



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

### Análisis de las proteínas ZmKRP1;1 y ZmKRP3 de maíz

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

**PRESENTA:**

**RODRIGO ANDRÉS NAVA LARA**



Ciudad de México

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Profesora: Mireya Rodríguez Penagos  
**Vocal:** Profesora: Martha Patricia Coello Coutiño  
**Secretario:** Profesora: Aurora Lara Núñez  
**1<sup>er</sup> suplente:** Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
**2<sup>do</sup> suplente:** Profesora: Sara Margarita Garza Aguilar

### **SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 114, Conjunto E, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM

**Asesor del tema:** \_\_\_\_\_  
Dra. Aurora Lara Núñez

**Sustentante:** \_\_\_\_\_  
Rodrigo Andrés Nava Lara

## **AGRADECIMIENTOS**

- ✿ A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por la influencia que han tenido en mi educación, en mi formación y en mi vida.
- ✿ Al laboratorio 114, por ser un lugar donde vine a aprender tantas cosas, donde comencé a formarme como un científico abocado a la investigación, y por ser un lugar donde he podido formarme como persona.
- ✿ A la Dra. Aurora Lara-Núñez, por haberme dado la confianza de trabajar en su laboratorio y en este proyecto, aún a pesar de todas las adversidades encontradas; por los consejos y por el apoyo.
- ✿ Al Dr. Jorge M. Vázquez-Ramos, por todo el apoyo que me dio para el avance de mi proyecto, por todas las aportaciones realizadas, por haber formado un buen grupo de gente genial en el laboratorio.
- ✿ Al Dr. Elpidio García-Ramírez, que me ayudó con muchísimas de las técnicas aprendidas en el laboratorio, y me brindó su amistad en ámbitos laborales y de esparcimiento, y por tener fe en la realización de este trabajo.
- ✿ A todos los compañeros (actuales y anteriores) que han estado conmigo en el laboratorio: Mingyar, Brendy, Fernanda, Pablo, Jesús, Diana, Javier, Cassandra, Jorge López, Aldo, Samantha, Mariana, Omar, Elena, Céfora, Gris, Jorge Zamora, Fernando, Roberto Carlos... (se me pasarán algunos) y en especial a Víctor, Silvia y Sara. De todos y cada uno he aprendido mucho y me quedo con la buena experiencia de realizar mi tesis en este laboratorio con su conocimiento, su apoyo, su compañía y amistad.
- ✿ A las profesoras miembros de mi jurado, Mireya Rodríguez Penagos, Martha Patricia Coello Coutiño, Tzvetanka Dimitrova Dinkova y Sara Margarita Garza Aguilar (de nuevo) por las aportaciones, correcciones y comentarios realizados durante la revisión de esta tesis.
- ✿ A todas esas personas de la Facultad de Química que he conocido ya sea en persona o en redes sociales, que me han motivado a seguir adelante siempre.

- ✿ A mis familiares, mi padre Luis Antonio, mi madre Laura Patricia, mi hermano Adrián, mi abuelita Cruz, mi abuelo Daniel donde quiera que esté, por haberme impulsado a seguir adelante académica y personalmente. Todo el amor y todas las buenas vibras. Este trabajo va dedicado a ustedes.
  
- ✿ A Mits, casi 11 años de amistad lo dicen todo, haber estado siempre ahí en las mejores y en las peores circunstancias te hace valer mucho, nunca se te olvide que siempre contarás conmigo y que se te quiere un montón. Todo el cariño y la buena suerte, el trabajo también va dedicado a ti.
  
- ✿ A la DGAE por la beca de titulación otorgada.
  
- ✿ A los programas PAPIIT IN215316/IA204817, PAIP 5000-9124/5000-9130 y CONACyT CB220661 por el financiamiento de este proyecto.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Página</b>
<i>Índice de figuras</i> -----	1
<i>Índice de tablas</i> -----	1
<i>Índice de apéndices</i> -----	2
<i>Abreviaturas</i> -----	3
<b>1. Resumen</b> -----	<b>5</b>
<b>2. Introducción</b> -----	<b>6</b>
<b>3. Antecedentes</b> -----	<b>7</b>
<u>3.1. Marco teórico</u> -----	7
<u>3.2. Antecedentes inmediatos</u> -----	25
<b>4. Justificación</b> -----	<b>31</b>
<b>5. Hipótesis</b> -----	<b>31</b>
<b>6. Objetivos</b> -----	<b>32</b>
<u>6.1. Objetivo general</u> -----	32
<u>6.2. Objetivos particulares</u> -----	32
<b>7. Materiales y metodología</b> -----	<b>33</b>
<b>8. Resultados</b> -----	<b>52</b>
<b>9. Análisis y discusión de resultados</b> -----	<b>72</b>
<b>10. Conclusiones</b> -----	<b>83</b>
<b>11. Perspectivas</b> -----	<b>83</b>
<b>12. Referencias bibliográficas</b> -----	<b>84</b>
<b>13. Apéndices</b> -----	<b>92</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> (Estructuras internas de la semilla de maíz) -----	10
<b>Figura 2</b> (Curso temporal de eventos relacionados a la germinación) -----	13
<b>Figura 3</b> (Esquema representativo del ciclo celular) -----	15
<b>Figura 4</b> (Representación esquemática de la transición G <sub>1</sub> /S) -----	18
<b>Figura 5</b> (Árbol filogenético de KRPs de <i>Arabidopsis</i> , arroz y maíz) -----	22
<b>Figura 6</b> (Ensayos de abundancia de ICK a lo largo de la germinación con BA y ABA) -----	26
<b>Figura 7</b> (Análisis de expresión de genes de KRPs de maíz) -----	27
<b>Figura 8</b> (Interacciones de KRPs de <i>Arabidopsis</i> con proteínas y complejos Cyc/CDK) -----	29
<b>Figura 9</b> (Fórmula para calcular cantidad de inserto de PCR para ligación) -----	40
<b>Figura 10</b> (Integridad de RNA extraído para RT-PCR) -----	52
<b>Figura 11</b> (Amplificación del CDS de <i>ZmKRP3</i> ) -----	53
<b>Figura 12</b> (Verificación y digestión de construcciones pGEM®-T easy- <i>ZmKRP3</i> ) -----	54
<b>Figura 13</b> (Determinación de identidad entre secuencias de <i>ZmKRP3</i> teórica y secuenciada) -----	55
<b>Figura 14</b> (Inducción de proteínas recombinantes GST-KRP3 completa y parcial) -----	58
<b>Figura 15</b> (WB de purificación de proteínas GST-KRP3 completa y parcial con $\alpha$ -KRP3) -----	59
<b>Figura 16</b> (Ensayos de inmunorreconocimiento de anticuerpos con ET y proteína sintética) -----	62
<b>Figura 17</b> (Ensayo de competencia de proteína recombinante His-KRP1;1 contra sí misma) -----	63
<b>Figura 18</b> (Nuevo ensayo de inmunorreconocimiento de $\alpha$ -KRP3) -----	64
<b>Figura 19</b> (Ensayo de competencia de ZmKRP3) -----	65
<b>Figura 20</b> (Predicción de modificaciones postraduccionales y exposición a solventes de ZmKRPs) -----	66
<b>Figura 21</b> (Predicción de estructura secundaria y exposición a solventes en PredictProtein) -----	67
<b>Figura 22</b> (Predicción de zonas intrínsecamente desordenadas en PredictProtein) -----	69
<b>Figura 23</b> (Modelos tridimensionales de ambas ZmKRPs a partir de <i>Phyre2</i> ) -----	70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> (Datos estimados de producción mundial de maíz, trigo, arroz y soya) -----	7
<b>Tabla 2</b> (Clasificación taxonómica del maíz) -----	8
<b>Tabla 3</b> (Proporción de componentes bioquímicos en las 3 partes principales de la semilla de maíz) -----	9
<b>Tabla 4</b> (Primers utilizados para amplificar el CDS de <i>ZmKRP3</i> ) -----	33
<b>Tabla 5</b> (Búsqueda de condiciones de PCR para amplificación de <i>ZmKRP3</i> ) -----	37

# ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Apéndice 1</b> (Alineamiento de secuencias génicas de <i>ZmKRP3</i> para diseño de primers) -----	92
<b>Apéndice 2</b> (Secuencia proteica de ZmKRP3 obtenida de Ensembl Plants) -----	93
<b>Apéndice 3</b> (Sitios de restricción del plásmido pGEM®-T easy) -----	93
<b>Apéndice 4</b> (Sitios de restricción del plásmido pET28b+) -----	94
<b>Apéndice 5</b> (Sitios de restricción del plásmido pGEX-4T-2) -----	94
<b>Apéndice 6</b> (Sitios de restricción hallados en el CDS de <i>ZmKRP3</i> ) -----	95
<b>Apéndice 7</b> (Secuencias Shine-Dalgarno en los promotores de pET28b+ y pGEX-4T-2) -----	95
<b>Apéndice 8</b> (Alineamiento de las 9 KRPs de maíz reportadas) -----	96
<b>Apéndice 9</b> (Primers para control positivo de PCR y para subclonación) -----	96
<b>Apéndice 10</b> (Resultado de secuenciación de construcción de <i>ZmKRP3</i> con primer KRP3-Reverse) -----	97
<b>Apéndice 11</b> (Resultado de secuenciación de construcción de <i>ZmKRP3</i> con primer T7) -----	97
<b>Apéndice 12</b> (Alineamiento de secuencias proteicas de ZmKRP3 teórica y experimental) -----	98
<b>Apéndice 13</b> (Amplificación y verificación de tamaño de <i>ZmKRP3</i> en pGEX-4T-2) -----	98
<b>Apéndice 14</b> (Rojo de Ponceau de los WB de la purificación de las proteínas GST-KRP3) -----	99
<b>Apéndice 15</b> (WB de purificación de proteínas GST-KRP3 completa y parcial con $\alpha$ -GST-CDKB) -----	99
<b>Apéndice 16</b> (Alineamiento de secuencias proteicas de ZmKRPs con sus posibles falsos positivos) -----	100
<b>Apéndice 17</b> (Resultados de la búsqueda de secuencias de 15 aa en genoma de <i>E. coli</i> ) -----	100
<b>Apéndice 18</b> (Secuencia hallada al buscar la secuencia de KLH en genoma de maíz) -----	101
<b>Apéndice 19</b> (Predicción de estructura secundaria y de regiones desordenadas en <i>Phyre2</i> ) -----	102
<b>Apéndice 20</b> (Confiabilidad de los modelos tridimensionales de <i>Phyre2</i> ) -----	103

## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ab</b>	Anticuerpo (Antibody)
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>BA</b>	Benciladenina
<b>BLAST</b>	Herramienta de búsqueda básica de alineamiento local (Basic Local Alignment Search Tool)
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
<b>C-terminal</b>	Carboxilo terminal
<b>CAK</b>	Cinasa activadora de CDK (CDK-Activating Kinase)
<b>CDK</b>	Cinasa dependiente de ciclina (Cyclin-Dependent Kinase)
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CDS</b>	Secuencia codificante (Coding Sequence)
<b>Cip/Kip</b>	Inhibidor de CDK en mamíferos (CDK/Kinase Inhibitory Protein)
<b>Cyc</b>	Ciclina (Cyclin)
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfatado
<b>DP</b>	Proteína compañera de dimerización (Dimerization Partner)
<b>E2F</b>	Factor de unión al promotor E2
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamintetraacético
<b>EdU</b>	5-etinil-2-deoxiuridina
<b>EST</b>	Marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tag)
<b>ET</b>	Extracto total de proteínas
<b>GC</b>	Par Guanina-Citosina
<b>GST</b>	Glutación S-Transferasa
<b>His</b>	Histidinas
<b>IAA</b>	Ácido indolacético
<b>IBT</b>	Instituto de Biotecnología
<b>ICK</b>	Inhibidor de CDK
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>KLH</b>	Hemocianina de lapa marina (Keyhole Limpet Hemocyanin)
<b>KRP</b>	Proteína relacionada a Kip (Kip-Related Protein)

<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>MBG</b>	Grado biología molecular (Molecular Biology Grade)
<b>MCS</b>	Sitio de clonación múltiple (Multiple-Cloning Site)
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnologic Information)
<b>Ni-NTA</b>	Níquel - ácido nitrilotriacético
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate Buffered Saline)
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PID</b>	Proteína intrínsecamente desordenada
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio
<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilideno
<b>RAM</b>	Meristemo apical de raíz (Root Apical Meristem)
<b>RID</b>	Región intrínsecamente desordenada
<b>RBR</b>	Proteína relacionada a retinoblastoma
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis)
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido sencillo (Single Nucleotide Polymorphism)
<b>SI</b>	Suero inmune
<b>SPI</b>	Suero preinmune
<b>SOG1</b>	Proteína supresora de respuesta gama 1 (Supressor of Gamma Response 1)
<b>ssp</b>	Subespecie
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N,N-tetrametiletilendiamina
<b>TM</b>	Temperatura de fusión (Melting Temperature)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UTR</b>	Región no traducida (Untranslated Region)
<b>WB</b>	Western-Blot
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## 1. RESUMEN

En maíz, la generación de una nueva planta inicia con la germinación, cuyo comienzo conlleva la activación de muchos procesos biológicos. Entre ellos se encuentra el ciclo celular, que es una serie de eventos finamente regulados, que tiene como finalidad generar 2 células hijas a partir de una, ambas con material genéticamente idéntico. Para llevar a cabo esta regulación algunas de las proteínas que participan son las ciclinas (Cyc) y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), que a su vez también pueden estar reguladas por otras proteínas, como por ejemplo las KRPs, que ejercen actividad inhibitoria sobre la actividad de cinasa de los complejos Cyc/CDK formados.

Uno de los objetivos de este trabajo fue obtener una de estas proteínas, la ZmKRP3, a partir de la amplificación de su gen, la clonación y la inducción de la proteína recombinante en un sistema heterólogo; además de realizar la caracterización y validación de anticuerpos producidos contra secuencias específicas de esta proteína y de la ZmKRP1; 1. Dados los resultados obtenidos en la parte experimental, fue necesario realizar un análisis *in silico* en las secuencias de ambas proteínas para encontrar características que pudieran explicar su inestabilidad. Se encontró que ambas proteínas presentaban sitios susceptibles a sufrir modificaciones postraduccionales degradativas (ZmKRP3 incluso presentaba un motivo de señalización de degradación denominado caja PEST); además se propuso que ambas son proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs), con bajos porcentajes de estructuras secundarias comunes ( $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -plegadas), y se obtuvo una predicción de su estructura tridimensional.

## 2. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se realizó la caracterización bioinformática y el análisis del comportamiento de las proteínas de maíz (*Zea mays ssp. mays*) ZmKRP1;1 y ZmKRP3, relacionadas con la regulación negativa del ciclo celular.

Previamente se han realizado estudios de expresión de la familia de genes que codifican para las 8 KRPs de maíz (Rosas-Bringas, 2015) y se ha observado cómo esta expresión se ve modificada por la presencia de agentes externos como azúcares (Lara-Núñez *et al.*, 2017), y que el comportamiento de los transcritos, no necesariamente correlaciona con el comportamiento a nivel proteico.

En trabajos previos ya ha sido reportada la interacción de algunas KRPs con otras proteínas de ciclo celular. En *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, se sabe que interaccionan con complejos de CycD con CDKA o CDKB (Nakai *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2002).

También es importante mencionar que hay algunos estudios en plantas que han requerido el uso de herramientas bioinformáticas disponibles en línea, tanto para poder predecir como para tratar de explicar la naturaleza de una proteína de acuerdo a resultados observados experimentalmente, utilizando estas predicciones para analizar aspectos como la estabilidad, las interacciones o las características estructurales que hacen que una proteína se comporte diferente a otra y, con base en eso, poder predecir la relación filogenética entre ambas (Jiménez-López *et al.*, 2016; Sonah *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2016; Lovisa *et al.*, 2016; Filiz *et al.*, 2017).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. MARCO TEÓRICO

##### EL MAÍZ

El maíz (*Zea mays ssp. mays*) es una planta herbácea, monocotiledónea y anual (Raven *et al.*, 1992), con una gran importancia a nivel histórico que ha llegado a perdurar hasta la actualidad, dado que ha sido parte importante de la base de muchas culturas mesoamericanas gracias a características seleccionadas a lo largo del tiempo, las cuales en la actualidad le confieren propiedades que han permitido su uso para alimentación humana y animal (Paliwal *et al.*, 2001), en aplicaciones industriales (principalmente en la fabricación de alimentos, de papel y de bebidas alcohólicas) e incluso como modelo de investigación en botánica (Vela, 2011).

Siendo así, no es de sorprender que se haya convertido en uno de los cereales más cultivados en el mundo, con cifras mayores de producción y consumo que las de trigo, arroz y soya durante el período 2015/2016

(Tabla 1).

**TABLA 1. Datos estimados de producción mundial (en millones de toneladas) de maíz, trigo, arroz y soya durante el período 2015/2016.**

Cereal	Maíz	Trigo	Arroz	Soya
Producción	970	736	481	315
Comercio	136	165	41	133
Consumo	968	721	474	311

Datos del Consejo Internacional de Cereales ([www.igc.int](http://www.igc.int)) GMR 470, 29 de septiembre de 2016.

De acuerdo a su clasificación taxonómica (Tabla 2), el maíz forma parte de un género (*Zea*) que incluye muchas otras plantas que se denominan genéricamente 'teocintle'. Dentro de la especie *Zea mays* se encuentran algunas otras subespecies denominadas del mismo modo, como *Zea mays ssp. mexicana* y *Zea mays ssp. parviglumis*; a esta última se le considera el precursor filogenéticamente más cercano al maíz actual (Doebley *et al.*, 1990; Matsuoka *et al.*, 2002) y a partir del cual los habitantes de

Mesoamérica habrían realizado una selección específica de características agronómicas desde hace al menos 8700 años en la zona del valle del Río Balsas (Guerrero, México), de donde se ha reportado que es originario el maíz (Piperno *et al.*, 2009; Matsuoka *et al.*, 2002).

**TABLA 2. Clasificación taxonómica del maíz.**

<b>Reino</b>	Plantae (plantas)
<b>Subreino</b>	Tracheobionta (plantas vasculares)
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta (plantas con semillas)
<b>División</b>	Magnoliophyta (plantas con flores)
<b>Clase</b>	Liliopsida (plantas monocotiledóneas)
<b>Subclase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Poaceae (Gramíneas)
<b>Género</b>	<i>Zea</i>
<b>Especie</b>	<i>Zea mays</i>
<b>Subespecie</b>	<i>Zea mays ssp. mays</i> (maíz)

Datos del Departamento de Agricultura de E.U.A. (<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ZEMA>)

A pesar de que las características morfológicas del maíz son diferentes respecto a las otras subespecies de *Zea mays*, a nivel molecular e inclusive celular las diferencias son poco notorias, siendo más importantes las estrechas similitudes: todas poseen 10 cromosomas, presentando únicamente 5 regiones significativamente diferentes en su genoma (Doebley *et al.*, 1990), el programa de división celular esencialmente es el mismo, y son capaces de producir híbridos totalmente fértiles y viables (Doebley, 2004).

Las plantas del género *Zea*, a diferencia de otras gramíneas, son de inflorescencia monoica; esto significa que presentan inflorescencias masculinas (panojas, que producen células espermáticas o microgametofitos) separadas de las femeninas (espigas o mazorcas, que producen ovocélulas o megagametofitos) dentro de la misma planta, lo cual incrementa las probabilidades de aumentar la variabilidad genética mediante la polinización abierta (Walbot y Evans, 2003).

## CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA DE MAÍZ

Dos de las diferencias más destacables entre el maíz y el teocintle son la morfología de sus mazorcas o espigas, y la de sus semillas o granos. El teocintle presenta una espiga de color verde a marrón oliváceo, con únicamente 2 filas de 5 a 10 semillas totalmente cubiertas por cúpulas, teniéndose una semilla por cúpula; mientras que la mazorca de maíz presenta varias filas de 8 a 30 granos que no alcanzan a estar cubiertos por sus cúpulas, y éstas pueden estar asociadas a más de un grano (Doebley *et al.*, 1990), además de presentar una diversidad mucho mayor de colores y formas en sus granos dependiendo de la variedad, pudiendo ser desde amarillo claro a azul oscuro, pasando por colores como verde pardo o inclusive rojo (Paliwal *et al.*, 2001). Estas nuevas características que fue adquiriendo el maíz lo hicieron propicio para ser la base de la alimentación (y veneración) de pueblos mesoamericanos como los olmecas, los mayas y los mexicas.

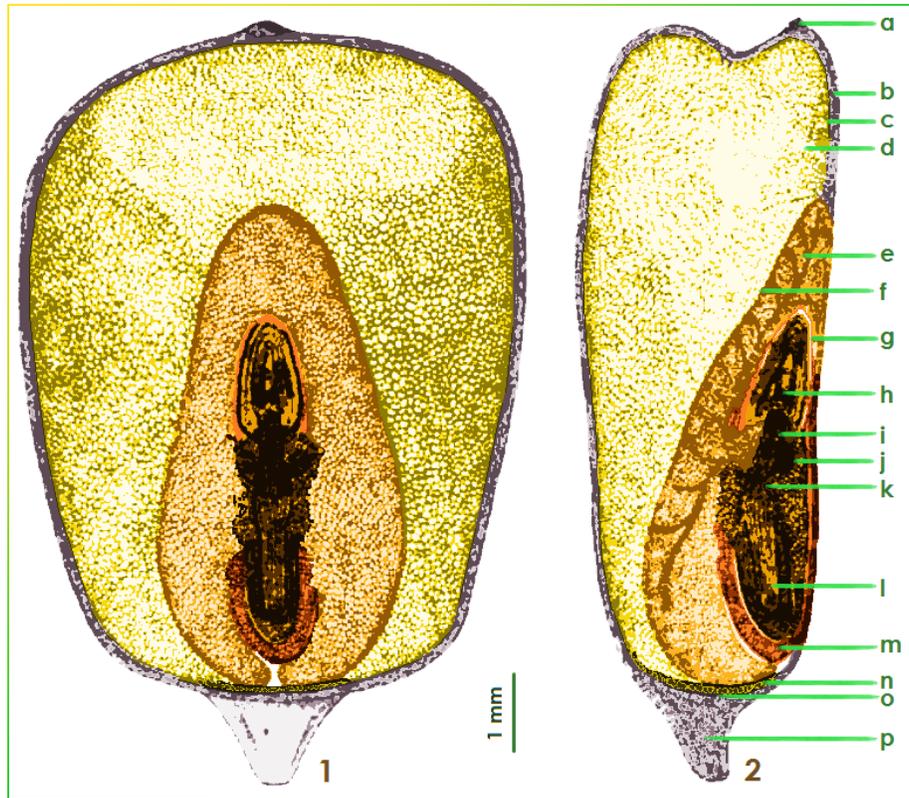
**TABLA 3. Proporción (en porcentajes) de componentes bioquímicos en cada una de las 3 partes principales de la semilla de maíz.**

<b>Componente (%)</b>	<b>Pericarpio</b>	<b>Endospermo</b>	<b>Embrión</b>
Proteínas	3.74	8.0	20.44
Grasas y aceites	1.04	0.79	36.89
Fibra cruda	86.70	2.7	9.78
Minerales	0.84	0.29	11.67
Almidón	7.34	87.6	9.22
Azúcares	0.34	0.62	12.0

*Datos del Depósito de Documentos de la FAO. El maíz en la nutrición humana..., capítulo 2*

*(<http://http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S03.htm>)*

El grano, semilla o cariopsis de maíz es la estructura a partir de la cual habrá de generarse una nueva planta. Se le cataloga dentro de las llamadas "semillas ortodoxas", es decir, semillas que adquieren tolerancia a la desecación durante periodos definidos de tiempo y en ciertas condiciones (Roberts, 1973; Berjak y Pammenter, 2002). Para su estudio se suelen distinguir 3 partes principales, las cuales se caracterizan por su contenido nutricional y químico (**Tabla 3**) y que son las siguientes:



**Figura 1.** Estructuras internas de la semilla de maíz, visibles al realizar en ella cortes verticales 1) transversal y 2) longitudinal. En esta última se señalan varias de las estructuras más importantes (ver texto): **a)** Hilio. **b)** Pericarpio. **c)** Capa de aleurona. **d)** Endospermo. **e)** Escutelo. **f)** Capa glandular escutelar. **g)** Coleoptilo. **h)** Plúmula. **i)** Mesocotilo. **j)** Primordio de raíz lateral adventicia. **k)** Nodo escutelar. **l)** Radícula. **m)** Coleorriza. **n)** Capa basal de transferencia. **o)** Capa de abscisión. **p)** Pedicelo. (Modificado de Hoseney, 1991).

**Pericarpio** - Capa externa transparente a modo de "cáscara" que envuelve y protege a la semilla. Se caracteriza por tener un alto contenido de fibras y por contener material genético materno, debido a que deriva de la pared del óvulo.

**Endospermo** - Comprende aproximadamente el 85% del peso total de la semilla, y contiene las reservas nutricionales (almidón, algunas proteínas y fibra en menor proporción) que se utilizarán durante y después de la germinación. Genéticamente es triploide, ya que procede de la fusión de una célula espermática con una célula central binucleada.

**Embrión** - Estructura que contiene toda la información necesaria para generar una nueva plántula. Sus componentes nutricionales se

encuentran en cantidades más equilibradas en comparación con el pericarpio y el endospermo, destacando el contenido de lípidos y proteínas. Es la parte genéticamente diploide de la semilla, producto de la unión de una célula espermática con una ovocélula (Walbot y Evans, 2003; Hosenev, 1991).

La **Figura 1** muestra estas 3 partes principales de la semilla de maíz a mayor detalle, observándose cómo a su vez están conformadas por órganos y tejidos con funciones específicas.

## LA GERMINACIÓN

Para que a partir de una semilla de maíz madura pueda desarrollarse una nueva planta, es necesario que ésta pase por un proceso denominado germinación. Este concepto no es fácil de definir, debido a que el estudio de las plantas se ha realizado desde enfoques variados y con objetivos diversos. Siendo así, se pueden mencionar 3 definiciones principales de germinación, dependiendo del contexto: la definición *agronómica*, la definición *fisiológica* y la definición *molecular*.

Las 3 definiciones coinciden en cómo inicia este proceso, estipulando que esto sucede cuando entra agua a una semilla en estado quiescente o metabólicamente inactiva, en un proceso conocido como imbibición (Mayer y Shain, 1974). En donde hay diferencias, es en cómo termina la germinación:

La *definición agronómica* estipula que la germinación finaliza cuando la plántula emerge de la superficie del suelo.

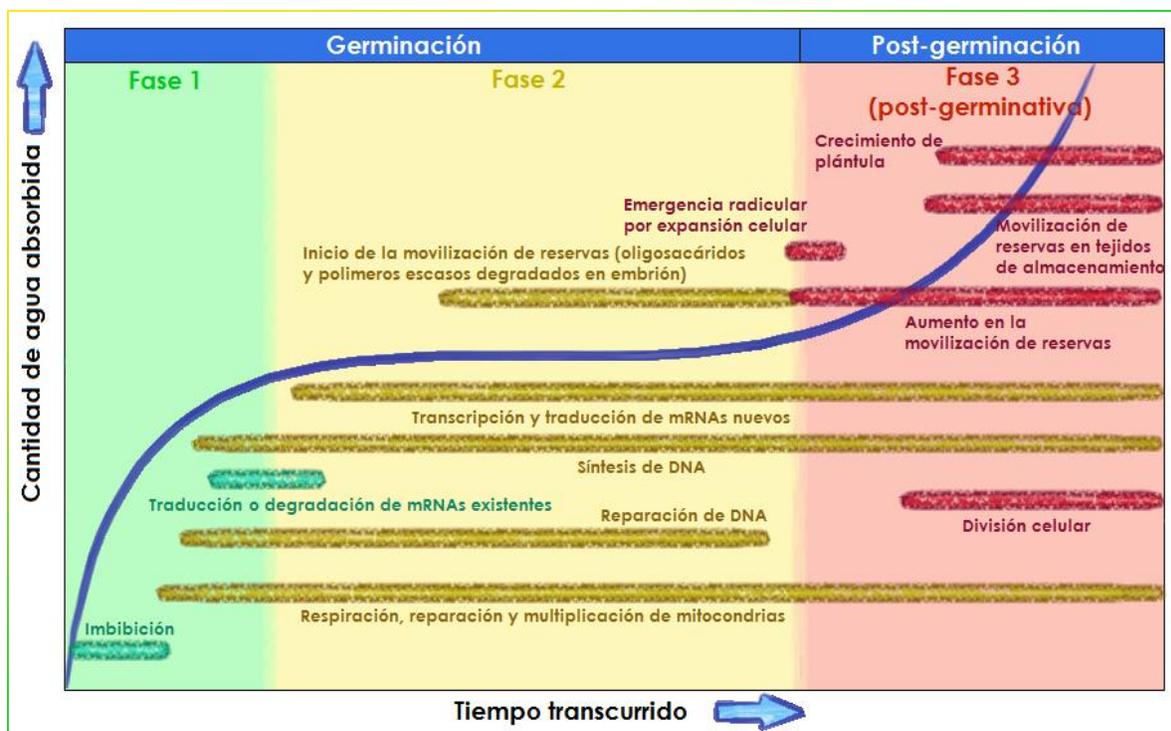
La *definición fisiológica* indica que el final de la germinación se da cuando el eje embrionario crece lo suficiente como para que la radícula atraviese la cubierta de la semilla, este proceso se denomina protrusión radicular (Bewley y Black, 1994). Es importante mencionar que puede haber germinación fisiológica sin que haya germinación agronómica, dado

que puede darse el caso en que posteriormente a la protrusión radicular, la semilla detenga su crecimiento y nunca emerja del suelo.

La **definición molecular** se estableció y se utiliza en nuestro grupo de trabajo, y postula que la culminación de la germinación se da cuando han existido los procesos bioquímicos y metabólicos que llevan a la finalización exitosa de la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas. Se ha adoptado esta definición por diversas razones: una de ellas sería la importancia que tiene el ciclo celular en el desarrollo de la plántula a nivel molecular, permitiendo a la semilla proseguir con procesos proliferativos y de crecimiento (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003), y otra sería que podría haber una omisión ambigua en la definición fisiológica debido a que la protrusión radicular puede también deberse a una elongación celular debida únicamente a fenómenos físicos, sin involucrar división celular; por lo tanto esto indicaría que semillas ya muertas aún podrían presentar germinación fisiológica, aunque es algo que sucede en muy pocas ocasiones (Buendía-Monreal, 2011).

En el momento en el que ocurre la imbibición en una semilla viable, se desencadenan varios procesos como la reparación y reactivación de la actividad de proteínas existentes, la hidratación de membranas y de estructuras celulares, la respiración celular, la elongación celular y la síntesis de macromoléculas. Estos procesos se pueden agrupar en 3 fases (Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010), que están definidas por la cantidad de agua que se absorbe en la semilla en función del tiempo transcurrido (**Figura 2**):

En la **fase 1**, la semilla absorbe una cantidad importante de agua y empieza a reparar su DNA, sus proteínas y sus mitocondrias, que podrían haber sufrido daños durante el proceso de quiescencia y desecación. Los genes de varias enzimas encargadas de estas reparaciones se sobreexpresan en los primeros momentos de la germinación (Ogé *et al.*, 2008; Vázquez *et al.*, 1991). Es importante recalcar que la toma inicial de



**Figura 2.** Curso temporal de eventos celulares y moleculares relacionados a la germinación y a los procesos posteriores a ésta en la semilla de maíz, en relación con la cantidad de agua absorbida por ésta (curva azul). (Modificado de Bewley, 1997; y de Nonogaki et al., 2010).

agua es un fenómeno exclusivamente físico que, como ya se mencionó, puede darse en semillas no viables. Esta hidratación también puede causar que algunas de las membranas internas de la semilla se dañen, lo cual desencadenaría una pérdida inicial de solutos de bajo peso molecular como iones (Bewley, 1997), la cual se va compensando conforme la germinación progresa. Durante la fase 1 también se procesan los mRNAs ya existentes, ya sea para su degradación o para síntesis *de novo* de proteínas, existiendo ya la maquinaria para este último proceso desde las primeras horas de germinación (Spiegel y Marcus, 1975). Además de la reparación de las mitocondrias, también se lleva a cabo su multiplicación.

En la **fase 2**, la toma de agua disminuye hasta alcanzar un nivel estable, manteniéndose el contenido de humedad de la semilla entre el 70-80%. En esta fase se consolidan varios de los procesos iniciados en la fase 1, y comienzan otros procesos como la síntesis *de novo* de DNA. La

síntesis de proteínas desde mRNAs nuevos también se lleva a cabo durante esta etapa, de manera independiente a la realizada a partir de mRNAs preexistentes (Spiegel y Marcus, 1975; Ching, 1972), y al final de esta fase inicia la movilización de reservas como oligosacáridos y restos de polímeros hacia el embrión, proceso que se lleva a cabo en su totalidad en la siguiente fase. Cabe mencionar que las semillas no viables que se imbibieron mecánicamente quedan detenidas en la fase 2.

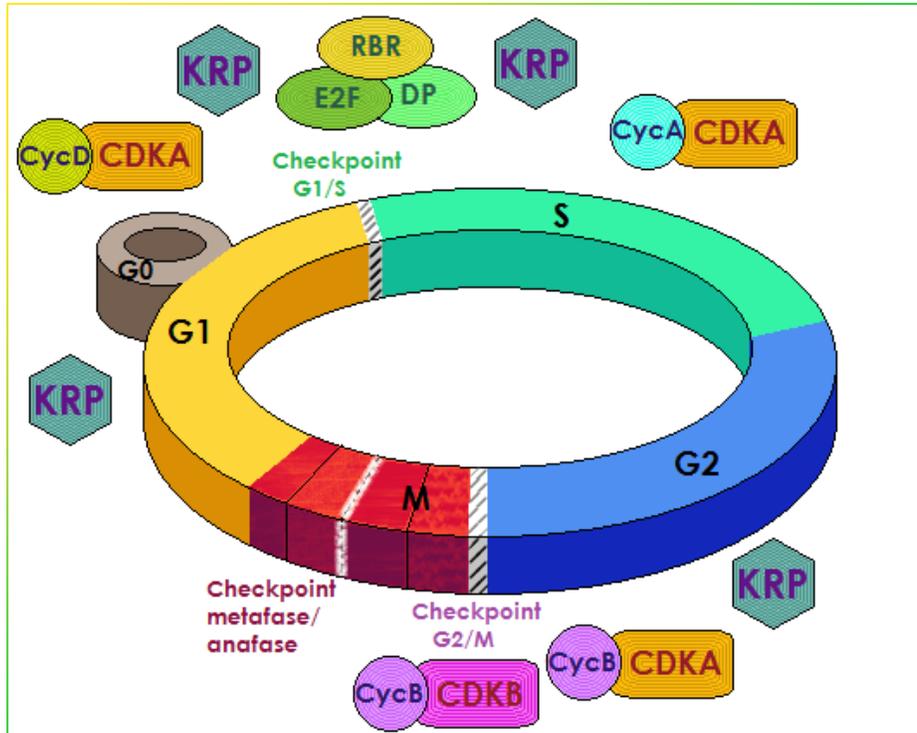
La **fase 3** ya se considera posterior a la germinación, en ella vuelve a haber un aumento en la toma de agua y las células de la radícula empiezan a elongarse y, la mayoría de las veces, a dividirse. En esta fase se lleva a cabo de lleno la movilización de reservas que inició al final de la fase 2 y la plántula comienza a crecer, por lo tanto va a existir influencia de factores ambientales en esta etapa (Bewley y Black, 1994).

## EL CICLO CELULAR

Para que la plántula pueda crecer, es necesario que existan las señales adecuadas para que las células puedan dividirse y proliferar. Esta división no se da de manera arbitraria sino que está fuertemente controlada para evitar que haya problemas en el crecimiento de la plántula. Esta regulación es llevada a cabo por diversas moléculas, señales y procesos que confluyen en lo que se denomina ciclo celular (**Figura 3**).

Al ciclo celular se le puede definir como una serie de eventos ordenados y regulados, cuyo objetivo final es dar origen a 2 células hijas genéticamente idénticas, y que tiene un papel determinante en el crecimiento y en el desarrollo de los organismos (Dewitte y Murray, 2003). De manera general se estipula que el ciclo celular consta de 4 fases diferentes: 2 fases de verificación o fases GAP ( $G_1$ ,  $G_2$ ) y 2 fases de procesamiento de material genético (S y M).

Durante la **fase  $G_1$** , la célula aumenta de tamaño a casi el doble, y verifica si las condiciones ambientales, nutrimentales y metabólicas son



**Figura 3.** Esquema que representa al ciclo celular, donde se indican sus fases, sus puntos de control (checkpoints) y algunas proteínas y complejos que lo regulan. (Modificado de Klug et al., 1999).

las adecuadas para entrar a la siguiente fase; si no lo son, pasan a estados de diferenciación o quiescencia (Zúñiga-Aguilar, 1998). Si prosigue el ciclo celular, entonces se empiezan a preparar mecanismos de ingreso a la fase posterior, como la duplicación de los organelos. Es en la fase G<sub>1</sub> en la cual la mayoría de las células en las semillas están detenidas antes de la imbibición (Deltour y Jacquard, 1974), y se ha reportado que la reactivación de ciclo celular se da alrededor de 6 horas después de la imbibición (Reyes *et al.*, 1991).

La **fase S**, también llamada de síntesis, es aquella en la que se lleva a cabo la duplicación del material genético posterior a la fase G<sub>1</sub>. Está reportado en maíz que esta fase comienza alrededor de 12 a 15 horas después de la imbibición (Baíza *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 1991).

En la **fase G<sub>2</sub>** la célula verifica que la duplicación del material genético se haya llevado a cabo de manera correcta, reparándose cualquier error que hubiera llegado a cometerse (De Veylder *et al.*, 2003).

Durante la **fase M** se llevan a cabo 2 procesos importantes para la proliferación celular: la mitosis y la citocinesis.

La mitosis es el proceso por el cual la célula prepara las condiciones necesarias para poder dividirse, condensando el material genético duplicado en cromosomas, y organizando éstos junto con los organelos. Se divide en 4 etapas:

**Profase:** En ella se empieza a organizar el material genético en cromosomas. Se habla también de la llamada prometafase, que sería en la que desaparece la envoltura nuclear.

**Metafase:** Los cromosomas ya formados se organizan en el ecuador celular, con ayuda del huso mitótico y los centrosomas.

**Anafase:** Las cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan y migran hacia los centrosomas, en polos opuestos de la célula.

**Telofase:** El material genético se relaja y vuelve a reorganizarse dentro de una nueva envoltura nuclear.

En la citocinesis se lleva a cabo la división celular, separándose los citoplasmas de las 2 nuevas células hijas formadas. Posterior a este proceso, cada célula hija vuelve a entrar en la fase G<sub>1</sub> y a estar en condiciones de reiniciar una nueva ronda de ciclo celular (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

La aparición de figuras mitóticas en semilla de maíz se da entre 28 y 32 horas después de la imbibición, lo cual coincide con la protrusión radicular, la cual comienza después de las 20 horas posteriores a la imbibición (Baíza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991; Herrera *et al.*, 2000).

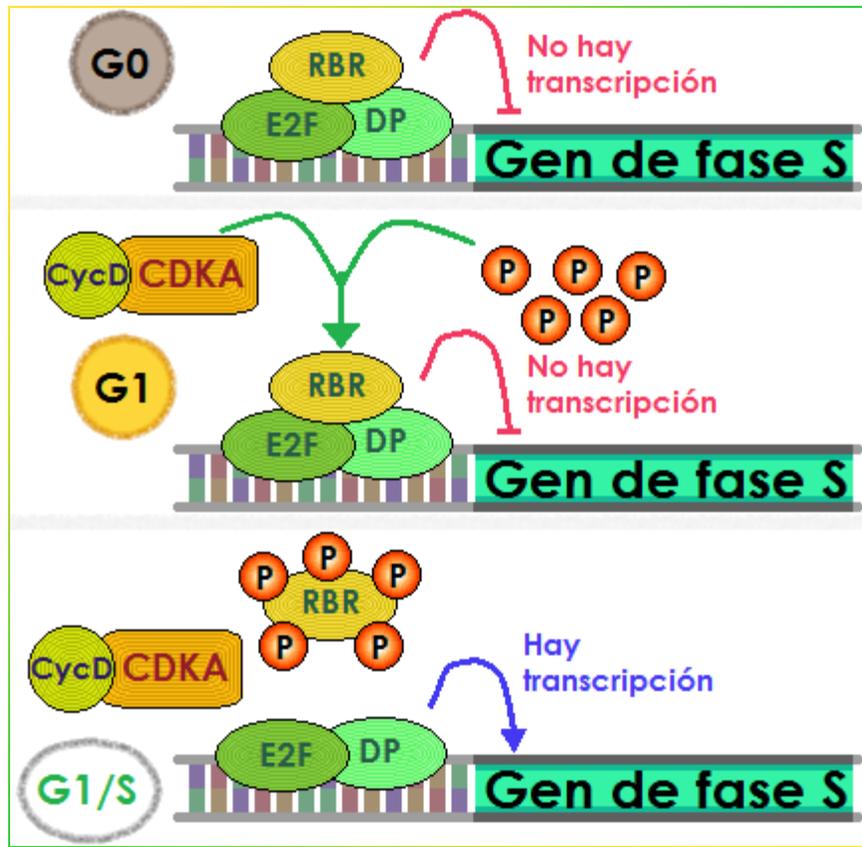
Tradicionalmente, se le denomina **interfase** a todos los procesos celulares que no están involucrados durante mitosis o citocinesis. Esto

indicaría que las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> formarían parte de la interfase celular (Klug *et al.*, 1999).

En algunas células también se presenta la existencia de una fase denominada **G<sub>0</sub>**, en la cual la célula no se divide; esta fase se considera que no forma parte del ciclo celular, pero se sabe que a partir de ella se ingresa a la fase G<sub>1</sub> cuando las condiciones son propicias (Meskiene *et al.*, 1995).

### PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR

Siendo el ciclo celular un proceso clave para el desarrollo y la supervivencia de los organismos, es de esperarse que exista una regulación fina para evitar que se presenten errores que podrían desembocar en situaciones catastróficas para la célula. Una parte importante de esta regulación es a través de fosforilaciones de moléculas importantes en el ciclo celular, realizadas por diversos complejos proteicos conformados por una ciclina (Cyc) y una cinasa dependiente de ciclina (CDK). Las ciclinas son proteínas cuya denominación proviene de su comportamiento a lo largo del ciclo celular, acumulándose durante la interfase y degradándose al final de la mitosis, para ser sintetizadas *de novo* al reiniciarse el ciclo celular. Las ciclinas se subdividen en varios tipos, siendo en plantas los más importantes los de ciclinas A, B, D y H; que se clasifican así por las diferencias entre sus dominios conservados (Evans *et al.*, 1983; Renaudin *et al.*, 1996). Las CDK son cinasas de serina/treonina que requieren unirse a una ciclina para tener actividad catalítica y poder reconocer y actuar sobre sus sustratos, varios de los cuales están presentes durante todo el ciclo celular. En plantas se han estudiado principalmente las CDK de tipo A y B, cuya diferencia estriba en la secuencia de su motivo de unión a ciclina. Se conocen 3 puntos de control principales dentro del ciclo celular, en los que actuarían los complejos Cyc/CDK:



**Figura 4.** Representación esquemática de los principales acontecimientos que se llevan a cabo durante la transición G<sub>1</sub>/S. (Modificado de Oakenfull et al., 2002).

El primer punto de control se localiza en la *transición G<sub>1</sub>/S*, esquematizada en la **Figura 4**. Las células que no han iniciado el ciclo celular se encuentran en la fase G<sub>1</sub> debido a que la proteína relacionada a retinoblastoma (RBR) está unida al complejo transcripcional E<sub>2</sub>F/DP, inhibiéndolo. E<sub>2</sub>F/DP está relacionado con la transcripción de genes asociados a replicación y reparación de DNA, por tanto al unirse con RBR no hay avance a la fase S. Cuando la célula inicia el ciclo, se sintetizan *de novo* ciclinas D (CycD), que se unen a CDKA principalmente; los complejos CycD/CDKA fosforilan a RBR, abatiendo la unión al complejo E<sub>2</sub>F/DP permitiendo la transcripción de genes relacionados a fase S, y así se inicia esta fase (Shen, 2002; Oakenfull *et al.*, 2002).

El segundo punto de control está en la *transición G<sub>2</sub>/M*. Esta transición es regulada por ciclinas tipo A y B, que se asocian indistintamente con

CDKs de tipo A y B; estos complejos Cyc/CDK se inactivan debido a la acción de proteínas como el factor transcripcional SOG1 y la cinasa WEE1, que actúan cuando se detecta daño en el DNA recién replicado. Los mecanismos para reactivar esta transición aún no están claros (De Veylder *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2016).

El tercer punto de control se halla en la *transición metafase/anafase*, en la fase M. En este punto de control se verifica que los cromosomas estén correctamente alineados en el plano ecuatorial de la célula en división, tomando en cuenta también la integridad de los microtúbulos para que la separación de las cromátidas hermanas sea correcta. En levadura se sabe que para que esta transición pueda progresar, también debe de llevarse a cabo la degradación de varios sustratos, entre ellos las ciclinas B, que se han reportado como inhibidores de la anafase (Farr y Cohen-Fix, 1999). Esto también se ha visto en plantas como *Arabidopsis* y maíz (Weimer *et al.*, 2016; Mews *et al.*, 1997).

#### INHIBIDORES DE CDKs EN PLANTAS

Así como los complejos Cyc/CDK son importantes para la regulación del ciclo celular, éstos también deben ser regulados para asegurar el control del avance del ciclo. Existen varias proteínas que regulan a los complejos Cyc/CDK como la ya mencionada WEE1, la cinasa activadora de CDK (CAK), entre otras; pero existe un grupo de proteínas cuya relevancia dentro del ciclo celular se ha observado recientemente, que son las proteínas inhibidoras de CDKs (ICKs). Estas proteínas ejercen su acción inhibitoria mediante la unión al complejo Cyc/CDK principalmente durante la fase G<sub>1</sub> (De Veylder *et al.*, 2001). En mamíferos se han reportado 2 familias principales de inhibidores: Los de la familia INK4, que se unen a la CDK en el complejo Cyc/CDK para inhibirlo (Serrano *et al.*, 1993; Hannon y Beach, 1994; Hirai *et al.*, 1995) y los de la familia Cip/Kip, que

se unen tanto a la ciclina como a la CDK (Stals y Inzé, 2001; Sherr y Roberts, 1999).

Los miembros más importantes de esta familia son p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>. Las 3 proteínas tienen en su extremo N-terminal un dominio de unión a otras proteínas sobre las que ejercen su función inhibitoria (Chen *et al.*, 1995). Entre estos inhibidores destaca p21<sup>Cip1</sup>, dado que es el único que posee en su dominio C-terminal una secuencia que une a la proteína PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular). En plantas se ha reportado que también existen proteínas de tipo ICK, las cuales se caracterizan por poseer un dominio conservado de alrededor de 31 aa en su extremo C-terminal, el cual presenta cierta similitud con el dominio de interacción con Cyc/CDK de la proteína p27<sup>Kip1</sup> (Wang *et al.*, 1997; De Veylder *et al.*, 2001; Jasinski, Perennes, *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1998). Por tal motivo, a estas proteínas se les denominó proteínas relacionadas a KIP (Kip-related proteins, KRPs).

Se ha reportado la existencia de 7 genes que codifican KRPs en *Arabidopsis*, las cuales se han clasificado en 2 grupos por sus interacciones diferenciales con otras proteínas de ciclo celular. En el primer grupo se encuentran AtKRP1, AtKRP2, AtKRP3 y AtKRP4 que se caracterizan por presentar interacciones con CDKA, mientras que en el segundo grupo están AtKRP5, AtKRP6 y AtKRP7 que no interaccionan con CDKA. Sin embargo se sabe que estas 7 KRPs tienen interacciones con ciclinas D, lo cual sugiere un papel importante de todas ellas en la fase G<sub>1</sub> (De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002). Aunque se han reportado también interacciones con complejos de CDKB con CycD y CycA (Nakai *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2005).

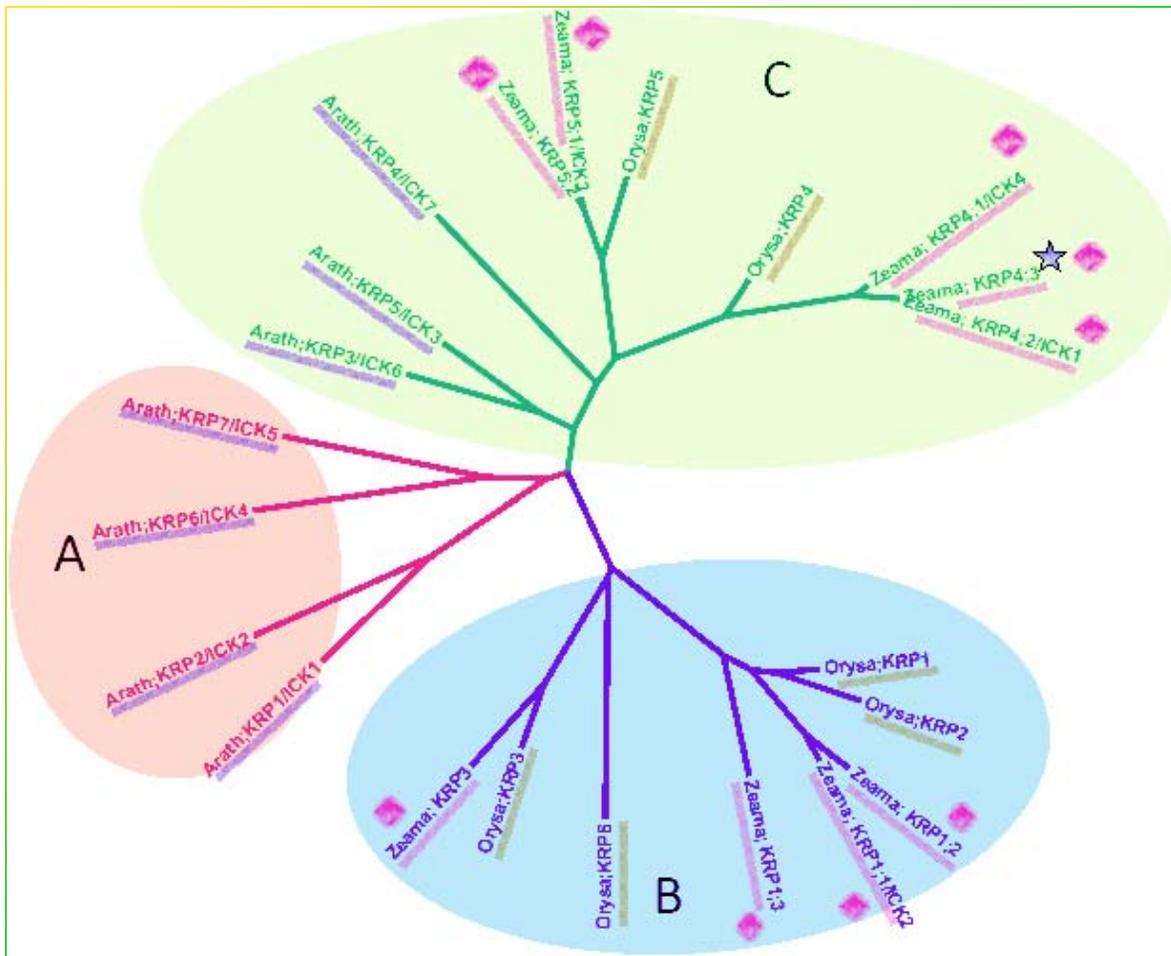
En arroz también se han identificado 6 genes que codifican para KRPs. Un séptimo gen también fue encontrado, pero considerado como posible pseudogén al no poseer los dominios de unión a complejos Cyc/CDK que se encontrarían en el extremo C-terminal, por lo que ya no podría fungir

como proteína inhibidora de estos complejos (Yang *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2007). Se ha reportado también que entre los 6 genes funcionales, el de la **OskRKP6** no tiene conservado el dominio N-terminal (asociado a la degradación de la proteína) y no estaría involucrado en ciclo celular, sino que su función estaría relacionada con respuestas a estrés ambiental (Schnittger *et al.*, 2003; Pettkó-Szandtner *et al.*, 2015).

En maíz también se han reportado varios genes que codifican para KRPs. Inicialmente 2 genes se identificaron como **KRP;1** y **KRP;2** en endospermo de maíz (Coelho *et al.*, 2005), los cuales posteriormente se renombraron como **ZmKRP4;2** y **ZmKRP1;1** respectivamente (Rosas-Bringas, 2015). Las proteínas codificadas por estos genes inhiben la actividad asociada a la cinasa Cdc2 de levadura y de los complejos de CDK con CycA1;3 y CycD5;1 de maíz, pero no la de complejos con CycB1;3. Además se reportó que la sobreexpresión de **ZmKRP4;2** inducía endorreplicación en callos de maíz (Coelho *et al.*, 2005). Posteriormente, se encontraron en un análisis *in silico* otras 8 secuencias que se identificaron como genes de KRP (**ZmKRP1;2a**, **ZmKRP1;2b**, **ZmKRP1;3**, **ZmKRP3**, **ZmKRP4;1**, **ZmKRP4;3**, **ZmKRP5;1** y **ZmKRP5;2**), sin embargo, 2 de ellas tuvieron que descartarse, debido a que una de ellas (**ZmKRP4;3**) codificaba para una proteína que correspondía al extremo C-terminal, sin codón de inicio y cuya traducción constaba de 62 aa; por otro lado se determinó que la otra, **ZmKRP1;2b** era una duplicación del gen **ZmKRP1;2a** en otro cromosoma. Por lo tanto, se concluyó que fueron 8 los genes de KRP hallados en maíz (Rosas-Bringas, 2015; Schnable *et al.*, 2009; Godínez-Palma *et al.*, 2017).

También se han estudiado proteínas inhibidoras de complejos Cyc/CDK en otras plantas, como en tabaco, jitomate y alfalfa (Jasinski, Perennes, *et al.*, 2002; Pettkó-Szandtner *et al.*, 2006; Bisbis *et al.*, 2006)

Con respecto a la clasificación filogenética de las KRPs, al comparar las secuencias proteicas de éstas en 40 especies vegetales, se agruparon en



**Figura 5.** Árbol filogenético de las KRPs halladas en *Arabidopsis* (subrayado morado), arroz (subrayado olivo) y maíz (subrayado y símbolo rosados) en sus 3 clases correspondientes. El pseudogen caracterizado como ZmKRP4;3 se indica con una estrella de borde negro. (Modificado de Rosas-Bringas, 2015).

3 clases: la clase A incluye exclusivamente KRPs de plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis* y álamo, la clase B únicamente incluye KRPs de monocotiledóneas como arroz y maíz, y la clase C incluye KRPs de ambos grupos, e inclusive de algunas gimnospermas (Torres-Acosta *et al.*, 2011). En la **Figura 5** puede observarse un árbol filogenético que incluye a las KRPs de las especies *Arabidopsis*, arroz y maíz, en el que se representan las 3 clases mencionadas. Esta agrupación de las KRPs de maíz se refuerza por las diferencias entre la distribución de los motivos conservados en todas ellas; por ejemplo, las KRPs de clase B tienen únicamente de 2 a 4 motivos reportados, mientras que las de clase C

tienen 7 (Torres-Acosta *et al.*, 2011; Rosas-Bringas, 2015). Aunque hay que mencionar que los 7 motivos reportados podrían presentar diferencias entre cada KRP; por ejemplo, en *Arabidopsis*, en el primer motivo de la zona del C-terminal se encuentra una secuencia de aa cuyo consenso sería PLEGRYEW, sin embargo los 3 primeros aa de este motivo son diferentes en AtKRP2 (y el tercero cambia también en AtKRP3, AtKRP4 y AtKRP5), la Y es sustituida por una F en AtKRP4, y el penúltimo aa (E) es diferente en AtKRP6 y AtKRP7 (De Veylder *et al.*, 2001). Algo similar ocurre con los otros motivos, incluidos los 4 últimos que no se hallan en todas las KRPs de *Arabidopsis* ni de alfalfa (Pettkó-Szandtner *et al.*, 2006).

Las razones por las que puede haber varios genes que codifican para inhibidores de CDK en plantas pueden ser varias, por ejemplo, regular distintos complejos, en condiciones ambientales diferentes o en tejidos específicos (Lui *et al.*, 2000). Esto se refleja en el fenotipo que puede presentar la planta cuando la expresión de estos genes cambia. Algunos efectos que se han reportado al aumentar la expresión de los genes de KRPs en *Arabidopsis* y tabaco son la inhibición del crecimiento de la plántula; hojas aserradas más pequeñas y de peciolo más cortos; acortamiento de las raíces, apertura de flores incompleta y acelerada, reducción del tamaño de éstas, inhibición de la división celular y cese de la endorreplicación (Wang *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Jasinski, Riou-Khamlichi, *et al.*, 2002; Jasinski, Perennes, *et al.*, 2002).

Por otro lado, cuando la expresión de los genes de KRPs disminuye en estas plantas, se ha observado en *Arabidopsis* que la morfología de las hojas se modifica, volviéndose más largas y delgadas; aumenta la proliferación celular lo cual induce mayor crecimiento de la semilla, de la planta y de los órganos de ésta (Cheng *et al.*, 2013). En maíz uno de los efectos observados al disminuir la expresión de algunos genes de KRP, es

el aumento en la cantidad de células del periciclo, lo cual está relacionado a una mayor cantidad de raíces laterales (Yu *et al.*, 2015).

Estos efectos observados varían dependiendo del nivel de expresión de estos genes, y por lo tanto son dosis-dependientes (Li *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2000).

### 3.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

#### ESTUDIOS BIOQUÍMICOS EN DIVERSAS VARIETADES DE MAÍZ

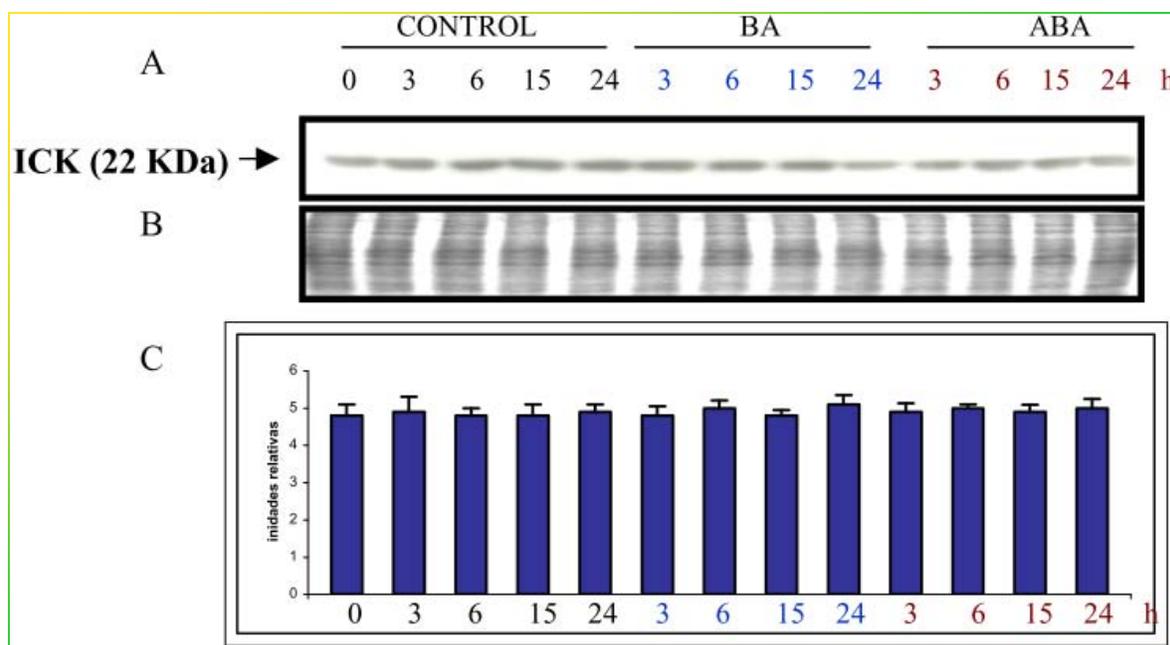
Los principales estudios sobre bioquímica vegetal, incluyendo los de ciclo celular, se han enfocado en plantas modelo como *Arabidopsis*. Más recientemente se han hecho estudios en plantas comercialmente importantes como son trigo, arroz y maíz. Cabe mencionar que la gran mayoría de los estudios realizados en maíz se han efectuado en una variedad modelo denominada B73, la cual ha sido caracterizada genómicamente en su totalidad, y que a partir de estos datos se han llevado a cabo la gran mayoría de estudios que utilizan secuencias de maíz *in silico* (Schnable *et al.*, 2009; Rymen *et al.*, 2007; Zhan *et al.*, 2015). Son pocos los estudios que se han realizado en otras variedades de maíz, y esto es debido a que éstas presentan características específicas asociadas a interés agronómico por su color, sabor o longevidad, las cuales B73 no posee (Durán-Hernández *et al.*, 2011).

En nuestro laboratorio se ha trabajado con la variedad denominada maíz chalqueño, debido a que presenta características como el gran tamaño y escasa rigidez de sus semillas, lo cual permite la extracción fácil de ejes embrionarios para su estudio. Además, es una variedad local, cultivada en zonas donde está poco expuesta a la polinización cruzada entre variedades, algo común en esta planta. Esto permite mantener cierta homogeneidad en la información genética estudiada, para evitar posibles variaciones en la secuencia y el comportamiento de genes y proteínas de la planta con cada cosecha obtenida.

#### ESTUDIOS PREVIOS DE ZmKRPs DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ

El grupo de trabajo del Dr. Jorge Vázquez-Ramos se ha dedicado a estudiar los cambios que se dan en diversas proteínas del ciclo celular a lo largo de la germinación de ejes embrionarios de maíz. Principalmente se han estudiado proteínas relacionadas a la transición G<sub>1</sub>/S como las

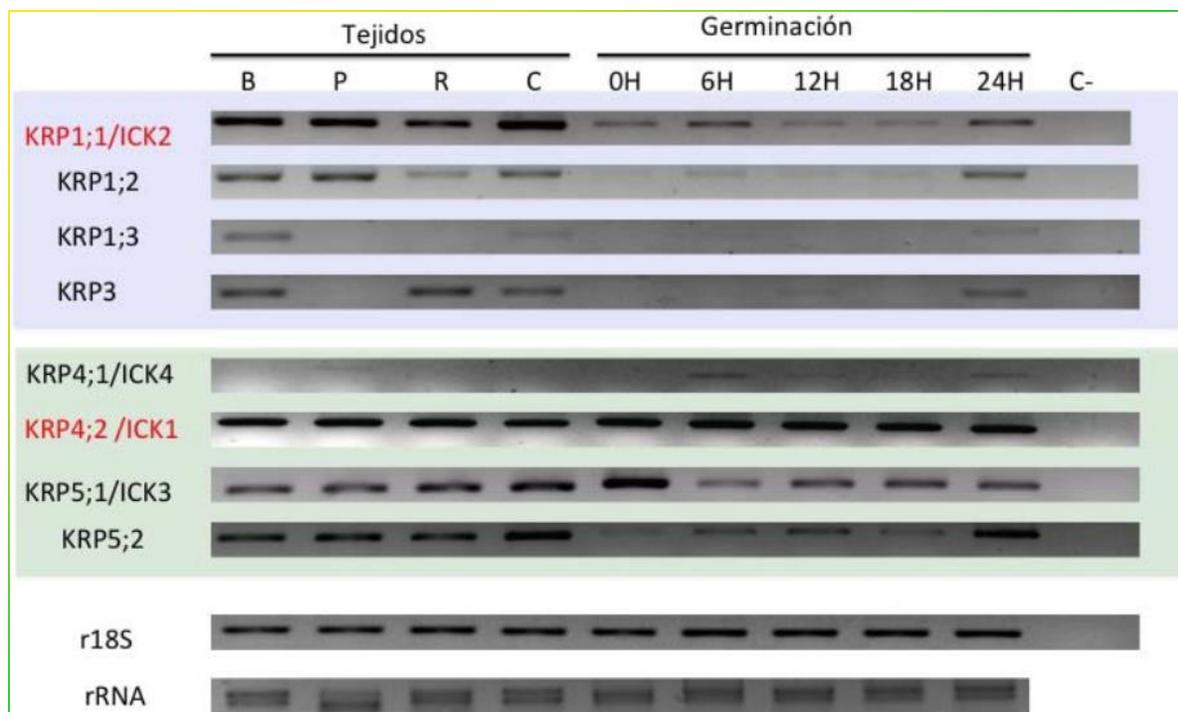
ciclinas D (Bravo-Alberto y Buendía-Monreal, 2008; López-Hernández, 2012; Zamora-Zaragoza, 2014), pero un campo de estudio menos explorado ha sido el de inhibidores de CDKs.



**Figura 6.** Ensayos de abundancia de la proteína ICK (ZmKRP4;1) en extractos crudos de maíz a diferentes tiempos de germinación, en ausencia y presencia de BA y ABA. A - Ensayo de Western-Blot. B - Tinción del gel con Coomassie como control de carga. C - Análisis de densitometría. (De Jesús-Juárez, 2008).

Uno de los primeros estudios al respecto realizados en el laboratorio involucra a la proteína ICK (llamada ZmKRP4;1 en la nomenclatura actual). En este estudio se obtuvo y se purificó la correspondiente proteína recombinante (la región C-terminal) la cual se utilizó para generar un anticuerpo que se validó y se utilizó para determinar los niveles de cantidad (abundancia) de proteína en extractos crudos de maíz a distintos tiempos de germinación, en ausencia y presencia de las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y benciladenina (BA). Tal como se observa en la **Figura 6**, no se detectó algún cambio en estos niveles a diferentes tiempos, ni al adicionar las fitohormonas. También se determinó la capacidad inhibitoria de esta proteína mediante ensayos de actividad de cinasa (De Jesús-Juárez, 2008).

También se realizó un estudio con el gen de una proteína llamada Zeama;KRP1 (En nomenclatura actual, ZmKRP4;2), el cual se amplificó por PCR, encontrándose una banda de 327 pb; para luego observar sus niveles de expresión génica a diferentes tiempos de germinación, a partir de RNA extraído de ejes embrionarios de maíz. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen (Mancilla-Flores, 2008).



**Figura 7.** Análisis de expresión de genes de las 8 KRPs de maíz, a partir de ensayos de RT-PCR. Primero se evaluó esta expresión en diferentes zonas (B - base de hoja, P - punta de hoja, R - punta de raíz, C - coleoptilo de plántula de 2 semanas); y después se evaluaron los perfiles en ejes embrionarios germinados a diferentes tiempos. C- es el control negativo, r18s y rRNA son controles de carga. En fondo azul están los genes de clase filogenética B, en fondo verde los de clase C. Se resaltaron en rojo los genes elegidos para obtener proteína recombinante y evaluar actividad de cinasa posteriormente. (Rosas-Bringas, 2015).

Otro estudio más reciente tuvo como objetivos principales realizar la caracterización filogenética y la expresión génica de distintos miembros de la familia de las ZmKRPs, así como la evaluación de la influencia de algunos de ellos en la actividad de cinasa de algunos complejos Cyc/CDK. Ya se mencionó en la sección anterior que se propuso una nueva nomenclatura para nombrar a las ZmKRPs, basada en su filogenia y en su

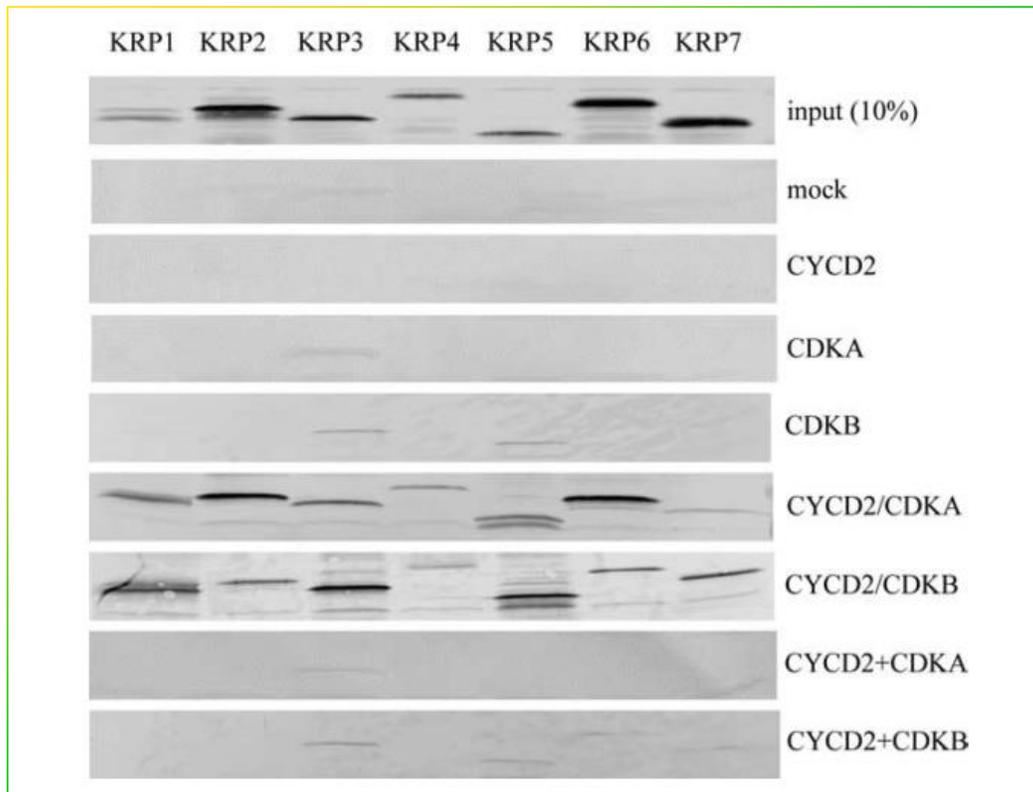
parecido secuencial con las KRPs de arroz, además de que se caracterizaron los motivos previamente reportados de KRPs en los 8 miembros de esta familia en maíz.

Además, se realizó el análisis de expresión de genes para las 8 KRPs de maíz. Tal como se observa en la **Figura 7**, se hicieron análisis en diversas partes de la planta, así como en ejes embrionarios a lo largo de la germinación, encontrando que sólo *ZmKRP4;2* se comporta de manera constitutiva, de acuerdo con lo reportado por Mancilla-Flores en 2008, mientras que todas las demás presentan un comportamiento diferencial.

Se eligieron los genes de *ZmKRP4;2* y *ZmKRP1;1*, dado su comportamiento variable entre ellas y su pertenencia a diferentes clases filogenéticas, para obtener las proteínas recombinantes respectivas y usarlas para analizar su efecto sobre la actividad de cinasa de complejos asociados a CycD2;2 y CycD6;1, encontrándose que su actividad inhibitoria también es diferente (Rosas-Bringas, 2015).

#### INTERACCIONES DE KRPs CON PROTEÍNAS DE CICLO CELULAR

No son muchos los estudios que se han realizado de interacciones de ZmKRPs con otras proteínas de ciclo celular en maíz. Destacan los estudios realizados en *Arabidopsis*, uno de los cuales se enfocó en estudiar las interacciones de las 7 KRPs de esta especie con complejos Cyc/CDK y con las proteínas individuales, así como observar la similitud de la inhibición de la actividad de cinasa de los complejos con el grado de interacción. Por medio de ensayos de precipitación por columna (pull-down), se evaluaron y verificaron las interacciones que existían entre las 7 KRPs y las proteínas CycD2, CDKA, CDKB, complejos activos de CycD2 con ambas CDKs, y mezclas de CycD2 con ambas CDKs que no formaban complejos. Como se ve en la **Figura 8**, las proteínas KRP3 y KRP5 presentan interacciones débiles y diferenciales con las CDKs, mientras que las interacciones con complejos son mucho más notorias. Resalta



**Figura 8.** Análisis de interacciones de las 7 KRPs de *Arabidopsis* con CycD2, CDKA, CDKB, sus complejos activos y mezclas que no forman complejos. El input al 10% funciona como control positivo y el mock (KRPs y sólo el medio de disolución) como control negativo. (Nakai *et al.*, 2006).

también que las interacciones con las mezclas son igual de débiles (y con el mismo patrón) que las presentadas con CDKs. Posteriormente, se demostró que la actividad de cinasa de ambos complejos era inhibida diferencialmente por cada KRP, lo cual indicó que hay otras circunstancias además de la interacción, que juegan un papel importante en la función inhibitoria de las KRPs (Nakai *et al.*, 2006).

#### ANÁLISIS DE PROTEÍNAS *IN SILICO*

En la actualidad, gracias a la gran cantidad de resultados experimentales que se han logrado obtener en cuanto a distintas características estructurales, funcionales, de secuencia e interactivas de macromoléculas como el DNA y las proteínas, se han desarrollado programas que permiten predecir con precisión las características de alguna secuencia de interés.

En el caso de las proteínas, existen ciertos programas que se basan exclusivamente en datos de secuencia para predecir sitios de unión con otras proteínas, o sitios donde pudieran llevarse a cabo modificaciones postraduccionales. Algunos otros programas utilizan información fisicoquímica de las secuencias de aminoácidos, tal como área de exposición a solventes, para predecir el que ciertas regiones de la proteína estén expuestas u ocultas, llegándose a predecir esto incluso para cada aminoácido de la secuencia (Petersen *et al.*, 2009). Estos datos se han utilizado en varios estudios realizados en mamíferos y bacterias para formular ciertas hipótesis sobre alguna característica específica de una proteína de interés, que después habría de ser corroborada experimentalmente; pero destaca el hecho de que aunque se han registrado en bases de datos las secuencias de 80 millones de proteínas, sólo han sido determinadas experimentalmente unas 100,000 estructuras tridimensionales (3D) lo cual hace pensar que utilizar un predictor de estas estructuras puede dar una cantidad aún mayor de información sobre la proteína, tomando en cuenta se conservan más las estructuras 3D de 2 proteínas homólogas que sus secuencias, al haber solamente unas 10,000 maneras en que todas las proteínas existentes a nivel biológico pueden plegarse (Koonin *et al.*, 2002; Kelley *et al.*, 2015).

Estudiar estas características en conjunto con la predicción de modificaciones postraduccionales que puedan sufrir las proteínas, puede ayudar a especular si hay posibilidad de que haya interacciones con otras proteínas y, en caso afirmativo, cómo se darían estas interacciones. Esto debido a que una proteína podría presentar sitios putativos de interacción con otras proteínas, pero un predictor de estructuras en 3D podría indicar que esos sitios se encuentran inaccesibles al menos en la conformación supuesta como más estable fisiológicamente.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Existen diversos estudios que analizan el comportamiento, características y funciones de proteínas de la familia ICK/KRP en *Arabidopsis* (Nakai *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 1998), pero hay pocos acerca del análisis experimental o *in silico* de KRPs de maíz. El conocimiento de estas características ya sea a nivel experimental o computacional de las ZmKRPs abrirá el panorama para estudios posteriores y más detallados.

Se eligió a las proteínas ZmKRP1;1 y ZmKRP3 debido a que se observaron diferencias en su expresión génica en tejidos diferenciados y a lo largo de la germinación (Rosas-Bringas, 2015) y en presencia o ausencia de azúcares (Lara-Núñez et al., 2017).

#### **5. HIPÓTESIS**

El análisis computacional de la secuencia, estructura y modificaciones postraduccionales de las proteínas ZmKRP1;1 y ZmKRP3, inhibidoras de la actividad de cinasa de los complejos Cyc/CDK, ayudarán a predecir diferencias en las características fisicoquímicas de ambas.

## **6. OBJETIVOS**

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar a las proteínas ZmKRP1;1 y ZmKRP3 a través del desarrollo de anticuerpos policlonales específicos, y en paralelo, analizar *in silico* sus características fisicoquímicas, de secuencia y de modificaciones postraduccionales.

### 6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Generar y validar anticuerpos policlonales (verificar su especificidad) sobre secuencias específicas de 15 aminoácidos de las proteínas ZmKRP1;1 y ZmKRP3.
- ❖ Diseñar una estrategia experimental para clonar y sobreexpresar a la proteína recombinante ZmKRP3 en un sistema heterólogo.
- ❖ Realizar un análisis *in silico* que permita identificar características fisicoquímicas, estructurales y de modificaciones postraduccionales de las proteínas ZmKRP1;1 y ZmKRP3.

## 7. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### **Análisis bioinformático previo**

**Diseño de primers para amplificación:** La secuencia del gen *ZmKRP3* se buscó en la base de datos Ensembl Plants, utilizando el número de acceso GRMZM2G154414 (Rosas-Bringas, 2015). De la entrada encontrada se exportaron datos a un archivo de texto en FASTA, para lo cual se eligieron secuencias desenmascaradas (sin remoción de motivos repetidos) de las que se escogió el DNA complementario (cDNA), la secuencia codificante (CDS), la secuencia cromosómica y la secuencia traducida en aminoácidos. Todas esas secuencias se introdujeron en el programa Geneious®, en el cual se realizó el alineamiento para todas las secuencias génicas **(Apéndices 1 y 2)**.

A partir de esos datos, se diseñaron primers para amplificar la región de la CDS de *ZmKRP3* que incluyeran los sitios de restricción para las enzimas NcoI (en extremo 5') y XhoI (en extremo 3'). En este último primer se omitió el codón de paro de tal manera que la proteína recombinante presentara 8 histidinas en tándem en el extremo C-terminal al ser clonada en el vector pET28b+ **(Tabla 4 y Apéndice 1)**, se verificó su capacidad de amplificación y sus parámetros teóricos de calidad (temperatura de fusión [TM], porcentaje de pares guanina-citosina [GC], estabilidad del extremo 3', número de nucleótidos repetidos y posibilidad de dimerización) mediante el programa AmplifX®.

**TABLA 4. Primers utilizados para la amplificación de la CDS de *ZmKRP3*.  
Subrayadas las regiones que aparean con sitios de restricción (ver texto).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
KRP3-Forward	ATTATACCATGGGCAAGTGCGTGAGGATCCG
KRP3-Reverse	ATTACTCGAGCCACCTCCGACCCCCCGTCA

**Diseño de experimentos de restricción:** Se buscaron en bases de datos las secuencias de los plásmidos pGEM®-T easy, pET28b+ y pGEX-4T-2, y se agregaron a Geneious® como secuencias lineal y circulares, respectivamente. Utilizando ese mismo programa se buscaron dentro de

los 3 plásmidos sitios de restricción que correspondieran a enzimas endonucleasas de restricción de uso común que no cortaran más de una vez en los plásmidos, que estuvieran en sus sitios de clonación múltiple (MCS, **Apéndices 3, 4 y 5**) y que no cortaran dentro de la secuencia de la CDS del gen, para lo cual también se buscaron sitios de restricción dentro de la CDS utilizando el programa NEB cutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>, **Apéndice 6**). Se determinó que las enzimas XhoI y NcoI eran adecuadas para trabajar en el caso de pET28b+, y que las enzimas EcoRI y XhoI eran adecuadas para trabajar en el caso de pGEX-4T-2. También se verificó que la CDS se encontrara correctamente insertada de manera que tuviera una secuencia Shine-Dalgarno antes de su codón de inicio. Esto se realizó para estos 2 plásmidos, como muestra el **Apéndice 7**.

Para el caso de pGEM®-T easy se determinó que la enzima EcoRI era adecuada si se requiriera extraer el inserto de una construcción ya realizada, pues este vector se liga directamente.

**Diseño de anticuerpos:** Para realizar el diseño de anticuerpos contra ZmKRP1;1 y ZmKRP3, se buscaron en Ensembl Plants las secuencias de todas las KRPs de maíz reportadas por Rosas-Bringas en 2015, incluyendo aquella correspondiente al pseudogen *ZmKRP4;3*, y se alinearon en Geneious® (**Apéndice 8**). A partir de ahí se buscaron en las secuencias proteicas de ZmKRP1;1 (cuyo número de acceso es GRMZM2G101613) y ZmKRP3, motivos de 14 aa que no se repitieran en ninguna de las otras ZmKRPs, para realizar el diseño de péptidos sintéticos que se utilizarían para la inmunización de conejos. A partir de esos datos, se mandaron sintetizar péptidos cortos de 15 aa (14 de los cuales correspondían a los motivos hallados para cada ZmKRP), acoplados a la proteína hemocianina de lapa marina (KLH) de la especie *Megathura crenulata*. Las secuencias de los péptidos se muestran en el **Apéndice 8**. El residuo 15 de cada secuencia corresponde a una cisteína agregada para unirla

covalentemente a la KLH, cuya secuencia se buscó en bases de datos. La comprobación de la especificidad de estas secuencias puede consultarse en la sección de Resultados.

### **Análisis bioinformático posterior**

**Búsqueda de posibles sitios de modificaciones postraduccionales:** Las páginas donde se insertaron las secuencias de ambas ZmKRPs para la predicción de posibles modificaciones postraduccionales (ver sección de Resultados) corresponden a los siguientes sitios: <http://www.ubpred.org/> (*UbPred*) (Radivojac *et al.*, 2010), <http://sumosp.biocuckoo.org/online.php> (*GPS-SUMO*) (Ren *et al.*, 2009), [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/) (*ExpASy PeptideCutter*) (Gasteiger *et al.*, 2005), <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/> (*NetSurfP ver. 1.1*) (Petersen *et al.*, 2009), y <https://www.predictprotein.org/> (*PredictProtein*) (Yachdav *et al.*, 2014). Los resultados de la búsqueda de sitios de ubiquitinación, sumoilación y residuos expuestos se obtuvieron en formato FASTA y se introdujeron en las secuencias proteicas de ambas ZmKRPs usando Geneious®, mientras que los resultados de PredictProtein se obtuvieron como imágenes y gráficas, y se usaron directamente.

**Predicción de estructura secundaria y modelado:** Las secuencias de ambas proteínas se introdujeron en el programa Phyre2 (ver sección de Resultados, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley *et al.*, 2015), del cual se obtuvieron para cada proteína todos los datos de su análisis exhaustivo, entre los que destacan la predicción de un modelo tridimensional, predicción del porcentaje de zonas intrínsecamente desordenadas y predicción de estructuras secundarias en general (con porcentaje de confiabilidad para cada uno de estos puntos).

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

**Obtención de primers:** Los primers diseñados para la amplificación de *ZmKRP3* se mandaron sintetizar al Instituto de Biotecnología (IBT). A partir de los tubos obtenidos se preparó una mezcla **de primers 10  $\mu$ M** cada uno. Para los controles positivos, se prepararon 2 mezclas de primers, una de ellas utilizando primers Forward y Reverse correspondientes a la amplificación del marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tag, EST) de *ZmKRP3* (Rosas-Bringas, 2015); y la otra mezcla utilizando primers Forward y Reverse correspondientes a la amplificación de una región del RNA 18s (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Las secuencias de estos primers se pueden consultar en el **Apéndice 9**. Cada primer estaba a una concentración de 10  $\mu$ M, **en las mezclas preparadas se llevó esta concentración a 5  $\mu$ M de cada primer.**

**Obtención de cDNA:** Se realizó germinación de semillas de maíz, durante 24 y 36 horas. Se extrajo RNA a partir de ejes embrionarios de maíz utilizando el método de TRIzol, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregó enzima DNAsa a ambas muestras y se purificó doblemente mediante un kit. Se cuantificaron ambas muestras mediante Biodrop, de acuerdo al protocolo del equipo. Para verificar el nivel de integridad de las muestras, éstas se prepararon utilizando agua grado biología molecular (MBG), buffer de carga para RNA y 20 ng de RNA, y se corrieron en gel de agarosa a 60 V (ver especificaciones del gel en la sección Gel de agarosa). Posteriormente se realizó la reacción de retrotranscripción (RT) para ambas muestras, a partir de **2  $\mu$ g de RNA.**

**Reacción de PCR:** Para el experimento de Touchdown con los primers de la **Tabla 4**, se prepararon 5 muestras con 0.2  $\mu$ L de primers, 1.5  $\mu$ L de cDNA, 5  $\mu$ L de mix de polimerasa Jumpstart® y 3.3  $\mu$ L de agua con dietilpirocarbonato (DEPC), para 10  $\mu$ L totales. Como control negativo se preparó una mezcla idéntica, pero sin cDNA y con 4.8  $\mu$ L de agua con DEPC. Las muestras se corrieron en un termociclador Techne® TC-512,

utilizando un programa de 35 ciclos. La temperatura de desnaturalización inicial fue de 94°C durante 2 minutos, la de desnaturalización de cada ciclo fue de 94°C por 30 segundos, las de alineamiento fueron de 58.1°C, 60.2°C, 62°C, 64.4°C y 67.6°C por 30 segundos (una temperatura por muestra), y la de extensión fue de 72°C por 1 minuto 20 segundos.

**TABLA 5. Experimentos de PCR realizados durante la búsqueda de condiciones para la amplificación de *ZmKRP3* (Ver texto para metodología).**

Condición	Enzima	DMSO	BSA	Formamida	Condiciones PCR
1	JS	-	-	-	Programa JS
2	IP	-	-	-	Programa IP
3	JS + IP (10:1)	-	-	-	Programa mix
4	JS + IP (100:1)	-	-	-	Programa mix
5	<b>JS</b>	<b>3%</b>	-	-	<b>Programa JS</b>
6	JS	6%	-	-	Programa JS
7	JS	3%	3.5 µg	-	Programa JS
8	JS	6%	3.5 µg	-	Programa JS
9	JS	-	-	3%	Programa JS
10	JS	-	-	6%	Programa JS
11	JS	-	3.5 µg	3%	Programa JS
12	JS	-	3.5 µg	6%	Programa JS
13	JS	-	3.5 µg	-	Programa JS
14	IP	3%	-	-	Programa IP
15	IP	6%	-	-	Programa IP
16	<b>IP</b>	<b>3%</b>	<b>3.5 µg</b>	-	<b>Programa IP</b>
17	IP	6%	3.5 µg	-	Programa IP
18	IP	-	-	3%	Programa IP
19	IP	-	-	6%	Programa IP
20	IP	-	3.5 µg	3%	Programa IP
21	IP	-	3.5 µg	6%	Programa IP
22	IP	-	3.5 µg	-	Programa IP
23 (CN)	JS + IP (10:1)	-	-	-	Programa mix

*Las enzimas utilizadas fueron Jumpstart® (JS) y iProof® (IP). Las especificaciones de las muestras pueden consultarse en el texto. En negritas, las condiciones utilizadas para anidación de PCR.*

Para la búsqueda de condiciones se prepararon 69 reacciones de 10 µL, distribuidas en 23 condiciones cuyas especificaciones se muestran en la **Tabla 5**. En todas las reacciones (excepto el control negativo) se usaron 1.5 µL de cDNA, 0.2 µL de primers (23 reacciones utilizaron primers de *ZmKRP3*, 23 primers del EST y 23 primers de 18s). En las reacciones con enzimas individuales (color amarillo y naranja) se agregaron 5 µL de mix

de enzima, mientras que para las mezclas de enzimas (color magenta) se agregaron 4.5  $\mu\text{L}$  de Jumpstart® + 0.5  $\mu\text{L}$  de iProof® en el caso de las mezclas 10:1, mientras que para la 100:1 se agregaron 4.95  $\mu\text{L}$  de Jumpstart® + 0.05  $\mu\text{L}$  de iProof®. El resto del volumen se completó con agua DEPC. En el control negativo se sustituyó el cDNA con agua DEPC. El "Programa JS" (naranja) consistió en 35 ciclos, desnaturalización inicial a 94°C 4 minutos, desnaturalización a 94°C 30 seg, alineamiento a 60°C 30 seg, extensión a 72°C 50 seg. El "Programa IP" (amarillo) consistió en 35 ciclos, desn. inicial a 98°C 2 minutos, desn. a 98°C 15 seg, alin. a 60°C 15 seg, ext. a 72°C 30 seg. El "Programa mix" (magenta) consistió en los siguientes parámetros: 35 ciclos, Desn. inicial a 98.9°C 4 minutos, desn. a 98.9°C 15 seg, y alin./ext. a 70°C 30 seg.

Las PCR de anidación se realizaron usando las condiciones 5 y 16 ya mencionadas en la tabla. Se realizó en 2 tandas: para la primera se realizó una PCR con Jumpstart® en condición 5, el producto se utilizó como cDNA para la segunda tanda, que constó de 2 reacciones de PCR, una con Jumpstart® (condición 5) y la otra con iProof® (condición 16).

Para las PCR realizadas con los primers KRP3-EcoRI-5' y KRP3-XhoI-parcial, se realizó un experimento de Touchdown a 63°C, 65°C y 67°C utilizando la condición 5 de la tabla, y una variación de la condición 2 utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion®, para amplificar fragmentos de 651 pb y 420 pb de las secuencias total y parcial del extremo N-terminal, respectivamente.

**Gel de agarosa:** Para correr las muestras, se prepararon geles utilizando agarosa Invitrogen® al 1.5% en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE), se calentó esa mezcla 30 seg. en horno de microondas, y se le **agregó 1  $\mu\text{L}$**  de bromuro de etidio. La mezcla de gel se colocó en una cámara con un peine de 10 a 14 pozos y se dejó polimerizar 15 minutos. Las muestras **se prepararon con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 6x para DNA o RNA y 10  $\mu\text{L}$  de amplicón**, y se cargaron en el gel además de **5  $\mu\text{L}$  de marcador de tamaño**

(GeneRuler® Ladder). Las muestras se corrieron a 80 volts (60 en el caso de RNA) durante 1 hora. Para visualización rápida se colocaron los geles en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron. Para fotodocumentación se colocaron los geles en el equipo ChemiDoc® y se procesó la imagen en el programa ImageLab®.

**Purificación de producto de PCR:** Para purificar el producto de PCR, se empleó el kit GelExtraction® GenElute™, siguiendo las instrucciones del protocolo. Se cuantificó el DNA obtenido por Biodrop.

### **Obtención y cuantificación de plásmido**

**pET28b+ y pGEX-4T-2:** Para ambos casos se extrajo el plásmido a partir de gliceroles de la cepa bacteriana DH5α, resistente a kanamicina, utilizando el kit Zypzy™ Plasmid Miniprep®, siguiendo las instrucciones del protocolo.

**pGEM®-T easy:** Este plásmido no requiere procesamiento y se proporciona por el proveedor a una concentración de 50 ng/μL, por lo cual se utilizó de manera directa para la ligación.

### **Ensayos de restricción, ligación y transformación**

**Análisis de restricción:** Sólo se realizó para los plásmidos pET28b+ y pGEX-4T-2. En el caso de pET28b+, se realizó la restricción del plásmido con las enzimas de restricción NcoI y XhoI por una hora. El producto de PCR de *ZmKRP3* de 651 pb (gen completo) fue amplificado con los primers mostrados en la **Tabla 4** como cebadores, obteniéndose un producto del tamaño esperado, el cual también se digirió con estas enzimas. Ambas muestras se purificaron por un kit (GelExtraction® GenElute™ la restricción del plásmido, GeneAll®Expin™ PCR el producto de PCR). En el caso de pGEX-4T-2 el procedimiento fue similar, pero los primers que se diseñaron y usaron para la PCR contenían sitios de restricción para EcoRI (en 5', **Apéndice 9**) y XhoI (en 3', primer KRP3-Reverse de la **Tabla 4**),

omitiendo el codón de inicio en 5' para que la proteína recombinante presentara el TAG de Glutación S-Transferasa (GST) en el extremo N-terminal. También se diseñó un primer 3' para obtener una secuencia parcial de la *ZmKRP3* con los primeros 420 pb (KRP3-XhoI-parcial, **Apéndice 9**) que generaría un péptido de 140 residuos. Se realizaron tanto el ensayo de restricción con estas enzimas, como la purificación de las muestras, del mismo modo que para pET28b+.

**Ensayos de ligación:** En el caso del plásmido pGEM®-T easy al no ser necesario hacer restricción, se purificó el producto de PCR con el kit ya especificado. La cuantificación por Biodrop fue de **11.78 ng/μL**. Este dato se utilizó para seguir el protocolo de ligación del plásmido, que implica utilizar una fórmula que se muestra en la **Figura 9**.

$$\frac{\text{ng plásmido} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb de plásmido}} \times \text{ratio} = \text{ng de inserto}$$

**Figura 9.** Fórmula utilizada para conocer la cantidad de inserto purificado de PCR a utilizar durante la ligación (ver texto).

Los parámetros utilizados para esta fórmula fueron los siguientes: 50 ng de plásmido, 0.651 kb de inserto, 3.015 kb de plásmido, y un valor de proporción (ratio) de 3 (3 veces la cantidad de inserto por 1 de plásmido). Se obtuvo un valor de 32.388 ng de inserto, que usando la cuantificación ya mencionada se llevó a **2.75 μL**. Se realizó **1 reacción de ligación**, un control positivo y uno negativo, en 3 tubos Eppendorf de 1.5 mL, de acuerdo al siguiente orden secuencial: **Se agregó 1 μL de plásmido a los 3 tubos, 2.75 μL de inserto sólo al tubo de reacción, 2 μL de DNA control del plásmido sólo al control positivo, y a los 3 tubos lo siguiente: 5 μL de buffer de ligación 2x previamente mezclado por vórtex, 1 μL de enzima DNA ligasa T4, y agua MBG suficiente para 10 μL totales.** Se incubaron las 3 reacciones a 4°C toda la noche.

En el caso de pET28b+, después del ensayo de restricción se utilizó la

misma fórmula y protocolo, pero los parámetros en este caso fueron los siguientes: 11.103 ng de plásmido, 0.651 kb de inserto, 5.368 kb de plásmido, y ratio de 3. Se obtuvo un valor de 4.04 ng de inserto, que con su cuantificación por Biodrop mostrada en la parte de Análisis de restricción se llevó a 6.38  $\mu\text{L}$  para llevar a cabo **la reacción en 20  $\mu\text{L}$** .

En el caso de pGEX-4T-2 se trabajó del mismo modo, aunque con los parámetros siguientes: 15 ng de plásmido, 0.651 kb de inserto para el gen completo o 0.42 kb para la secuencia parcial, 4.97 kb de plásmido, y ratio de 3. La reacción también se llevó a cabo **en 20  $\mu\text{L}$** .

**Transformación celular:** Para transformar las construcciones de pGEM®-T easy, se utilizaron bacterias *Escherichia coli* competentes de la cepa XL10-GOLD almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron 5 tubos de células competentes, colocándolos en hielo al igual que los 3 tubos donde se **realizó la reacción de ligación, a los que se llevó el volumen a 40  $\mu\text{L}$  con agua estéril. De esta dilución se agregaron 20  $\mu\text{L}$  a 3 de los tubos de células competentes, mientras al 4° tubo se le agregaron 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril, y al 5° tubo 50 ng de la construcción pDEST-17-E2F1;1 como control positivo de la transformación.** Se incubaron estos tubos 30 minutos en hielo, se les realizó choque térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos mediante Heatblock, se incubaron 5 minutos en hielo, se les agregó 1 mL de medio LB y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm durante 1 hora. Se prepararon 8 cajas con aproximadamente 30 mL de agar LB con **ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y tetraciclina 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$** . A las placas solidificadas se les agregó en la superficie **100  $\mu\text{L}$  de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.1 M** previamente esterilizado por filtración (para llegar a una concentración de 1 mM), y **20  $\mu\text{L}$  de X-gal 50 mg/mL** disuelto en dimetilformamida. Se incubaron las cajas a  $37^{\circ}\text{C}$  por media hora. Tras la incubación los tubos se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$ . **Se agregaron 200  $\mu\text{L}$**  de cada tubo a 5 de las cajas preparadas, mediante siembra por varilla

de vidrio. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche y las colonias blancas halladas, denominadas positivas (que poseen la construcción completa) se resembraron en 3 cajas de agar restantes. Como control negativo, células competentes sin transformar se sembraron en LB sólido con los antibióticos ya mencionados. Las colonias azules se consideran negativas al poseer el plásmido pero no el inserto. El precultivo se preparó con 4 mL de medio LB. A los tubos con crecimiento provenientes de bacterias seleccionadas con antibióticos se les extrajo el plásmido **utilizando el kit GeneElute™ Plasmid Miniprep®**, de acuerdo a las instrucciones del protocolo.

En el caso del plásmido pEt28b+, las células competentes utilizadas fueron también XL10-GOLD en el caso de transformación de mantenimiento, y BL21(DE3)RIPL para transformar en células de sobreexpresión. El antibiótico utilizado para todos los medios de cultivo fue kanamicina **50 µg/mL (20 µL de un stock de kanamicina 10 µg/µL)**. Se seleccionaron al azar algunas colonias que crecieron en la placa, se les extrajo el plásmido mediante el kit **Zyppy™ Plasmid Miniprep®**, y mediante ensayos de restricción se seleccionó la colonia positiva, misma que se mandó secuenciar para corroborar el resultado.

En el caso del plásmido pGEX-4T-2 el procedimiento fue el mismo que para pEt28b+ tanto para bacterias de mantenimiento como de expresión, **excepto que en este caso el antibiótico usado fue ampicilina 100 µg/mL**.

### **Subclonación y secuenciación del gen *ZmKRP3***

**pGEM®-T easy-ZmKRP3:** Después de transformar bacterias XL10-GOLD, se analizaron 6 colonias mediante extracción de plásmido por kit y ensayos de restricción con EcoRI, para al final seleccionar 2 muestras que mostraron resultados positivos (ver sección de Resultados). Para obtener la secuencia del plásmido, se enviaron al Instituto de Biotecnología (IBT) 2 tubos por cada muestra positiva, uno con primer de secuenciación

Forward, y otro con primer de secuenciación Reverse.

**pET28b+-ZmKRP3:** Se realizó la transformación y la verificación del tamaño del amplicón, usando las enzimas NcoI y XhoI para la restricción. Se obtuvieron muestras positivas de las que se eligió una, el plásmido de esa muestra se secuenció y los resultados mostraron que efectivamente la secuencia se encontraba dentro del plásmido y en marco de lectura (en fase, ver sección de Resultados). Con este plásmido se transformó *E. coli* BL21(DE3)RIPL competentes para la obtención de proteína recombinante His-KRP3.

**pGEX-4T-2-ZmKRP3:** Se siguió el mismo procedimiento que el ya descrito para el vector pET28b+, utilizando las enzimas EcoRI y XhoI, y se obtuvieron los plásmidos clonados y su correspondiente secuenciación confirmando la presencia del inserto en marco de lectura.

### **Inducción de proteína recombinante**

En el caso de ZmKRP3, las colonias de *E. coli* BL21(DE3)RIPL transformadas se incubaron en medio LB toda la noche (overnight) a 37 °C en agitación con antibiótico de selección (kanamicina para pET28b+ y ampicilina para pGEX-4T-2) para obtener los precultivos. De estos se partió para preparar cultivos frescos de 200 mL con el 1% de volumen de precultivo y el antibiótico de selección en la concentración adecuada. Se monitoreó la densidad óptica de las bacterias a 600 nm, y cuando éstas alcanzaron una absorbancia entre 0.6 y 0.8 se inició la inducción con 0.5-1 mM de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Tras tres horas de inducción, las bacterias se colectaron por centrifugación y el pellet se resuspendió en amortiguador de extracción (ver sección **Obtención de extracto crudo proteico**), se sonicó y tras la centrifugación el sobrenadante se empleó para la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad: La proteína His-KRP3 se purificó utilizando una columna de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) de Qiagen® para

proteínas con cola de histidina, y GST-KRP3 se purificó con una columna de resina acoplada a glutatión-agarosa de Sigma-Aldrich® para proteínas con TAG de GST, utilizando buffers con base de urea 8 M. Las alícuotas tomadas fueron correspondientes a cada paso de inducción y purificación realizado. Algunas de las eluciones fueron precipitadas mediante una mezcla de ácido tricloroacético (TCA)/acetona, se centrifugaron 14000 g 10 minutos, se evaporaron y se resuspendieron en urea 8 M.

Para el caso de KRP1;1, se utilizaron construcciones ya existentes en el laboratorio de His-KRP1;1 en pPROEX-HTb, y GST-KRP1;1 en pGEX-4t2 (Rosas-Bringas, 2015), se extrajo plásmido a partir de los glicerolos de mantenimiento correspondientes, se transformaron bacterias competentes BL21, se precultivaron y la inducción se realizó overnight en 100 mL de medio con IPTG 0.5mM para cada una. Se centrifugaron las bacterias, se resuspendió el pellet, se sonicó y se trató con lisozima y urea. La proteína His-KRP1;1 se purificó con la columna de Ni-NTA, mientras que GST-KRP1;1 se purificó con la columna de GST-agarosa.

### **Geles de poliacrilamida**

**Preparación de geles de poliacrilamida:** Se utilizó sistema BioRad™ Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems para la preparación de geles de 1 mm de grosor y su posterior resolución. Se emplearon geles al 10%, 12% o 14% en la fase del gel separador, mientras que la fase concentradora fue siempre al 4%.

**Electroforesis en gel (SDS-PAGE):** Se corrieron los geles mediante electroforesis a 100 V por 1 hora y media.

**Tinción de geles con azul de Coomassie:** Tras la corrida de electroforesis, se incubaron los geles en solución fijadora (40% de etanol al 96° y 10% de ácido acético glacial en agua destilada) por 45 minutos. Posteriormente se lavaron y se adicionaron 20 mL de azul de Coomassie base ácida (70 mg de azul de Coomassie G-250 y 3 mL de HCl concentrado para volumen

final de 1 L), para luego calentar el recipiente en microondas, en 3 a 4 pulsos de 10 segundos o hasta que se visualizaran incipientemente bandas en el gel. Una vez que esto sucedió, se dejó agitando el gel 15 minutos, y se retiró el azul de Coomassie para su reutilización. Posteriormente se agregó agua destilada y se dejó desteñir el exceso de colorante overnight. Para fotodocumentar, se colocó el gel en el ChemiDoc® utilizando una pantalla de conversión a luz blanca, y se procesó la imagen usando la aplicación de Coomassie.

**Secado de geles:** Los geles ya fotodocumentados se procesaron para su secado y conservación **utilizando un secador de geles BioRad™M-583**, de acuerdo a las instrucciones del protocolo. Se utilizó papel filtro y celofán dulce como agentes de retención del gel. El procedimiento se llevó a cabo a 50 psi de presión y 75°C de temperatura, durante 1 hora.

### **Western-Blot (WB)**

**Transferencia húmeda:** Tras la corrida de los geles en SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas a membranas de fluoruro de polivinildeno (PVDF) en sistema de transferencia húmeda (BioRad) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La transferencia se corrió a 50 V por 2 horas.

**Bloqueo, adición de anticuerpos y lavados:** Una vez concluida la transferencia, las bandas correspondientes al marcador se remarcaron con un lápiz. A la membrana se le agregaron 10 mL de una suspensión de leche en polvo **Nestlé™Svelty® al 7.5% en buffer salino de fosfatos (PBS)** denominada mezcla de bloqueo, la cual se dejó incubar con agitación por un periodo de 20 minutos a 1 hora. Al terminar este periodo, se retiró la mezcla de bloqueo y se agregaron 10 mL de una mezcla de leche en polvo al 7.5% en PBS con Tween 20 al 0.1% (PBS-Tween) y de **0.5 a 20 µL de una solución de anticuerpo primario (ver Inmunización y obtención de anticuerpos)**, dependiendo del título a utilizar. Esta mezcla se incubó con agitación a 4°C overnight, posteriormente se retiró y se

realizaron 3 lavados secuenciales con 10 mL de PBS, PBS-Tween y/o PBS astringente (50 mL de un stock de PBS 20x, 29.2 g de NaCl adicionales y 18 mL de Tween 20 para un volumen final de 1 L) dependiendo del experimento, a intervalos de 7 minutos y medio (7:30 minutos). Se **preparó una mezcla de 0.2 a 2  $\mu$ L (dependiendo del título necesario) de anticuerpo secundario de conejo acoplado a la enzima peroxidasa, en 10 mL de leche al 7.5% en PBS-Tween.** Esta mezcla se agregó después de los 3 lavados y se dejó incubar 1 hora en agitación. Posteriormente se retiró y se realizaron otros 3 lavados.

**Revelado de membranas:** Al finalizar los lavados, a la membrana se le adicionaron 2 mL de una mezcla de luminol- $H_2O_2$  1:1, preparada a partir de reactivos separados pertenecientes a un kit Millipore®. Se distribuyó la mezcla uniformemente en toda la membrana y se colocó en el ChemiDoc® utilizando para su fotodocumentación una aplicación multicanal Chemi-colorimetric, que toma varias imágenes en un intervalo determinado (se eligió un programa de 20 imágenes, la primera a los 20 segundos de inicio de protocolo, la última a 4 minutos).

**Tinción de membranas con rojo de Ponceau:** Al finalizar el revelado, se retiró la mezcla luminol-peróxido y se agregaron 10 mL de una solución de rojo de Ponceau (0.5 g de rojo de Ponceau S y 25 mL de ácido acético glacial, para un volumen final de 500 mL con agua destilada), para dejar agitando 7:30 minutos. Una vez finalizada la agitación, se retiró el rojo de Ponceau y se hicieron de 3 a 5 lavados con agua destilada. La membrana se visualizó en el ChemiDoc® utilizando para su fotodocumentación la aplicación Alexa488. Posteriormente la membrana se dejó secar overnight para almacenarla.

**Desnudado y reutilización de membranas:** Para reutilizar las membranas de PVDF, se reactivaron con metanol, se les retiró el rojo de Ponceau con 10 mL de buffer de electroforesis, y se les adicionaron 10 mL de buffer de desnudado (57.078 g de cloruro de guanidinio y 694  $\mu$ L de  $\beta$ -

mercaptoetanol en 100 mL de disolución acuosa) transparentando la membrana. Se incubó en este buffer con agitación durante 25 minutos, se retiró el buffer y se lavó la membrana con agua hasta recuperar su **color blanco y eliminar el  $\beta$ -mercaptoetanol**. Entonces se les agregó mezcla de bloqueo y se procedió con el protocolo para Western-Blot.

### **Inmunización de conejos y obtención de anticuerpos**

**Obtención de péptidos sintéticos:** Las secuencias de 15 aa elegidas para generar los anticuerpos (ver sección de Resultados) se mandaron diseñar **en péptidos acoplados a la proteína KLH, con la empresa GenScript™**. Se recibieron 5 mg de cada uno de los péptidos, y se prepararon soluciones de 1 mg/mL en condiciones estériles de cada péptido.

**Esquema de inmunización:** Se seleccionaron 3 conejos, 1 para obtener anticuerpo  $\alpha$ -ZmKRP1;1 y los otros 2 para obtener  $\alpha$ -ZmKRP3. Se aplicó un esquema de inmunización de 4 semanas, en el cual a cada conejo se le extrajo 1 mL de sangre para obtener suero preinmune. Luego de esto, **a los conejos se les inyectaron 100  $\mu$ L de péptido sintético** disuelto en PBS 1x vía ganglio poplíteo izquierdo, a la mitad de esa semana se les aplicó otra dosis idéntica en ganglio poplíteo derecho. Al inicio de la segunda semana a cada conejo se administró **200  $\mu$ L de antígeno con adyuvante incompleto de Freund**, y se realizó una sangría de prueba de 1 mL a cada conejo. **A la mitad de esa semana se aplicaron 100  $\mu$ L de antígeno-adyuvante incompleto** a cada conejo. En la tercera semana se **administraron 100  $\mu$ L de antígeno a cada conejo vía intraperitoneal**, y en la cuarta semana se les realizó la punción cardíaca, extrayendo 46 mL de sangre aproximadamente a cada conejo.

**Obtención de sueros crudos:** La extracción de sangre previa a la inoculación de antígeno y la de la sangría de prueba se recogió en tubos **Vacutainer™ de tapa amarilla, se centrifugaron y el suero recuperado** sobre la gelatina separadora del tubo se extrajo y se colocó en tubos

Eppendorf de 1.5 mL, etiquetados de acuerdo al tipo de suero obtenido. La sangre obtenida por punción cardiaca se centrifugó y el suero se distribuyó en 4 tubos Falcon de 15 mL guardados a -70°C. De ahí se tomaron alícuotas de 1 mL para trabajar, guardadas a 4°C.

### **Inmunopurificación de anticuerpos**

**Obtención de zona de inmunorreconocimiento:** Se cargó proteína recombinante (fracción de pellet o fracción de elución) en geles de poliacrilamida, se corrió la electroforesis y se transfirió a membranas de PVDF de 0.45 µm de poro. Las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau y se definió la zona donde se hallaba exclusivamente la proteína recombinante de interés en todos los carriles. Esta zona se encerró marcándola con un lápiz, se destiñó la membrana con buffer de electroforesis y se recortó la tira marcada con tijeras.

**Tratamientos con glicina:** Se prepararon 50 mL de una disolución de glicina 0.2 M a pH 2.5, se esterilizó por filtración y se agregaron 5 mL a tubos Falcon de 15 mL en los que se agregaron las tiras recortadas. Se incubaron por 15 minutos en agitación, se retiró la disolución y se lavaron las tiras con 5 mL de PBS-Tween cada una por 7:30 minutos. Se preparó mezcla de bloqueo (7.5% de leche en PBS-Tween) para incubar durante 1 hora con agitación, 5 mL por tira. Se realizaron 3 lavados de 7:30 minutos con PBS-Tween, y se prepararon 2 mezclas de 10 mL de leche al 7.5%, a las que se agregaron 2.5 µL de suero preinmune crudo de KRP1;1 y 2.5 µL de suero inmune crudo, respectivamente. La mitad de las tiras se incubó con una mezcla, y la otra mitad con la otra, a 4°C durante 4 horas en agitación. Finalizada la incubación, se conservó cada mezcla de leche como control negativo de inmunopurificación. Se realizaron 3 lavados de 7:30 minutos con PBS-Tween a las tiras y a cada condición se le agregaron 1.5 mL de glicina, incubándose con agitación durante 2 minutos. Inmediatamente al finalizar se traslada esta mezcla a un tubo

Eppendorf de 2 mL, agregando 195  $\mu$ L de Tris-base 1 M.

**Purificación por centrifugación:** Se agregaron 500  $\mu$ L de cada mezcla obtenida a tubos de centrifugación Amicon-Ultra® con membrana, y éstos se colocaron dentro de tubos Eppendorf especiales para centrifugación. Se centrifugaron a 14000 rpm 15 minutos 3 veces, reemplazando el volumen de cada tubo de centrifugación con 500  $\mu$ L de PBS cada vez. Posterior a esto, se agrega otro volumen de 500  $\mu$ L de PBS a cada tubo de centrifugación, y se recoge mediante pipeteo en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se colocó cada tubo de centrifugación de manera inversa en su Eppendorf y se les dio un spin de centrifugación para evitar pérdidas.

### **Extracción de proteína de ejes embrionarios**

**Imbibición de ejes embrionarios:** Se extrajeron ejes embrionarios a partir de semillas secas de maíz chalqueño (cosecha 2015) con navajas delgadas, dejando expuestas únicamente la plúmula y la radícula y retirando la mayor cantidad posible de endospermo y escutelo. Se lavaron con HClO al 0.5%, durante 10 minutos. Se preparó un stock de buffer de imbibición 2x (5 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7.6, 2.5 mL de KCl 2 M, 1 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M y H<sub>2</sub>O destilada para 50 mL de solución) que se esterilizó por autoclave, junto con círculos de papel filtro y servitoallas. Se preparó en condiciones estériles una solución de imbibición a partir del stock, con 120 mM de sacarosa. A cada caja Petri con círculos de papel filtro se le colocaron 30 ejes suficientemente separados y se les agregaron 5 mL de buffer de imbibición 1x. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas, para preparar un pool de extracto proteico. Se obtuvieron también extractos a 18, 24 y 36 horas para otros experimentos. Finalizados esos tiempos, los ejes se guardaron a -70°C en tubos Eppendorf.

**Obtención de extracto crudo proteico:** Se preparó buffer de extracción de proteínas con base de urea (605.7 mg Tris base, 48.048 g de urea, 1 g

de SDS y agua para 100 mL de disolución). Se colocaron los Eppendorf con los ejes en nitrógeno líquido, y se transfirieron a un mortero, donde se les agregaron 1.8 mL de buffer de extracción, y se molieron con pistilo hasta obtener una suspensión espesa con la menor cantidad posible de partículas sólidas grandes. Esta suspensión se distribuyó en 2 tubos Eppendorf de 1.5 mL, cuidando que ambos tuvieran el mismo volumen. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm 30 minutos a 25°C, el sobrenadante de cada tubo se recolectó evitando tomar pellet (restos sólidos) o lípidos de la superficie, y se colocó en tubos nuevos que se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. La cantidad de proteína se determinó por Biodrop **de la siguiente manera: Se colocó 1  $\mu$ L de extracto en el lector, se le dieron 3 lecturas, se limpió el lector, se colocó agua destilada y se volvió a limpiar.** Los resultados fluctuaron entre 7 y 14  $\mu$ g/ $\mu$ L, y se utilizaron para preparar muestras proteicas de 50  $\mu$ g de extracto (volumen variable), 6.25  $\mu$ L de buffer de carga para proteínas 4x y agua destilada para un volumen final de 25  $\mu$ L por muestra. Estas muestras se cargaron en un SDS-PAGE, se tiñó el gel con Coomassie y se fotodocumentó en ChemiDoc® de acuerdo a los protocolos ya mencionados.

### **Ensayos de competencia**

Para cada ensayo se prepararon mezclas de 5 mL de leche al 7.5%, a las que se agregó anticuerpo primario en el mismo título. Posteriormente se realizaron las precompetencias utilizando 1 de 2 métodos: A) con proteína en disolución, o B) con proteína inmovilizada.

**A) Método de disolución:** A una de las mezclas leche-anticuerpo se le agregó una disolución cuantificada por Biodrop de proteína (ya fuera péptido sintético o proteína recombinante) para tener de 2 a 25  $\mu$ g de ésta en la mezcla; a otra mezcla se le agregó 10 veces la cantidad de proteína agregada a la mezcla anterior. A una tercera mezcla se le agregó

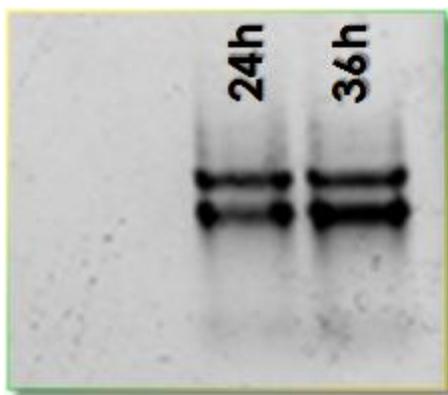
como competidor negativo una disolución de BSA 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para tener la misma cantidad de proteína que la mezcla más concentrada. A la última mezcla no se le agregó proteína. La precompetencia consistió en incubación de las mezclas a 4°C con agitación por una noche. Para el ensayo de competencia, al día siguiente se realizó un WB con un cierto número de carriles de proteína de extracto total (ET) o proteína recombinante; la membrana obtenida se tiñó con rojo de Ponceau y se marcaron con lápiz las secciones, una por cada carril visualizado. La membrana se lavó con buffer de electroforesis, se bloqueó y cada sección se recortó con tijeras, se colocó en un recipiente y se le agregó una de las mezclas ya mencionadas, para incubar la competencia toda la noche como anticuerpo primario. El resto del protocolo de WB fue el mencionado anteriormente.

**B) Método de inmovilización:** Se corrieron la proteína de interés (sintética o recombinante) y la BSA en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau para localizar las bandas de interés. Éstas se encerraron marcándolas con lápiz, se lavó la membrana con buffer de electroforesis y se recortó la zona marcada dejando una tira. A una mezcla de leche-anticuerpo se le agregaron 1 a 4 tiras de proteína de interés, a otra se le agregaron 1 a 4 tiras de BSA, a otra se le agregaron 1 a 4 tiras recortadas de una zona sin proteína, y a otra mezcla no se le agregaron tiras. Estas mezclas se precompitieron a 4°C overnight, y se realizó el resto del protocolo de competencia, idéntico al método descrito en A).

## 8. RESULTADOS

### Amplificación de *ZmKRP3*

Utilizando los primers diseñados para la amplificación de la secuencia codificante (CDS) de *ZmKRP3* (ver Materiales y metodología), se realizó la retrotranscripción (RT) y la reacción de PCR. Para esto, se extrajo RNA de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 y 36 horas, ya que se reportó que a partir de 24 horas hay expresión del gen (Rosas-Bringas, 2015); se cuantificaron ambas muestras vía Biodrop, y se verificó su integridad mediante gel de agarosa, observándose el doble bandeo esperado de las fracciones 18s y 26s (**Figura 10**).

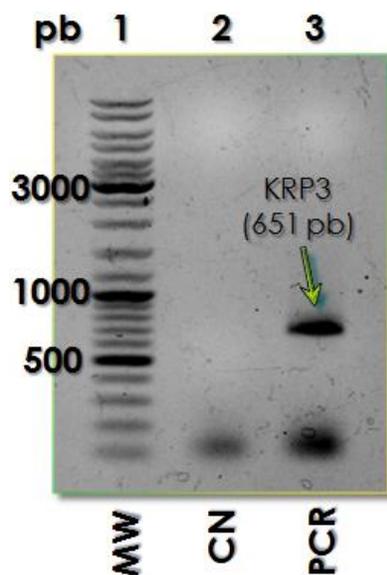


**Figura 10.** Verificación de la integridad del RNA extraído para realizar RT. De izquierda a derecha: RNA de 24 horas y 36 horas. Banda superior 26S, inferior 18S.

Una vez obtenido el RNA y realizada la RT, se comenzaron a realizar los experimentos con el cDNA obtenido. El análisis de AmplifX determinó que las  $T_M$  de los primers forward y reverse eran de  $65^\circ\text{C}$  y  $69^\circ\text{C}$ , respectivamente. Estos valores son altos y cercanos a la  $T$  de extensión habitual de PCR ( $72^\circ\text{C}$ ), por lo cual se realizó un experimento de Touchdown (PCR con diferentes temperaturas de alineamiento), empleando una  $T_M$  en un rango de  $58\text{-}68^\circ\text{C}$  utilizando el mix de polimerasa Jumpstart®.

Se observó una ligera amplificación de una banda del tamaño esperado (651 pb) a  $62^\circ\text{C}$  y  $66^\circ\text{C}$ , pero se encontraron complicaciones dado que estas condiciones no fueron reproducibles, observándose también

presencia de una banda muy intensa con mayor desplazamiento y que presuntamente indicaba presencia de productos truncos, pese a que los controles tanto negativo como positivo salían correctos. Por lo tanto, se probaron 23 condiciones diferentes de PCR, utilizando 2 polimerasas distintas y 3 inductores de polimerasa en diferentes cantidades (ver Materiales y metodología). Se determinó que la mejor condición se daba al usar Jumpstart® y DMSO al 3% para la CDS, aunque la mejor condición para los controles positivos era con iProof® y DMSO 3% además de 3.5 µg de BSA. Aun así la amplificación de la CDS fue baja, por lo que se optó por un procedimiento de anidación de PCR (PCR usando DNA amplificado



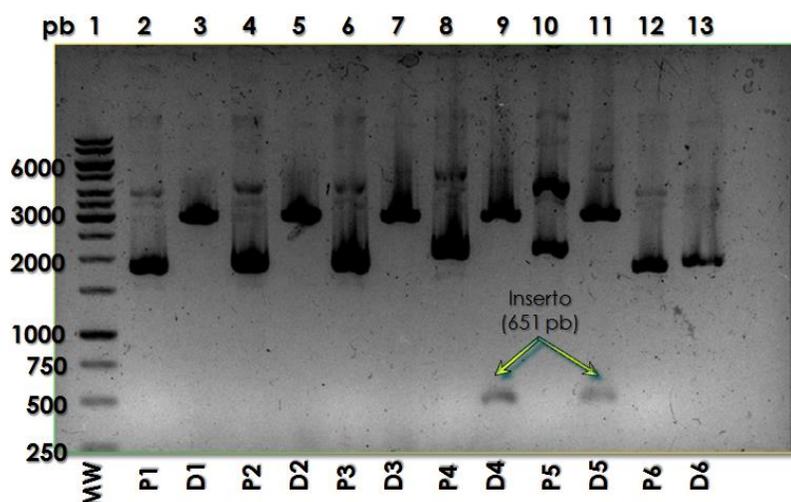
**Figura 11.** Amplificación de la CDS de *ZmKRP3*. Carril 1, marcador de peso molecular (MW) Carril 2, Control negativo (CN). Carril 3, Reacción de PCR anidada con Jumpstart® primero y iProof® después (ver texto). Se señala la banda del amplicón a la distancia esperada.

de una PCR anterior como templado). La primera PCR se realizó con las condiciones óptimas para la CDS usando la enzima Jumpstart®, mientras que para la segunda PCR se realizaron 2 anidaciones usando las 2 condiciones mencionadas arriba. En el caso de la anidación con la enzima iProof® en una de las PCR subsecuentes, los resultados fueron óptimos dado que se pudo observar claramente la banda esperada a 651 pb, como se observa en la **Figura 11**.

Se verificó la reproducibilidad del experimento y se purificó el producto de PCR a partir de la banda en gel para los posteriores procesos de ligación y transformación (ver Materiales y Metodología). También se observó que el hacer ambas PCR de la anidación con Jumpstart® y 3% de DMSO daba resultados adecuados, por lo cual también se trabajó con esta condición en experimentos posteriores.

### Verificación de tamaño de la construcción pGEM®-T easy-ZmKRP3

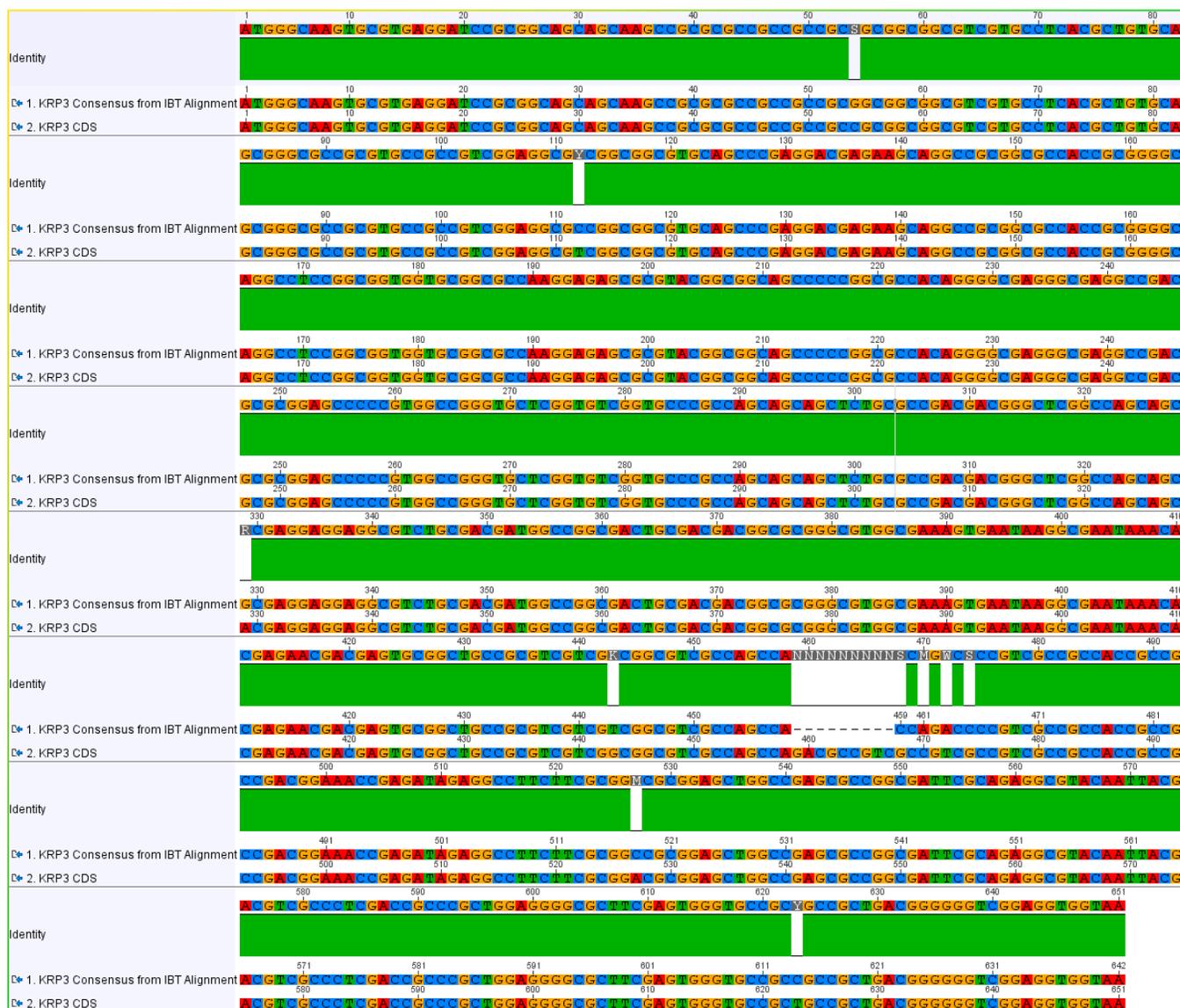
Después de purificar el producto de PCR, se ligó en el vector de mantenimiento pGEM®-T easy y posteriormente se transformaron células XL10-GOLD. Se eligieron 6 colonias positivas (blancas, de acuerdo a Materiales y metodología), se extrajo el plásmido y se realizó la digestión con enzima EcoRI para verificar la clonación mediante análisis en gel de agarosa.



**Figura 12.** Verificación de tamaño de construcciones pGEM®-T easy-ZmKRP3. En el carril 1 se cargó marcador. El resto de carriles impares, marcados como D1, D2, D3, etc. corresponden a las Digestiones realizadas a cada una de las 6 muestras elegidas, mientras los carriles pares marcados como P1, P2, P3, etc. corresponden a los Plásmidos correspondientes sin digerir. Se señalan con flechas las 2 bandas de inserto, halladas en sólo 2 de las digestiones, elegidas para secuenciación.

En la **Figura 12** se observa que de las 6 muestras seleccionadas, solamente 2 presentan tanto la banda correspondiente al inserto (651 pb) como la correspondiente al plásmido (3016 pb). Las otras 4 sólo

presentan la banda del plásmido. A modo de control negativo, se cargaron mezclas de cada colonia sin cortar, teóricamente se esperaría una banda de 3667 pb pero debido a la presencia de distintos topoisómeros del plásmido, se observan varias bandas en tamaños de 2000 a 4000 pb. Los plásmidos de las 2 muestras positivas se secuenciaron, sin obtener resultados positivos. Por lo tanto se inició la clonación dirigida, la transformación y la verificación de tamaño usando las 2 muestras positivas ahora en el plásmido pET28b+, obteniendo resultados positivos.



**Figura 13.** Identidad de la secuencia del CDS de *ZmKRP3* (KRP3 CDS) con la secuencia consenso producto de 2 secuencias obtenidas de muestras enviadas al IBT (KRP3 Consensus from IBT Alignment), que se muestran en los **Apéndices 10 y 11.**

### Secuenciación de construcción pET28b+ -*ZmKRP3*

Se envió la construcción pET28b+ -*ZmKRP3* por duplicado a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT). Por un lado, se utilizó el primer KRP3-Reverse (**Tabla 4**) y por el otro, un primer denominado T7, que amplifica a partir del promotor de la RNA polimerasa en el plásmido. Estas muestras develaron resultados adecuados, los cuales se muestran en los **Apéndices 10 y 11**. Las secuencias obtenidas se alinearon en Geneious® para obtener una secuencia consenso, la cual se alineó a su vez con la secuencia de *ZmKRP3* teórica obtenida en bases de datos, tal como se observa en la **Figura 13**. De acuerdo a esta figura, ambas secuencias comparten una identidad de 97.1%, presentando 6 cambios de 1 base (polimorfismos de 1 nucleótido, SNPs), pero resalta además una zona entre las bases 459 a 474 de la *ZmKRP3* teórica que presenta varias diferencias con la *ZmKRP3* secuenciada, puesto que las primeras 9 bases de esta región no se encuentran en la secuenciada (en esa zona se presentan 9 gaps [espacios vacíos de alineamiento], implicando esto que la *ZmKRP3* secuenciada presenta solamente 642 pb comparados con los 651 pb de la teórica), lográndose alinear sólo las bases 468 a 474 que también presentan diferencias, dado que mientras la *ZmKRP3* teórica presenta el motivo GCCGTCG, la secuenciada muestra el motivo CCAGACC.

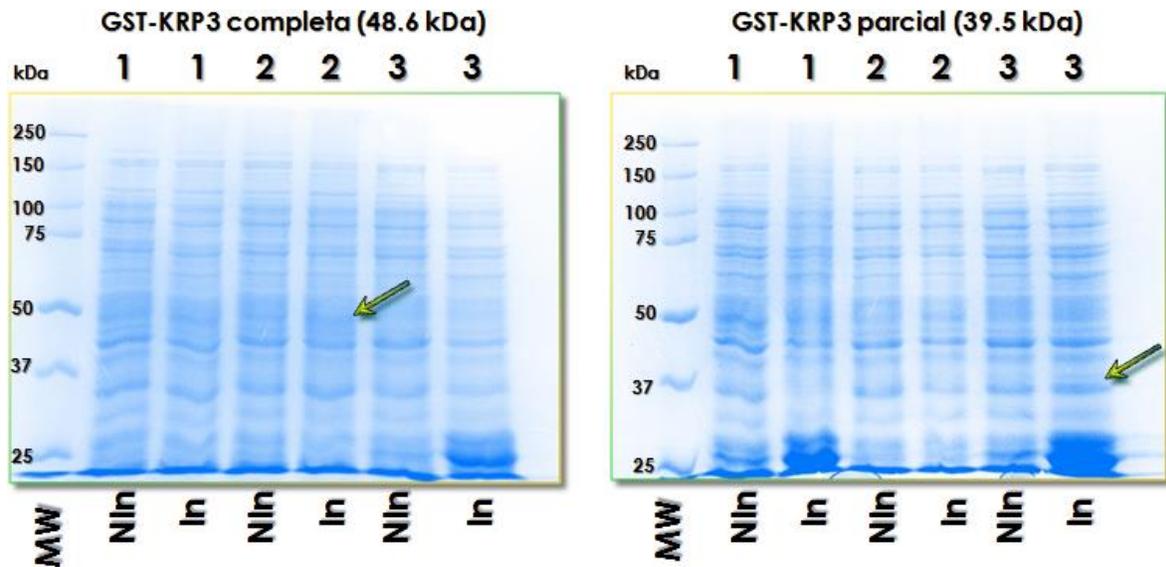
Dada esta situación, ambas secuencias génicas fueron traducidas *in silico* y alineadas para determinar las diferencias que pudieran presentarse a nivel proteico. Se observó que ambas proteínas presentaban un porcentaje de identidad de 94.9%, debido a 5 sitios con un cambio puntual de residuo, indicando que de los 6 posibles SNPs hallados en la secuencia genética, uno corresponde a una mutación silenciosa (en la secuencia génica teórica las bases 52-54 corresponden al codón GCC, mientras en la experimental corresponden a GCG, ambos codones se traducen en el residuo alanina). La zona diferente a nivel

genético también es distinta a nivel proteico, puesto que mientras en la secuencia proteica teórica los residuos 153 a 158 consisten en la secuencia QTPSPS, en la ZmKRP3 experimental la secuencia correspondiente a esa zona es únicamente HQ---T, por lo tanto hay 3 residuos de menos en la secuencia experimental (213 aa) que en la teórica (216 aa). Estos datos pueden observarse en el **Apéndice 12**. Sin embargo, podrían hacer falta más réplicas de la secuenciación para tener certeza de estos resultados.

### Inducción de proteína recombinante ZmKRP3

Posterior a la secuenciación y a la verificación de que el inserto correspondiera a *ZmKRP3*, se procedió a realizar la transformación en bacterias de expresión BL21(DE3)RIPL con el vector pET28b+-HisKRP3. Hubo dificultades al realizar estos experimentos, debido a que no fue posible detectar inducción de la proteína recombinante ni por tinción de gel con Coomassie, ni en WB **utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -KRP3** generados en el laboratorio (ver sección Caracterización de anticuerpos). Aun así se purificaron los extractos bacterianos obtenidos por columna Ni-NTA y se obtuvieron todas las fracciones de purificación, donde destacaba la presencia de bandas en alturas inferiores a la esperada (23 kDa), esto sugería que la proteína se degradaba durante o incluso antes de la purificación. En las eluciones se llegó a ver una banda a la distancia esperada, pero al realizar ensayos posteriores no se obtuvieron resultados positivos.

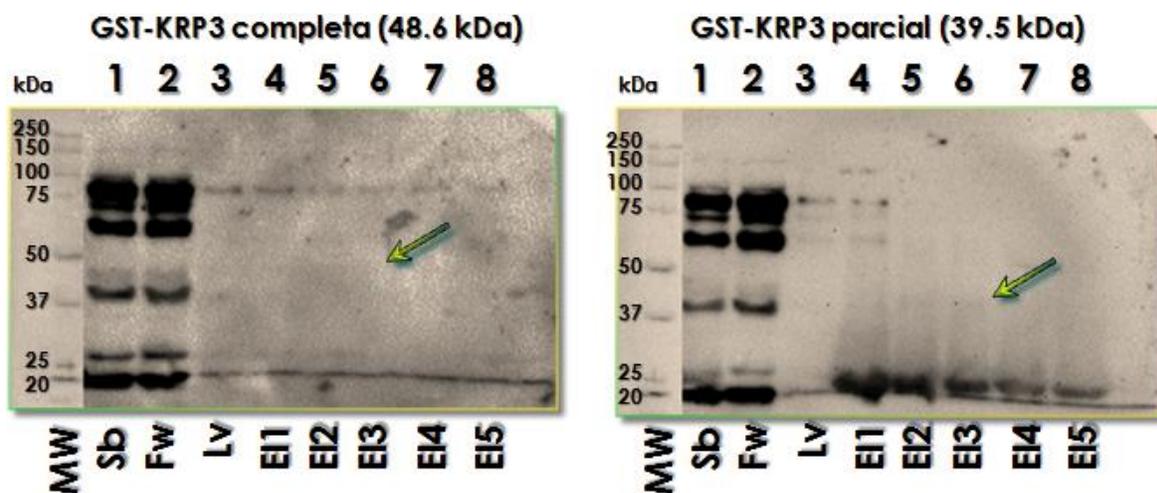
Por ello se decidió seguir otra estrategia, consistente en obtener la proteína recombinante GST-KRP3 a partir de una construcción realizada en el vector pGEX-4T-2. Para lo cual se realizaron (ver Materiales y metodología) la amplificación **(Apéndice 13)**, la ligación, la transformación en bacterias de mantenimiento, la selección de colonias **(Apéndice 13)**, la transformación en bacterias de expresión, la



**Figura 14.** Inducción de proteína recombinante GST-KRP3 completa (izquierda) y parcial (derecha). Los números en la parte superior indican las 3 diferentes clonas de las que provienen las muestras. MW = Marcador. NIn = No inducida. In = Inducida. Se señala con flechas la zona donde parece observarse la banda de interés en la distancia esperada. Destaca el aumento de proteínas de bajo peso en carriles inducidos de ambos experimentos.

sobreexpresión y la inducción de la proteína recombinante correspondientes a esta estrategia, realizada tanto para obtener proteína completa, como para obtener un péptido de  $\approx 14$  kDa (sin el C-terminal). Se observa en la **Figura 14** que para ambos casos la inducción fue baja, apenas dándose un ligero incremento en la cantidad de proteína en el tamaño esperado en algunas clonas al azar; sin embargo, en ambos casos destaca nuevamente el hecho de que en varias de las clonas inducidas, hay aumento de proteína por debajo del tamaño esperado, sugiriendo que posiblemente la proteína se degrada inmediatamente después de ser inducida, o no se traduce en su totalidad. Se especulaba que podría haber existido un problema con la traducción de la secuencia por posible falta de secuencias Shine-Dalgarno en ambos plásmidos, sin embargo de acuerdo al **Apéndice 7**, estas secuencias sí se hallan justo antes de donde se insertaría la secuencia de interés, por lo que esa no sería causa del problema.

Esperando que aún hubiera una cierta cantidad de proteína íntegra del tamaño esperado, se realizó la purificación de ambas proteína recombinantes GST-KRP3, obteniendo las fracciones Flow-through (no adsorbida), lavado y eluciones, tal como se muestra en la **Figura 15**. Tanto en el WB revelado con el ab  $\alpha$ -KRP3 en esta figura, como en las tinciones con rojo de Ponceau mostradas en el **Apéndice 14**, se muestra que las eluciones no parecen presentar bandas significativas del tamaño esperado en el caso de la proteína completa, en el caso de la GST-KRP3 parcial se ve una zona que podría indicar la presencia de una banda tenue. Las bandas significativamente visibles aparecen abajo del tamaño esperado, lo que reforzaría las ideas de que la proteína sufre degradación antes de su purificación, o su traducción es incompleta. Pensando en que el ab  $\alpha$ -KRP3 no fuera lo suficientemente sensible, se desnudaron las membranas y se volvieron a revelar utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -GST-CDKB, para visualizar al TAG (**Apéndice 15**). El patrón observado resultó ser idéntico, por lo tanto se concluye que la proteína ZmKRP3 recombinante, estuviera como secuencia completa (216 aa) o parcial (140



**Figura 15.** Purificación de proteínas recombinantes GST-KRP3 completa (izquierda) y parcial (derecha) reveladas con anticuerpo  $\alpha$ -KRP3 1:1000, y secundario 1:15,000. Sb = Sobrenadante. Fw = Flow-through (fracción no adsorbida). Lv = Lavado. E1-5 = Eluciones. Se señala con flechas la altura donde parece observarse la banda de interés en la tercera elución.

aa), podría ser de un tamaño menor debido a degradación quizá incluso en las bacterias, o a una traducción incompleta.

#### Especificidad de secuencias de 15 aa

Las secuencias de las 10 KRPs de maíz conocidas se alinearon en Geneious®, tal como se describe en Materiales y metodología. Como se observa en el **Apéndice 8**, casi todas las ZmKRPs tienen motivos conservados en buena parte de su secuencia, aunque la que más diferencias presenta con sus homólogos en maíz es la ZmKRP3. En el caso de ZmKRP1;1 no se pudo hallar una secuencia de 15 aa específica en el amino terminal, debido a que en esa zona se presentaban varias similitudes e identidades con ZmKRP1;2 y en menor medida, ZmKRP1;3. Se eligió una zona cercana al carboxilo terminal, antes de la zona conservada, correspondiente a la secuencia HKTGPSLPAATPAA. Esta secuencia forma parte de una región en la que en la secuencia consenso predominan los gaps (RRV-----XAPP), debido a que 5 de las ZmKRPs presentan gaps en 9 de los 16 espacios destinados a residuos (La secuencia de ZmKRP1;1 presenta 2 gaps). Se observó que ningún residuo de la secuencia de ZmKRP1;1 empalmaba con la secuencia consenso, pero residuos específicos apareaban con algunas secuencias de las otras ZmKRPs de manera dispersa (por ejemplo, el alineamiento empareja el tercer residuo, T, con una T hallada en KRP5;2, o el sexto residuo, S, con otra S de ZmKRP3). En el caso del alineamiento con ZmKRP1;2 (secuencia QKTGCSSSPATTTSA) se hallaron 7 identidades, tal como muestra el **Apéndice 8**.

Para la ZmKRP3 se encontró una secuencia de 15 aminoácidos distinta de todas las demás ZmKRPs, las cuales presentan alta identidad de secuencia en esa zona, siendo la secuencia consenso MERXTRETTPCSLI. La ZmKRP3 en cambio presentaba la secuencia LGQQHEEEASATMA.

Se realizó la búsqueda por BLASTp (NCBI) de ambas secuencias, en el

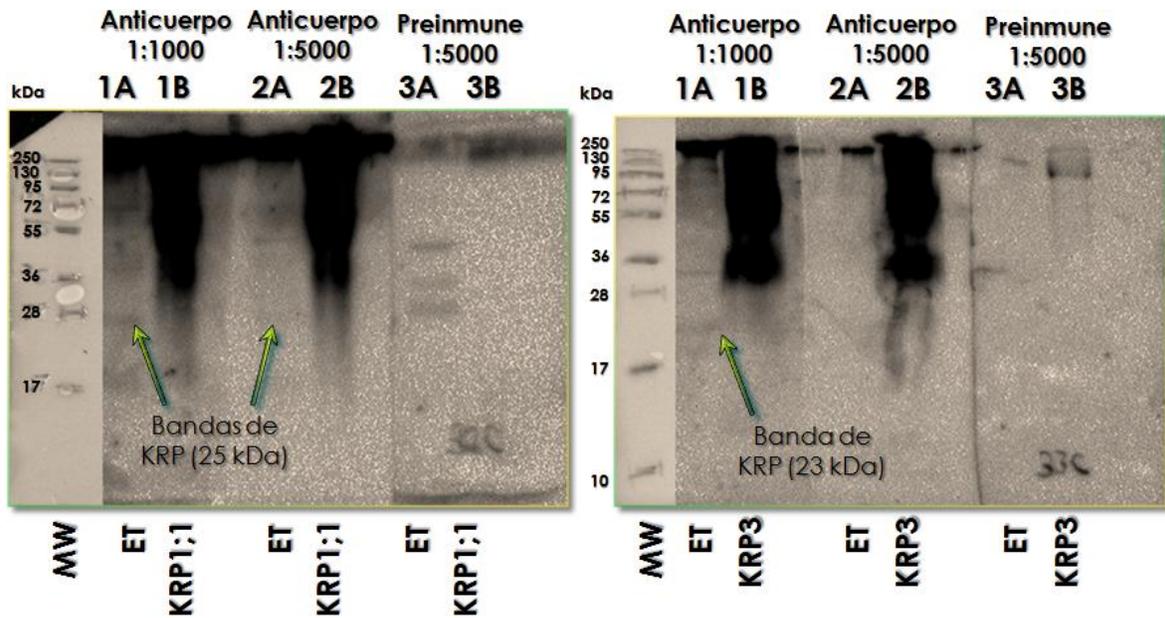
proteoma tanto de maíz como de *E. coli*, con el objetivo de buscar si habría alguna proteína en estos organismos que tuviera masa molecular similar a alguna de las 2 ZmKRPs (20 - 25 kDa), y que por lo tanto, pudiera dar un falso positivo en Western-Blot. Los resultados para cada ZmKRP en el proteoma de maíz indicaron 3 secuencias correspondientes a estas proteínas ya reportadas en bases de datos. En caso de ZmKRP1;1 sólo se halló una proteína con tamaño similar (204 aa, 21.9 kDa), al hacer el alineamiento con ZmKRP1;1 en Geneious®, se encontró una identidad baja (20.7%). Para ZmKRP3 se encontró una proteína de 208 aa y 23.2 kDa, al alinear ambas proteínas la identidad fue de 17.6% **(Apéndice 16)**. Por lo que no se consideraron como posibles falsos positivos.

Para el caso del proteoma de *E. coli* no se encontró alguna proteína de tamaño similar que además tuviera identidad en los 15 aminoácidos de las secuencias elegidas **(Apéndice 17)**.

Un análisis adicional se realizó para verificar si en proteínas de maíz de tamaño similar al de las ZmKRPs pudiera haber dominios similares a los hallados en la secuencia de KLH, ya que el péptido se conjugó con dicha proteína para realizar la inmunización en conejos, para lo cual se hizo BLASTp de la secuencia de KLH en el proteoma de maíz. Todos los resultados hallados correspondían a reportes de secuencias de polifenol oxidases de maíz de más de 546 aa (59.6 kDa), por lo tanto ninguno podría representar un falso positivo para alguna de las ZmKRPs **(Apéndice 18)**.

#### Caracterización de anticuerpos $\alpha$ -ZmKRP1;1 y $\alpha$ -ZmKRP3

Una vez finalizado el esquema de inmunización y obtenido el suero inmune, se realizaron ensayos de reconocimiento para cada ab a diferentes títulos para determinar cuál era el título óptimo a emplear. En geles de SDS-PAGE se cargaron 30  $\mu$ g de ET obtenido a partir de ejes embrionarios de maíz. La **Figura 16** muestra los resultados de estos

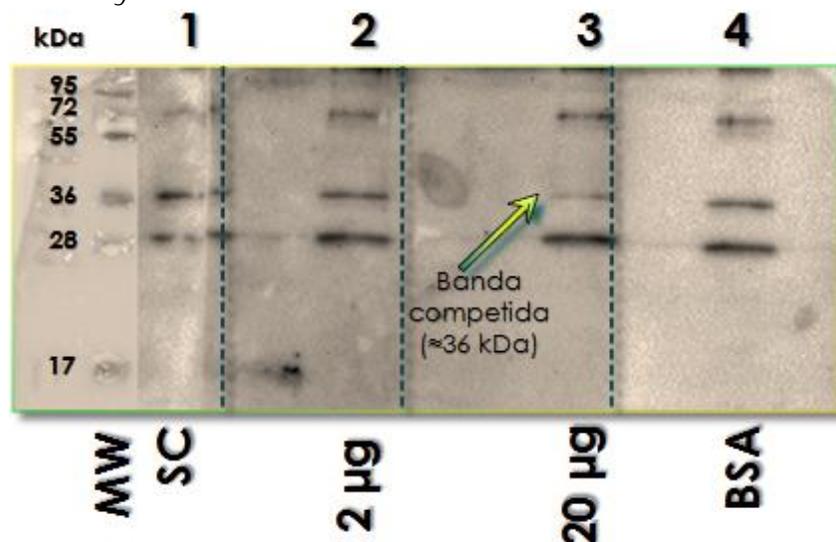


**Figura 16.** Ensayos de inmunorreconocimiento por WB para el ab  $\alpha$ -KRP1;1 del conejo I-1 (izquierda) y para el ab  $\alpha$ -KRP3 del conejo I-2 (derecha). Cada membrana se seccionó en 3 partes para trabajar con una condición de ab primario diferente, enunciada en la parte superior. MW = marcador de peso molecular. En los carriles 1A, 2A y 3A se cargaron 30  $\mu$ g de Extracto total (ET), mientras que en los 1B, 2B y 3B se cargaron 2  $\mu$ g del péptido sintético unido a KLH correspondiente. El título del ab 2º fue 1:20,000. Se señalan las bandas de interés, indicando sus masas.

ensayos para el ab  $\alpha$ -KRP1;1 (conejo I-1) y el ab  $\alpha$ -KRP3 (conejo I-2). Se observa en esta figura que el ab  $\alpha$ -KRP1;1 reconoce en el ET a 0 horas una banda a la altura esperada (25 kDa) en ambos títulos de ab, mientras que reconoce muy fuertemente a la proteína sintética dada la inmunogenicidad de la KLH. Sin embargo, el suero preimmune (SPI) pese a que no reconoció bandas en la zona de la proteína sintética (conforme a lo esperado), en la zona de ET reconoció algunas bandas, una de las cuales tenía una masa con tamaño cercano a la banda de interés, aunque ligeramente arriba de 25 kDa. Para el caso del  $\alpha$ -KRP3 del conejo I-2 el reconocimiento en el ET es débil, observándose una banda en la altura esperada (23 kDa) con el título 1:1000. Aun así, el péptido sintético con la KLH también es reconocido de manera importante en ambos títulos, disminuyendo drásticamente este reconocimiento en el caso del suero preimmune, que no parece reconocer bandas en este caso.

### Validación de anticuerpo $\alpha$ -KRP1;1

Con los resultados obtenidos, se planteó la estrategia para la validación de los anticuerpos. El primer intento **para  $\alpha$ -KRP1;1** consistió en realizar un ensayo de competencia utilizando péptido sintético en solución acoplado a KLH para competir contra ET; dicho ensayo no tuvo un resultado concluyente.

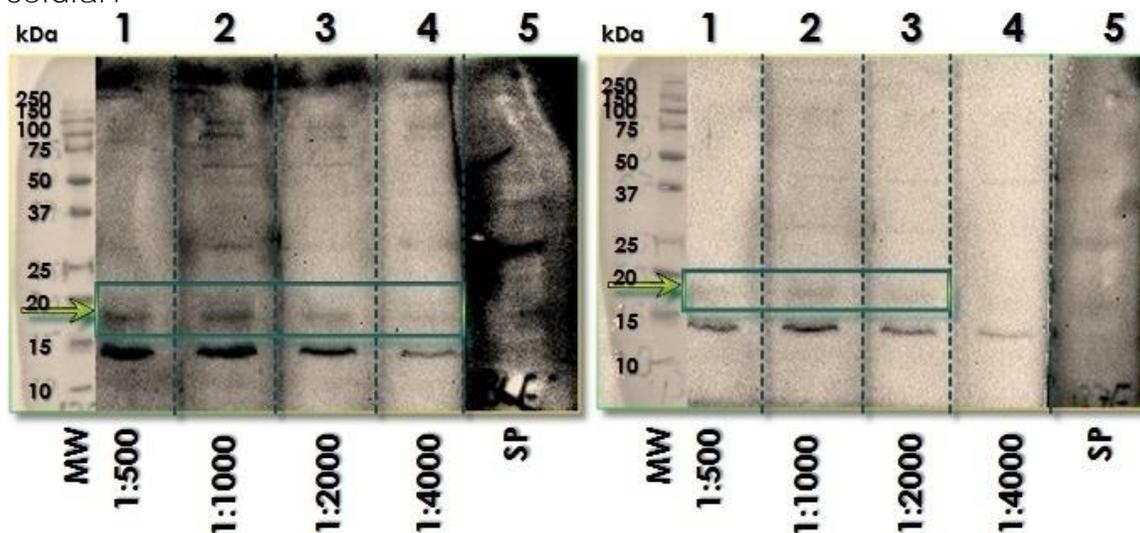


**Figura 17.** Ensayo de competencia del ab  $\alpha$ -KRP1;1 en WB, compitiendo la proteína His-KRP1;1 contra sí misma. En cada carril se cargaron 20  $\mu$ g de His-KRP1;1. MW es el marcador de masa molecular. SC indica la zona Sin Competir. En los carriles 2 y 3 se muestran las competencias de His-KRP1;1 con 2 y 20  $\mu$ g. En el carril 4 se muestra la competencia con 20  $\mu$ g de BSA (proteína no relacionada). El título del ab primario fue 1:2500, y el del secundario 1:20,000. Se señala con una flecha la banda que compite.

En un segundo intento, se utilizó la proteína recombinante His-KRP1;1 (Rosas-Bringas, 2015) para realizar la competencia nuevamente en solución, compitiendo la proteína recombinante con el anticuerpo policlonal y cargando la misma proteína en gel, de acuerdo a lo que muestra la **Figura 17**. Se observa **que utilizando 20  $\mu$ g de His-KRP1;1** sí hay competencia de la proteína recombinante contra sí misma, como se **esperaba**; aunque la banda que compite corre ligeramente más arriba ( $\approx$  36 kDa) de la altura esperada para la proteína recombinante ( $\approx$  29 kDa), mientras que una segunda banda detectada a 28 kDa no compite. El rojo de Ponceau no alcanzó a detectar bandas en esta membrana.

Así que se realizó un nuevo ensayo de competencia, de proteína recombinante contra ET, pero sin resultados positivos.

Debido a esto se llevó a cabo otra metodología para utilizar fracciones de inducción y de purificación de las proteínas recombinantes His-KRP1;1 y GST-KRP1;1 como competidores contra ET. Ningún ensayo tuvo resultados determinantes, denotando la imposibilidad de validar el anticuerpo al competir contra extractos crudos de maíz. Sin embargo, al estar validado en el caso de la proteína recombinante, el anticuerpo es útil para realizar ensayos con ésta, como por ejemplo análisis *in vitro* de interacciones con otras proteínas participantes en la regulación del ciclo celular.

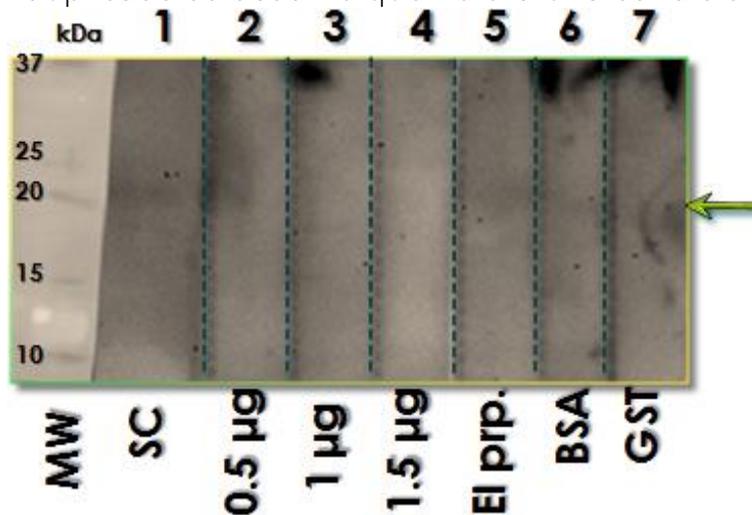


**Figura 18.** Ensayos de inmunorreconocimiento para el ab  $\alpha$ -KRP3. En ambos casos, en los 5 carriles marcados se cargaron 80  $\mu$ g de ET de 0 horas, y cada sección de membrana se incubó con ab 1<sup>o</sup> en el título mostrado en la parte inferior (SP = preinmune 1:500). MW = marcador de masa molecular. El experimento de la izquierda se reveló con ab 2<sup>o</sup> 1:10,000, mientras que el de la derecha con 2<sup>o</sup> 1:20,000. Se encierra y se señala con flecha la zona donde aparece una banda que podría corresponder a ZmKRP3 incompleta.

### Validación de anticuerpo $\alpha$ -KRP3

Para la ZmKRP3 se hicieron experimentos similares a los mencionados anteriormente, pero no dieron resultados positivos. Entonces se volvió a determinar el título ideal para estudiar a la ZmKRP3. Este ensayo se

muestra en la **Figura 18**, donde se realizaron 2 WB cuya diferencia estriba en el título del ab secundario. Se observa que la condición de ab 2° 1:10,000 resulta más adecuada para la visualización de la proteína de interés, siendo mejor el reconocimiento del ab 1° 1:1000; mientras que en el ensayo con 2° 1:20,000 la señal disminuye considerablemente. Pese a que no se observó la banda a la distancia deseada ( $\approx$  23 kDa), es posible que la banda observada abajo de 20 kDa, o incluso a 15 kDa, pudieran corresponder a la proteína deseada como productos de degradación. El suero preinmune generaba señales muy difusas y no concluyentes. Entonces se realizó un nuevo ensayo de competencia, de proteína recombinante contra ET, en el que se observó que una banda a 15 kDa parecía competir al utilizar 125  $\mu$ g de proteína contra 50  $\mu$ g de ET, pero al realizar un duplicado se observó que no era una condición reproducible.



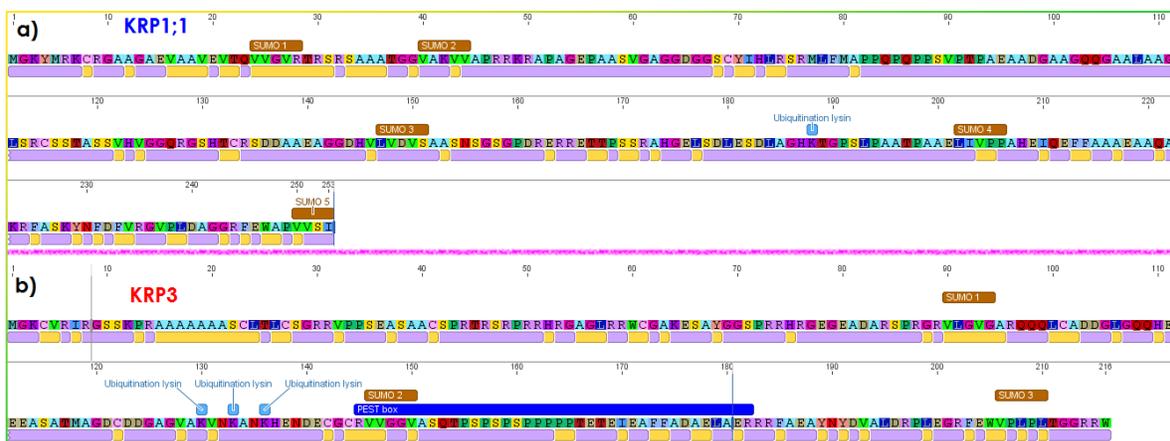
**Figura 19.** Ensayo de competencia de ab a-KRP3 con GST-KRP3 en WB. En todos los carriles se cargaron 50  $\mu$ g de ET de 18 horas, y se revelaron con ab primario 1:1000 y ab secundario 1:15,000. MW = Marcador de masa molecular. SC = Sin competir. Los carriles marcados 0.5-1.5  $\mu$ g se compitieron con esa cantidad de proteína recombinante de Flow-through inmovilizada. "El prp." indica que se compitió con 250 ng de proteína de eluciones. Se señala con flechas la altura donde se espera y parece observarse la banda competida. Los competidores negativos fueron 5  $\mu$ g de BSA y GST.

Tras la generación de la proteína recombinante GST-KRP3, se utilizó ésta para realizar un nuevo ensayo de competencia contra proteína de ET, el

cual se muestra en la **Figura 19**. Se puede observar que aparece de manera muy incipiente en todos los carriles una banda en la altura esperada que parece competir de acuerdo a lo esperado, aunque solamente compite contra proteína inmovilizada de Flow-through, no se observa competencia contra proteína de eluciones.

### Predicción *in silico* de modificaciones e interacciones proteicas

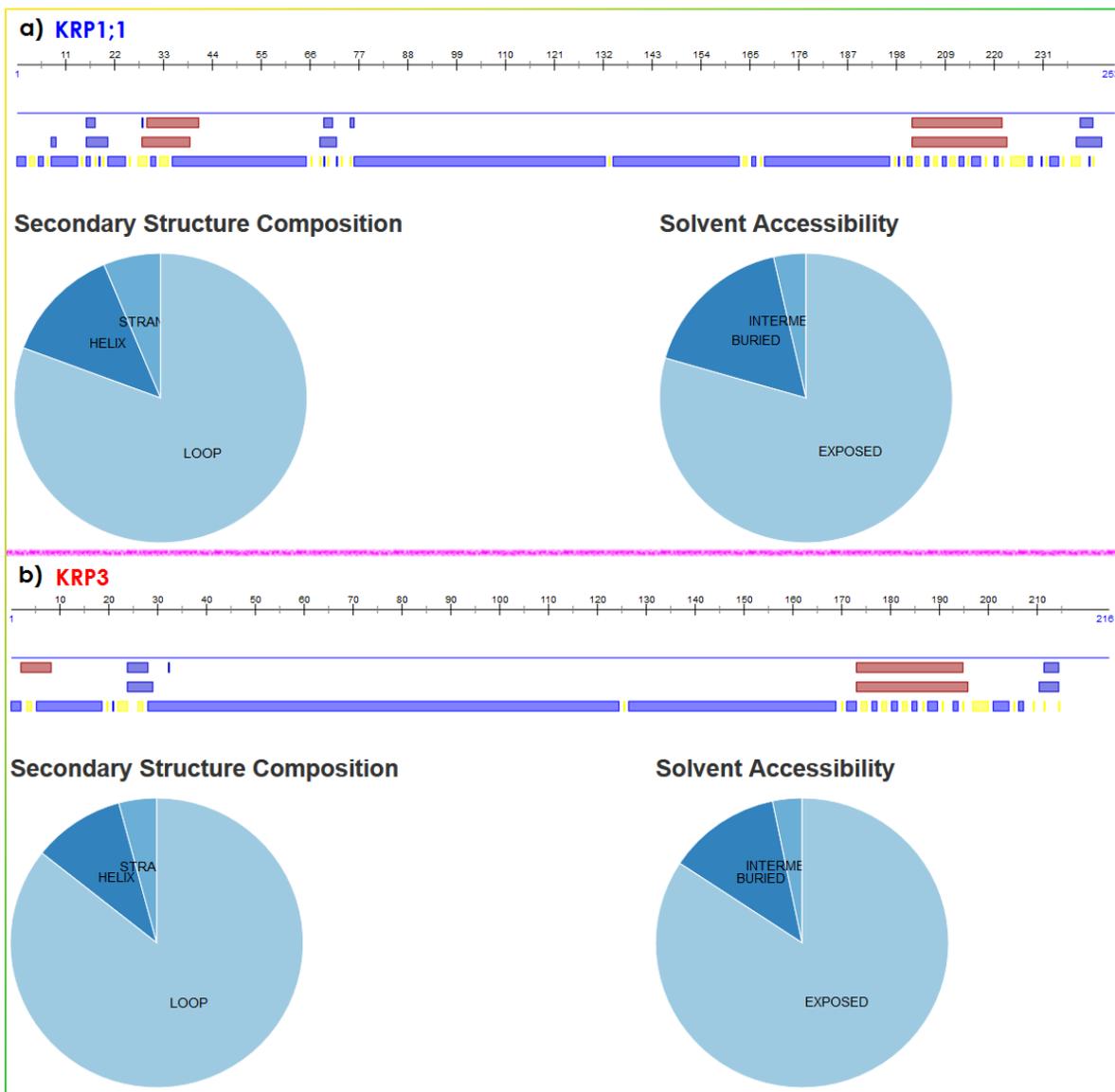
Con estos resultados, se planteó la pregunta de si las características estructurales y de secuencia de ambas ZmKRPs eran determinantes para especular sobre su dificultad de manejo experimental. Para lo cual, se introdujeron las secuencias de ambas proteínas en los sitios siguientes: *UbPred* para estimar en ambas ZmKRPs posibles sitios de ubiquitinación; *GPS-SUMO* para sitios potenciales de sumoilación; *ExPASy PeptideCutter* para posibles sitios donde las proteínas pudieran ser digeridas; *NetSurfP ver. 1.1* para determinar si todos los sitios anteriormente buscados se encuentran o no en la superficie de la proteína; *PredictProtein* y *Phyre2* para predecir características como estructura secundaria, regiones intrínsecamente desordenadas (RIDs), zonas de interacción con otras



**Figura 20.** Resultados de la predicción de sitios potenciales de ubiquitinación (azul claro), sumoilación (café), exposición de residuos de acuerdo a *NetSurfP* (lila = expuesto, amarillo = oculto) y cajas PEST (azul rey) vistos en Geneious® para ZmKRP1;1 (arriba) y ZmKRP3 (abajo).

proteínas, entre otros aspectos (Phyre2 también puede predecir modelos moleculares tridimensionales).

En el caso de ZmKRP1;1 se observa que podría haber un único sitio potencial de ubiquitinación y 5 sitios potenciales de sumoilación, de los cuales 2 estarían en regiones ocultas de la proteína (que de acuerdo a



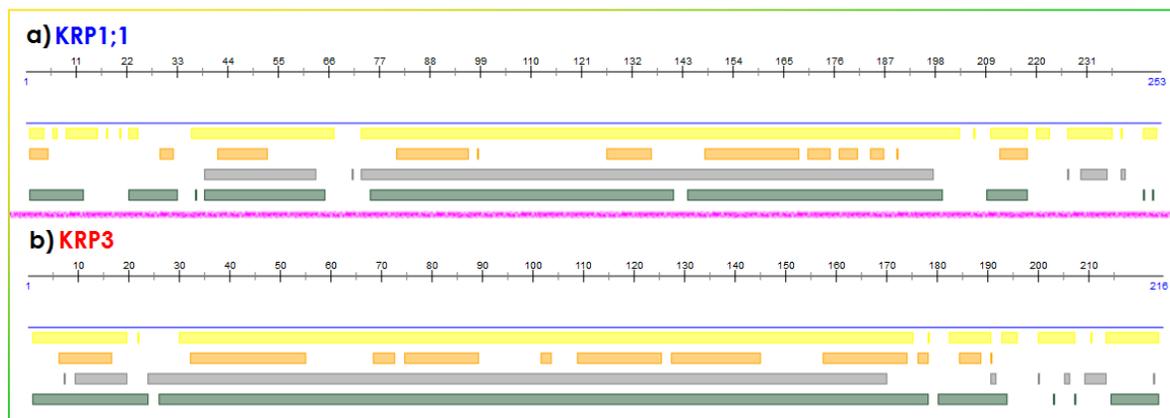
**Figura 21.** Resultados de la predicción de estructura secundaria y exposición de residuos de acuerdo a *PredictProtein* para ZmKRP1;1 (arriba) y ZmKRP3 (abajo). En las 2 primeras predicciones, las líneas rojas corresponden a  $\alpha$ -hélices, las azules a  $\beta$ -plegadas, y los espacios vacíos a loops; le corresponde la gráfica de la izquierda. En la tercer predicción, las zonas amarillas corresponden a residuos ocultos y las azules a residuos expuestos, los espacios vacíos a zonas que pueden estar expuestas u ocultas (intermedias), le corresponde la gráfica de la derecha.

*NetSurfP*, representan el 23.7% de la secuencia), la cual carecería de cajas PEST. Para el caso de ZmKRP3 está reportado que presenta una caja PEST de 37 aa, que podría funcionar como péptido señal para la degradación de la proteína (Godínez-Palma *et al.*, 2017). Se hallaron al lado de esta caja 3 posibles sitios de ubiquitinación en zonas expuestas; y 3 sitios potenciales de sumoilación dispersos en la secuencia, todos en zonas ocultas (que de acuerdo a *NetSurfP* representan el 31% de la secuencia). Estos resultados especulativos se muestran en la **Figura 20**.

El análisis de estructura secundaria de ZmKRP1;1 realizado en *PredictProtein* mostró que un 78.3% de la proteína se conformaría de **estructuras secundarias de giro (loop)**, **13.8% de  $\alpha$ -hélices** y **7.9% de  $\beta$ -plegadas**; mientras que el análisis de exposición a solventes de este programa muestra que las regiones ocultas de ZmKRP1;1 representarían sólo el 17.4% de su secuencia, bastante menor que el de NetSurfP (**Figura 21**). En contraste, los resultados de predicción de estructura secundaria ofrecidos por *Phyre2* indican que 64% de la proteína podría presentar loops, 30% de la estructura secundaria estaría conformada por  **$\alpha$ -hélices** y **6% serían  $\beta$ -plegadas**, tal como se muestra en el **Apéndice 19**. En lo referente a ZmKRP3, el análisis de estructura secundaria de *PredictProtein* mostró que un 84.3% de la proteína presentaría loops, en **contraste con 10.6% de  $\alpha$ -hélices** y **5.1% de  $\beta$ -plegadas**, mientras que su análisis de exposición a solventes mostró que las regiones ocultas de ZmKRP3 representarían el 13.9% de su secuencia (**Figura 21**). *Phyre2* mostró que **56% de la proteína presentaría loops**, **38% serían  $\alpha$ -hélices** y **6%  $\beta$ -plegadas** (**Apéndice 19**).

El análisis de predicción de regiones intrínsecamente desordenadas (RIDs) de ZmKRP1;1 realizado en *PredictProtein* mostró que 3 de los 4 algoritmos de predicción de RIDs abarcarían la mayor parte de la proteína, excluyendo en 2 de esos algoritmos una parte de la región N-terminal, y en los 3, gran parte de la región C-terminal. El cuarto algoritmo predijo

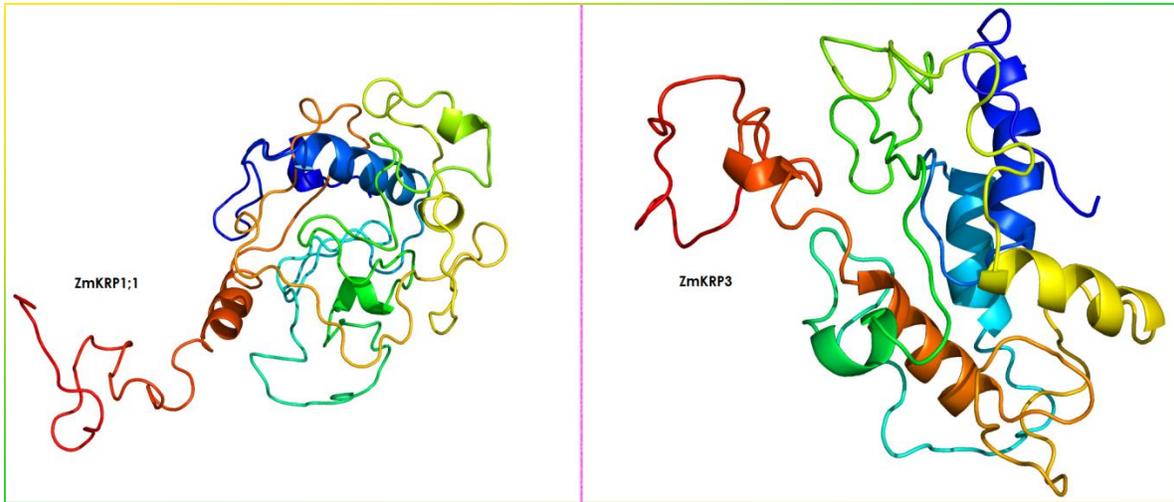
pocas RIDs dispersas a lo largo de la secuencia (**Figura 22**). El análisis realizado por *Phyre2* indicaba que 76% de la proteína presentaría RIDs, destacando la exclusión de algunas zonas como la región de los residuos 69-75, y gran parte de la región C-terminal, en los residuos 207-249 (**Apéndice 19**).



**Figura 22.** Resultados de la predicción de regiones intrínsecamente desordenadas (RIDs) de acuerdo a *PredictProtein* para ZmKRP1;1 (arriba) y ZmKRP3 (abajo). Cada línea representa a un algoritmo de predicción, donde las zonas de color corresponden a posibles RIDs, mientras los espacios vacíos corresponden a regiones que serían ordenadas.

El análisis realizado en ZmKRP3 mostró que los 4 algoritmos de predicción de RIDs indicaban que éstas comprenderían la mayor parte de la proteína y además en mayor proporción que ZmKRP1;1: sólo la región C-terminal tendría una conformación ordenada (**Figura 22**). Sin embargo, el análisis realizado por *Phyre2* mostraba que el porcentaje de RIDs (72%) sería menor que el de KRP1;1, aunque el patrón presentado era consistente con el de *PredictProtein* en cuanto a que el C-terminal no presentaría desorden: sólo los residuos 167-209 tendrían conformación ordenada (**Apéndice 19**).

Las secuencias de ambas ZmKRPs se introdujeron al predictor de estructuras tridimensionales (3D) de *Phyre2*, que proporcionó los modelos que se muestran en la **Figura 23**. Se predijo que la ZmKRP1;1 presentaría un alto porcentaje de estructuras en forma de loop, con una



**Figura 23.** Predicción de las estructuras tridimensionales de las proteínas ZmKRP1;1 (izquierda) y ZmKRP3 (derecha), de acuerdo a *Phyre2*. El extremo N-terminal se indica en color azul, y la escala cromática va cambiando hasta llegar al extremo C-terminal, que es rojo.

$\alpha$ -hélice formada por 15 aa y 5  $\alpha$ -hélices de menos de 7 aa; además de 4 estructuras  $\beta$ -plegada de 2 residuos cada una. Para el caso de ZmKRP3 se predijeron 3  $\alpha$ -hélices de 11-12 residuos, y 4 de 3-4 residuos. Todo el resto de la proteína se conformaría de loops, puesto que no se predijeron estructuras  $\beta$ -plegadas. Es importante mencionar que para predecir estos modelos el programa utiliza la confiabilidad de los porcentajes de estructura secundaria ya mencionados para ambas proteínas (y que corresponden, como ya se dijo, al **Apéndice 19**), y también toma en cuenta la influencia de las regiones intrínsecamente desordenadas (RIDs, también en **Apéndice 19**), que cuando se encuentran en gran proporción en la proteína hacen que disminuya la confiabilidad del modelo en 3D. En el **Apéndice 20** se muestra esta influencia, en ambos casos solamente el 21% de la proteína presentaba un alto grado de confianza en que la estructura mostrada fuera correcta. Resalta que ese porcentaje en ambos casos corresponde al extremo C-terminal.

Con respecto a la estimación de posibles sitios de digestión, se predijo que la mayoría de las proteasas elegibles en el programa digerirían a las ZmKRPs generando varios fragmentos pequeños, de 1 a 60 aa, lo cual no

parece correlacionar con la banda a 15 kDa presente en los WB de ambas proteínas. En el caso de ZmKRP1;1 sólo las proteasas LysC, LysN y glutamil endopeptidasa podrían generar fragmentos de casi 14 kDa, por lo cual se podría pensar que una posibilidad es que algún ortólogo de éstas en maíz pudiera estar actuando sobre ella. Para la ZmKRP3 la proteasa que podría generar la banda a 15 kDa sería un ortólogo en maíz de la caspasa 1, puesto que está reportado que la prolin-endopeptidasa, aunque genera un fragmento de 149 aa, sólo corta en secuencias de 30 residuos o menos (Keil, 1992). Aunque se hacen necesarios los experimentos correspondientes para determinar esto una vez halladas las condiciones de trabajo para la ZmKRP3.

## 9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Amplificación de *ZmKRP3*

En este trabajo un objetivo fue obtener la proteína KRP3 completa, para lo cual se buscó obtener por PCR únicamente las 651 pb de la secuencia codificante (CDS) completa, a diferencia de los trabajos con expresión de genes donde sólo se obtuvieron los últimos 98 pb del CDS y 264 pb de la **3'UTR, lo que en conjunto correspondería al marcador de secuencia expresada (EST)** (Rosas-Bringas, 2015). Las dificultades encontradas para llegar a este objetivo se centraron principalmente en el porcentaje de pares GC en ambas secuencias (75.1% en la del CDS, comparados con sólo 52.4% del EST), ya que un par GC al estar unido por 3 puentes de hidrógeno comparados con los 2 que unen un par AT, requiere de más energía para abrir las cadenas de DNA y así aparear los primers. Además, el hecho de que éstos tuvieran parámetros de calidad pobres (TM óptima alta, porcentaje de GC muy alto, hasta 6 nucleótidos continuos repetidos) indicaba que no era recomendable su uso para una reacción de PCR. Debido a esto, se probaron varias sustancias que pueden servir como aditivos para estabilizar la PCR (por ejemplo, disminuyendo la TM óptima), en diversas combinaciones y concentraciones para buscar cuál era la que daba mejores resultados de amplificación. Además fue necesario emplear 3 diferentes tipos de polimerasa: Jumpstart®, que corresponde a Taq-polimerasa de uso común; iProof® y Phusion®, que son polimerasas artificiales de alta fidelidad. Las condiciones elegidas fueron aquellas en las que los 2 controles positivos y la muestra de interés amplificaran bandas en los tamaños esperados. Aun con todo esto el producto se amplificó pobremente, por lo que se recurrió al procedimiento de anidación de PCR, donde a pesar de que la amplificación dio una banda visible en el tamaño esperado, se observó también una banda intensa en la parte inferior, más intensa que en el control negativo, atribuible a la presencia de productos truncos; esto sugiere que a estas polimerasas les

cuesta procesar el amplicón debido al alto porcentaje de GC, lo cual daría como resultado productos truncos de PCR de aproximadamente 100 pb o menos. Esto significaría que la cantidad de cDNA que se amplifica completamente es menor a la que se esperaría. Aun así, la amplificación es visible y reproducible.

### Inducción de proteína recombinante ZmKRP3

Cuando se realizó la inducción de la proteína recombinante His-KRP3, después de 3 horas se observó un aumento ligero de la densidad óptica, lo cual podría deberse a la dificultad que podrían tener las bacterias para sobreexpresar a una proteína intrínsecamente desordenada (PID) a partir de un gen con 75% de GC en su secuencia, incluso a pesar de que las células BL21(DE3)RIPL están diseñadas para llevar a cabo la sobreexpresión de genes con altos porcentajes de AT o GC. Esto se vio reflejado al cargar los extractos bacterianos no inducido e inducido en los geles de SDS-PAGE, dado que His-KRP3 no parecía mostrar ningún aumento en la intensidad de la banda en el tamaño esperado, y como esa banda era visible incluso en los extractos no inducidos, inicialmente se especuló sobre que esta proteína pudiera presentar "leaking" o goteo, es decir, sobreexpresión de proteína recombinante independiente de la adición de IPTG a los cultivos. Esta hipótesis se descartó al realizar un control consistente en cargar en un gel de SDS-PAGE bacterias sin transformar y realizar el WB **con ab α-KRP3**, donde una banda en el tamaño esperado (25 kDa) era visible, la cual no podría ser la proteína de interés al no haber transformado siquiera a las bacterias.

La aparición de bandas por debajo del tamaño esperado en las eluciones obtenidas sugerían que era posible que la proteína se degradara durante el proceso de purificación, lo cual es algo que puede suceder comúnmente en el caso de proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs) manejadas en condiciones *in vitro*, en las que el microambiente no

es similar al que la PID tendría en condiciones *in vivo* (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011). También se especuló que pudiera haber existido algún problema con las secuencias de reconocimiento ribosomal (Shine-Dalgarno) en los plásmidos pET28b+ y pGEX-4T-2, pues el inserto quizás no se habría insertado correctamente en el plásmido. El **Apéndice 7** muestra que no fue así: para ambos casos se observa que los sitios de clonación múltiple se encuentran justo después de las secuencias Shine-Dalgarno, por lo que el problema no sería este. Cabe mencionar que el plásmido pGEM-T easy no presenta secuencias Shine-Dalgarno, puesto que al ser un vector exclusivamente de mantenimiento no las requiere.

Por todo lo anterior, se utilizó una nueva estrategia consistente en obtener la GST-KRP3 completa (con una masa de 50 kDa) y parcial (los **primeros 140 aa de la secuencia de KRP3 [ $\approx$ 14 kDa] unidos al TAG** proteico glutatión S-Transferasa [GST, 25 kDa], con una masa total de  $\approx$ 39 kDa). El **cambio al TAG** de GST tenía 2 objetivos: 1) Resolver el problema de la banda a 25 kDa que aparecía en bacterias sin transformar, cambiando el tamaño de las bandas esperadas a 39 y 50 kDa; y 2) Verificar si con este nuevo TAG de 25 kDa aumentaba la estabilidad de la proteína. La generación de una secuencia parcial tenía como objetivo aumentar aún más la estabilidad de GST-KRP3, dado que el TAG abarcaría un porcentaje mayor de la proteína recombinante obtenida. Se observó que no fue así, mostrando los resultados que podría haber degradación incluso después de la inducción en ambos casos, lo cual obedecería a características puntuales del extremo N-terminal de la secuencia de ZmKRP3. La presencia de proteínas de bajo peso en las zonas inducidas también sugiere que podría haber traducción incompleta de la proteína, una teoría que parte del alto porcentaje de GC que tiene el gen de interés, factor que además de ser probable responsable de la escasa inducción, también pudo tener influencia en la generación de proteínas truncas. Aun **usando un ab  $\alpha$ -GST-CDKB** para visualizar el patrón de proteína

recombinante se observaba algo similar, por lo cual se infirió que no había **problema para que el ab α-KRP3** detectara proteínas recombinantes, sino que la proteína en sí presenta inestabilidad aún al ser purificada en condiciones que inactivarían a otras proteasas (urea 8 M) aunque una pequeña fracción pareció mantenerse estable y se alcanzó a visualizar en los WB, por lo cual se trató fallidamente de usar como antígeno para competencia.

### Secuencias de ZmKRPs, su funcionalidad y sus señalizaciones

Algo importante a resaltar de las ZmKRPs seleccionadas son las características diferenciales de sus secuencias. Se observa en el **Apéndice 8** que en el caso de la ZmKRP1;1 no existen grandes diferencias entre ella y el resto de las ZmKRPs en general, teniendo especial similitud con las ZmKRPs filogenéticamente más cercanas a ella (ZmKRP1;2 y ZmKRP1;3). En estas 3 proteínas están conservados al menos 4 motivos ya reportados, entre los cuales se encuentran los motivos de unión a ciclinas D y CDKs, que son comunes a todas las KRPs. Las secuencias de las ZmKRPs 4;1 y 4;2 también se parecen entre sí (y se parecen también a la 4;3 en la región del C-terminal), mismo caso para la 5;1 y 5;2 que también son semejantes (Torres-Acosta *et al.*, 2011; Rosas-Bringas, 2015). Sin embargo, la ZmKRP3 es diferente a todas las demás. Como se ve en el **Apéndice 8**, es la única ZmKRP que presenta diferencias sustanciales con el consenso en al menos 5 regiones específicas; incluso una de esas regiones fue elegida como secuencia específica para la generación de un anticuerpo. De los 7 motivos conservados que están reportados en las KRPs (incluso se podría hablar de un 8º motivo no reportado con secuencia consenso LALXRRQR, hallado en las ZmKRPs 4;1, 4;2, 5;1 y 5;2, que se encontraría en los aa 46-53 del consenso de acuerdo al **Apéndice 8**), hay 5 motivos que son comunes en todas las ZmKRPs excepto la ZmKRP3, en la que sólo se hallan 2 de

esos 5 motivos (los correspondientes al C-terminal), e inclusive en esa región esos 2 motivos conservados presentan diferencias puntuales con las otras ZmKRPs. Las secuencias de los 2 motivos restantes (y también la del motivo LALXRRQR) que se hallan en las ZmKRPs 4;1, 4;2, 5;1 y 5;2, tampoco se encuentran en la ZmKRP3. Adicional a las diferencias en los motivos, cabe mencionar que ZmKRP1;1 presenta menor identidad de secuencia con ZmKRP3 (22.9%) que con ZmKRP4;2 (27.8%), por lo que se esperaría que ZmKRP3 tuviera un comportamiento más alejado respecto de ZmKRP1;1 que el que tendría la ZmKRP4;2, aún cuando la filogenia sugiere que ZmKRP1;1 es más cercana a ZmKRP3 que a ZmKRP4;2.

### Caracterización y validación de anticuerpos $\alpha$ -ZmKRP1;1 y $\alpha$ -ZmKRP3

Se realizaron los experimentos preliminares para identificar a los péptidos sintéticos de ZmKRP1;1 y ZmKRP3, que estaban acoplados a la hemocianina KLH, de 359 kDa. La similitud de esta proteína acoplada con las codificadas por el genoma de maíz es muy escasa, y su inmunogenicidad es alta, lo cual se utilizó como estrategia para mejorar la producción de anticuerpos en los conejos. Pero esto pudo haber provocado que al realizar ensayos de competencia con péptidos sintéticos, debido a la inmunogenicidad alta de la KLH, la mayoría de los anticuerpos policlonales generados (y los que hubiera en suero antes de inmunizar) se pegaran a la KLH y en consecuencia, esto podría haber disminuido la señal de todas las bandas de la competencia. Esto sugiere que el anticuerpo no presenta la avidéz suficiente por la proteína de extracto total (ET) pero sí presenta gran avidéz por la KLH, lo cual explicaría el comportamiento visto en los ensayos de inmunoreconocimiento de la **Figura 16**. Lo anterior podría explicar el hecho de que la cantidad de anticuerpo 1° y 2° utilizados para la inmunodetección de la proteína en ET de maíz (e incluso de la proteína recombinante) fueron bastante altos

en comparación con los de otras proteínas ya estudiadas en el laboratorio.

Para el **ab  $\alpha$ -KRP3**, cuya avidéz y especificidad por la ZmKRP3 de ET era visiblemente menor que la del **ab  $\alpha$ -KRP1;1 respecto a la proteína  $\alpha$ -KRP1;1** en ET, es importante resaltar otro punto: Las secuencias mostradas en el **Apéndice 12** corresponden a las secuencias de ZmKRP3 teórica (que proviene de bases de datos, con información obtenida a partir de maíz B73) y ZmKRP3 experimental (obtenida en el laboratorio a partir de maíz chalqueño), y en ellas se observa que uno de los aminoácidos no conservados entre ambas se encuentra en la secuencia utilizada para generar los anticuerpos (LGQQHEEEASATMA), puesto que en la secuencia experimental en lugar de la histidina (H) se encontraba una arginina (R); a pesar de ser ambos aminoácidos básicos, son de diferente tamaño y características químicas, esto pudo haber provocado que el anticuerpo no generara la respuesta adecuada porque ese cambio puntual habría vuelto poco reconocible a la proteína de maíz chalqueño para el anticuerpo generado contra una secuencia de maíz B73.

El hecho de que ambos sueros preinmunes detectaran varias bandas en los extractos crudos de maíz (y algunas en proteína recombinante) podría incluso tener relación con la alimentación de los conejos utilizados para generar los anticuerpos, dado que si hubieran sido alimentados con maíz previo al esquema de inmunización, se podrían haber generado anticuerpos contra nutrientes o sustancias presentes en el maíz, por lo que los sueros preinmunes de los conejos detectarían bandas de esos antígenos.

La proteína recombinante His-KRP1;1 presenta diferencias en su corrimiento respecto a lo esperado, como se observa en la **Figura 17**, donde el corrimiento se observa a  $\approx 36$  kDa y no a  $\approx 30$  kDa que es la masa teórica, esto podría deberse a varios aspectos como influencia de las regiones intrínsecamente desordenadas (RIDs) en el corrimiento (Rosas-Bringas, 2015). El caso de GST-KRP1;1 es más acorde a lo

reportado previamente, la masa de 50 kDa es la ya descrita. Como la diferencia entre masas moleculares en el corrimiento de los geles es logarítmica de acuerdo a los marcadores, esa diferencia de masa que sería perceptible entre 30 y 35 kDa quizá ya no se detecta a la altura de 50 kDa.

Se obtuvo un resultado con la competencia de una banda a 60 kDa, que puede indicar 2 cosas: una es que la proteína sufra las suficientes modificaciones postraduccionales para alcanzar esa masa, o que el ab reconozca inespecíficamente algo a esa altura con más avidez que para con su proteína blanco teórica. El hecho de que sólo en el caso de la proteína inmovilizada se observara competencia sugiere que seguramente este proceso la protege de algún tipo de degradación que pudiera presentarse en solución.

En el caso de la competencia de la **Figura 19**, hay que tomar en cuenta que la proteína ZmKRP3 de extractos totales de maíz también parecía ser inestable igual que la recombinante (ver sección Inducción de proteína recombinante ZmKRP3) y que esta inestabilidad sería mayor que la de ZmKRP1; 1; esto podría explicar que la visualización por WB de ZmKRP3 en extractos totales fuera muy incipiente y poco consistente.

Se comprobó en este trabajo que los anticuerpos funcionan adecuadamente para con las proteínas recombinantes, pero no son eficientes para reconocer a sus proteínas blanco en ET. El hecho de que se observe una banda a la altura esperada con los sueros preinmunes en algunos ensayos indica que no se puede tener la certeza de que esa banda corresponda a la proteína de interés al usar sueros inmunes.

#### Análisis *in silico* de predicciones y de modificaciones proteicas

Lo que se buscó al hacer el análisis de predicción de modificaciones postraduccionales, regiones intrínsecamente desordenadas (RIDs) y estructuras secundaria y terciaria en ambas ZmKRPs era ver si se podía

especular, con los datos que se obtuvieran de todos estos análisis, si existiría alguna razón por la cual las proteínas pudieran ser más susceptibles a degradarse (dado que en algunos ensayos de competencia aparecían bandas de tamaño menor al esperado [aprox. 15 kDa] que parecían competir) o sufrir modificaciones post-traduccionales (dada la **observación de una banda a  $\approx 60$  kDa en los ensayos de competencia de ambas ZmKRPs**, que también llegaba a competir; también por el hecho de que la His-KRP1;1 se hallaba en una altura ligeramente mayor a la esperada). Además, dadas las características generales de las secuencias de ambas ZmKRPs y el porcentaje relativamente alto de glicinas y otros residuos hidrofílicos que presentan (además de un alto porcentaje de alaninas), se especuló que fueran proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs) (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011), lo cual sí fue predicho por *PredictProtein* y *Phyre2*; este último arrojó porcentajes de desorden mayores a 70% para ambas proteínas. Este desorden podría explicar la inestabilidad de ambas proteínas en ET (y la presencia de la banda a 15 kDa en los WB de ambas, que correspondería a una degradación) y el que éstas se visualicen tan escasamente en los WB, siendo probable que sean más estables al formar complejos con las proteínas con las que estarían ejerciendo su actividad dado que en esas circunstancias cambiaría su conformación. Además, ya se ha reportado que los análogos funcionales de las KRPs en mamíferos (las proteínas Cip/Kip) están también catalogados como PIDs (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011).

Aunque *PredictProtein* y *Phyre2* presentaban diferencias en cuanto al porcentaje de RIDs que hay en ambas proteínas, los 2 programas predicen en las proteínas una región de 42 residuos ordenados, y que en el caso de *Phyre2* existe alto grado de confiabilidad en la estructura tridimensional de esa zona, como se ve en el **Apéndice 20**. Esa región corresponde al extremo C-terminal, que es la zona a través de la cual

interaccionarían ambas ZmKRPs con otras proteínas (Wang *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000; Jasinski, Perennes, *et al.*, 2002). Eso explicaría que la región C-terminal tuviera que mantener cierta estructura y estabilidad para que la interacción fuera lo suficientemente estable (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011).

*PredictProtein* y *Phyre2* también difirieron en la proporción de estructuras secundarias que habría en cada proteína, siendo *PredictProtein* el que predice mayores porcentajes de estructuras en loop (habiendo gran diferencia entre el 84.3% predicho por éste, al 56% que predice *Phyre2*). Aunque en ambos programas lo que se mantiene constante son las proporciones: Las estructuras en forma de loop (que representan más de la mitad de ambas proteínas) estarían en un **porcentaje mayor al de las  $\alpha$ -hélices**, y éstas a su vez serían más abundantes **que las  $\beta$ -plegadas**, que casi no se presentarían en ambas secuencias.

Las estructuras tridimensionales predichas por *Phyre2* presentan algunas diferencias con lo reportado por el mismo programa en cuanto a la estructura secundaria, dado que la cantidad, el tamaño y la ubicación **de las  $\alpha$ -hélices** difiere entre la predicción de las estructuras secundarias y la estructura tridimensional. En el caso de ZmKRP3, la predicción de la **estructura en 3D incluso llega a carecer por completo de  $\beta$ -plegadas**, en contraste con las predicciones de estructura secundaria realizadas por **ambos programas donde aunque el porcentaje de  $\beta$ -plegadas es bajo** (de 6% en ambos casos), éstas sí estarían presentes. Estas diferencias que se presentan en las estructuras 3D de ambas proteínas respecto de sus estructuras secundarias, podrían tener relación con el hecho de que un alto porcentaje de ambas estructuras 3D (79% en ambos casos) presenta un grado bajo de confiabilidad, menor a 70%; *Phyre2* informa que esto es debido a la gran presencia de RIDs en ambas proteínas (mayor a 70% en ambos casos). Este porcentaje bajo de confiabilidad se relaciona con

el hecho de que *Phyre2* realiza, entre otras cosas, alineamiento de secciones de la proteína de interés con regiones de proteínas cuya estructura ha sido experimentalmente obtenida mediante cristalografía. En estos casos es difícil predecir la estructura de una proteína desordenada (PID) debido a que no se puede cristalizar con las estrategias actuales. El hecho de que ambas ZmKRPs sean PIDs explicaría la dificultad de su manejo experimental, pues posiblemente las condiciones de trabajo del laboratorio no favorecen su estabilidad al diferir del microambiente en el que se encontrarían en una célula viva (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011).

En lo referente a modificaciones postraduccionales, para ZmKRP1;1 se encontró un posible sitio de ubiquitinación y 5 de sumoilación, que en conjunto no parecieran ser suficientes para justificar que una banda apareciera y compitiera a 60 kDa, a menos que en ese solo sitio la proteína se poliubiquitinara 2 a 3 veces y se mantuviera visible durante todo el proceso de WB, algo que parece improbable. En el caso de ZmKRP3 se podría pensar que el mayor grado de degradación que ésta presenta sea debido a la caja PEST y a la mayor cantidad de sitios de ubiquitinación, dado que los sitios de sumoilación no parecieran ser relevantes al estar ocultos. Esto en conjunto podría explicar su mayor inestabilidad, siendo que inclusive la proteína recombinante es inestable y se degrada antes de poderla visualizar en gel una vez purificada; aunque en el caso específico de la caja PEST es necesario mencionar lo siguiente: La secuencia de ZmKRP3 parcial, que abarca los primeros 420 pb del gen, corresponde por lo tanto a los primeros 140 aa de la proteína. La caja PEST está reportada en los residuos 145-182 (ver **Figura 20**), por tanto la secuencia de ZmKRP3 parcial no la presenta. Aun así la banda asociada a posible degradación o incompleta traducción de ZmKRP3 parcial estaba presente en las **Figura 14** y **15**, por lo que es poco probable que la caja PEST esté relacionada con este fenómeno.

El programa *PredictProtein* también incluye un algoritmo para predecir zonas expuestas y ocultas en las proteínas, el cual presentó algunas diferencias con los resultados de *NetSurfP* en ambas proteínas en cuanto a que éste último predecía una cantidad mayor de residuos ocultos (con porcentajes de alrededor de 23-30%, comparados con los 13-17% que arroja *PredictProtein*) y que permitió dilucidar esta condición de exposición residuo por residuo, por tal motivo pareciera ser más preciso el resultado del programa *NetSurfP* para especular sobre el comportamiento de las modificaciones postraduccionales puntuales. No obstante, es importante recalcar que estos análisis son especulativos y explican sólo parcialmente la problemática hallada en el desarrollo de los experimentos.

## 10. CONCLUSIONES

- ✿ Las proteínas ZmKRP1;1 y ZmKRP3 presentan características similares en cuanto a porcentajes de estructura secundaria, terciaria y de RIDs, siendo más acentuadas las posibles señales de modificación y degradación en ZmKRP3.
- ✿ La dificultad de manejo experimental *in vitro* de ambas ZmKRPs estudiadas parece obedecer al hecho de que son proteínas intrínsecamente desordenadas e inestables.

## 11. PERSPECTIVAS

Es necesario seguir realizando análisis para completar la caracterización de ZmKRP1;1 y ZmKRP3, algunas de las acciones a llevar a cabo consistirían en lo siguiente:

- ✿ Encontrar las condiciones experimentales para preservar la integridad de las proteínas recombinantes y en extractos crudos a partir de embriones de maíz.
- ✿ Analizar la abundancia de ambas proteínas a lo largo de la germinación y en diferentes regiones de la semilla y de la planta en general, así como en diferentes condiciones nutrimentales, o en varias concentraciones de diferentes fitohormonas.
- ✿ Evaluar la actividad de cinasa de complejos Cyc/CDK en presencia de ZmKRP1;1 y ZmKRP3.
- ✿ Estudiar el efecto de mutaciones en la secuencia de ZmKRP1;1 y ZmKRP3 en las asociaciones con otras proteínas del ciclo celular y la actividad inhibitoria.
- ✿ Realizar un análisis inmunohistoquímico para determinar la ubicación subcelular de ambas proteínas.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. y Sánchez de Jiménez, E.** (1989) DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *J. Plant Physiol.*, **135**, 416–421. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161789800975>.
- Berjak, P. y Pammenter, N.W.** (2002) Orthodox and recalcitrant seeds. En *Tropical tree seed manual*. USDA Forest Service, pp. 137–148. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Orthodox+and+Recalcitrant+Seeds#2>.
- Bewley, J.D.** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, **9**, 1055–1066.
- Bewley, J.D. y Black, M.** (1994) *Seeds, Physiology of development and germination* 2ª edición., Springer.
- Bisbis, B., Delmas, F., Joubès, J., Sicard, A., Hernould, M., Inzé, D., Mouras, A. y Chevalier, C.** (2006) Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors regulate the CDK-cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit. *J. Biol. Chem.*, **281**, 7374–7383.
- Bravo-Alberto, C.E. y Buendía-Monreal, M.** (2008) *Estudio De La Región Promotora De Cuatro Ciclinas D De Maíz*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Buendía-Monreal, M.** (2011) *Caracterización Filogenética Y De Expresión Génica De Las Ciclinas Tipo D De Maíz*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W. y Dutta, A.** (1995) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*, **374**, 386–388.
- Cheng, Y., Cao, L., Wang, S., et al.** (2013) Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes upregulates the E2F pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in Arabidopsis. *Plant J.*, **75**, 642–655.
- Ching, T.M.** (1972) *Metabolism of Germinating Seeds*, ACADEMIC PRESS, INC. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124243033500087>.
- Coelho, C.M., Dante, R.A., Sabelli, P.A., Sun, Y., Dilkes, B.P., Gordon-Kamm, W.J. y Larkins, B.A.** (2005) Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol.*, **138**, 2323–2336. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055680>.
- Cuevas-Velázquez, C.L. y Covarrubias-Robles, A.A.** (2011) Las proteínas

- desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, **14**, 97–105.
- Deltour, R. y Jacquard, A.** (1974) Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L. *Ann. Bot.*, **38**, 529–534.
- Dewitte, W. y Murray, J.A.H.** (2003) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 235–264. Available at: [www.annualreviews.org/](http://www.annualreviews.org/).
- Doebley, J.** (2004) The genetics of maize evolution. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 37–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15568971>.
- Doebley, J., Stec, A., Wendel, J. y Edwards, M.** (1990) Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 9888–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55279&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Durán-Hernández, D., Gutiérrez-Hernández, G.F., Arellano-Vázquez, J.L., García-Ramírez, E. y Virgen-Vargas, J.** (2011) Caracterización molecular y germinación de semillas de maíces criollos azules con envejecimiento acelerado. *Agron. Mesoam.*, **22**, 11–20.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. y Hunt, T.** (1983) Cyclin: a Protein Specified By Maternal Messenger-Rna in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed At Each Cleavage Division. *Cell*, **33**, 389–396.
- Farr, K.A. y Cohen-Fix, O.** (1999) The metaphase to anaphase transition: A case of productive destruction. *Eur. J. Biochem.*, **263**, 14–19.
- Filiz, E., Vatanserver, R. y Ozyigit, I.I.** (2017) Insights into a key sulfite scavenger enzyme sulfite oxidase (SOX) gene in plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **23**, 385–395. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12298-017-0433-z>.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, a, Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R. y Bairoch, A.** (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.*, 571–607. Available at: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>.
- Godínez-Palma, S.K., Rosas-Bringas, F.R., Rosas-Bringas, O.G., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J. y Vázquez-Ramos, J.M.** (2017) Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D–cyclin-dependent kinase complexes. *J. Exp. Bot.*, 1–13. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erx054>.
- Guo, J., Song, J., Wang, F. y Zhang, X.S.** (2007) Genome-wide identification and

- expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Mol. Biol.*, **64**, 349–360.
- Hannon, G.J. y Beach, D.** (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, **371**, 257–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8078588>.
- Herrera, I., Sánchez, M.D.L.P., Molina, J., Plasencia, J. y Vázquez-Ramos, J.M.** (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.*, **110**, 127–134.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.-Y., Ashmun, R.A. y Sherr, C.J.** (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2672–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hoseney, R.C.** (1991) *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*, Acribia.
- Hu, Z., Cools, T. y Veylder, L. De** (2016) Mechanisms Used by Plants to Cope with DNA Damage. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **67**, 439–462. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-043015-111902>.
- Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C. y Glab, N.** (2002) Comparative Molecular and Functional Analyses of the Tobacco Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor NtKIS1a and Its Spliced Variant NtKIS1b. *Plant Physiol.*, **130**, 1871–1882.
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, C., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C. y Glab, N.** (2002) The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *J. Cell Sci.*, **115**, 973–982.
- Jesús-Juárez, N. De** (2008) *Estudios Sobre La Proteína Ick De Maíz*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jiménez-López, J.C., Zafra, A., Palanco, L., Florido, J.F. y Alché, J.D.D.** (2016) Identification and assessment of the potential allergenicity of 7S vicilins in olive (*Olea europaea* L.) seeds. *Biomed Res. Int.*, **2016**, 1–11.
- Keil, B.** (1992) *Specificity of proteolysis*, Springer-Verlag-Berlin-Heidelberg-NewYork.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. y Sternberg, M.J.E.** (2015) The Pyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nat. Protoc.*, **10**, 845–858. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C. y Palladino, M.** (1999) *Essentials of genetics* 7ª edición., Pearson/Prentice.

- Koonin, E. V., Wolf, Y.I. y Karev, G.P.** (2002) The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature*, **420**, 218–223.
- Lara-Núñez, A., García-Ayala, B.B., Garza-Aguilar, S.M., Flores-Sánchez, J., Sánchez-Camargo, V.A., Bravo-Alberto, C.E., Vázquez-Santana, S. y Vázquez-Ramos, J.M.** (2017) Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination. *Plant Physiol. Biochem.*, **113**, 20–31. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S098194281730030X>.
- Li, Q., Shi, X., Ye, S., Wang, S., Chan, R., Harkness, T. y Wang, H.** (2016) A short motif in Arabidopsis CDK inhibitor ICK1 decreases the protein level, probably through a ubiquitin-independent mechanism. *Plant J.*, 1–12.
- López-Hernández, M.N.** (2012) *Estudio de los niveles proteicos de ciclina CYCD2;1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (Zea mays)*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lovisa, S., Citro, S., Sonogo, M., et al.** (2016) SUMOylation regulates p27Kip1 stability and localization in response to TGF $\beta$ . *J. Mol. Cell Biol.*, **8**, 17–30.
- Lui, H., Wang, H., DeLong, C., Fowke, L.C., Crosby, W.L. y Fobert, P.R.** (2000) The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J.*, **21**, 379–385.
- Mancilla-Flores, A.F.** (2008) *Clonación de la Zeama;KRP1 de maíz y estudios de expresión durante la germinación*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sánchez G., J., Buckler, E. y Doebley, J.** (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 6080–6084.
- Mayer, A.M. y Shain, Y.** (1974) Control of Seed Germination. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 167–193.
- Meskiene, I., Bögre, L., Dahl, M., Pirck, M., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Heberle-Bors, E., Ammerer, G. y Hirt, H.** (1995) cycMs3, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Plant Cell*, **7**, 759–771.
- Mews, M., Sek, F.J., Moore, R., Volkmann, D., Gunning, B.E.S. y John, P.C.L.** (1997) Mitotic cyclin distribution during maize cell division: Implications for the sequence diversity and function of cyclins in plants. *Protoplasma*, **200**, 128–145.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A. y Sekine, M.** (2006) Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-

- type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett.*, **580**, 336–340.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W. y Bewley, J.D.** (2010) Germination-Still a mystery. *Plant Sci.*, **179**, 574–581.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C. y Murray, J.A.H.** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *R. Soc.*, **357**, 749–760. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12079670](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12079670).
- Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., et al.** (2008) Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 is involved in both seed longevity and germination vigor in Arabidopsis. *Plant Cell*, **20**, 3022–3037. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.108.058479> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19011119> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2613667>.
- Paliwal, R.L., Granados, G. y Lafitte, H.R.** (2001) *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*, Colección FAO: Producción y protección Vegetal.
- Petersen, B., Petersen, T., Andersen, P., Nielsen, M. y Lundegaard, C.** (2009) A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct. Biol.*, **9**, 1–10. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1472-6807/9/51>.
- Pettkó-Szandtner, A., Cserhádi, M., Barrôco, R.M., Hariharan, S., Dudits, D. y Beemster, G.T.S.** (2015) Core cell cycle regulatory genes in rice and their expression profiles across the growth zone of the leaf. *J. Plant Res.*, **128**, 953–974.
- Pettkó-Szandtner, A., Mészáros, T., Horváth, G. V., Bakó, L., Csordás-Tóth, É., Blastyák, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P. y Dudits, D.** (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J.*, **46**, 111–123.
- Piperno, D.R., Ranere, A.J., Holst, I., Iriarte, J. y Dickau, R.** (2009) Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 5019–5024.
- Quiroz-Figueroa, F. y Vázquez-Ramos, J.M.** (2006) Expression of maize D-type cyclins: Comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol. Plant.*, **128**, 556–568.
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G. y Iakoucheva, L.M.** (2010) Identification, analysis, and prediction

- of protein ubiquitination sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **78**, 365–380.
- Raven, P.H., Evert, R.F. y Eichhorn, S.E.** (1992) *Biología de plantas* 4ª edición., Reverté.
- Ren, J., Gao, X., Jin, C., Zhu, M., Wang, X., Shaw, A., Wen, L., Yao, X. y Xue, Y.** (2009) Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics*, **9**, 3409–3412.
- Renaudin, J.-P., Doonan, J.H., Freeman, D., et al.** (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, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A. y Vázquez-Ramos, J.M.** (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci. Res.*, **1**, 113–117. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S096025850000074X](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S096025850000074X).
- Roberts, E.H.** (1973) Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.*, **1**, 499–514.
- Rosas-Bringas, F.R.** (2015) *Caracterización génica de la familia ICK/KRP de maíz*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D. y Beemster, G.T.S.** (2007) Cold Nights Impair Leaf Growth and Cell Cycle Progression in Maize through Transcriptional Changes of Cell Cycle Genes. *Plant Physiol.*, **143**, 1429–1438. Available at: <c:%5CProgram Files%5CEndNote%5CPDF 2007 a 2008%5CRymen 2007 Cold nights impair leaf growth.pdf>.
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., et al.** (2009) The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science (80-. )*, **329**, 1112–1115.
- Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schobinger, U. y Hulskamp, M.** (2003) Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1 in single-celled Arabidopsis trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell*, **15**, 303–315. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12566574](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12566574).
- Serrano, M., Hannon, G.J. y Beach, D.** (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**, 704–707. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/366704a0>.
- Shen, W.-H.** (2002) The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci.*, **7**, 505–511.
- Sherr, C.J. y Roberts, J.M.** (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of

G1-phase progression. *Genes Dev.*, **13**, 1501–1512.

**Shi, S., Gao, Q., Zeng, J., Liu, X., Pu, Q., Liu, G., Zhang, H., Yang, X. y Zhu, L.**

(2016) N-terminal domains of ARC1 are essential for interaction with the N-terminal region of Exo70A1 in transducing self-incompatibility of Brassica oleracea. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **48**, 777–787.

**Sonah, H., Deshmukh, R.K., Labbé, C. y Bélanger, R.R.** (2017) Analysis of aquaporins in Brassicaceae species reveals high-level of conservation and dynamic role against biotic and abiotic stress in canola. *Sci. Rep.*, **7**, 2771. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-02877-9>.

**Spiegel, S. y Marcus, A.** (1975) Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature*, **256**, 228–230.

**Stals, H. y Inzé, D.** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.*, **6**, 359–364.

**Torres-Acosta, J.A., Fowke, L.C. y Wang, H.** (2011) Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Ann. Bot.*, **107**, 1141–1157.

**Vázquez-Ramos, J.M. y Sánchez, M.D.L.P.** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.*, **13**, 113–130.

**Vázquez, E., Montiel, F. y Vázquez-Ramos, J.M.** (1991) DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. *Seed Sci. Res.*, **1**, 269–273. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0960258500000994](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0960258500000994).

**Vela, E.** (2011) El maíz. *Arqueol. Mex. Edición Espec. número 38*.

**Veylder, L. De, Beeckman, T., Beemster, G.T.S., et al.** (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 1653–1667.

**Veylder, L. De, Joubès, J. y Inzé, D.** (2003) Plant cell cycle transitions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 536–543.

**Walbot, V. y Evans, M.M.S.** (2003) Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 369–379. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12728279](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12728279).

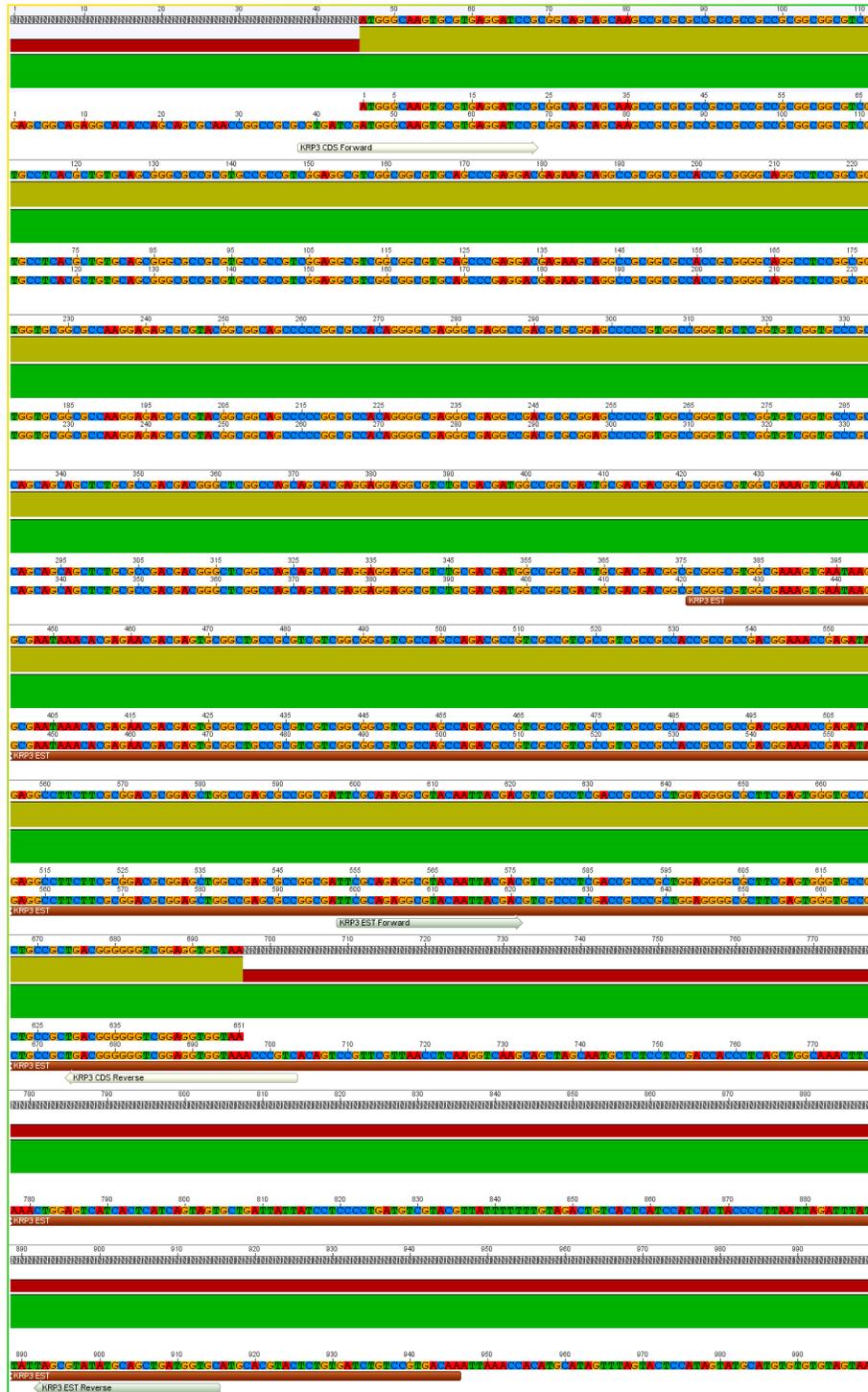
**Wang, H., Fowke, L.C. y Crosby, W.L.** (1997) A Plant Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Gene. *Nature*, **386**, 451–452.

**Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. y Fowke, L.C.** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana

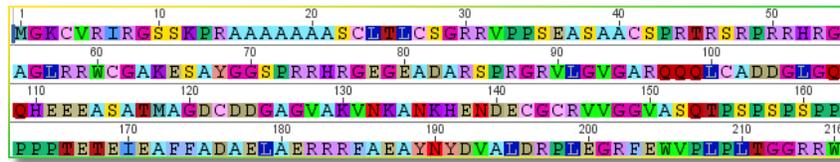
- interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.*, **15**, 501–510.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S. y Fowke, L.C.** (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.*, **24**, 613–623.
- Weimer, A.K., Biedermann, S., Harashima, H., et al.** (2016) The plant-specific CDKB 1 -CYCB 1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis. *EMBO J.*, 1–19.
- Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., et al.** (2014) PredictProtein - An open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 337–343.
- Yang, R., Tang, Q., Wang, H., Zhang, X., Pan, G., Wang, H. y Tu, J.** (2011) Analyses of two rice (*Oryza sativa*) cyclin-dependent kinase inhibitors and effects of transgenic expression of OsICK6 on plant growth and development. *Ann. Bot.*, **107**, 1087–1101.
- Yu, P., Eggert, K., Wirén, N. Von, Li, C. y Hochholdinger, F.** (2015) Cell Type-Specific Gene Expression Analyses by RNA Sequencing Reveal Local High Nitrate-Triggered Lateral Root Initiation in Shoot-Borne Roots of Maize by Modulating Auxin-Related Cell Cycle Regulation. *Plant Physiol.*, **169**, 690–704. Available at: <http://www.plantphysiol.org/content/169/1/690.long>.
- Zamora-Zaragoza, J.** (2014) *Caracterización de la ciclina CycD6;1 de maíz y sus interacciones con otros reguladores del ciclo celular*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zhan, J., Thakare, D., Ma, C., et al.** (2015) RNA sequencing of laser-capture microdissected compartments of the maize kernel identifies regulatory modules associated with endosperm cell differentiation. *Plant Cell*, **27**, 513–531. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783031>.
- Zhou, Y., Fowke, L.C. y Wang, H.** (2002) Plant CDK inhibitors: Studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep.*, **20**, 967–975.
- Zúñiga-Aguilar, J.J.** (1998) *Efecto de citocininas a niveles transcripcional y traduccional durante la germinación de maíz*. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México.

### 13. APÉNDICES

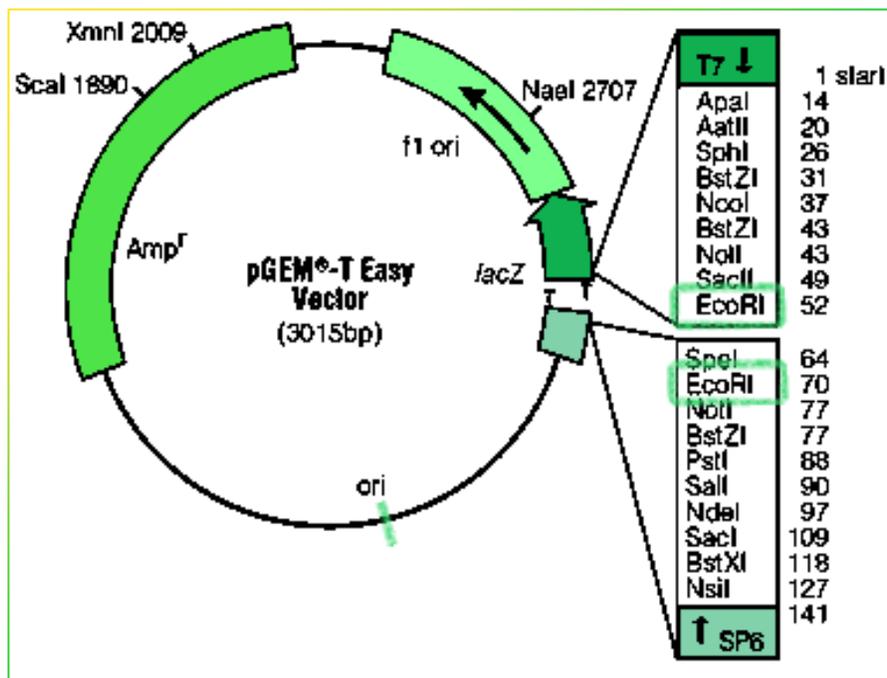
**Apéndice 1.** Alineamiento de secuencias de CDS (superior) y cDNA (inferior) de *ZmKRP3* usadas en Geneious® para diseñar los primers de CDS (flechas blancas, **Tabla 4**). La zona marcada como KRP3 EST (color café) corresponde al marcador de secuencia expresada (EST) del gen, dentro de la cual Rosas-Bringas en 2015 diseñó primers (flechas oliváceas, **Apéndice 9**) para observar la sobreexpresión de este gen en la **Figura 7**.



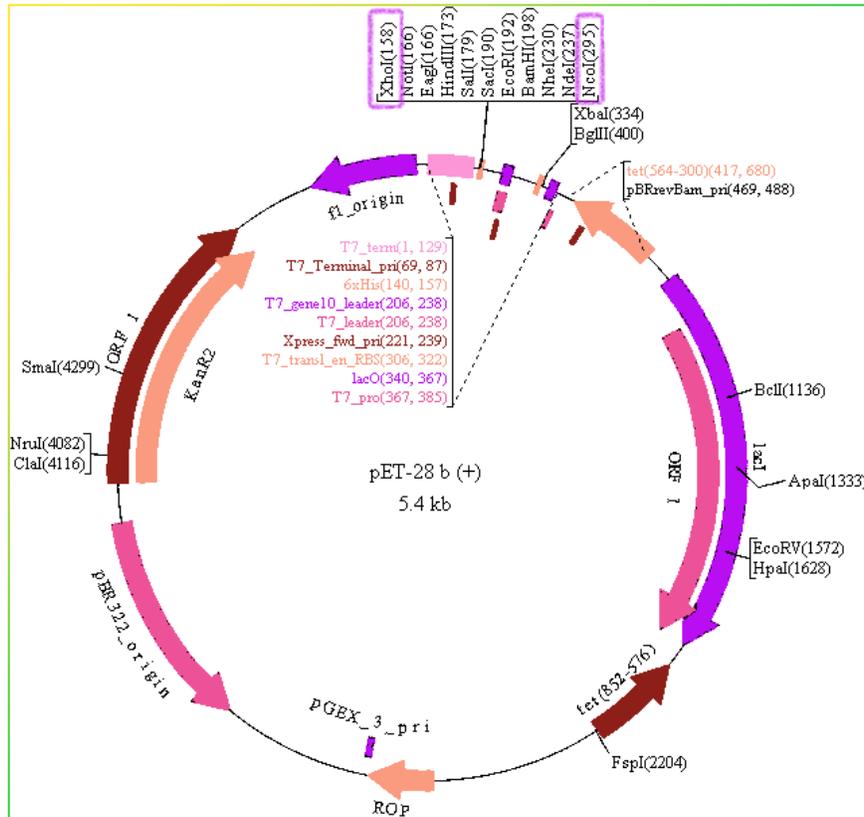
**Apéndice 2.** Secuencia proteica de ZmKRP3 obtenida de Ensembl Plants.



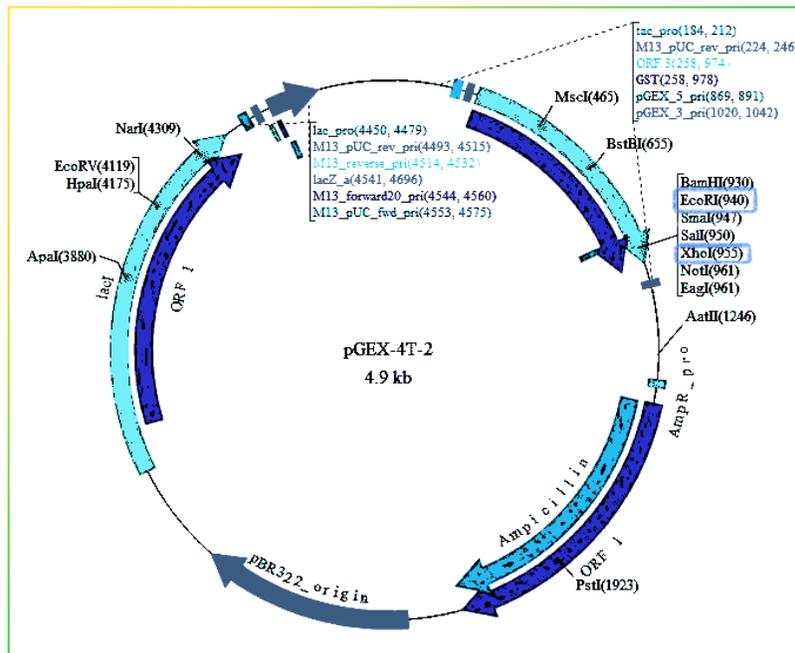
**Apéndice 3.** Esquema del plásmido de mantenimiento pGEM®-T easy. En rectángulos verdes marcados los sitios de restricción de EcoRI.



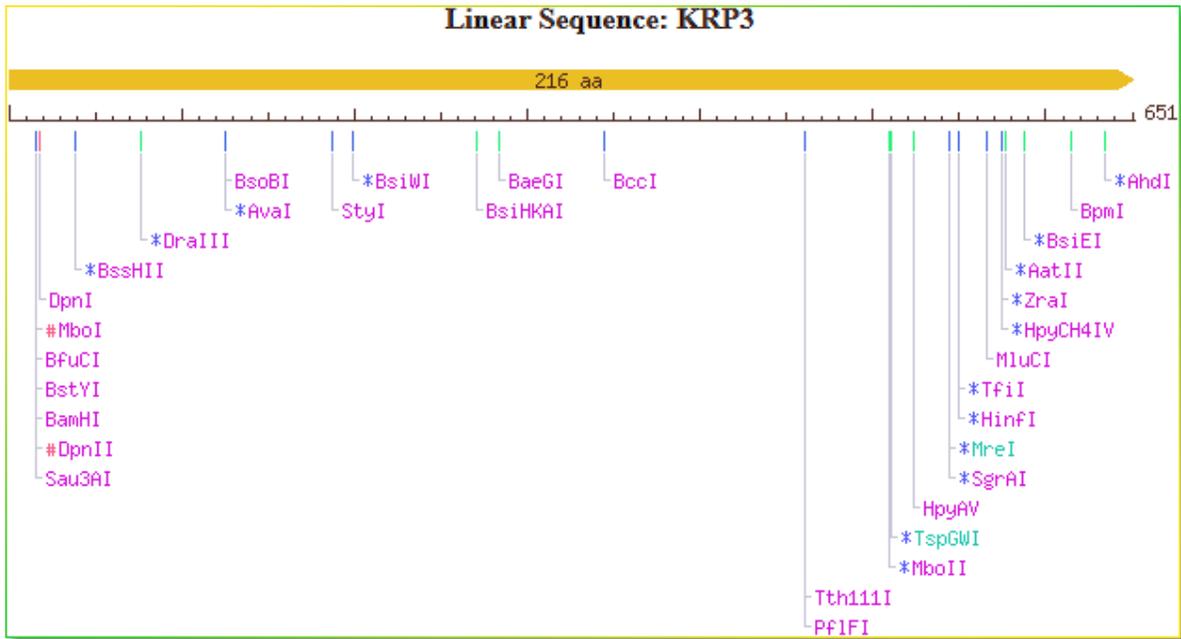
**Apéndice 4.** Esquema del plásmido de expresión pET28b+. En rectángulos morados marcados los sitios de restricción de NcoI y XhoI.



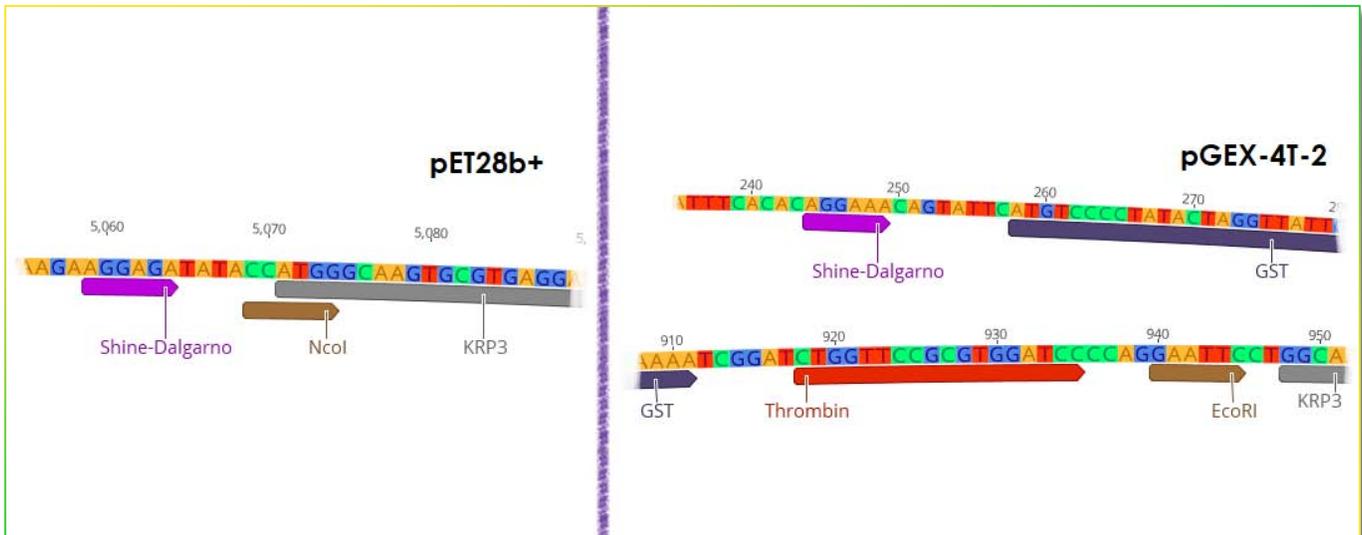
**Apéndice 5.** Esquema del plásmido de expresión pGEX-4T-2. En rectángulos azules marcados los sitios de restricción de EcoRI y XhoI.



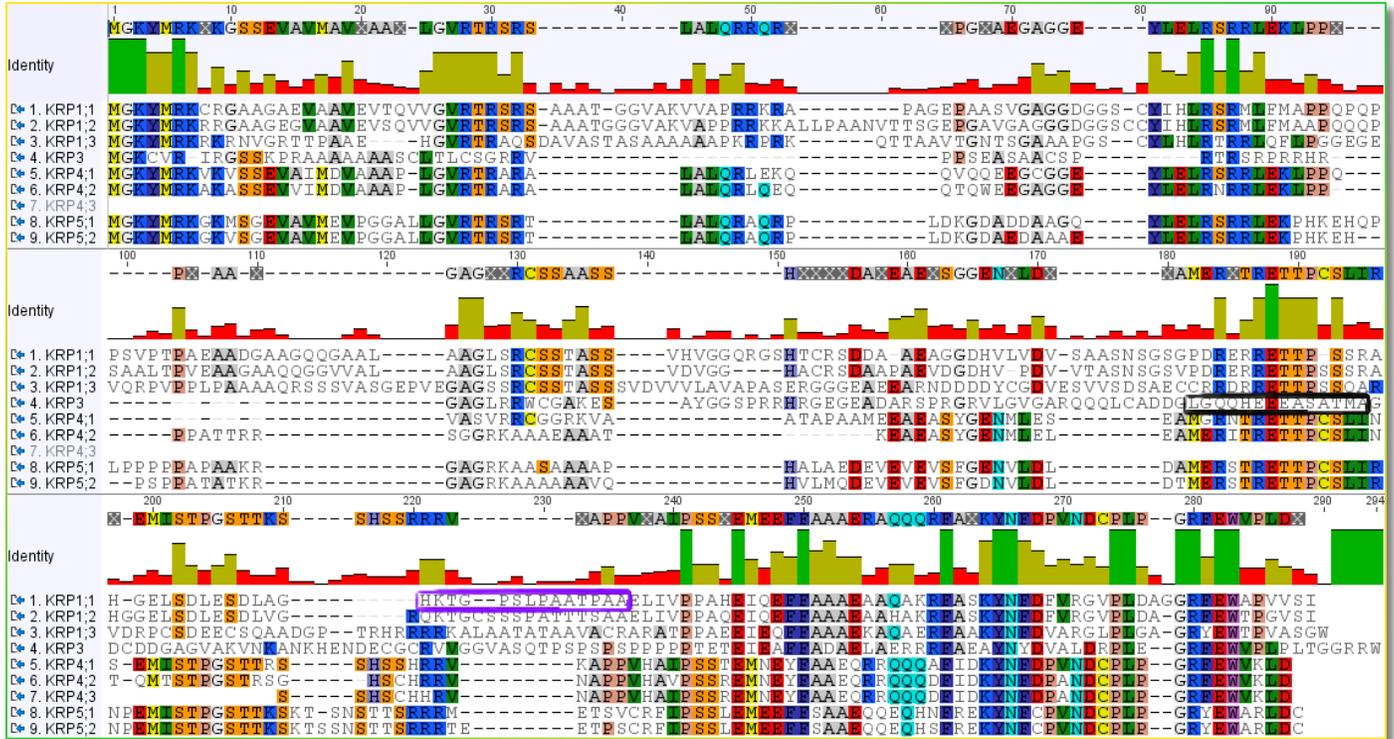
**Apéndice 6.** Sitios de restricción hallados en el CDS de *ZmKRP3*. Destaca la ausencia de sitios de restricción para *EcoRI*, *NcoI* y *XhoI*.



**Apéndice 7.** Presencia de secuencias Shine-Dalgarno en los promotores de los vectores pET28b+ y pGEX-4T-2, antes de sus sitios de restricción. Las secuencias se pueden consultar en los archivos de GenScript®.

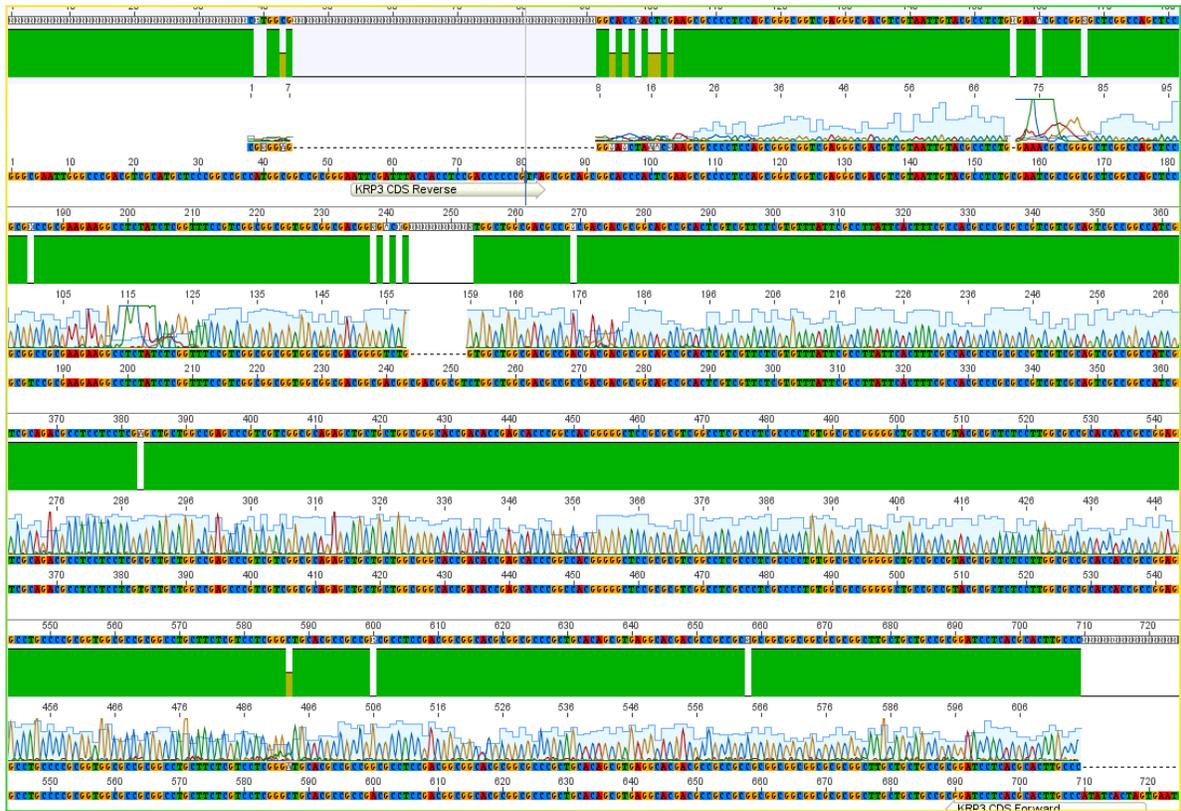


**Apéndice 8.** Alineamiento de la 8 secuencias de KRPs de maíz reportadas y la del pseudogen ZmKRP4<sub>3</sub> (Rosas-Bringas, 2015). Encerrada en morado la secuencia de 14 aa usada para ZmKRP1<sub>1</sub>, y encerrada en negro la secuencia usada para ZmKRP3.

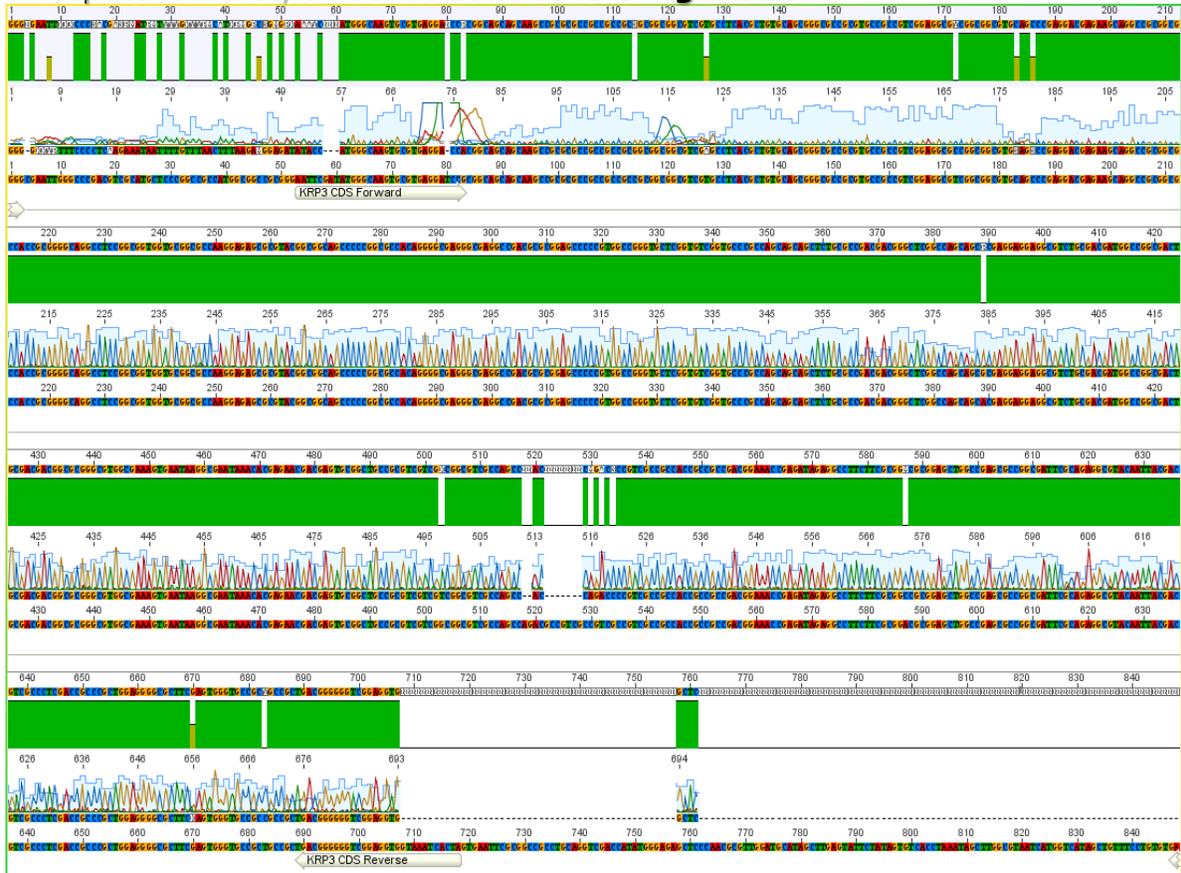


**Apéndice 9.** Primers utilizados como controles positivos durante los ensayos preliminares de PCR, y durante las subclonaciones de *GST-KRP3*. Los primers KRP3-EST amplifican un fragmento de 318 pb, y los 18s uno de 200 pb aproximadamente. El primer KRP3-EcoRI-5' amplifica los 651 pb del gen completo al usarlo junto con el KRP3-Reverse (Tabla 4) o los primeros 420 pb de la secuencia parcial al usarlo junto con el KRP3-XhoI-parcial. Subrayados los sitios de restricción para EcoRI y XhoI respectivamente, en el caso de los últimos 2 primers.

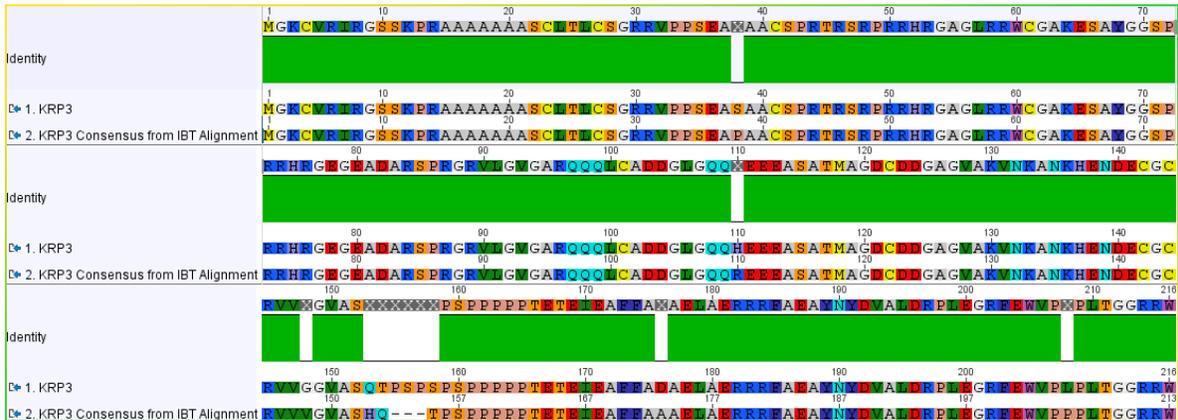
Primer	Secuencia
KRP3-EST-Forward	TTCGCAGAGGCGTACAATTACGC
KRP3-EST-Reverse	GCACCATCAGCTGCATATACGCTA
18S-Forward	TCGAACTGTGAACTGCGAATGG
18S-Reverse	CCGTGTCAGGATTGGGTAATTTGC
KRP3-EcoRI-5'	GATCGAGAATTCTGGCAAGTGCCTGAGGATCCGC
KRP3-XhoI-parcial	GATCCTCGAGTCAGTCGTTCTCGTGTTTATTCGCCTTATTC



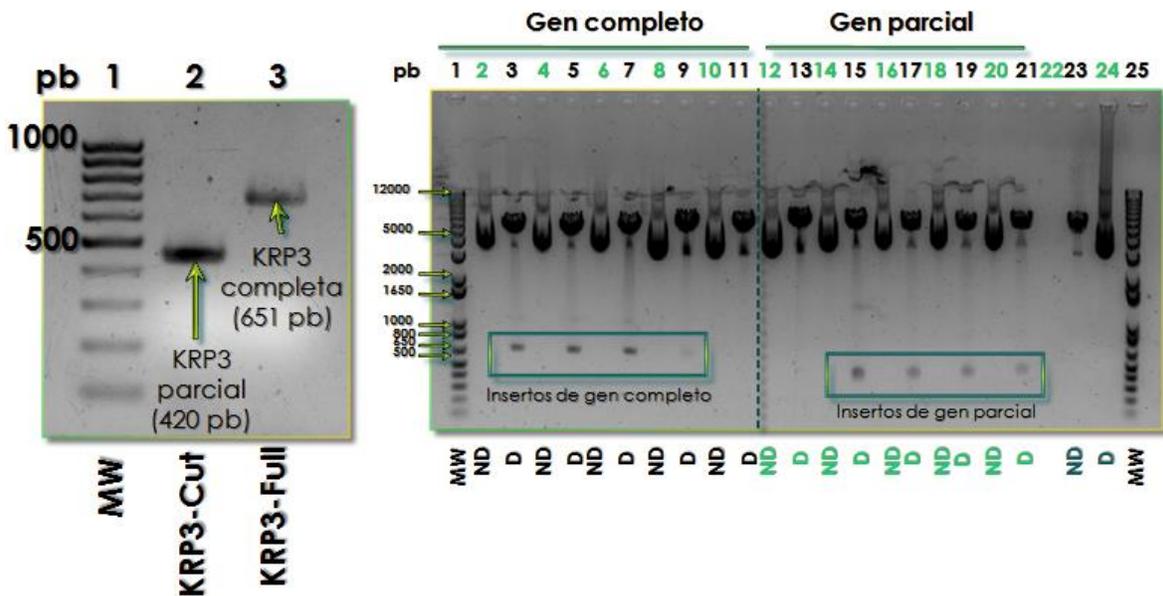
**Apéndices 10 (arriba) y 11 (abajo).** Resultados de secuenciación de la construcción pET28b+-ZmKRP3 utilizando los primers KRP3-Reverse y T7, respectivamente, de donde se obtiene la **Figura 13**.



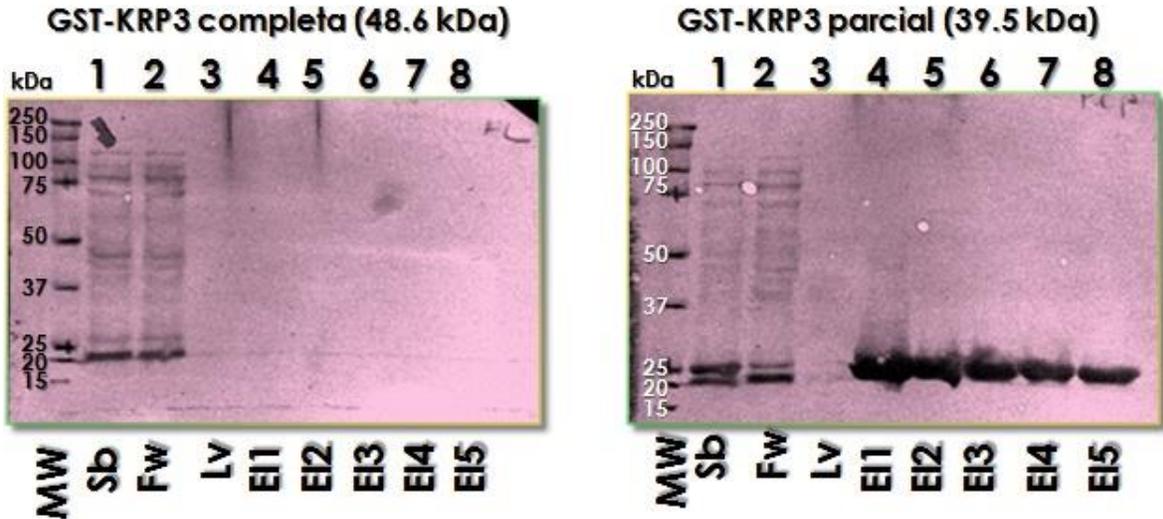
**Apéndice 12.** Alineamiento de las secuencias proteicas de ZmKRP3 para determinar su porcentaje de identidad. Secuencia superior (KRP3), teórica. Secuencia inferior (Consensus from IBT), experimental.



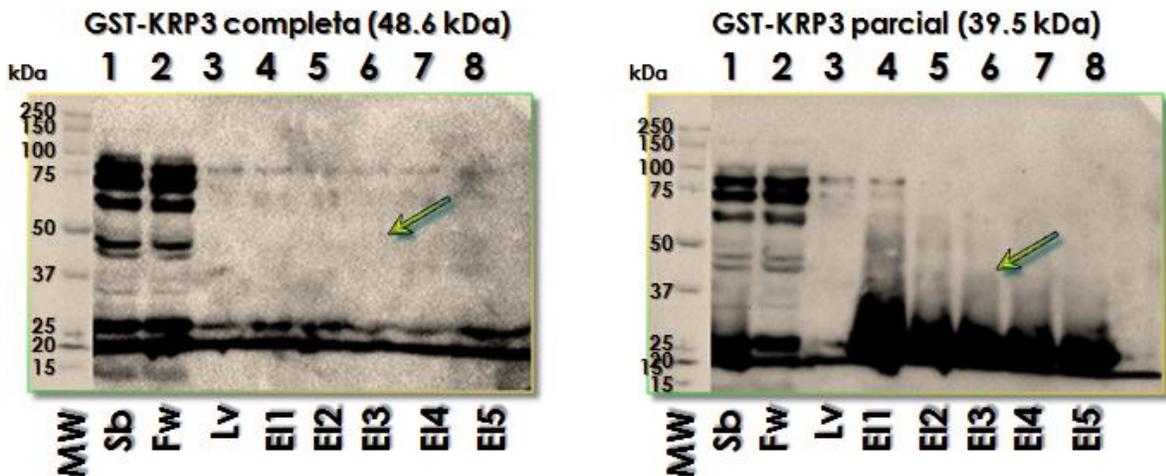
**Apéndice 13.** Izquierda: Amplificación de ZmKRP3 parcial (KRP3-Cut, 420 pb) y completo (KRP3-Full, 651 pb). Ambas bandas se señalan con flechas. Derecha: Doble digestión de construcciones realizadas en pGEX-4T-2 con las enzimas EcoRI y XhoI utilizando gen completo (carriles 2-11) y gen parcial (carriles 2-21). Los carriles marcados como ND indican construcciones sin digerir, los carriles D indican construcciones digeridas. Los controles de plásmido sin inserto están en los carriles 23 y 24. El marcador se encuentra en los carriles 1 y 25. Se encierran en rectángulos las zonas donde aparece el inserto correspondiente después de la doble digestión, todos en el tamaño esperado.



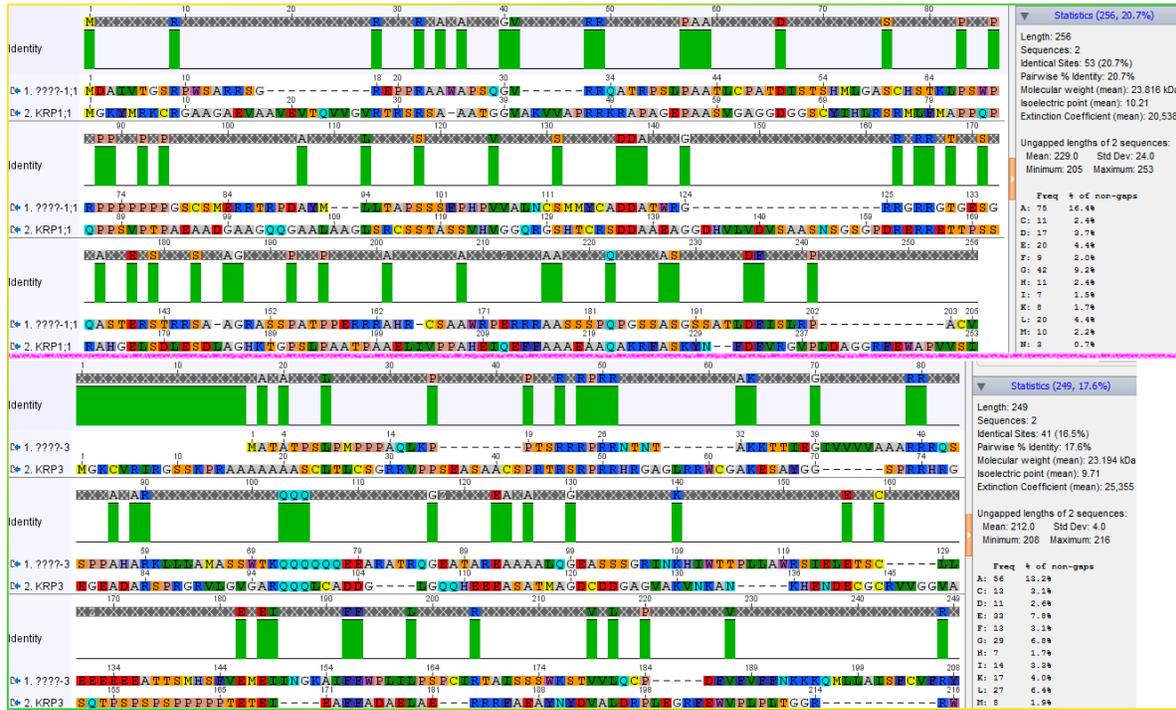
**Apéndice 14.** Tinción con rojo de Ponceau de las membranas correspondientes a la purificación de las proteínas recombinantes GST-KRP3 completa (izquierda) y parcial (derecha), cuyo WB se muestra en la **Figura 14**. Las acotaciones son las mismas que en dicha figura.



**Apéndice 15.** WB de la purificación de las proteínas recombinantes GST-KRP3 completa (izquierda) y parcial (derecha) reveladas con anticuerpo  $\alpha$ -GST-CDKB. Los títulos de anticuerpo, las acotaciones y señalamientos son los mismos que en la **Figura 14**.



**Apéndice 16.** Alineamientos entre la secuencia proteica de ZmKRP1;1 con el posible falso positivo en WB hallado mediante BLASTp (parte superior, secuencias inferior y superior, respectivamente) y entre la secuencia proteica de ZmKRP3 con su posible falso positivo (parte inferior, secuencias inferior y superior, respectivamente).



**Apéndice 17.** Datos de secuencias encontradas al buscar las secuencias de 15 aa de cada ZmKRP en el genoma de *E. coli* mediante BLASTp. Destacan los altos valores e, y la escasa cobertura (máximo 73%) de varios resultados, pese a la alta identidad de los mismos.

Sequences producing significant alignments: for KRP1;1						Sequences producing significant alignments: for KRP3							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	26.9	26.9	53%	7.6	88%	WP_072251071.1	<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	27.4	27.4	53%	5.2	100%	AMW89120.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein HMPREF9542_05125 [Escherichia coli MS 117-3]	24.0	24.0	46%	86	86%	EGB85478.1	<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: hypothetical protein [Enterobacteriaceae]	27.4	27.4	53%	5.2	100%	WP_001317524.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein PU65_25215 [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	86	86%	KIG30078.1	<input type="checkbox"/> hypothetical protein PU47_18610 [Escherichia coli]	27.4	27.4	53%	5.3	100%	KIH88693.1
<input type="checkbox"/> Rhs core protein RhsD [Escherichia coli EC096/10]	24.0	24.0	46%	86	86%	EWC53591.1	<input type="checkbox"/> conserved hypothetical protein [Escherichia coli H299]	27.4	27.4	53%	5.3	100%	EGS3050.1
<input type="checkbox"/> Rhs protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	KHH36059.1	<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	27.4	27.4	53%	5.3	100%	WP_077817013.1
<input type="checkbox"/> Rhs repeat-associated core domain protein [Escherichia coli 2860500]	24.0	24.0	46%	87	86%	ENB02777.1	<input type="checkbox"/> DNA primase domain protein [Escherichia coli DEC10F]	26.5	47.1	73%	11	67%	EHW83742.1
<input type="checkbox"/> Rhs element protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	CTV36240.1	<input type="checkbox"/> hypothetical protein C22711_5198 [Escherichia coli O104:H4 str. C227-11]	26.5	26.5	73%	11	67%	EGT71163.1
<input type="checkbox"/> Rhs repeat-associated core domain protein [Escherichia coli p0305293.3]	24.0	24.0	46%	87	86%	ENG68075.1	<input type="checkbox"/> DNA primase [Escherichia coli]	26.5	26.5	73%	11	67%	KGP42344.1
<input type="checkbox"/> RhsD protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	CTV36334.1	<input type="checkbox"/> toprim domain protein [Escherichia coli]	26.5	26.5	73%	11	67%	WP_072276747.1
<input type="checkbox"/> Rhs protein [Escherichia coli H489]	24.0	24.0	46%	87	86%	EGB54508.1	<input type="checkbox"/> toprim domain protein [Escherichia coli P0304816.6]	26.5	26.5	73%	11	67%	ENF59019.1
<input type="checkbox"/> Rhs repeat-associated core domain protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_023153907.1	<input type="checkbox"/> hypothetical protein HMPREF0986_04859 [Escherichia coli 4_1_47FAA]	26.5	26.5	73%	11	67%	EHP63204.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_049086925.1	<input type="checkbox"/> toprim domain protein [Escherichia coli 1-182-04_S1_C3]	26.5	26.5	73%	11	67%	EZK02504.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_077778776.1	<input type="checkbox"/> toprim domain protein [Escherichia coli MS 117-3]	26.5	47.1	73%	11	67%	EGB90027.1
<input type="checkbox"/> Rhs protein [Escherichia coli 97_0259]	24.0	24.0	46%	87	86%	EH131747.1	<input type="checkbox"/> toprim domain protein [Escherichia coli]	26.5	47.1	73%	11	67%	KGI47747.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_077688361.1	<input type="checkbox"/> IncI1 plasmid conjugative transfer DNA primase [Escherichia coli]	26.5	43.7	73%	11	67%	EGH83742.1
<input type="checkbox"/> protein rhsA [Escherichia coli KTE147]	24.0	24.0	46%	87	86%	ELG94226.1	<input type="checkbox"/> soq [Escherichia coli]	26.5	47.1	73%	11	67%	EHP78664.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_059339695.1	<input type="checkbox"/> soq DNA primase [Escherichia coli EC4402]	26.5	43.7	73%	11	67%	EIP48487.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_077781106.1	<input type="checkbox"/> mobilization protein [Escherichia coli]	26.5	41.1	73%	11	67%	WP_07777131.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein AM263_23420 [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	KQI93018.1	<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: hypothetical protein [Enterobacteriaceae]	26.5	41.1	73%	11	67%	WP_005112217.1
<input type="checkbox"/> Rhs repeat-associated core domain-containing protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_042098507.1	<input type="checkbox"/> mobilization protein [Escherichia coli]	26.5	58.8	73%	11	67%	WP_077824935.1
<input type="checkbox"/> Rhs repeat-associated core domain-containing protein [Escherichia coli]	24.0	24.0	46%	87	86%	WP_020240412.1	<input type="checkbox"/> mobilization protein [Escherichia coli]	26.5	62.1	73%	11	67%	WP_077828002.1
							<input type="checkbox"/> Transfer protein SoqS [Escherichia coli]	26.5	58.8	73%	11	67%	SHF26982.1

**Apéndice 18.** Uno de los resultados hallados al buscar la secuencia de KLH en el genoma de maíz, correspondiente a una polifenol oxidasa.

PREDICTED: polyphenol oxidase, chloroplastic-like [Zea mays]  
 Sequence ID: [XP\\_008663490.1](#) Length: 546 Number of Matches: 7

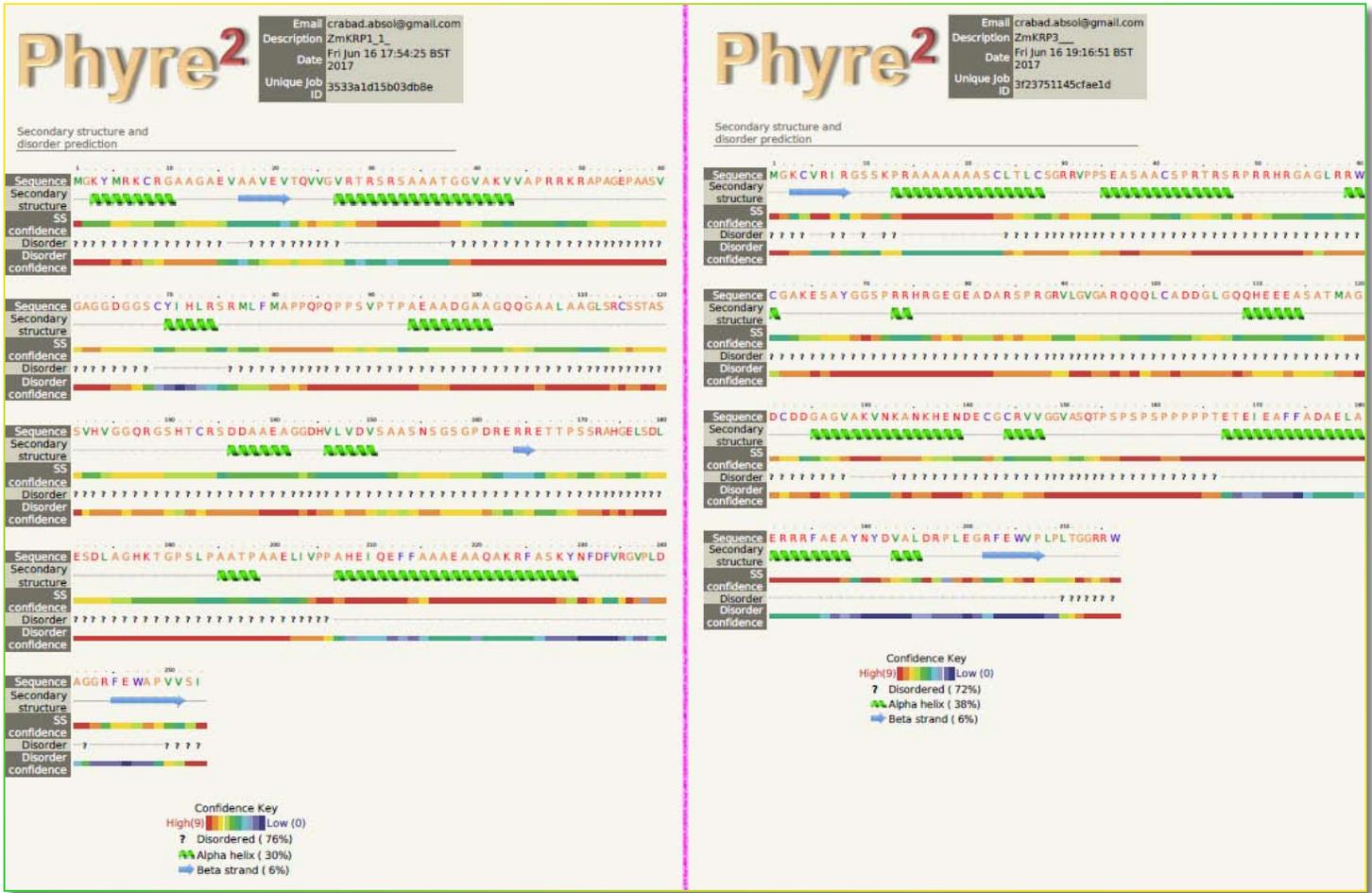
Range 1: 82 to 343 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
72.8 bits(177)	9e-12	Compositional matrix adjust.	69/265(26%)	108/265(40%)	38/265(14%)
Query 433	QSANLLVRKININDLTREEVLNLRFAFKFQEDRSVDGYQATAEYHGLPARCPRPDAKDRY				492
Sbjct 82	EDVNCCPSPGIVDFTSPRLRVRPA AHLVDAEYVAKYEKAVALMKQLPDDDP RSFAQQWR				141
Query 493	ACCVH-----GMP-----IFPHWHRLFV---TQVEDALVGRGATIGIPYWDW				531
Sbjct 142	VHCAYCDGAFDQVGFDPLEIQIHNCWLFQWHRFYLYFHERILGKLVGDD-KFALPFWNW				200
Query 532	TEPM-THIPGLAGNKT---YVDSHGASHTNPFHSSVIAFEENAPHTKR--QIDQRLF---				582
Sbjct 201	DAPGGMSLPAIYADKSSPLYDERRDPAHQPPFTLD-LDYDGTPTIPRAQQIDQNLIMIMY				259
Query 583	-KPATFGHHTDLFNQILY-AFEQEDYCDFEVQFEITHNTIHAWTGGSEHFS---MSSLHY				637
Sbjct 260	RQMISGAKKELFFGMPYRQGDQDPGAGTVE-SIPHNPVHFWSGDPRQPNGEDMGNFY S				318
Query 638	TAFDPLFYFHHSNVDRLWAVWQALQ 662				
Sbjct 319	AARDPLFFAHHGNIDRMWSVWNGLR 343				

Range 2: 163 to 462 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
60.1 bits(144)	8e-08	Compositional matrix adjust.	67/318(21%)	124/318(38%)	38/318(11%)
Query 2155	IHGMPFFPHWHRLYLTLQFEQALRR--HGSSVAVPYWDWTKPI-HNIPHLFTDKE--YYDV				2209
Sbjct 163	IHNCWLFQWHRFYLYFHERILGKLVGDDKALPFWNWDAPGGMSLPAIYADKSSPLYDE				222
Query 2210	WRNKVMPNPF-----RGYVPSHDTYTVRDVQEGFLHSTSTGEHSALLNQALLAL-----				2259
Sbjct 223	RRDPAHQPPFTLDLDYDGTPT--IPRAQQIDQNLIMIMYRQMISGAKKELFFGMPYRQG				280
Query 2260	EQHDYCDFAVQFEVMHNTIHYLVGGPQVYS---LSSLHYASYDPIFFIHHSFVDKVVAVW				2316
Sbjct 281	DQDPGAGTVE-SIPHNPVHFWSGDPRQPNGEDMGNFYSAARDPLFFAHHGNIDRMWSVW				339
Query 2317	QALQEKRLPSDRA--DCAVSLMTQNMRFHYEINHNQFTKKHAVPNDVFKYELLGYRYD				2374
Sbjct 340	NGLRPGNSDFTDPSWLDASFLFYDEEARLVRVRV-----RDCLDTAALGYAYQ				387
Query 2375	NLEIGGMNLHEIEKEIKDKQHVRVVFAGFLHGIRTSADVQFQICKTSEDCHGGQIFVL				2434
Sbjct 388	DVALPWLNAKP-AKEAGSPAPTAGALPAILNQTVRVAV-TRPKTSRTRKEKDAKEEVLVV				445
Query 2435	GGTKEMAWAYNRLFKYDI 2452				
Sbjct 446	QGI-EIADHSSRFVKFDV 462				

**Apéndice 19.** Resultados de la predicción de estructuras secundarias y de regiones intrínsecamente desordenadas hecha en Phyre2 para ZmKRP1;1 (izquierda) y ZmKRP3 (derecha). En estructura secundaria, las hélices verdes indican la predicción de  $\alpha$ -hélices, las flechas azules la predicción de  $\beta$ -plegadas, y la línea continua la predicción de loops. Las zonas que serían intrínsecamente desordenadas se denotan con signos de interrogación. El código de colores indica la confiabilidad del análisis.



**Apéndice 20.** Confiabilidad de los modelos tridimensionales de ZmKRP1;1 (izquierda) y ZmKRP3 (derecha) mostrados en la **Figura 23**. En color rojo, las zonas con alto grado de confiabilidad (más de 90%) de una predicción correcta de la estructura, ambas corresponden al C-terminal. En color azul, zonas de baja confiabilidad (menor a 70%).

