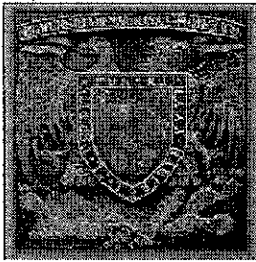


3

00581 2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

*PAGINADO DISCONTINUO*

“EFECTO DE CITOCININAS A NIVELES TRANSCRIPCIONAL Y  
TRADUCCIONAL DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUÍMICA)

PRESENTA

JOSÉ JUAN ZÚÑIGA AGUILAR

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

25-05-18



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.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) por el siguiente jurado:

**Presidente :** Dr. Guillermo Alfaro Martínez

**Primer vocal** Dr. Gerardo Gamba Ayala

**Segundo vocal** Dr. Luis Herrera Estrella

**Tercer vocal** Dra. Alejandra Covarrubias Robles

**Secretario** Dra. June Simpson

**Primer suplente** Dra. Blanca Ruíz Ordaz

**Segundo suplente** Dra. Herminia Loza Tavera

## **Agradecimientos:**

Este trabajo se realizó con el apoyo de las siguientes instituciones:

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

CONACYT  
3013N-9306 y 85379

General Dirección de Asuntos del Personal Académico  
DGAPA IN-209885

Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado  
05348 "Expresión de Genes Inducidos por Benciladenina durante la germinación de ejes embrionarios de maíz".

## RESUMEN

El maíz es una planta angiosperma y como tal utiliza las semillas como forma de reproducción. El proceso biológico mediante el cual la semilla parcialmente deshidratada y con una actividad metabólica reducida al mínimo es reactivada tras la entrada de agua se denomina germinación.

Dentro de los primeros eventos bioquímicos que se establecen durante la germinación se encuentran aquellos que permiten la generación de energía, la reparación de estructuras y membranas, y el recambio de metabolitos y complejos enzimáticos. En conjunto, estos procesos permitirán a las células quiescentes del embrión estar en condiciones de reiniciar la proliferación y concluir exitosamente la primera ronda de divisiones celulares, fenómeno con el cual la germinación termina para dar paso a los procesos de crecimiento.

El proceso de la germinación puede ser acelerado de diferentes maneras, teniendo como resultado un incremento en procesos reparativos y un acortamiento del ciclo celular. En nuestro laboratorio hemos utilizado tanto la adición de fitohormonas (citocininas) como la técnica de osmocondicionamiento para acelerar la germinación. En el desarrollo del presente proyecto hemos estudiado cambios en la expresión génica y la concentración/actividad de proteínas regulatorias del ciclo celular durante la germinación normal y la germinación acelerada con citocininas.

Como resultado del estudio a nivel transcripcional, encontramos cambios cuantitativos, promovidos por las citocininas, en la expresión de una serie de genes, algunos relacionados preferentemente con el metabolismo de mantenimiento (BARM-1, BAEM-2 y BAEM-5); mientras que los estudios a nivel traduccional, han revelado efectos de citocininas sobre la concentración y actividad de proteínas regulatorias clave en el reinicio y control de la proliferación celular (anti-oncogen p53, Ciclina D-1, factor transcripcional E2F y Ciclina B). Los datos encontrados nos permiten sugerir un mecanismo de acción de citocininas sobre el reinicio de la proliferación durante la germinación de maíz, al nivel de la estimulación de proteínas reguladoras del ciclo celular, que están almacenadas en la semilla seca y que en condiciones metabólicas normales son receptivas a la transducción de señales externas para regular el ciclo celular en zonas meristemáticas.

## ABSTRACT

Among the first biochemical processes established during seed germination, those related to energy generation, structure and membrane repair, and metabolite and enzymatic-complex turnover, will allow quiescent embryo cells to reinitiate proliferation and to accomplish the first round of cell proliferation, which in turn represents the end of germination, thus giving way to the growth process.

Seed germination can be accelerated in different ways, resulting in the enhancement of general reparative processes and in cell-cycle shortening. In our laboratory, we have used the addition of exogenous cytokinin in order to accelerate maize germination. In this work, we have studied the germination process both at the gene expression level and also following the behaviour of cell cycle regulatory proteins, either normal or accelerated by means of cytokinin.

At the transcriptional level, we have found cytokinin-promoted changes in the expression of some genes (BARM-1, BAEM-2 and BAEM-5), several of which code for proteins related to house-keeping, whereas the experiments with cell cycle-markers have shown that cytokinin addition affects both concentration and activity of some key regulatory cell cycle proteins (anti-oncogene p53, Cyclin D-1, transcription factor E2F and Cyclin B).

All these data lead us to propose a mechanism by which cytokinins switch-on a signal transduction pathway during maize germination, leading to the stimulation of cell cycle regulatory proteins present in dry seed, which in turn, allows the reinitiation of proliferation in meristematic cells.

## INDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Capítulo I Introducción	1
1.1 Angiospermas	2
1.2 Germinación	2
1.3 Bioquímica de la Germinación	4
1.3.1 Imbibición	5
1.3.2 Síntesis de ATP	5
1.3.3 Síntesis de Proteínas, ARN y ADN	5
1.4 Fitorreguladores	6
1.5 El Ciclo Celular	9
1.5.1 Regulación del Ciclo Celular	13
1.5.1.1 La transición G1/S	13
1.5.1.2 La transición G2/M	16
1.6 La Germinación de semillas como modelo para el estudio de la proliferación celular	17
1.7 Antecedentes inmediatos	19
Hipótesis	22
Objetivos	23



<b>Capítulo II Efectos de citocininas a nivel transcripcional</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Materiales y Métodos</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Resultados</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Artículo 1</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Resultados adicionales</b>	<b>34</b>
<b>2.4.1 Introducción</b>	<b>35</b>
<b>2.4.a Modificaciones al protocolo de                     "Differential Display"</b>	<b>37</b>
<b>2.4.b Análisis de efectos de citocininas sobre                     marcadores moleculares de maíz</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo III Efectos de citocininas sobre proteínas del Ciclo Celular</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Materiales y Métodos</b>	<b>57</b>
<b>3.2 Resultados</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Artículo 2</b>	<b>57</b>
<b>Capítulo IV Discusión y Conclusiones</b>	<b>89</b>
<b>4.1 Discusión</b>	<b>89</b>
<b>4.1.1 Efectos de citocininas sobre la expresión génica                     durante la germinación de maíz</b>	<b>91</b>
<b>4.1.2 Efectos de Citocininas sobre Proteínas Reguladoras                     del Ciclo Celular.</b>	<b>100</b>
<b>4.1.3 Efectos de Citocininas Durante la Germinación de Maíz.</b>	<b>106</b>
<b>4.2 Conclusiones</b>	<b>110</b>
<b>Referencias</b>	<b>111</b>

## 1.1 Angiospermas.

Las angiospermas son aquellas plantas cuya semilla joven está contenida en un ovario; estas semillas se desarrollan de un óvulo fertilizado. La fertilización en las angiospermas se caracteriza por la participación de dos núcleos masculinos: un núcleo no móvil que se libera del tubo polínico se fusiona con el núcleo del óvulo para formar un cigoto diploide, y el otro se fusiona con dos núcleos polares para formar un núcleo triploide, que posteriormente formará el endospermo. La primera división en el cigoto diploide dará lugar a una célula axial o apical, y a una célula basal. En semillas de monocotiledóneas gramíneas, como el maíz, el embrión y el suspensor se forman en su mayor parte a partir de la célula axial. En este tipo de semillas, el cotiledón está constituido por el escutelo. El embrión está protegido en la radícula por la coleoriza y en la plúmula por el coleoptilo (Figura 1)(Bewley and Black, 1994).

## 1.2 Germinación.

La germinación de semillas puede ser considerada desde un punto de vista molecular como una etapa del desarrollo de las plantas, que comprende una serie de eventos metabólicos que permiten al embrión adoptar una condición metabólica que le permita reiniciar la proliferación celular a partir de un estado quiescente en donde el contenido de agua está reducido hasta cerca de un 10%. En maíz, bajo condiciones aptas de temperatura y humedad, la única señal externa que se requiere para el establecimiento de la germinación es la entrada de agua (Mayer, 1975).

Un concepto definido de germinación ha sido difícil de unificar. Bajo un punto de vista agronómico, una semilla ha germinado una vez que la plántula emerge de la superficie del suelo;

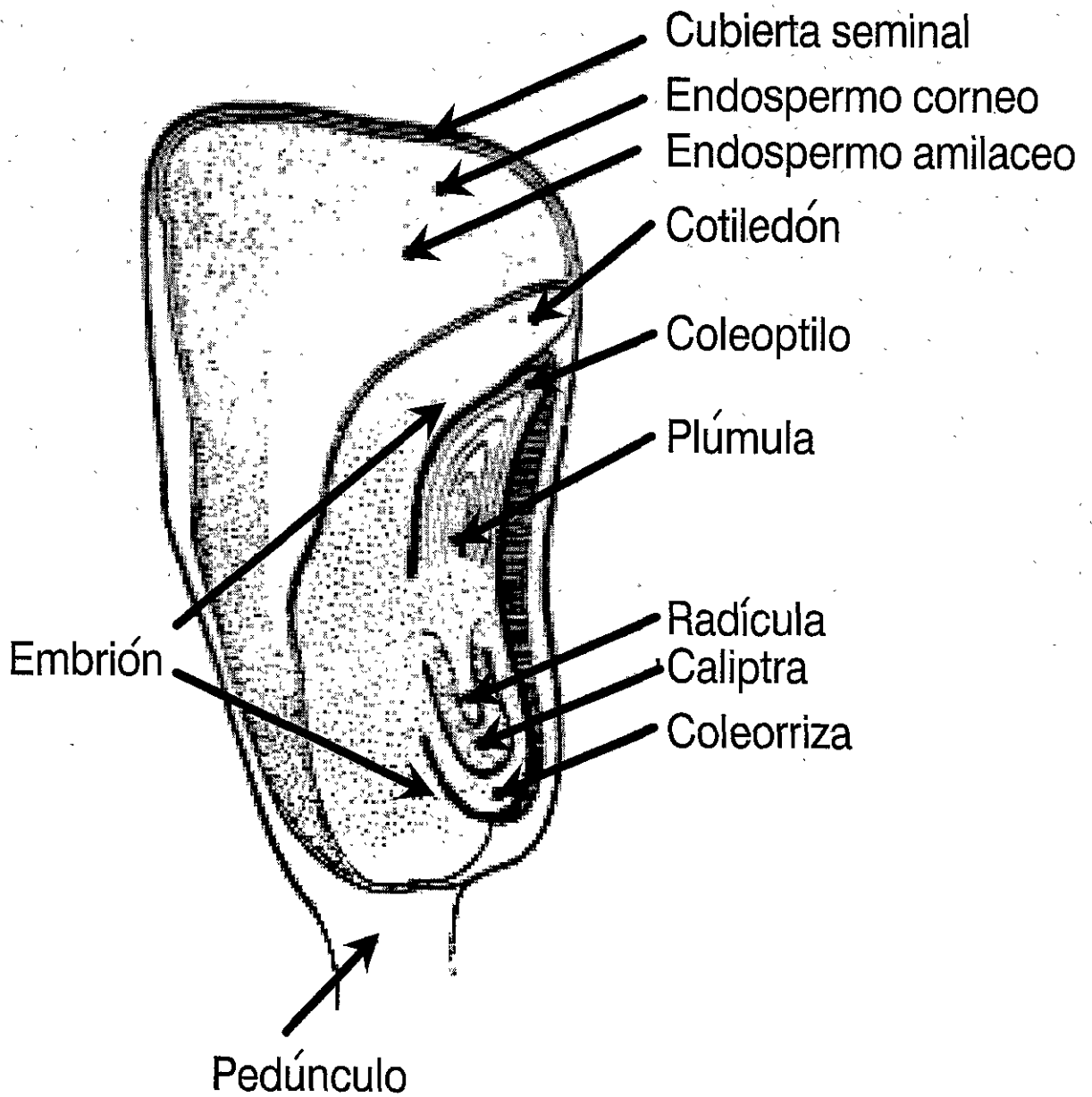


Figura 1. Esquema de semilla y embrión

una definición fisiológica implica que la germinación se ha completado cuando una parte del embrión atraviesa la cubierta de la semilla (Bewley and Black, 1994). Sin embargo, una de las principales funciones de la germinación es restablecer las condiciones aptas para el reinicio de la proliferación celular; debido a que una vez que el compromiso para la entrada al ciclo celular ha sido establecido, este tendrá que completarse necesariamente, en nuestro grupo de trabajo adoptamos una definición molecular de germinación, bajo la cual, un conjunto inicial de procesos bioquímicos y moleculares permiten al embrión estar en condiciones de reiniciar la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas. De acuerdo con esta definición, los eventos propios de la germinación conducirán al metabolismo a un punto de compromiso metabólico después del cual no puede darse un regreso al estado de quiescencia, y lo llevarán hasta un punto donde el éxito en la primera división celular marcará el inicio del proceso de desarrollo.

### **1.3 Bioquímica de la Germinación.**

Existen una serie de procesos bioquímicos que parecen comunes a una gran parte de las semillas de gramíneas, que pueden clasificarse como eventos tempranos y tardíos. Dentro de los eventos tempranos que se inician con la entrada de agua se encuentran la producción anaerobia de energía, la síntesis de ARN, la síntesis de proteínas, y la reparación de estructuras, membranas y del ADN. Los eventos tardíos incluyen la elongación celular, la replicación del ADN y la división celular (Osborne, 1983).

### **1.3.1 Imbibición.**

La entrada de agua presenta tres fases definidas, la fase I es rápida e independiente del estado metabólico de la semilla, se presenta como resultado de las fuerzas de hidratación de los tejidos embrionarios, de las paredes celulares y de los organelos, activando secuencialmente sus funciones (Ching, 1972). La fase II es lenta y acompaña los procesos metabólicos tempranos descritos anteriormente. La fase III puede considerarse como un evento tardío; es una fase rápida que se relaciona con el proceso de elongación previo a la división celular (Bidwell, 1979; Bewley and Black, 1994).

### **1.3.2 Síntesis de ATP**

La principal ruta metabólica encargada de sintetizar el ATP durante los primeros momentos de la germinación es la glucólisis, debido principalmente a que la entrada de agua en la fase I de imbibición y la permeabilidad de las membranas no permite la adecuada entrada de oxígeno, y también a que las mitocondrias se encuentran aún inhabilitadas metabólicamente. Coincidente con la fase II de imbibición, se presenta un incremento en el consumo de oxígeno, que se relaciona con la fosforilación oxidativa y con una mayor producción de ATP (Bewley and Black, 1994).

### **1.3.3 Síntesis de ARN, Proteínas y ADN.**

Aunque en embriones secos no hay síntesis de proteínas, esta es iniciada en semillas de trigo y centeno al poco tiempo de la entrada de agua (Marcus *et al.*, 1966, Sen and Osborne, 1975). Se ha observado una disminución en ribosomas libres con la entrada de agua y la consiguiente aparición de polisomas (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981).

La síntesis de ARN se inicia también a los pocos minutos (Datta *et al.*, 1983), indicando que los constituyentes necesarios para la traducción están presentes en la semilla seca (Simon, 1984). Existen evidencias que indican un papel importante de ARN mensajeros almacenados en la semilla seca para la síntesis inicial de proteínas, mientras que la síntesis posterior puede ser sostenida por ARN mensajeros sintetizados posteriormente (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1984).

También la síntesis de ADN es un evento que comienza relativamente temprano durante la imbibición; sin embargo, esta síntesis está relacionada con procesos de reparación (Zaraín *et al.*, 1987) y de replicación organelar (Zlatanova *et al.*, 1987). La síntesis replicativa nuclear del ADN en embriones de maíz comienza entre las 12 y las 15 horas, teniendo un máximo de actividad después de las 30 horas (Vázquez-Ramos *et al.*, 1986; Zlatanova *et al.*, 1987; Baíza *et al.*, 1989; Georgieva *et al.*, 1994a).

#### 1.4 Fitorreguladores.

Los factores que afectan la germinación pueden ser divididos en extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos están relacionados con las condiciones ambientales como la cantidad disponible de agua, la tensión de oxígeno, la temperatura, y para algunas semillas la luz es un factor importante (Mayer and Poljakoff, 1975). Dentro de los factores internos se encuentran los fitorreguladores u hormonas vegetales. Actualmente, se encuentran mejor descritos alrededor de 6 grupos de fitorreguladores, de los cuales 5 son los mejor estudiados: las giberelinas, las auxinas, el ácido abscísico, el etileno y las citocininas (Raven, 1992).

A las giberelinas se les ha asignado un papel importante durante la germinación principalmente al nivel de inducción de enzimas hidrolíticas en el proceso de movilización de reservas (Hill, 1977).

Entre los efectos más importantes asociados a las auxinas se encuentran su liberación enzimática de conjugados gluco- o ribosídicos, y su transportación hacia la punta del coleoptilo en donde favorecen la elongación y crecimiento celular (Euwens *et al.*, 1975; Cohen, 1982).

Algunos eventos promovidos por el ácido abscísico (ABA) se encuentran asociados a la síntesis de proteínas de reserva, a la inducción de dormancia (Karssen *et al.*, 1983; Koorneef *et al.*, 1984) y a la prevención del crecimiento del embrión (Karssen, 1968). Los niveles de ABA aumentan durante la embriogénesis y disminuyen al ocurrir la germinación; esto último, junto con su promoción de la inhibición de la actividad de la carboxipeptidasa C (enzima específica de la germinación, Dure, 1975), sugieren que ABA actuaría como un modulador negativo de la germinación (Quatrano, 1987).

El etileno está poco relacionado con los procesos germinativos y al respecto existen pocos reportes de ello.

Las citocininas son un grupo de fitorreguladores mitogénicos, los cuales han sido descritos como estimuladores de la germinación de semillas (Van Staden, 1983). En semillas y en cultivo de tejidos vegetales, en presencia de auxinas, promueven la división celular (Miller *et al.*, 1956; Skoog and Miller, 1957); en eventos tardíos, el eje embrionario de garbanzo controla el metabolismo de las reservas energéticas almacenadas en los cotiledones a través de las citocininas (Muñoz *et al.*, 1990); en semillas de sandía, las citocininas pueden tomar el papel de la luz al inducir la transcripción y traducción del gen de la proteína cosechadora de luz y de unión a clorofilas **a** y **b**, LHCP (Longo *et al.*, 1990); aumentan la síntesis del ARN mensajero y de la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5-bisfosfato Carboxilasa-Oxigenasa, y la tasa de biogénesis de cloroplastos (Harvey *et al.*, 1974; Teyssendier *et al.*, 1985; Flores and Tobin, 1986).

En nuestro laboratorio se ha estudiado la germinación de maíz mediante la adición de benciladenina (BA), un fitorregulador mitogénico sintético perteneciente al grupo de las citocininas.

Los resultados obtenidos indican que BA induce un incremento en la síntesis total de ADN en más del 50% con relación al control, así como un incremento en la síntesis reparativa de ADN en ejes embrionarios de maíz y-irradiados; mientras que en los ejes control cambia el tipo de síntesis de un tipo indefinido a uno reparativo (Zaraín *et al.*, 1987; Reyes, 1988). Cuando los experimentos anteriores se llevan a cabo en presencia de inhibidores de traducción y transcripción, se anula el efecto estimulador de BA sobre la síntesis de ADN (Reyes, 1988), y se adelanta el inicio de la replicación del ADN, de tal forma que un evento que ocurre normalmente en un plazo de 15 horas después de la entrada de agua, se adelanta y se presenta a las 6 horas de germinación (Reyes *et al.*, 1991). Adicionalmente, hemos observado que aumenta la actividad de ADN polimerasa nuclear (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990), se incrementa el número de figuras mitóticas en más de tres veces en relación al control (Reyes *et al.*, 1991), y se promueve un cambio cuantitativo en la población de ARN mensajeros traducibles *in vitro* (Zúñiga, 1991)

Con base a que BA disminuye el tiempo en que los núcleos de células meristemáticas han duplicado su ADN y promueve un incremento en la aparición de figuras mitóticas marcadas, hemos hipotetizado un mecanismo de acción hormonal mediante el cual BA promueve adelantos en las fases S y M del ciclo celular durante la germinación temprana de ejes embrionarios de maíz.



## 1.5 El Ciclo Celular.

El ciclo celular tiene como finalidad la división de una célula para dar origen a dos células hijas, genéticamente idénticas a la progenitora. En eucariotes, el ciclo celular está definido por cuatro fases, que bien podrían considerarse como una fase de duplicación del material genético (fase S) y una fase de repartición equitativa de éste entre las dos células hijas (fase M), separadas ambas por dos fases, G1 y G2, en las que se regulan los tiempos y el orden de estos procesos. Cuando en una célula se ha iniciado el camino hacia la proliferación, la entrada a la fase G1 se da a partir de un estadio celular denominado fase G0, en el cual la célula no se divide. Dentro de la fase G1 se encuentra una etapa temprana en la que se revisa el estado metabólico general de la célula, antes de avanzar hasta una etapa tardía, donde se presentan mecanismos reguladores que permitirán el inicio de la duplicación del ADN, o fase S. En la fase G1, los eventos tempranos están separados de los tardíos por un punto de restricción (R); este punto marca el límite después del cual la célula está comprometida a completar íntegramente el ciclo celular. Una vez que se completa la síntesis del ADN, se presenta otra fase de revisión (G2), donde se encuentran controles moleculares que aseguran que las dos nuevas moléculas de ADN se encuentren intactas antes de entrar a la fase de división cromosómica, o fase M. Finalmente, tras la citocinesis las células hijas se encuentran nuevamente en la fase G1 temprana, donde se decidirá si se inicia una nueva ronda de divisiones o se toma el camino hacia una fase G1 no comprometida con el ciclo celular.

Una célula en división puede abandonar el ciclo celular hacia un estado de desarrollo vegetativo o de diferenciación, y las decisiones para ello ocurren en la fase G1; al parecer, el punto de restricción R en esta fase funciona como un punto de bifurcación (Figura 2): antes de consumar la ejecución de R la célula puede emprender el camino hacia diferentes estados celulares como la

quiescencia, la diferenciación o la meiosis (o la vía de apareo en levaduras), mientras que la conclusión de R obliga a la célula a cumplir un riguroso programa de división celular.

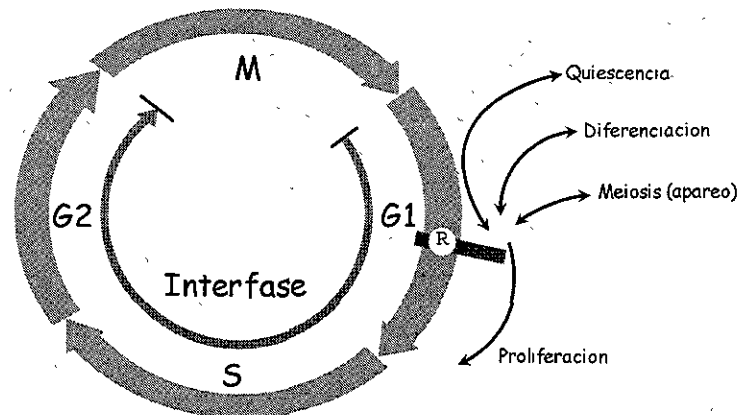


Figura 2. Esquema del ciclo celular.

La decisión de la vía que una célula puede tomar está regulada en parte por diversos factores externos como hormonas, circunstancias nutricionales y por diferentes tipos de estrés; sin embargo, estos factores afectan a la fase G1 antes del punto R pero no tienen efectos reguladores cuando éste ha sido completado.

Diversos estudios han indicado claramente que, tanto los controles moleculares que regulan el avance sobre R como aquellos que regulan los tiempos de duración de las otras fases del ciclo están mediados por cascadas de fosforilación de proteínas. Estos sistemas de control del ciclo celular convergen en complejos clave formados por una ciclina y una cinasa dependiente de ciclinas (cdk por sus siglas en inglés), los complejos ciclina/cdk (Pines, 1993) (figura 3), los cuales serán descritos brevemente a continuación.

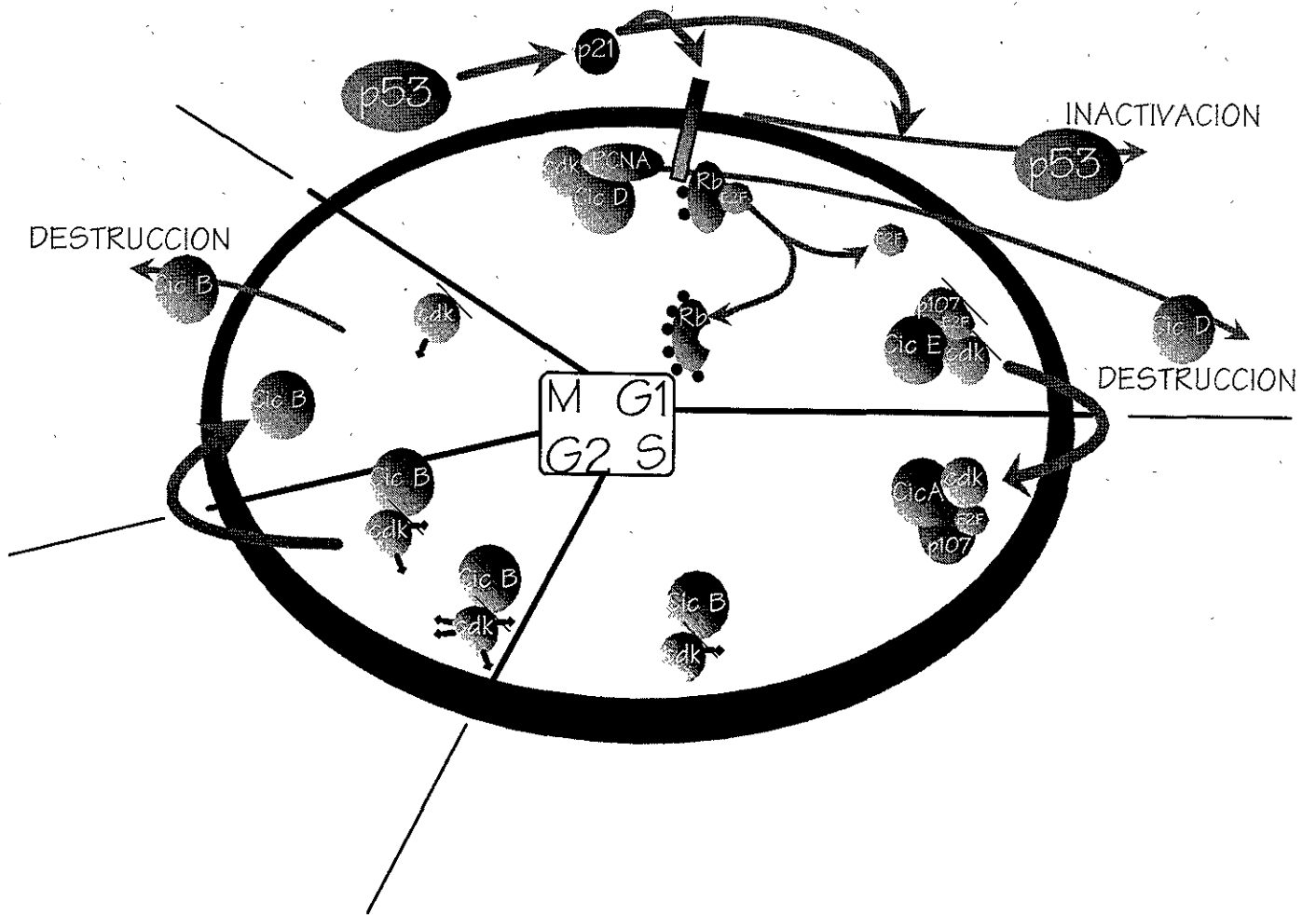


Figura 3. Diagrama del control del Ciclo Celular

Las ciclinas fueron identificadas inicialmente por su acumulación en interfase y destrucción abrupta al final de la mitosis en embriones de invertebrados (Evans *et al.*, 1983). Desde entonces se ha demostrado su presencia en un gran número de especies; en animales se conocen 8 tipos de ciclinas nombradas de la A a la H, además de otras ciclinas pertenecientes a eucariotes inferiores y plantas, pero la nomenclatura varía de acuerdo a la especie. Todas ellas tienen en común una secuencia peptídica bien conservada conocida como la "caja de ciclina", región que está relacionada con la unión a las cdks (Lees and Harlow, 1993). Las ciclinas pueden ser divididas en dos grandes tipos o familias: las ciclinas de mitosis, en donde se agrupan las ciclinas A y B, y las ciclinas de G1 en donde se agrupan las ciclinas C, D y E.

Las cinasas dependientes de ciclina son un grupo de proteínas involucradas en la regulación sobre diferentes puntos de control en el ciclo celular. Todas ellas tienen en común una secuencia peptídica con un alto grado de similitud, y el unirse y ser activadas por las ciclinas, por lo que se conocen como cdks. La mayor parte de las cdks han sido aisladas por reacciones de PCR a partir de una región presente en el producto del gen *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe*, bastante conservada en todas ellas, la secuencia PSTAIRE. Así, se han identificado las cdks de la 1 a la 7 (Hutchison and Glover, 1995).

La actividad de las cdks se regula parcialmente por su unión con ciclinas, pudiendo actuar éstas últimas como las subunidades reguladoras que dirigen a la cinasa a sustratos particulares o a compartimentos intracelulares diferentes (Norbury *et al.*, 1990). Las ciclinas B regulan a la cdk1 (p34<sup>cdc2</sup> en levaduras) en un complejo conocido como MPF (Mitosis Promoting Factor), cuya actividad es el punto de control maestro para el avance del ciclo celular en la transición G2/M; y las ciclinas A se asocian a cdk1 y cdk2, modulando funciones de éstas en la fase S y en la transición G2/M.

Las ciclinas D y E se unen a las cdk's 2, 4, 5 y 6 (Hutchison and Glover, 1995), y tienen funciones regulatorias en las fases G1 y S, como se describirá a continuación.

## 1.5.1 Regulación del Ciclo Celular.

### 1.5.1.1 Transición G1/S.

En la fase G1 se encuentran dos importantes puntos de control: el paso sobre el punto de restricción R que separa G1 temprano de G1 tardío, que compromete a la célula hacia la vía de división celular, y la transición de G1 tardío a la fase S. Como se mencionó, los complejos ciclina/cdk tienen un papel determinante en esta regulación.

Diferentes evidencias indican el papel crucial de complejos ciclina D/cdk para superar el punto de restricción y comprometer a la célula hacia el avance y conclusión del ciclo celular. Existen tres isómeros de la ciclina D (D1, D2 y D3), cuya cantidad puede variar en diferentes tejidos y tipos celulares (Lew *et al.*, 1991). Aunque las tres ciclinas D no son redundantes, pues la ciclina D1 tiene un papel primordial en la diferenciación y tienen diferentes afinidades por la proteína RB, son las ciclinas más directamente ligadas con la transducción de señales extracelulares (Matsushime *et al.*, 1991). Las ciclinas D forman complejos con las cdk's 2, 4, 5 y 6 (Xiong *et al.*, 1992; Bates *et al.*, 1994); de estas, la más importante al nivel del reinicio de la proliferación parece ser la cdk4.

La detención del ciclo celular en la fase G1 antes del punto de restricción está determinado por el secuestro del factor transcripcional E2F por el producto del gen de retinoblastoma, pRB (Weintraub *et al.*, 1992). Esta es una fosfoproteína que regula negativamente el avance del ciclo celular en la fase G1 antes del punto R, uniendo a miembros de la familia de factores transcripcionales E2F impidiendo su actividad; la regulación de esta interacción está determinada

por los niveles de fosforilación de pRB; sólo en su forma hipofosforilada es activa y puede unir a E2F (Ikeda *et al.*, 1996).

Bajo condiciones aptas para la proliferación, el complejo de la ciclina D1/ cdk4 se une a pRB y lo fosforila (Kato *et al.*, 1993), reduciendo su afinidad por y liberando a E2F, el cual en forma libre actúa promoviendo la transcripción de genes relacionados con la síntesis de nucleótidos y del ADN, como la timidilato cinasa, timidilato sintetasa, ribonucleótido reductasa, dihidrofolato reductasa, cdc2, ADN polimerasa  $\alpha$ , y ADN ligasa (Dalton, 1992; Means *et al.*, 1992), requisitos para la entrada y mantenimiento de la fase S.

Bajo condiciones adversas para la proliferación, por ejemplo cuando hay limitación de nutrientes o existe daño en el ADN, la actividad del complejo ciclina D1/cdk4 es inhibida por la acción de una proteína conocida como p53, a través de la transcripción de productos génicos como el inhibidor específico de complejos ciclina/cdk, la proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Peter and Herzkowitz, 1994). Este inhibidor es miembro de una familia que contiene también a p27<sup>Kip1</sup> (Polyak *et al.*, 1994), p27<sup>Kip2</sup> (Lee *et al.*, 1995) y p27<sup>Xic1</sup> (Su *et al.*, 1995); la forma de actuar de todos ellos parece tener un mecanismo común: los complejos ciclina/cdk actúan como molde induciendo en el inhibidor una reordenación estructural en el extremo N-terminal (altamente conservado en todos los miembros), lo que les permite unirse fuertemente dentro de la interfase ciclina-cdk interfiriendo con el dominio de unión al ATP del complejo ciclina/cdk (Russo *et al.*, 1996). De esta manera, la proteína p53 opera la detención del ciclo celular antes del punto de restricción hasta que las condiciones metabólicas normales son restablecidas. Debido a esta función de revisión de la integridad del ADN, función que no es la única, p53 es conocida como el guardián del genoma (Lane, 1992).

Es interesante la existencia de evidencias que muestran que la actividad de unión al ADN de p53 es activada por fosforilación independiente en uno de los tres sitios de fosforilación del extremo Carboxilo-terminal (por cdk, PKC y CKII); aún más, se han reportado interacciones

fisiológicas entre p53 y la Caseína Cinasa II, MAP cinasas y SAP cinasas (Meek, 1994; Milne *et al.*, 1994).

Una vez que se sobrepasa el punto R, la actividad del complejo ciclina E/cdk2 es esencial para la entrada a la fase S (Knoblich *et al.*, 1994). Esta actividad tiene un pico máximo en la transición G1/S y disminuye rápidamente conforme el ciclo avanza hacia la parte media y final de la fase S (Dulic *et al.*, 1992). La relevancia de la ciclina E para la entrada a la fase S probablemente este relacionada con la formación de un complejo en asociación con pRB y E2F (Lees *et al.*, 1992). Debe recordarse que E2F promueve la transcripción de genes relacionados con la replicación del ADN.

También el control de la replicación en la fase S está altamente regulado; las células eucarióticas han desarrollado estrategias para asegurar tanto la integridad del ADN antes y después de su replicación, como la prevención de la re-replicación del genoma antes de la conclusión de la mitosis.

Complejos ciclina A/cdk o ciclina E/cdk se requieren para la iniciación de la replicación semiconservativa del ADN *in vitro* (Krude *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha detectado citolocalización del complejo ciclina A/cdk2 en los focos activos de replicación, lo que sugiere un papel de este complejo en la replicación del ADN (Cardoso *et al.*, 1992).

De manera similar, se ha demostrado la citolocalización del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) junto a complejos ciclina/cdk en los focos de replicación (Xiong *et al.*, 1992). PCNA es una proteína que se une al ADN en forma circular, sujetando indirectamente a la ADN Polimerasa  $\delta$  al ADN, aumentando su procesividad (Kelman, 1997). En condiciones de daño al ADN, la proteína inhibidora de complejos ciclina/cdk, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, se une fuertemente por su extremo carboxilo a PCNA, bloqueando la interacción de este con proteínas del Replisoma, como la ADN Polimerasa  $\delta$  (Gulbis *et al.*, 1996), inhibiendo directamente la replicación.

### 1.5.1.2 Transición G2/M.

En esta transición se encuentra otro de los puntos de retención del ciclo celular (Hutchison and Glover, 1995). Nuevamente, el papel regulador final está sustentado por un complejo ciclina/cdk. La transición G2/M está universalmente regulada por el complejo ciclina B/p34<sup>cdc2</sup> (originalmente MPF; Nurse, 1990). MPF se acumula durante las fases S y G2 en el citoplasma, pero se mueve al núcleo al comienzo de la profase (Pines and Hunter, 1991), localizándose en la lámina nuclear, en el huso mitótico y otras estructuras. La actividad de MPF se elimina por destrucción de la ciclina al final de la fase M, permitiendo el reingreso de las células a la fase G1.

Durante la fase G2, la actividad del complejo está regulada diferencialmente por fosforilación:

a) Una actividad reguladora positiva (cdk Activating Kinase, CAK) fosforila en residuos de Treonina (Kaldis *et al.*, 1996). La purificación de CAK en mamíferos, estrella de mar y *Xenopus* ha identificado un complejo tetramérico compuesto por una subunidad catalítica, p40MO15/cdk7, una subunidad reguladora, la ciclina H, y un factor de ensamblaje, MAT1. CAK fosforila no sólo a p34<sup>cdc2</sup>, sino a otras cdk's, incluyendo a cdk4 y cdk6:

b) Una actividad reguladora negativa fosforila en residuos Treonina 14 y Tirosina 15 (Norbury *et al.*, 1991). La transición hacia la fase M se logra con la desfosforilación de los residuos Thr 14 y Tyr 15, por medio de la proteína fosfatasa específica cdc25 (Russell and Nurse, 1986).



## 1.6 La Germinación de Semillas como Modelo de Estudio de la Proliferación Celular.

Conforme la semilla se acerca a su madurez fisiológica, el ciclo celular se detiene, y permanece en una especie de latencia hasta la entrada de agua a la semilla y el restablecimiento de las condiciones metabólicas apropiadas para su reinicio. Este reinicio de la proliferación celular se presenta únicamente en las zonas meristemáticas del embrión, y constituye un evento tardío que ocurre normalmente después del crecimiento por elongación celular y la protrusión de la radícula (Baíza *et al.*, 1989). En maíz, la mayor parte de las células se encuentran detenidas en la fase G1 y sólo un pequeño porcentaje lo hacen en G2 (Deltour and Jacquard, 1974). Una vez que la semilla es embebida, las células que se encontraban en G2 avanzarán hacia la fase M, pero aquellas poblaciones mayoritarias que se encontraban en G1 tendrán que sujetarse a una serie de controles y revisiones del estado metabólico y molecular antes de proceder hacia la etapa tardía de G1.

A nivel fisiológico se sabe que ciertas semillas embebidas pueden ser deshidratadas, conservando la viabilidad si no se ha dado la protrusión de la radícula (crecimiento por elongación celular), pero son incapaces de hacerlo si el proceso de desecación se efectúa después de la protrusión (Bray *et al.*, 1995) El estudio del fenómeno indica claramente la existencia durante el proceso germinativo de un punto después del cual la semilla en germinación no puede ser deshidratada, lo cual asemeja los procesos moleculares de control del ciclo celular. La similitud del control a niveles molecular y fisiológico sugeriría que en las zonas meristemáticas el ciclo celular no puede ser detenido después del avance sobre el punto de restricción en la transición G1temprano/G1tardío (con excepción del punto de control temporal en la transición G2/M), bajo riesgo de abortar la germinación y conducir a la semilla a la muerte.

La correlación de los efectos a ambos niveles permite a la germinación constituirse en un modelo apropiado para el estudio de la reactivación y el control de la proliferación celular en vegetales. De esta manera, se puede emplear este modelo para investigar los mecanismos que regulan la reactivación del metabolismo desde un estado de semi-latencia hasta uno totalmente restaurado; así como para estudiar en plantas los controles moleculares del ciclo celular, ampliamente descritos en eucariotes superiores e inferiores.

El conocimiento que se tiene del control del ciclo celular en plantas ha sido tradicionalmente restringido a la clonación de proteínas homólogas descritas en otras especies (Francis and Halford, 1995). Estos estudios comprenden, en la mayoría de los casos, la obtención de secuencias de ADNc por medio de PCR, y para algunas de ellas el análisis de la expresión tejido-específica y complementación funcional en levaduras.

Como ejemplo de estos hallazgos se tienen la clonación de genes para ciclinas y cdk's, así como para las proteínas PCNA (López, 1995) y pRB (Xie, 1996). A continuación se mencionarán algunas de ellas.

Se han aislado homólogos de ciclinas en soya y zanahoria (Hata *et al.*, 1991), alfalfa (Hirt *et al.*, 1991), maíz (Renaudin *et al.*, 1994), tabaco (Qin *et al.*, 1995) y Arabidopsis (Soni *et al.*, 1995). Estas ciclinas han sido agrupadas en tipos A, B y  $\delta$ , de acuerdo a su similitud en secuencia con las respectivas ciclinas de mamíferos.

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales y PCR, se han aislado análogos de cdk's en chícharo (Feiler and Jacobs, 1990), Arabidopsis (Ferreira *et al.*, 1991), maíz (Colasanti *et al.*, 1991), alfalfa (Hirt *et al.*, 1991), Petunia (Bergounioux *et al.*, 1992) y soya (Miao, 1993).

La detección en plantas de secuencias similares a productos del ciclo celular eucariótico contrasta con los pocos esfuerzos por encontrar actividades metabólicas y fisiológicas de estos productos. Como uno de los pocos ejemplos puede mencionarse el trabajo de Herrera-Teigeiro,

quien encontró mediante estudios de citolocalización que una putativa proteína p34<sup>cdc2</sup> de maíz se trasloca al núcleo durante la germinación de maíz, donde es activada; fenómeno acelerado por inducción hormonal (Herrera-Teigeiro, datos no publicados).

## 1.7 Antecedentes inmediatos.

A diferencia del conocimiento acumulado a niveles fisiológico y bioquímico, el mecanismo molecular por el cual las citocininas modifican el metabolismo es aún desconocido. Aunque los primeros efectos de las citocininas en tejidos vegetales, promoviendo la citocinesis, fueron descubiertos hace cerca de 4 décadas, otorgándoseles la categoría de hormonas vegetales (Skoog and Miller, 1957), poco progreso se ha logrado al tratar de encontrar receptores o sistemas de transducción de señales que pudieran servir de mediadores de la respuesta celular a estas hormonas, por lo cual la hipótesis de un comportamiento hormonal típico "hormona→receptor→efectores→respuesta" no ha podido ser demostrado.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que las citocininas promueven una serie de efectos sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y el ciclo celular. Las citocininas incrementan la síntesis replicativa y reparativa del ADN en todo el período, promueven un aumento en la actividad de ADN polimerasa y cambios cuantitativos en la población de ARN mensajeros traducibles alrededor de las 6 horas de germinación. Sin embargo, la estimulación de la síntesis de ADN por citocininas es abolida si se añade  $\alpha$ -amanitina o cicloheximida junto con la hormona sintética (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). De esta manera, existe la posibilidad de que la respuesta celular a la hormona sea mediada no solamente por cambios en procesos de activación

transcripcional sino también por alteración de actividades a niveles traduccional o post-traduccional.

Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares por los cuales las citocininas afectan el comportamiento de eventos metabólicos durante la germinación de maíz, decidimos abordar el proyecto mediante dos estrategias convergentes:

**a) Un enfoque a nivel transcripcional:**

Con el cual realizamos la búsqueda de cambios en la expresión génica, mediada por citocininas, mediante sondeo de bibliotecas de ADNc y ensayos de "despliegue diferencial de ARNs".

El esquema experimental en esta parte consistió en la detección de mensajes expresados diferencialmente, la corroboración de su expresión diferencial por medio de Northern blot y su secuenciación. Mediante esta estrategia, los segmentos clonados de ADNc tienen necesariamente que identificarse para poder asignarles un papel regulador, si lo hay, en el proceso.

**b) Un enfoque a niveles transcripcional y traduccional:**

Mediante los cuales estudiamos la posibilidad de que las citocininas promuevan los efectos metabólicos observados a través de la modificación en la síntesis de ARN mensajeros o de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular y/o en la transcripción de genes relacionados con la síntesis de ADN.

Para realizar este estudio, utilizamos como marcadores del ciclo celular el ADNc del gen de una ciclina de maíz, denominada ZmCycII, que con base a su secuencia ha sido clasificada como tipo A; el ADNc (clona AA9) de un gene de maíz que se expresa en tejidos proliferativos; y anticuerpos heterólogos dirigidos contra proteínas importantes en la regulación del Ciclo Celular eucariótico,

pero cuya existencia en plantas no se ha demostrado fehacientemente; los anticuerpos utilizados están dirigidos contra las siguientes proteínas de humano:

1. El supresor génico **p53**, proteína conocida como el guardián del genoma, y cuya actividad se relaciona con el monitoreo de la integridad del ADN y la detención del ciclo en la fase  $G1$ ;
2. La **ciclina D1**, relacionada con el licenciamiento para el avance del ciclo celular en el punto de restricción  $G1_{\text{temprano}} \rightarrow R \rightarrow G1_{\text{tardío}}$ ;
3. El factor de transcripción **E2F-1**, cuya actividad como factor transcripcional posibilita la expresión de genes involucrados en la síntesis del ADN y, como consecuencia, del paso de  $G1_{\text{tardío}}$  a la fase  $S$ ;
4. La **ciclina B**, que forma parte del complejo MPF, llave central en el control del paso de la fase  $G2$  a la fase  $M$  del ciclo.

La estrategia experimental en esta parte consistió en la identificación en maíz de análogos de estas proteínas por medio de ensayos de Western blot, y posteriormente el análisis de su concentración a lo largo de las primeras 24 horas de germinación tanto en condiciones normales como en presencia de citocininas.

## **HIPÓTESIS**

Debido a que ciertos efectos bioquímicos de citocininas sobre el metabolismo del ADN durante la germinación de semillas de maíz pueden ser revertidos con la adición conjunta de inhibidores de la transcripción y la traducción, existe la posibilidad de que las citocininas promuevan estos efectos modificando la síntesis de ARN y/o de proteínas.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Investigar a niveles transcripcional y traduccional, los mecanismos moleculares involucrados en el establecimiento y conclusión exitosa de la germinación de semillas de maíz.

### ESPECÍFICOS.

- I. Detectar cambios en las poblaciones de ARN mensajeros transcritos durante la germinación normal y acelerada de ejes embrionarios de maíz.
  - a) Caracterizar los mensajes detectados:
    - Analizar por Northern blot la expresión a diferentes períodos de germinación.
    - Secuenciar el(os) correspondiente(s) ADNc(s) y comparar con secuencias reportadas.
  - b) Analizar los efectos del aceleramiento sobre la expresión de los ARN mensajeros correspondientes a la proteína ciclina ZmCycII de maíz y la clona AA9 de maíz.
- II. Investigar los efectos de la inducción hormonal sobre la síntesis de los siguientes marcadores del ciclo celular: el supresor génico p53, el factor transcripcional E2F-1, la ciclina D1 y la ciclina B.

## **CAPÍTULO II      Efectos de citocininas a nivel transcripcional.**



## **2.1 Materiales y Métodos**

El material y los métodos utilizados en este Capítulo se describen en el artículo que se presenta a continuación y en resultados adicionales.

## **2.2 Resultados**

Los resultados de este capítulo comprenden el estudio de los efectos de citocininas sobre la expresión génica, utilizando como sistemas detectores el sondeo de una biblioteca de ADNc de 15 horas de germinación con citocininas y el desarrollo de la técnica de RNA Differential Display a 15 y a 5 horas. La caracterización de los productos detectados consistió en el análisis del comportamiento de los respectivos transcritos por medio de Northern blot, la verificación por Southern blot de la existencia en el genoma de secuencias complementarias a los ADNc y la secuenciación de ADNc clonados.

## **2.3 Artículo 1: "Does Benzyladenine Stimulate DNA metabolism by Modifying Gene Expression During Maize Germination?"**

## Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination?

José Juan Zúñiga-Aguilar, Imelda López, Alberto Gómez and Jorge M. Vázquez-Ramos\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Avenida Universidad y Copilco, México 04510, D.F., México

### Abstract

**Benzyladenine, a synthetic cytokinin, stimulates DNA metabolism during maize germination; apparently such stimulation occurs in two phases, and during the first phase stimulations of DNA synthesis, of protein kinase activity (both  $\alpha$ -amanitin repressible), of DNA polymerase and poly ADP-ribosyl polymerase activities are observed. Since the evidence suggested that the effects produced by BA were due, at least partially, to transcriptional activation, attempts were made to discover genes, by subtractive hybridization of a cDNA library or by differential display, whose expression depended on the presence of BA; however these were unsuccessful. BA modulated the expression of a limited number of genes only. The possible mechanism by which BA could be promoting DNA metabolism during maize germination is discussed.**

**Keywords:** maize, seed germination, benzyladenine, DNA metabolism

### Introduction

How plant cells perceive hormones and how these molecules regulate or modify metabolism are active research topics about which information is still fragmentary. For cytokinins, these two concepts lag far behind as compared with what is known for abscisic acid, gibberellins and auxins. Cytokinins stimulate protein synthesis, RNA synthesis and DNA synthesis (Zwar, 1973; Naito *et al.*, 1978; Galli, 1984); delay senescence (Fletcher, 1969; Yokoyama *et al.*, 1981) and promote chloroplast biogenesis (Seyer and Lescure,

1984). The expressions of the genes codifying for nitrate reductase, Rubisco and LHCPa/b binding protein (Longo *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1990; Ohya and Suzuki, 1991) are also cytokinin promoted events.

Cytokinins have additionally been reported as stimulators of seed germination (Van Staden, 1983). Benzyladenine (BA), a synthetic cytokinin, stimulates DNA metabolism during maize germination by stimulating DNA synthesis, probably of both repair and replicative types (Zaraín *et al.*, 1987; Reyes-Jiménez *et al.*, 1991) and DNA polymerase activity (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990), and promotes the advancement of the cell cycle (Reyes-Jiménez *et al.*, 1991). The biochemical response of cells to BA is very fast, and is clearly visible within the first 3–6 h of germination.

Despite the knowledge accumulated at the physiological and biochemical levels, the mechanism by which cytokinins modify metabolism is not known. Although the first effects of cytokinins on plant tissues, promoting cytokinesis, were discovered almost 4 decades ago (Skoog and Miller, 1957), little progress has been made as to the existence of receptors or molecules that could serve as mediators of the cellular response to this hormone.

Previous results in our laboratory indicated that the reported stimulation of DNA synthesis by BA during maize germination was abolished if  $\alpha$ -amanitin or cycloheximide were added together with the synthetic cytokinin (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). Thus, a possibility existed that the quick response of cells to BA was mediated not only by enzymic activation but by changes in gene expression. We have extended our studies on BA-stimulation of DNA synthesis by following the effect of this hormone on enzymatic activities that could potentially modify DNA metabolism, such as protein kinases and polyADP-ribosyl polymerase; we also report here on our attempts to find out whether there is differential BA-promoted gene expression during maize germination.

\*Correspondence

## Material and methods

### Plant material

Maize (*Zea mays*, cv. Chalqueño) embryo axes were hand dissected, disinfected with 0.5% NaClO and incubated at 25°C between two wetted, sterile discs of Whatman No. 1 paper for different time periods.

### Benzyladenine stimulation of DNA synthesis

Sterile imbibition buffer containing 50 mM Tris HCl pH 7.6, 2% sucrose, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µg/ml chloramphenicol and 10 µCi/ml (methyl-<sup>3</sup>H)-thymidine (70–90 Ci/mmol, New England Nuclear). Benzyladenine (10<sup>-6</sup> M) (SIGMA Co.) was added to the imbibition buffer in 3-h pulses during 0–3 and 3–6 h of germination. At the end of each pulse, embryo axes were washed with imbibition buffer and incubation continued till 24 h. As controls, embryo axes were imbibed with/without BA for the whole period. DNA synthesis was measured as incorporation of (methyl-<sup>3</sup>H)-thymidine into TCA-insoluble material.

### Determination of protein

Protein concentration was determined using the method described by Bradford (1976) with bovine serum albumin as standard.

### Protein kinase activity

Embryo axes were incubated in imbibition buffer with/without BA as already described, for the indicated time periods. An µ-<sup>32</sup>P pulse (50 µCi/ml) was given during the last 3 h of imbibition (0–3 or 3–6 h); embryo axes were thoroughly washed with the same buffer and were then homogenized in a buffer containing 70 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 mM EDTA, 15 mM β-mercaptoethanol, 50 µg/ml leupeptin and 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>. The homogenate was centrifuged once at 5000 × g for 10 min and twice at 100000 × g for 2 h. The resulting supernatant was treated with 10% protamine (to precipitate nucleic acids), centrifuged and aliquots of the new supernatant were TCA-precipitated to determine α-<sup>32</sup>P incorporation into protein. Application of α-amanitin (13 µM) to maize embryos was as reported by Vázquez-Ramos *et al.* (1990).

### Poly ADP-ribosyl polymerase activity (According to Grey and Bryant, 1984)

Embryo axes were imbibed for different time periods and then nuclei were isolated as reported by Cheah and Osborne (1978); briefly, axes were homogenized in a buffer containing 15 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM sucrose, 10 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM β-mer-

captoethanol and 0.5 mM spermidine. The homogenate was filtered through 3 layers of Miracloth, centrifuged at 800 × g for 15 min and the pellet used as the source of nuclei; nuclei were suspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA and 20 µCi/ml (<sup>3</sup>H-ade)-NAD (20 Ci/mmol). Incubation was carried out for 30 min at 25°C and then label in the TCA-precipitated material was measured by means of scintillation counting.

### Total-RNA preparation

Total RNA was prepared using Tryzol (GIBCO BRL, Life Technologies) according to Chomczynsky (1993). Briefly, embryo axes were washed at the end of each imbibition period with 1% sodium citrate and homogenized with Tryzol (1.5 ml/100 mg embryo axes); after an imbibition period of 5 min at room temperature, the homogenate was extracted twice with 1/5 volume of chloroform-isoamyl alcohol 49:1 and the resulting aqueous phase was precipitated with isopropanol (1:1). The RNA pellet was washed twice with 70% cold ethanol and dissolved in RNase-free H<sub>2</sub>O. Purity and integrity of total RNA was measured spectrophotometrically and by denaturing agarose gel electrophoresis. The final RNA preparation was treated with 2 U/ml of RNase-free DNase I (Boehringer-Mannheim).

### Poly (A)<sup>+</sup> RNA isolation

Total RNA (1 mg) was dissolved in 3 ml of binding buffer (10 mM Tris HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% LDS), heated for 5 min at 65°C, cooled on ice and loaded onto a 1-ml bed oligo(dT)cellulose column (Boehringer-Mannheim). This column was then washed with ten volumes of binding buffer, and poly(A)<sup>+</sup> RNA was eluted with 1.5 ml of elution buffer (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5% LDS); eluted poly(A)<sup>+</sup> RNA was heated again for 5 min at 65°C and cooled on ice, left for 20 min at room temperature and loaded onto the same column immediately after addition of 90 µl of 5 M NaCl. Chromatography was performed as described above. Finally, poly(A)<sup>+</sup> RNA was precipitated with 90 µl of 5 M NaCl and 3 ml of cold absolute ethanol. Integrity and purity of poly(A)<sup>+</sup> RNA was measured as described for total RNA.

### Construction and screening of a cDNA library

A cDNA library was constructed from maize embryo axes imbibed for 5 h in the presence of BA (10<sup>-6</sup> M). Double-stranded cDNA was synthesized from poly(A)<sup>+</sup> RNA using a cDNA synthesis kit (GIBCO BRL). An Eco RI linker was added to the resulting cDNA, and this was then ligated to λgt11 vector arms

(GIBCO BRL) and packaged *in vitro* using a commercial kit (Lambda Packaging System, GIBCO BRL). 200000 clones from the cDNA library ( $3.5 \times 10^7$  ufp) were screened with subtracted cDNA probes made from poly(A)<sup>+</sup> RNAs coming from maize embryo axes incubated with BA: single strand cDNA probes from BA-treated axes were synthesized using the cDNA synthesis kit in the presence of 1 mCi of ( $\alpha^{32}$ P)-dCTP (3000 Ci/mmol) and these were subtracted with poly(A)<sup>+</sup> RNA from buffer-imbibed embryo axes as follows: 1  $\mu$ g of radiolabelled single strand cDNA was mixed with 10  $\mu$ g of poly(A)<sup>+</sup> RNA, the mix was then ethanol-precipitated and the pellet redissolved in 6  $\mu$ l of RNase-free H<sub>2</sub>O, 0.5 M sodium phosphate pH 6.8, 6.25 mM EDTA pH 8.0, and 0.25% SDS to a total volume of 8  $\mu$ l. This mixture was poured into a sealed siliconized 20- $\mu$ l glass capillary tube, boiled in a water bath for 5 min and allowed to stand at 65°C for 48 h to allow nucleic acids to hybridize. The hybridization mixture was transferred to SS buffer (0.12 M sodium phosphate pH 6.8 and 0.1% SDS) and single and double strands were separated by chromatography on hydroxyapatite at 60°C as described in Sambrook *et al.* (1989).

#### Northern blot analysis

Total RNA (up to 60  $\mu$ g) was heat-denatured, subjected to electrophoresis on agarose gels with 2.2 M formaldehyde at 50 V for 4–5 h, and transferred to nylon membranes. The blots were UV-crosslinked, pre-hybridized at 65°C in 250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.8, 1 mM EDTA, 7% SDS, 1% albumin and hybridized to random primer-labelled cDNA probes. After hybridization, the blots were washed twice at 65°C for 15 minutes with washing solution containing 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, and exposed to X-O-Mat film at –70°C.

#### mRNA differential display

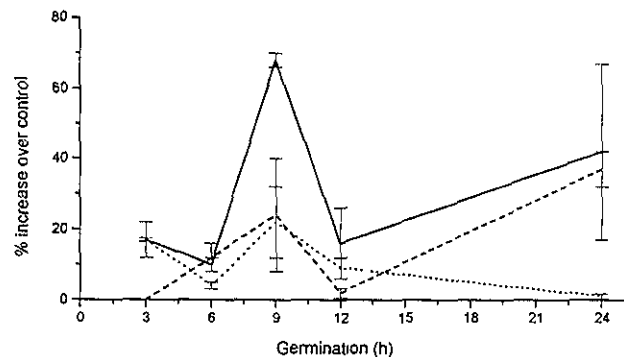
The mRNA differential display technique was followed according to Liang and Pardee (1992), using commercial primers obtained from Operon Technologies, Alameda, California. Single strand cDNA was synthesized from 400 ng of DNase I-treated total RNA using different anchor primers: 1 mM of either oligo-dT<sub>17</sub>GC, oligo-dT<sub>17</sub>GA or oligo-dT<sub>17</sub>CA. PCR amplification to produce double strand cDNA was made in the presence of ( $\alpha^{35}$ S)dATP with a second 10-mer with arbitrary sequence: 200 nM of 5'-CTGGGCAACT-3' (OPM-06) or 5'-GACCTACCAC-3' (OPM-15) as follows: 94°C, 30 sec → 40°C, 2 min → 72°C, 30 sec for 40 cycles → 72°C, 10 min → 4°C in a Perkin Elmer 480 Thermal Cycler. 7  $\mu$ l of samples plus 4  $\mu$ l of loading buffer were heated at 80°C and immediately loaded onto a 6% DNA sequencing gel, for elec-

trophoresis at 60 W constant power until the xylene-cianol dye was near the bottom. The gel was dried under vacuum at 80°C and exposed to BioMax film at –70°C for 48 h.

## Results

Benzyladenine promotes DNA synthesis and the advancement of the cell cycle during maize germination (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990; Reyes-Jiménez *et al.*, 1991). In these experiments BA was present all the time. We wanted to know whether there was a critical time at which BA should exert its stimulatory action. For this, maize embryo axes were imbibed and BA was added for the periods 0–3 or 3–6 h into germination and then axes were washed to remove the phytohormone. As controls, axes were incubated either with or without BA for the whole imbibition period. Figure 1 shows that the 0–3 h BA-pulse produced an initial stimulation of DNA synthesis mainly in the 6–9 h imbibition period and then the stimulatory effect declined to equal control levels by 24 h. DNA synthesis in axes that received the BA-pulse in the 3–6 h period also showed the 9-h stimulation peak, followed by a decline of stimulation by 12 h, to rise again up to 24 h, a similar behaviour to that shown by axes that were imbibed continuously with BA, behaviour that had been reported before (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990); however, in the latter the magnitude of stimulation at 9 h is 2-fold higher than that shown by axes receiving only the BA pulses (0–3 or 3–6 h).

Evidence has accumulated indicating that DNA synthesis taking place during the early hours of seed germination is, at least partially, of repair-type (Osborne *et al.*, 1984; Elder and Osborne, 1993); in mammal cells,



**Figure 1.** Effect of BA pulses on stimulation of DNA synthesis during maize germination. Maize embryo axes received a 3-h pulse of BA ( $10^{-6}$  M) during the periods 0–3 h (.....) or 3–6 h (---) into germination, or BA was present all the time (—). DNA synthesis was followed as indicated in Materials and methods. Results are reported as % over control axes that received no BA. Bars = S.D. (n = 5).

**Table 1.** BA- stimulation of protein kinase and polyADP-ribosyl polymerase activities during early germination

Imbibition time (h)	$\alpha$ -amanitin	Protein Kinases (cpm/ $\mu$ g protein)		PolyADP-ribosyl polymerase (cpm/ $\mu$ g protein)	
		- BA	+ BA	- BA	+ BA
3	-	10.67 $\pm$ 0.53†	14.64 $\pm$ 2.7 (37%)*	3.16 $\pm$ 0.8	7.14 $\pm$ 1-3 (139%)
3	+	4.60 $\pm$ 1.6	6.29 $\pm$ 2.8	—	—
6	-	10.73 $\pm$ 0.86	19.53 $\pm$ 2.1 (82%)*	6.56 $\pm$ 0.6	7.68 $\pm$ 1.6 (17%)
6	+	5.04 $\pm$ 1.8	8.78 $\pm$ 3.1	—	—

† S. D. n = 3 independent experiments

\* Numbers in brackets indicate % of stimulation over control sample

this type of DNA synthesis can be regulated by enzyme modification due to the action of poly ADP-ribosyl polymerases (PARP, Satoh and Lindahl, 1992). BA stimulates a repair-type synthesis during the early hours of maize germination (Zaraín *et al.*, 1987); we studied the effect of BA on PARP activity during these early hours and found a stimulation of 137% at 3 h and of only 17% at 6 h (Table 1), coinciding with the times of maximal stimulation of DNA repair synthesis by BA (Zaraín *et al.*, 1987).

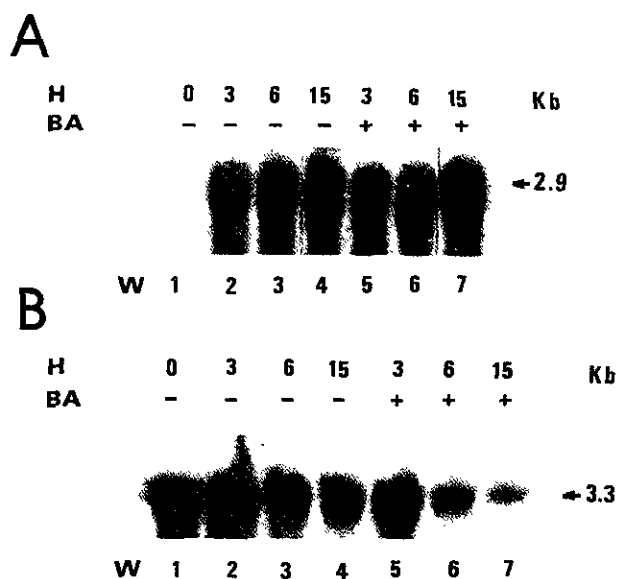
Besides the stimulatory effect on DNA synthesis, stimulation of DNA polymerase activity is also a BA-mediated effect during maize germination; this stimulation is perhaps an indirect effect since polymerase specific activity is not reduced if embryo axes are incubated in the presence of either  $\alpha$ -amanitin or cycloheximide (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). Our recent results have shown that the amount of the major DNA polymerase activity (a replicative-type enzyme) does not change during germination; however, the enzyme is cyclically phosphorylated (Coello and Vázquez-Ramos, 1995). We studied whether protein kinase activity could be modified by BA during early germination. The results showed that protein kinase activity in BA-treated axes was 37% and 82% higher than control levels at 3 and 6 h of germination, respectively (Table 1). Interestingly, stimulation of kinase activity by BA was totally inhibited by  $\alpha$ -amanitin. Table 1 shows that this inhibitor reduced kinase activity below 50% at 3 and 6 h of germination in both BA-treated and untreated axes; this inhibitory behaviour is very similar to inhibition of DNA synthesis by  $\alpha$ -amanitin in axes imbibed with/without BA (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990).

One question arising is at what level is BA stimulating enzymatic activities and promoting the cell cycle during maize germination? The effect produced by the RNA synthesis inhibitor ( $\alpha$ -amanitin) reported above suggested that BA was promoting, among other things, the expression of genes

whose products, directly or indirectly, participated in DNA synthesis. For this purpose, a cDNA library from embryo axes imbibed for 5 h in the presence of BA was constructed. This time was chosen because it is the time at which a clear stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase, kinase and ribosyl polymerase activities is observed (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990; Reyes-Jiménez *et al.*, 1991). By screening this cDNA library against cDNA resulting from subtraction of BA-induced cDNAs with mRNAs from non BA-treated axes, we should be able to detect BA-induced genes.

After several attempts to obtain BA-induced genes, we were unable clearly to identify a single clone: of the several clones that were isolated as positives after 3 independent screenings, none was found to correspond to a *de novo* BA-induced gene; clones 9 and 13 were the only cases (out of 13 clones from a first screening) in which BA influenced gene expression. Figure 2 shows a Northern analysis indicating how these genes responded to BA during maize germination. The message for clone 13 was present in dry seeds and its amount increased as germination advanced (6 and 15 h); this increase was higher when axes were imbibed in the presence of BA. On the contrary, the message for clone 9 decreased in response to BA as germination advanced (6 and 15 h). The expression of the genes corresponding to the remaining isolated clones was not modified by BA during germination.

Another, very powerful technique to investigate whether there is a change in gene expression promoted by cytokinins is 'differential display' (Liang and Pardee, 1992). This methodology relies on the amplification by PCR of subpopulations of mRNAs. For this, an oligomer of 9-11 dT + 2 more nucleotides in any combination (i.e. G-C, G-A, C-G, etc.) are used at the 3' end to produce cDNAs; the second oligomer is any one of a series of 11-mers (of random sequence) that will 'select' a subpopulation of the synthesized cDNAs and then, by using this pair of oligomers, a certain pro-



**Figure 2.** Expression of BA-modulated genes. cDNAs from clones 13 (A) and 9 (B) were used as probes for Northern blot analysis to follow variations in gene expression of the corresponding genes; total RNA was extracted from maize embryo axes imbibed in the presence or absence of BA ( $10^{-6}$  M). H = time in hours. Lanes 1–7, treatments: lane W, no RNA.

portion of the original mRNAs will be amplified by PCR. It is expected that any qualitative difference in the population of mRNAs due to selective gene expression could be identified in this way.

We have used several combinations of 11-mers and oligo dT + 2N oligomers searching for BA-induced messages. Figure 3 (A, B and C) shows some of the results obtained, which indicate that most changes observed (if not all) are the increase or decrease in message intensity (see arrows): bands labelled with the numbers 1 and 2 indicate mRNAs whose concentration either increases or decreases, respectively, during germination, independently of the effect of BA; bands with numbers 3 and 4 are messages whose amount either increases or decreases, respectively, as a result of the presence of BA. However, no clear-cut *de novo* appearance (or disappearance in any case) of messages was found. Some of these bands have been isolated and will be studied further.

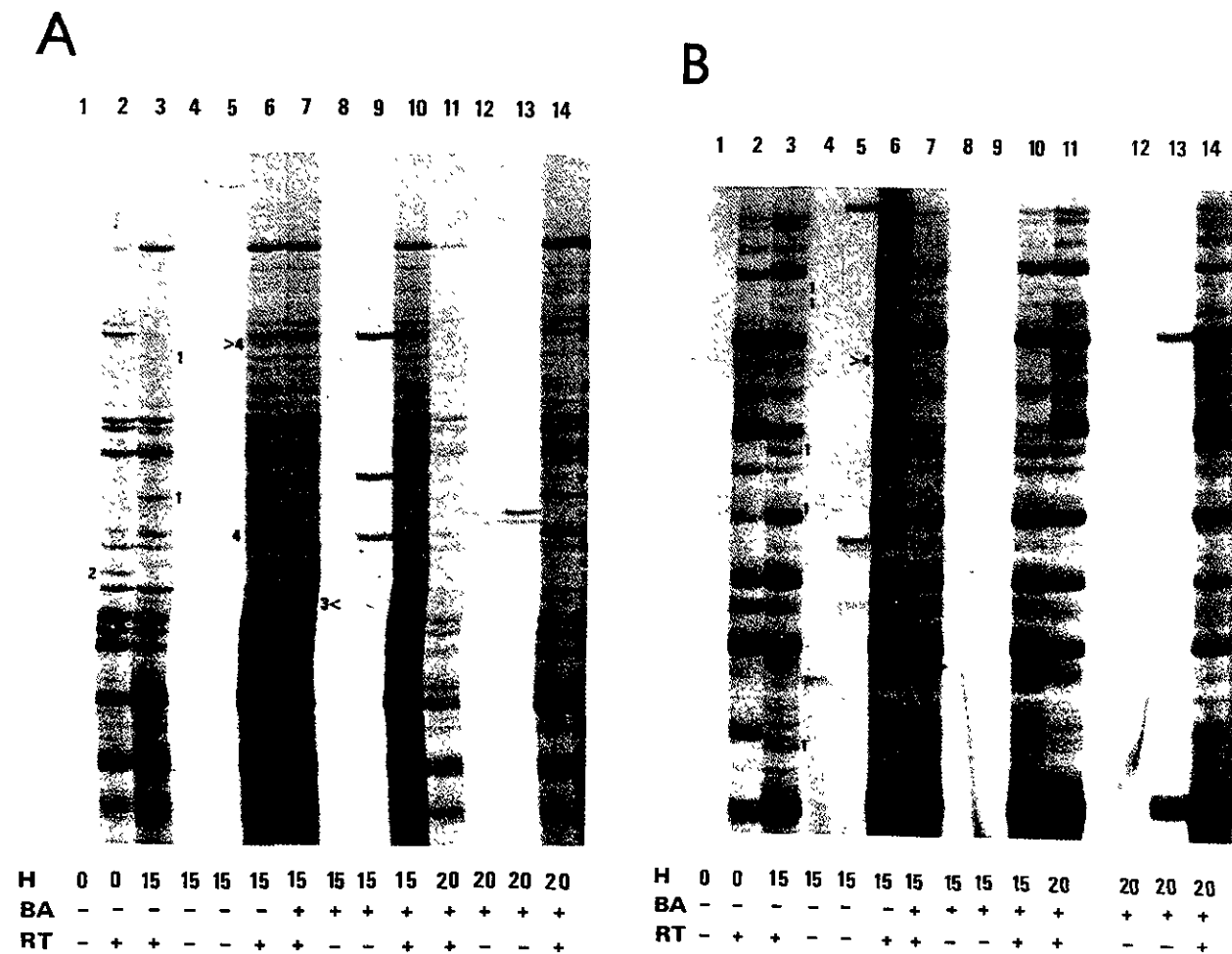
## Discussion

The synthetic cytokinin benzyladenine promotes DNA metabolism during maize germination, stimulating DNA synthesis, probably of both the repair (Zarain *et al.*, 1987) and replicative types (Reyes-Jiménez *et al.*, 1991); it also stimulates DNA polymerase activity (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990) and the

advancement of the cell cycle (Reyes-Jiménez *et al.*, 1991). Potential DNA metabolism-modifying enzymatic activities are also importantly stimulated such as those of protein kinase and poly ADP-ribosyl polymerase (PARP) (Table 1). Phosphorylation cascades control, among many other metabolic pathways, the cell cycle in all eukaryotes so far studied (Murray and Kirschner, 1989); PARP has been found to regulate DNA repair (Satoh and Lindahl, 1992). In this context, it is interesting to observe that the BA-promoted increase in PARP activity occurs at times when DNA repair takes place during seed germination (Osborne, 1983; Meléndez and Vázquez-Ramos, 1990), which repair is also BA-stimulated in maize (Zaraín *et al.*, 1987).

Activation of DNA metabolism by BA is an early event during seed germination; during the first 6 h of imbibition all the activities mentioned before are considerably enhanced. We had previously shown that the imbibition of BA-treated axes together with  $\alpha$ -amanitin or cycloheximide not only eliminated stimulation of DNA synthesis but that this was lower than that shown by control axes in the absence of BA; nonetheless, DNA polymerase activity in inhibitor-imbibed axes (with/without BA) was at least at the same level as that in control axes (no BA, no inhibitor; Vázquez-Ramos and Reyes, 1990). Therefore, this stimulation of DNA synthesis appeared to be due to the production of a BA-induced protein (and probably its message too) that participated in DNA metabolism. A protein kinase could be the BA target as shown in Table 1:  $\alpha$ -amanitin totally inhibits BA-promoted kinase activation and, as already indicated, it also inhibits BA-promoted DNA synthesis. This suggestion is further strengthened by our finding that the major DNA polymerase in germinating maize is a phosphoprotein whose phosphorylation status changes as germination advances (Coello and Vázquez-Ramos, 1995). It remains to be determined whether phosphorylation of this DNA polymerase is BA-modified.

These results led us to believe that BA was exerting its effect, at least partially, at the level of transcription. However, the results presented here indicate that if there exists *de novo* promotion of gene expression by BA during early germination, such expression must consist of messages that are scarcely represented in the mRNA population. Indeed, several independent attempts to select for these messages by screening cDNA libraries with subtracted cDNAs, or fractionating the RNA population by differential display did not show the appearance of a single 'all or nothing' BA-responsive gene. The best we could get after all our efforts was messages whose amount either increased or decreased. It should be stressed here that the experimental time covered was 0–20 h of germination; this is pertinent since some BA-responsive genes have been reported in the past; examples are the genes for nitrate reductase, Rubisco and LHCP a/b binding protein



**Figure 3.** Differential display of RNA from maize embryo axes imbibed with/without BA. Embryo axes were imbibed for 0, 15 and 24 h in the presence/absence of BA. Total RNA was isolated from each sample and used to produce the corresponding cDNAs with the following combination of anchor and random decamer primers: A, oligo-dT<sub>11</sub>CC and 5'-CTGGGCAACT-3'; B, oligo-dT<sub>11</sub>GA and 5'-GACCTACCAC-3'; C, oligo-dT<sub>11</sub>CA and 5'-GACCTACCAC-3'. Numbers along the lanes indicate: 1, cDNAs that increase independently of BA treatment; 2, cDNAs that decrease independently of BA treatment; 3, cDNAs that increase due to the BA treatment; 4, cDNAs that decrease due to the BA treatment. Arrow heads indicate cDNAs that were cut from the gel and will be sequenced. As controls, the same samples were treated without *Taq* DNA polymerase (RT-). H = time in hours; BA = benzyladenine.

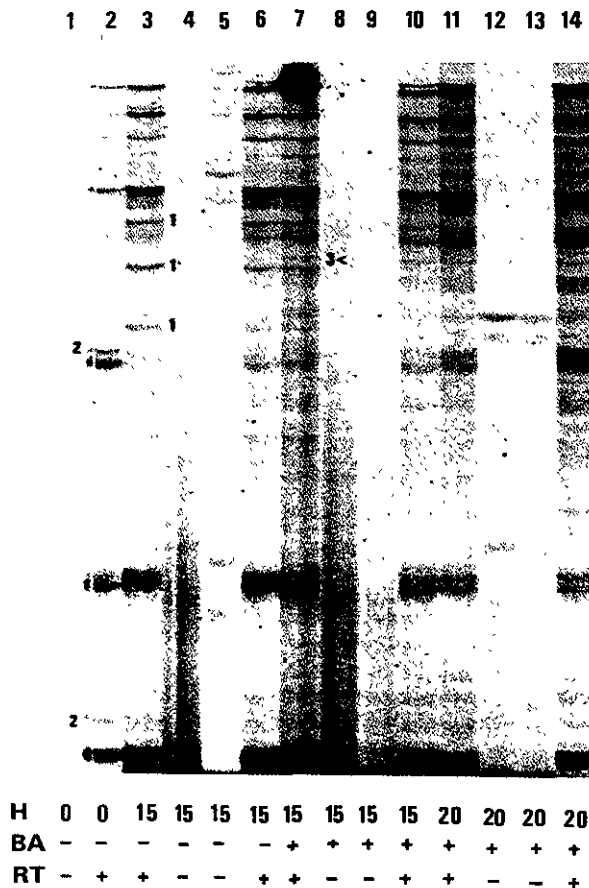
(Longo *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1990; Ohya and Suzuki, 1991). However, these were found when tissues were incubated in the presence of BA for long periods, of 40 h or longer. None of the gene products described have any connection with the promotion of DNA metabolism, or the cell cycle, events that are highly stimulated by BA during maize germination.

We can detect two phases of the stimulation of DNA synthesis by BA during maize germination (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990), and only one of them if BA is added exclusively during the first 3 h of imbibition. We could speculate that an initial fast response of cells to BA is at the level of signal transduction, in which

general metabolic stimulation prepares cells to proliferate (activation of metabolism, DNA repair, enzyme and protein phosphorylation). If there is any specific BA-promoted gene expression during early seed germination, as indicated by the  $\alpha$ -amanitin inhibition of BA-stimulated activities, the resulting messages should code for tightly regulated control proteins that will be difficult to identify with our experimental procedures.

With longer exposure of axes to BA the initial signal transduction stimulation may give way to an increase in gene expression, perhaps of genes whose products function in late events and are different from those required for seed germination, such as products for

C



chloroplast biosynthesis (Seyer and Lescure, 1984), nitrate metabolism (Lu *et al.*, 1990) and others; such gene expression might only be indirectly BA-promoted. A similar conclusion was reached recently by Binns (1994). We are currently cloning the most representative cDNAs coming from the differential display experiments to find out what they code for. Also, we are studying the expression of cell cycle and signal transduction genes during maize germination and its possible modification by BA.

#### Acknowledgements

Funding for this work was provided by DGAPA IN-202291 and CONACYT 3013N-9306.

#### References

- Binns, A.N. (1994) Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 173-196.
- Bradford, M. (1976) A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-252.
- Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978) DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature* **272**, 593-599.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-536.
- Coello, P. and Vázquez-Ramos, J.M. (1995) Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *European Journal of Biochemistry* **231**(1), 99-103.
- Elder R.H. and Osborne, D.J. (1993) Function of DNA synthesis and DNA repair in the survival of embryos during early germination and in dormancy. *Seed Science Research* **3**, 43-53.
- Fletcher, R.A. (1969) Retardation of leaf senescence by BA in intact bean plants. *Planta* **89**, 1-8.
- Galli, M.G. (1984) Synthesis of DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and BA. *Planta* **160**, 193-199.
- Grey, J.E. and Bryant, J.A. (1984) Changes in the activity of Poly(Adenosine Diphosphate-ribose) polymerase during germination of pea. *Phytochemistry* **23**, 477-478.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- Longo, G.P.M., Bracale, M., Rossi, G. and Longo, C.P. (1990) BA induces the appearance of LHCP-mRNA and of the relevant protein in dark-grown excised watermelon cotyledons. *Plant Molecular Biology* **14**, 569-573.
- Lu, J.L., Ertl, J.R. and Chen, C.M. (1990) Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *Plant Molecular Biology* **14**, 585-594.
- Meléndez, S. and Vázquez-Ramos, J.M. (1990) Estudios sobre la naturaleza y localización de la síntesis de ADN durante las etapas iniciales de la germinación de maíz. *Revista de la Sociedad Química de México* **34**, 354-359.
- Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1989) Dominos and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* **246**, 614-621.
- Naito, K., Tsuji, H. and Hatekeyama, I. (1978) Effect of BA on DNA, RNA, protein, and chlorophyll contents in intact bean leaves: differential responses to BA according to leaf age. *Physiologia Plantarum* **43**, 367-371.
- Osborne, D.J. (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Canadian Journal of Botany* **61**, 3568-3577.
- Osborne, D.J., Dell'Aquila, A. and Elder, R.H. (1984) DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. *Folia Biologica (Praha)* **30**, 155-169.
- Ohya, T. and Suzuki, H. (1991) The effects of BA on the accumulation of messenger RNAs that encode the large and small subunits of RubisCO and LHCPa/b protein in excised cucumber cotyledons. *Plant and Cell Physiology* **32**, 577-580.



- Reyes-Jiménez, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A. and Vázquez-Ramos, J.M. (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Research* **1**, 113–117.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Satoh, M.S. and Lindahl, T. (1992) Role of Poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **356**, 356–358.
- Seyer, P. and Lescure, A.M. (1984) Evidence for changes in plastid mRNA populations during cytokinin induced chloroplast differentiation in tobacco cell suspensions. *Plant Science Letters* **36**, 59–66.
- Skoog, F. and Miller, D.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposium of the Society of Experimental Biology* **11**, 118–131.
- Van Staden, J. (1983) Seeds and cytokinins. *Physiologia Plantarum* **55**, 60–72.
- Vázquez-Ramos, J.M. and Reyes, J. (1990) Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity during early germination of maize embryo axes. *Canadian Journal of Botany* **45**, 649–653.
- Yokoyama, M., Naito, K. and Suzuki, H. (1981) BA-enhanced cell proliferation and suppressed greening in attached young bean leaves. *Plant and Cell Physiology* **22**, 623–627.
- Zaraín, H.M., Bernal-Lugo, I. and Vázquez-Ramos, J.M. (1987) Effect of benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutation Research* **181**, 103–110.
- Zwar, J.A. (1973) Effects of cytokinins on the nucleic acids of tobacco pith. *Journal of Experimental Botany* **24**, 701–710.

Received 15 June 1995, accepted 28th July 1995

© CAB INTERNATIONAL, 1995

## **2 .4      Resultados adicionales.**

## 2.4.1 Introducción.

Para la realización de la técnica del "Differential Display" (DD, Liang and Pardee, 1992), se utilizó un protocolo comercial (RNAmapping™, GenHunter Co., Brookline, MA) con diferentes combinaciones de cebadores (Operon Technologies, Inc., San Diego, CA). La comparación de las poblaciones de ARN mensajeros se hizo a partir de ejes embrionarios embebidos por 15 horas en agua o con citocininas (descrito en el artículo 1). Los resultados obtenidos muestran muy pocas diferencias entre los transcritos correspondientes a las poblaciones control y las inducidas. Al igual que los resultados del sondeo de bibliotecas de ADNc, las diferencias detectadas entre ambas poblaciones consistieron únicamente en el incremento o disminución en la cantidad de los mensajes afectados.

Debido a que nuevamente no pudieron detectarse genes cuya expresión alterada del todo o nada por efecto del fitorregulador, se siguieron las siguientes estrategias experimentales:

a) Se realizaron modificaciones al protocolo de DD, con el fin de mejorar la definición de las bandas en el gel y de esa manera incrementar las posibilidades de detectar mensajes "inducibles".

Las innovaciones introducidas fueron dos fundamentalmente:

a.i La modificación del protocolo de marcaje radiactivo y del tiempo de germinación en el que se analizaron las poblaciones de mensajeros. Los ensayos iniciales se realizaron incorporando [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP durante la reacción de PCR, con lo cual quedan marcados todos los segmentos de ADN que están siendo amplificados. La modificación consistió en marcar el cebador de anclaje oligo-dT<sub>11</sub>MN con [ $\gamma^{32}$ ]-ATP mediante la ADN Polinucleótido Kinasa del fago T4 (GIBCO-BRL, Gaithersburgh, MD); con esta modificación se espera que se marquen solamente los segmentos de ADN que provengan de un ARN mensajero, evitando de esa manera la detección de segmentos

que se amplifiquen por hibridación del decámero cebador universal (5'-GACCTACCAC-3') en diferentes segmentos de un mismo ADNc o con ADN genómico contaminante.

a.ii La determinación del período de germinación idóneo para detectar diferencias en la expresión génica. Inicialmente, este período se escogió tomando como base los resultados del sondeo de las bibliotecas de ADNc, puesto que con estos ensayos las mayores diferencias en la expresión de los genes detectados se observaron precisamente a las 15 horas (descrito en el artículo 1). Sin embargo, el análisis de los efectos de citocininas sobre la síntesis de ADN durante la germinación muestra que es en el período comprendido entre las 3 y las 6 horas cuando estas fitohormonas inducen un incremento en este proceso, que se mantiene hasta las 24 horas (que fue el último tiempo estudiado) aún cuando el fitorregulador ya no este presente en el medio. La otra modificación consistió por tanto en realizar el análisis DD con mensajeros de 4 horas de germinación en lugar de emplear mensajeros de 15 horas como se había hecho anteriormente.

b. Por otro lado se estudiaron los efectos de citocininas sobre la expresión de dos productos homólogos de maíz relacionados con la proliferación celular: el ADNc de la ciclina ZmCycII, una ciclina que tiene similitud en su secuencia con el grupo de ciclinas tipo A (Renaudin *et al.*, 1994), aunque complementa una mutación en levaduras para ciclinas de G1; y el ADNc correspondiente a un transcrito expresado durante la germinación de semillas de maíz, aislado mediante ensayos de DD a partir de semillas osmoacondicionadas (Cruz-García, datos no publicados); este mensaje se expresa preferentemente en tejidos con alta proliferación celular como meristemos apicales y radicales, y durante la germinación de ejes embrionarios, pero no se expresa en hoja ni en tallo.

## 2.4.a Modificaciones al protocolo de "Differential Display"

Los resultados de los ensayos con las innovaciones introducidas mostraron un mayor número de diferencias en cuanto a la inducción de mensajes por citocininas: junto con aquellos mensajes cuya cantidad aumenta o disminuye, se detectaron algunos segmentos de ADNc de diferentes tamaños, que aparentemente aparecen o desaparecen por efecto de la fitohormono, como se muestra en la figura 4.

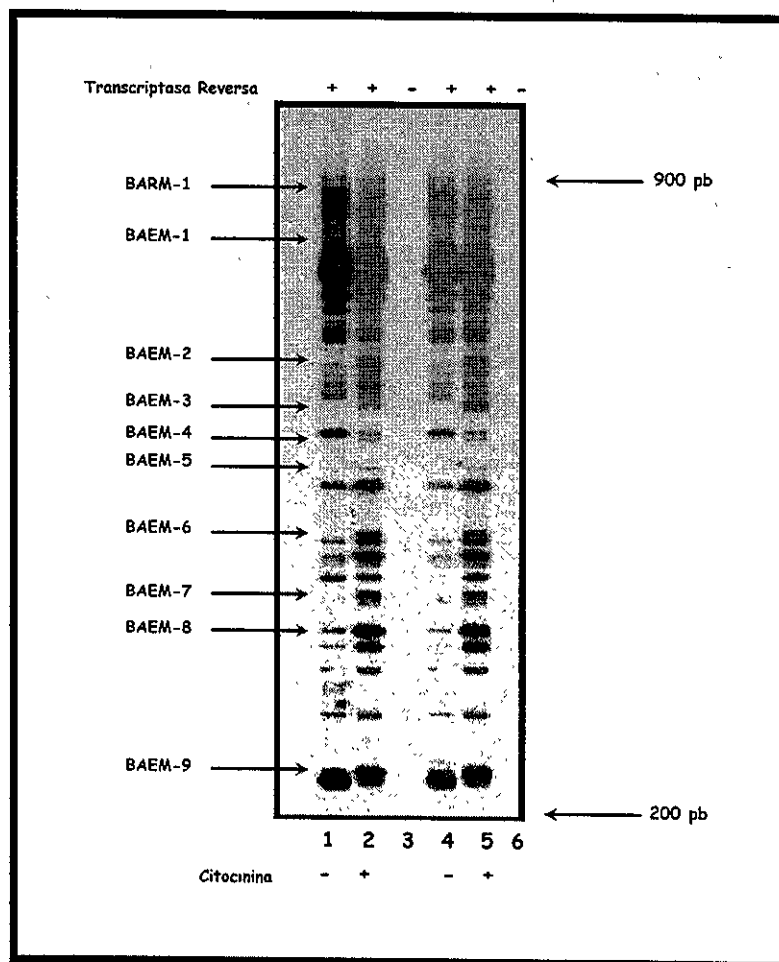


Figura 4. "ARN Differential Display" de transcritos aislados de ejes embrionarios de 5 horas de germinación en presencia de solución control (carriles 1 y 4) o de citocininas (carriles 2 y 5).

La nomenclatura asignada a estos segmentos de ADNc incluyó a los mensajes reprimidos por citocininas (BARM) y a aquellos cuya síntesis aumenta por el efecto hormonal (BAEM). La posterior caracterización de estos segmentos consistió en la corroboración de la estimulación por citocininas de los niveles de los respectivos transcritos mediante ensayos de Northern blot y su secuenciación para comparación en bancos de datos.

Los segmentos marcados en la figura 4 se eluyeron del gel y se reamplificaron. Después de dos rondas de reamplificación por PCR, se obtuvieron bandas del tamaño observado en el gel de secuenciación sólo para algunos de ellos; para las bandas BAEM-6, BAEM-7 y BAEM-8 se obtuvieron barridos (figura 5). Los segmentos reamplificados de BARM-1, BAEM-1, BAEM-2 y BAEM-9 se clonaron en el vector pCR2.1 (Stratagene, La Jöya, CA). La clona con el inserto BARM-1 se denominó entonces pZmR1, la clona con el inserto BAEM-1 se denominó pZmE1 y así sucesivamente. En la figura 6 se muestra como ejemplo un ensayo de restricción de estos plásmidos.

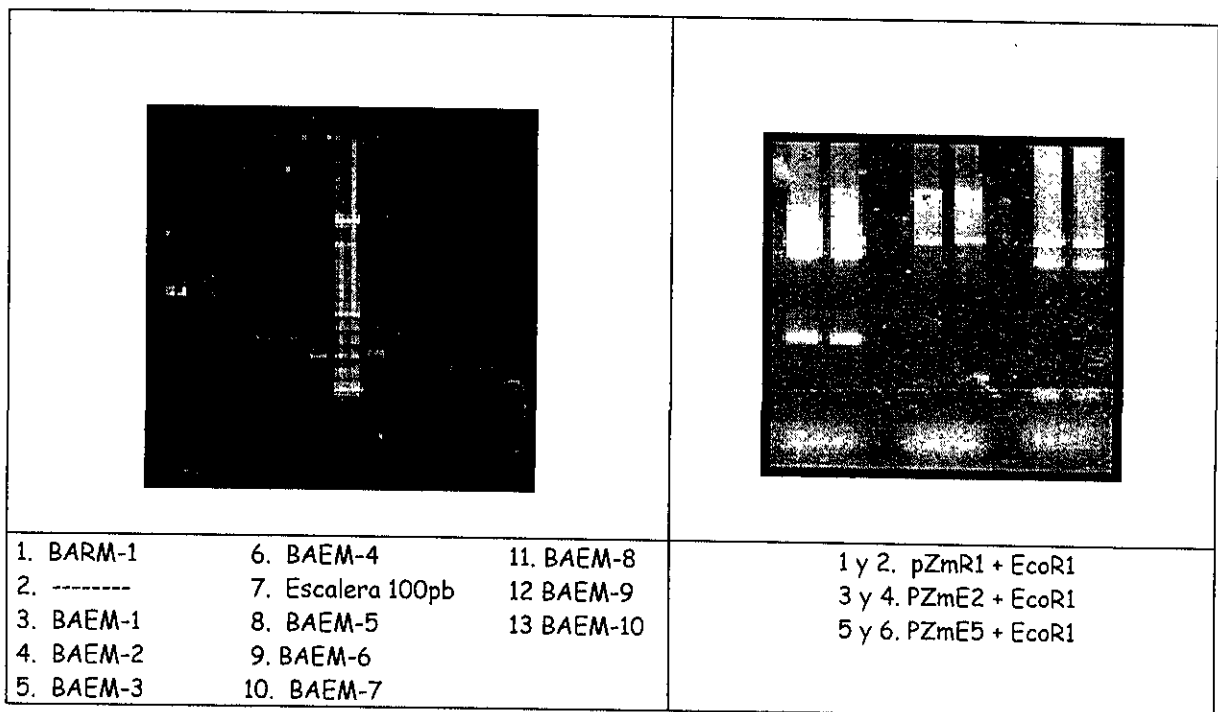


Figura 5. Reamplificación de segmentos de ADNc aislados del gel de DD.

Figura 6. Clonación en pCR2.1 de segmentos de ADNc reamplificados.

## Caracterización de ADNc clonados.

### a) Caracterización de BARM-1.

La clona pZmR1 contiene un inserto de 865 pares de bases, tamaño correspondiente al producto BARM-1 (figura 5). En la secuencia anotada abajo se encuentran sombreados los cebadores que se utilizaron en el DD.

#### Secuencia Nucleotídica:

5' - GAATTCGGCTT-**GACCTACCAC**

GAGAAGATGT	CAGAGACGCA	TTCATATGTT	TGACTGCAA	TTCGCTTGCA
GAGCTTCCTG	CTGGCAGTGT	TATTGGAAGT	GCTTCTCTGC	GGAGACAATC
TCAGATTCTC	TACAGATATC	CATCACTGAA	AGTAGTTAAC	TTCAGAGGAA
ATGTTCAAGC	ACGGTAAAGG	AAACTCAAGG	AGGGAGATGT	CTCTGCTACA
TTGTTGGCAC	TGGCTGGATT	AAGGAGGCTA	AATATGGCAG	AAAATGCAAC
TGCTGTACTA	TCAGTGGAAG	AAATGCTTCC	AGCAGTTGCC	CAAGGTGCTA
TTGGAATACC	TTGCCGAAGC	AATGATGACA	AAATGATGGA	GTATCTATCA
GCGTTGAACC	ATGAAGATAC	CACATTAGCT	GTTGCATGTG	AAAGAGAATT
TTGGCAGTTC	TTGATGGTAA	CTGCCGAACT	CCAATTGCAG	CCTATGCTTA
CCGTGACAAT	GATGGGAATT	GCTCATTCCG	CGGTCTATTG	TCTTCCCAG
ATGGATCTAA	AGTATTTGAG	ACAACGAGAA	GTGGACCGTA	CTCTTTTGAC
GACATGGTTG	AGATGGGCAA	AGATGCTGGT	CATGAACTGA	AGGCAAAGGC
TGGGCCTGGA	TTCTTTGATA	GCTCGCAATG	AAAAGAATGA	GCGGCCATGA
GCAATTTCAA	TTGTCACTCT	TTTGGGTAGA	AACAGAGGGC	CCAAGTAGAG
TGTGGAGAGG	TTTGTTTTGG	TTTCTTCTTT	CTCCTGCTAA	TTCTGCTAAA
GAAGGGTGTA	CCTGGTGTAG	TGGTGAGCCG	AGTCATCAGG	TCGCGGGTTC
GAAGCATCCA	GTCTCCGTAT	TTGCCGGAGA	AGTTTGTCTC	GG-----

-----**TCAAAAAAAAAAAA**-AAGCCGAATTC - 3'

**Comparación de la secuencia nucleotídica.** La comparación de esta secuencia se hizo en el banco EMBL con el programa "Fasta3 Database Searches", encontrando similitud con los siguientes productos génicos: (<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>).

The best scores are:		length	% identity
ATTS4335 5' end;	Similar to <u>hydroxymethylb</u>	( 409)	67.98
PSHEMCA X73418	<i>P.sativum</i> <u>hemCA</u> mRNA	(1856)	70.89
ATHEMC X73535	<i>A.thaliana</i> gene for <u>hemC</u>	(3602)	73.42
ATHEM X73839	<i>A.thaliana</i> gene for <u>hemC</u>	(3422)	73.42
SCHEM3PDG Z11745	<i>S.cerevisiae</i> <u>hem3</u>	(2051)	54.30
CVHEMACD 12/92M96364	<i>Chlorobium vibrioform</i> <u>hemACD</u>	(3041)	55
CJHEMA 11/95D28503	<i>Clostridium josui</i> <u>hemA</u> ,	(5979)	40
MM63724 W59637	Soares mouse emb	( 456)	60
MM1160838 Aa244934	Soares mouse	( 601)	60
ECHEMC X04242	<i>E. coli</i> gene <u>hemC</u>	(1957)	42
ECHEMCD	<i>E. coli</i> genes <u>hemC</u> and <u>hemD</u>	(4260)	42
BSHEMAXC 7/96M57676	<i>Bacillus subtilis</i> gene <u>hemA</u>	(6634)	32

En todos estos géneros, los genes referidos (hem A, B, C o 3) codifican la enzima Porfobilinógeno desaminasa (Uroporfirinógeno III cosintasa, hidroximetilbilano sintasa). Esta enzima se encarga de catalizar la reacción de desaminación de 4 porfobilinógenos para producir una molécula de hidroximetilbilano, requerida para la primera ciclización del anillo tetrapirrólico que da lugar al uroporfirinógeno III con ayuda de una cosintasa, durante la síntesis de porfirinas.

**Secuencia deducida de aminoácidos.** La determinación de la secuencia de aminoácidos codificada en este segmento de ADNc se hizo con el programa "ExpASy Translate Tool" (<http://expasy.hcuge.ch/www/dna.html>).



10            20            30            40            50            60  
 DLPREDVRDAFICLTANSLAELPAGSVIGSASLRRQSQILYRYP SLKVVNFRGNVQTRLRKLKÉG  
 70            80            90            100           110           120           130  
 GDVSATLALAGLRRLNMAENATAVLSVEEMLPAVAQGAIGIPCRSND DKMMEYLSALNHEDT  
 140           150           160           170           180           190  
 TLAVACEREFWQFLMVTAELQLQPMLTVTMMGIAHSAVYCLPQMDLKYLRQRREVDRTLL  
 210  
 TTWLRWAKMLVMN~~Stop~~ RQRLGLDSL IARNEKNERPStopAISIVTLLGRNRGPKStopSVERF  
 VFVSSFSCStopFCStopRRVYLVStopWStopAESSGRGF EASSLRICGRSLRSRKKK

### Comparación de la secuencia peptídica deducida en bancos de datos.

La comparación con secuencias peptídicas reportadas se hizo en el Banco SwissProt con el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.genome.ad.jp/SIT/BLAST.html>)

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:			Length	identity
HEM3_ <i>Pisum sativum</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	369	74.64
HEM3_ <i>Arabidopsis thaliana</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	382	70.63
HEM3_ <i>Proteus mirabilis</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	313	50.76
HEM3_ <i>Escherichia coli</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	313	47.1
HEM3_ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	172	47.72
HEM3_ <i>Bacillus subtilis</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	314	34.9
HEM3_ <i>Chlorobium vibrioforme</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	128	36.36
HEM3_ <i>Homo sapiens</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	361	29.4
HEM3_ <i>Sacharomices cerevisiae</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	127	29.0
HEM3_ <i>Mus musculus</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	115	28.6
HEM3_ <i>Campylobacter pylori</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	140	42.1
HEM3_ <i>Clostridium josui</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	120	48.28
HEM3_ <i>Rattus norvegicus</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	110	28.2
HEM3_ <i>Yersinia pestis</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	183	50
HEM3_ <i>Methanococcus j.</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	435	34.68
HEM3_ <i>Euglena grassilis</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	480	36.0
HEM3_ <i>Campylobacter pylori</i>	Porphobilinogen Deaminase	EC 4.3.1.8	151	46.0

A continuación se muestra un esquema donde se compara parte de la secuencia de BARM-1 con algunas secuencias de las especies de la lista anterior, escogidas para demostrar la conservación en la escala evolutiva:

**Organism**

**Match**

	<u>3*</u>	<u>2*</u>	<u>1*</u>	<u>2*</u>	
Maize: 1	DLPREDVRDAFICLTANSLAELPAGSVTGSASLRRQSQTLYRYP <sup>1*</sup> SLKVVNFRGN				54
Pea: 158	NLPREDVRDAFISLSAASLADLPAGSVIGTASLRRKSQILHRYP <sup>2*</sup> SLTVVNF <sup>1*</sup> FRGN				211
Arab: 171	NLPREDVRDAFICLTAATLAE <sup>3*</sup> LPAGSVVGTASLRRKSQILHKYPALHVVNF <sup>2*</sup> FRGN				227
E.coli: 101	REDPRDAFVSN <sup>3*</sup> NYD <sup>2*</sup> SLDALPAGSIVGTSSLRRQCQLAERRPDLIIRSLRGN				149
Chlor: 87	AEAKMATSSLRRMSQLLSLRPDLETMDIRGN				117
Yeast: 122	SLDDLPDGGIVGTSSVRRSAQLKRKYPHLKFESV <sup>2*</sup> RGN				158
Human:133	TLETLP <sup>3*</sup> EKS <sup>2*</sup> VVGTSSLRRAAQLQRKFP <sup>1*</sup> HLEFRSIRGN				169
Mouse:133	TLETLP <sup>3*</sup> EKS <sup>2*</sup> AVGTSSLRRVAQLQRKFPNLEFKSIRGN				169
Rat: 133	TLETLP <sup>3*</sup> EKS <sup>2*</sup> AVGTSSLRRVAQLQRKFP <sup>1*</sup> HLEFKSIRGN				169

	<u>4*</u>	<u>3*</u>	
Maize: 55	VQTRLRKLKEGDVSA-T-LALAGLRRENMAENATAVLSVEEMLPAVAQGAIGI		107
Pea: 212	VQTRLRKLSEG-VVKAT-LALAGLKRLNMTENV <sup>3*</sup> TSTLSIDDMLPAVAQGAIGI		64
Arab: 228	VQTRLSKL QGGkvQATLLALAGLKRLSMTENVASILSLDEMLPAVAQGAIGI		281
E.coli: 150	VGTRLSKL DNGEYDAIILAVAGLKR <sup>3*</sup> L GLESRTAALPPEISLPAVGQGA <sup>4*</sup> VGI		205
Chlor: 118	LNTRFKKFDEGDFDAMMLAYAGVYRLEFSDRI TEILPHETMLPAVGQ <sup>3*</sup> GALGI		
Yeast: 159	IQTRLQKLDD-----LASAGLMRM GLENRITQRFHSDTMYHAVGQ <sup>4*</sup> GALGI		215
Human:170	LNTRLRKLDEQQEFSAIILATAGLQRMGWHNRV <sup>3*</sup> GQILHPEECMYAVGQ <sup>4*</sup> GALGV		224
Mouse:170	LNTRLRKLDELQEFSAIVLAVAGLQRMG <sup>3*</sup> WQNRV <sup>4*</sup> GQILHPEECMYAVGQ <sup>4*</sup> GALAV		224
Rat: 170	LNTRLRKLDEL-----AVAGLQRMG <sup>3*</sup> WQNRV <sup>4*</sup> GQILHPEECMYAVGQ <sup>4*</sup> GALAV		224

	<u>3*</u>	
Maize:108	PCRSNDDK <sup>3*</sup> MMEYLSALNHEDTTLAVACEREF	136
Pea: 265	ACRSNDDKMAEYLA <sup>3*</sup> SLNHEETRLAISCERAF	293
Arab: 282	ACRTDDDKMATYLA <sup>3*</sup> SLNHEETRLAISCERAFLETL	314
E.coli:206	ECRLDDSR <sup>3*</sup> TRELLAALNHHETALRVTAER	232
Chlor: 222	ETRTDDAETREIVRVLNDDNTEMCCRAERALLRHL	204
Scerev:216	EIRKGD <sup>3*</sup> TKMMKILDEICDLNATICCLSERALMRTL	248
Human:225	EVRAKDQDILD <sup>3*</sup> LVGV LHDPETLLRCIAERAFLRHL	257
Mouse:225	EVRAKDQDILD <sup>3*</sup> LVSVLHDPETLLRCIAERAFLRHL	257
Rat: 170	EVRAKDQDILD <sup>3*</sup> LVGV LHDPETLLRCIAERAFLRHL	257

En la secuencia peptídica anterior están numerados con asterisco, dominios que corresponden a sitios de modificación postraducciona que se detallan a continuación. La búsqueda de patrones de modificación se hizo con el programa "BCM Gene Finder".

(<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/gene-finder/gf.html>)

### 1\* cAMP Phosphorylation Site Pattern.

DE cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site: [RK](2)-x-[ST]

Sites found: 1 Expected number: 0.2245 95% confidential interval: 1

# Start End Expected Site sequence

1	34	37	0.2245	R R Q S
---	----	----	--------	---------

### 2\* Protein Kinase C Phosphorylation Site Pattern.

DE Protein kinase C phosphorylation site. [ST]-x-[RK]

Sites found: 2 Expected number: 1.8885 95% confidential interval: 4

# Start End Expected Site sequence

1	32	34	1.8885	S L R
---	----	----	--------	-------

2	45	47	1.8885	S L K
---	----	----	--------	-------

### 3\* Casein Kinase II Phosphorylation Site Pattern

DE Casein kinase II phosphorylation site. [ST]-x(2)-[DE].

Sites found: 3 Expected number: 1.7647 95% confidential interval: 4

# Start End Expected Site sequence

1	18	21	1.7647	S L A E
---	----	----	--------	---------

2	91	94	1.7647	S V E E
---	----	----	--------	---------

3	110	113	1.7647	S N D D
---	-----	-----	--------	---------

## Análisis de transcrito(s) para BARM-1 durante la germinación.

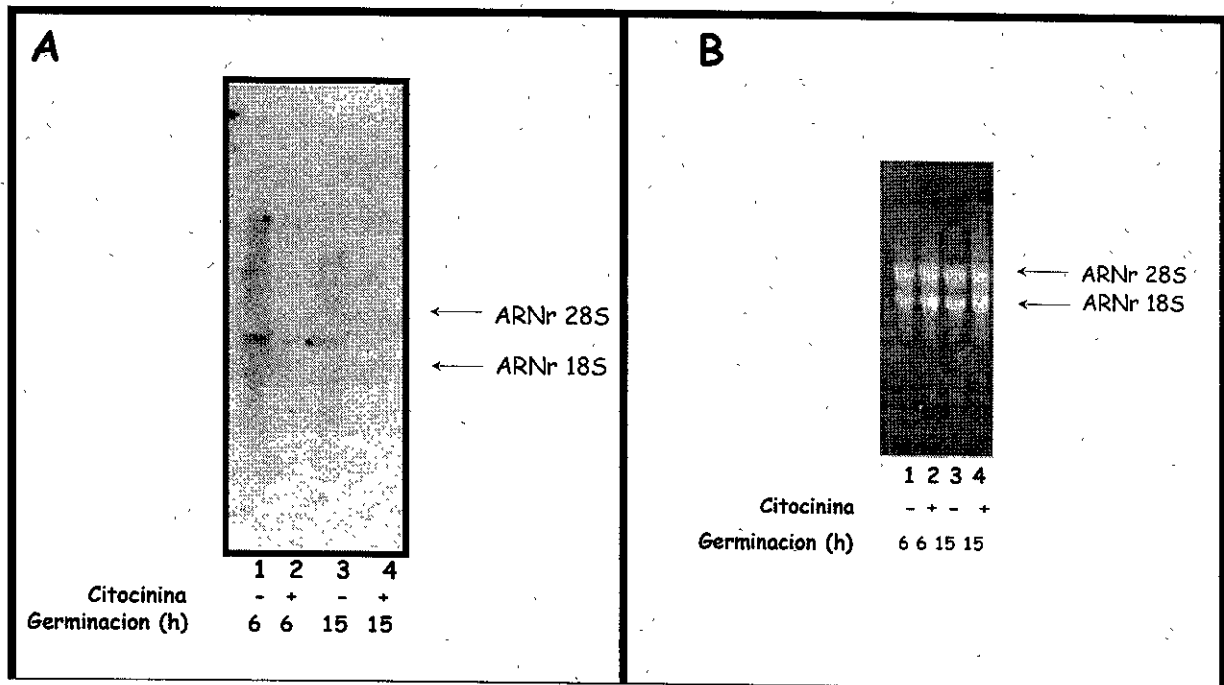


Figura 7. Detección de transcritos para la clona BARM-1 durante la germinación de maíz.  
A = autorradiografía ; B = Bromuro de etidio.

El segmento de ADNc BARM-1 hibrida con un ARN mensajero de aproximadamente 3,000 bases. El transcrito está presente desde las 6 horas de germinación pero disminuye su concentración a las 15 horas. La adición de citocininas acelera la desaparición del mensaje (figura 7) de tal manera que a las 15 horas difícilmente se detecta.

En hoja madura, este gen es inducido por citocininas de manera similar a otros genes del aparato fotosintético; no obstante, en las etapas tardías de la embriogénesis de semillas existe la degradación activa de clorofila y de antocianinas, eventos que constituyen, junto con otros procesos como la síntesis de proteínas de reserva y la tolerancia a la desecación, marcadores de maduración en la embriogénesis (Parcy *et al.*, 1997). De esta manera, no parece extraño que las

citocininas, fitohormonas inductoras del proceso germinativo (Van Staden, 1983), aceleren la degradación de mensajeros asociados con la síntesis de clorofila como parte del mecanismo que elimina eventos residuales de la embriogénesis y orienta el metabolismo hacia el reinicio de la proliferación durante la germinación.

### Análisis de transcrito(s) para BARM-1 en diferentes tejidos de maíz.

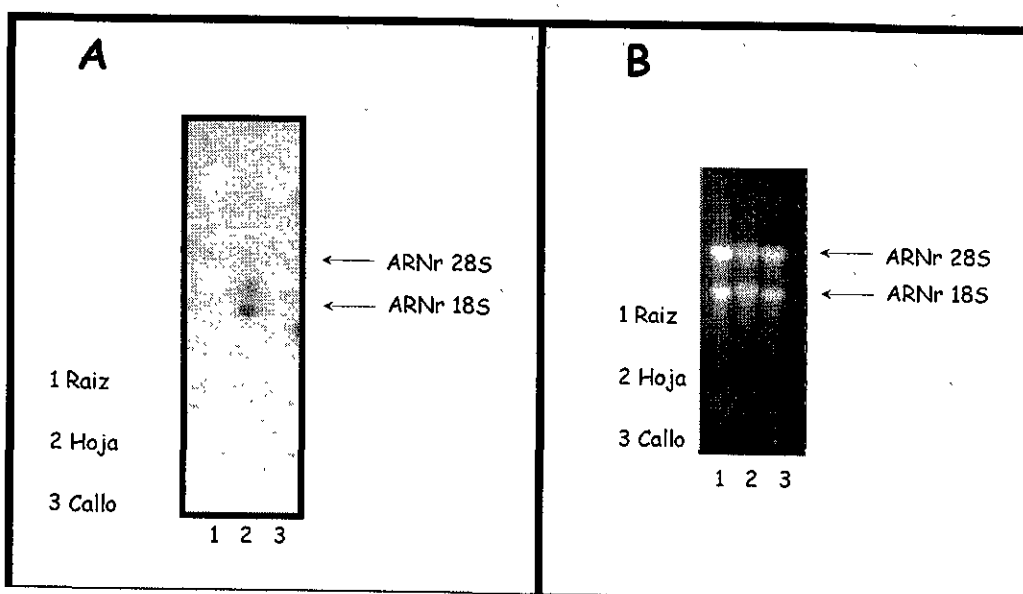


Figura 8. Expresión de BARM-1 en diferentes tejidos.  
A= Autorradiografía; B= Bromuro de etidio.

Para la clona pZmR1 se hizo un estudio de expresión en diferentes tejidos de plántula de cuatro semanas. Como es de esperarse para un producto involucrado en la síntesis de clorofila, en plántula fisiológicamente activa se detecta expresión del correspondiente transcrito en hoja madura, pero difícilmente se observa en raíz y en callo en proliferación (figura 8).

## b) Caracterización de BAEM-2.

La clona pZmE2 contiene el inserto BAEM-1 de 432 pb marcado en la figura 5. En la secuencia se encuentran sombreados los cebadores que se utilizaron en el DD.

### Secuencia Nucleotídica:

```

5' - GAATTCGGCTT GACCTACCAG
TGAAGAACAT  GTATGAACTG  TTGTTGAAGA  GTCTTGTCTT  GAGCGCTAAG
AAAATTGAGG  TCGAGACAAG  ACCCGTCTAG  GAGGATACAT  CAGGCGGCAA
GCTCAAAGAG  GCGTTGCCTG  GCCCCCCTGC  ATAGTGAATC  CAATGGATGC
GATCTTCGGT  GATTTATTTG  AGGAGAAAAG  CAACAAAGTC  GTTAAGACCC
CTGCCAAAGA  AAAATAGGAT  GTTGGTTGTG  CTAGGCTGTG  TGCCTCTCCC
TGTTAGCCAA  GTTGAGCCTT  TGTGATCGCG  GTCTATCTCT  TTCAGTCTTC
TGATCGAGGA  TAAGGAGGGT  GAGTTGAGTT  AGGAGAATGG  ACTATTTGTG
AGTACTTGGT  GATGTAACCA  AATTGTATAT  TGTGTGTTGT  GT-----
GTCGTAGGTC AAGCCGAATC - 3'

```

En esta secuencia no se encontró ningún marco de lectura, pero al compararla al nivel de nucleótidos en diferentes bancos, se encontró similitud significativa (67%) únicamente con un tramo corto del extremo 3' no traducible de un gene de *Lemna gibba*. La comparación en los bancos EMBL/Genbank se hizo con el programa "Fasta3 Database Searches" (<http://www2.ebi.ac.uk/fast3/>).

The best scores are:

			length	% identity
LGNPR1	X64327	<i>Lemna gibba</i> gene <b>npr1</b>	(1573)	66.67

El gen **npr1** pertenece a una familia de genes (npr1-3) de *Lemna gibba* cuyos transcritos se acumulan durante tratamientos de obscuridad probablemente por mediación del fitocromo, y que al nivel de aminoácidos tiene similitud con proteínas abundantes durante la embriogénesis de semillas de trigo, arroz y cebada, cuya concentración es regulada probablemente por el ácido abscísico.

## Análisis de transcrito(s) para BAEM-2 durante la germinación.

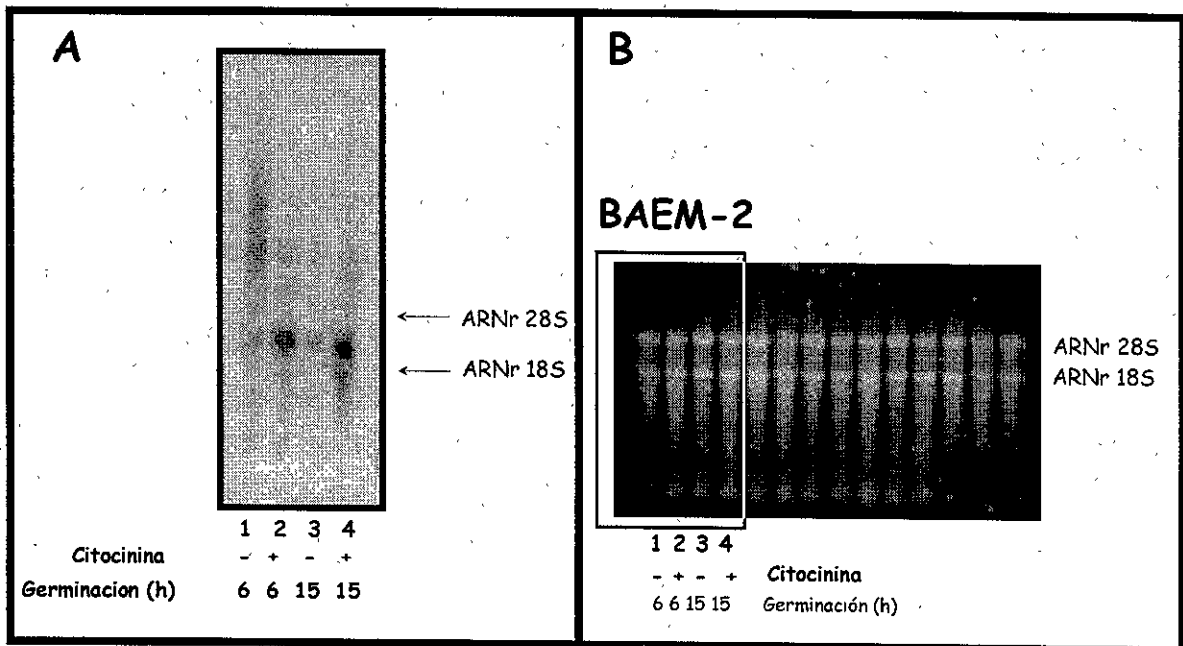


Figura 9. Detección de transcritos para la clona BAEM-2 durante la germinación de maíz.  
A = autorradiografía; B = bromuro de etidio.

El inserto de pZmE2 se cortó con *EcoRI*, y se utilizó como sonda para el ensayo de Northern blot. Puede observarse en la figura 9 que este inserto hibrida con un transcrito de aproximadamente 2,400 bases, cuya concentración no presenta cambios apreciables entre las 6 y las 15 horas, pero en presencia de citocininas se promueve un incremento en la cantidad del transcrito en ambos tiempos. Este comportamiento es interesante debido a que parte de la secuencia nucleotídica de esta clona tiene similitud con el extremo 3' no traducible del gene *npr1* de *Lemna gibba*. En las etapas tardías de germinación, la expresión del gene es reprimida por efecto del fitocromo, probablemente a través de la acción del ácido abscísico. En maíz, durante tiempos tempranos de germinación las citocininas promueven un aumento en la cantidad del mensaje.

### c) Caracterización de BAEM-5.

La clona pZmE5 contiene el inserto BAEM-5 de 314 pares de bases. En la secuencia se encuentran sombreados los cebadores utilizados para el DD:

### Secuencia Nucleotídica:

```

5' - GAATTCGGCTT GACCTACCAC
CATATCCAAA CCTCCATGAA ATGCTTGAAA CCTGCACTTG TACCTAATGC
TTATTGAGAT ATATGAAAAG CTTCTCATT GTAGGTATAG TTCTAGCCAT
GCTCTCTCTG TCTTCCATT AGAATGGCTA GGTTCAAGCT TGGCTCGTCA
ACCCTATCAC AACCTCTTT TACCAGGGCT TGGGATTGTC TATTTTGAAG
ACAACGTAGG TGAAGTTGTG TATTGAATAG CAAATGTAA ATATATCTTA
TCATTGTGAG TCATTGTGAG AATGGAAGAA GAGTTCCTGC C-----
TCAAAAAAAAAAAAA AAGCCGAATTC - 3'

```

**Comparación de la secuencia Nucleotídica.** La comparación de la secuencia se hizo de la misma manera que para BAEM-2:

The best scores are:		length	% identity
EM_BA: MJU67573 U67573	<i>Methanococcus jannasi</i>	(10094)	66.67
EM_PL: AC002534 Ac002534	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(74674)	66.3
EM_PL: NTNTRAE L29272	<i>Nicotiana tabacum</i> ntRab11e	(843)	65.9
EM_BA: VFRAC M19039	<i>Vibrium fischeri</i> regulatory protein	(1684)	64.7
EM_BA: VFLUX Y00509	<i>Vibrium fischeri</i> luxR, I and C	(1866)	64.7

Los genes de *Methanococcus jannasi* y de *Arabidopsis thaliana* corresponden a secuencias genómicas de proyectos de secuenciación de ambos organismos, que están siendo identificadas. El gene ntRab11e de *Nicotiana tabacum* codifica una probable proteína de unión a GTP de la subfamilia de Ras, que está unida a membrana y que podría estar involucrada en transducción de señales. Los genes de *Vibrium fischeri* corresponden a una proteína reguladora (luxR) de un operón que regula una vía luminiscente.



**Secuencia deducida de aminoácidos.** La determinación de la secuencia de aminoácidos codificada en este segmento de ADNc se hizo con el programa "ExpASY Translate Tool" (<http://expasy.hcuge.ch/www/dna.html>). Los seis marcos de lectura potenciales contienen varios codones de terminación, por lo que se hizo una búsqueda con el programa "BCM Gene Finder" (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/gene-finder/gf.html>) para detectar posibles exones dentro de esta secuencia, obteniéndose los siguientes resultados:

# of potential exon: 1  
 from base 57 - to base 215    w = -1.22    ORF = 3 of the first exon  
 Exon- 1 amino acid sequence = 53aa

10                    20                    30                    40                    50  
**MLIEIYEKLLISRYSSSHALSVFPLEWLGSSSLARQPYHNPLLPLGLGICYFEDN**

**Comparación en bancos de datos de la secuencia peptídica codificada en este exón.** La comparación con secuencias reportadas se hizo en el Banco SwissProt con el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.genome.ad.jp/SIT/BLAST.html>)

Match	Identity
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> <span>1*</span> <span>2*</span> <span>2*</span> </div> LLISRYSSSHALSVFPLEWLGSSSLARQPYHNPLLPLGLGYCIY NLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIAH NLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIAH NLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIAH LSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHED LSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHED LSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHED LSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHED SLYDYLQLTTLDTVSCLRIVLSIASGLAHLH LSWPVRLHLALDIARGRLYLHS LSWPVRLHLALDIAQGLRYLHA WSQRVSFAKDIASGMAYLHS WSQRVSFAKDIASGMAYLHS WSQRVSFAKDIASGMAYLHS WQQKVRFAKGIASGMAYLHS EDLCKNPLTMEDLICYSFQVARGMEFLAS TDYLKGNIIITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVPW TDYLKGNIIITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVPW TDYLKGNIIITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVPW	Zea mays BAEM-2 Human TGF-beta Rec. Rat TGF-beta Rec. Mouse TGF-beta Rec. Bovin Activin Rec. II Human Activin Rec. II Mouse Activin Rec. II Sheep Activin Rec. II Bovine Ser/thre Rec. Human Testis Kinase I Rat Testis Kinase I Human Lim Domain Kinase I Mouse Lim Domain Kinase I Rat Lim Domain Kinase I Rat Lim Domain Kinase II Vascular Growth Factor Rec. Human Activin Rec. IIB Mouse Activin Rec. IIB Rat Activin Rec. IIB

En la secuencia peptídica anterior están remarcados dominios que corresponden a los sitios de modificación post-traducciona que se detallan a continuación. Se utilizó el programa "BCM Gene Finder" (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/gene-finder/gf.html>).

### 1\* Microbodies C-terminal targeting signal Pattern.

DE Microbodies C-terminal Site: **[SAGCN]-[RKH]-[LIVMAE]**  
 Sites found: 1 Expected number: 0.4954 95% confidential interval: 2

#	Start	End	Expected	Site	sequence
1	18	20	0.4954		<b>SHA</b>

### 2\* N-myristoylation Site Pattern.

DE N-myristoylation site: **G-[EDRKHPFYW]-x(2)-[STAGCN]-[P]**  
 Sites found: 2 Expected number: 0.4555 95% confidential interval: 2

#	Start	End	Expected	Site	sequence
1	30	35	1.8885		<b>GSSLARS</b>
1	45	50	1.8885		<b>GLCYCI</b>

Como se observa en la página anterior, el péptido codificado en el probable exón tiene similitud con proteínas de especies animales que tiene como característica común el funcionar como receptores celulares con actividad de cinasas de serina/treonina y de tirosina (ver página anterior). Aunque el grado de igualdad se da casi exclusivamente con motivos de miristoilación (que se requiere en estas proteínas para poder unirse a otras) y de etiquetación para su localización en membrana, el hecho de que se parezca más a receptores que a otras de las muchas proteínas que se localizan en membrana puede ser un rasgo significativo. Este hecho puede ser más relevante si se considera que a nivel de nucleótidos este ADNc tiene similitud con una proteína de unión a GTP, tipo Ras, de *Nicotiana tabacum* que podría estar involucrada en procesos de transducción de señales (Haizel *et al.*, 1995).

## Análisis de transcrito(s) para BAEM-5 durante la germinación.

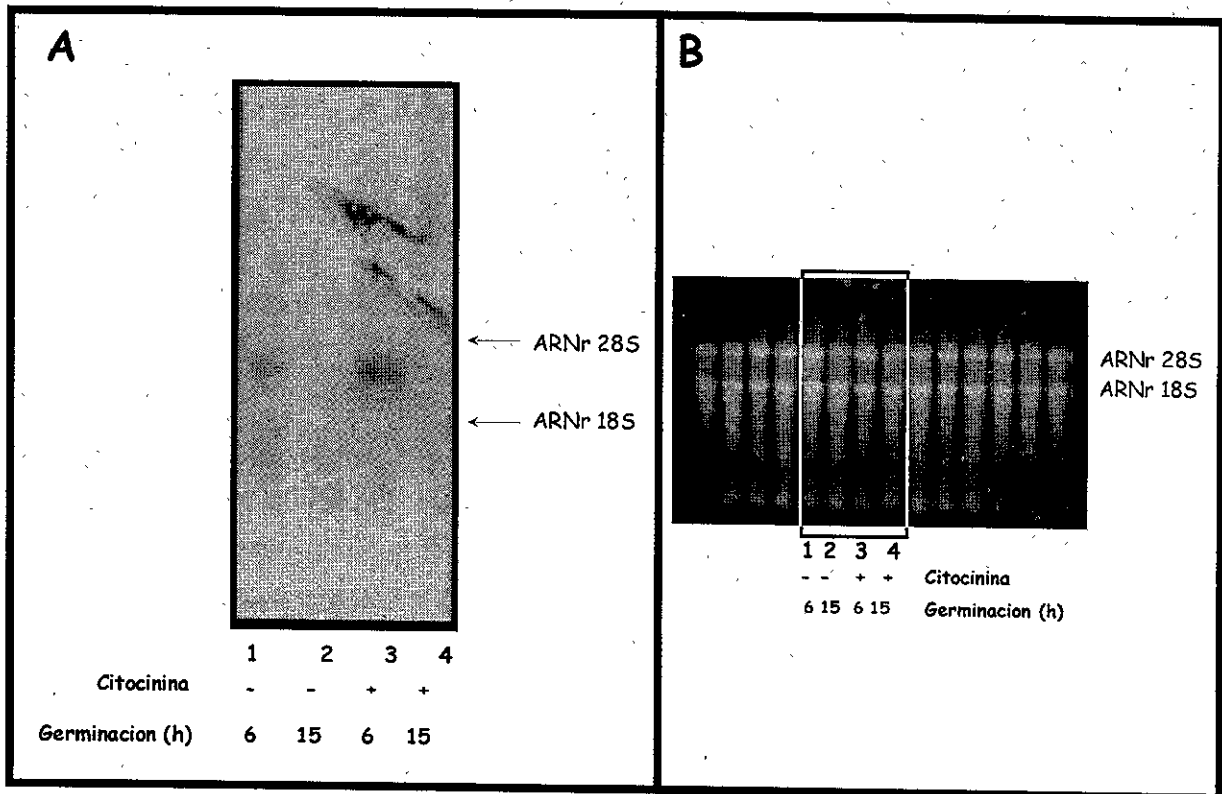


Figura 10. Detección de transcritos para BAEM-5 durante la germinación de maíz.  
**A**= Autorradiografía; **B**= Bromuro de etidio.

El inserto de pZmE5 se cortó con *EcoRI* y se utilizó como sonda para el ensayo de northern blot. Puede observarse en la figura 10 que el inserto hibrida con un transcrito de aproximadamente 2,800 bases, que está presente a las seis horas de germinación pero que no se detecta a las 15. En presencia de citocininas se promueve un aumento en la cantidad del mensaje tanto a las 6 como a las 15 horas (figura 10). Como puede observarse, el tratamiento hormonal no promueve efectos sobre esta clona del todo o nada, pero sí promueve un aumento de su expresión en tiempos tempranos de germinación.

**2 .4.b Efectos de citocininas sobre marcadores moleculares del ciclo celular en maíz.**

## Introducción

Los sondeos diferenciales de bibliotecas de ADNc y los ensayos de RNA Differential Display se realizaron con la intención de detectar genes expresados específicamente durante la germinación de maíz, e identificarlos para conocer su función por analogía con genes anteriormente descritos en la literatura. Una desventaja de esta aproximación consiste en que los presuntos genes pueden tener poca o ninguna similitud con secuencias descritas, o que su expresión sea extremadamente baja o restringida a un período de tiempo tan corto que su detección resulte demasiado complicada.

Otra estrategia experimental para investigar mecanismos moleculares que regulen estos procesos consiste en analizar la expresión de genes específicos, con una función conocida, la cual se sospecha involucrada en la regulación del fenómeno en estudio. De esta manera, puede monitorearse la expresión de estos genes, utilizándolos como marcadores moleculares bajo estimulación externa o condiciones experimentales previamente definidas. Debido a que en el presente proyecto se propone que la terminación exitosa de la germinación requiere de la conclusión de la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas del embrión, se siguió esta segunda estrategia para analizar la expresión de dos ADNc relacionados con procesos de proliferación celular en células de maíz. Uno de los ADNc corresponde a una ciclina de maíz denominada **ZmCycII** (Renaudin *et al.*, 1994), y el otro ADNc corresponde a un producto de 700 pb denominado **AA9**, clonado en el vector pCR2.1 y aislado mediante ensayos de DD de semillas osmoacondicionadas de maíz (Cruz-García, resultados no publicados). Este último transcrito se expresa preferentemente en tejidos con alta proliferación celular como meristemas apicales y radiculares, y durante la germinación de maíz.

En esta parte del proyecto se analizó la expresión de ambos transcritos durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, normal o acelerada con citocininas.

## Expresión de ZmCycII durante la germinación de maíz.

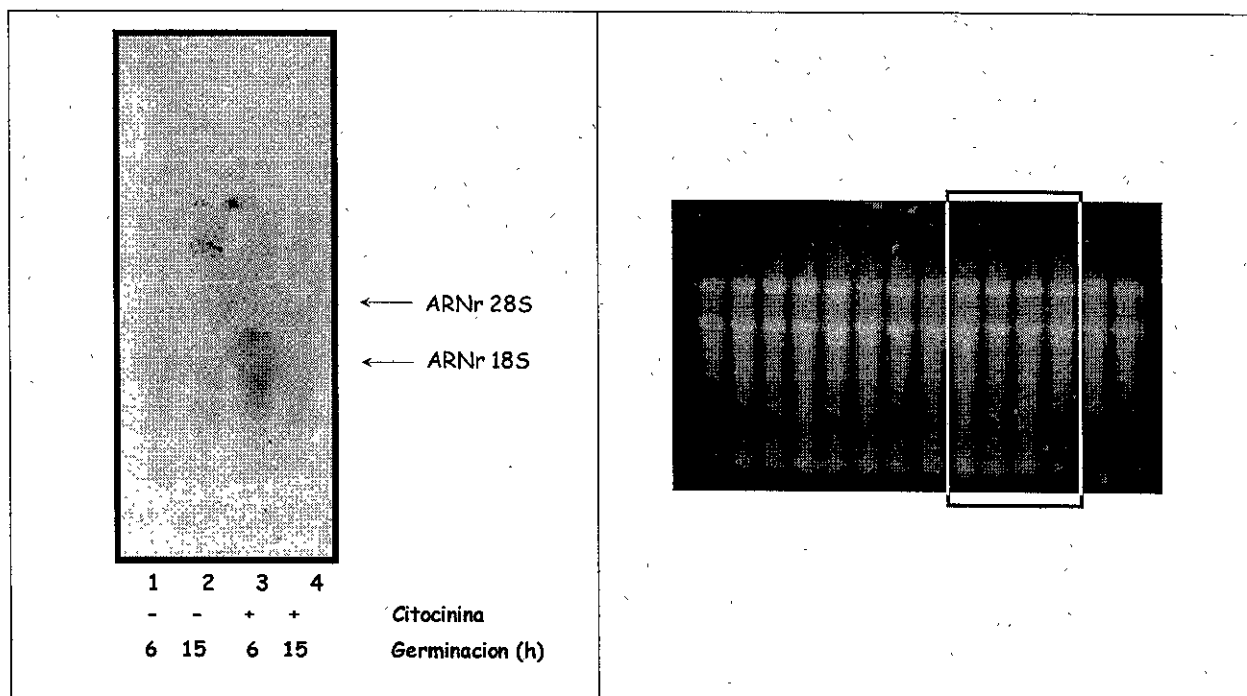


Figura 11. Efecto de citocininas sobre la expresión de la ciclina ZmCycII durante la germinación temprana de maíz. Carriles 1 y 2, solución control; carriles 3 y 4, solución de benciladenina  $10^{-6}M$ .

La clona ZmCycII de maíz es un ADNc de 1,900 bases que fue donada amablemente por el Dr. Sundarezan Verkatesan de Cold Spring Harbor Laboratory. Este ADNc se utilizó como sonda para detectar los niveles del correspondiente transcrito durante la germinación de maíz. Como puede observarse en la figura 11, la concentración del transcrito de aproximadamente 1,900 pares de bases es baja y no parece variar apreciablemente en los tiempos de germinación estudiados. La adición de citocininas promueve un aumento importante sobretodo a las 6 horas de germinación.

## Expresión de AA9 durante la germinación de maíz.

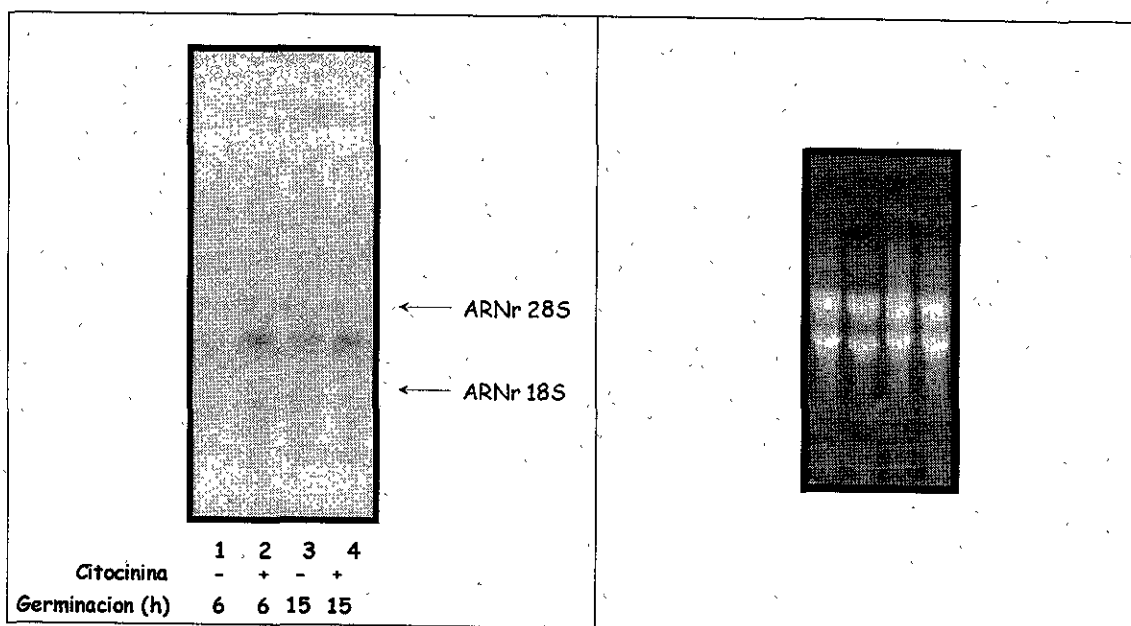


Figura 12. Efecto de citocininas sobre la expresión de la clona AA9 durante la germinación temprana de maíz. Carriles 1 y 3, solución control; carriles 2 y 4, solución de benciladenina  $10^{-6}M$ .

La clona AA9 de maíz es un ADNc de 700pb que fue donada amablemente por el Dr. Felipe Cruz García. Este ADNc se utilizó como sonda para detectar los niveles del correspondiente transcrito durante la germinación de maíz. Como puede observarse en la figura 12, el transcrito de cerca de 3,000 bases apenas se detecta a las 6 horas de germinación pero su concentración aumenta para las 15 horas. En presencia de citocininas existe un aumento considerable del transcrito en la etapa inicial, pero a las 15 horas el tratamiento hormonal produce un incremento más discreto.

Este transcrito ha sido caracterizado por el Dr. Cruz García. Él encontró que esta clona se expresa en tejidos de maíz con alta proliferación celular (datos no publicados). En el presente modelo de aceleración de la germinación con citocininas, el correspondiente gene parece inducirse en tiempos más tempranos por el tratamiento hormonal.

### **Capítulo III Efectos de citocininas sobre proteínas del ciclo celular.**



### **3.1 Materiales y Métodos**

El material y los métodos utilizados en este Capítulo se describen en el artículo que se presenta a continuación.

### **3.2 Resultados**

Los resultados del presente Capítulo comprenden, en principio, la detección en maíz de proteínas homólogas a las siguientes proteínas reguladoras del ciclo celular eucariótico: proteínas p53, Ciclina D-1, E2F y Ciclina B. También, el análisis de los efectos de las citocininas sobre estas proteínas durante la germinación de maíz. El estudio se llevó a cabo utilizando anticuerpos heterólogos dirigidos contra proteínas de humano y abarcan la detección por Western blot de las putativas proteínas, la inmunoprecipitación de la cinasa cdk-4 y las Ciclinas D-1 y B, y la detección de actividad en inmunoprecipitados de la cinasa cdk-4 y la ciclina D-1.

### **3.3 Artículo 2: "Effect of Stimulating Maize Germination on Cell Cycle Proteins."**

En este artículo se presentan de manera conjunta los efectos de dos procesos de aceleración de la germinación, el osmoacondicionamiento y la adición de citocininas. El artículo fue sometido a la revista *Physiologia Plantarum* y actualmente se encuentra en prensa.

# PHYSIOLOGIA PLANTARUM

Published on behalf of the  
Scandinavian Society for Plant Physiology

30 October 1997

Dr Jorge M Vázquez-Ramos  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química, UNAM  
Avenida Universidad y Copilco  
México D.F. 04510  
México

Dear Dr. Vázquez-Ramos:

Two reviewers and I have read your manuscript, "Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins" (97063NA). This is a very interesting study. Although the reviewers have some criticisms that must be seriously considered, I would like to provisionally accept the paper for publication.

I would like to see revisions addressing the issues brought up by the reviewers. Below are the ones I consider particularly important:

Reviewer I:

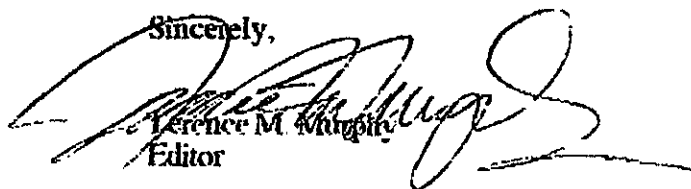
- a) citation of work by other groups;
- b) the question of cell synchrony, both within and between different tissues in the axis (Is there evidence of cell synchrony in axes? Your experimental strategy seems to assume that there is.);
- c) a complete analysis of the the bands in Fig. 7.

Reviewer II:

- a) the reliability of the variation in levels of the bands in Figs 5 and 9. I do not expect a complete statistical analysis, but you should state how many times the extractions were performed and the extracts analyzed with similar results. Of course, a single set of extracts would not be satisfactory

The Technical Editor and I have made a number of style and format changes. In your revision, please include those changes unless they alter your meaning. Thank you for sending us this paper. The project and the results are very exciting. I look forward to the revision.

Sincerely,



Terence M. Murphy  
Editor

North American Editorial Office: Section of Plant Biology  
University of California  
Davis, CA 95616 USA

Tel. (916) 754 9293  
Fax (916) 752 5410  
jglcwis@ucdavis.edu

Jorge M. Vázquez-Ramos. Departamento de Bioquímica, Facultad de  
Química, UNAM. Avenida Universidad y Copilco, México D.F. 04510,  
México.

Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins.

Felipe Cruz-García\*, José Juan Zúñiga-Aguilar\* and Jorge M. Vázquez-Ramos

Cruz-García\*, F., Zúñiga-Aguilar\*, J.J. and Vázquez-Ramos, J.M. 1988.

Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins.-

Physiol. Plant. 00:000.

The germination process can be accelerated if seeds are stimulated either by adding cytokinins or by osmopriming. Under these conditions, cells in maize embryo axes shorten the time at which the first round of DNA replication and mitosis takes place, thus advancing the cell cycle. Using heterologous antibodies against different cell cycle proteins, we have followed the behaviour of several markers for G1 phase (Cyclin D, E2F and p53) and a marker of G2 phase (cyclin B) under either control or "accelerated" germination conditions. The results showed two classes of behaviour: either there was no variation in the amount of the protein present under control or accelerated germination conditions, represented by cyclin B- and E2F-type proteins, or the amount of the proteins was drastically reduced, more rapidly under accelerated germination, as was the case for cyclin D- and p53-type proteins. Although the cyclin D-type protein was de novo synthesized during germination, the balance was towards degradation so that there was no cyclin D detected by 15 h after germination in benzyladenine-treated and osmoprimed seeds. A Cdk4-type protein seemed to be present in cyclin D immunoprecipitates and its kinase activity

paralleled the fluctuations of the cyclin amount during germination.

These data are discussed in the context of early seed germination.

Key words- Benzyladenine, cell cycle, germination, osmopriming, Zea mays.

Cruz-García\*, Zúñiga-Aguilar\* and Vázquez-Ramos (corresponding author, E-mail-jorman@servidor.unam.mx). Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Ave. Universidad y Copilco, México D.F. 04510, México.

\*Both authors contributed equally to this work

## Introduction

In order to fulfil its role as an intermediate in plant reproduction, a seed must germinate, a process that involves re-activation of metabolism and re-initiation of growth. Most of the cells in a dry seed embryo are in G1 phase and move into the S phase only after several hours of imbibition (Bewley and Black 1994). In maize seeds, activation of the S phase and appearance of mitotic figures during germination can be accelerated either by incubating embryo axes with cytokinins or by germinating osmoprimed seeds. In either case, the beginning of the S phase is shifted from around 12-15h of imbibition under normal germination conditions, to around 4-6h of imbibition under "accelerated" germination conditions (Reyes-Jiménez et al. 1991; Cruz-García et al. 1995). As a consequence, the whole cell cycle is advanced.

The process of seed osmopriming involves the initiation of the germination process without allowing radicle protrusion due to restrictive osmotic conditions present in the imbibition solution (Heydecker and Coolbear 1977); the beneficial effect of osmopriming is preserved in re-dried osmoprimed seeds (Bradford 1986). Some controversy exists concerning the extent of DNA synthesis (replication) that may take place during the osmopriming of seeds, since research carried out in pepper and tomato seeds have offered evidence of some DNA replication occurring in root tip cells during osmopriming (Bino et al 1992, Lanteri et al 1993); on the other hand, no evidence of DNA replication or mitosis was found in meristems of primary and secondary roots of osmoprimed maize seed axes (Cruz-García

et al 1995) and in osmoprimed leek embryos (Ashraf and Bray 1993), perhaps suggesting differences between species. Although maize embryo axes consist of a mixture of tissues, only cells in the meristematic regions of roots and mesocotile are activated into the cell cycle in non-osmoprimed germinating seeds (0-36 h, Baiza et al 1989), and during germination after osmopriming (0-20 h, Cruz-García et al 1995).

Cytokinins stimulate the activity of enzymes related to the cell cycle, such as poly ADP ribose polymerase, protein kinase(s) and DNA polymerase(s), whose activities increase during the first hours of germination (Vázquez-Ramos and Reyes 1990, Zúñiga-Aguilar et al. 1995). Interestingly, in benzyladenine-stimulated axes, calcium-independent protein kinase activity reaches a maximum at 15 h of germination, a time at which mitotic figures start appearing under the influence of the phytohormone (or after osmopriming). Biochemical evidence indicates that this kinase activity corresponds to a p34<sup>cdc2</sup>-like protein (I. Herrera-Teigeiro, unpublished data), the kinase responsible for promoting the G2/M transition in eukaryotic cells (Norbury and Nurse, 1992). Since the amount of this p34<sup>cdc2</sup>-like protein kinase does not change during germination, whether cytokinins are added or not, the increase in kinase activity appears to be due to enzyme activation. Cytokinins appear to promote the translocation of the p34<sup>cdc2</sup>-like protein, probably bound to its corresponding partner cyclin B protein, from the cytoplasm to the nucleus, where this complex should be activated (I. Herrera-Teigeiro, unpublished data). Whereas the involvement of a p34<sup>cdc2</sup>-like protein would explain the stimulation by cytokinins of the G2/M phase of the cell cycle during maize germination, it does not account for the dramatic shortening of

the S phase that is observed during early germination. Thus the mechanism of stimulation of the cell cycle by cytokinins probably involves the participation of other cell cycle proteins that act during early G1 to prepare cells for progression into the S phase. We have followed the behaviour of a number of putative cell cycle proteins during both normal and "accelerated" maize germination by using heterologous antibodies to three proteins of G1 phase, cyclin D, p53 and E2F and a protein of G2/M, cyclin B, the partner of p34<sup>cdc2</sup>.

Cyclin D triggers the commitment to progress into the cell cycle during early G1 (Won et al. 1992, Baldin et al. 1993) and is associated to a cyclin-dependent kinase, CDK4 or CDK6. Its function appears to be counteracting the cell cycle inhibitory effect of the retinoblastoma protein, pRB (Ewen et al. 1993). The p53 protein is a checkpoint molecule that senses the cellular status before the commitment to the cycle, halting the process in G1 if, for instance, the DNA is damaged (Lane 1992); p53 mechanism includes the promotion of transcription for gene products that inhibit the action of G1 cyclin-CDK complexes (El Deiry et al. 1993).

The transcription factor E2F is involved in the transcription of genes whose products participate in the S phase of the cycle (Nevins 1992). Its activity is down regulated by binding to pRB (Hiebert et al. 1992); upon phosphorylation of pRB by cyclin D1-CDK4(6), E2F is released from the complex with pRB so that it can act as a transcription factor (Sherr 1994).

Finally, cyclin B is associated with p34<sup>cdc2</sup>, forming what was known for some time as MPF, or maturation (M-phase) promoting factor (Norbury and Nurse 1992).



In the present paper, we present data showing the behaviour of these putative maize cell cycle proteins during normal and stimulated germination, and discuss the mechanism by which cytokinins and/or seed osmopriming might stimulate the germination process.

## Materials and methods

### Plant Material

Maize seeds (Chalqueño Variety) with 95% germination were used. Embryo axes were hand dissected from dry seeds and used immediately or kept at 4°C in a desiccator until use.

### Materials

Cyclic AMP-dependent kinase inhibitor and 6-benzylamino purine were from Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA; protein A-agarose, calf thymus histone H1 and protease inhibitor cocktail tablet (Complete™) were from Böehringer-Mannheim, Mannheim, Germany; Hyperfilm ECL and ECL Western blotting detection reagent were from Amersham International PLC, Little Chalfont, England; Immobilon PVDF membranes were from Millipore, Bedford MA, USA; acrylamide, N,N bis-acrylamide, goat anti-rabbit IgG (H+L)-Premium Quality peroxidase labelled, Cat. # 13859-012 and goat anti-mouse IgG (H+L)-Premium Quality peroxidase labelled, Cat. # 13871-017 were from Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD, USA; Rabbit anti-goat IgG (H+L) horse radish peroxidase conjugate, Cat. # 61-620 was from Zymed, San Francisco CA, USA; cyclin D1 (H-295) rabbit polyclonal IgG against full length human protein, Cat. # sc-753, p53 (Pab-240) mouse monoclonal IgG against 212-217 peptide of human protein, Cat. # sc-99, E2F-1 (C-20) rabbit polyclonal IgG

against 418-437 peptide of human protein, Cat. # sc-193, p34<sup>cdc2</sup> (17) mouse monoclonal IgG against full length human protein, Cat. # sc-54, cyclin B1 (H-433) rabbit polyclonal IgG against full length human protein, Cat. # sc-752 and Cdk4 (H-22) goat polyclonal IgG against 280-303 peptide of mouse protein, Cat. # sc-601 were from Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA, USA; [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-adenosine 5'-triphosphate, 222 Tbq-mmol<sup>-1</sup> was from New England Nuclear, Du Pont, Boston MA, USA.

#### Maize seed osmopriming

Conditions for maize seed osmopriming were reported previously (Cruz-García et al. 1995). Briefly, seed lots (25 seeds each) were imbibed in a -1.7 MPa polyethylene glycol (PEG) solution for 10 days at 25°C. PEG was then removed and osmoprimed seeds were germinated, without re-drying, under optimal hydration conditions for the indicated time periods.

#### Protein extraction

Maize embryo axes were imbibed for 0, 3, 5, 10, 15 and 24 h in sterile imbibition buffer (sucrose 2%, Tris HCl 50 mM pH 7.6, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM and chloramphenicol 10 µg ml<sup>-1</sup>) either in the presence or absence of benzyladenine (BA) at a concentration of 10<sup>-6</sup>M, or after seed osmopriming. Axes were homogenized at 4°C with extraction buffer (70 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 0.25 mM sucrose, 15 mM β-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 80 mM β-glycerophosphate, 10 mM benzamidine and protease inhibitor cocktail). Protein extracts were centrifuged at 150000 g for 30 min at 4°C, and protein amount was determined (Bradford 1976). For

cyclin D-like protein determinations, extraction buffer also contained 1% SDS and 4 M urea since the protein seems to be very labile; in this case, extracts were used immediately.

#### Immunoblots

Proteins (ca. 30  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE electrophoresis (13%) for 2 h at 90 mA, the gels were washed with transfer buffer (20 mM Tris-HCl, pH 10.4, 150 mM glycine, 20% methanol) and proteins were transferred to PVDF filters (0.2  $\mu$ m pore size) by means of a LKB Transblot apparatus for 1.5 h at 1 mA/cm<sup>2</sup>. The semi-discontinuous buffer system recommended by the manufacturers was used. Membranes were washed in TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl), transferred to saturation buffer (TBS containing 5% semi-skimmed milk and 0.6% Tween 20) for 1 h and then the first antibody was added to saturation buffer and incubated overnight at 4°C with gentle agitation. Membranes were washed twice in TBS and once in TBS-0.5M NaCl and then probed with the second antibody for 1 h at room temperature. Membranes were again washed as above and visualized by the Enhanced Chemiluminescence method (ECL, Amersham).

#### Antibodies

All antibodies were used at a 1:2000 dilution for Immunoblot analysis. All immunoblots were repeated at least 3 times.

#### Immunoprecipitation

This was performed according to Durán et al. (1984). Total protein (50  $\mu$ g) was pre-treated with protein A-agarose and then diluted 10-fold with buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40, 1 mM PMSF and 1 mM benzamidine). Anti-human p34<sup>cdc2</sup>

antibody at a 1:100 dilution, or anti-human cyclin D1 antibody at a 1:50 dilution, or pre-immune serum was added and the mixture was incubated overnight at 4°C with gentle agitation. Buffer A-equilibrated protein A-agarose was added and the mixture was incubated 2 h at room temperature with gentle agitation; the resin was washed three times with buffer B (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40 and 0.025% Triton X-100) and twice with buffer A. The bound complex was used as the source of enzyme for histone H1 phosphorylation assayed as described below or eluted with sample buffer for SDS-PAGE (Laemmli 1970) for immunoblot processing.

#### Histone H1 kinase assay

The methodology described by Feiler and Jacobs (1990) with some modifications was followed. To prepare protein extracts, imbibed maize axes were homogenized with 10 volumes of extraction buffer. Extracts were filtered through three layers of Miracloth and the filtrate was centrifuged 30 min at 150000 g at 4°C; 50 µg of protein was diluted two-fold with dilution buffer (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EGTA, 5 mM β-mercaptoethanol, 150 mM NaCl, 60 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 25 mM NaF and protease inhibitor cocktail), and taken as the kinase source. For the kinase assay, the reaction mixture contained 1 µg of protein extract in 20 µl of dilution buffer and 20 µl of reaction buffer (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoethanol, 5 mM EGTA, cAMP-dependent kinase inhibitory peptide, 20 µM ATP, 7.4 kBq [γ-<sup>32</sup>P]ATP and 40 µg ml<sup>-1</sup> histone H1). Under these conditions the reaction was linear for at least 15 min. The reaction was stopped after 10 min by adding stop mix and the proteins were loaded onto an

SDS-PAGE gel, separated by electrophoresis and the gels prepared for autoradiography.

## Results

We have used antibodies raised against several human cell cycle proteins to identify possible cognate proteins in cells from maize embryo axes. Antibodies against cyclin D1, E2F, p53 and cyclin B recognised fairly clean bands in maize protein extracts (fig. 1), and were used to study the behaviour of the putative equivalent proteins in maize under conditions in which germination was accelerated either by seed osmopriming (Cruz-García et al. 1995) or by stimulation with BA (Reyes-Jiménez et al. 1991).

It is noteworthy to find all these types of proteins in dry seeds. We had previously found that cell cycle proteins such as DNA polymerases and p34<sup>cdc2</sup> were also present in dry maize seeds (Coello et al. 1992; I. Herrera-Teigeiro, unpublished data), and that their amounts did not vary during the germination process (Coello and Vázquez-Ramos 1995).

The antibody against human cyclin B detected a 35-kDa band in maize tissues, whereas the protein was approximately of 60 kDa in human cells (fig. 1C, Pines and Hunter 1989). The sequence recognized by the antibody in human cyclin B1 is VEQHTLAKYLMELT, which is similar to that present in the central region of maize cyclin CycZmII, which when transfected promotes nuclear disassembly in *Xenopus* oocytes

(Renaudin et al. 1994). A very close match to this sequence is also found in plant A2-type cyclins (Renaudin et al. 1996). The putative cyclin B was present in dry seeds and its amount remained fairly constant during the 0-24 h-period measured, whether seeds were germinated under control conditions (fig. 2A), under the influence of BA (fig. 2B) or during germination after seed osmopriming (fig. 2C). The level of cyclin B in 10 day-osmoprimed seed axes was similar to that found in dry seeds (fig. 2C). This antibody has been used in immunoprecipitation experiments using maize protein extracts, and it co-precipitates a 34-kDa protein with histone H1-kinase activity that is recognised by a homologous antibody against maize p34<sup>cdc2</sup> (I. Herrera-Teigeiro, unpublished data). The reverse experiment, the immunoprecipitation of maize protein extracts with an anti-human p34<sup>cdc2</sup> antibody, was carried out. A 35-kDa protein was co-precipitated that was recognized by the anti-cyclin B antibody (fig. 3); as expected, immunoprecipitation of maize protein extracts with the anti-cyclin B antibody precipitated a 35 kDa protein (fig. 3). The second antibody used to recognize immunoprecipitated proteins was goat anti-rabbit, and therefore only recognizes IgGs in anti-cyclin B precipitates (rabbit anti-human) and not in anti-p34<sup>cdc2</sup> precipitates (mouse anti-human).

The antibody against human E2F detected a band of around 60 kDa in maize tissues, a size very similar to that found in human cells (fig. 1B; Nevins 1992). The protein was also present in dry seeds and remained at a constant level during germination of control seeds (fig. 4A). Neither BA treatment of maize axes (fig. 4B) nor osmopriming

(fig. 4C) caused significant changes in the amount of the E2F-like protein during early germination when compared to protein levels present in dry seeds, although a slight decrease in the amount was observed by the end of the period measured (Fig. 4B and C). In 10-day osmoprimed seeds there was a lower level of the E2F-like protein, compared to the amount present in dry seeds (fig. 4C).

The antibody against human cyclin D1 detected a band of around 50 kDa in maize tissues and a band of around 34 kDa (fig. 1D) in human cells (Xiong et al. 1991). The sequence recognized by this antibody is EVETIRRAYPDANLLNDRVLRAM, and plant D cyclins contain similar sequences (especially D1 and D2 types) in the EVETIRRA and in the DRVLRAM tracks of the sequence (Renaudin et al. 1996). Dry seeds contain a significant amount of this protein; however, it gradually decreased during germination of control axes (fig 5A). This drop in the amount of the cyclin D-like protein occurred earlier, and it was steeper in BA-treated maize axes so by 15 h of germination only trace amounts of protein could be detected (fig. 5B). The behaviour of this protein in germinating osmoprimed axes, although similar, was more erratic since there was a sharp drop at 5 h of germination and a sudden rise at 10 h to drop again and disappear after 15 h (fig. 5C). This behaviour was reproducible. Interestingly, 10 day-osmoprimed seed axes contained trace amounts of this protein, much less than the amount present in dry seeds or after 3 h germination after osmopriming (fig. 5C). Therefore, de novo synthesis of the cyclin D-like protein was followed by germinating both control and osmoprimed seed axes in the presence of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. The results showed

that cyclin D protein was present in 3 h-imbibed control axes in the presence of cycloheximide, although at a lower level than in control axes without cycloheximide at the same time (fig. 5A); however, it was absent after 10 h, indicating that after 3 h of imbibition of control axes, all cyclin D-like protein present was synthesized de novo (fig. 5A). In germinating osmoprimed seed axes treated with cycloheximide, cyclin D was absent all the time (fig. 5C) indicating that seeds released from osmopriming must synthesize the protein from the start.

Immunoprecipitation of maize protein extracts with either anti-cyclin D or anti-Cdk4 antibodies co-precipitated a protein with histone H1 kinase activity (fig. 6) that contained a 38 kDa protein immunorecognized by an antibody against mouse Cdk4 (fig. 7). In this figure, the bands at around 50 kDa in the immunoprecipitates corresponded to the heavy chain IgG protein; the light chain IgG protein of around 20 kDa could also be observed in some immunoprecipitates. The immunoprecipitated human Cdk4 protein gave the size band expected, i.e., around 32 kDa (fig. 7). Some residual IgG heavy subunit and the Cdk4-like protein can be seen in the supernatants.

The immunoprecipitated histone H1-kinase activity was followed during germination of control, BA-treated and osmoprimed seed axes. The kinase activity pattern resembled quite closely the amount of cyclin D-like protein detected by the antibody (fig. 8): whereas kinase activity was detectable at 5, 10 and 15 h of germination of control axes, it disappeared at 15 h of germination under the influence of BA and showed the fluctuating behaviour under osmopriming conditions, with no detectable activity at 5 h, recovery of activity



at 10 h and total absence of activity at 15 h, indicating that the observed pattern in the immunoblot (fig. 5) was not an artifactual result.

The antibody against human p53 detected a band of 50 kDa in maize tissues (fig. 1A), very close to the 53 kDa band found in human cells (Lane 1992). The p53-like protein was also present in dry seeds, remained approximately constant up to 10-15 h of germination, and then declined in amount (fig. 9A). This decline was steeper, occurring after only 5-6 h of germination in both BA-treated axes and germinating osmoprimed axes; trace amounts of protein were left after 24 h (fig. 9B and C).

#### Discussion

Metabolic events during maize germination, especially those leading to cell division, are not synchronous; several hours have to pass after imbibing seeds before DNA replication and mitosis are observed and these take place at different times in different meristematic tissues of the embryo axes (Baiza et al. 1989). Apparently, only a few cells within these meristems are capable of dividing. In this context, acceleration of germination, either by adding phytohormones or by seed priming, resulting in a shortening of the interval before which DNA replication and mitosis take place (Reyes-Jiménez et al. 1991, Cruz-García et al. 1995), seem to have the effect of reducing the time at which cell populations within the meristems of secondary and primary roots are activated to enter the cell division cycle, producing a synchronization effect. DNA replication and mitosis should thus be

considered important events during maize germination. It would be expected that cell cycle proteins were involved in the regulation of these events and should constitute excellent markers to follow the timing at which the different phases of the cell cycle take place under these germination conditions.

We have used heterologous antibodies to follow the amounts of various proteins through the cell cycle; despite this, there are elements that lend validity to the results presented. In the case of both cyclin-like proteins, there are sequences of the corresponding plant cyclins that can be targeted by the antibodies used. Moreover, for both cyclins analyzed we found a corresponding kinase activity. For p53 and E2F proteins, we suggest their presence based on the molecular masses detected, and the specific recognition of these and virtually no other protein in immunoblots.

We have found that all cell cycle proteins measured are present in dry seeds, something that seems to be the rule rather than the exception. In previous work we reported three soluble DNA polymerases present (and active) in dry maize seeds (Coello et al. 1992). The amount of one of them, DNA polymerase 2, a replicative type enzyme, does not vary during the 0-48 h period of germination measured (Coello and Vázquez-Ramos 1995). We have also found that another important cell cycle protein, the kinase p34<sup>cdc2</sup>, is also present in dry seeds and its amount does not vary during germination, even in BA-treated axes (I. Herrera-Teigeiro, unpublished data). The constant levels found for the cyclin B-like and E2F-like proteins during germination, whether under control or under accelerated conditions, may therefore not be surprising and may suggest a secondary role during accelerated

germination. We have previously reported that even though maize DNA polymerase 2 amount is constant during germination, its activity fluctuates so that it reaches a fourfold increase in activity by 24 h which coincides with the phosphorylation of the enzyme (Coello and Vázquez-Ramos 1995). Maize p34<sup>cdc2</sup> protein also does not vary during germination (as detected by an homologous antibody), but its activity increases gradually and BA promotes an even higher kinase activity and an earlier translocation into nuclei, its site of action (I. Herrera-Teigeiro, unpublished data). Cyclin B is the partner of p34<sup>cdc2</sup> in the complex known as MPF. Thus, it is important that the anti-p34<sup>cdc2</sup> antibody used co-immunoprecipitates a protein of the same size as that recognized by the anti-cyclin B antibody and that this complex shows histone H1 kinase activity; this would suggest that the putative cyclin B protein is transported together with p34<sup>cdc2</sup> to nuclei and that this would also occur faster if cells are stimulated either by BA or by the priming process.

E2F protein, the transcription factor necessary for the expression of S-phase genes, has not been reported in plants, and therefore there are no details on molecular mass or activity. The protein detected in maize protein extracts by the heterologous antibody has a similar molecular mass. In mammalian cells, E2F seems to be regulated mainly at a postranslational level (Sherr 1996); perhaps the same situation holds for the putative maize E2F. It would be most interesting to explore the possibility that E2F is released from its inhibitory complex with pRb by the accelerating germination conditions, thus letting S-phase genes to be expressed.

Conversely, the putative cyclin D and p53 proteins show a very different behaviour during germination. Both are present in dry seeds, but gradually disappear as germination advances, and BA treatment as well as osmopriming cause a faster disappearance. The function of cyclin D is to sense the metabolic state before cells are committed to undergo the cell cycle (Sherr 1993); cyclin D is degraded under conditions in which growth factors are removed, although it appears to be rather stable when cells are engaged in proliferation (Sherr 1996). The protein recognized and immunoprecipitated by the heterologous anti-cyclin D1 antibody has an associated histone H1 kinase activity and an associated Cdk4-like protein kinase and is degraded during early germination at times when DNA replication is taking place (Reyes-Jiménez et al. 1991). This was shown by the experiments with cycloheximide. The turnover seems to be faster under accelerated germination.

The apparent short half-life of the maize cyclin D-like protein contrasts with the behaviour of its human counterpart, since seed germination is a process that triggers cell proliferation. Perhaps plant D-type cyclins are regulated differently than mammalian D cyclins, or proliferation during seed germination is under a control program different from that at other stages of plant development. Another possibility would be that D-type cyclins in plants could carry out functions similar to those of mammalian E-cyclins, which are normally degraded during S phase (Sherr 1996) and have histone H1 as a preferred *in vitro* substrate. Regardless, it would be necessary that before disappearing, the cyclin D containing kinase phosphorylated the pRb protein, thus releasing E2F, an hypothesis worth exploring.

p53 is a protein that halts the cell cycle under conditions of DNA damage; otherwise, the protein is degraded (Lane 1992). A p53-like protein has not been described in plants, although evidence of its presence through germination was given for maize cells using an heterologous antibody: the p53-like protein disappeared as germination progressed (Georgieva et al. 1994). We corroborate these results and in addition show that both BA and priming treatments promote a faster disappearance, suggesting an earlier activation of the cell cycle.

Finally, we want to point out the similarity between the effects of exogenous BA and the priming treatment on seed germination. The starting material differs in that dry maize embryo axes received cytokinins together with the imbibition buffer, whereas axes from osmoprimed seeds were under restrictive water conditions for 10 days and then they were germinated without re-drying; notwithstanding this, both treatments advance DNA replication and mitosis with similar timing (Reyes-Jiménez et al. 1991, Cruz-García et al. 1995) and appear to do it in a similar fashion at the molecular level as the behaviour of the cell cycle markers studied here indicate, strongly suggesting that osmopriming halts cells very early in G1 phase in maize axes. It is expected that both treatments will produce their effects through similar signalling pathways, perhaps involving the same signal transduction cascade, and provide a physiological model to study the mechanism by which the cell cycle is regulated during germination.

Acknowledgments. This work was supported by DGAPA grant IN-209895. FCG was a recipient of grants Conacyt 84455 and PADEP 05321; JJZA was a recipient of grants Conacyt 85379 and PADEP 05348.

## References

- Ashraf, M. & Bray, C.M. 1993. DNA synthesis in osmoprimed leek (*Allium porrum* L.) seeds and evidence for repair and replication.- *Seed Sci. Res.* 3: 15-23.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. & Sánchez de Jiménez, E. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination.- *J. Plant Physiol.* 135: 416-421.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. & Draetta, G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1.-*Genes Dev.* 7: 812-821.
- Bewley, J.D. & Black M. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*, 2<sup>nd</sup> Ed. Plenum Press, New York. Pp. 1-445. ISBN 0-306-44748-7.
- Bino, R.J., de Vries, J.N., Kraak, H.L. & van Pijlen, J.G. 1992. Flow cytometric determinations of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination.-*Ann. Bot.* 69: 231-236.
- Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions.- *Hort. Sci.* 59: 672-676.
- Bradford, M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.-*Anal. Biochem.* 72: 248.
- Coello, P. & Vázquez-Ramos, J.M. 1995. Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination.-*Eur. J. Biochem.* 231(1): 99-103.

- ,García, E., Rodríguez, R. & Vázquez-Ramos, J.M. 1992. A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role.- Plant Mol. Biol. 20(6): 1159-1168.
- Cruz-García, F., Jiménez, L.F. & Vázquez-Ramos, J.M. 1995. Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds.-Seed Sci. Res. 5: 15-23.
- Durán, N., Bach, M., Puigdoménech, P. & Palau, J. 1984. Characterization of antigenic polypeptides of the RNP, Sm and SS-B nuclear antigens from calf thymus.-Mol. Immunol. 21: 731-736.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculesco, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.- Cell 75: 817-825.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J.Y. & Livingston, D.M. 1993. Functional interactions of the retinoblastoma protein with the mammalian D-type cyclins.-Cell 73: 487-497.
- Feiler, H.S. & Jacobs, T.W. 1990. Cell division in higher plants: A cdc2 gene, its 34 kDa product, and histone H1 kinase activity in peas.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5397-5401.
- Georgieva, E.I., López-Rodas, G. & Loidl, P. 1994. Maize embryo germination: II. Proteins related to nuclear proto-oncogene and tumor suppressor gene products.-Planta 192: 125-129.
- Heydecker, W. & Coolbear, P. 1977. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis.- Seed Sci. Technol. 5: 353-425

- Hiebert, S.W., Chellappan, S.P., Horowitz, J.M. & Nevins, J.R. 1992.  
The interaction of Rb with E2F inhibits the transcriptional  
activity of E2F.-Genes Dev. 6: 177-185.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the  
assembly of the head of bacteriophage T4.-Nature (London) 227:  
680-685.
- Lane, D.P. 1992. P53, guardian of the genome.-Nature 358: 15-16.
- Lanteri, S., Lieke Kraak, H., Ric de Vos, C.H. & Bino, R.J. 1993.  
Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication  
activity in seeds of pepper (*Capsicum annuum*).- Physiol. Plant.  
89: 433-440.
- Nevins, J.R. 1992. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein  
and viral oncoproteins.-Science 258: 424-429.
- Norbury, C. & Nurse P. 1992. Animal cell cycles and their control.-  
Annu. Rev. Biochem. 61: 441-470.
- Pines, J. & Hunter, T. 1989. Isolation of a human cyclin cDNA:  
evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle  
and the interaction with p34cdc2.-Cell 58: 833-846.
- Renaudin, J.P., Colasanti, J., Rime, H., Yuan, A. & Sundaresan, V.  
1994. Cloning of four cyclins from maize indicates that higher  
plants have three structurally distinct groups of mitotic  
cyclins.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7375-7379.
- , J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé,  
D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Saviouré, A.,  
Sorrell D.A., Sundaresan, V. & Murray, J.A.H. 1996. Plant  
cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type



- cyclins based on sequence organization.-Plant Mol. Biol. 32:  
1003-1018.
- Reyes-Jiménez, J., Jiménez-García, L.F., González, J. & Vázquez-Ramos,  
J.M. 1991. Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and  
cell division in germinating maize.-Seed Sci. Res. 1: 113-117.
- Sherr, C.J. 1993. Mammalian G1 Cyclins.-Cell 73: 1059-1065.
- , C.J. 1994. G1 phase progression cycling on cue.-Cell 79: 812-  
821.
- , C.J. 1996. Cancer cell cycles.- Science 274: 1672-1677.
- Vázquez-Ramos, J.M. & Reyes, J. 1990. Stimulation of DNA synthesis and  
DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination  
of maize axes.-Can. J. Bot. 68 (12): 2590-2594.
- Won, K.A., Xiong, Y., Beach, D. & Gilman, M.Z. 1992. Growth-regulated  
expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts.-  
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 9910-9914.
- Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B. & Beach, D. 1991. Human D-type  
cyclin.-Cell 65: 691-699.
- Zúñiga-Aguilar, J.J., Gómez, A., López, I. & Vázquez-Ramos, J.M. 1995.  
Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene  
expression during maize germination?.-Seed Sci. Res. 5: 219-226.

Fig. 1. Immunorecognition of maize and human cell cycle proteins. Protein extracts from 6 h-imbibed maize axes were separated by SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis, using for immunorecognition: A, anti-human p53 antibody; B, anti-human E2F antibody; C, anti-human cyclin B antibody and D, anti-human cyclin D antibody. Zm, *Zea mays*, H, human colon cancer cells (normal human colon cells for p53).

Fig. 2. Immunorecognition of the cyclin B-like protein. Maize embryo axes were imbibed for 0 (ds), 3, 5, 10, 15 and 24 h under control conditions (A); in the presence of  $10^{-6}$ M BA (B) or after 10 days osmopriming (C). Proteins from each sample were separated by SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis. An antibody against human cyclin B was used. Op, axes from 10 days osmoprimed seeds; GAP, germination after osmopriming.

Fig. 3. Co-immunoprecipitation of cyclin B- and p34cdc2-type proteins. Protein extracts from 6 h imbibed maize axes were immunoprecipitated using antibodies against human p34<sup>cdc2</sup> (p34<sup>cdc2</sup>) or human cyclin B (Cyc B). Proteins in the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis. The antibody against human cyclin B was used for immunorecognition. IPP, immunoprecipitate; SN, supernatant after immunoprecipitation; TP, total protein extract.

Fig. 4. Immunorecognition of the E2F-like protein. Procedures were identical to those described in fig. 2. An antibody against human E2F protein was used.

Fig. 5. Immunorecognition of the cyclin D-like protein. Procedures were identical to those described in fig. 2, except that in these

experiments, control and osmoprimed maize axes were additionally treated with cycloheximide (CH) and then imbibed for 3, 10 and 15 h.

Fig. 6. Histone H1 kinase activity in anti-cyclin D antibody immunoprecipitates. Protein extracts from 6 h imbibed maize axes were immunoprecipitated using either an anti-cyclin D antibody (CycD) or an anti-Cdk4 antibody (Cdk4), and the precipitates were used as a source of histone H1 kinase activity (H1). TP, activity in total protein extracts.

Fig. 7. Co-immunoprecipitation of a Cdk4-like protein. Protein extracts from 6 h-imbibed maize axes were immunoprecipitated by using either anti-human cyclin D (CycD) or anti-mouse Cdk4 (Cdk4) antibodies. Proteins in the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis. The antibody against Cdk4 was used for immunorecognition. TP, total maize protein extract; IPP, immunoprecipitate of maize proteins; SN, supernatant of maize proteins; IPP<sub>h</sub>, immunoprecipitate of human proteins (colon cancer cells).

Fig. 8. Histone H1 kinase activity in cyclin D-like complexes during germination. Protein extracts from 5, 10 and 15 h imbibed maize axes, either in the absence of BA (control, lanes 1, 4 and 7), in the presence of BA (lanes 2, 5 and 8) or after osmopriming (lanes 3, 6 and 9), were immunoprecipitated by using anti-human cyclin D antibody and the precipitates were used as a source of histone H1 kinase activity.

Fig. 9. Immunorecognition of the p53-like protein. Procedures were identical to those described in fig. 2. An antibody against human p53 protein was used.

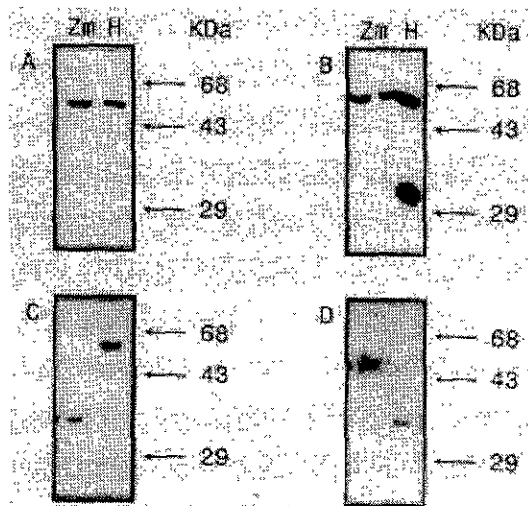


Figure 1

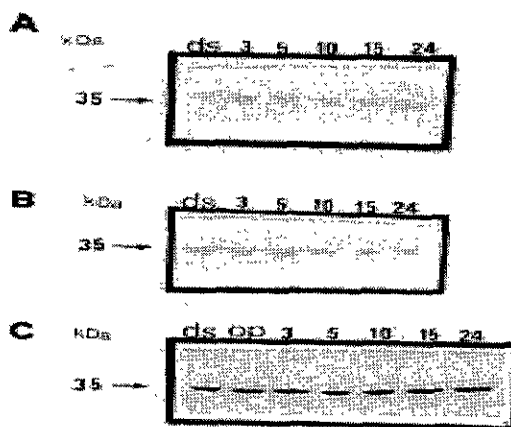


Figure 2

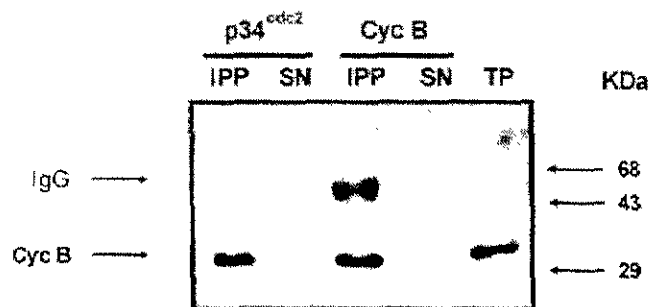


Figure 3

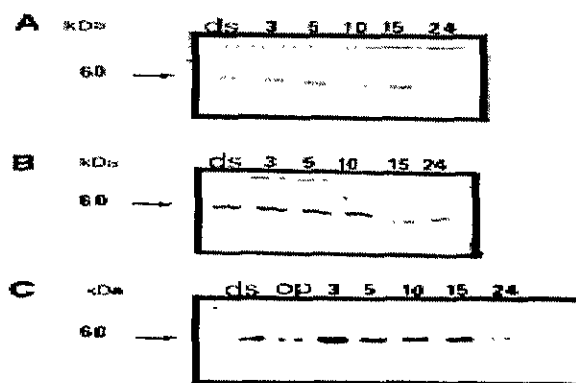


Figure 4

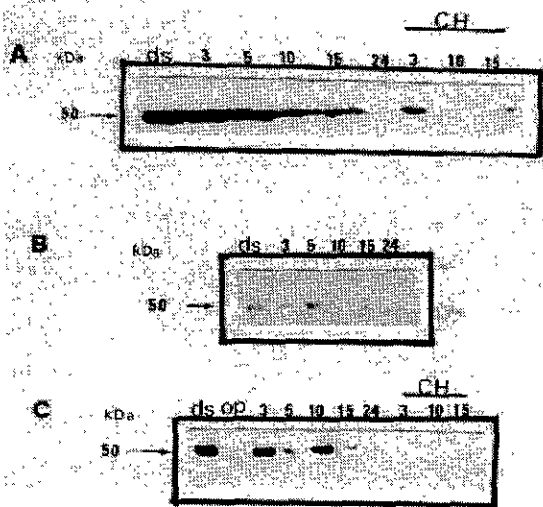


Figure 5

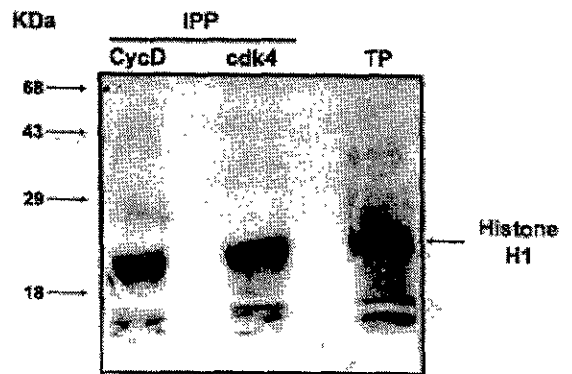


Figure 6

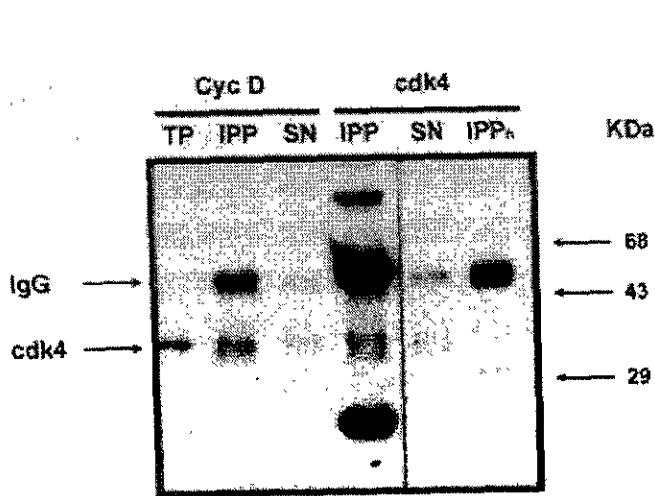


Figure 7.

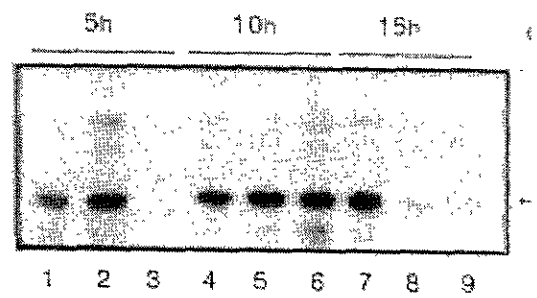


Figure 8

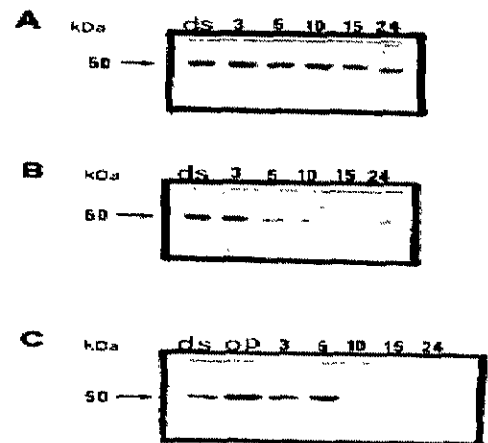


Figure 9

## **4.1 Discusión.**

La Discusión está dividida en tres partes: de los resultados de los efectos de citocininas sobre la expresión génica; de los resultados de los efectos de citocininas sobre proteínas de maíz, análogas a proteínas reguladoras del ciclo celular eucariótico; y finalmente, sobre posible(s) mecanismo(s) mediante el(los) cual(es) las citocininas estimulan el metabolismo durante la germinación de maíz

#### 4.1.1 Efectos de Citocininas sobre la Expresión Génica Durante la Germinación de Maíz.

El fenómeno de la germinación ha sido objeto de diferentes estudios encaminados a determinar si este proceso constituye un estado de diferenciación dentro de las distintas etapas del desarrollo en el ciclo de vida de una planta, o si por otro lado constituye un período en el que simplemente se detiene el metabolismo y la entrada de agua promueve la reactivación de aquellos procesos que quedaron detenidos durante la desecación en la embriogénesis. Debido a que la síntesis de proteínas se establece rápidamente después del inicio de la imbibición (Bewley and Black, 1994), se han llevado a cabo diversos estudios para examinar el papel, durante las etapas tempranas de germinación, de los ARNm almacenados en la semilla seca. Los resultados han sido ambiguos:

Por un lado, se ha sugerido un papel funcional para los ARNm almacenados en la semilla seca; esta interpretación se basa en el hallazgo de polipéptidos con tamaños y secuencias similares, al comparar los productos de traducción *in vitro* de mensajes aislados de semilla seca con los productos de mensajes aislados de semillas germinadas (Brooker *et al.*, 1978). También, se ha demostrado que en algunas especies, la adición de inhibidores de la traducción no afecta ni la cantidad ni la calidad de proteínas sintetizadas en etapas tempranas de germinación (Hammet and Katterman, 1975).

Por otra parte se ha sugerido un papel pobre o restringido para los ARNm almacenados en semilla seca debido a que algunos de ellos codifican proteínas de reserva o polipéptidos de muy bajo peso molecular, que pueden ser reemplazadas por nuevos polipéptidos al inicio de la germinación (Delseny *et al.*, 1977; Carlier *et al.*, 1980; Martin and Northcote, 1981).

Con base a diversos antecedentes experimentales obtenidos en nuestro laboratorio, entre los que se encuentran principalmente la reversión por  $\alpha$ -amanitina de la estimulación de la síntesis de ADN por citocininas y la modificación por estas fitohormonas de la población de ARN mensajeros traducibles a las 6 horas de germinación, existía la posibilidad de que las citocininas promovieran cambios en la expresión génica durante la germinación de maíz. Para investigar esta posibilidad, durante el inicio del presente proyecto se decidió utilizar la técnica experimental más indicada para ese entonces, el sondeo diferencial de una biblioteca de ADNc.

Después de sondear independientemente dos bibliotecas de ADNc de 4 y 15 horas de germinación, se detectaron y aislaron una serie de clonas. Para las dos más representativas, se encontró por medio ensayos de northern blot que las citocininas indujeron solamente una potenciación en la expresión de los correspondientes transcritos. Con la sonda 9.4 se detectó un transcrito cuya concentración disminuye conforme la germinación avanza, y la adición de citocininas únicamente adelanta la desaparición. Con la sonda 13.1 se detectó un transcrito que estando presente en la semilla seca, incrementa progresivamente su concentración a lo largo de las primeras 15 horas de germinación y la adición de citocininas solamente magnifica el incremento (descrito en el artículo 1).

Como puede observarse, mediante la técnica del sondeo diferencial de bibliotecas de ADNc no pudieron aislarse genes cuya expresión fuese modificada del "todo o nada" por las citocininas, pero los experimentos realizados con  $\alpha$ -amanitina indican que durante la germinación se requiere de la actividad transcripcional para que este proceso se desarrolle. Las razones para no haber podido detectar estos cambios transcripcionales pueden radicar en que aquellos genes que se expresen diferencialmente, por su naturaleza reguladora deben estar escasamente representados



en la población total de ARN mensajeros, o que su expresión es altamente transitoria y en los tiempos en los que se realizó el estudio no se encuentran significativamente representados.

Si efectivamente el problema en la detección de expresión diferencial radica en una baja representatividad de los transcritos correspondientes, las probabilidades de detección y aislamiento de estos genes serán mayores utilizando una técnica más potente para el análisis comparativo de poblaciones de ARN mensajeros provenientes de células expuestas a diferentes estímulos, condiciones o tiempos de tratamiento.

En el ensayo de "RNA Differential Display" se amplifican exponencialmente, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, ADNc sintetizados a partir de sub-poblaciones del total de ARN mensajeros, los cuales provienen de células expuestas a diferentes condiciones (Liang and Pardee, 1992). Los ADNc producidos son separados en un gel de secuenciación y las bandas comparadas entre sí por medio de marcaje isotópico o tinción con plata. Puesto que las mayores diferencias entre las poblaciones de mensajeros de semillas control e inducidas, detectadas mediante sondeo diferencial de bibliotecas de ADNc, se presentaron a las 15 horas de germinación, el primer ensayo de DD se realizó con ARN poliadenilado de ese período. No obstante, debido a que los resultados fueron similares a los de los sondeos diferenciales, se decidió estudiar otra etapa de germinación en la cual existieran mayores probabilidades de detectar expresión génica diferencial, para lo cual se realizaron una serie de experimentos que consistieron en estimular la germinación de maíz mediante la adición exógena de citocininas por diferentes períodos, con el propósito de encontrar tiempos específicos en los que la adición de citocininas causaran una respuesta fisiológica más evidente. Los resultados mostraron que cuando las citocininas están presentes de manera continua durante las primeras 24 horas de germinación, inducen una estimulación bifásica en la síntesis de ADN; un pico a las 9 horas y posteriormente un

incremento constante desde las 12 hasta las 24 horas. Cuando las citocininas son adicionadas durante las tres primeras horas se presenta únicamente el pico inicial, pero cuando son adicionadas durante el período comprendido entre las 3 y las 6 horas sí se presentan las dos fases, aunque la respuesta es menor (artículo 1).

En el período comprendido entre las 3 y las 6 horas de germinación las citocininas estimulan la síntesis de ADN de manera similar a cuando están presentes todo el tiempo, aún cuando son retiradas posteriormente del medio de imbibición. Esto indicaría que en este período existe la influencia sobre algún evento o proceso, el cual parece promover la estimulación de eventos posteriores. Por este motivo, se decidió repetir el ensayo de **ADD**, partiendo de ARN mensajeros extraídos de ejes embrionarios de 5 horas de germinación en presencia de citocininas.

Con las modificaciones descritas en "Resultados adicionales", la utilización de esta técnica permitió la detección de segmentos de ADNc que en primera instancia parecen inducirse o reprimirse por la acción hormonal (nivel transcripcional: artículo 1 y resultados adicionales), pero que después de la corroboración por northern blot de los correspondientes niveles de transcritos, mostraron una vez mas resultados similares a los anteriormente obtenidos; genes que aumentan o disminuyen su expresión por efecto de citocininas, pero ninguno afectado como "todo o nada". La secuencia del ADNc BARM-1 corresponde a un gene de mantenimiento, sin embargo, al igual que las secuencias de BAEM-1 y BAEM-2, contiene sitios de modificación post-traducciona que las convierten en moléculas interesantes desde un punto de vista de regulación, como se describirá a continuación.

La clona pZmR1 contiene un ADNc de 865 pares de bases e hibrida con un ARN de aproximadamente 3,000 bases. El transcrito está presente en semilla seca pero su concentración disminuye conforme avanza la germinación y el efecto hormonal acelera la desaparición del

mensaje. La comparación de su secuencia nucleotídica y la polipéptidica deducida muestran un alto grado de similitud e igualdad con la enzima Porfobilinógeno Desaminasa de géneros evolutivamente tan distantes como bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*), algas (*Euglena gracilis*, *Chlorobium vibrioforme*), plantas (*Pisum sativum*, *Arabidopsis thaliana*) y animales (ratón, rata y humano). Aunque no se tiene el marco de lectura abierto, la gran similitud e igualdad entre estas secuencias permiten asegurar que el inserto de la clona pZmR1 contiene la secuencia complementaria del ARN que codifica la enzima Porfobilinógeno Desaminasa de maíz. Esta enzima lleva a cabo la primera reacción de ciclación en la formación del anillo tetrapirrólico del uroporfirinógeno III durante la síntesis de protoporfirinas. Es interesante el hecho que teniendo un papel importante en la síntesis de precursores de clorofila, la expresión del gen disminuya en una etapa del desarrollo en la cual no tiene aparentemente un papel relevante. Sin embargo, se ha demostrado que un proceso que ocurre durante la maduración de ciertas semillas es la degradación de clorofila, y esto se correlaciona con la capacidad para sintetizar proteínas de reserva (Parcy *et al.*, 1997). No obstante ser considerado un gene de mantenimiento del aparato fotosintético, BARM-1 contiene en su secuencia 3 motivos de fosforilación por diferentes proteínas cinasas: Proteína Cinasa dependiente de AMP cíclico (proteína cinasa A), Proteína Cinasa C y Caseína Cinasa II. Las tres cinasas están involucradas en vías de transducción de señales. De esta manera, es interesante que una señal hormonal como las citocininas aceleren la degradación del mensaje para una enzima involucrada en la síntesis de clorofila, durante las etapas tempranas de la germinación. Parte del comportamiento anterior se comprueba al detectar expresión del transcrito en hoja, pero poca en raíz y callo en proliferación (nivel transcripcional: resultados adicionales).

La clona pZmE2 contiene un ADNc de 432 pares de bases. En ensayos de northern blot, hibrida con un transcrito de 2,400 bases, el cual está presente en semilla seca y su concentración aumenta paulatinamente conforme avanza la germinación; en presencia de citocininas el aumento es mayor. El ADNc tiene similitud con el extremo 3' no traducible del gen *lgmpr1*, perteneciente a una familia de tres genes que codifican proteínas abundantes en semillas de *Lemna gibba*, de función desconocida, cuya expresión es reprimida en etapas tardías de germinación por efecto del fitocromo (Okubara and Tobin, 1991) a través, probablemente, de la mediación del ácido abscísico (ABA). En otros tejidos, como hoja madura, la expresión de estos genes se reprime por efecto de la luz; se ha sugerido que el comportamiento en estos tejidos puede estar regulada a diferentes niveles (Okubara and Tobin, 1993). Durante la germinación de maíz, las citocininas inducen un aumento inicial de pZmE2. No se sabe si en ambas especies la regulación es diferente o estas proteínas tienen funciones diferentes.

La clona pZmE5 contiene un ADNc de 314 pares de bases. Los ensayos de northern blot muestran un transcrito de 2,800 bases que está presente a las 6 horas de germinación y casi desaparece para las 15 horas. En presencia de citocininas la cantidad es mayor para ambos tiempos. La secuencia del ADNc tiene similitud con algunas secuencias reportadas; aunque para algunas de ellas no se conoce la función, su similitud con el gen *ntRab11e* de *Nicotiana tabacum*, que codifica para una putativa proteína de unión a GTP de la sub-familia de Ras. Este hecho parecería no tener relevancia, debido a que la similitud se presenta en un tramo corto; sin embargo, si bien esta secuencia nucleotídica no incluye un marco de lectura, se encuentra la señalización de un putativo exón entre los nucleótidos 55 y 215, el cual codifica para un polipéptido de 53 aminoácidos. La comparación de la secuencia de este polipéptido en bancos de datos muestra similitud con dos motivos de modificación post-traducciona l en el dominio

citoplasmático de receptores con actividad de cinasas de serina/treonina, entre los que se encuentran el receptor de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) de humano (Lin *et al.*, 1994), de rata (Tsuchida *et al.*, 1993) y de ratón (Suzuki *et al.*, 1994); el receptor de activina II de humano (Hilden *et al.*, 1994), de rata (Matzuk *et al.*, 1992), de ratón (Mizuno *et al.*, 1994) y de activina II y IIB de bovino (Ethier *et al.*, 1994); y cinasas tipo LIM de serina/treonina que tienen funciones importantes durante la diferenciación testicular en roedores (Proschel *et al.*, 1995) y en humano (Mizuno *et al.*, 1994).

Los receptores de TGF- $\beta$  modulan su unión a otros factores membranales mediante, entre otras cosas, el enlace de ácido mirístico a residuos de asparagina en el extremo amino terminal; mientras que las cinasas LIM contienen dedos de zinc involucrados también en la unión a otras proteínas (Proschel *et al.*, 1995). La principal modificación post-traducciona que comparten estos receptores con BAEM-5 es precisamente una miristoilación; parecería por lo tanto, que esta modificación podría estar relacionada con la capacidad para unirse a otras proteínas, aunque debe notarse que las similitudes detectadas entre los motivos presentes en BAEM-2 y estos receptores/cinasas (que por otro lado son muy parecidos entre ellos) se encuentra principalmente en el dominio catalítico citoplásmico de estos últimos. No obstante, el que la secuencia peptídica tenga similitud con un buen número de receptores con actividad de cinasa y no con otras proteínas localizadas en membrana, y el que la secuencia nucleotídica se parezca en un segmento a una proteína de unión a GTP tipo Ras, hace interesante el hecho de que las citocininas induzcan un incremento en la cantidad del transcrito.

Aunque el principal nivel de regulación en los sistemas de transducción de señales mitogénicas no es en la síntesis de proteínas, tanto en estos sistemas como en los puntos clave de regulación del ciclo celular, la fosforilación de proteínas juega un papel preponderante. El estudio posterior

de este producto de ADNc clonado -por ejemplo la búsqueda del marco de lectura abierto- debe ofrecer resultados más precisos.

Recapitulando sobre la identidad y comportamiento de los ADNc aislados hasta el momento, independientemente del papel que los respectivos productos codificados tengan durante la germinación de maíz, sus respectivos mensajes están presentes en la semilla seca; y la estimulación en la síntesis de los transcritos después del inicio de la imbibición puede representar un aumento o un adelanto de las funciones celulares codificadas por ellos.

Este comportamiento no es inusual ya que existen en la literatura reportes que ofrecen pruebas de transcripción durante etapas tempranas de la germinación, de mensajes almacenados en semilla seca; por ejemplo, algunos de los mensajes almacenados en semillas de *Vigna unguiculata* son sintetizados nuevamente desde las 4 horas posteriores al inicio de la imbibición (Suzuki and Minamikawa, 1985). Datos como el anterior sugieren un papel activo durante las primeras horas de germinación, de los ARNm almacenados (Sánchez de Jiménez and Aguilar, 1984). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la imbibición y la germinación son parte de un proceso continuo de desarrollo desde la embriogénesis hasta antes del crecimiento post-germinativo de la plántula (Suzuki and Minamikawa, 1985). Desde ese punto de vista, no deberían existir marcadas diferencias metabólicas entre los últimos estadios de maduración de la semilla y las etapas tempranas de la germinación. Sin embargo, nuestros resultados con inhibidores del proceso transcripcional y con la estimulación por pulsos de citocininas demuestran que la germinación requiere necesariamente de la transcripción de nuevos mensajes y que el período cuando esto es necesario podría ser entre las 3 y las 6 horas. Ambos puntos de vista pueden no ser contrarios del todo: La transcripción de la mayor parte de los mensajes al inicio de la imbibición puede estar definida desde la embriogénesis, pero la transcripción de genes

regulatorios que estén involucrados en el establecimiento de la germinación puede constituir un fenómeno *de novo*, y con las técnicas empleadas en este estudio no pudieron aislarse.

Apoyándose en estos conceptos y en los datos obtenidos en el presente trabajo con relación a los efectos de citocininas a nivel transcripcional, puede sugerirse que el grueso del patrón de la expresión génica desplegado durante el establecimiento y el desarrollo de la germinación está probablemente determinado desde el proceso de maduración de la semilla. Sin embargo, no se descarta el hecho de que las técnicas empleadas no permitieron detectar la expresión de genes cuya expresión sea exclusiva de etapas de la germinación, ya sea porque estos se encuentran extremadamente poco representados en el total de transcritos o porque son expresados puntualmente durante la germinación.

#### 4.1.2 Efectos de Citocininas sobre Proteínas Reguladoras del Ciclo Celular.

El bloqueo de las células en  $G_1$  o en su fase anterior ( $G_0$ ) como punto de partida hacia la diferenciación es un proceso común en células eucariontes y se ha demostrado que las células detenidas en  $G_1/G_0$  mantienen altos niveles de viabilidad por extensos períodos de tiempo (Yanishevsky, 1981). La mayoría de los datos disponibles sobre la germinación de embriones de maíz indican que durante la maduración de la semilla la mayor parte de las células embrionarias están bloqueadas en la fase  $G_1$  del ciclo celular (Deltour and Jacquard, 1974), y aún después de 12 horas del inicio de la imbibición, la mayoría de las células (75%) permanecen en la fase  $G_1$ . Aun cuando un porcentaje importante de células se empieza a mover hacia la fase  $S$  en estas etapas, no se detectan figuras mitóticas en secciones seriadas de embriones de maíz (Baíza *et al.*, 1989, Georgieva *et al.*, 1994).

Debido a que, de acuerdo a nuestra hipótesis, la conclusión exitosa del proceso germinativo en las semillas implica la conclusión del primer ciclo celular, y a que en sistemas de eucariontes superiores la regulación del ciclo es llevada a cabo por proteínas altamente conservadas, se resolvió estudiar la presencia en maíz de algunas de estas proteínas, escogidas con base a su relevancia en los puntos clave para la reactivación de la proliferación y en los puntos de control de avance del ciclo celular, principalmente en las transiciones  $G_1/S$  y  $G_2/M$ . Una vez detectada la existencia en maíz de proteínas análogas, se procedió a estudiar su comportamiento durante la germinación normal y acelerada con citocininas.

Como herramienta metodológica se emplearon anticuerpos policlonales dirigidos contra los siguientes marcadores del ciclo celular en humano:



1. La proteína anti-tumoral **p53**, una proteína relacionada con la percepción del estado celular en la fase *G1*, y que impide la entrada al ciclo bajo condiciones adversas, por ejemplo daño en el ADN.

2. La **ciclina D1**, que es la ciclina más relacionada con la respuesta a la transducción de señales externas, proliferativas o nutricionales, y responsable, como parte de un complejo ciclina/cdk, del avance sobre el punto de restricción R en la fase *G1*.

3. El factor transcripcional **E2F**, una proteína involucrada en la transición *G1/S* y en la transcripción de genes fundamentales para la síntesis del ADN.

4. La **ciclina B**, la proteína encargada, también como parte de un complejo ciclina/cdk, de regular la transición en la interfase *G2/M*.

Mediante ensayos de Western blot, se logró la detección de bandas únicas en extractos de ejes embrionarios de maíz, con todos los anticuerpos utilizados aún bajo las condiciones más rigurosas. En principio, estos resultados constituyen el primer indicio de que efectivamente existen en maíz proteínas análogas a las correspondientes proteínas de humano utilizadas para producir los anticuerpos. Todas las proteínas están presentes en la semilla seca, pero tienen diferente comportamiento conforme avanza la germinación y responden de manera particular al estímulo mitogénico por citocininas.

En general, los resultados muestran durante la germinación normal dos tipos de comportamientos para las proteínas detectadas: la cantidad de proteína para las putativas E2F-1, ciclina B y p53 no cambia apreciablemente durante las primeras 24 horas de germinación, mientras que para ciclina D1 ocurre una disminución paulatina, de tal modo que después de las 15 horas la proteína presenta un nivel extremadamente bajo.

En presencia de citocininas se presentan igualmente dos tipos de respuestas: no se observan efectos sobre la cantidad de las proteínas E2F y ciclina B. Pero estas fitohormonas promueven la degradación de p53 y de ciclina D1 después de 6 horas de iniciada la imbibición, ya que la cantidad de ambas proteínas disminuye drásticamente a las 9 horas.

Debido a que el uso de anticuerpos heterólogos introduce un elemento de incertidumbre sobre los resultados obtenidos, se realizaron experimentos encaminados a detectar en estas proteínas de maíz las actividades enzimáticas asociadas a las homólogas de humano, con el fin de aumentar los elementos que aseguren la identidad de las proteínas detectadas.

Las ciclinas constituyen las subunidades regulatorias de los complejos ciclina/cdk, con actividad de cinasa (Pines, 1993). Por este motivo, las proteínas detectadas en maíz con los anticuerpos anti ciclina D1 y anti ciclina B deben estar asociadas con una cinasa. Para comprobar esto se realizaron los siguientes ensayos:

a) Se inmunoprecipitaron extractos de maíz de diferentes tiempos de germinación con anticuerpos dirigidos contra las ciclinas D1 y B;

b) Se inmunoprecipitaron los mismos extractos con anticuerpos dirigidos contra las cinasas cdk 4 y cdc2, que son subunidades catalíticas asociadas con la ciclina D1 y la ciclina B, respectivamente.

Ambos inmunoprecipitados se utilizaron para determinar por un lado la presencia de la contraparte asociada, y por otra parte para realizar ensayos de fosforilación sobre la Histona H1, que es un sustrato específico para las cdk.

Los anticuerpos heterólogos dirigidos contra estas ciclinas y cdk's inmunoprecipitan proteínas del mismo peso molecular que las detectadas por inmunoblot a partir de extractos totales de maíz, y co-inmunoprecipitan a las respectivas proteínas asociadas (a saber ciclina B con cdc2 y

ciclina D1 con cdk4). Asimismo, estos inmunoprecipitados contienen una actividad de cinasa que fosforila a la Histona H1. Esta actividad presenta el mismo comportamiento que la ciclina D1 durante los tiempos de germinación estudiados; está presente en semilla seca y disminuye a las 15 horas, pero en presencia de citocininas la disminución es más acentuada. Tanto la cantidad de proteína como la actividad de cinasa asociada desaparecen antes de lo normal por el tratamiento hormonal; como esta actividad se requiere para el paso sobre el punto R del ciclo, puede sugerirse que las citocininas adelantan el tiempo de acción de estos complejos, degradándose la ciclina D cuando ya no se requiere (figura 13, comparar con la figura 3 de la introducción).

Para las proteínas p53 y E2F-1, que tienen actividad como factores de transcripción, no hay reportes sobre su presencia en maíz y solo se conoce un ensayo para demostrar el estado de activación de p53 en tejidos tumorales de humano (Flaman *et al.*, 1995). Por lo tanto, los únicos elementos que se tienen para asegurar su presencia son los resultados de los experimentos de inmunoblot, que muestran la clara identificación de una sola banda.

Junto con las proteínas estudiadas en el desarrollo del presente proyecto, en nuestro laboratorio se ha reportado la presencia en semillas secas de maíz, de proteínas como las ADN polimerasas (Coello *et al.*, 1992) y una proteína homóloga a la cinasa p34<sup>cdc2</sup> (Herrera-Teigeiro, datos no publicados). La cantidad de estas proteínas no cambia durante la germinación pero presentan cambios en su actividad. La ADN polimerasa 2 incrementa su actividad después de las 15 horas de germinación, evento asociado con un aumento en sus niveles de fosforilación (Coello, 1995). La cinasa p34<sup>cdc2</sup> presenta un incremento en actividad en tiempos coincidentes con su transportación al núcleo (Herrera-Teigeiro, datos no publicados).

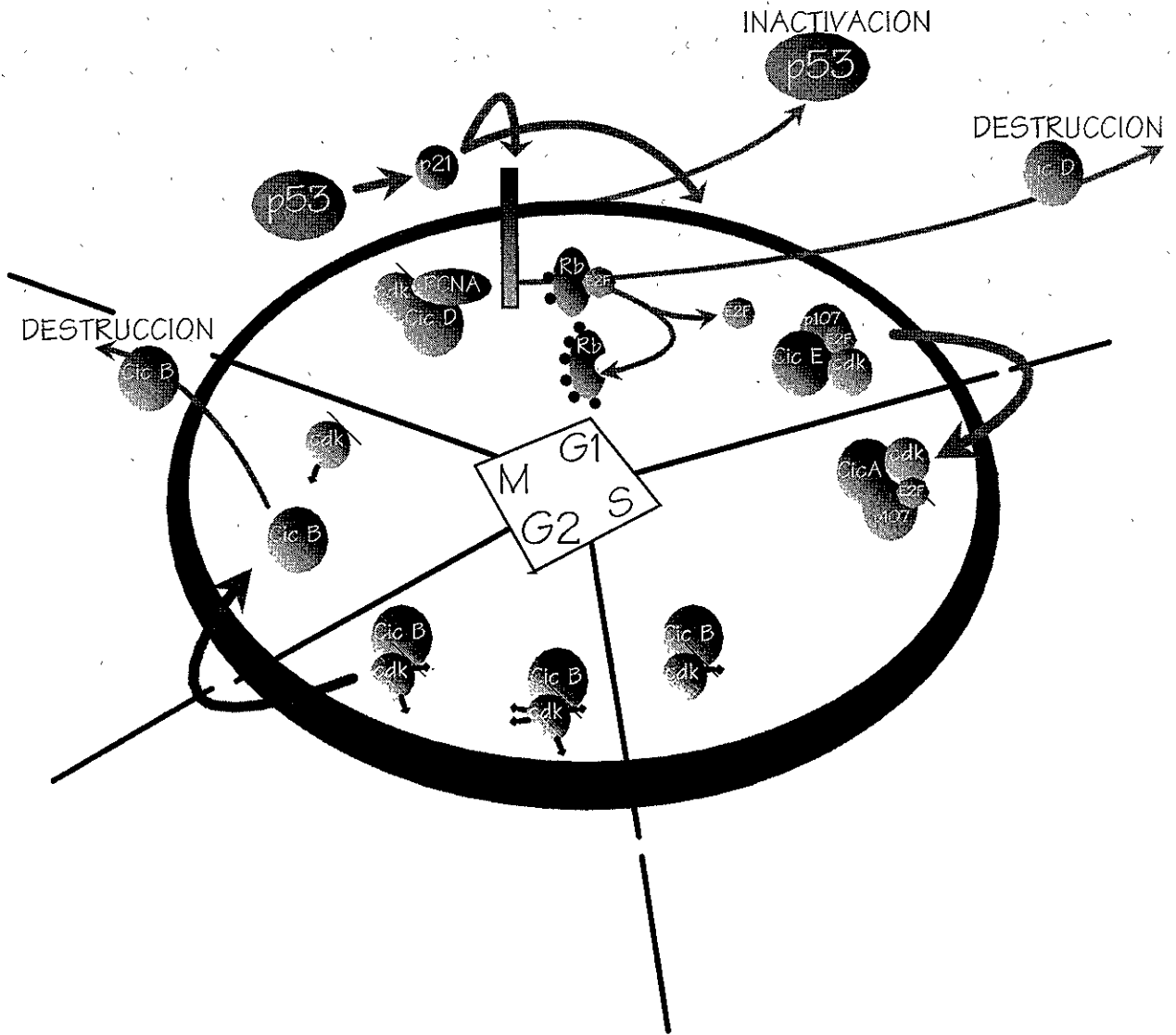


Figura 13. Efecto de citocininas sobre proteínas del ciclo celular de maíz.

De manera similar, las putativas proteínas del ciclo celular de maíz están todas presentes en semilla seca. Mientras que las proteínas detectadas con los anticuerpos dirigidos contra el factor antitumoral p53, el factor transcripcional E2F-1 y la ciclina B mantienen una concentración constante durante las primeras 24 horas de germinación, la proteína correspondiente a la ciclina D1 presenta una disminución remarcada hacia las 15 horas.

El hecho de que proteínas importantes para el reinicio de la proliferación celular se encuentren almacenadas en la semilla seca, sugiere que durante la etapa de maduración debe presentarse un programa molecular con el que se asegure el establecimiento exitoso del reinicio de la proliferación, una vez que se lleven a cabo los procesos de reparación del daño acumulado durante la etapa de quiescencia metabólica. Coincidente con esta suposición, se ha propuesto que durante la etapa de embriogénesis pueden formarse pozas específicas de metabolitos, que serán utilizados durante el período de imbibición; por ejemplo, se ha sugerido la existencia en semillas secas de maíz de una poza de timidilato que será utilizada en tiempos tempranos de la germinación para asegurar que los procesos de síntesis reparativa y replicativa del ADN se inicien independientemente de la síntesis *de novo* de proteínas (Georgieva *et al.*, 1994).

Con lo anterior como antecedente, y considerando los efectos tanto de los inhibidores de la transcripción y la traducción como los de la adición exógena de citocininas, es posible proponer un modelo que represente la activación del metabolismo durante el establecimiento de esta importante etapa del desarrollo de una planta, lo que se describirá a continuación.

### 4.1.3 Efectos de Citocininas Durante la Germinación de Maíz.

La respuesta de algunos procesos moleculares a la adición exógena de citocininas durante la germinación de maíz, sugiere que este grupo de fitorreguladores actúa a diferentes niveles.

Utilizando como parámetro la estimulación de la síntesis de ADN, puede decirse que dependiendo del tiempo de adición, las citocininas pueden promover eventos tempranos y eventos tardíos. Se ha pensado que los primeros pueden estar relacionados con procesos de reparación (Osborne, 1983; Zaráin *et al.*, 1987) y los tardíos pueden relacionarse francamente con eventos replicativos o proliferativos (Galli *et al.*, 1981; Zaráin *et al.*, 1987; Reyes *et al.*, 1991). Sin embargo, debe resaltarse el hecho de que es en el período comprendido entre las 3 y las 6 horas cuando los procesos moleculares responsables de la promoción de eventos tardíos son estimulados por las citocininas.

Al nivel de síntesis de ARN mensajeros, nuestros resultados muestran un cierto número de mensajes afectados por las citocininas, pero no parecen hacerlo al nivel de "todo o nada". Los efectos observados con el uso de  $\alpha$ -amanitina si implican la existencia de transcripción *de novo*, pero el hecho de no haber detectado genes que se expresen diferencialmente puede mas bien radicar en la competencia de las técnicas empleadas. De hecho, es de esperarse que un gen regulador tenga precisamente un nivel bajo y un período limitado de expresión, lo que constituye un problema metodológico para su detección.

Al nivel de síntesis de proteínas, las citocininas no afectan la concentración de proteínas cuya actividad es importante una vez que se reinició el ciclo celular (E2F-1 y ciclina B), pero sí afectan tanto la concentración como la actividad de proteínas involucradas en el establecimiento del compromiso molecular para la entrada al ciclo (p53 y ciclina D1).

Con base a este comportamiento, puede sugerirse un mecanismo de acción de las citocininas durante la germinación de maíz, regulando directa o indirectamente la actividad de enzimas importantes que están presentes desde la semilla seca, como las proteínas p53 y ciclina D1. Ambas proteínas constituyen el blanco final de cascadas de transducción de una amplia variedad de señales, mediante las cuales la célula percibe su entorno y modula su destino metabólico. De esta manera, señales mitogénicas, nutricionales y de diferentes tipos de estrés son percibidas por la célula y transmitidas a estas proteínas durante la etapa G1 del ciclo celular antes de la transición sobre el punto R, pudiendo la célula en esta etapa decidir el rumbo hacia la proliferación, la quiescencia o la diferenciación (Hutchison and Glover, 1995). Debido a que estas proteínas son estimuladas por las citocininas durante la germinación de maíz, sería posible proponer que estos fitorreguladores actuaran a través de alguna ruta de transducción de señales.

Al respecto, existen en la literatura trabajos que muestran fosforilación *in vitro* de p53 por cinasas dependientes de ciclinas (cdks), proteína cinasa C (PKC), caseína cinasa II (CKII) y cinasas activadas por estrés (SAP-K) (Milne *et al.*, 1995). Estos reportes ofrecen claras evidencias de que la capacidad de unión al ADN de p53 es activada por fosforilación independiente en cada uno de tres sitios del dominio carboxilo terminal, por cdks, proteína cinasa C y caseína cinasa II. Estas interacciones se presentan también a nivel fisiológico.

Existen evidencias de la estimulación de la actividad de p53 a través de vías de transducción de señales que involucran a cinasas de serina/treonina tipo HOG1 de levaduras o JNK de eucariotes superiores (Milne *et al.*, 1995). Ambos tipos de proteínas están presentes en módulos de transducción tipo MAP cinasas (cinasas de proteínas activadas por mitógenos) que median repuestas a diferentes tipos de estrés, módulos que han sido recientemente detectados en

plantas (Nishihama *et al.*, 1995), y que podrían estar frenando el ciclo celular durante la germinación de semillas, en función de la cantidad limitada de agua.

Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que la cantidad de p53 disminuye hasta desaparecer por el efecto hormonal. Si uno de los efectos de la putativa p53 es regular negativamente la actividad de la ciclina D1 en su complejo ciclina/cdk y con ello inhibir la germinación, es posible suponer que lo hace anticipadamente en presencia de citocininas.

De esta manera, la actividad del putativo complejo ciclinaD-1/cdk4 de maíz representaría el blanco de vías de transducción de señales que modulan el avance de la reactivación del metabolismo durante la germinación (inducidas por mitógenos o por señales generadas por la entrada de agua a la semilla), y vías que modulan negativamente este proceso (en respuesta a la cantidad limitada de agua presente en el embrión quiescente -estrés hídrico-, bajas temperaturas, etc.), como se propone al comparar las etapas de quiescencia y de imbibición de semillas, con la regulación de la proliferación en función de factores externos descrita en eucariotes superiores (figura 14).

Actualmente, los sistemas de transducción de señales tipo MAP cinasas están siendo ampliamente estudiados, conociéndose la existencia de al menos tres vías paralelas que perciben una diversidad de estímulos externos como factores de crecimiento, factores nutricionales y de diferentes tipos de estrés, y que pueden incluir la transcripción génica como parte del mecanismo de acción. El presente modelo de estimulación de la germinación mediante la adición externa de un factor mitogénico, resulta bastante atractivo para proseguir los estudios analizando los tipos de vías que participen en la interpretación de los estímulos externos en células vegetales.



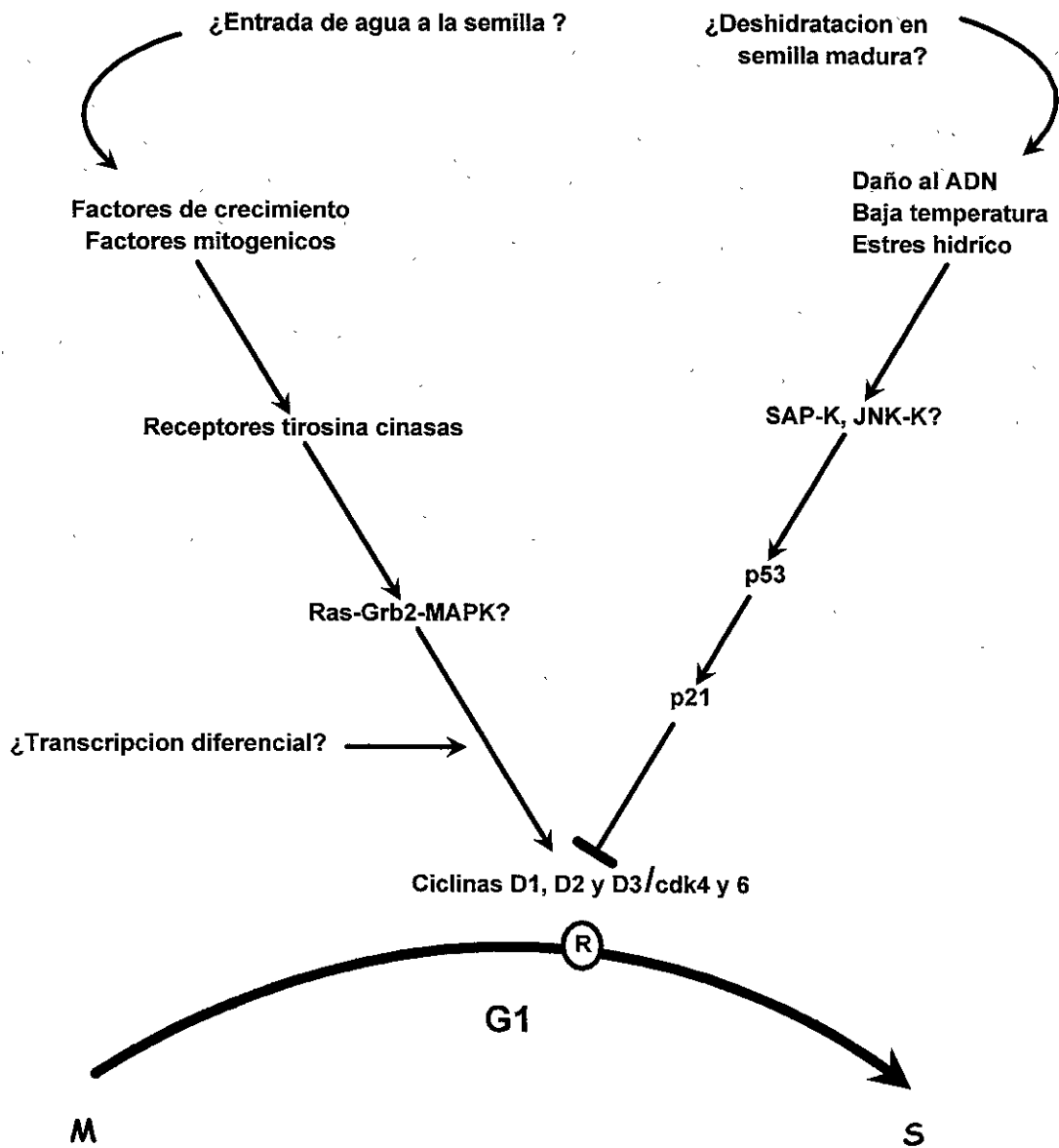


Figura 14. Modelo propuesto que relaciona el establecimiento de la germinación y el reinicio de la proliferación celular (Modificado de Hutchison, 1995).

# FALTAN PAGINAS

De la: 107

A la: 109

## 4.2 Conclusiones.

- Los mecanismos mediante los cuales las citocininas promueven efectos sobre la síntesis del ADN y el ciclo celular durante la germinación de maíz, se presentan efectivamente a niveles transcripcional y traduccional. A nivel transcripcional modulan la síntesis de mensajes potencialmente regulables por transducción de señales; a nivel traduccional promueven la desaparición (y por lo tanto adelantarían la actividad) de proteínas involucradas en la regulación de la entrada al ciclo celular.
- Mediante ensayos inmunológicos logró demostrarse la presencia en maíz de proteínas reguladoras del ciclo celular ampliamente descritas en eucariotes superiores, pero cuya presencia no había sido inequívocamente demostrada en plantas. Estas proteínas son el factor anti-tumoral p53, la ciclina D1, la cinasa dependiente de ciclinas cdk4, el factor transcripcional E2F y la ciclina B.
- Las citocininas inducen un cambio en la cantidad las proteínas p53 y ciclina D1, al mismo tiempo que modulan la actividad de una cinasa asociada de esta última. Por lo tanto, puede sugerirse que una forma mediante la cual las citocininas estimulan el metabolismo del ADN y acortan el ciclo celular durante la germinación de maíz es promoviendo la actividad de factores protéicos que constituyen puntos finales de vías de transducción de señales y que regulan la entrada al ciclo celular.
- Ya que tanto las proteínas estudiadas como los ARN mensajeros afectados por las citocininas están presentes en la semilla seca, el grueso del patrón transcripcional desplegado durante la germinación debe probablemente estar definido desde la etapa de embriogénesis. La expresión *de novo* de genes regulatorios específicos de la germinación debe estar sujeta a una regulación más fina en cuanto a la cantidad y al tiempo en que estos deben transcribirse.

## REFERENCIAS.

1. Baíza, A. M., Aguilar, R. and Sánchez-de-Jiménez, E. (1986) Histones and the first cell cycle in maize germination, *Physiol. Plant.* 68, 259.
2. Baíza, A. M., Vázquez-Ramos, J. M. and Sánchez-de-Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination, *J. Plant Physiol.* 135, 416.
3. Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D. Parry, D., Holder, A., Dickson, C. and Peters G. (1994) cdk6 (PLSTIRE) and cdk4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1, *Oncogene* 9, 71.
4. Bergounioux, C., Perennes, C., Hemerly, A. S., Qin, L. X., Sarda, C., Inzé, D. and Gadat, P. (1992) A cdc2 gene of *Petunia hybrida* is differentially expressed in leaves, protoplasts and during various cell cycle phases, *Plant Mol. Biol.* 20, 1121.
5. Bewley, J. D. and Black, M. (1994) *Seeds. Physiology of development and germination*, second ed., Plenum Press, New York, 1-233.
6. Bidwell, R. G. (1979) *Fisiología Vegetal*, A.G.T. editor, México, D. F., 75-77, 409-448.
7. Bradford, M. (1976) A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248.
8. Bray, C. M. (1995) in *Seed development and germination*. Chapter 28: Biochemical processes during the osmopriming of seeds, Kigel, J. and Galili, G. (eds.), Marcel Dekker Inc., New York, 767-789.
9. Brooker, J. D., Tomaszewski, M. and Marcus, A. (1978) Preformed messenger RNAs and early wheat embryo germination, *Plant Physiol.* 61, 145.
10. Cardoso, M. C., Leonhardt, H. and Nadal\_ginard, B. (1992) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication, *Cell* 74, 979.
11. Carlier, A. R., Manickam, A. and Peumans, W.J. (1980) Characterization of a maturation-specific mRNA in dry mung bean embryonic axes, *Planta* 149, 227.
12. Ching, T. M. (1972) Metabolism of germinating seed, In T. T. Kozlowski (ed), *Seed Biology*, vol. 3, Academic Press, New York, 116-117.
13. Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step isolation of RNA, DNA and Proteins from cell and tissue samples, *Biotechniques* 15(3), 532.

14. Coello, P., Rodríguez, R. García, E. and Vázquez-Ramos, J. M. (1992) A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role, *Plant Mol. Biol.* 20, 1159.
15. Coello, P. and Vázquez-Ramos, J. M. (1995) Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination, *Eur. J. Biochem.* 231, 99.
16. Cohen, J. D. (1982) Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-l-aspartate from seeds of *glycine max L.*, *Plant Physiol.* 70, 749.
17. Colasanti, J., Tyers, M. and Sundaresan V. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cdc2 homologue from *Zea mayz*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3377,
18. Dalton, S. (1992) Cell cycle regulation of the human cdc2 gene, *EMBO J.* 11(5), 1797.
19. Datta, R. W., Thomas, M. and Marcus, A. (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA, *Plant Physiol.* 72, 394.
20. Deltour, R. and Jacquard, A. (1974) Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays L.*, *Ann. Bot.* 38, 329.
21. Delseny, M., Aspart, L. and Guitton, Y. (1977) Disappearance of stored polyadenylic acid and mRNA during early germination of radish (*Raphanus sativus L.*) embryo axes, *Planta* 135, 125.
22. Dulic, V., Lees, E. and Reed, S. I (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase, *Science* 257, 1958.
23. Dure, L. S. (1975) Seed formation, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 259.
24. Ethier, J.F., Houde A., Lussier J.G. and Silversides D.W. (1994) Bovine activin receptor type II cDNA: cloning and tissue expression, *Mol Cell Endocrinol* 106(1), 1.
25. Eeuwens, C. L. and Schwabe, W. W. (1975) Seed and pod wall development in *Pisum sativum L.*, in relation to extracted and applied hormones, *J. Exp. Bot.* 26, 1.
26. Evans, T., Rosenthal, E., T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at the end cleavage division, *Cell* 33, 389.
27. Feiler, H. S. and Jacobs, T. W. (1990) Cell division in higher plants: A cdc2 gene, its p34 protein product, and histone H1 kinase activity in pea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5397.
28. Feng Z.M., Madigan M.B. and Chen C.L. (1993) Expression of type II activin receptor genes in the male and female reproductive tissues of the rat, *Endocrinology* 132(6), 2593.

29. Ferreira, P. C. G., Hemeryly, A. S., Villaroel, R., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1991) The Arabidopsis functional homologue of the p34<sup>cdc2</sup> protein kinase, *Plant Cell* 3, 531.
30. Flaman, J.-M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Chappuis, P., Sappino, AP., Limacher, J.-M., Bron, L., Benhattar, J., Tada, M., Estreicher, A. and Iggo, R.D. (1995) A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood and tumours, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3963.
31. Fletcher, R. A. (1969) Retardation of leaf senescence by BA in intact bean plants, *Planta* 89, 1.
32. Flores, S. and Tobin, E. M. (1986) BA modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast protein in *Lemna gibba*: apparent post-transcriptional regulation, *Planta* 168, 340.
33. Francis, D. and Halford, N. G. (1995) The Plant cell cycle, *Physiol. Plant.* 93, 365.
34. Galli, M. G., Levi, M. and Sparvoli, E. (1981) Lack of correlation between overall protein synthesis and the onset of elongation in germinating embryos of *Haplopappus gracilis*, *Physiol. Plantarum* 51, 321.
35. Galli, M. G. (1984) Synthesis of DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and Benzyladenine. *Planta* 160, 193.
36. Georgieva, E. I., López-Rodas, G., Sendra, R., Gröbner, P. and Loidl, P. (1991) Histone acetylation in *Zea mays*. II. Biological significance of post-translational Histone acetylation during embryo germination, *J. Biol. Chem.* 266, 18751.
37. Georgieva, E. I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G. and Loidl, P. (1994a) Maize embryo germination: I. Cell cycle analysis, *Planta* 192, 118.
38. Georgieva, E. I., López-Rodas, G. and Loidl, P. (1994b) Maize embryo germination: II. Proteins related to nuclear proto-oncogene and tumor suppressor gene products, *Planta* 192, 125.
39. Haizel, T., Merkle, T., Turck, F. and Nagy, F. (1995) Characterization of membrane-bound small GTP-binding proteins from *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol.* 108, 59.
40. Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1996) Structure of the C-terminal region of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> complexed with human PCNA, *Cell* 87, 297.
41. Hammet, J. R. and Katterman, F. R. (1975) Storage and metabolism of poly(adenylic acid)-mRNA in germinating cotton seeds, *Biochemistry* 14, 4375.
42. Harvey, B. M. R., Lu, B. C. and Fletcher, R. A. (1974) BA accelerates chloroplast differentiation and stimulates photosynthetic enzyme activity in cucumber cotyledons, *Can. J. Bot.* 52, 2481.

43. Hata, S., Kouchi, H., Suzuka, I. and Ishi, T. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins, *EMBO J.* 10, 2681.
44. Hilden K, Tuuri T, Eramaa M and Ritvos, O. (1994) Expression of type II activin receptor genes during differentiation of human K562 cells and cDNA cloning of the human type IIB activin receptor, *Blood* 83(8), 2163.
45. Hill, A. T. (1977) *Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal*, Ed. Omega, Barcelona, España.
46. Hirt, H., Pay, A., Bako, L., Nemeth, K., Bögre, L., Schweyen, R. J., Herbele-Bors, E. and Dudits, D. (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34<sup>cdc2</sup>, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88, 1636.
47. Hutchison, C. and Glover, D. M. (eds) *Cell cycle control*, first ed. Oxford University Press, England, 1995.
48. Ikeda M., Jakoi L., and Nevins J. (1996) A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(08), 3215.
49. Kaldis, P., Sutton, A. and Solomon, M. J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* 86, 553.
50. Karssen, C. M. (1968) The light promoted germination of the seeds of *Chenopodium album* L. ; II. Effects of (RS) abscisic acid, *Acta Bot. Neerl.* 17, 293.
51. Karssen, C. M., Brinkhorst-Van der Swan, D. L. C. Breekland, A. E. and Koornneef, M. (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Planta* 157, 158.
52. Kato, J-Y., (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4, *Genes Dev.* 7, 331.
53. Kelman, Z. (1997) PCNA: structure, functions and interactions, *Oncogene* 14, 629.
54. Knoblich, J. A.Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. and Lehner, C. F. (1994) Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation, *Cell* 77, 107.
55. Koornneef, M., Reuling, G. and Karssen, C. M. (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Plant.* 61, 377.
56. Krude, T., Jackman, M., Pines, J. and Laskey, R. A. (1997) Cyclin/cdk-dependent initiation and DNA replication in a human cell-free system, *Cell* 88, 109.

57. Lane, D. P. (1992) P53, Guardian of the genome, *Nature* 358, 15.
58. Lee M. H., Reynisdottir, I. and Massagué, J. (1995) Cloning of p57<sup>Kip2</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution, *Genes Dev.* 9, 639.
59. Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S. I. and Harlow, E. (1992) Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner, *Genes Dev.* 6, 1874.
60. Lees, E. M. and Harlow, E. (1993) Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A is sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase, *Mol. Cell. Biol.* 13, 1194.
61. Lew, D. J., Dulic, V. and Reed, S. I. (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Clh) functions in yeast, *Cell* 66, 1197.
62. Liang, P. and Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* 257, 967.
63. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, and Lodish HF (1992) Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase, *Cell* 68(4), 775.
64. Longo, G. P. M., Bracale, M., Rossi, G. and Longo, C. P. (1990) BA induces the appearance of LHCP-mRNA and of the relevant protein in dark-grown excised watermelon cotyledons, *Plant Mol. Biol.* 14, 569.
65. López, I., Khan, S., Vázquez-Ramos, J. and Hussey, P. (1995) Molecular cloning of a cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen, *Biochem. Biophys. Acta* 1260, 119.
66. López-Rodas, G., Georgieva, E. I., Sendra, R., and Loidl, P. (1991) Histone acetylation in *Zea mays*. I. Activities of Histone acetyltransferases and Histone deacetylases, *J. Biol. Chem.* 266, 18745.
67. Lu, Jia-Ling, Ertl, J. R. and Chen, Chong-maw. (1990) Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves, *Plant Mol. Biol.* 14, 585.
68. Marcus, A., Feeley, J. and Volcani, J. (1966) Protein synthesis in imbibed seeds. III: Kinetics of amino acid incorporation, ribosome activation and polysome formation, *Plant Physiol.* 41, 1167.
69. Martin, C. and Northcote, D. H. (1981) Qualitative and quantitative changes in mRNA of castor beans during the initial stages of germination, *Planta* 151, 189.
70. Mathews L. S. and Vale W. W. (1991) Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase, *Cell* 65(6), 973.



71. Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J. (1991) Colony-Stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle, *Cell* 65, 701.
72. Matzuk M. M. and Bradley A. (1992) Cloning of the human activin receptor cDNA reveals high evolutionary conservation, *Biochim Biophys Acta* 1130(1), 105.
73. Maxson, R., Coohn, R., Kedes, L. and Mohun, T. (1983) Expression and organization of Histone genes, *Annu. Rev. Genet.* 17, 239.
74. Mayer, A. M. and Poljakoff, A. (1975) "The germination of seeds", Second Ed. Pergamon Press, pp. 21-26.
75. Means, A. L., Slansky, J. E., McMahon, S. L., Knuth, M. W. and Farnham, P. J. (1992) The HIP1 binding site is required for growth regulation of the dihydrofolate reductase gene promoter, *Mol. Cell. Biol.* 12, 1054.
76. Meek, D.W. (1994) Post-translational modification of p53, *Sem. Cancer Biol.* 5, 203.
77. Miao, G. H., Hong, Z. and verma, D. P. S. (1993) Two functional soybean genes encoding p34<sup>cdc2</sup> protein kinases are regulated by different plant development pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 943.
78. Miller, C. O., Skoog, F., Okamura, F. S., Saltza, M. H. and Strong, F. M. (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1345.
79. Milne, D.M., Campbell, D.G. Caudwell, F. B. and Meek, D.W. (1994) Phosphorylation of the tumour suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases, *J. Biol. Chem.* 269, 9253.
80. Mizuno K., Okano I., Ohashi K., Nunoue K., Kuma K., Miyata T. and Nakamura, T. (1994) Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif, *Oncogene* 9(6), 1605.
81. Muñoz, J. L., Martin, L., Nicolás, G. and Villalobos, N. (1990) Influence of endogenous cytokinins on reverse mobilization in cotyledons of *Cicer arietinum* L., *Plant Physiol.* 93, 1011.
82. Naito, K., Tsuji, H. and Hatekeyama, I. (1978) Effect of BA on DNA, RNA, protein, and chlorophyll contents in intact bean leaves: differential responses to BA according to leaf age, *Physiol. Plant.* 43, 367.
83. Nishihama R, Banno H, Shibata W, Hirano K, Nakashima M, Usami S and Machida Y. (1995) Plant homologues of components of MAPK (mitogen-activated protein kinase). signal pathways in yeast and animal cells, *Plant Cell Physiol.* 36(5), 749.

84. Norbury, C., Blow, J. and Nurse, P. (1991) Regulatory phosphorylation of p34cdc2 protein kinase in vertebrates, *EMBO J.* 10, 3321.
85. Nurse, P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase, *Nature* 344, 503.
86. Ohya, T. and Suzuki, H. (1991) The effects of BA on the accumulation of messenger RNAs that encode the large and small subunits of RubisCO and LHCPa/b protein in excised cucumber cotyledons, *Plant Cell Physiol.* 32(4), 577.
87. Okubara P. A., and Tobin E. M. (1991) Isolation and characterization of three genes negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba*, *Plant Physiol.* 96, 1327.
88. Okubara P. A., and Tobin E. M. (1993) Analysis of genes negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba* and identification of a promoter region required for phytochrome responsiveness, *Plant Physiol.* 101, 915.
89. Osborne, D. J. (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* 61, 3568.
90. Parcy, F., Vaon, Ch., Kohara, A., Miséra, S. and Giraudat, J. (1997) The ABSCICIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3, and LEAFY COTYLEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development, *The Plant Cell* 9, 1265.
91. Peter, M. and Herskowitz, I. (1994) Joining the complex: cyclin-dependent inhibitory proteins and the cell cycle, *Cell* 79, 181.
92. Pines, J. and Hunter, T. (1991) Human cyclins A and B are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport, *J. Cell Biol.* 115, 1.
93. Pines, J. (1993) Cyclins and cyclin-dependent kinases: Take your partner, *Trends Biochem. Sci.* 18, 195.
94. Polyak, K., Lee, M.-H., Solomon, M., C. J., Massague, J., Roberts, J. M. and Koff, A. (1994) p27kip1 and cyclinD-cdk4, interacting regulators of cdk2, link TGF-B and contact inhibition to cell cycle arrest, *Genes Dev.* 8, 9.
95. Proschel C., Blouin M.J., Gutowski N.J., Ludwig R., and Noble M. (1995) Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro, *Oncogene* (7), 1271.
96. Qin, L. X., Richard, L., Perennes, C., Godal, P. and Bergounioux, C. (1995) Identification of a cell cycle-related gene, cyclin *Nicotiana tabacum* (L), *Plant Physiol.* 108, 425.
97. Quatrano, R. S. (1987) in *Plant hormones and their role in plant growth and development*, P. J. Davies, ed., Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, p. 494.

98. Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. (1992) *Biology of plants*, fifth ed. Worth publishers, New York, pp. 545-562.
99. Renaudin, J. P., Colasanti, J., Rime, H., Yuan, Z. And Sundaresan V. (1994) Cloning of four cyclins from maize indicate that higher plant have three structurally distinct groups of mitotic cyclins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7375.
100. Reyes-Jiménez, J. (1988) Estimulación de la síntesis de ADN durante las primeras horas de la germinación de *Zea mays* L. por benciladenina, tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
101. Reyes-Jiménez, J., Jiménez-García, L. F., González, M. A. and Vázquez-Ramos, J. M. (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize, *Seed Science Res.* 1, 113.
102. Russell, P. and Nurse, P. (1986) *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast, *Cell* 45, 145.
103. Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massagué, J. and Pavletich, N. P. (1996) Crystal structure of the p27kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-cdk2 complex, *Nature* 382, 325.
104. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
105. Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. and López, S. (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 99, 445.
106. Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R. (1984) Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos, *Plant Physiol.* 75, 231.
107. Sen, S. and Osborne, D. J. (1975) Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos and the relationship to early protein synthesis, *Biochem. J.* 148, 381.
108. Seyer, P. and Lescure, A. M. (1984) Evidence for changes in plastid mRNA populations during cytokinin induced chloroplast differentiation in tobacco cell suspensions, *Plant Sci. Letters* 36, 59.
109. Simon, E. W. (1984) Early events in germination, in "Seed physiology V; II. Germination and reserve mobilization, David R. Murray, de. Academic Press, Australia, pp. 77.
110. Skoog, F. and Miller, D. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118.

111. Soni, R. , Carmichael, J. P., Shah, Z. H. and Murray, J. A. H. (1995) A family of cyclin D homologous from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif, *Plant Cell* 7, 85.
112. Su, J.-J., Rempel, R. E., Erikson, E. and Maller, J. L. (1995) Cloning and characterization of the *Xenopus* cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>xicl</sup>, *Proc. Natl. Aced. Sci. USA* 92, 10187.
113. Suzuki, Y. and Minamikawa, T. (1985) On the role of stored mRNA in protein synthesis in embryonic axes of germinating *Vigna unguiculata* seeds, *Plant Physiol.* 79, 327.
114. Suzuki A., Shioda N., Maeda T., Tada M. and Ueno N. (1994) Cloning of an isoform of mouse TGF-beta type II receptor gene, *FEBS Lett* 355(1), 19.
115. Teysseidier de la Serve, B., Axelos, M. and Péaud-Ienoël, C. (1985) Cytokinins modulate the expression of genes encoding the protein of the light-harvesting chlorophyll a/b complex, *Plant Mol. Biol.* 5, 155.
116. Toshima J., Ohashi K., Okano I., Nunoue K., Kishioka M., Kuma K., Miyata T., Hirai M., Baba T. and Mizuno K. (1995) Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells, *J Biol Chem* 270(52), 31331.
117. Tsuchida K, Lewis KA, Mathews LS and Vale WW (1993) Molecular characterization of rat transforming growth factor-beta type II receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191(3), 790.
118. Van Staden, J. (1983) Seeds and Cytokinins, *Physiol. Plant.* 55, 60.
119. Vázquez-Ramos, J. and Osborne, D. J. (1986) Chromatography analysis of the DNA synthesized during early germination of rye, *Mut. Res.* 166, 39.
120. Vázquez-Ramos, J. M. and Reyes, J. (1990) Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity during early germination of maize embryo axes, *Can. J. Bot.* 45, 649.
121. Weintraub, S. J., Prater, C. A. and Dean, D.C. (1992) Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element, *Nature* 358, 259.
122. Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P. and Gutiérrez, C. (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma protein family of growth regulatory proteins, *EMBO J.* 15, 4900.
123. 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, 504.
124. Yanishevsky, R. M. and Stein, G. H. (1981) Regulation of the cell cycle in eucaryotic cells, *Int. Rev. Cytol.* 69, 223.
125. Yokoyama, M., Naito, K. and Susuki, H. (1981) BA-enhanced cell proliferation and suppressed greening in attached young bean leaves, *Plant Cell Physiol.* 22, 623.

126. Zaráin, H. M., Bernal-Lugo, I. and Vázquez-Ramos, J. M. (1987) Effect of benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes, *Mut. Res.* 181, 103.
127. Zlatanova, J. S., Ivanov, P. V., Stoilov, L. M., Chimshirova, V. and Stanchev, B. (1987) DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize, *Plant Mol. Biol.* 10, 139.
128. Zwar, J. A. (1973) Effects of cytokinins on the nucleic acids of tobacco pith, *J Exp. Bot.* 24, 701.
129. Zúñiga Aguilar, J. J., Efecto de Benciladenina sobre la población de RNA mensajeros presentes durante la germinación de maíz, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 1991.
130. Zúñiga-Aguilar, J. J., López-Villaseñor, I., Gómez-Gutiérrez, A. and Vázquez-Ramos, J. M. (1995) Does benzyladenine stimulates DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination?, *Seed Sci. Res.* 5, 219.
131. Zúñiga-Aguilar, J. J., Cruz-García, F. and Vázquez-Ramos, J. M. (1998) Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins, *Physiol. Plant.*, in press.