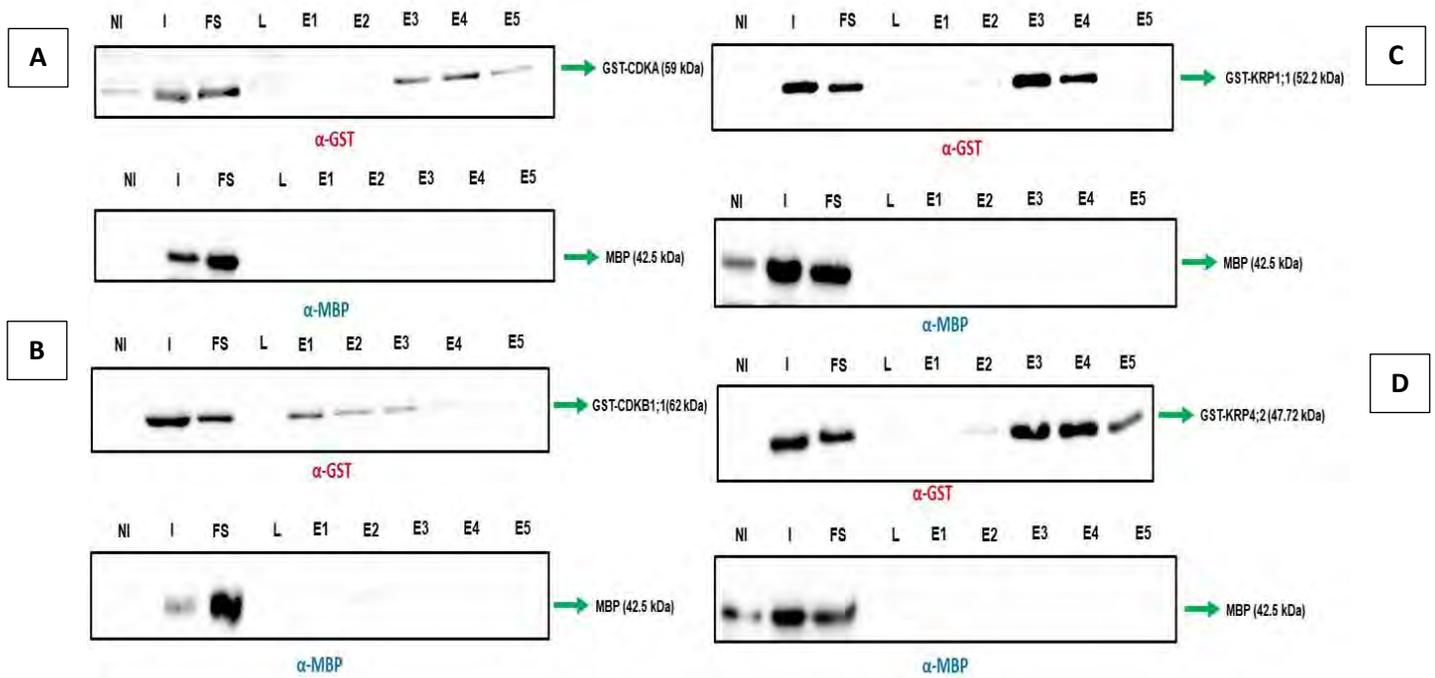
- in the phosphatase regulon of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 238(3), 444-454. <https://doi.org/10.1007/bf00292004>
- Peres, A., Churchman, M. L., Hariharan, S., Himanen, K., Verkest, A., Vandepoele, K., Magyar, Z., Hatzfeld, Y., Van Der Schueren, E., Beemster, G. T. S., Frankard, V., Larkin, J. C., Inzé, D., & De Veylder, L. (2007). Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25588-25596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703326200>
- Pettkó-Szandtner, A., Mészáros, T., Horváth, G. V., Bakó, L., Csordás-Tóth, E., Blastyák, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P., & Dudits, D. (2006). Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 46(1), 111-123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02677.x>
- 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. *The Plant Journal*, 38(4), 616-625. <https://doi.org/10.1111/j.0960-7412.2004.02071.x>
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed Germination and Vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 507-533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. *Science*, 234(4774), 364. <https://doi.org/10.1126/science.2876518>
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27 Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A–Cdk2 complex. *Nature*, 382(6589), 325-331. <https://doi.org/10.1038/382325a0>

- Sánchez, J. A. (2011). Evolución natural y antropogénica de *Zea* spp. En Mesoamérica. *Archaeobios*, 5, 36-78.
- Sánchez, M. de la P., Gurusinghe, S. H., Bradford, K. J., & Vázquez-Ramos, J. M. (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), 515-523. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri029>
- Schneider, K. R., Smith, R. L., & O'Shea, E. K. (1994). Phosphate-Regulated Inactivation of the Kinase PHO80-PHO85 by the CDK Inhibitor PHO81. *Science*, 266(5182), 122-126. JSTOR.
- Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schöbinger, U., & Hülskamp, M. (2003). Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1 in single-celled *Arabidopsis* trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *The Plant Cell*, 15(2), 303-315. <https://doi.org/10.1105/tpc.008342>
- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D., & Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 79(2), 233-244. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90193-7)
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*, 9(10), 1149-1163. <https://doi.org/10.1101/gad.9.10.1149>
- Sherr, Charles J. (1994). G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell*, 79(4), 551-555. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90540-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90540-1)
- Sherr, Charles J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), 1501-1512.
- Sorrell, D. A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J. R., Rogers, H. J., & Francis, D. (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 215(3), 518-522. JSTOR.

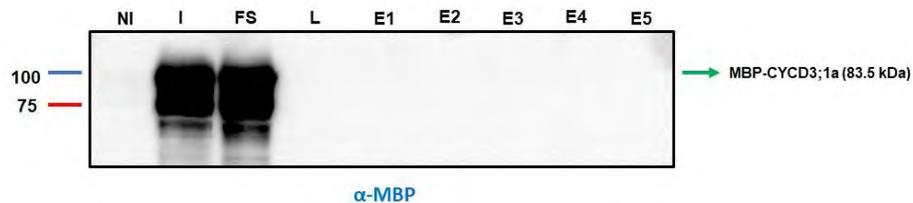
- Torres Acosta, J. A., Fowke, L. C., & Wang, H. (2011). Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Annals of Botany*, *107*(7), 1141-1157. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr034>
- Umeda, M., Shimotohno, A., & Yamaguchi, M. (2005). Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase-activating Kinases in Plants. *Plant and Cell Physiology*, *46*(9), 1437-1442. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci170>
- Umeda, M., Umeda-Hara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., & Uchimiya, H. (1999). Differential Expression of Genes for Cyclin-Dependent Protein Kinases in Rice Plants. *Plant Physiology*, *119*(1), 31-40. <https://doi.org/10.1104/pp.119.1.31>
- Vandepoele, K., Raes, J., Veylder, L. D., Rouzé, P., Rombauts, S., & Inzé, D. (2002). Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *14*(4), 903-916. <https://doi.org/10.1105/tpc.010445>
- Vázquez-Ramos, J. M., & de la Paz Sánchez, M. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*, *13*(2), 113-130. <https://doi.org/10.1079/SSR2003130>
- Verkest, A., Manes, C.-L. de O., Vercruyssen, S., Maes, S., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Genschik, P., Kuiper, M., Inzé, D., & De Veylder, L. (2005). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP2 Controls the Onset of the Endoreduplication Cycle during Arabidopsis Leaf Development through Inhibition of Mitotic CDKA;1 Kinase Complexes. *The Plant Cell*, *17*(6), 1723-1736. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032383>
- Veylder, L. D., Beeckman, T., Beemster, G. T. S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Schueren, E. V. D., Maes, S., Naudts, M., & Inzé, D. (2001). Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis. *The Plant Cell*, *13*(7), 1653-1668. <https://doi.org/10.1105/TPC.010087>
- Vodermaier, H. C. (2004). APC/C and SCF: Controlling Each Other and the Cell Cycle. *Current Biology*, *14*(18), R787-R796. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.020>

- Wang, H., Fowke, L. C., & Crosby, W. L. (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature*, 386(6624), 451-452. <https://doi.org/10.1038/386451a0>
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., & Fowke, L. C. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *The Plant Journal*, 24(5), 613-623. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00899.x>
- Wang, Q. Q., P, S., Aj, C., Wl, C., & Lc, F. (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. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 15(4), 501-510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00231.x>
- Xiao, Q., Zhang, C., Li, H., Wei, B., Wang, Y., Huang, H., Li, Y., Yu, G., Liu, H., Zhang, J., Liu, Y., Hu, Y., & Huang, Y. (2017). Identification and functional analysis of the ICK gene family in maize. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep43818>
- Zhou, Y., Fowke, L., & Wang, H. (2002). Plant CDK inhibitors: Studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports*, 20(10), 967-975. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0434-8>
- Zhou, Yongming, Li, G., Brandizzi, F., Fowke, L. C., & Wang, H. (2003). The plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 has distinct functional domains for in vivo kinase inhibition, protein instability and nuclear localization. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 35(4), 476-489. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01821.x>

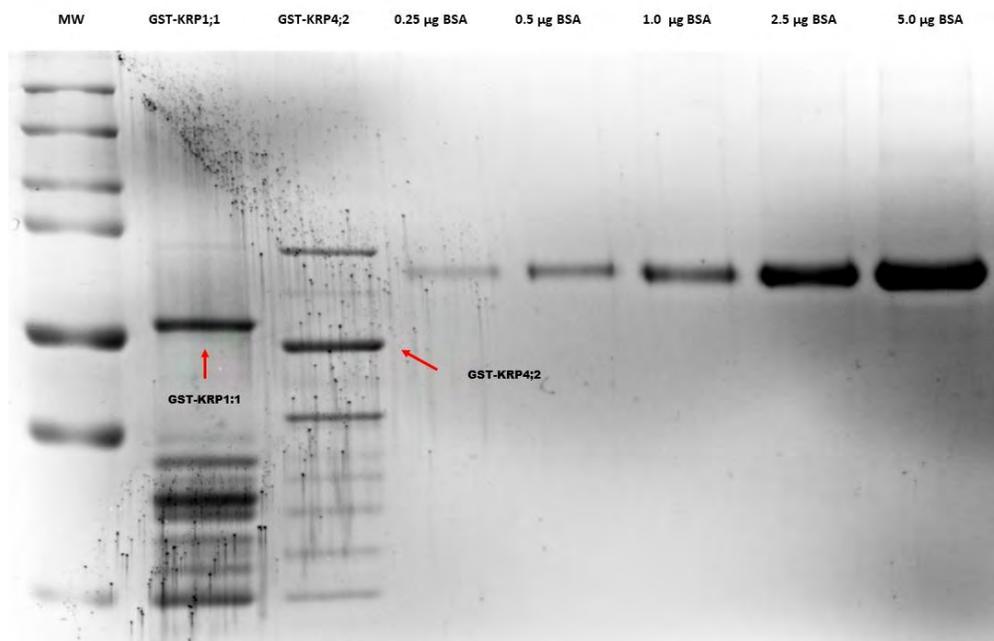
Anexo



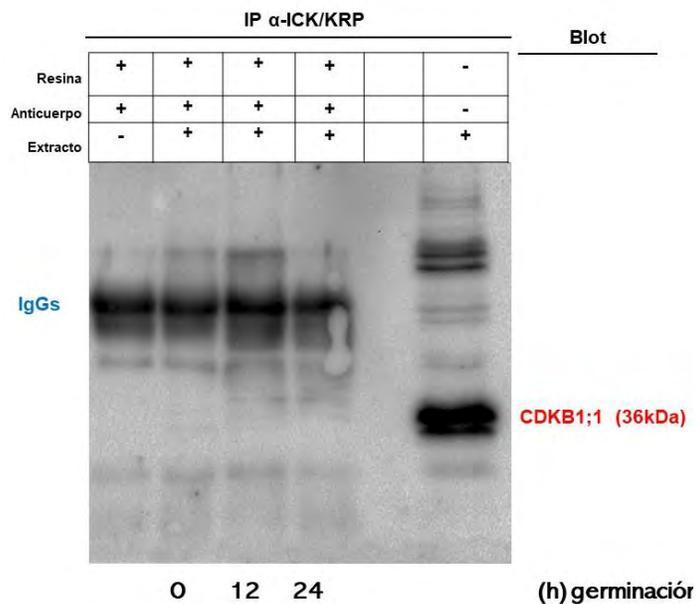
Anexo 1. Controles de la interacción *in-vitro*. A) Interacción GST-CDKA;1 con MBP. B) Interacción GST-CDKB1;1 con MBP. C) Interacción KRP1;1 con MBP. D) Interacción KRP4;2 con MBP.



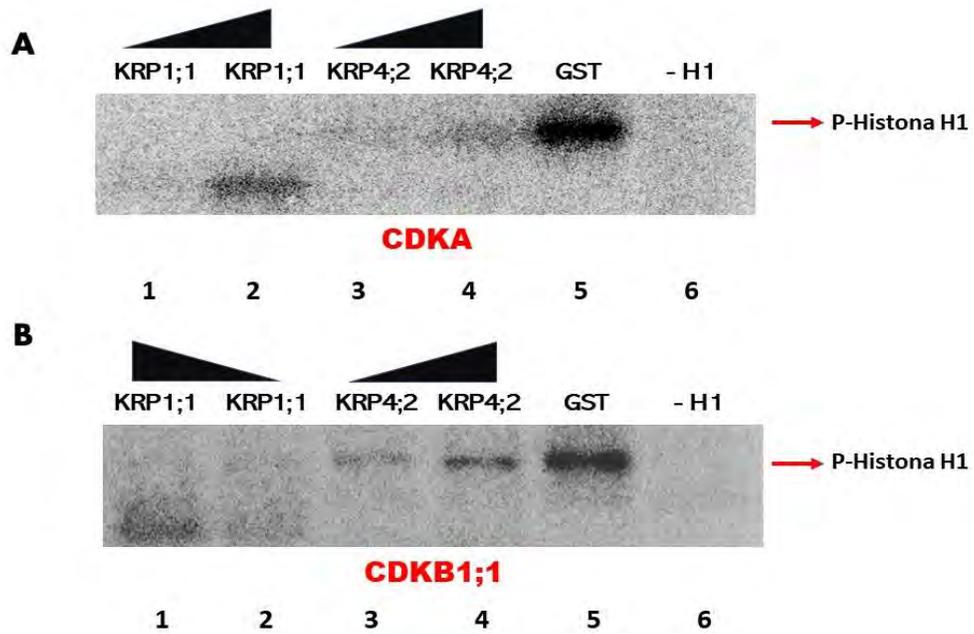
Anexo 2. Control de la interacción *in-vitro*. La proteína MBP-CycD3;1a fue pasada por la columna de sefarosa glutación, para corroborar de que no existía una interacción inespecífica de esta proteína con la columna de glutación.



Anexo 3. Purificación de KRP1;1 y KRP4;2 para ensayos de inhibición. Gel teñido con azul de coomassie en donde se muestran dos eluciones cargadas de KRP1;1 y KRP4;2 (señaladas con flechas) y una curva patrón con diferentes cantidades de BSA



Anexo 4. ICK/KRP se asocia a CDKB1;1 en la germinación de maíz. Inmunoprecipitado utilizando el anticuerpo anti-ICK/KRP en extractos embebidos por 0, 12 y 24 h. La inmunodetección se realizó usando el anticuerpo específico anti-CDKB1;1.



Anexo 5. Inhibición de la actividad de cinasa de complejos CDKA/Cyc y CDKB1;1/Cyc usando dos cantidades de KRP1;1 y KRP4;2. En A) actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKA. Carriles 1 y 2: incubación con 1 y 5 μ g de KRP1;1 respectivamente. Carriles 3 y 4: incubación con 1 y 5 μ g de KRP4;2 respectivamente. Carril 5: incubación con GST. En B) actividad de cinasa asociado a inmunoprecipitados con anticuerpo α -CDKB1;1. Carriles 1 y 2: incubación con 5 y 1 μ g de KRP1;1 respectivamente. Carriles 3 y 4: incubación con 1 y 5 μ g de KRP4;2 respectivamente. Carril 5: incubación con GST. Como control negativo se utilizó resina más anticuerpo más extracto sin histona (-H1).