



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIOS SOBRE LA PROTEÍNA ICK
DE MAÍZ

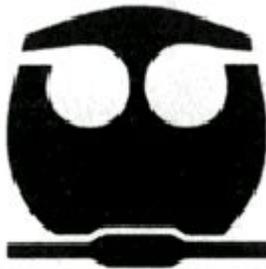
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

Natividad De Jesús Juárez

Tutor: Dr. Jorge M. Vázquez Ramos



MÉXICO, D. F.

2008



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.

ESTUDIOS SOBRE LA PROTEÍNA ICK DE MAÍZ

RECONOCIMIENTOS

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

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Jorge M. Vázquez Ramos
Dr. Diego González Halphen
Dr. Javier Plasencia de la Parra

El Jurado de Examen para obtener el Grado de la Maestría en Ciencias Bioquímicas estuvo formado por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Vocal	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Secretario	Dr. Mario Rocha Sosa
Suplente	Dr. Javier Plasencia de la Parra
Suplente	Dra. Marina Macías Silva

El proyecto fue apoyado parcialmente por PAPIIT 202002. Durante los estudios de maestría tuve el apoyo de una beca por parte del Sistema Nacional de Investigadores para la realización de la presente tesis.

ÍNDICE

Abreviaturas

Resumen

INTRODUCCIÓN.....1

Germinación.....1

Ciclo celular.....2

Ciclo celular en mamíferos.....4

Inhibidores de CDKs en mamíferos.....5

PCNA en el control del ciclo celular.....8

Inhibidores de CDKs en otros organismos..... 9

Ciclo celular en plantas.....10

Inhibidores de CDKs en plantas.....12

Organización estructural de las ICKs.....14

Fitohormonas.....15

ANTECEDENTES.....17

HIPÓTESIS.....21

OBJETIVO GENERAL..... 21

OBJETIVOS PARTICULARES..... 21

MATERIALES Y MÉTODOS.....22

RESULTADOS.....28

DISCUSIÓN.....48

CONCLUSIONES.....53

BIBLIOGRAFÍA.....54

APÉNDICE I.....61

ARTÍCULO: Expression and activity of a Kip-related protein, Zeama;KRP1,during maize germination.....65

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de cDNAs de las ICKs de Arabidopsis (AtICK1-AtICK7), Arroz (OsICK) y un EST de maíz (ZmEstICK).....	30
Fig. 2 Amplificación del cDNA de ZmICK1 de maíz por PCR utilizando los nucleótidos con los sitios de restricción BamH1/EcoR1.....	31
Fig. 3 Purificación del cDNA de ZmICK1.....	31
Fig. 4 Digestión de los cDNA de ZmICK1 con BamH1 y EcoRI.....	31
Fig. 5 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de ZmICK1 con polipéptidos deducidos de las secuencias de cDNAs de las ICKs de maíz (ZeamaKRP1 y ZeamaKRP2), Arabidopsis (AtICK1-AtICK7) y Arroz (OsICK).....	33
Fig. 6 Inducción de GST-ZmICK recombinante en PGEX-4T2 con IPTG 1M por 4 h a 37°C.....	34
Fig. 7 Purificación con trombina de la proteína GST-ZmICK recombinante.....	35
Fig. 8 Inmunoréplica para la detección de ICK con la fracción de anticuerpos precipitados con Sulfato de Amonio Saturado (77.7%).....	36
Fig. 9 Validación por ensayos de competencia del anticuerpo anti-ZmICK.....	39
Fig. 10 Efecto de BA y ABA sobre los niveles de la proteína ICK durante la germinación de maíz. Extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 3, 6, 15 y 24 h en la presencia/ausencia de BA 1µM o ABA20µM	40
Fig. 11 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA, anti-ciclina D2 y p13 ^{Suc1} , utilizando GST-ZmRBR-C como sustrato.....	42
Fig. 12 Efecto de BSA sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA y anti-ciclina D2 utilizando GST-ZmRBR-C como sustrato.....	43
Fig. 13 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA.....	44
Fig. 14 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en proteínas asociadas a ciclina D2.....	46
Fig. 15 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en proteínas asociadas a p13 ^{Suc1}	47

ÍNDICE DE MODELOS Y ESQUEMAS

Esquema 1. Representación esquemática de la familia de inhibidores Cip/Kip e INK4. Clasificación, estructura y su asociación con otras proteínas del ciclo celular.....	6
Modelo 1. Transición G1-S en plantas.....	11
Esquema 2. Comparación de las secuencias de proteínas de las ICKs de maíz (ZeamaKRP1, ZeamaKRP2) con aquellas de las familia Cip/Kip (p21, p27 y p57), Arabidopsis (KRP1-7) y KRPs de tabaco (NsKIS1a y NtKISa).....	14
Modelo 2. Ciclo celular durante la germinación de semillas de maíz.....	19
Tabla 1. Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la ICK1 de maíz comparada con la de otras especies.....	33

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
BA	Benciladenina
BSA	Albúmina sérica bovina
CDKA	Cinasa dependiente de ciclina
DP	Compañera de dimerización
GST	Glutación S-transferasa
ICK	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
kDa	kiloDalton
KRP	Proteínas relacionadas a Kip
LB	Luria Broth
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-tiogalactopiranosido
Ipp	Inmunoprecipitado

RESUMEN

La germinación de semillas es un evento fundamental en el ciclo de vida de una planta, durante el cual la semilla reactiva su metabolismo para formar una nueva planta. En un estado avanzado de la germinación se inicia otro evento celular de suma importancia desde un punto de vista bioquímico, que marca el fin de ésta: la división celular. La división celular señala entonces el inicio de crecimiento del eje embrionario por proliferación celular para dar origen a una nueva plántula. La proliferación celular es controlada por señales de crecimiento estimuladoras e inhibitorias transducidas del ambiente extracelular. Los reguladores del ciclo celular tales como ciclinas e inhibidores de CDKs (ICKs) integran estas señales. Los genes ICKs codifican para proteínas de bajo peso molecular, las cuales inducen el arresto del ciclo celular o retrasan la progresión del ciclo celular en respuesta a señales intracelulares o extracelulares. En el presente proyecto de investigación se aisló la secuencia parcial de un inhibidor de CDK de maíz el cual contenía las regiones más conservadas entre las ICKs de plantas. Esta proteína tiene un alto grado de identidad con las ICKs de arroz y Arabidopsis, y como ellas, muestra una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos en común con la familia de CKIs Cip/Kip en mamíferos. La proteína ZmICK1 se mantiene a niveles semejantes a los diferentes tiempos durante la germinación normal, lo cual sugeriría que este inhibidor de cinasas podría funcionar a lo largo del ciclo celular durante la germinación normal de maíz y no sólo en una fase específica del ciclo. Al llevarse a cabo la germinación en presencia de ácido absísico, los niveles de ZmICK1 no variaron, tampoco existió ninguna influencia de citocininas, por lo que no hay un efecto hormonal en la regulación de la acumulación de esta proteína. También se determinó la funcionalidad de ZmICK1 probando su efecto inhibitorio *in vitro* sobre la actividad de CDK asociada a proteínas como PCNA, ciclina D2 y p13^{Suc1} que promueven la progresión del ciclo celular, a través de la transición G1/S. La proteína ZmICK1 ejerce un efecto inhibitorio temporal distinto en la actividad de cinasa asociada a ciclina D2, a PCNA y a p13^{Suc1} durante la germinación normal en ejes embrionarios de extractos proteicos de maíz.

INTRODUCCIÓN

GERMINACIÓN

La germinación comprende aquellos eventos que se activan con la toma de agua por la semilla quiescente y termina con la elongación del eje embrionario (protrusión radicular). La captación de agua favorece el restablecimiento del metabolismo y la realización de diferentes eventos que se dividen en: eventos tempranos como la hidratación, la síntesis de proteínas, la síntesis de ATP, la síntesis de RNA y la reparación de DNA; y eventos tardíos, dentro de los cuales se encuentran la movilización de reservas, la expansión celular y la replicación de DNA [Bewley et al., 1997].

Todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas después de la imbibición están presentes en las células de los embriones de las semillas maduras [Bewley et al., 1997]. La síntesis de proteínas durante las primeras horas de la germinación se debe a la presencia de mRNAs preformados durante la maduración de la semilla, así como a transcritos sintetizados *de novo* conforme procede la germinación. Los inhibidores de la síntesis de proteínas y de RNA inhiben la germinación lo cual evidencia que durante la imbibición ocurre síntesis *de novo* de proteínas y de RNA esenciales para la germinación [Sánchez de Jiménez et al., 1984].

Antes de la germinación de las semillas, las células de los embriones están detenidas en G1 y al germinar se reactiva el ciclo celular activando la replicación del DNA y la división celular. En nuestro laboratorio se ha adoptado la siguiente definición operacional: la germinación de la semilla es un conjunto de procesos bioquímicos y moleculares que permiten al embrión reiniciar la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas. Los eventos propios de la germinación conducirán al metabolismo a un punto de compromiso metabólico partiendo de un estado de quiescencia hasta llegar a la primera división celular, la cual en nuestro concepto marca el inicio del proceso de desarrollo [Vázquez-Ramos, 2000].

CICLO CELULAR

La proliferación celular requiere de la división celular y para lograrlo las células deben crecer en tamaño, duplicar su cromosoma y, finalmente, separar los cromosomas para su exacta distribución entre las dos células hijas. Estos procesos están coordinados en el ciclo celular y consisten de diferentes fases. En la primera fase (G1) las células crecen y empiezan a alargarse. Después de alcanzar un cierto tamaño, las células entran a la siguiente fase (S o de síntesis), en la cual ocurre la síntesis de DNA para duplicar el material hereditario. Durante la siguiente fase (G2) la célula se asegura que la replicación del DNA se haya completado y sólo entonces las células se preparan para la división celular. Los cromosomas son separados durante la fase M (mitosis) y la célula se divide en dos células hijas, cada una recibiendo un juego idéntico de cromosomas. Después de la división las células reingresan a la fase G1 y el ciclo celular puede recomenzar [Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003].

Durante G1 temprano las células integran la información externa que es derivada de estímulos mitogénicos y de la disponibilidad de nutrientes para prepararse y poder pasar a través de las distintas fases del ciclo celular. Para asegurar esta progresión apropiada, las células han desarrollado puntos de control ó checkpoints, que previenen la entrada a una nueva fase hasta que hayan completado correctamente la fase previa [Meijer y Murray, 2000; Malumbres y Barbacid, 2005].

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

La fosforilación y desfosforilación de proteínas clave es un mecanismo fundamental para la regulación del ciclo celular, permitiendo que éste avance. Los complejos ciclina/CDK son las moléculas que conducen la progresión del ciclo celular, regulando las diferentes transiciones, así como la salida del ciclo celular [Boniotti y Griffith, 2002]. Se ha propuesto que la regulación de la expresión de genes en diferentes fases, específicamente en los puntos de control críticos en donde las células pasan de la fase G1 a S y de G2 a M, es un mecanismo importante para controlar la progresión del ciclo celular. Estos genes frecuentemente muestran una regulación dependiente de la posición del ciclo celular [Zhang et al., 2005].

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

La actividad de las CDKs es regulada de una manera compleja, pues son fosforiladas/desfosforiladas por cinasas/fosfatasa específicas. Una de estas modificaciones la realiza la cinasa activadora de CDK (CAK). Esta enzima, compuesta de la ciclina H, la cinasa CDK7 y una proteína de ensamblaje, Mat1, activa al complejo ciclina/CDK por fosforilación en el residuo Thr-161 [Ciemerych y Sicinski, 2005]. La fosforilación de los residuos Thr-14 y Tyr-15 por la cinasa Wee1 interfiere con la correcta unión de ATP y, por lo tanto, inhibe la actividad de las CDKs. Estas fosforilaciones inhibitorias son eliminadas por la acción de la fosfatasa Cdc25 [Larkins et al., 2001]. En mamíferos existen tres fosfatasas Cdc25, codificadas por tres genes relacionados, *Cdc25A*, *Cdc25B* y *Cdc25C*. Cdc25A regula las transiciones G1/S y G2/M, mientras que Cdc25B y Cdc25C controlan la transición G2/M [Ciemerych y Sicinski, 2005].

Otro punto de regulación de las CDKs lo componen proteínas que se unen al complejo ciclina/CDK para regular negativamente su actividad en la fase G1. Este grupo de proteínas se conoce como inhibidores de cinasa dependientes de ciclina (ICK) y se detallarán más adelante [De Veylder et al., 2001].

CICLO CELULAR EN MAMÍFEROS

El ciclo celular en mamíferos es un proceso altamente regulado, influido por señales regulatorias de crecimiento tanto positivas como negativas durante la etapa G1 del ciclo celular [Sheer y Roberts 1999]. En G1 tardío y antes de la entrada a la fase S, las células pasan a través de un punto de restricción crucial para la decisión de entrar a la fase S y completar el ciclo celular, o bien permanecer en un estado quiescente o no proliferativo [Vidal, 2000]. El paso a través de este punto de restricción y entrada a la fase S es coordinado por la activación e inactivación secuencial de complejos ciclina/CDK de la fase G1 [Stevens y Thangue, 2003]. Estos complejos están formados por dos clases de CDKs: CDK4 o CDK6, en combinación con tres ciclinas tipo D (D1, D2 y D3) y CDK2 en asociación con dos ciclinas tipo E (E1 y E2) [Pei y Xiong, 2005].

En mamíferos, la transición G1/S es iniciada a través de la activación de una o más ciclinas tipo D por factores de crecimiento mitogénicos. Una característica estructural de las ciclinas tipo D tanto en animales como en plantas es la presencia de un motivo altamente conservado conocido como LxCxE (donde x representa cualquier residuo de aminoácido) que permite su asociación con pRB y es necesario para la inducción de la síntesis de DNA [Münger, 2003; Stevens y Thangue, 2003].

pRB posee, entre otras funciones, la de un represor transcripcional y se sabe que es miembro de una familia de proteínas conocidas como proteínas “pocket”, que incluyen a p107 y a p130 y pueden inhibir el crecimiento celular al actuar entre las fases G0 y S del ciclo celular, principalmente a través de la unión e inactivación de factores de transcripción [Claudio et al., 2002; Stevaux y Dyson, 2002].

En G0 y en G1 temprano, pRB se encuentra en un estado de hipofosforilación y es esta forma la que se une fuertemente a un motivo de 18 aminoácidos dentro del dominio de transactivación del factor transcripcional E2F, bloqueando su habilidad para reclutar a la maquinaria transcripcional [Trimarchi y Lees, 2001; Stevens y Thangue, 2003].

E2F corresponde a una familia de factores, la que es frecuentemente subdividida en E2Fs activadores (E2F1, E2F2 y E2F3a) y E2Fs represores (E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6 y E2F7a/b). Los E2Fs activadores se unen exclusivamente a pRB, mientras que p107 y p130 interaccionan específicamente con E2Fs represores [Frolov y Dyson, 2004; Cobrinik, 2005]. E2F forma heterodímeros con uno de los miembros de la familia DP (DP1 o DP2), los cuales estabilizan su interacción al DNA y a pRB [Zheng et al., 1999; Datta et al., 2002].

La actividad de la proteína pRB es modulada por eventos de fosforilación secuencial llevados a cabo por los complejos ciclina D/CDK4 o CDK6 en G1 temprano y después, en G1 tardío, por los complejos ciclina E/CDK2 [De Veylder, 2003; Malumbres y Barbacid, 2005]. En un estado de hiperfosforilación pRB libera al factor transcripcional E2F, permitiendo así la transcripción coordinada de un grupo de genes cuyos productos génicos son necesarios para la síntesis de DNA. Una vez que la célula entra a la fase S, la ciclina E es degradada y entonces la CDK2 se asocia con la ciclina A; la formación de este complejo mantienen los niveles de pRB hiperfosforilada durante las fases S y G2 [Vidal, 2000; Ciemerych y Sicinski, 2005], hasta que finalmente es secuencial y temporalmente desfosforilada en la transición M/G1, para unirse de nuevo a los E2Fs libres y prevenir la re-entrada al ciclo celular [Tamrakar et al., 2000; Boniotti y Gutiérrez, 2001; Münger, 2003].

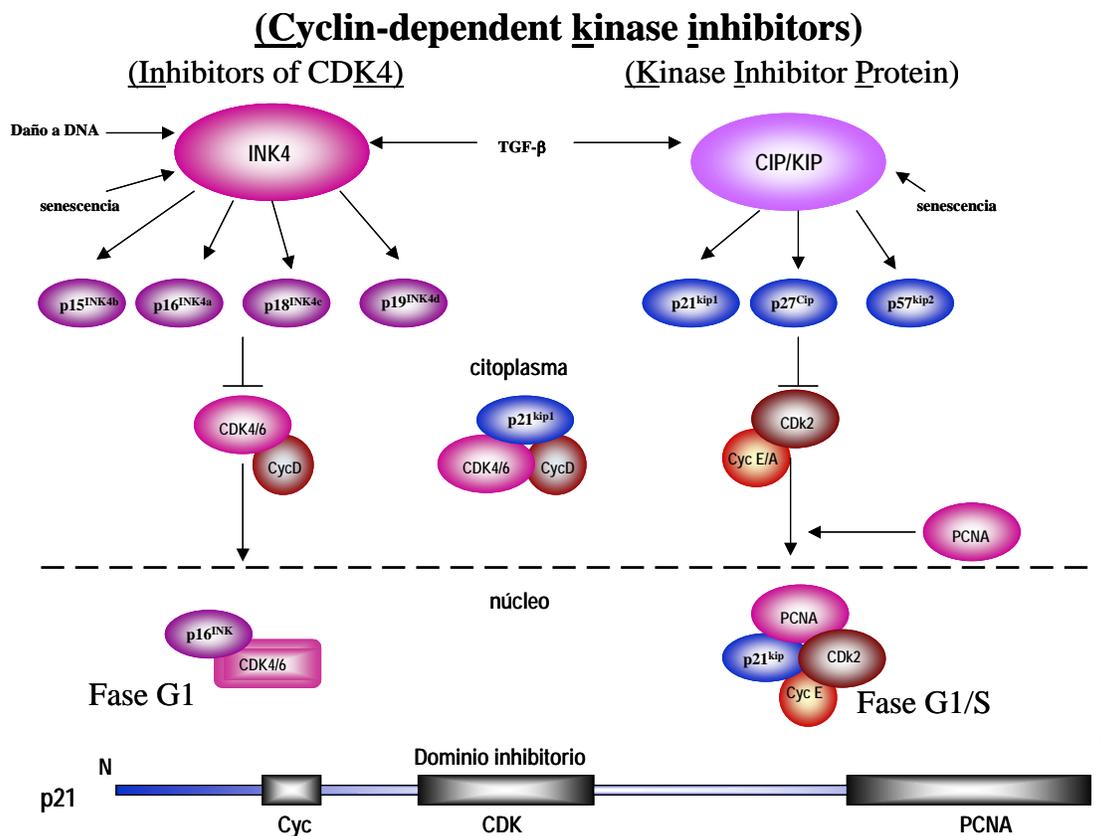
INHIBIDORES DE CDKs EN MAMÍFEROS

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

En mamíferos, las CKIs están bien caracterizadas e inducen el arresto del ciclo celular en respuesta a señales antiproliferativas [Leibovitch et al., 2003]. De acuerdo con su estructura y especificidad de acción, las CKIs se dividen en dos familias: **INK4** (inhibitors of CDK4) y **Cip/kip** (kinase inhibitory protein) [Sherr y Robert, 1999; Rank et al., 2000]. La primera clase incluye a las proteínas **p15, p16, p18 y p19**, son exclusivas de la fase G1

y tienen la habilidad de formar complejos binarios con, e inhibir a, CDK4 y CDK6 [Pavletich, 1999; Thullberg, 2000]. De la familia INK4, p16 es el principal supresor de tumores. Los inhibidores INK4 son proteínas de bajo peso molecular en cuya secuencia se encuentran muchas repeticiones de ankirina y sólo se unen a la subunidad con actividad de cinasa, pero no a las ciclinas [Pavletich, 1999].

Los miembros de la familia Cip/Kip son **p21**, **p27** y **p57** e inhiben un amplio espectro de complejos ciclina-CDK en la transición G1/S [Stals e Inzé 2003; Leibovitch et al., 2003] y forman complejos ternarios con ciclina B/CDC2, ciclina A/CDK2, ciclina E/CDK2, ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6. La región N-terminal de estos inhibidores contiene un dominio de aproximadamente 65 residuos, el cual consiste de dos subdominios separables para unirse a la ciclina y a la CDK [Chen et al., 1995] (Esquema 1).



Esquema 1. Representación esquemática de la familia de inhibidores Cip/Kip e INK4. Clasificación, estructura y su asociación con otras proteínas del ciclo celular basado en los modelos de Sherr y Robert, 1999 y Coqueret, 2003.

Los inhibidores CIP/KIP también funcionan como ensambladores y estabilizadores de los complejos ciclina D-CDK4/6 en el citoplasma y los tres miembros de la familia dirigen la acumulación de los complejos ciclina/CDK al núcleo de la célula, debido a que tanto las ciclinas tipo D como la CDK4 carecen de señales de localización nuclear (NLS) [Mangeng, 1999]. Por lo tanto, estos inhibidores regulan la proliferación celular a través de sus interacciones físicas con las CDKs en el núcleo [Coqueret, 2003; Leibovitch et al., 2003; Lacy et al., 2004] y se requieren en bajas concentraciones para la formación del complejo ciclina/CDK y a altas concentraciones para inhibir la actividad de la CDK [Zhou et al., 2003]. El dominio carboxilo-terminal de p21 se asocia a la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y puede de esta forma inhibir directamente la replicación de DNA [Oh et al., 2002].

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

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

PCNA EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR

PCNA es una proteína auxiliar esencial tanto para el proceso de replicación como de reparación del DNA, estimula la actividad de la DNA polimerasa delta e incrementa su procesividad al actuar como una plataforma móvil que ancla a la DNA polimerasa al DNA molde durante la replicación [Bowman et al., 2005; Kontopidis et al., 2005].

PCNA es una proteína altamente conservada en mamíferos y plantas. En células humanas, la acumulación de PCNA llega a un pico durante la fase S del ciclo celular y después permanece a un nivel constante [Morris y Mathews, 1989]. Estudios bioquímicos han mostrado que PCNA interacciona con complejos ciclina A/CDK2 específicos de la fase S. La unión física de CDK2 a la región C-terminal de PCNA produce un complejo ternario activo de PCNA-CDK2-ciclina A, sugiriendo un papel funcional de PCNA en los complejos ciclina A/CDK2. PCNA parece actuar como un conector entre CDK2 y sus sustratos, estimulando su fosforilación [Maga y Hübscher, 2003].

También se ha demostrado que PCNA puede participar en la formación de complejos cuaternarios de PCNA-p21/CDK-ciclina, particularmente CDK4/ciclina D1, probablemente contribuyendo a coordinar la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA [Zhang et al., 1993]. A nivel celular se considera que la competencia entre p21 y los factores de replicación del DNA (particularmente RF-C) por unirse a PCNA, es el mecanismo a través del cual la síntesis de DNA puede ser inhibida [Kontopidis et al., 2005].

Los complejos cuaternarios de ciclina/CDK con p21 y PCNA existen en múltiples fases del ciclo celular, incluyendo G1, S y aún en G2/M, donde el complejo ciclina B/CDK1 está implicado. La formación de este complejo cuaternario proporciona una base estructural para explicar el hecho de que p21 puede bloquear el acceso a PCNA de otras proteínas involucradas en la replicación del DNA y también puede actuar como un adaptador para varios complejos de PCNA con cinasas [Kontopidis et al., 2005]. Este modelo también sugiere que PCNA podría actuar como una plataforma para múltiples interacciones proteína-proteína involucradas en la replicación, reparación, recombinación y probablemente en el control de la fase G1 del ciclo celular [Ando et al., 2001; Kontopidis et al., 2005].

La unión de PCNA a los complejos ciclina/CDK podría ayudar a llevar estas proteínas regulatorias a sus blancos, mientras que la interrupción de estas interacciones por la unión competitiva de p21 podría ser la señal para arrestar la replicación del DNA. Al facilitar la interacción entre complejos ciclina/CDK y sus sustratos, PCNA parece ser una de las formas en que la célula recluta proteínas específicas a un sitio particular en un momento determinado y como una consecuencia de su interacción con PCNA, muchas proteínas muestran un incremento en su eficiencia catalítica [Maga, 2003].

INHIBIDORES DE CDKs EN OTROS ORGANISMOS

Las proteínas CKIs han sido identificadas en muchos organismos diferentes y, aunque la mayoría de ellas muestra actividad de CKI, controlan un amplio espectro de procesos fisiológicos especie-específicos [Coelho et al., 2005]. En levaduras de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*) se han identificado tres CKIs: **Far1** inhibe a las CDKs de G1; **Sic1** juega un papel importante en la sincronización del comienzo de la fase S al inhibir a los complejos ciclina/CDK de la fase G1/S y **Pho81** inactiva a los complejos ciclina/CDK que controlan la expresión de genes en condiciones deficientes de fosfato. En levaduras de fisión (*Schizosaccharomyces pombe*), una CKI llamada **Rum1** inhibe a los complejos de CDK mitóticos y tiene una función central en la regulación de la fase G1 [Coelho et al., 2005; Verkest et al., 2005].

CICLO CELULAR EN PLANTAS

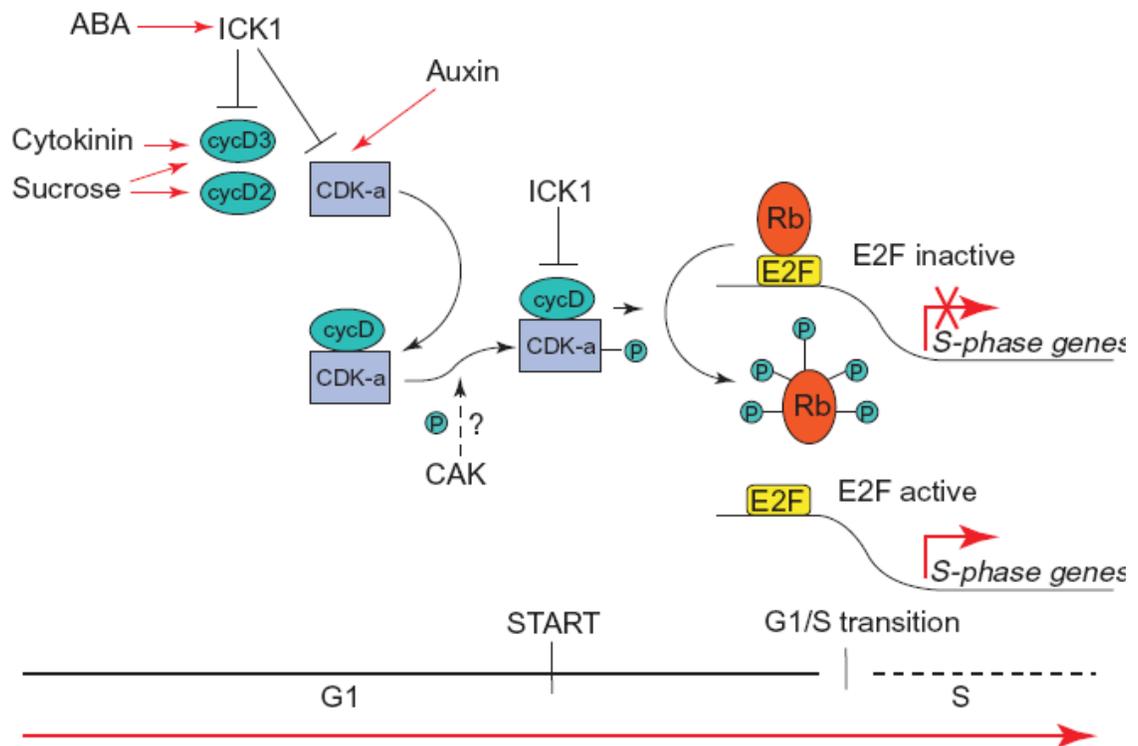
El mecanismo que regula la transición G1/S se ha conservado entre mamíferos y plantas. El desarrollo de las plantas, comparado con el de mamíferos, es influido mucho más por el ambiente en el cual crecen para controlar la división celular y en consecuencia el crecimiento de la planta. En las plantas se han identificado ortólogos de la mayoría de los genes que participan en el ciclo celular y sus productos proteicos muestran similitudes funcionales y estructurales a sus contrapartes en mamíferos.

En células de plantas, como en todos los eucariotes, las cuatro fases básicas del ciclo celular están conservadas y el control de las transiciones G1/S y G2/M está determinada por complejos ciclina/CDK y se han descubierto múltiples CDKs, entre las cuales las mejor caracterizadas son las que contienen el motivo PSTAIRE y que están estrechamente relacionadas a las CDKs prototípicas (cdc2/CDC28 en levaduras y cdc2/CDK1 y CDK2 en mamíferos). En plantas, las CDKs tipo A (CDK-A) contienen este motivo, el cual es esencial para su unión a las ciclinas y regulan tanto la transición G1/S como la G2/M. Las CDK-B actúan sólo en la fase G2/M y se dividen en dos subgrupos dependiendo de la presencia del motivo PPTALRE (CDKB1) o PPTTLRE (CDKB2) [Li et al., 2004].

Las CDKs como monómeros no tienen actividad de cinasa y deben asociarse con las ciclinas para ser activadas. En plantas existen tres clases principales de ciclinas, las A, B y D. Las ciclinas tipo A actúan durante las fases S y M y las ciclinas tipo B controlan la transición G2/M, probablemente en asociación tanto con la CDKA como con la CDKB. Las ciclinas tipo D actúan en la fase G1 como integradoras de señales extracelulares y de desarrollo, aunque su presencia y, quizás su actividad, puede prolongarse hasta G2 [De Jager et al., 2005; Tomohiro, 2006]. Debido a que sus niveles fluctúan en el ciclo celular, semejante a como ocurre en las ciclinas animales, las ciclinas de plantas son los principales factores que determinan el momento de activación de las CDKs [Oakenfull et al., 2002].

En la entrada a G1 y durante la transición G1/S, el mecanismo pRB/E2F es el blanco de los complejos ciclina/CDK. La proteína relacionada a pRB de plantas, o RBR y las proteínas E2F/DP son reguladores claves que acoplan la expresión de muchos genes

requeridos para la entrada a la fase S con la progresión del ciclo celular semejante a como ocurre en células de mamíferos [Rossi y Varotto, 2002; Vandepoele et al., 2002; Dimova y Dyson, 2005] (Modelo 1).



Modelo 1. Transición G1-S en plantas [Bart et al., 2000].

La presencia de un mecanismo mediado por pRB para la regulación del ciclo celular en plantas fue evidenciada por dos líneas de investigación: la existencia de ciclinas tipo D que contienen el motivo LxCxE (el cual media la unión de la ciclina con pRB en células humanas) y la identificación de proteínas en geminivirus que también contienen el motivo LxCxE y que además es requerido para la eficiente replicación viral en células de cultivo [Gutiérrez, 2005]. Los genes codificantes de pRBR fueron descubiertos por primera vez en maíz y después en otras especies de plantas. La proteína RBR es fosforilada por complejos ciclina D/CDKA y la fosforilación ocurre de manera dependiente del ciclo celular, produciendo su máximo en la transición G1/S; esta fosforilación inactiva a RBR y provoca la subsecuente liberación del factor de transcripción E2F-DP en su forma activa [Meijer y Murray, 2000; De Veylder et al., 2003].

Los genes E2F-DP también se han identificado en plantas. En el genoma de *Arabidopsis* están presentes tres genes E2F (E2Fa, E2Fb y E2Fc) y dos genes DP (DPa y DPb). Tanto E2Fa como E2Fb son potentes activadores transcripcionales mientras que E2Fc carece de un dominio de transactivación y por lo tanto actúa como represor [De Veylder et al., 2003; De Jager et al., 2005].

INHIBIDORES DE CDKs EN PLANTAS

Los primeros inhibidores de CDKs en plantas se identificaron en *Arabidopsis* (ICK1-ICK7), mediante ensayos de doble híbrido para identificar proteínas de asociación a la CDKA;1 [Jasinski et al., 2002; Zhou et al., 2003]. Estos inhibidores presentan similitud en su extremo C-terminal con el dominio N-terminal del inhibidor p27^{kip1} de mamíferos, por lo que fueron denominados ICKs (INHIBITORS/INTERACTORS OF CDK) ó KRPs (KIP RELATED PROTEINS) [De Veylder et al., 2001; Weinl et al., 2005; Verkest et al., 2005].

Las interacciones de estos inhibidores con otras proteínas reguladoras del ciclo celular, por el sistema de doble híbrido, ha conducido a su clasificación en dos posibles grupos. Los inhibidores del grupo A, ICK1, ICK2, ICK6 (KRP3) e ICK7 (KRP4) interactúan con CDK-A y tres ciclinas tipo D (DI, D2 y D3), mientras que los inhibidores del grupo B, ICK4 (KRP6), ICK5 (KRP7) e ICKCr (una proteína relacionada a ICK1 de *C. rubrum*) interactúan con ciclinas tipo D pero no con CDK-A [Jasinski et al., 2002; Wang et al., 2003]. Esto podría sugerir que las ICKs tienen un papel importante en la fase G1, donde pueden inhibir tanto el ensamblaje como la actividad de los complejos ciclina/CDK [Wang et al., 1998 Coelho et al., 2005; Nakai et al., 2006]. Las proteínas ICKs individuales también muestran diferente actividad inhibitoria hacia las cinasas asociadas a ciclina D2, sugiriendo que cada ICK tiene distintas funciones, y que las actividades de los complejos son precisamente moduladas por las ICKs [Nakai et al., 2006].

ICK1 fue el primer inhibidor de CDK identificado y caracterizado en términos de sus propiedades bioquímicas y funcionales en *Arabidopsis thaliana* [Zhou et al., 2002; Zhou et al., 2003]. ICK1 interactúa con, e inhibe al complejo ciclina D/CDK-A y su expresión es inducida por ácido abscísico, sugiriendo un posible mecanismo por el cual esta fitohormona puede inhibir la proliferación celular [Wang et al., 1998; Stals e Inze, 2001].

ICK1 es similar a la familia de inhibidores p21/p27 de animales en cuanto a tamaño, hidrofiliidad y en la presencia de una secuencia conservada de 31 aminoácidos en la región carboxilo-terminal de ICK1 que lleva a cabo el efecto inhibitorio sobre la actividad de las CDKs [Wang et al., 1998]. En ensayos de interacción de doble híbrido, ICK1 puede unirse a CDKA;1 y a ciclina D3;1 y se ha demostrado que puede inhibir *in vitro* la actividad de cinasa de la CDKA;1 sobre histona H1 [Weinl et al., 2005]. La inhibición de la división celular por la expresión de ICK1 tiene efectos profundos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas [Wang et al., 2003].

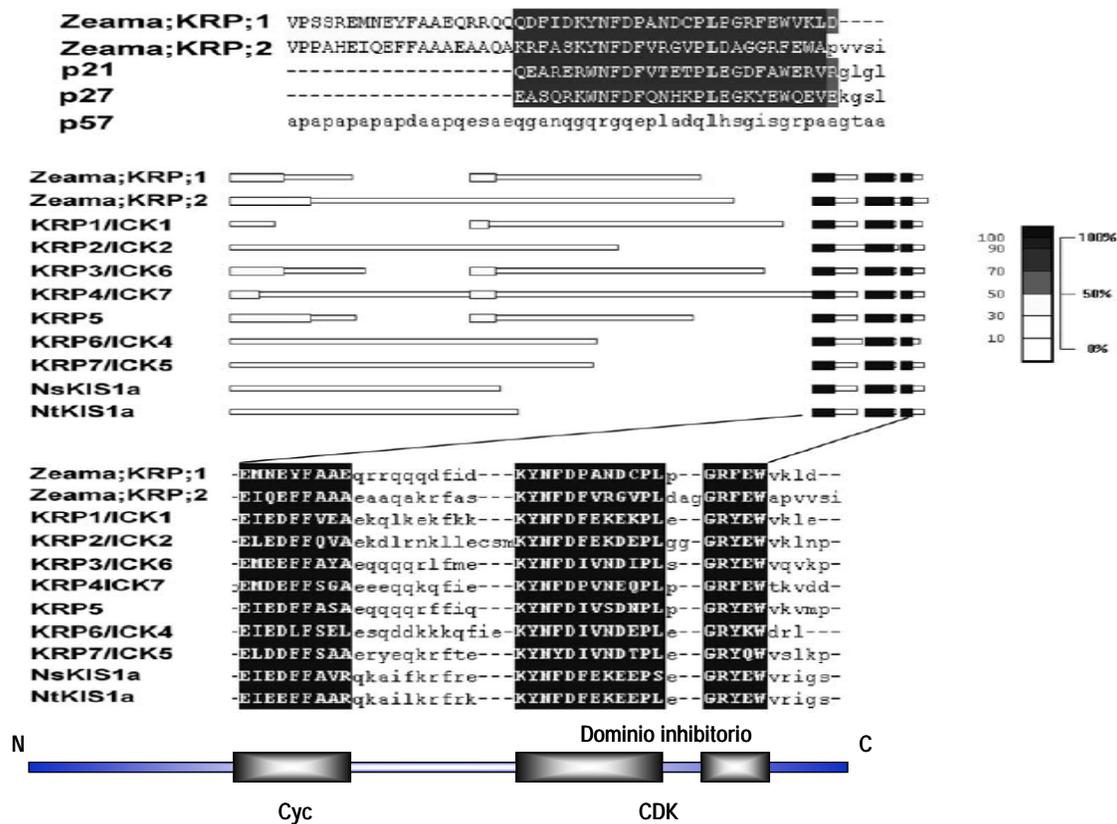
Hay muchas posibles razones por las que las plantas podrían tener múltiples inhibidores de CDK. Estas pueden atacar distintas clases de complejos ciclina/CDK, o bien pueden participar en regular la actividad de las CDKs en respuesta a diferentes señales ambientales y de desarrollo o podrían tener una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

La primera ICK de tabaco (NtKIS1a) identificada fue capaz de inhibir la actividad de cinasa de los complejos ciclina/CDK en células BY-2. En un sistema de doble híbrido, NtKIS1a interacciona tanto con CDK como con ciclinas D, pero no con PCNA, sugiriendo que está más estrechamente relacionado a p27^{Kip1} que a p21^{Cip1} [Jasinski et al., 2002].

Recientemente, se identificaron dos cDNAs en endospermo de maíz que codifican para ICKs (ZeamaKRP1 y ZeamaKRP2); estos dos genes muestran dominios conservados con las CKIs Cip/Kip de mamíferos. Ambas proteínas son capaces de inhibir la actividad de cinasa Cdc2/CDK asociada a p13^{Suc1} e inhiben específicamente la actividad de CDK asociada a ciclina D5;1 (fase G1), pero no a la CDK asociada a ciclina B1;3 (fase M) [Coelho et al., 2005] (Esquema 2).

ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS ICKs

Sólo tres dominios localizados en el extremo C-terminal están conservados en todos los inhibidores de CDK de plantas [De Veylder et al., 2001]. Esta región de las ICKs muestra homología parcial con el dominio de las proteínas KIP/CIP necesario para la interacción con las CDKs, sugiriendo que la función de las CKIs en plantas reside en su extremo C-terminal. Todos los inhibidores de CDKs en plantas muestran un dominio de 36 aminoácidos el cual es esencial para la interacción con CDKs y ciclinas y que corresponde al dominio de unión a la CDK de p27^{Kip1} [De Veylder et al, 2001; Coelho et al., 2005; Verkest et al., 2005; Weinl et al., 2005] (Esquema 2).



Esquema 2. Comparación de las secuencias de proteínas de las ICKs de maíz (ZeamaKRP1, ZeamaKRP2) con aquellas de las familia Cip/Kip (p21, p27 y p57), Arabidopsis (KRP1-7) y KRPs de tabaco (NsKIS1a y NtKIS1a). [Coelho et al., 2005].

La función del extremo N-terminal, muy variante entre ICKs, aún es incierto. Se ha sugerido que la región N-terminal de AtKRP1 regula negativamente su función; la delección de esta región incrementa significativamente la interacción física de AtKRP1 con CDKA y ciclina D3. Los dominios adicionales encontrados en la parte N-terminal de las ICKs podría ayudar a determinar la especificidad hacia diferentes complejos ciclina/CDKs, o bien interaccionar con otras proteínas aún por describirse [De Veylder et al., 2001]. Otra posible función del extremo N-terminal podría ser la regulación de la estabilidad de las ICKs. Se ha demostrado que la eliminación de la región N-terminal incrementa los niveles de proteína de AtKRP1. Sin embargo, los mecanismos que regulan la estabilidad de esta proteína se desconocen [Verkest et al., 2005]. En contraste, la delección de la región conservada C-terminal atenúa las interacciones de AtKRP1 con CDKA y ciclina D3 [Zhou et al., 2003].

FITOHORMONAS Y CICLO CELULAR

Se sabe que la transducción de señales entre el medio ambiente y la maquinaria del ciclo celular es importante para el crecimiento de las plantas [Jasinski et al., 2002]. De entre una multitud de factores específicos que afectan la proliferación celular en plantas, las fitohormonas parecen jugar el papel más prominente en crear vínculos funcionales entre la recepción y transducción de señales internas y externas, que conducen al desarrollo y a la expresión de genes del ciclo celular [Polit et al., 2003]. Los reguladores del ciclo celular tales como CDKs, ciclinas o inhibidores de CDKs son las proteínas principales que integran estas señales.

Por ejemplo, durante la germinación de semillas, la acción de agentes externos así como de hormonas vegetales, modifican principalmente la fase G1 del ciclo celular, acortándola o alargándola [Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003]. La mayoría de las hormonas se encuentran en un nivel basal en las plantas bajo una situación de crecimiento. Los niveles de hormonas cambian durante el curso normal del desarrollo de una planta y estos cambios probablemente determinan patrones intrínsecos de crecimiento y desarrollo. Sin

embargo las hormonas también son componentes claves de mecanismos de respuesta puesto que pueden ser moduladas en respuesta a señales ambientales [Malamy, 2005].

La evidencia indica que las citocininas regulan el ciclo celular tanto en la transición G1/S como en la G2/M [Zhang et al., 2005]. Durante la germinación de maíz, la benciladenina, una citocinina sintética, acelera el proceso de germinación, afectando los niveles de proteínas de la transición G1/S del ciclo celular como PCNA y ciclinas D y estimula la actividad de una DNA polimerasa replicativa durante la germinación [Sánchez et al., 2002; Sánchez et al., 2004].

Como las ciclinas D están involucradas en la iniciación del ciclo celular por ser las responsable de establecer la decisión de entrar al ciclo, actúan como sensores de factores de crecimiento. La activación de la división celular es un determinante clave de la germinación y los genes de ciclina D activados tempranamente controlan de manera limitante la velocidad de germinación y por lo tanto son los reguladores responsables de impulsar la germinación [Masubelele et al., 2005].

El ácido abscísico (ABA) promueve el cierre de los estomas al alterar rápidamente el flujo de iones en las células guarda. Otras acciones de ABA están involucradas con modificaciones en la expresión de genes [Jefrey et al., 1998]. Además, tiene una función importante en la maduración y germinación de la semilla, así como en la adaptación a un estrés ambiental abiótico. ABA inhibe la germinación de semillas, posiblemente al bloquear la replicación de DNA y en *Arabidopsis* induce la expresión de un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (ICK1), el cual conduce al arresto del ciclo celular en la transición G1/S; este podría ser un mecanismo por el cual el establecimiento de la fase S es bloqueada durante la germinación de las semillas [Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003]. Se ha reportado que el complejo ICK1/KRP1 es capaz de inhibir la división celular y modificar la morfología y crecimiento en células de *Arabidopsis* [Jasinski et al., 2002; Zhou et al., 2003].

ANTECEDENTES

La germinación de semillas parece ser un excelente modelo para estudiar el ciclo celular en plantas. El desarrollo del embrión durante la formación de la semilla implica una alta velocidad de proliferación celular; este proceso puede tomar varias semanas, después del cual la semilla acumula material de reserva, madura y pierde agua. Las células en embriones de semillas secas de diferentes especies tienen mayoritariamente un contenido de DNA tipo G1 [Deltour y Jacquard, 1975]. Al inicio de la germinación, las células se encuentran en una fase semejante a G0 y eventualmente entran a la fase G1, la cual puede tener una duración variable y, después de la cual ocurre la síntesis de DNA de tipo replicativo, marcando el inicio de la fase S [Baíza et al., 1989].

Es importante estudiar las fases G1 y S del ciclo celular durante la germinación, puesto que es en estas fases donde ocurre un control más meticuloso en el avance del ciclo celular. De hecho, se ha observado que la fase G1 puede ser la más larga de las fases, ya que la célula debe estar completamente segura que tiene todo lo necesario para sobrevivir y es aquí donde ocurren una serie de mecanismos de verificación, después de los cuales se compromete a replicar su DNA.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que durante la germinación de maíz, la proteína PCNA está presente a bajos niveles en ejes embrionarios de semilla seca y su cantidad se incrementa gradualmente hasta alcanzar un máximo en el momento en que las células están entrando a la fase S (15-20 h de germinación) [Herrera et al., 2000]. Poco se sabe acerca de los complejos proteicos que forma PCNA en plantas. Sin embargo, inicialmente se reportó la asociación de PCNA de maíz con una ciclina D putativa y con una cinasa tipo Cdk-A; este complejo ternario contenía una actividad de cinasa y tanto la asociación como la actividad sólo eran detectadas durante las primeras 15 h de germinación y desaparecían según avanzaba la replicación del DNA [Sánchez et al., 2004].

Un anticuerpo contra la secuencia PSTAIRE, presente en Cdk-A, reconoce dos proteínas de 32 y 36 kDa en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz y, mientras la cantidad de la proteína de 36 kDa se incrementa conforme avanza la germinación, los niveles de la proteína de 32 kDa disminuyen después de las 15h. PCNA se une a estos dos

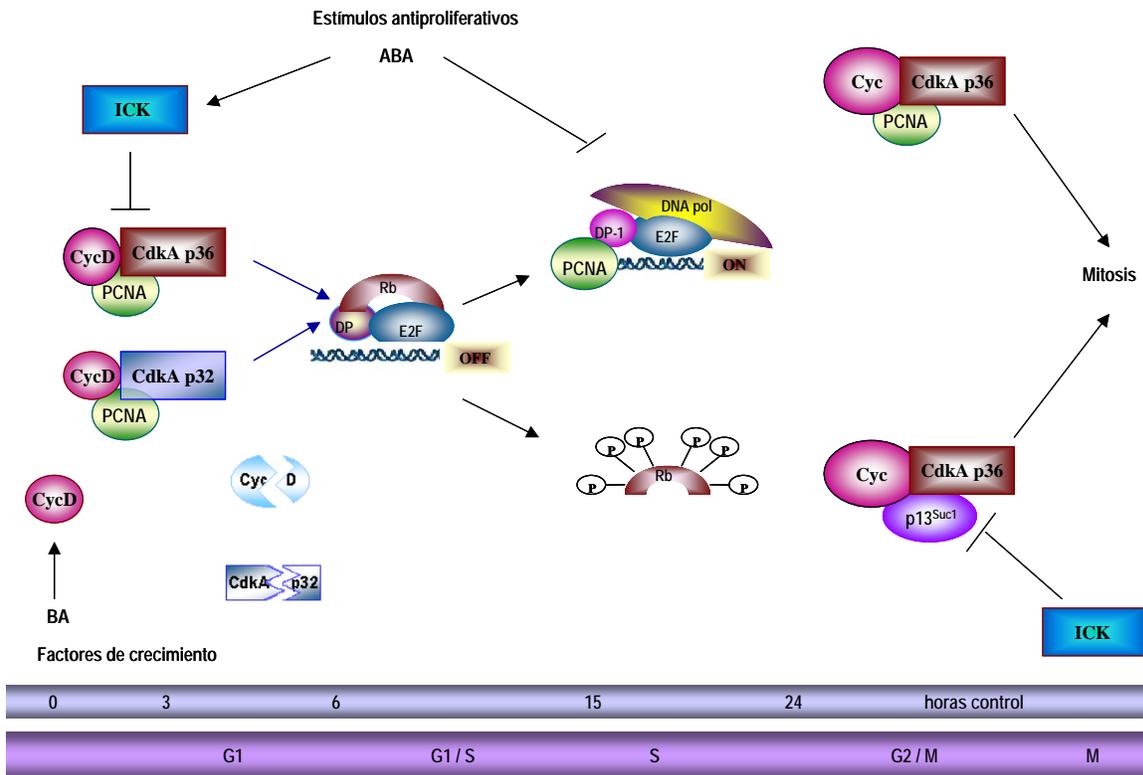
tipos de CDKs y aparentemente la unión a ambas está en función proporcional a su abundancia [Sánchez et al., 2002].

La actividad de cinasa asociada a PCNA es mayor durante las horas tempranas de la germinación (0-6 h), que a horas tardías (15 y 24 h), que es cuando la fase S comienza, sugiriendo que la cinasa asociada es de la fase G1. Las dos cinasas PSTAIRE, de 32 y 36 kDa, pueden encontrarse en complejos con PCNA antes de que la fase S inicie y es interesante que la actividad de cinasa se incrementa en paralelo con el incremento de la cantidad de la proteína PSTAIRE de 32 kDa y decrece conforme esta cinasa desaparece [Sánchez et al., 2002].

En ensayos *in vitro*, la proteína de levaduras de fisión $p13^{\text{Suc1}}$ se une fuertemente a CDKs tipo PSTAIRE en extractos proteicos de maíz. El complejo de cinasa asociado a $p13^{\text{Suc1}}$ contiene una proteína de aproximadamente 36 kDa, la cual es detectada con el anticuerpo anti-PSTAIRE; la actividad de este complejo se incrementa cuando comienza la fase S, después de las 15h de germinación, sugiriendo que esta cinasa actúa durante la fase G2 [Sánchez et al., 2004]. Por lo tanto, la actividad de cinasa asociada a $p13^{\text{Suc1}}$ durante la germinación de maíz, usando RBR de maíz como sustrato, muestra una activación temporal distinta a la asociada a PCNA.

Las evidencias descritas sugieren que la cinasa PSTAIRE de 32 kDa es la principal responsable de la actividad de cinasa asociada a PCNA, mientras que la cinasa PSTAIRE de 36 kDa lo es en los complejos asociados a $p13^{\text{Suc1}}$. Esta unión diferencial puede explicar la actividad de cinasa diferencial encontrada entre estos dos complejos durante la germinación. Por lo tanto, las dos cinasas PSTAIRE podrían participar en la regulación de las distintas etapas del ciclo celular durante la germinación de maíz [Sánchez et al., 2002 y Sánchez et al., 2004] (Modelo 2).

Ciclo celular durante la germinación de maíz



Modelo 2. Ciclo celular durante la germinación de semillas de maíz. [Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003].

Recientemente se han aislado los cDNA de cuatro diferentes ciclinas D de maíz, las ciclinas D5;1; D5;2; D2;1 y D4;1 (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos). De éstas, se ha reportado que los inmunoprecipitados de ciclina D2;1 contienen a las dos proteínas PSTAIRE y la actividad de cinasa asociada a ciclina D2;1 se incrementa gradualmente hasta alcanzar un máximo hacia las 15 h de germinación y disminuye posteriormente. Esta actividad de cinasa es fuertemente inhibida por olomoucina, un inhibidor específico de cinasas PSTAIRE, corroborando que la cinasa asociada es de tipo CDK-A [Gutiérrez et al., 2005].

En células de mamíferos, las CKIs juegan un papel importante en controlar la progresión de la fase G1 [Pestell et al., 1999]. En plantas, el papel de los inhibidores de CDKs en el control del ciclo celular y la progresión G1-S aún no está completamente comprendido.

Usando datos de secuencias en el GENBANK (Maize Genetics and Genomics Database) se identificó un EST (Expressed Sequence Tag) de maíz el cual corresponde a la secuencia parcial de un cDNA, que codifica para un miembro de las KRPs (EST AW267370). El cDNA correspondiente fue aislado mediante técnicas de RT-PCR. Esta clona fue llamada ZmICK1 y tiene una longitud de 355 pb. La identidad de esta KRP de maíz fue confirmada por un análisis filogenético usando el programa de alineamiento múltiple CLUSTAL W (EMBL-EBI). El análisis de la secuencia de aminoácidos predicho revela la presencia de los tres motivos conservados en el extremo C-terminal de todas las KRPs de plantas.

El propósito de este trabajo es estudiar la expresión de ZmICK1 de maíz y su función inhibitoria sobre los complejos ciclina/CDK presentes durante las etapas tempranas de la germinación, en las que las células embrionarias están en las fases G1 y S del ciclo celular. Dado que las ciclinas D median la transición G1/S durante la germinación normal de maíz, se ha propuesto que esta ZmICK1 podría funcionar como un inhibidor de la fase G1.

HIPÓTESIS:

Debido a que las ICKs son mediadores importantes de señales antiproliferativas, entonces podrán inhibir la actividad de cinasa asociada a PCNA, a ciclina D2 y a p13^{Suc1} que promueven la progresión del ciclo celular, a través de la transición G1/S.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto inhibitorio de la proteína ICK sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA, a ciclina D2 y a p13^{Suc1}, durante la germinación normal y su comportamiento en presencia de fitohormonas (BA y ABA) que estimulan o inhiben la germinación de maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Mediante la obtención de la secuencia completa de una ICK de maíz, sobreproducir la proteína y producir anticuerpos homólogos.
- Estudiar los niveles de la proteína ICK durante la germinación normal de maíz y en presencia de fitohormonas como BA y ABA.
- Determinar la función inhibitoria de la proteína ICK sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA, ciclina D2 y a p13^{Suc1}.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Los ejes embrionarios se obtuvieron de semillas de maíz, (*Zea mays* variedad criolla Chalqueño), provenientes del Valle de Chalco, Edo. de México.

TRATAMIENTO DE EJES EMBRIONARIOS

Se desinfectaron 10 ejes embrionarios con NaClO al 0.1 % durante 30 seg. Se lavaron 5 veces con agua estéril durante 30 seg y se dejaron secar sobre papel filtro estéril por 15 min. Posteriormente se adicionó el buffer de imbibición que contiene Tris HCl 50 mM pH 7.6, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y sacarosa al 2% en presencia y ausencia de BA 1 μM ó ABA 20 μM. Los ejes se germinaron por 3, 6, 15 y 24 h. Las proteínas se extraen con buffer de extracción (1 mL/10 ejes embrionarios) que contiene Tris-HCl 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 15 mM, NaCl 75 mM, KCl 25 mM, EDTA 5mM pH 8.0, DTT 1mM, Tritón X-100 0.2%, sacarosa 250 mM, β-glicerofosfato 60 mM, NaF 50 mM, Na₃V0₄ 200 μM, EGTA 1 mM y una tableta de inhibidores de proteasa/50 mL de buffer. Los extractos se centrifugaron a 30,000 rpm/30 min, 4°C y la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

AISLAMIENTO DE UN cDNA DE ICK

Para el aislamiento deL cDNA codificante de un inhibidor de CDKs se realizó un análisis de secuencias de nucleótidos, para ello se compararon las secuencias de las ICKs (ICK1-ICK7) de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), arroz (*Oriza Sativa*) y un EST de maíz (AW267370). Los oligos fueron diseñados contra la región que codifica para el carboxilo y la región amino de los dominios más conservados, según el análisis de secuencias.

AMPLIFICACIÓN DEL cDNA DE ZmICK1 POR PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando los siguientes oligonucleótidos: Fw 5' ATG GGC AAG TAC ATG CGC AAG 3' y Re 5' GTC TAG CTT CAC CCA TTC AAA CCT GCC 3'. Se emplearon 250 ng de DNA como molde se les agregó 0.3 μ M de cada uno de los oligonucleótidos, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 50 mM, buffer 10X para PCR y 0.5 U de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron 60 °C/1 min, 72°C /1 min y 35 ciclos.

Mediante PCR se logró amplificar un fragmento de 355 pb. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.9%, se cortó la banda correspondiente al cDNA y se purificó con un Kit (Gibco) como se indica en el protocolo. El cDNA purificado se clonó en el vector pGEM-T-EASY (Promega). Posteriormente se realizó la transformación en células competentes de *E.coli*, DH5 α con el producto de la reacción de ligación bajo las siguientes condiciones: 30 min/4°C, 45 s/42°C y 2 min/4°C. Se agregó 1 mL de medio SOC y se incubó 1 h /37°C. Las bacterias se sembraron en medio LB/Ampicilina (50 μ g/ μ L) suplementado con X-Gal e IPTG (0.5 mM).

Este vector permite seleccionar las clonas que contiene el cDNA de interés porque contiene en su sitio múltiple de clonación el gen que codifica para la β -Galactosidasa (Lac Z), por lo que al insertar el cDNA en esta región la enzima se inactiva y las colonias positivas pueden ser seleccionadas debido a que presentan un color blanco translúcido. Las colonias que presentan una coloración azul no presentan el inserto, ya que no se interrumpió el gen Lac Z y la β -Galactosidasa producida puede hidrolizar el análogo de la lactosa X-Gal, que al precipitarse da una coloración azul, ésto se lleva a cabo en presencia de IPTG, que induce la expresión del gen. La bacterias que contienen el plásmido se crecen por 12 h/37°C en medio LB/Ampicilina. Se centrifuga todo el extracto celular y se aísla el plásmido con el Kit Wizard Plus Miniprep Promega como se indica en el protocolo. La digestión con la enzima de restricción EcoR1 permite liberar el inserto del vector pGEM-T-EASY. El plásmido obtenido se llevó a secuenciar y se realizó un análisis por BLAST a partir de la secuencia de aminoácidos traducida del cDNA del producto de PCR.

CLONACIÓN EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pGEX-4T2

Se diseñaron nucleótido con los sitios de restricción necesarios para poder subclonar en el vector de expresión (pGEX-4T2). La ZmICK1 fue amplificada por PCR utilizando los oligos específicos el gen GST-ZmICK1 Fw 5'CGCggatccGCG TGGGCAAGTACATGCGCA3', RE 5'GgaattcCGTCTAGCTTCACCCATTCAAAA 3', se subclonó en marco de lectura abierto en el vector de expresión pGEX-4T2 y con la construcción resultante se transformaron células BL21.

INDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA GST-ZmICK RECOMBINANTE

El vector de expresión (pGEX-4T2) facilita la purificación de la proteína de interés porque codifica una proteína de fusión con la Glutathión S-Transferasa (GST). Estas se asocia a la resina Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences), permitiendo separar a la proteína GST-ICK del resto de las proteínas de la bacteria, por cromatografía de afinidad.

La producción de la proteína recombinante GST-ICK1 fue inducida con IPTG 1M por 4 h a 37°C. La proteína recombinante fue purificada utilizando la columna de afinidad Glutathione Sepharose como sigue: después de centrifugar el extracto celular a 10000 rpm/10 min el pellet se resuspende en una solución que contiene 0.08 g de lisozima en PBS 1X por 1 h y se adiciona una tableta de inhibidores de proteasa COMPLETE. Se adiciona Tritón X-100 al 10% en PBS 1X por 30 min y se centrifuga a 10000 rpm/5 min. El sobrenadante se incuba 2 h con la columna de afinidad, se lava 3 veces con PBS 1X para eliminar las proteínas no-unidas a la resina y la proteína de interés se eluye con 50 mM de Tris-Glutathión pH 8.0 (1 mL de Tris-Glutathión/mL de resina). Si solo se requiere obtener la proteína ICK, se lleva a cabo un paso proteolítico por el cual después de lavar la resina 3 veces con PBS 1X se incuba con trombina (50 µL/mL de resina) por 2 h a temperatura ambiente. La proteína cortada se eluye con 500 µL de PBS 1X.

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

Se diseñó un esquema de inmunización y se inocularon dos conejos. Uno de ellos se inoculó con la proteína ICK fusionada a GST y el otro sólo con la proteína ICK. Para obtener una mejor respuesta inmune los antígenos se acoplaron a hemocianina (Sigma). Por ello, se prepara una solución de hemocianina (2 mg) con 10 μ L de glutaraldehído en 90 μ L de PBS 1X y se incuba por 12 h. El exceso de glutaraldehído se elimina mediante tubos Centricón 50 por 15 min. A esta solución se le agrega el antígeno (250-500 μ g) y se deja acoplando 12 h a temperatura ambiente. Para inyectar al conejo se hace una emulsión agregando a lo anterior Adyuvante completo o incompleto de Freund. Se realizaron 7 inmunizaciones en total (3 inmunizaciones por semana, 2 en una sola semana y 2 refuerzos en la siguiente semana). Antes de la sangría de prueba se hicieron 4 inmunizaciones y 3 posteriores.

Una vez obtenidos los respectivos anticuerpos se purificaron precipitándolos con sulfato de amonio saturado (77.7 %) a una concentración final del 50% p/v; 0.5 mL de suero inmune se precipitan con 0.25 mL de sulfato de amonio saturado (77.7 %) y se incuba por 12 h/4°C en agitación. Se realiza una primera centrifugación a 4000 rpm/4°C/30 min y el sobrenadante se vuelve a precipitar con 0.25 mL de sulfato de amonio saturado y se incuba por 6 h/4°C en agitación. La segunda centrifugación es a 4000 rpm/4°C/30 min y al precipitado se le adicionan 200 μ L de PBS 1X. Los anticuerpos se dializan en tubos Centricón con 500 μ L de PBS 1X a 3000 rpm/4°C/5 min (3 veces).

INMUNOPURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO anti-ZmICK

Se carga en un gel SDS-PAGE el equivalente a 0.2-1.0 mg de proteína total (antígeno). Después se transfiere a una membrana de nitrocelulosa y se incuba con el suero inmune o el suero precipitado con sulfato de amonio (0.2 mL de suero precipitado con sulfato de amonio/2 mL de PBS 1X) por 12 h/4°C. Posteriormente, se lavan con PBS 1X (5 min cada lavado en agitación) y se eluye el anticuerpo con 0.5 mL de buffer de glicina 0.2 M pH 2.7. Se neutraliza con Tris-base 0.5 M pH 8.

ENSAYOS DE COMPETENCIA

El anticuerpo anti-ZmICK en una dilución 1:1000 se incubó 12 h con la proteína recombinante ICK (30 µg y 50µg) y se llevó a un volumen de 100 µL con PBS 1X. Esta solución se utiliza como primer anticuerpo y se realiza una réplica en Western para observar el efecto de competencia.

RÉPLICA EN WESTERN

Los geles SDS-PAGE (14%) fueron transferidos a membranas de PVDF y éstas se incubaron con anticuerpos policlonales anti-ZmICK (1:1000) por 12 h/TA, se lavaron dos veces con buffer PBS 1X/15 min y un lavado con buffer PBS 1X que contiene NaCl 0.5 M/15 min, después se incubaron por 2 h con un segundo anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa en una dilución 1:10,000 y la reacción de peroxidasa se detectó por quimioluminiscencia (ECL). Los análisis densitométricos se llevaron a cabo utilizando el equipo Phosphoimager de BioRad.

INMUNOPRECIPITACIÓN

Se incubaron proteínas (200 µg de extractos proteicos) con anticuerpo anti-ciclina D2 (1:10) [Gutiérrez et al., 2005] , anti-ZmICK (1:10), anti-PCNA (1:15) [Sánchez et al., 2004], conjugados a proteína A-Agarosa 12 h/4°C, después se lavaron con 50 µL de buffer Suc que contiene Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 5 mM pH 8.0, EGTA 1 mM y las proteínas resultantes se revelaron por SDS-PAGE (14%).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE CINASA ASOCIADA A PCNA Y p13^{Suc1}

Se incubaron proteínas (200 µg de extractos proteicos) con anticuerpo anti-PCNA conjugado a proteína A-Agarosa (30 µL) o p13^{Suc1}-Sepharose (10 µL) 12h/4°C, después se lavaron con 50 µL de buffer Suc que contiene Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 5 mM pH 8.0, EGTA 1 mM y las proteínas resultantes se utilizaron como fuente de actividad de cinasa.

Las proteínas asociadas a PCNA y p13^{Suc1} fueron resuspendidas en 15 µL de buffer de cinasa (Tris-HCl 70 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 25 mM,

EDTA 5 mM pH 8.0, DTT 1mM, sacarosa 0.25 M, EGTA 5 mM, ATP 20 μ M y 5 μ Ci de γ -³²P[ATP]. Se utilizó como sustrato GST-ZmRBR-C en ausencia y presencia de ICK recombinante (2.5 μ g para PCNA y 0.5 μ g para p13^{Suc1}). La purificación de GST-ZmRBR-C se llevó a cabo de acuerdo a Ramírez-Parra et al. (1999). La reacción se llevó a cabo por 30 min y se paró con 15 μ L de buffer de carga para proteína que contiene SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 90°C/5 min y se separaron por SDS-PAGE (14%).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE CINASA PARA CICLINA D2

Se incubaron proteínas (200 μ g de extractos proteicos) con anticuerpo anti-ciclina D2 conjugado a proteína G-Agarosa (1:10), después se lavaron con 50 μ L de buffer Suc que contiene Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 125 mM, EDTA 5 mM pH 8.0, EGTA 1 mM y las proteínas resultantes se utilizaron como fuente de actividad de cinasa.

Las proteínas asociada a ciclina D2 fueron resuspendidas en 10 μ L de buffer de cinasa (Tris-HCl 70 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 25 mM, EDTA 5 mM pH 8.0, DTT 1 mM, sacarosa 0.25 M, EGTA 5 mM, ATP 20 μ M y 3 μ Ci de γ -³²P[ATP]. Se utilizó como sustrato GST-ZmRBR-C (4 μ g) en ausencia y presencia de ICK recombinante (2.5 μ g de proteína). La reacción se llevó a cabo por 30 min y se paró con 15 μ L de buffer de carga para proteína que contiene SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 90°C/5 min y se separaron por SDS-PAGE (14%).

RESULTADOS

Para el aislamiento de un inhibidor de CDKs se realizó un análisis de secuencias, para ello se compararon varias secuencias de ICKs de Arabidopsis, arroz y un EST de maíz (AW267370). De este análisis se encontró que existen motivos muy conservados en el extremo carboxilo de las ICKs de Arabidopsis, arroz y maíz y la secuencia del cDNA del EST de maíz también presentó estos dominios bien conservados hacia el extremo carboxilo, sin embargo las ICKs analizadas, así como las de otras especies, presentaron una gran divergencia hacia el extremo amino.

Para poder aislar un cDNA de una ICK de maíz se diseñaron nucleótidos contra la región C-terminal y la región N-terminal de los dominios más conservados en el análisis de secuencias.

Mediante técnicas de PCR se logró amplificar un fragmento de 355 pb. El producto de PCR se reamplificó y se corrió en un gel de agarosa para cortar, purificar y clonar en el vector pGEM. Posteriormente se secuenció y se encontró que la secuencia obtenida correspondía a una ICK de maíz con alta semejanza con el extremo carboxilo de las ICKs de Arabidopsis y arroz (Fig. 1). Como no se logró obtener la secuencia completa de este gen, se diseñaron nucleótidos con los sitios de restricción para *BamHI* y *EcoRI* para subclonar el producto en un vector de expresión (PGEX-4T2).

ZmEstICK -----
OsICK -MGKYMRKAKVVVSGE-----VVAAAVMELAAAP----LGVTRARSLALQ-- 41
AtICK4 -MGKYIRKSKIDGAGAGAGGGGGGGGGESSIALMDVVPSSSSSLGVLTRAKSLALQQQ 59
AtICK3 -MGKYMKKSKITG-----DISVMEVSKATAPSPGVRTRAAKTLALKRL 42
AtICK5 -MGKYIKKSKVAG-----AVSVKDKSHPPALGFRTAAAAKNLALHRL 42
AtICK6 -MSERKRELAEEAS-----STSFSPKKTKLNDSSDSSPDSHDVIVFAV 43
AtICK7 -MSETK---PKRDS-----EYEGSNIKRMRLDDDDD-VLRSPTRTLSS 39
AtICK1 -MVRKYRKAKGIVEAG-----VSSTYMLRSRRIVYVRSEKSSSVVVDNG 46
AtICK2 -MAAVRRRERDVVEEN-----GVTTTTVKKRKMEEVDLVESRIILSPCVQ 45

ZmEstICK -----
OsICK -----KROGGEYLELRSRRLEKLPPPPPP 65
AtICK4 QQRCLLQKPSPPSSLPPTSASENPPSKQMKKKQQMNDCGSYLQLRSRRLQKKPPIVVI 119
AtICK3 NS-----SAADSALPNDSscyLQLRSRRLKPKSSLIEP 75
AtICK5 RS-----HSDEADSFN----YLQLRSRRLVKLPLLTNT 71
AtICK6 SSS-----SVASSAALASDECSVTIGGEESDQ-SSSISS 76
AtICK7 SSS-----SLAYSVSDSGGFCSVALSEEDDHRSSSISS 73
AtICK1 VSS-----SCSGSNEYKKKELIHLEEDKDGDTETSTY 79
AtICK2 ATN-----RGGIVARNASAGSETSVVIVRRRDSPPVVEEQCI 82

ZmEstICK -----
OsICK PPR-----RRATAAAATADATAAESA-----EAEVSF 92
AtICK4 RSTKRRKQQRNETCGRNPNPRSNLDSIRGDGSRSDSVSESVVFGKDKDLISEINKDPTF 179
AtICK3 KQPPRVHRSGIKESGSRSRVDSVNSVPVAQSSNEDECFDN-----FVSVQVSC 123
AtICK5 RKQ---QKQQLIPS-----VNQCQTKNPRASSGPAKKLEP-----DTTTEEAC 111
AtICK6 GCF-----TSESKEIAKNSSSFGV-----DLEDHQIET 104
AtICK7 GCS-----SSETNEIATRLPFS-----DLEAHEIS- 98
AtICK1 RRG-----TKRKLFEENLREEE-----KEELSK 101
AtICK2 EEE-----DSSVSCCSTSEEKSKRR-----IEFVDLEENN 112

ZmEstICK ----- 9
OsICK GGEN-VLELEAMERIAPFVSLNCVKNTWVAPSPKYPRVGATCLOGTKGVPYERDEQVLRH 151
AtICK4 GQNFFDLEEEHTQRTT----- 195
AtICK3 GENSLGFESRHSTRES----- 139
AtICK5 GDN-----ERISRS----- 121
AtICK6 ETETSTFITSNFRKET----- 120
AtICK7 ETEISTLLTNNFRKQG----- 114
AtICK1 SMENYSSEFESAVKES----- 117
AtICK2 GDDRETETSWIYDDLN----- 128

```

ZmEstICK      ----RETPCSLIN-SEMISTPGSTTRSSH-----SHRRVKAPPVH-AIPSTEMNEYFA 59
OsICK         FWNTRETTPCSLIRDPDTISTPGSTTRSSH-----SHCKVQTPVRHNIIPASAELEAFFA 208
AtICK4       ----RESTPCSLIRRPEIMTPGSSTKLNICVSESNQREDSLSRSHRRRPTTPEMDEFFS 251
AtICK3       -----TPCNFVEDMEIMVTPGSSTRSMCR-----ATKEYTREQDNVIPTTSEMEEFFA 187
AtICK5       -----CNFGD---KGFDLSENRSMIS-----DSKS-----IQSEIEDFFA 154
AtICK6       -----SPVSEGLGETTTEMESSATKR-----KQPGVRKTPAAEIEDLFS 161
AtICK7       -----ISSENLGET-AEMDSATTEMRDQ-----KTEKKKKMEKSPTQAELEDDFFS 160
AtICK1       -----LDCCSGRKTMEETVTAEEEEKAK-----LMTEMPTESEIEDFFV 157
AtICK2       -----KSEESMNMDSSSVAVEDVESRRRLR-----KSLHETVKEAELEDFFQ 170
                .
                *::*

ZmEstICK      AEQRROQQA---FIDKYNFDPVND CPLPG--RFEWVKLD-- 93
OsICK         AEEQRQRQA---FIDKYNFDPVND CPLPG--RFEWVKLD-- 242
AtICK4       GAEEEQQKQ---FIEKYNFDPVNEQPLPG--RFEWTKVDD-- 286
AtICK3       YAEQQQQL---FMEKYNFDIVNDIPLSG--RYEWVQVKP-- 222
AtICK5       SAEQQQQR---FIQKYNFDIVSDNPLPG--RYEWVKVMP-- 189
AtICK6       ELESQDDKKK-QFIEKYNFDIVNDEPLEG--RYKWDRL--- 196
AtICK7       AAERYEQKR---FTEKYNFDIVNDTPLEG--RYQWVSLKP-- 195
AtICK1       EA EKQLKEK---FKKKYNFDIFEKPLEG--RYEWVKLE-- 191
AtICK2       VAEKDLRNKLLLECSMKYNFDFEKDEPLGGG-RYEWVKLNP-- 209
                : . ***:* ** . *::* :

```

Fig. 1 Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de cDNAs de las ICKs de Arabidopsis (AtICK1-AtICK7), Arroz (OsICK) y un EST de maíz (ZmEstICK).

En la Fig 2A, carril 5 se muestra la amplificación del cDNA de ZmICK1 por PCR utilizando los oligos con los nuevos sitios de restricción, comprobando que el fragmento de la ZmICK1 tiene el tamaño esperado (355 pb) y en la Fig. 2B, carriles 1 y 2, se muestra la reamplificación de los productos de PCR para purificar y transformar células BL21.

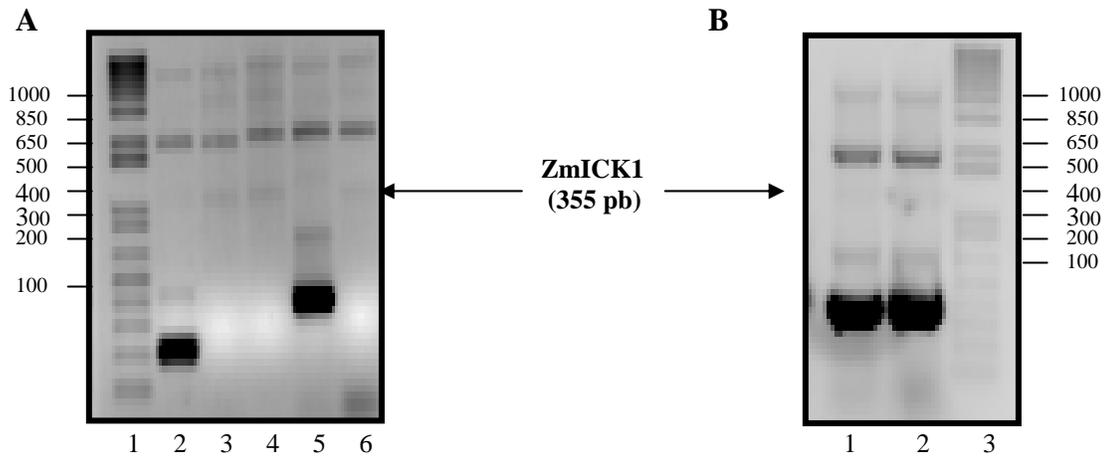


Fig. 2 Amplificación del cDNA de ZmICK1 de maíz por PCR utilizando los nucleótidos con los sitios de restricción BamH1/EcoR1. Fig (A) Amplificación del cDNA de ZmICK1 por PCR. Carriles: 1 PM, 2 ZmICK2, 3 nucleótido Fw, 4 nucleótido Re, 5 ZmICK1, 6 Fw/Re. Condiciones: 35 ciclos/60°C. (B) Reamplificación del cDNA de ZmICK1 para purificar el producto de PCR. Carriles: 1 y 2 ZmICK1, carril 3 PM. Condiciones: 35 ciclos/60°C.

En la Fig. 3, carril 4 se muestra la banda del fragmento purificado de la ZmICK1, el cual se clonó posteriormente en el vector pGEX-4T2. En la Fig. 4, carril 3 se muestra la digestión del plásmido pGEX-4T2 con las enzimas *BamH1* y *EcoR1*, en donde se observa que el fragmento liberado tiene un tamaño de 355 pb.

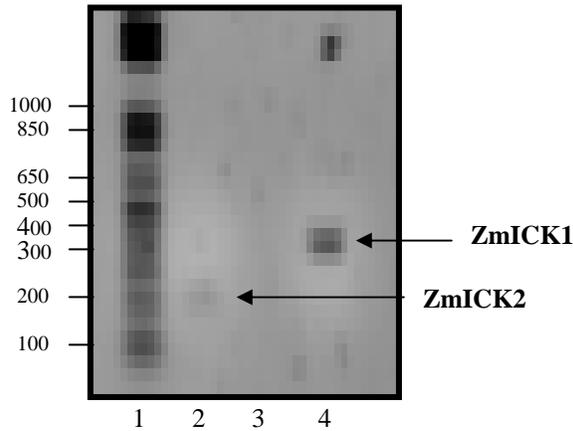


Fig. 3 Purificación del cDNA de ZmICK1. Carriles: 1 PM, 2 ZmICK2, 3 sin muestra, 4 ZmICK1.

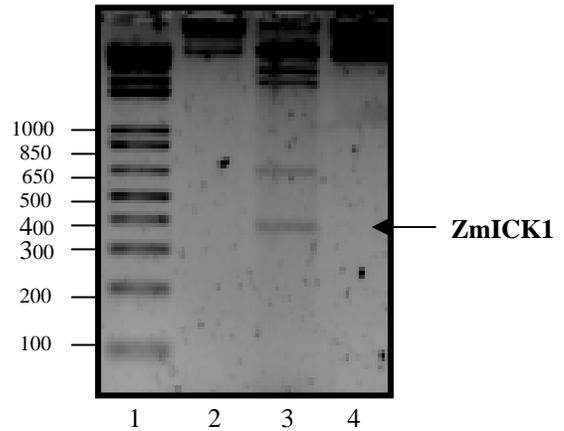


Fig. 4 Digestión de los cDNA de ZmICK1 con BamH1 y EcoR1. Carriles: 1 PM, 2 ZmICK1 sin digerir, 3 digestión de ZmICK1 con BamH1/EcoR1, 4 pGEX-4T2 sin digerir.

El fragmento que corresponde a la ICK, clonado en el vector de expresión pGEX-4T2 fue secuenciado y se realizó un análisis por BLAST de la secuencia de aminoácidos (Fig. 5). El resultado final fue que la secuencia de aminoácidos presentó un alto grado de identidad con KRP1 de maíz (88%) y con la OsICK de arroz (61%) (Fig. 5, tabla 1).

ZmICK1	-----	
ZeamaKRP1	-MGKYMRKAKASS-----EVMIMDVAAAP----LGVTRTRARALALQRL	38
OsICK	-MGKYMRKAKVVVSGE-----VVAAAVMELAAAP----LGVTRTRARSLALQ--	41
AtICK4	-MGKYIRKSKIDGAGAGAGAGGGGGGGGGESSIALMDVVS P S S S S L G V L T R A K S L A L Q Q Q	59
AtICK3	-MGKYMKKSKITG-----DISVMEVSKATAPSPGVRTRAAKTLALQRL	42
AtICK5	-MGKYIKKSKVAG-----AVSVKDKSHPPALGFRTRAAAKNLALHRL	42
ZeamaKRP2	-MGKYMRKCRGAAG-----AEVAAVEVTQVVGVRTRRSRAAATGGVAKVA	44
AtICK6	-MSERKRELAEAS-----STSFSP L K K T K L N D S S D S S P D S H D V I V F A V	43
AtICK7	-MSETK---PKRDS-----EYEGSNIKRMRLDDDDD-VLRSPTRTLSS	39
AtICK1	-MVRKYRKAKGIVEAG-----VSSTYMQ L R S R R I V Y V R S E K S S S V S V V G D N G	46
AtICK2	-MAAVRRRERDVVEEN-----GVTTTTVKRRKMEEVDLVESRIILSPCVQ	45
ZmICK1	-----	W 1
ZeamaKRP1	QE-----QQTQWEEGAGGEYLELRNRRLEKL--PPPP	68
OsICK	-----KRQGGEYLELRNRRLEKLPPPPPP	65
AtICK4	QQRCLLQKPS P S S L P P T S A S P N P P S K Q M K K K Q Q M N D C G S Y L Q L R S R R L Q K K P P I V I	119
AtICK3	NS-----SAADSALPNDSSCYLQLRSRRLQKPSLIEP	75
AtICK5	RS-----HSDEADSFN----YLQLRSRRLVKPLPLLTNT	71
ZeamaKRP2	PRR-----KRAPAGEPAAAVSAGDGGSCYIHLRSRMLFMAPPQPQP	86
AtICK6	SSS-----SVASSAALASDECSVTIGGEESDQ--SSSIS	76
AtICK7	SSS-----SLAYSVSDSGGFC S V A L S E E E D D H R S S S I S S	73
AtICK1	VSS-----SCSGSNEYKKKELIHLEEDKDGDTETSTY	79
AtICK2	ATN-----RGGIVARNSAGASETSVVI V R R R D S P P V E E Q C Q I	82
ZmICK1	AST-----CAS-----TAEATATK-----EADASY	21
ZeamaKRP1	ATT-----RRSGRKA A E A A A A T K-----EAEASY	93
ICKOs	PPR-----RRATAAAATADATAAESA-----EAEVSF	92
AtICK4	RSTKRRKQQRNETCGRNP N P R S N L D S I R G D G S R S D S V S E S V V F G K D K D L I S E I N K D P T F	179
AtICK3	KQPPRVHRSGIKESGSRSRVDSVNSVPVAQSSNEDEC F D N-----FVSVQVSC	123
AtICK5	RKQ---QKQQLIPS-----VNQCQTKNPRASSGPAKKLEP-----DTTTEEAC	111
ZeamaKRP2	SVDSVP TP V E A A D G - A A G Q Q G A A L A A G L R C S S T A S S V N L G L G G Q R G S H T C R S Y D A A E A G	145
AtICK6	GCF-----TSESKEIAKNSSSFGV-----DLEDHQIET	104
AtICK7	GCS-----SSETNEIATRLPFS-----DLEAHEIS-	98
AtICK1	RRG-----TKRKL F E N L R E E E-----KEELSK	101
AtICK2	EEE-----DSSVSCCSTSEEKSKRR-----IEFVDLEENN	112
ZmICK1	GENMETFELEAMERIT-----	37
ZeamaKRP1	GENM--LELEAMERIT-----	107
OsICK	GGEN-VLELEAMERIAPFVSLNVCVNTWVAPSPKYPRVGATCLQGTGKVPYERDEQVLRH	151
AtICK4	GQNFFDLEEEHTQRTT-----	195
AtICK3	GENSLGFESRHSTRES-----	139
AtICK5	GDN----ERISRS-----	121
ZeamaKRP2	GDHVLVDVSAASNSGS-----GP	163
AtICK6	ETETSTFITSNFRKET-----	120
AtICK7	ETEISTLLTNNFRKQG-----	114
AtICK1	SMENYSSEFESAVKES-----	117
AtICK2	GDDRETETSWIYDDLN-----	128

```

ZmICK1      ----RETTPCSLIN-TQMTSTPGS-TRSSH-----RHRRVNAPPVH-AVSSREMNEYFA 86
ZeamaKRP1  ----RETTPCSLIN-TQMTSTPGS-TRSSH-----CHRRVNAPPVH-AVSSREMNEYFA 156
OsICK      FWNTRETTPCSLIRDPDTISTPGSTTRSSH-----SHCKVQTPVRHNIIPASAELEAFFA 208
AtICK4     ----RESTPCSLIRRPEIMTPGSSTKLNICVSESNQREDSLSRSHRRRPTPEMDEFFS 251
AtICK3     -----TPCNFVEDMEIMVTPGSSTRSMCR-----ATKEYTREQDNVIPTTSEMEEFFA 187
AtICK5     -----CNFGD---KGFLESENRSMIS-----DSKS-----IQSEIEDFFA 154
ZeamaKRP2  DRERRETTPSSRAHGELSDLESFLAGHKTGP-----SLPAATPAAELIVPPAHEIQEFA 218
AtICK6     -----SPVSEGLGETTTEMESSATKR-----KQPGVRKTPAAEIEDLFS 161
AtICK7     -----ISSENLGET-AEMDSATTEMRDQR-----KTEKKKKMEKSPTQAELEDDFFS 160
AtICK1     -----LDCCSGRKTMEETVTAEEEEKAK-----LMTEMPTESEIEDFFV 157
AtICK2     -----KSEESMNMDSSSVAVEDVESRRRLR-----KSLHETVKEAELEDDFFQ 170
                                         *:: *

ZmICK1      AEQRRQQQD---FIDKYNFDPANDCPLPG--RFEWVKLD-- 120
ZeamaKRP1  AEQRRQQQD---FIDKYNFDPANDCPLPG--RFEWVKLD-- 190
OsICK      AEEQRQRQA---FIDKYNFDPVND CPLPG--RFEWVKLD-- 242
AtICK4     GAEQQQKQ---FIEKYNFDPVNEQPLPG--RFEWTKVDD-- 286
AtICK3     YAEQQQQL---FMEKYNFDIVNDIPLSG--RYEWVQVKP-- 222
AtICK5     SAEQQQQR---FIQKYNFDIVSDNPLPG--RYEWVKVMP-- 189
ZeamaKRP2  AAEEAAQAKR---FASKYNFDFVRGVPLDAGGRFEWAPVVS I 256
AtICK6     ELESQDDKKK-QFIEKYNFDIVNDEPLEG--RYKWDRL--- 196
AtICK7     AAERYEQKR---FTEKYNFDIVNDTPLEG--RYQWVSLKP-- 195
AtICK1     EAQKQLKEK---FKKKYNFDFEKEKPLEG--RYEWVKLE-- 191
AtICK2     VAEKDLRNKLLLECSMKYNFDFEKDEPLGGG-RYEWVKLNP- 209
          : .          ***:*      ** .   *::* :

```

Fig. 5 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de ZmICK1 con polipéptidos deducidos de las secuencias de cDNAs de las ICKs de maíz (ZeamaKRP1 y ZeamaKRP2), Arabidopsis (AtICK1-AtICK7) y Arroz (OsICK).

Secuencia	#(aa)	Secuencia	#(aa)	Identidad (%)
ZmICK1	120	ZeamaKRP1	190	88
ZmICK1	120	OsICK	242	61
ZmICK1	120	AtICK4	286	38
ZmICK1	120	zeamaKRP2	256	25
ZmICK1	120	AtICK3	222	28
ZmICK1	120	AtICK6	196	26
ZmICK1	120	AtICK7	195	23
ZmICK1	120	AtICK5	189	22
ZmICK1	120	AtICK1	191	20
ZmICK1	120	AtICK2	209	20

Tabla 1. Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la ICK1 de maíz comparada con la de otras especies.

SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para obtener anticuerpos y estudiar la función de la proteína, se procedió a expresar ésta como una proteína de fusión empleando el vector de expresión PGEX-4T2, el cual puede expresar polipéptidos o proteínas enteras fusionadas al C-terminal de la proteína Glutación S-Transferasa (GST), lo cual permite fácilmente purificarlas mediante una columna de afinidad de Glutación-Agarosa. Dentro del sitio de clonación de este vector también hay un sitio de corte para la trombina que puede liberar al péptido de la proteína GST. La Fig. 6 muestra la inducción de la proteína recombinante con IPTG 1M por 4 h a 37°C. El panel A presenta el gel de acrilamida teñido con Azul de Coomasie y en el B la inmunoreplica del gel utilizando anticuerpos dirigidos contra GST.

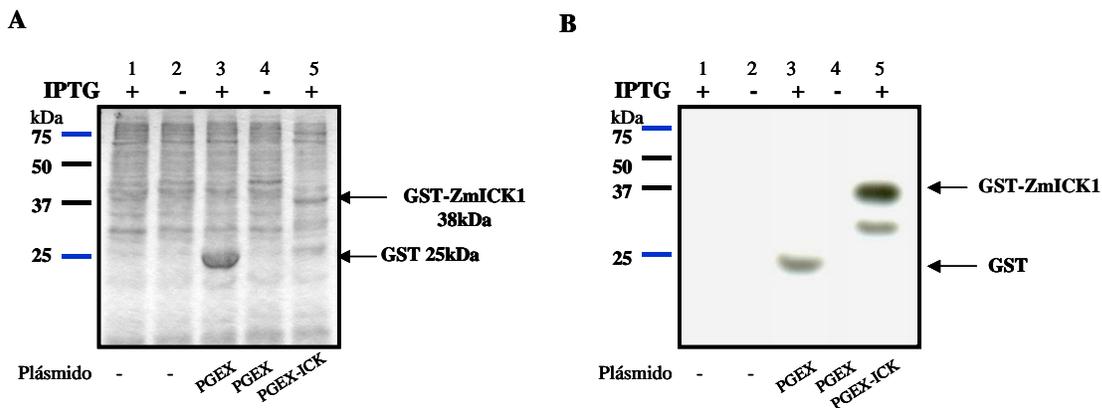


Fig. 6 Inducción de GST-ZmICK recombinante en PGEX-4T2 con IPTG 1M por 4 h a 37°C. (A) Gel de acrilamida al 14% teñido con Azul de Coomasie. (B) Western blot anti-GST para detectar a la proteína GST-ZmICK recombinante y a GST. Carriles: 1 *E. coli* BL21 sin plásmido con IPTG, 2 *E. coli* BL21 sin PTG, 3 Fracción GST con IPTG, 4 Fracción GST sin IPTG y 5 Fracción GST-ZmICK con IPTG.

En la Fig. 6A los carriles 1 y 2, muestran el extracto proteico de una cepa silvestre de *E. coli* BL21 sin el plásmido y sin o con IPTG, respectivamente. En los carriles 3 y 4 se observa la inducción con IPTG de la proteína con y sin la proteína GST y el carril 5 muestra la inducción de clonas que tienen el inserto de ZmICK1. En la fig. 6B se observa la inmunodetección de la proteína GST de 25 kDa (carril 3) y la proteína ZmICK1 fusionada a GST, de 38 kDa, inducida con IPTG (carril 5), mientras que en los carriles 1, 3 y 4 no se detectó proteína alguna.

Ya que se comprobó la inducción de la proteína GST-ZmICK, ésta se purificó, separándose la proteína recombinante ICK de la proteína de fusión GST mediante proteólisis con trombina. La Fig 7 muestra un gel de acrilamida teñido con Azul de Coomasie en donde se observan las fracciones de purificación de la proteína recombinante GST-ICK. Los carriles 1, 2 y 3 muestran la purificación de tres fracciones diferentes de la proteína ICK fusionada a GST (38 kDa) y en los carriles 4, 5 y 6 se observan las fracciones de la proteína ICK de 13 kDa aproximadamente, como producto de la proteólisis de la proteína GST-ICK. En el carril 7 sólo se observa la primera elución de GST (25 kDa) después de la proteólisis con trombina.

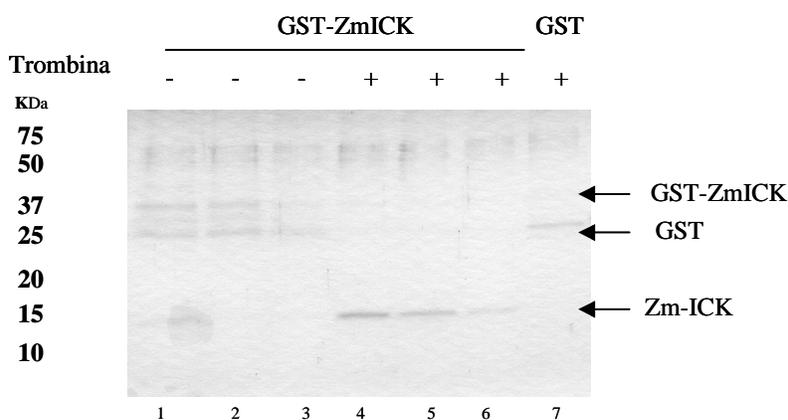


Fig. 7 Purificación con trombina de la proteína GST-ZmICK recombinante. Gel de acrilamida al 14% teñido con Azul de Coomasie. Carriles: 1, 2 y 3, fracciones purificadas de GST-ZmICK; 4, 5 y 6, fracciones purificadas de ZmICK; carril 7, fracción purificada de GST.

GENERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Después de inducir la proteína ZmICK1 , se diseñó un esquema de inmunización y se inocularon dos conejos. Antes de inmunizar, se obtuvieron los respectivos sueros pre-inmunes para ver cual era su respuesta ante los extractos proteicos de maíz. Uno de los conejos se inmunizó con la proteína ICK fusionada a GST (38 kDa) y el otro sólo con la proteína ICK cortada (13 kDa). Para inducir una mayor respuesta inmunogénica, las proteínas recombinantes se acoplaron a hemocianina y se preparó una emulsión con adyuvante de Freund, alternando adyuvante completo e incompleto en las inmunizaciones.

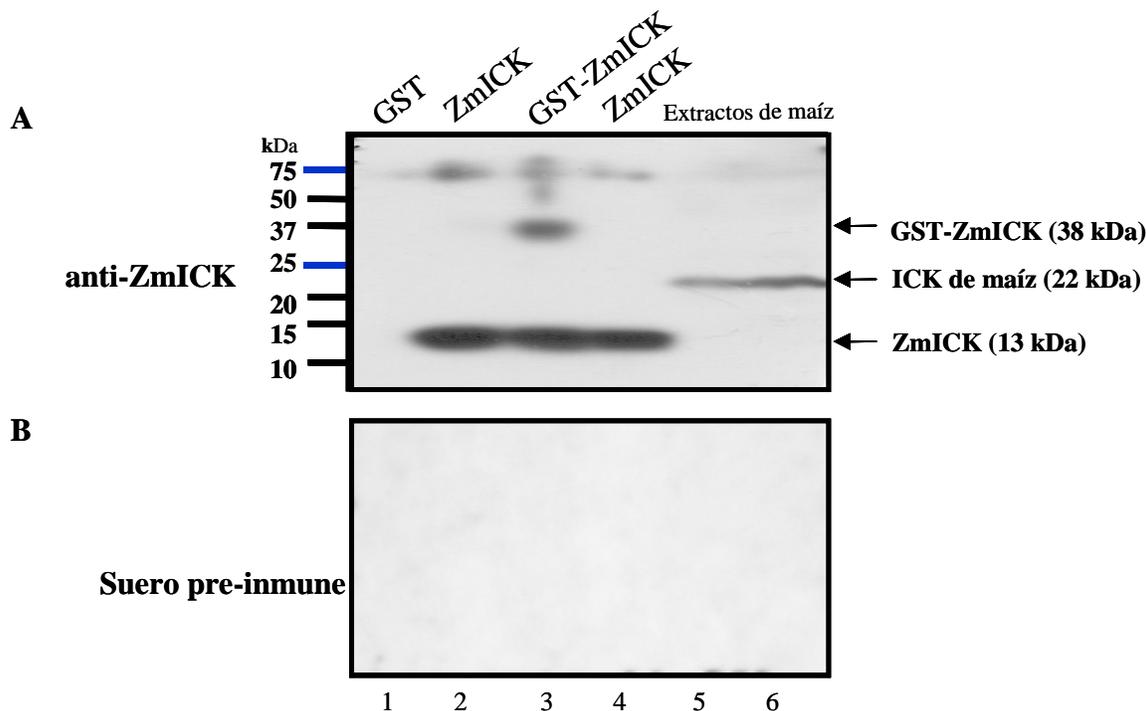


Fig. 8 Inmunoréplica para la detección de ICK con la fracción de anticuerpos precipitados con Sulfato de Amonio Saturado (77.7%). (A) Anticuerpo dirigido contra ZmICK recombinante (1:1000). (B) Suero pre-inmune (1:1000). Carriles: 1, GST (2 μ g); 2, ZmICK (10 μ g); 3, GST-ZmICK (10 μ g); 4, ZmICK (10 μ g) ; 5 y 6, Extractos de ejes embrionarios de maíz (30 y 60 μ g de proteína total) germinado por 15 h.

Después de la cuarta inyección se hizo una sangría de prueba para ver si había un título adecuado de anticuerpos. Como el resultado no fue el esperado, se realizaron tres inmunizaciones más.

Como el anticuerpo dirigido contra la proteína GST-ICK no dio una buena respuesta inmunogénica, sólo se utilizó el anticuerpo dirigido contra la proteína ICK cortada, en una dilución de 1:1000, ya que fue el que dio una respuesta mejor para detectar a las proteínas recombinantes y a la proteína ICK de extractos proteicos de maíz. También se realizó la inmunodetección del suero pre-inmune con un título de 1:1000 (Fig. 8).

En la Fig. 8A se observa que el anticuerpo anti-ICK no reconoció a GST (25 kDa, carril 1), pero sí a la proteína ICK recombinante (13 kDa, carriles 2 y 4), así como por la proteína ICK fusionada a GST (38 kDa, carril 3). En extractos proteicos de maíz, el anticuerpo también reconoció una proteína de 22 kDa aproximadamente (carriles 5 y 6). Este peso cae dentro del rango de las ICKs de Arabidopsis, cuyos pesos oscilan entre 20 y 30 kDa (referencia).

En la Fig. 8B se muestra que el suero pre-inmune del conejo inmunizado con anti-ICK no detectó a ninguna de las proteínas recombinantes ni a las proteínas de extractos proteicos de maíz.

VALIDACIÓN DEL ANTICUERPO anti-ICK

Una vez que se purificó el anticuerpo dirigido contra el péptido ICK aislado, se realizaron ensayos de competencia para verificar que la proteína que se detecta en extractos de maíz corresponde a una ICK.

Para el ensayo de competencia, el anticuerpo anti-ICK en una dilución 1:1000 se incubó 12 h con la proteína recombinante soluble ICK (50 µg) y, esta solución se utilizó como primer anticuerpo; después se realizó una réplica Western para observar el efecto de competencia. En la Fig. 9 se muestra la validación del anticuerpo anti-ICK. Para llevar a cabo este experimento se produjeron 4 membranas idénticas que contenían: GST (carril 1), ICK (carriles 2 y 3), GST-ICK (carril 4) y extractos proteicos de maíz (carriles 5 y 6). Las membranas se incubaron por separado con los anticuerpos anti-ICK (Panel A), con el anticuerpo anti-ICK preincubado con ICK (B), con el anti-ICK preincubado con GST (C) y con el suero preinmune (D).

En la Fig. 9, panel A, se muestra el reconocimiento de las proteínas ICK recombinantes (13 kDa, carriles 2 y 3), la proteína GST-ICK (38 kDa, carril 4) y la proteína ICK en extractos proteicos de maíz (carriles 5 y 6) por el anticuerpo anti-ICK; GST (carril 1) no es reconocida por el anticuerpo. En la figura del panel B, se observa que el anticuerpo con la proteína ICK recombinante soluble se unió eficientemente al anticuerpo y lo neutralizó pues no la detectó ni a la ICK recombinante (Fig. 2 y 3) ni a la proteína endógena de maíz (Fig. 5 y 6) inmovilizadas en la membrana. En contraste la proteína GST soluble o se unió al anticuerpo pues éste reconoció a la proteína recombinante y a la proteína endógena. Para el panel D se realizó una inmunodetección con el suero preinmune, en el cual no se observa reconocimiento alguno.

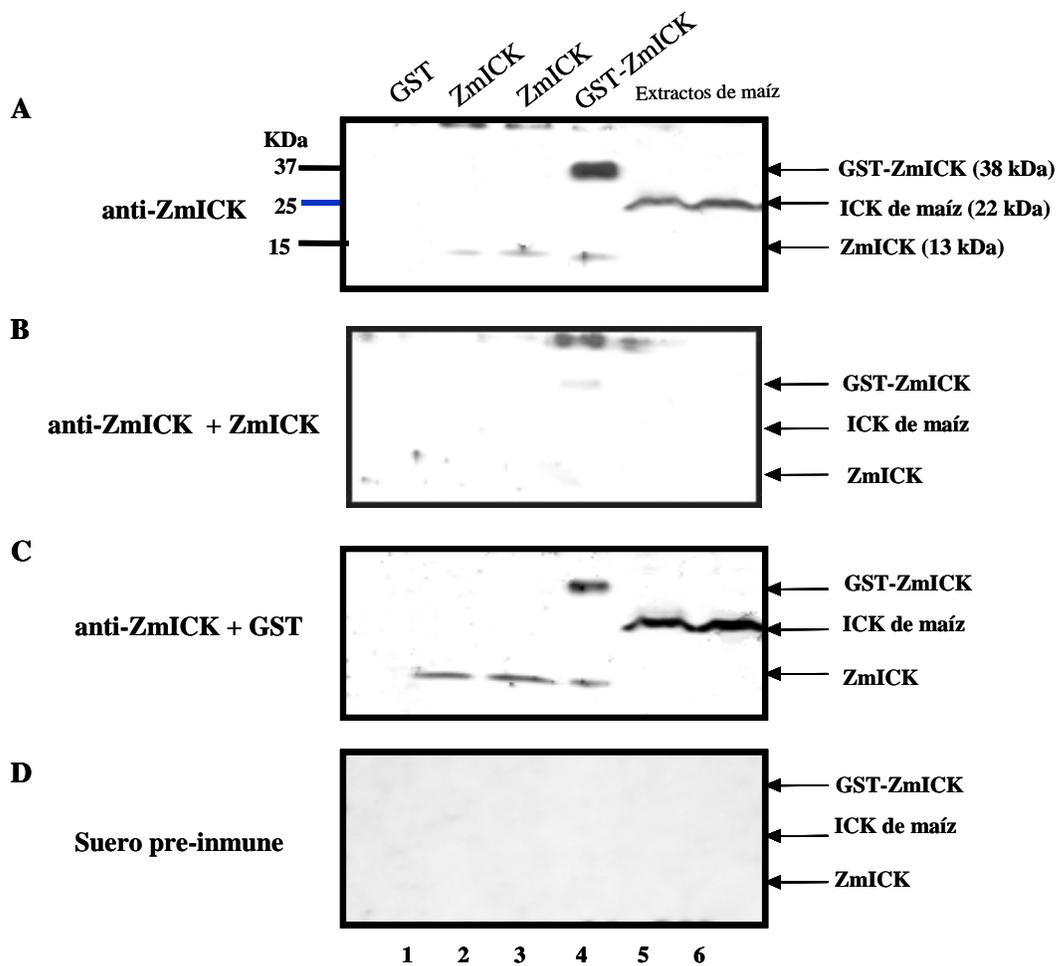


Fig. 9 Validación por ensayos de competencia del anticuerpo anti-ZmICK. (A) anti-ZmICK (1:1000); (B) anti-ZmICK + 30 µg ICK recombinante; (C) anti-ZmICK + GST; (D) suero pre-inmune. Carriles: 1, GST (2 µg); 2 y 3 ZmICK recombinante (10 µg); 4, GST-ZmICK recombinante (10 µg); 5 y 6, Extractos de ejes embrionarios de maíz (60 µg de proteína total) germinado por 15 h

NIVELES DE LA ICK DURANTE LA GERMINACIÓN DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ Y EL EFECTO DE FITOHORMONAS

Teniendo la seguridad de que el anticuerpo sólo reconoce a una proteína en maíz y que se trata de una ICK, se decidió analizar su comportamiento durante la germinación de maíz, para lo cual se germinaron ejes embrionarios de maíz y se tomaron muestras a diferentes horas. Se decidió ver el comportamiento de la ICK en presencia de BA y ABA. En la Fig. 10 se presenta la inmunodetección de la ICK durante la germinación normal de maíz y en presencia de fitohormonas. En los paneles A y C, se observa que no hubo cambios significativos en los niveles de la proteína ICK de maíz tanto en los ejes de semilla control y que la fitohormonas no tuvieron ningún efecto en los niveles de esta proteína. En el panel B se observa que el cargado de proteínas fue parejo para todas las muestras.

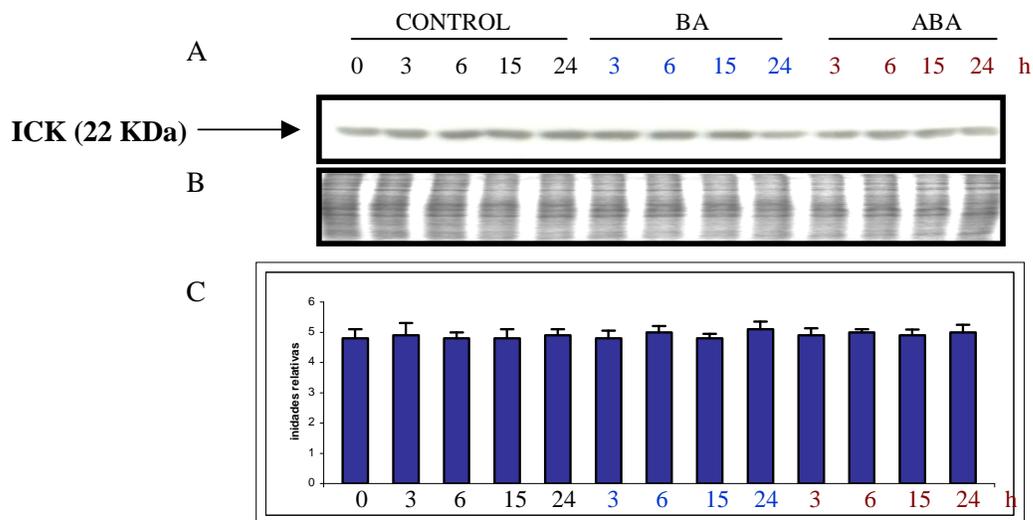


Fig. 10 Efecto de BA y ABA sobre los niveles de la proteína ICK durante la germinación de maíz. Extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 3, 6, 15 y 24 h en la presencia/ausencia de BA $1\mu\text{M}$ o ABA $20\mu\text{M}$. (A) Réplica en Western con anti-ZmICK 1:1000; (B) Gel de cargado; (C) Análisis densitométrico relacionando la señal del western blot con la cantidad de proteína cargada.

ACTIVIDAD DE CINASA Y EFECTO DE ICK

Mediante ensayos de actividad de cinasa *in vitro* se determinó el efecto inhibitorio de la proteína ZmICK1 recombinante sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA, a ciclina D2 y a p13^{Suc1}, utilizando como sustrato a GST-ZmRBR-C y como fuente de CDKs, inmunoprecipitados de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz. Para esto, se utilizaron extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 6 h para PCNA, 6 y 15 h para ciclina D2 y 15 y 24 h para p13^{Suc1}, que son los tiempos en donde la actividad de cinasa muestra un pico de actividad.

En la Fig. 11A se muestra la fosforilación de GST-ZmRBR-C por las cinasas asociadas a PCNA y se observó que hay un efecto dosis-respuesta en el efecto inhibitorio de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa encontrada en inmunoprecipitados de anti-PCNA (carriles 1-4). Hubo una ligera disminución en la actividad de cinasa en presencia de un inmunoprecipitado con anti-ICK (carril 5) y no se observaron cambios en la actividad de cinasa en presencia del suero pre-inmune (PI), ni utilizando la proteína GST fusionada a ICK o sola (carriles 6, 7 y 8 respectivamente).

La Fig. 11B indica que no se observó un efecto dosis-respuesta en la inhibición de la actividad de cinasa asociada a ciclina D2 (carriles 1-4), sólo hubo disminución de la actividad cuando se utilizó una concentración de 2.5 µg del inhibidor (carril 4). No hubo una disminución de la actividad de cinasa cuando se utilizó un inmunoprecipitado de anti-ICK, el suero preinmune o la proteína GST fusionada a ICK o sola (Figs. 5-8).

No se observó un efecto dosis-respuesta en la disminución de la actividad de cinasa asociada a p13^{Suc1} (Fig. 11C); sin embargo, las tres concentraciones utilizadas de inhibidor (0.5, 1.5 y 2.5 µg) disminuyeron en la misma proporción la actividad de cinasa con respecto al control (carriles 1-4). No hubo disminución de la actividad de cinasa cuando se utilizó un inmunoprecipitado de anti-ICK, el suero preinmune, la proteína GST fusionada a ICK o sola (carriles 5-8).

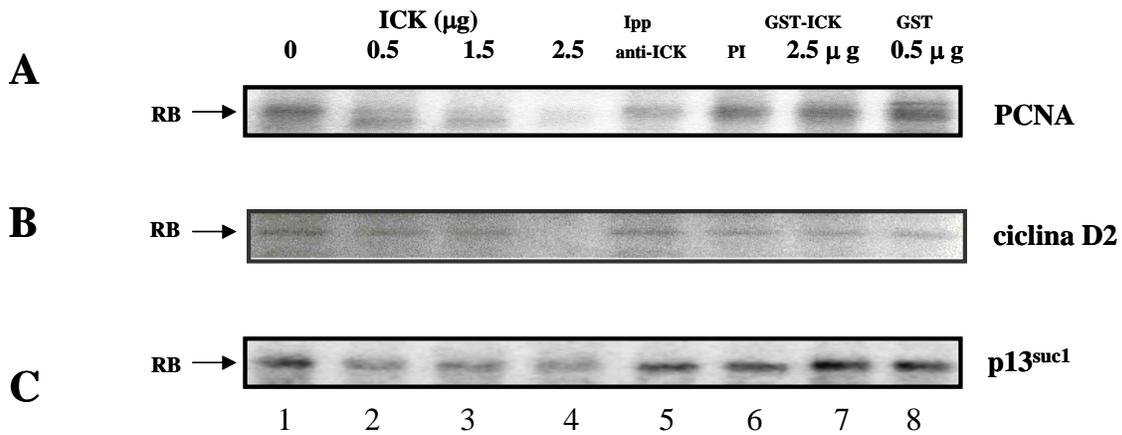


Fig. 11 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA, anti-ciclina D2 y p13^{Suc1}, utilizando GST-ZmRBR-C como sustrato. Efecto dosis-respuesta de la proteína recombinante ICK sobre la cinasa asociada a: (A) PCNA en ejes germinados por 6 h, (B) ciclina D2 en ejes germinados por 6 y 15 h y (C) p13^{Suc1} en ejes germinados por 15 y 24 h. Concentración de ICK: 0, 0.5, 1.5 y 2.5 μg de proteína recombinante en carriles 1-4; carril 5, Ipp anti-ICK; carril 6, PI (suero pre-inmune); carril 7, GST-ICK 2.5 μg; carril 8, GST 0.5μg.

Para determinar la especificidad del efecto inhibitorio de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA, a ciclina D2 y a p13^{Suc1}, se probó también otra proteína no relacionada con la regulación del ciclo celular. Se observó que la albúmina a diferentes concentraciones (0, 5, 10 y 20 μg) no ejerció ningún efecto sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA (Fig. 12A, carriles 1-4). Tampoco hubo una disminución de la actividad de cinasa en presencia del suero pre-inmune (carril 5) ni de un inmunoprecipitado con anti-ICK (carril 6). El carril 7 muestra un control positivo, al igual que el carril 1, que no contiene albúmina. En el carril 8 se demuestra que un inmunoprecipitado del suero pre-inmune por sí mismo carece de actividad comparada a la actividad de cinasa del control positivo (carril 7).

En la Fig. 12B se observa un patrón similar en cuanto al efecto de la albúmina sobre la actividad de cinasa asociada a ciclina D2, con la única diferencia de que la señal de actividad de cinasa es menos acentuada que en la Fig. 12A.

Después de determinar la cantidad requerida de la proteína inhibitoria sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA, anti-ciclina D2 y en el pull down de p13^{Suc1}, se estudió el efecto inhibitorio de ZmICK en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz a distintas horas de la germinación.

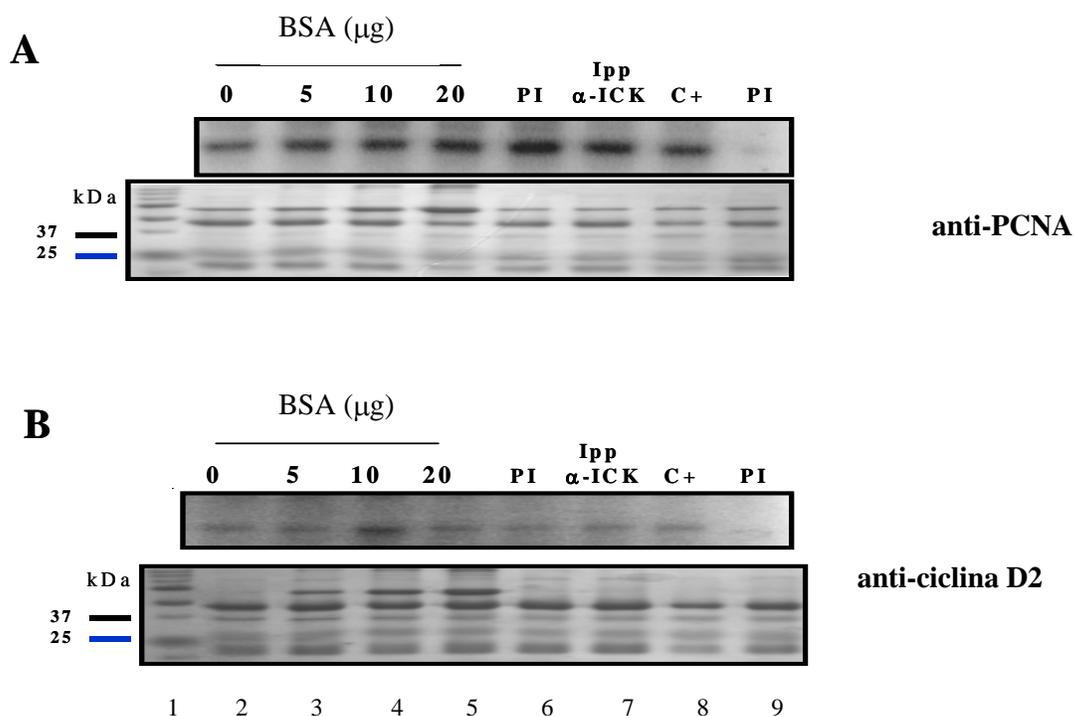


Fig. 12 Efecto de BSA sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA y anti-ciclina D2 utilizando GST-ZmRBR-C como sustrato. Efecto de la proteína BSA sobre la actividad de cinasa asociada a: (A) PCNA en ejes germinados por 6 h y (B) ciclina D2 en ejes germinados por 6 y 15 h, en presencia de 0, 5, 10 y 20 µg de BSA, carriles 2-5; Carril 6, PI suero pre-inmune; carril 7, Ipp de anti-ICK; carril 8, control positivo; carril 9, PI del suero pre-inmune sin anti-PCNA o anti-ciclina D2.

En la Fig. 13A se observa el comportamiento normal de la actividad de cinasa asociada a PCNA en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz germinados por 3, 6 15 y 24 h, así como el efecto inhibitorio de ZmICK1. La actividad de cinasa en inmunoprecipitados de PCNA de semilla control fue más alta a horas tempranas de la germinación (3-6 h) y decayó hacia las horas tardías (15-24 h).

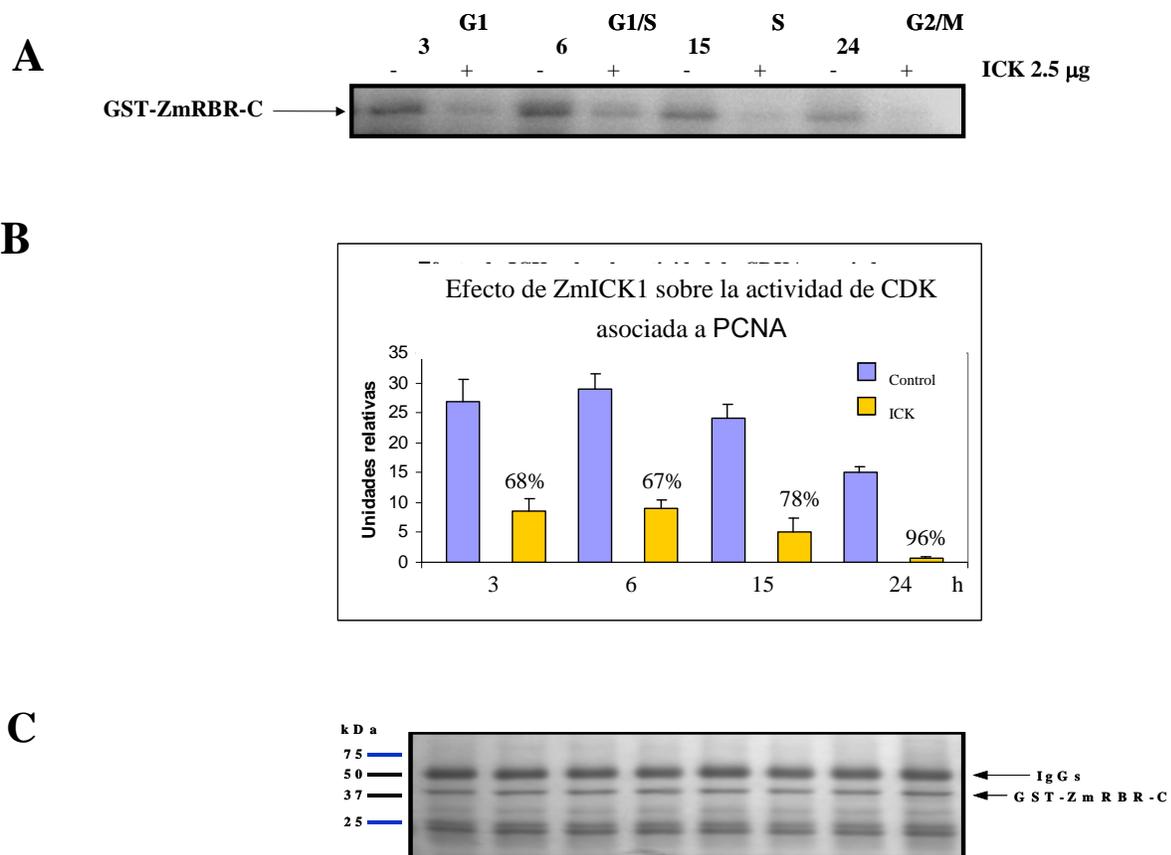


Fig. 13 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA. (A) Actividad de cinasa asociada a PCNA en extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6, 15 y 24 h en ausencia y presencia de 2.5 µg de ZmICK1, utilizando GST-ZmRBR-C (4 µg) como sustrato. La autoradiografía muestra al sustrato marcado con ^{32}P después de la separación electroforética. (B) Análisis cuantitativo de la actividad de cinasa asociada a PCNA relacionando la señal de la autoradiografía con la cantidad de proteína cargada. (C) Gel de acrilamida teñido con Azul de Coomasie como control de cargado.

En presencia del inhibidor se observó que hubo una disminución casi del 70 % de la actividad de cinasa asociada a PCNA con respecto a la actividad normal a las 3 y 6 h de germinación, y conforme avanzó el tiempo de germinación, hacia las 15 h, se observó un efecto inhibitorio más marcado del 78%. Hacia las 24 h el efecto inhibitorio por ZmICK se elevó hasta el 96 % (Fig. 13B).

En la Fig. 14A se observa el comportamiento normal de la actividad de cinasa asociada a ciclina D2 en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz germinados por 3, 6 15 y 24 h, así como el efecto inhibitorio de ZmICK1. La actividad de cinasa asociada a ciclina D2 se incrementó gradualmente hasta alcanzar un máximo entre las 6 y 15 h de germinación y disminuyó hacia las horas tardías de la germinación normal de maíz (24 h).

En presencia del inhibidor se observó que hubo una disminución del 70 % de la actividad de cinasa asociada a ciclina D2 con respecto a la actividad normal a las 3 h de germinación, a las 6 h hubo una inhibición del 85% y conforme avanzó el tiempo de germinación, hacia las 15 h, se observó un efecto inhibitorio más marcado del 92%. Sin embargo, a las 24 h el efecto inhibitorio por ZmICK1 fue sólo del 25 % con respecto a la actividad en el control (Fig. 14B).

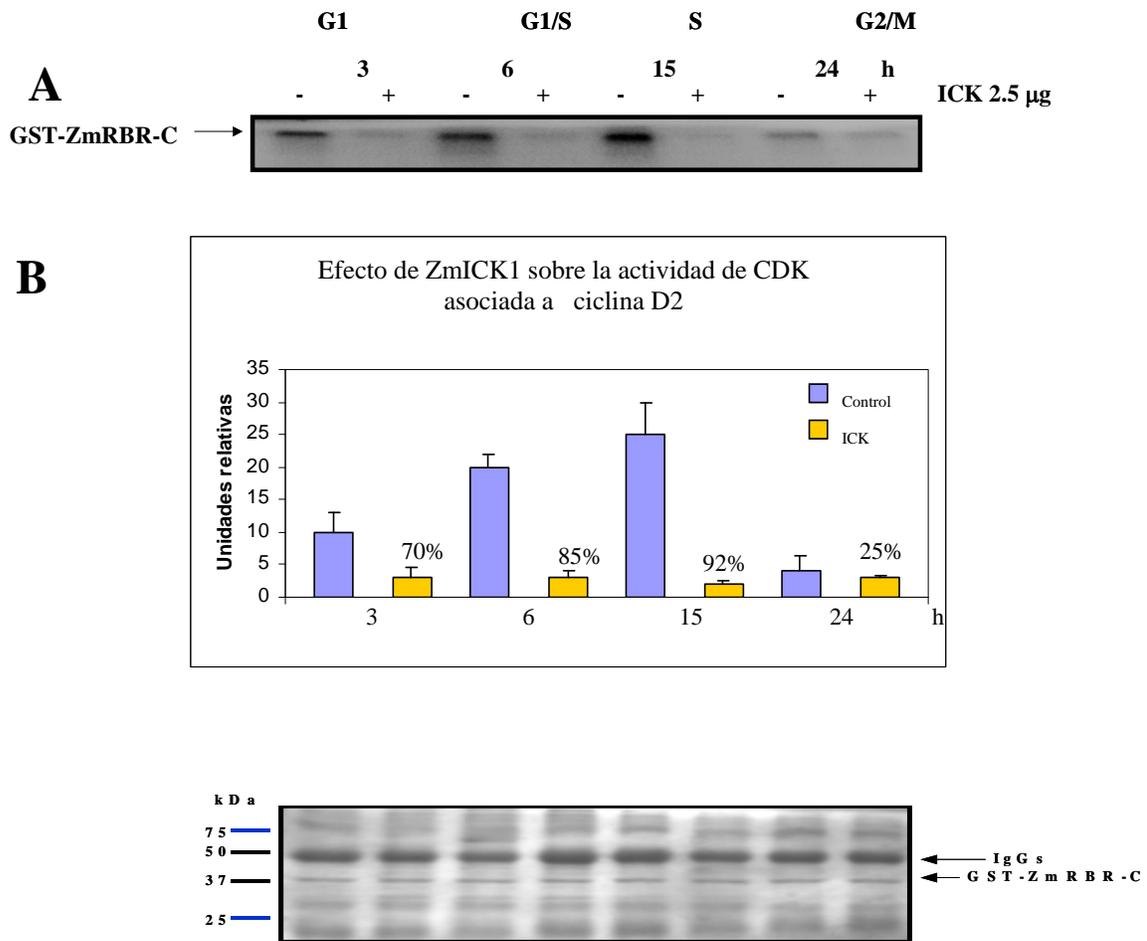


Fig. 14 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en proteínas asociadas a ciclina D2. (A) Actividad de cinasa asociada a ciclina D2 en extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6, 15 y 24 h en ausencia y presencia de 2.5 μ g ICK, utilizando GST-ZmRBR-C (4 μ g) como sustrato. La autoradiografía muestra al sustrato marcado con 32 P después de la separación electroforética. (B) Análisis cuantitativo de la actividad de cinasa asociada a ciclina D2 relacionando la señal de la autoradiografía con la cantidad de proteína cargada. (C) Gel de acrilamida teñido con Azul de Coomassie como control de cargado.

En la Fig. 15A se observa el comportamiento normal de la actividad de cinasa asociada a p13^{Suc1} en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz germinados por 3, 6, 15 y 24 h, así como el efecto inhibitorio de ZmICK1. La actividad de cinasa asociada a p13^{Suc1} fue baja durante la germinación temprana (3-6 h) y se incrementó notablemente conforme avanzó la germinación (15 y 24 h).

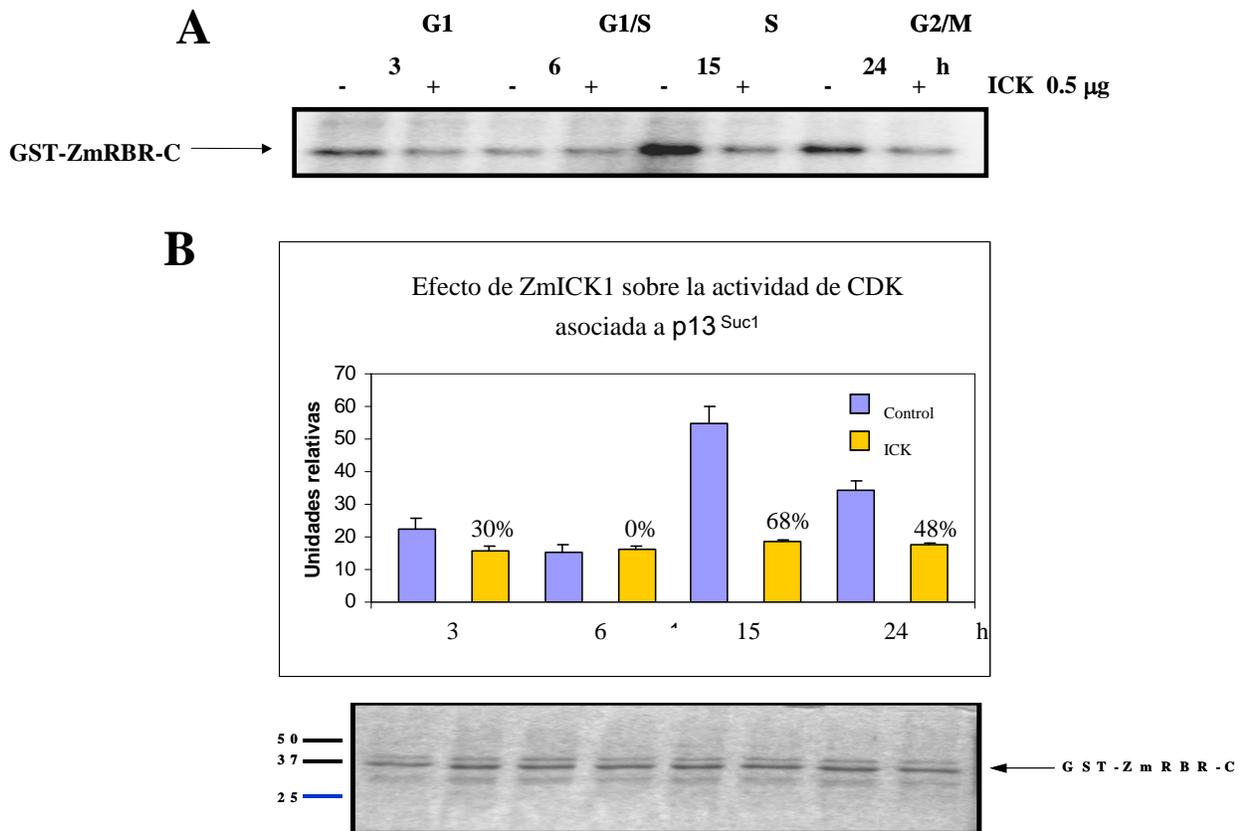


Fig. 15 Efecto de ZmICK1 sobre la actividad de cinasa en proteínas asociadas a p13^{Suc1}. (A) Actividad de cinasa asociada a p13^{Suc1} en extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 3, 6, 15 y 24 h en ausencia y presencia de 0.5 µg de ICK, utilizando GST-ZmRB-C (4 µg) como sustrato. La autoradiografía muestra al sustrato marcado con ³²P después de la separación electroforética. (B) Análisis cuantitativo de la actividad de cinasa asociada a p13^{Suc1} relacionando la señal de la autoradiografía con la cantidad de proteína cargada. (C) Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomasie como control de cargado.

En presencia del inhibidor se observó una disminución del 30 % de la actividad de cinasa asociada a p13^{Suc1} con respecto a la actividad control a las 3 h de germinación; a las 6 h no hubo efecto inhibitorio alguno. Sin embargo, hacia las 15 h se observó un efecto inhibitorio más marcado, del 68% y a las 24 h se observó una inhibición del 48 % con respecto a la actividad control (Fig. 15B).

DISCUSIÓN

Considerando que en los mamíferos han evolucionado múltiples inhibidores de CDKs, los cuales podrían interactuar con distintos complejos de ciclinas-CDKs, y el hecho de que las plantas también poseen múltiples CDKs y ciclinas, era de esperarse que también existieran múltiples inhibidores de CDKs, como son las proteínas ICKs. Estas proteínas han conservado los principales dominios de unión a las CDKs y las ciclinas, sitios que han sido mapeados en el dominio C-terminal [Wang et al., 1998]; los motivos adicionales encontrados en la parte N-terminal de las ICKs podrían determinar la especificidad hacia diferentes complejos ciclina/CDK. Alternativamente, estos dominios podrían interactuar con otras proteínas aún no descritas [De Veylder et al., 2001].

La estrategia que se utilizó para obtener una ICK de maíz fue la de comparar las secuencias reportadas de las ICKs de plantas y sintetizar oligonucleótidos de la región más conservada, para amplificar cDNAs (Fig. 1). Sólo se logró aislar una secuencia parcial del gen para la ICK con un tamaño de 355 pb. Los intentos por obtener la secuencia completa no han sido exitosos y al momento solo contamos con cDNAs que corresponden al carboxilo terminal que, sin embargo, posee las regiones más conservadas entre las ICKs de plantas: el dominio de unión a las ciclinas y el dominio de unión a las CDKs, en el extremo carboxilo. Esta proteína tienen un alto grado de identidad con las ICKs de maíz (88%), arroz (61%) y *Arabidopsis* (38%) y como ellas, muestra una secuencia de aproximadamente 30 aa en común con la familia de CKIs Cip/Kip en mamíferos, región que fue identificada como el dominio de interacción/inhibición en las CKIs [Russo et al., 1996].

Una vez que se clonó, expresó y purificó la proteína recombinante GST-ZmICK, se separó a la GST de la ICK por medio de proteólisis con trombina. El polipéptido producido corresponde enteramente a un fragmento de la secuencia de la proteína ZmICK1, cuyo peso molecular se determinó en 13 kDa (Fig. 7, carril 5). Los anticuerpos obtenidos contra esta proteína reconocen primordialmente una proteína de 22 kDa en extractos proteicos de maíz, lo que sugeriría que de existir múltiples ICKs, éstas deben tener secuencias relativamente diferentes. El hecho de que no se detecte la banda de 22 kDa en ensayos de réplica en

Western en presencia del polipéptido recombinante soluble es un buen indicio de la especificidad de reconocimiento y de la identidad de esta proteína.

La inmunodetección de ZmICK1 durante la germinación normal muestra que la proteína se mantiene a niveles semejantes a los diferentes tiempos (Fig. 10A). Esto sugeriría que este inhibidor de cinasas podría funcionar a lo largo del ciclo celular durante la germinación normal de maíz y no sólo en una fase específica del ciclo.

Las fitohormonas son reguladores fundamentales del ciclo celular en plantas [Evans 1984]. La observación de que las ICKs son transcripcionalmente reguladas por acción de fitohormonas durante el desarrollo indica que muestran, al igual que la familia Cip/Kip de mamíferos, el potencial para integrar señales de desarrollo con la maquinaria central del ciclo celular [Verkest, 2005]. Se ha demostrado que las ICKs son capaces de responder a inhibidores de crecimiento y es probable que participen en la regulación de la actividad de las CDKs en respuesta a diferentes señales ambientales y de desarrollo. Esta hipótesis es sostenida por el hecho de que la expresión de la ICK1 en *Arabidopsis* es inducida por condiciones que son inhibitorias para la división celular vegetal, tales como el tratamiento con ácido abscísico ó a bajas temperaturas, implicando que ICK1 puede estar inhibiendo la división celular bajo condiciones de estrés abiótico [Ormenese, 2004; Wang, 1998]. Nuestros resultados demuestran que durante la germinación en presencia de ácido abscísico, los niveles de proteína ZmICK1 no varían, y se comporta como en el control (Fig. 10 panel A); tampoco parece existir ninguna influencia de citocininas, por lo que no parece existir un efecto hormonal, al menos por estas hormonas, en la regulación de la acumulación de esta proteína. Lo anterior indica que en maíz las ICKs, o al menos esta KRP, podrían tener una regulación diferente a la mostrada por la contraparte de *Arabidopsis*. Opcionalmente, el control metabólico de las semillas en germinación podría operar de manera diferente a como sucede en otros tejidos o estados de desarrollo vegetales.

Se determinó la funcionalidad de ZmICK1 probando su efecto inhibitorio *in vitro* sobre la actividad de CDK asociada a ciclina D2, a PCNA y a p13^{Suc1}, durante la germinación normal en ejes embrionarios de extractos proteicos de maíz. ZmICK1 ejerce un efecto inhibitorio diferencial en la actividad de cinasa asociada a cada una de estas proteínas. La inhibición de la actividad de cinasa asociada a PCNA se reduce en forma

proporcional a la concentración de ICK (Fig. 11A), diferente a como sucede para la cinasa asociada a ciclina D2 (Fig. 11B), que a concentraciones menores de 1.5 μg de ZmICK1 no ejerce un efecto inhibitorio diferencial, mientras que para la cinasa asociada a p13^{Suc1} existe un mismo efecto inhibitorio a todas las concentraciones de inhibidor utilizadas (Fig. 11C). Estos resultados indican que algunos complejos ciclina/CDK son más sensibles que otros, sugiriendo que su composición es diferente, esto es, podría variar tanto la Cdk como la ciclina asociada en cada caso (ver adelante).

La proteína GST-ZmICK no ejerció efecto inhibitorio sobre la actividad de cinasa en ninguno de los tres casos anteriores, a pesar de que el péptido ICK fusionado a GST contiene el dominio C-terminal que es donde reside la actividad inhibitoria. Esto podría deberse a que GST, que es un polipéptido de mayor tamaño, enmascara dominios de la ICK indispensables para su asociación con el complejo Cyc/CDK. GST por sí misma tampoco ejerció efecto alguno sobre el grado de fosforilación de GST-ZmRBR-C en ninguno de los casos anteriores.

Se estudió el efecto inhibitorio ejercido por ZmICK1 en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz a distintas horas de germinación. En inmunoprecipitados con anti-PCNA, la actividad de cinasa es alta en horas tempranas y tiende a disminuir conforme avanza la germinación (Fig. 13, panel A); dos proteínas PSTAIRE son las principales responsables de esta actividad (36 y 32 kDa), siendo que la de 36 kDa aparece tarde durante la germinación [Sánchez et. al., 2002]. Nuestros resultados muestran que ZmICK1 ejerce un efecto inhibitorio de casi el 70 % en las horas tempranas de la germinación normal (3 y 6 h) y un poco más marcado conforme avanza la germinación, 78 % hacia las 15 h y 96 % hacia las 24 h (Fig 13B); esto podría indicar que, durante la germinación, en horas tempranas está inhibiendo a una de las cinasas y en horas tardías a la otra cinasa que predomina en estos tiempos. Aparentemente hay un efecto inhibitorio más marcado hacia las horas tardías de la germinación y esto podría deberse a que se está observando la sumatoria del efecto inhibitorio sobre las dos cinasas. Como estas dos cinasas podrían participar en la regulación de las distintas etapas del ciclo celular durante la germinación de maíz, es probable que la ZmICK1 también pueda estar participando en esta regulación.

La actividad de cinasa asociada a ciclina D2 se incrementa gradualmente hasta alcanzar un pico hacia las 15 h de germinación y disminuye posteriormente (Fig. 14A). Esta

actividad de cinasa es fuertemente inhibida por un inhibidor específico de cinasas PSTAIRE, olomoucina, corroborando que la cinasa asociada es de tipo CDK-A [Gutiérrez et al., 2005]. Nuestros resultados muestran que ZmICK1 ejerce un efecto inhibitorio en orden ascendente de la actividad de cinasa conforme avanza la germinación, de 70 % a las 3 h y 85 % a las 6 h, hasta alcanzar un pico de inhibición de 92 % a las 15 h; hacia las horas tardías de la germinación (24 h) el efecto inhibitorio disminuye a solo un 25 % de la actividad.

Estos resultados indican que ZmICK1 está inhibiendo a la cinasa PSTAIRE que está asociada predominantemente con la ciclina D2 en horas tempranas de la germinación y, que al final de la fase S, cuando deja de actuar esta ciclina y comienza la entrada a la fase G2 (después de las 15h), se reduce el efecto inhibitorio muy probablemente porque también decaen los niveles de proteína de la ciclina D2 [Gutiérrez et al., 2005] y en consecuencia queda sólo un remanente de actividad de cinasa. Se ha reportado que las ciclinas D median la transición G1/S en plantas y en animales [Dewitte y Murray, 2003] e ZmICK1 al inhibir la actividad de cinasa asociada a la ciclina D2 podría funcionar como inhibidor de la transición G1/S.

En ensayos *in vitro*, la proteína de levaduras de fisión p13^{Suc1} se une fuertemente a CDKs tipo PSTAIRE que tienen alta actividad tanto en la fase S y como en la fase M del ciclo celular [De Veylder et al., 1997]. En maíz, el complejo con actividad de cinasa asociado a p13^{Suc1} contiene a la proteína PSTAIRE de 36 kDa y la actividad de este complejo se incrementa cuando comienza la fase S después de las 15 y 24 h de germinación (Fig. 15A). Nuestros resultados muestran que ZmICK1 ejerce mínimo o nulo efecto inhibitorio a las horas tempranas de la germinación (3 y 6 h) y que conforme avanza la germinación se acentúa el efecto inhibitorio hasta un 70% hacia las 15 h y 50% hacia las 24h, tiempo que coincide con el incremento en la actividad de la cinasa de G2/M (Fig. 14B). Esto implica que esta ICK de maíz también puede actuar en las fases G2 y M, aunque pareciera que su efecto inhibitorio es mayor con las cinasas de la fase G1/S (PCNA y ciclina D2).

En resumen, la cinasa asociada a PCNA funciona en la fase temprana de la germinación [Sánchez et. al., 2002], mientras que la asociada a ciclina D2 funciona por un tiempo más avanzado [Gutiérrez et. al., 2005]. Cabe la posibilidad de que la ciclina

asociada a PCNA sea diferente a Cyc D2; asimismo, la CDK asociada a Cyc D2 podría no ser la misma que se encuentra asociada a PCNA. En el caso de p13^{Suc1}, esta proteína se asocia a dos tipos de CDK-As y la actividad de cinasa se incrementa conforme avanza la germinación, diferente a como sucede con la asociadas a PCNA o a CycD2; en todo caso, se ignora que tipo de ciclinas están asociadas a p13^{Suc1}. Todo esto podría hacer variar la respuesta de los diferentes complejos a la acción de ZmICK1.

CONCLUSIONES

En ejes embrionarios de maíz se expresa constitutivamente, una proteína de aproximadamente 22 KDa que tiene una similitud de 61 % con ICKs de otras especies de plantas y que se requiere para inhibir a la actividad de cinasa asociada a ciclina D2, a PCNA y a p13^{Suc1}.

Durante la germinación de maíz, los niveles de la proteína ZmICK1 se mantienen constantes y estos niveles no se modifican durante la germinación en presencia de BA y ABA.

BIBLIOGRAFÍA

- Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommant, B., Itob M. and Okamoto, T. (2001). *Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest DNA damage.* The Journal of Biological Chemistry 276, 42871-42877.
- Baíza, A., Vázquez-Ramos J. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). *DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination.* Journal Plant Physiology 133, 416-421.
- Bewley, J. D. and Black, M. (1997) Seeds The Plant Cell. 1055-1066.
- Boniotti, M. B. and Griffith, M. E. (2002). "Cross-Talk" between cell division cycle and development in plant. The Plant Cell 14, 11-16.
- Boniotti, M. B. and Gutierrez, C. (2001). *A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA cyclin D complex.* Plant Journal 28, 341-350.
- Bowman, G. D., Goedken, E. R., Lazmski, M. O'D. and Kuriyan, J. (2005). *DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition.* FEBS Letters. 579, 863-867.
- Chen J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W. and Dutta A. (1995). Nature 374, 386-388.
- Ciemerych, M. A. and Sicinski, P. (2005). *Cell cycle in mouse development.* Oncogene 24, 2877-2898.
- Claudio, P. P., Tonini, T. and Giordano, A. (2002) *The retinoblastoma family: twins or distant cousins?* Genome Biology 3, 3012.1-3012.9.
- Cobrinik, D. (2005). *Pocket proteins and cell cycle control.* Oncogene 24, 2796-2809.
- Coelho, C. M., Dante, R. A., Sabelli, P. A., Sun, Y., Dilkes, B. P., Gordon-Kamm, W. J. and Larkins, A. (2005). *Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication.* Plant Physiology 238, 2323-2336.
- Coqueret, O. (2003). *New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment.* Trends in Cell Biology 13, 65-70.
- Datta, A., Alo, N. and Raychaudhuri, P. (2002). *Differential regulation of E2F1, DP1, and the E2F1/DP1 complex by ARF.* Molecular and Cellular Biology 22, 8398-8408.
- De Jager, S. M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S. and Murray, J. A. H. (2005). *The developmental context of cell-cycle control in plant.* Seminars in Cell & Developmental Biology 16, 385-396.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. and Inzé, D. (2001). *Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis.* The Plant Cell. 13, 1653 -1667.
- De Veylder, L., Joubés, J. and Inzé D. (2003). *Plant cell cycle transitions.* Current Opinion in Plant Biology 6, 536-543.

- Deltour, P. Jacquard, M. (1974). *Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays**. Annals of Botany London 38, 324-334.
- Den Boer, B. G. W. and Murray, J. A.H. (2000). *Triggering the cell cycle in plants*. Trends in Cell Biology 10, 245-250.
- Denicourt, C. and Dowdy S. F. (2004) *Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors*. Genes & Development Perspective 851-855.
- Dewite W. and Murray J. A.H. (2003). The plant cell cycle. Annual Review of Cell and Plant Biology 54, 235-264.
- Dimova, D. K. and Dyson N. J. (2005). *The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces*. Oncogene 24, 2810-2826.
- Francis, D. and Sorrell, D. A. (2001). *The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review*. Plant Growth Regulation 33, 1-12.
- Frolov, A. V. and Dyson, N. J. (2004). *Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression*. Journal of Cell Science 117, 2173-2181.
- Gutiérrez, C. (2005). *Coupling cell proliferation and development in plants*. Nature Cell Biology 7, 535-541.
- Gutiérrez, C.; Ramírez-Parra, E. Castellano, M. M. and Del Pozo, C. (2002). *G1 to S transition than a cell cycle engine switch*. Current Opinion in Plant Biology 5, 480- 486.
- Gutiérrez, R. Quiroz, F. F. and Vázquez-Ramos, J. M. (2005). *Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination*. Plant Cell Physiology 46, 166-173.
- Herrera, I., Sánchez, M. de la Paz, Molina, J., Plasencia, J., Vázquez-Ramos, J. (2000). *Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins*. Physiologia Plantarum 110, 127-134.
- Inzé, D. (2005). *Green light for the cell cycle*. European Molecular Biology Organization Journal. 24, 657-662.
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, R., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C. and Glab N. (2002). *The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants*. Journal Cell Science 115, 973 - 982.
- Jasinski, S., Perennes, C. Bergounioux, C. and Glab N. (2002). *Comparative Molecular and Functional Analyses of the Tobacco Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor NtKIS1a and Its Spliced Variant NtKIS1b*. Plant Physiology 130, 1871 - 1882.
- Jeffrey, P. D., Tong, L. and Pavletich, N. P. (2000). *Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors*. Genes & Development 14, 3115-3125.
- Joubés, J. and Chevalier, C. (2000). *Endoreduplication in higher plants*. Plant Molecular Biology 43, 735-745.

Kontopidis, G., Wu, S-Y., Zheleva, D. I., Taylor, P., McInnes, C., Lane, D. P., Fisher, P. M. and Walkinshaw, M. S. (2005). *Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 102, 1871-1876.

La Baer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., and Harlow, E. (1997). *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors*. Genes & Development 11, 847-862.

Lacy, E. R., Filippov I., Lewis W. S., Oieno S., Xiao L., Hengst L. and Kriwacki R. W. (2004). Nature Structural & Molecular Biology 11, 358-367.

Larkins, B. A., Dilkes, B. P., Dante, R. A., Coelho, C. M., Woo, Y-m. and Liu, Y. (2001). *Investigating the how and why of DNA endoreduplication*. Journal of Experimental Botany 52, 183-192.

Leibovitch M. P., Kannengiesser C., Leibovitch S. A. (2003). *Signal-induced ubiquitination of p57^{Kip2} is independent of the C-terminal consensus Cdk phosphorylation site*. FEBS Letters 543, 125-128.

Li, G. Y.W, Xing, M. and Hu, B. (2004). *A PSTAIRE CDK-like protein localizes in nuclei and cytoplasm of Physarum polycephalum and functions in the mitosis*. Cell Research 14, 169-175.

López, I., Khan, S., Vázquez, J. and Hussey, P. J. (1997). *The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in Zea mays is composed of two members that have similar expression programmes*. Biochimica et Biophysica Acta 1353, 1-6

Lui H, Wang H, DeLong C, Fowke LC, 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, 379-385.

Luo, Y., Hurwitz, J., and Massagué, J. (1995). *Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21^{Cip1}*. Nature 375, 159-161.

Maga, G. and Hübscher, U. (2003). *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners*. Journal of Cell Science 116, 3051-3060.

Malamy, J. E. (2005). *Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture*. Plant Cell and Environmental 28, 67-77.

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005). *To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer*. Nature Review Cancer 1, 221-231.

Masubelele, N. H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., Nieuwland, J., Scofield, S. and Murray, J. A. H. W. (2005). *D-type cyclins active division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 102, 15694-15699.

Meijer, M. and Murray, J. A. (2000). *The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle*. Plant Molecular Biology 43, 621-633.

Meijer, M. and Murray, J. A. (2001). *Cell cycle controls and the development of plant form*. Current Opinion in Plant Biology 4, 44–49.

Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. and Inze, D. (1999). *Cyclin-dependent kinases and cell division in plants the nexus*. The Plant Cell 11, 509–521.

Morris G. F. and Mathews M. B. (1989). *Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle*. Journal of Biological Chemistry 264, 13856-13864.

Münger, K. (2003). Clefts, grooves, and (small) pockets: *The structure of the retinoblastoma tumor suppressor in complex with its cellular target E2F unveiled*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 100(5), 2165-2167.

Murray, W. A. (2004). *Recycling the cell cycle: Cyclins revisited*. Cell 116, 221-234.

Nakai, T., Kato, K., Shinmyo A. and Sekine, M. (2006). *Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase*. FEBS letters 580, 336-340.

Nakayama, K. and Nakayama, K. (1998). *Cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development*. BioEssays 20, 1020-1029.

Oh, H., Mammucari C., Nenci A., Cabodi S., Cohen S. N and Dotto P. G. (2002). *Negative regulation of cell growth and differentiation by TSG101 through association with p21^{Cip1/WAF1}*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 99, 5430-5435

Ormenese, A.; De Almeida Engler, J.; De Groot, R.; De Veylder, L.; Inés, D. and Jacquard Annie. (2004). *Analysis of spacial expression pattern of seven Kip Related Proteins (KRPs) in the shoot apex of Arabidopsis thaliana*. Annals of Botany London 93, 575-580.

Pavletich, N. P. (1999). *Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structure of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors*. Journal of Molecular Biology 287, 821-828.

Payton, M. and Coats, S. (2002). *Cyclin E2, the cycle continues*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 34, 315-320.

Pei, X-H.W and Xiong, Y. (2005). *Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues*. Oncogene 24, 2787-2795.

Pestell, R. G., Albanese, C., Reutens, A. T., Segall, J. E., Lee, R. J. and Arnold, A. (1999). *The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation*. Endocrine Review 20, 501-534.

Polit, J. T., Maszewski, J. and Kazmierczak, A. (2003). *Effect of BAP and IAA on the expression of G1 and G2 control points and G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of Vicia faba*. Cell Biology International 27, 559-566.

Rank, K. B., Evans D. B. and Sharma S. K. (2000). *The N-terminal domains of cyclin-dependent kinase inhibitory protein block the phosphorylation of cdk2/cyclin E by the CDK-activating kinase*. Biochemical and Biophysical Research Communications 271, 469-473.

Renaudin, J-P., Donan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J. Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrell, D. A., Sundaresan, and Murray, J. A. H. (1996). *Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization*. Plant Molecular Biology 32, 1003-1018.

Rossi, V.; Varotto, S. (2002). *Insights into the G1-S transition in plants*. Planta 215, 345-356.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massangué, J. Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27 kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. Nature 382, 325-331.

Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R. (1989). Protein synthesis patterns. Plant Physiology 75, 231-234.

Sánchez, M. D. P., Gurusinghe, S. H., Bradford, K. J. and Vázquez-Ramos, J. M. (2004). *Differential response of PCNA and Cdk-A and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination*. Journal of Experimental Botany. 1-9.

Sánchez, M. D.P., Torres, A., Boniotti, M. B., Gutierrez, C. and Vázquez-Ramos, J. M. (2002). *PCNA protein associates to Cdk-A ty protein kinases in germinating maize*. Plant Molecular Biology 50, 167-175

Schnittger, C. Weinl, D. Bouyer, U. Schobinger, and M. Hulskamp. (2003). *Misexpression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1/KRP1 in Single-Called Arabidopsis Trichomes Reduces Endoreduplication and Cell Size and Induces Cell Death*. The Plant Cell 15, 303 - 315.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). *CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes & Development 13, 1501-1512.

Stals, H. and Inze, D. (2001). *When plant cells decide to divide*. Trends in Plant Science 6, 359-364.

Stevaux, O. and Dyson, A. J. (2002). *A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function*. Current Opinion in Cell Biology 14, 684-691.

Stevens, C. and Thangue, N. B. (2003). *E2F and cycle control: a double-edged sword*. Archives of Biochemistry and Biophysics 412, 157-169.

Tamrakar, S. Rubin, E. and Ludlow, J. W. (2000). *Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation*. Frontiers in Biosciences 5, d121-137.

Trimarchi, J. M. and Lees, J. A. (2001). *Subling rivalry in the E2F family*. Nature: Molecular Cell Biology 3, 11-20.

Vandepoele, K.; Raes, J.; De Veylder, L.; Rouzé, P.; Rombauts, S. and Inés D. (2002). *Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis*. The Plant Cell 14, 903-916.

Vázquez-Ramos J. M. and Sánchez De Jiménez (1989). DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissue and germination. Plant Physiology.

Vázquez-Ramos J. M. and Sánchez M. P. (2003). *The cell cycle and seed germination*. Seed Science Research 13, 113-130.

Vázquez-Ramos, J. (2000) *Cell cycle control during maize germination*. Seed Biology: Advances and Applications. CAB International Oxford, 261-270.

Verkest, A.; Manes C-L de O.; Vercruyssen, S., Maes S.; Van Der Schueren, E.; Beeckman, T.; Genschik, P.; Kuiper, M.; Inés, D. And De Veylder, L. (2005). *The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through of mitotic CDKA;1 kinase complexes*. The Plant Cell 17, 1723-1736.

Verkest, A.; Weinel, C.; Inzé, D.; De Veylder, L. and Schnittger, A. (2005). *Switching the cell cycle. Kip-Related proteins in plant cell cycle control*. Plant Physiology 139, 1099-1106.

Vidal, A. y Koff, A. (2000). *Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause*. Gene 247, 1-15

Wang, G., Kong, h., Sun, Y., Zhang, X., Zhang W., Atman, N., dePamphilis, C. W. and Ma, H. (2004). *Genome-Wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of the plant cyclin-like proteins*. Plant Physiology 135, 1084-1099.

Wang, H., Fowke, L.C. and Crosby, W. L. (1997). *A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene*. Nature 386, 451-452.

Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. and Fowke, L.C. (1998). *ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and Cycd3, and its expression is induced by abscisic acid*. The Plant Journal 15, 501-510.

Wang, H., Zhou Y., Gilmer, S., Cleary, A., John, P., Whitwill, S., Fowke L.C. (2003). *Modifying plant growth and development using the inhibitor ICK1*. Cell Biology International 27, 297-299.

Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L.C. (2000). *Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology*. The Plant Journal 24, 613-623.

Weinel, C; Marquart, S.; Kuijt, S. J. H.; Nowack, M.K.; Jakoby, M. J.; Hülskamp, M. and Schnittger, A. (2005). *Novel Functions of Plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis*. The Plant Cell. 1-19.

Yang, J. and Kornbluth, S. (1999). *All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners*. Trends in Cell Biology 9, 207-210.

Zhang, H. Xwiong Y. and O'Donnell, M. (1993). *Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes*. Molecular Biology of the Cell 4, 897-906.

Zhang, W-K.; Shen, Y-G.; He, X-J.; Du, B-X.; Xie, Z-M.; Luo, G-Z.; Zhang, J-S. and Chen, S-Y. (2005). *Characterization of a novel cell cycle-related gene from Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany. 1-10.

Zheng, N., Fraenkel, E. Pabo, A. O. and Pavletich, N. P. (1999). *Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP*. Genes & Development 13, 666-674.

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

Zhou, Y., Wang H., Gilmer S., Whitwill S., Fowke L. C. (2003). *Effects of co-expressing the plant CDK inhibitors ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in Arabidopsis thaliana*. Planta 216, 604-613.

Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S., Keller, W., and Fowke, L. C. (2002). *Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 in transgenic Brassica plants*. Planta 215, 248–257.

Zhou, Y.; Li, G.; Brandizzi, F.; Fowke, L. C. and 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 35, 476-489.

APÉNDICE

Buffer de Imbibición

Tris-HCl	50 mM pH 7.6
KCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
Sacarosa	2 %

Buffer de extracción de proteínas

Tris-HCl	70 mM pH 7.5
MgCl ₂	1.0 mM
KCl	25 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	5.0 mM pH 8.0
Sacarosa	0.2 mM
DTT	7.5 mM
Tritón X-100	0.1%
NaF	50 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
β-glicerolfosfato	80mM
H ₂ O	50 mL

1 tableta de cocktail de inhibidores de proteasas complete™ (Boehringer) por cada 50 mL de amortiguador.

SDS-PAGE

Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g
H ₂ O	100 mL

Amortiguador del gel apilador 2X (pH 6.8)

Tris-HCl	7.88 g
SDS	0.4 g
H ₂ O	100 mL

Amortiguador del gel apilador 2X (pH 8.8)

Tris-HCl	23.64
SDS	0.4 g
H ₂ O	100 ml

Gel separador 14%

Amortiguador del gel separador 2X	1.25 mL
Acrilamida/Bisacrilamida al 30%	4.33 mL
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ al 20%	25 µL
TEMED	10 µL
H ₂ O	4.77 mL

Gel apilador

Amortiguador del gel separador 2X	0.75 mL
Acrilamida/Bisacrilamida al 30%	0.50 mL
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ al 20%	7.5 µL
TEMED	10 µL
H ₂ O	1.83 mL

Buffer de carga 4X

Tris-HCl 250 mM	30.32 g
Glicina 1.92 mM	144 g
SDS al 1%	10 g
H ₂ O	1000 ml

Solución de Azul de Coomasie

Coomasie G 25	0.05%
HClO ₄ (70%)	5.18%
H ₂ O	1000 ml

Western-blot**Solución de transferencia pH 8.3**

Glicina	1.44 g
Tris base	0.3 g
Metanol	20 mL
H ₂ O	100 mL

PBS 10X pH 7.4

NaCl	80 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	11.5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
H ₂ O	1000mL

Solución de bloqueo

Leche en polvo	5 g
Tween 20	1.2mL
PBS	10 mL

Solución de lavado para membranas de proteína

EDTA 0.5 mM	200 μ L
SDS	2 g
NACl	2.9 g
PBS 1X	100 mL

Buffer de carga para geles de agarosa

Glicerol	50%
TAE	2X
Azul de bromofenol	0.25 %

TAE 50X

Tris Base	121 g
Ácido acético glacial	28.55 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	50 mL
H ₂ O	500 mL

Buffer de elusión de proteínas

Glutación reducido	10 mM
Tris-HCl pH 8.0	50 mM

Buffer de reacción 10X

Buffer de cinasa 5X	40 μ L
Histona H1 (5 mg/mL)	40 μ L
DTT 20 mM	10 μ L
γ -ATP	3 μ L
ATP 1 mM	5 μ L
H ₂ O	22 μ L

Preparación de hormonas BA y ABA

BA 1 μ M

Pesar 5.6 mg de BA

Disolver en 1 mL de NaOH 0.1 N

Aforar a 25 mL de agua desionizada.

Solución stock 1.0 mM

ABA 20 μ M

Pesar 5.3 mg de ABA

Disolver en 350 μ L de NaOH 0.1 N

Llevar a un volumen final de 1 mL.

Solución stock 0.02 M

Tomar 1 μ L de hormona por cada mL de buffer de imbibición.

Agregar 10 μ L de timidina tritiada/1 mL de buffer de imbibición

Expression and activity of a Kip-related protein, Zeama;KRP1, during maize germination

Natividad de Jesús Juárez, Alfredo Mancilla, Elpidio García and Jorge M. Vázquez-Ramos*

Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510

Abstract

Plant KRP proteins are cyclin/cyclin-dependent kinase subunit (Cdk) inhibitors that share a limited homology with mammalian p27^{Kip1} proteins. Several KRPs have been reported in maize (*Zea mays* L.), of which Zeama;KRP1 was studied during maize germination. Expression of the *Zeama;KRP1* gene did not vary during the 24h germination period. A homologous antibody raised against the 13 kDa carboxy end of the Zeama;KRP1 polypeptide, a sequence containing the cyclin/Cdk inhibitory domain, indicated the existence of a 22 kDa protein in maize embryonic axes, the amount of which also remained unchanged during germination. Neither abscisic acid nor cytokinins modified the amount of protein. The purified Zeama;KRP1 polypeptide inhibited the kinase activity associated with Zeama;PCNA and Zeama;CycD2;1, and also the kinase activity in p13^{Suc1}-pulled-down complexes. However, there were differences in the inhibition pattern during germination. Whereas kinase activity in proliferating cell nuclear antigen (PCNA) or CycD2;1 immunoprecipitates was strongly inhibited mainly during early germination, that in p13^{Suc1}-pulled-down complexes was mainly inhibited at late times, suggesting that each protein complex is composed of different cyclins and/or Cdk.

Keywords: cell cycle, cyclin/Cdk, germination, KRPs, *Zea mays*

Introduction

The cell cycle is controlled by a series of protein complexes with kinase activity, composed of a cyclin protein subunit and an accompanying

cyclin-dependent kinase subunit (Cdk). During the G1 phase in animal cells, the active complex is formed by any of three cyclin Ds and Cdk4 or Cdk6, which phosphorylates and inhibits the antiproliferative protein pRB (or retinoblastoma protein), thus initiating a positive loop towards establishment of the S phase (Pines, 1995). Activity of G1 cyclin/Cdks is regulated in several ways, including the addition of inhibitory phosphorylations by specific kinases, and the association with different proteins, the role of which is to inhibit their kinase activity. There are two main classes of inhibitory proteins: the Cip/Kip family and the Ink4 family (Sherr and Roberts, 1999; Rank *et al.*, 2000). The former contains three members: p21^{Cip1}, p27^{Kip1} and p57^{Kip2}. The Ink4 family contains four members: p15^{Ink4}, p16^{Ink4}, p18^{Ink4} and p19^{Ink4}. These proteins associate with either the kinase or the cyclin moieties of the protein complex and inhibit its catalytic activity (Pavletich, 1999).

Plant cells have conserved most of the basic mechanisms for cell cycle control, including the presence of cyclin/Cdk complexes, although some peculiarities exist. Whereas three main types of D cyclins have been described for animal cells, *Arabidopsis* cells contain 10 different types of D cyclins (Renaudin *et al.*, 1996; Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Also, only one type of Cdk appears to associate with plant D cyclins (Cdk-A), while two different Cdks associate with animal D cyclins (Cdk4 or 6) (Pines, 1995).

The search for cyclin/Cdk inhibitors in plants has revealed a family of proteins related to the animal p27^{Kip1} protein that have been named Kip-related proteins (KRPs) (De Veylder *et al.*, 2001; Verkest *et al.*, 2005; Weinl *et al.*, 2005). There are seven of these in *Arabidopsis* (KRP1 to 7) (Jasinski *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). The similarity is based on the amino terminal of p27^{Kip1}, which corresponds to the carboxy end of the plant KRPs (about 20 amino acids). These proteins have been classified in two groups: group A proteins interact with Cdk-A and cyclins D1, 2 and 3, while group B proteins interact with cyclin Ds, but not with Cdk-A (Jasinski *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004),

*Correspondence

Fax: + 52 55 56225329

Email: jorman@servidor.unam.mx

suggesting distinct functions for each type. It is also suggested that their main action occurs during the G1 phase (Wang *et al.*, 1998; Coelho *et al.*, 2005; Nakai *et al.*, 2006).

Arabidopsis KRP1 was the first inhibitor to be characterized; it interacts with, and inhibits, cyclin D/Cdk-A complexes, and its expression is induced by abscisic acid (Wang *et al.*, 1998; Stals and Inzé, 2001). Over-expression of KRP1 has important effects on plant growth and development (Wang *et al.*, 2003). Tobacco and alfalfa KRPs (*NtKIS1a* and *KRPMt*, respectively) have also been characterized and equally show interaction with, and an inhibitory effect on, cyclin/Cdk complexes (Jasinski *et al.*, 2002; Pettkó-Szandtner *et al.*, 2006).

Recently, two KRPs have been identified and studied in maize, *Zeama;KRP1* and *Zeama;KRP2*, and both show the same conserved domains with p27^{Kip1}. Both proteins inhibit the cyclin/Cdk activity associated with p13^{Suc1}, and specifically the kinase activity associated with *Zeama;CycD5;1*, but not that associated with *Zeama;CycB1;3*, a G2/M cyclin (Coelho *et al.*, 2005).

Successful seed germination may require the efficient establishment of the cell cycle and, in particular, the G1 phase may play a very important role (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003). Of greatest importance for the initiation of the G1 phase is the activation of the complex formed by D-type cyclins and Cdks. *Zeama;CycD2;1* has been characterized, as has its association with a Cdk-A-type kinase subunit during germination and the influence of phytohormones (Gutiérrez *et al.*, 2005). Three other maize D cyclins (D5;1, D5;2 and D4;1) have been cloned, and their expression during germination reported (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006). The study of KRPs is of interest for the comprehension of the regulation of the G1 phase during maize germination. This paper describes the expression of a maize KRP gene, its characterization at the protein level during germination and its inhibitory activity upon cyclin/Cdk complexes, which suggests how the G1 phase in germinating seeds is controlled.

Materials and methods

Plant material, seed germination and protein extraction

Embryonic axes from maize caryopses (*Zea mays* L., cv. Chalqueño) were imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24 h on a sheet of absorbent Whatman No. 1 filter paper wetted with imbibition buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ and 2% (w/v) sucrose] at 25 ± 2°C in darkness. When indicated, axes were incubated in the presence of benzyladenine

(1 μM BA) or abscisic acid (20 μM ABA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Proteins from embryonic axes were extracted with extraction buffer (1 ml/10 axes), containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 15 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.2% (v/v) Triton X-100, 250 mM sucrose, 60 mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 200 μM Na₃VO₄, 1 mM EGTA and one tablet of protease inhibitors (Complete, Roche Mannheim, Germany) per 50 ml buffer. Protein extracts were centrifuged at *c.* 37,000 g for 30 min at 4°C, and protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

RNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Maize embryonic axes (100 mg fresh weight) were ground to a fine powder under liquid nitrogen and mixed with 1 ml Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The protocol followed was that recommended by the supplier. RNA integrity was checked by electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gels and ethidium bromide staining.

For reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments, a fragment containing nucleotides 1–327 from *Zeama;KRP1* was amplified as follows: 150 ng of total RNA, 0.6 μM of the forward 5'-ATGGGCAAGTACATGCGCAAGGCC-3' oligo and 0.6 μM of the reverse 5'-CTCCCTGGTAATCCTCTCATGGC-3' oligo were incubated at 50°C for 35 min to obtain the cDNA; then, conditions were: 95°C 16 min, 25–35 cycles of 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min and a final extension at 72°C 10 min, using the one-step RT-PCR kit from QIAGEN GmbH (D-40724 Hilden, Germany). Similar conditions were used to amplify the actin gene: the forward primer was 5'-ATTGAGGTGATGGTGTGAGCCACAC-3' and the reverse primer was 5'-GCCACCGATCCAGACACTGTACTTCC-3'. RT-PCR products were analysed by 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis. No bands were amplified with these oligos if genomic DNA was used instead of total RNA.

Antibody production

A 355 bp fragment corresponding to the 3' end of *Zeama;KRP1* was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and transformed into DH5α competent cells. The insert was released from the vector using *Eco*RI restriction enzyme (Invitrogen), and then subcloned into the pGEX-4T2 vector (GE Healthcare, Sao Paulo, Brazil) that allows fusion with the glutathione-S-transferase (GST) protein. This new plasmid was introduced into *E. coli* BL21 cells, and these were grown in the

presence of isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.6 mM) to induce the recombinant fused protein. This recombinant protein was purified by passing bacterial protein extracts through a glutathione-Sepharose column (GE Healthcare).

Two rabbits were inoculated either with the fused GST-KRP1 protein or with the KRP1 fragment resulting from treatment of recombinant fused protein with thrombin (GE Healthcare). Recombinant proteins were coupled to keyhole limpet haemocyanin (Jemmerson, 1987) as follows: haemocyanin (2 mg) was first dissolved in 0.8 ml water and then 0.2 ml phosphate-buffered saline (PBS) [137 mM NaCl, 27 mM KCl and 4.3 mM sodium phosphate (pH 7.2)] was added. A total of 10 μ l of 25% (v/v) glutaraldehyde and 90 μ l PBS was added, and the protein solution was incubated with the purified recombinant protein (around 400 μ g) for 12 h at room temperature with shaking. Excess glutaraldehyde was removed by filtration through Centricon-100 tubes. A rabbit was injected intramuscularly with two pooled preparations of protein (800 μ g) coupled to haemocyanin, emulsified with 500 μ l of complete Freund adjuvant. A second immunization was applied 8 d later using incomplete Freund adjuvant, and this protocol was repeated for a further 7 weeks. The antibodies produced (anti-KRP1 or anti-GST-KRP1) were fractionated using ammonium sulphate precipitation [45% (w/v) final concentration], and then immunopurified by incubating with recombinant KRP1 bound to Immobilon filters, eluted with 0.2 M glycine (pH 2.8) and neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 9.0).

Western blotting

Proteins (c. 25 μ g/2–3 μ l protein extract) were separated by 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), gels were blotted on to PVDF membranes (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), and these were incubated with the anti-maize KRP1 polyclonal antibody (1:1000 dilution) for 12 h at 4°C, washed twice with PBS buffer (10 ml each), and once in PBS buffer containing 0.5 M NaCl (10 ml), and 15 min each at room temperature. The membranes were incubated for 2 h with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (GE Healthcare) at 1:10,000 dilution. Membranes were washed again with 10 ml PBS buffer, and the peroxidase reaction was detected by the enhanced chemiluminescence method (ECL, GE Healthcare, Sao Paulo, Brazil). Densitometry analyses were performed using a BioRad Phosphorimager. All Western blots were repeated a minimum of three times using independent protein extracts.

Immunoprecipitation and pull-down assays

Proteins (200 μ g/15–20 μ l protein extract) were incubated with anti-Zeama;CycD2;1 antibody (1:10), anti-Zeama;PCNA antibody (1:15) or anti-Zeama;KRP1 antibody (1:10) conjugated with Protein A-agarose (30 μ l, Roche) or with p13^{Suc1}-Sepharose beads (10 μ l, Millipore) overnight at 4°C. After incubation, beads were washed five times with 15 μ l buffer A [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 2.5 mM EDTA (pH 8.0), 2.5 mM EGTA, 2.5 mM NaF, 0.1% (v/v) Triton X-100] and once with kinase assay buffer (15 μ l, see below). Resulting protein precipitates or pulled-down proteins were used as the sources of kinase activity.

Protein kinase activity

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and CycD2;1 immunocomplexes or p13^{Suc1}-associated proteins were resuspended in 15 μ l of kinase buffer [70 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, 20 μ M ATP and 5 μ Ci [γ -³²P]ATP; GE Healthcare]. As substrate, 4 μ g GST-ZmRBR-C fusion peptide [the C-terminal domain of maize retinoblastoma related (RBR) protein] were added per sample. Purification of the GST-ZmRBR-C fusion peptide was performed according to Ramirez-Parra *et al.* (1999). Reactions were performed for 30 min at 30°C and were stopped by adding SDS loading buffer [15 μ l, 80 mM Tris-HCl (pH 6.8); 5% (v/v) mercaptoethanol; 2% w/v SDS; 10% (v/v) glycerin; 0.01% (w/v) bromophenol blue]. After boiling for 5 min, the reaction products were separated by 12% SDS-PAGE.

Results

Expression of Zeama;KRP1 and protein levels during maize germination

RT-PCR experiments were performed to follow the expression of the gene coding for Zeama;KRP1 during germination; as a control actin mRNA was also measured. Figure 1 shows that the amount of *Zeama;KRP1* mRNA did not change during the 0–24 h period measured, which is up to the time when radicle protrusion is first evident (Fig. 1). Thus, the next step was to study the behaviour of the corresponding protein. For this, it was necessary to produce homologous antibodies. Therefore, the carboxy end (355 nt) of *Zeama;KRP1* was cloned into the pGEX-4T2 expression vector which, when expressed, produces a protein fused to GST. The fused protein was overproduced, separated at the thrombin

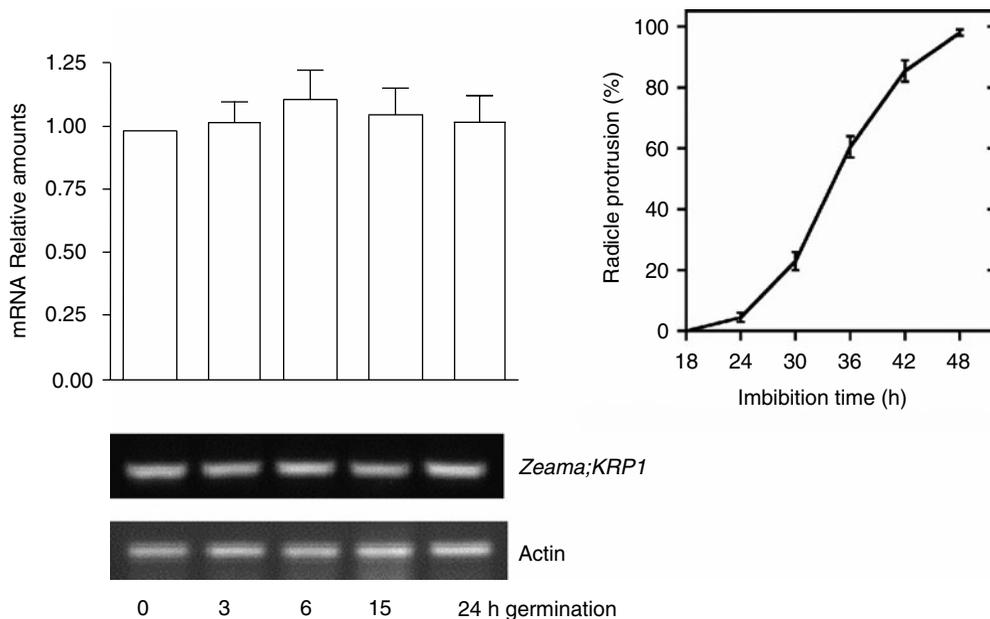


Figure 1. Expression of the *Zeama;KRP1* gene during germination. Maize embryonic axes were imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24 h and total RNA was extracted. RT-PCR was carried out, using the expression of the actin gene as a loading control. The bar graph shows a densitometry analysis relating *Zeama;KRP1* mRNA band intensity to actin mRNA band intensity. The graph on the right illustrates a typical maize germination curve (completion is recorded as radicle protrusion).

cleavage site, and then used to raise antibodies. These were prepared against both the fused protein and the 13 kDa KRP fragment. Only the antibody against the 13 kDa protein gave clear results in Western blot experiments, and this recognized a 22 kDa protein band in maize protein extracts (Fig. 2A). This protein band was not detected if the antibody was pre-treated with recombinant *Zeama;KRP1*, nor using the pre-immune serum (results not shown).

The kinetics of accumulation of *Zeama;KRP1* protein during germination was evaluated by Western blot experiments. This protein was present in extracts from dry embryonic axes, and its amount did not vary during the 24 h germination period (Fig. 2B, C). Neither the addition of cytokinin (BA) nor abscisic acid (ABA) modified this behaviour in the same time period (Fig. 2B, C); in contrast, *Arabidopsis* KRPs are induced by addition of ABA (Wang *et al.*, 1998; Stals and Inzé, 2001).

***Zeama;KRP1* inhibits kinase activity in cyclin-CDK complexes**

KRPs are inhibitors of the kinase activity in cyclin/Cdk complexes. Thus, to test whether *Zeama;KRP1* has KRP properties, kinase activity in *Zeama;CycD2;1* and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoprecipitates, or in $p13^{\text{Suc}1}$ -pulled-down complexes,

was evaluated. First, a dose-response experiment was performed, adding 0.5, 1.5 and 2.5 μg of *Zeama;KRP1* 13 kDa peptide, using as a target the kinase activity present in the complexes described above. PCNA- and *CycD2;1*-associated kinase activities were obtained from 6 h germinating axes, and the $p13^{\text{Suc}1}$ -associated kinase activity was from 15 h germinating axes, because at these times kinase activity was maximal (Sánchez *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005).

PCNA- and *Zeama;CycD2;1*-associated kinase activities were reduced in a dose-dependent manner, and KRP at 2.5 μg reduced activity almost completely. The $p13^{\text{Suc}1}$ -associated kinase activity was reduced around 50% with 0.5 μg peptide, and no further effect was observed at higher peptide amounts (Fig. 3). Exposure of kinase activity-containing immunoprecipitates to an anti-KRP immunoprecipitate did not produce an inhibitory effect (Fig. 3). Pre-immune serum, addition of 2.5 μg of GST-KRP or GST had no effect (not shown). Addition of increasing amounts of BSA (5–20 μg), instead of the KRP polypeptide, did not inhibit kinase activity (Fig. 3).

KRP1 inhibition of kinase activity associated with PCNA, *Zeama;CycD2;1* or $p13^{\text{Suc}1}$ was followed during maize germination, using the highest KRP amount (2.5 μg). In control samples, PCNA-associated kinase activity was highest during early germination and decreased by 24 h (Sánchez *et al.*, 2002) (Fig. 4). KRP1 strongly inhibited kinase activity during

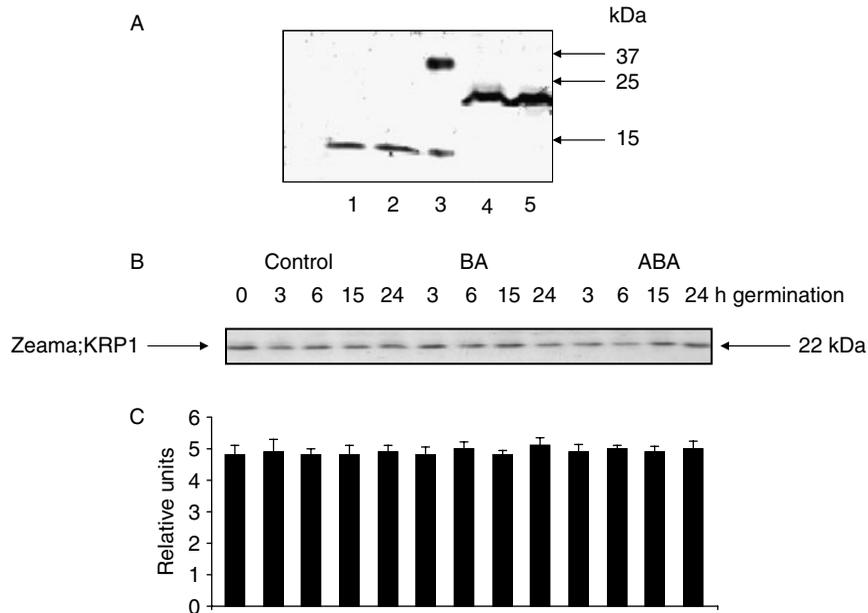


Figure 2. Zeama;KRP1 protein accumulation during germination of maize embryonic axes. (A) Validation of the anti-Zeama;KRP1 antibody by Western blotting. Protein extracts were from 6h germinating axes. Lanes 1 and 2, KRP1 13kDa recombinant polypeptide; lane 3, GST-KRP1 recombinant protein; lanes 4–5, Zeama;KRP1 from 6h-imbibed seed axes. (B) Maize embryonic axes were imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24 h in the presence of benzyladenine (BA), abscisic acid (ABA) or water (control), and protein extracts were used to determine KRP1 protein amounts by Western blotting. (C) Densitometry analysis relating the Western blot signal to the amount of protein loaded.

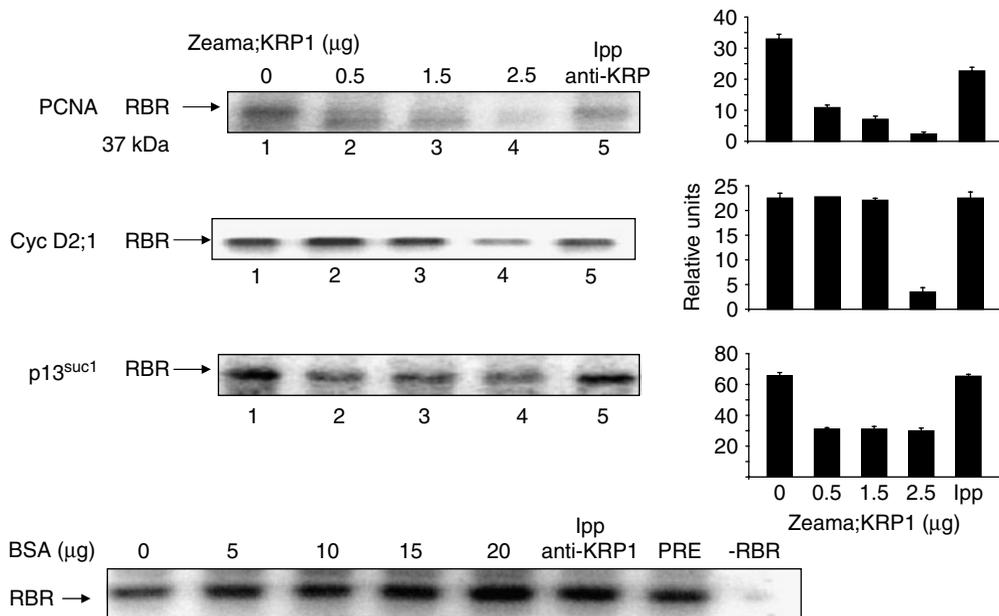


Figure 3. Zeama;KRP1 concentration-dependent inhibition of kinase activity from maize embryonic axes. Zeama;KRP1 polypeptide was added at 0, 0.5, 1.5 and 2.5 μg (lanes 1–4) to PCNA or Zeama;CycD2;1 immunoprecipitates, or to p13^{Suc1}-pulled-down proteins, and protein kinase activity was measured. The carboxy terminal domain of maize RBR (retinoblastoma related) protein was used as substrate. A KRP1 immunoprecipitate was also used as a source of inhibitory activity (lane 5). Boxes at the right represent the densitometry analysis relating kinase activity to the amount of the RBR polypeptide added in kinase assays. Lowermost blot: as a control, bovine serum albumin (BSA) was added to PCNA immunoprecipitates to demonstrate the specificity of the KRP polypeptide inhibitory activity. PRE, pre-immune serum; – RBR, no RBR protein added.

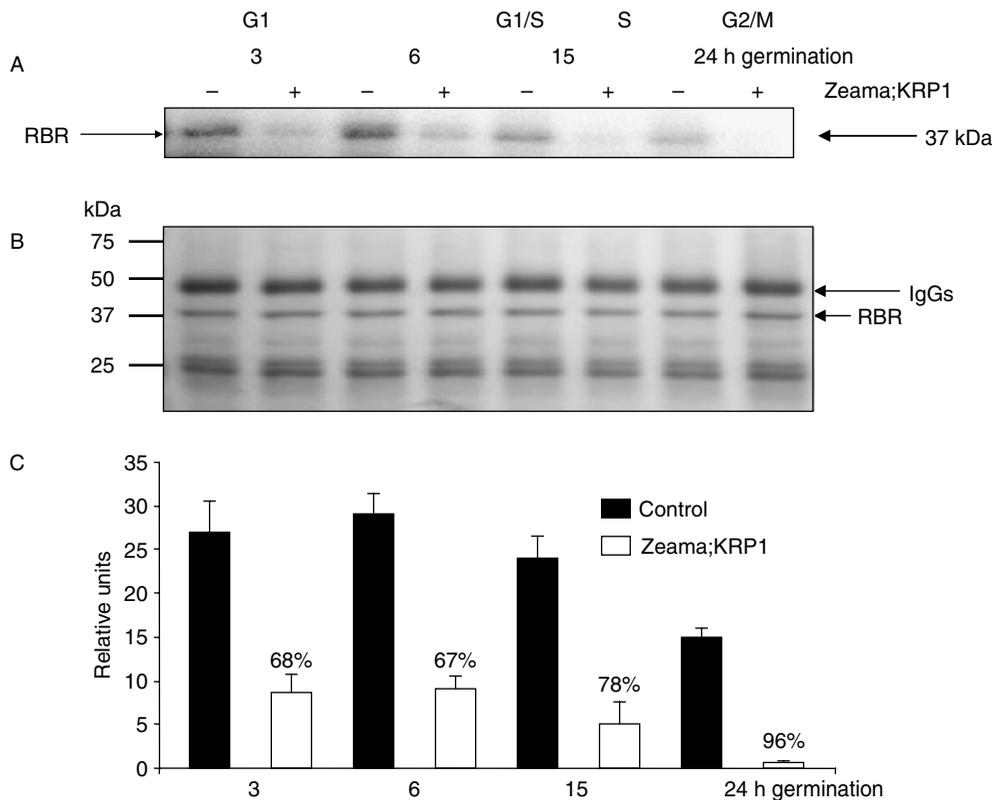


Figure 4. Zeama;KRP1 inhibition of PCNA-associated kinase activity. Maize embryonic axes were imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24 h, and the PCNA-associated kinase activity was obtained from the corresponding protein extracts by immunoprecipitation using the anti-PCNA antibodies. (A) Kinase activity measured in the presence or absence of Zeama;KRP1 polypeptide at different germination times; (B) stained gel showing the amount of RBR (retinoblastoma related) protein loaded; (C) densitometry analysis relating the kinase activity signal to the amount of the RBR protein loaded; numbers indicate the percentage of inhibition by the KRP polypeptide.

germination, from 68% at 3–6 h to 96% by 24 h (when PCNA-associated kinase activity was minimal).

Zeama;CycD2;1-associated kinase activity increased between 0 and 15 h germination and then decreased (Gutiérrez *et al.*, 2005) (Fig. 5). KRP1 strongly decreased kinase activity, by 70 to 92% between 0 and 15 h; by 24 h, inhibition was marginal, but kinase activity was also very low.

Inhibition of kinase activity in p13^{Suc1}-pulled-down proteins was different. In control samples, kinase activity was low during early germination and increased by 15 h (Fig. 6). The inhibitory effect of KRP1 was low between 3 and 6 h germination and increased by 15 h, reaching 68% inhibition; by 24 h, inhibition was 48%.

Discussion

Expression of Zeama;KRP1 was followed both at the transcriptional and protein accumulation levels during maize germination. Because KRP1 is a cyclin/Cdk inhibitor, it was expected that its amount

would decrease to allow cell cycle advance; thus, it was surprising to observe that there were no changes in either the mRNA or protein during the first 24 h of germination. It was also unexpected that ABA did not modify KRP protein accumulation. In *Arabidopsis* and *Medicago* cells, ABA stimulates KRP accumulation, and it would appear that the cell cycle and growth are inhibited in this way (Wang *et al.*, 1998; Pettkó-Szandtner *et al.*, 2006).

Demonstration of Zeama;KRP1 as a cyclin/Cdk inhibitor was obtained by measuring kinase activity in immunoprecipitates using anti-Zeama;PCNA or anti-Zeama;CycD2;1 antibodies, or activity in p13^{Suc1}-pulled-down proteins. PCNA, the DNA polymerase δ sliding clamp, binds cyclin/Cdk complexes in animal and plant cells (Xiong *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 2002), and p13^{Suc1} is a protein that binds strongly to Cdk1 (Cdk-A)-type kinases (Hayles *et al.*, 1986).

Maize PCNA associates with Zeama;CycD2;1 and Cdk-A type kinases, and in this association protein kinase activity can be measured. This and CycD2;1-associated kinase activity are present mainly during

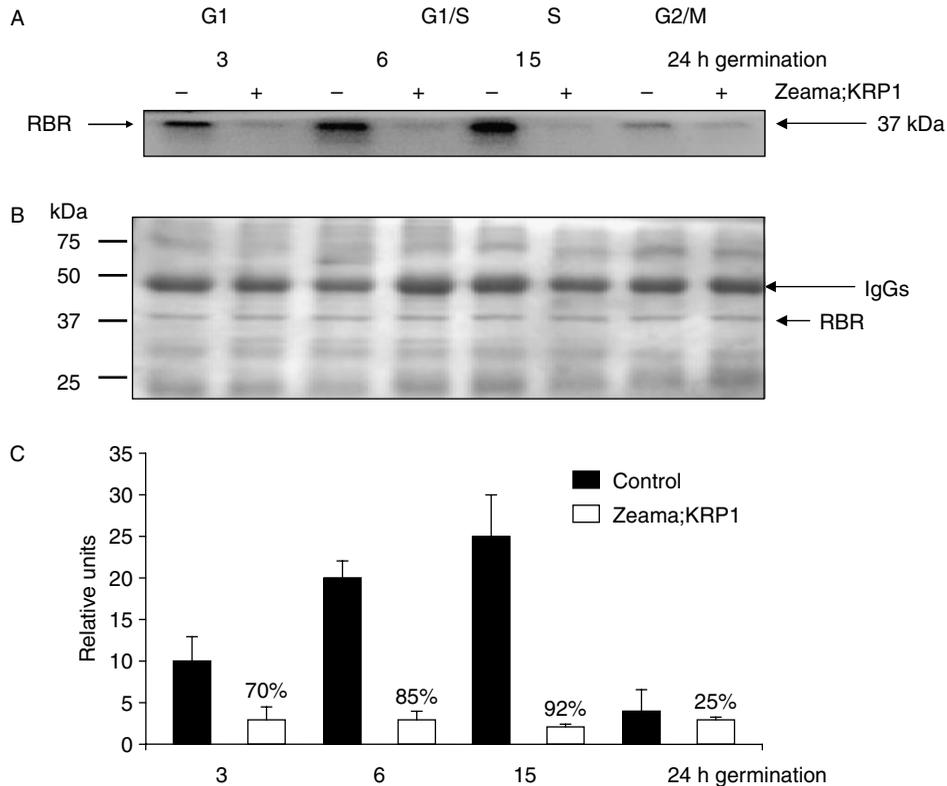


Figure 5. Zeama;KRP1 inhibition of CycD2;1-associated kinase activity from maize embryonic axes, using the anti-CycD2;1 antibodies. (A) Kinase activity measured in the presence or absence of the Zeama;KRP1 polypeptide at different germination times; (B) stained gel showing the amount of RBR (retinoblastoma related) protein loaded; (C) densitometry analysis relating the kinase activity signal to the amount of the RBR protein loaded; numbers indicate the percentage of inhibition by the KRP polypeptide.

0–15 h of germination, while activity is lower at later germination times (Sánchez *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005). The opposite occurs with the p13^{Suc1}-associated kinase activity, which reaches a peak during late germination (by 24 h), but has low activity in the earlier hours. As the beginning of the S phase during maize germination occurs by 12–15 h of imbibition, and the first labelled mitotic figures appear by 24–28 h (previous to or concomitant with radicle protrusion) (Baíza *et al.*, 1989; Sánchez *et al.*, 2005), PCNA- and Zeama;CycD2;1-associated kinase activities must exert their actions in the G1 phase and at the G1–S transition, while activity in p13^{Suc1} complexes must correspond to a G2–M transition kinase.

Zeama;KRP1 very strongly inhibited the kinase activity associated with both PCNA and Zeama;CycD2;1 in *in vitro* assays, when 2.5 µg peptide were added. On the other hand, the p13^{Suc1}-associated kinase activity was reduced to only about half at any concentration of peptide tested. This may indicate that p13^{Suc1} associates with more than one cyclin/Cdk complex, and only one (or some) of these complexes is sensitive to the KRP action. Association of p13^{Suc1} to

Cdk-A and Cdk-B kinases has been demonstrated (Coelho *et al.*, 2005).

Zeama;KRP1 inhibited kinase activity in a differential fashion during maize germination. Kinase activity associated with either PCNA or Zeama;CycD2;1 was strongly inhibited virtually at all times, but a distinction observed was that the PCNA-associated kinase became more sensitive by 24 h, reflecting the predominance of only one type of cyclin/kinase bound to PCNA as germination advances. On the other hand, the CycD2;1-associated kinase activity importantly declined by 24 h of germination, and the remaining activity was only marginally inhibited, perhaps indicating the gradual loss of the sensitive moiety while the remaining kinase activity would be resistant to KRP1. An opposite trend was observed for kinase activity associated with p13^{Suc1}, in which there was only a marginal effect during early germination, suggesting that at these times the associated cyclin/Cdk was not a good target for KRP1. Inhibition was observed only after 15 h germination, a time at which there must be another cyclin/Cdk-associated complex that is sensitive to

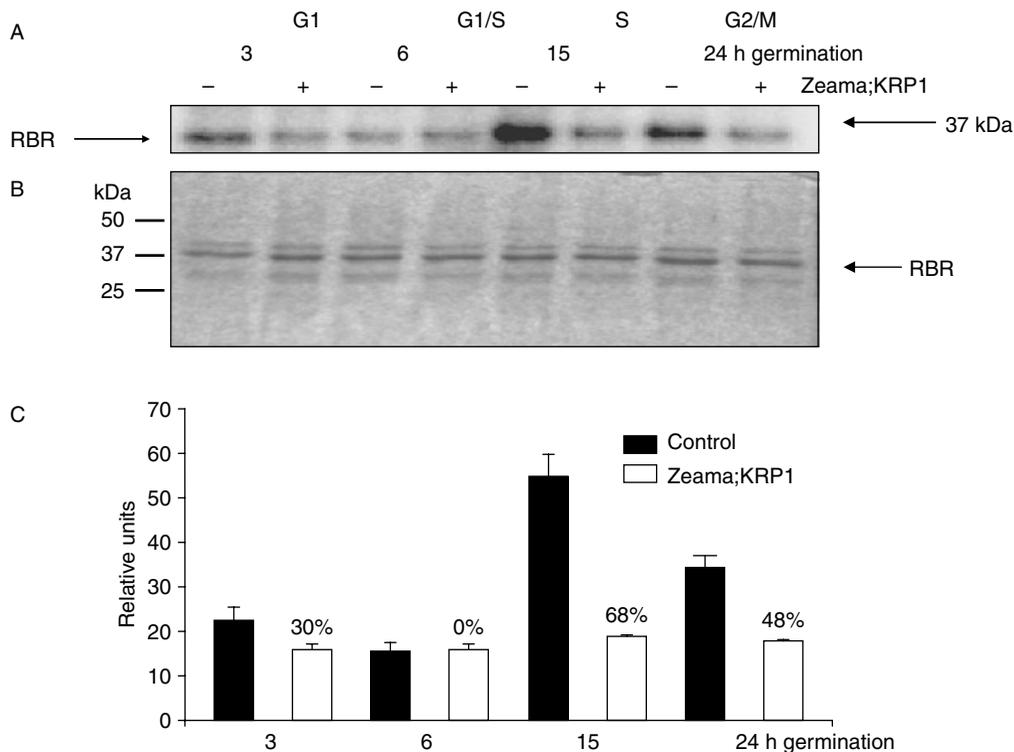


Figure 6. Zeama;KRP1 inhibition of p13^{Suc1}-associated kinase activity. Maize embryonic axes were imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24 h, and the p13^{Suc1}-associated kinase activity was obtained from the corresponding protein extracts using agarose beads containing bound p13^{Suc1}. (A) Kinase activity was measured in the presence or absence of Zeama;KRP1 polypeptide at different germination times; (B) stained gel showing the amount of RBR (retinoblastoma related) protein loaded; (C) densitometry analysis relating the kinase activity signal to the amount of the RBR protein loaded; numbers indicate the percentage of inhibition by the KRP polypeptide.

KRP1. By 24 h, p13^{Suc1} may associate with more than one kinase complex. On the whole, it would appear that different Cdks and cyclins form different complexes with PCNA, with CycD2;1, or with p13^{Suc1}, and they may participate in regulating different stages of the cell cycle, germination, or both.

Acknowledgements

We acknowledge receiving grants PAPIIT IN-206799 and IN-200706 and Conacyt grant 42896-Z. N.J.J. and A.M. received grants from the Sistema Nacional de Investigadores, level III researchers.

References

- Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology* **135**, 416–421.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–252.
- Coelho, C.M., Dante, R.A., Sabelli, P.A., Sun, Y., Dilkes, B.P., Gordon-Kamm, W.J. and Larkins, B.A. (2005) Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiology* **138**, 2323–2336.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, P., Landrieu, I., Van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. and Inzé, D. (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1653–1667.
- Gutiérrez, R., Quiroz, F. and Vázquez-Ramos, J.M. (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant and Cell Physiology* **46**, 166–173.
- Hayles, J., Aves, S. and Nurse, P. (1986) *suc1* is an essential gene involved in both the cell cycle and growth in fission yeast. *EMBO Journal* **5**, 3373–3379.
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, C., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C. and 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**, 973–982.

- Jemmerson, R.** (1987) Multiple overlapping epitopes in the three antigenic regions of horse cytochrome C. *Journal of Immunology* **138**, 213–219.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A. and Sekine, M.** (2006) *Arabidopsis* KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Letters* **580**, 336–340.
- Pavletich, N.P.** (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology* **287**, 821–828.
- Pettkó-Szandner, A., Mészáros, M., Horvath, G.V., Bakó, L., Csordás-Toth, E., Blastyák, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P. and Dudits, D.** (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant Journal* **46**, 111–123.
- Pines, J.** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research* **66**, 181–212.
- Quiroz-Figueroa, F. and Vázquez-Ramos, J.M.** (2006) Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiologia Plantarum* **128**, 556–568.
- Ramírez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C.** (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Research* **27**, 3527–3533.
- Rank, K.B., Evans, D.B. and Sharma, S.K.** (2000) The N-terminal domains of cyclin-dependent kinase inhibitory proteins block the phosphorylation of cdk2/cyclin E by the CDK-activating kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**, 469–473.
- Renaudin, J.-P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V. and Murray, J.A.H.** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology* **32**, 1003–1018.
- Sánchez, M.D., Gurusinghe, S.H., Bradford, K.J. and Vázquez-Ramos, J.M.** (2005) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany* **56**, 515–523.
- Sánchez, M.D., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. and Vázquez-Ramos, J.M.** (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biology* **50**, 167–175.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M.** (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development* **13**, 1501–1512.
- Stals, H. and Inzé, D.** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science* **6**, 359–364.
- Vandepoole, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S. and Inzé, D.** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 903–916.
- Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez, M.D.** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* **13**, 113–130.
- Verkest, A., Weinl, C., Inzé, D., De Veylder, L. and Schnittger, A.** (2005) Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiology* **139**, 1099–1106.
- Wang, G.F., Kong, H.Z., Sun, Y.J., Zhang, X.H., Zhang, W., Altman, N., de Pamphilis, C.W. and Ma, H.** (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of the plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology* **135**, 1084–1099.
- Wang, H., Qi, Q.G., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. and Fowke, L.C.** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant Journal* **15**, 501–510.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Cleary, A., John, P., Whitwill, S. and Fowke, L.** (2003) Modifying plant growth and development using the CDK inhibitor ICK1. *Cell Biology International* **27**, 297–299.
- Weinl, C., Marquardt, S., Kuijt, S.J.H., Nowack, M.K., Jakoby, M.J., Hülskamp, M. and Schnittger, A.** (2005) Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* **17**, 1704–1722.
- Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D.** (1992) D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505–514.
- Zhou, Y., Fowke, L.C. and Wang, H.** (2002) Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* **20**, 967–975.

Received 8 October 2007

accepted after revision 28 February 2008

© 2008 Cambridge University Press