



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación de la actividad de la cinasa CDKA1 de maíz

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Mingyar Neftalí López Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Vázquez Ramos, Facultad de Química - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adriana Garay Arrollo, Instituto de Ecología – UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Facultad de Química - UNAM

Ciudad de México. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Panta rei kai oudén ménei

Heráclito de Éfeso

Reconocimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos Facultad de Química - UNAM

Dra. Adriana Garay Arrollo Instituto de Ecología - UNAM

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres Facultad de Química - UNAM

Se reconoce:

La asesoría técnica y la discusión del proyecto de la Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez del Instituto de Ecología – UNAM; de la Dra. Aurora Lara Núñez del laboratorio 114 de la Facultad de Química; del Técnico Académico del laboratorio 114, Dr. Elpidio García Ramírez; así como de mis compañeros de laboratorio durante la duración del proyecto.

La donación del plásmido pCDFDuet-1 y de la construcción pCDFDuet-1**AtCDKA** *GST-Cak1* por parte del Dr. Arp Schnittger del Departamento de Biología del Desarrollo de la Universidad de Hamburgo.

El financiamiento para la realización de los experimentos por parte del PAPIIT (IN215316/IA204817), PAIP (5000-9124/5000-9130) y Conacyt (CB 220661).

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

Al término de la maestría gocé de un Estímulo económico de Ayudante de Investigador Nivel III otorgado por el SNI.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día.....

El Jurado de Examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares Facultad de Química - UNAM

Secretario Dr. Fernando López Casillas Instituto de Fisiología Celular - UNAM

Vocal Dr. Eleazar Martínez Barajas Facultad de Química - UNAM

Vocal Dr. José Francisco Torres Quiroz Instituto de Fisiología Celular - UNAM

Vocal Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez Instituto de Fisiología Celular - UNAM

Agradecimientos

A la Facultad de Química, al posgrado en Ciencias Bioquímicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica y humana.

Al Dr. Jorge Vázquez, por sus invaluable consejos, por alentarnos cada lunes en seminario a desarrollar una visión crítica de la ciencia; por invitarme a su laboratorio, ya que así pude descubrir lo fascinante que es la ciencia, por su entera confianza y libertad para desarrollar este proyecto, por sus críticas, por su apoyo incondicional.

A las doctoras Aurora Lara y Mary Paz Sánchez, por el asesoramiento y las críticas, ya que me ayudaron a desarrollar este proyecto de mejor forma. Por mi formación en el laboratorio.

Al doctor Elpidio García, quien ha compartido conmigo su experiencia y conocimiento, y quien también ha sido un gran amigo, dispuesto a apoyarme y darme esos pequeños empujoncitos en momentos de duda.

A los miembros del comité tutor, la Dra. Adriana Garay y el Dr. Rogelio Rodríguez, cuyas críticas enriquecieron el proyecto.

Al Dr. Rogelio Rodríguez, quien con sus consejos, me alentó a continuar.

A los miembros del Jurado, los doctores Rosario Adelaida Muñoz Clares, Fernando López Casillas, Eleazar Martínez Barajas, José Francisco Torres Quiroz y Luis Alfonso Vaca Domínguez, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, y por sus correcciones y sugerencias.

A mis compañeros y excompañeros del laboratorio 114, Brendy, Cassandra, Griss, Roberto, Javier, Samantha, Pablo, Diana, Aldo, Jorge, Jesús, y muy en especial a Sara, Silvia, Fernando, Jorge Zamora, Fernanda y Víctor; por las aportaciones experimentales, sus críticas y su amistad, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A los miembros del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, en quienes he encontrado a una gran familia, que no dudaron en apoyarme con algún reactivo o material que hiciera falta.

A mis padres y mi hermana, por su ayuda y apoyo incondicional.

A Antonieta, por siempre estar al pendiente.

A Carolina, por el tiempo dedicado a la corrección ortográfica y gramatical de esta tesis, por ayudarme a la purificación de proteínas. ¡Por compartir su vida conmigo!

Índice general

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
1.1 El ciclo celular.....	3
1.1.2 Fases del ciclo celular.....	5
1.2. Proteínas que regulan la progresión del ciclo celular.....	7
1.2.1. CDKs.....	7
1.2.1.1. Cinasas Activadoras de CDKs (CAKs).....	12
1.2.1.2 CAKs en plantas.....	14
1.2.2. CDKs en plantas: La CDKs tipo A y B.....	15
1.2.2.1 CDKs tipo C y E.....	17
1.2.3. Ciclinas.....	18
1.2.3.1. Ciclinas tipo D en plantas.....	21
1.2.4. La vía RB-E2F y el control de la transición G1/S.....	22
1.2.5. El control de la transición G2/M.....	25
1.2.5.1. Proteínas que controlan la transición G2/M en plantas.	27
1.2.5.1.1. Regulación de la transición G2/M: La proteína CDC25 en plantas...	29
1.2.5.1.2. Regulación de la transición G2/M: La proteína Wee1 en plantas....	30
2. Antecedentes y planteamiento del proyecto.....	35
3. Hipótesis.....	40
4. Objetivo General.....	40
4.1. Objetivos particulares.....	40
5. Resultados.....	41
5.1.1 Clonación de <i>ZmCDKA1</i> , <i>ZmCycD2;2a</i> y <i>Cak1</i>	41
5.2.1 Caracterización de <i>ZmWEE1</i>	44
5.2.2 Clonación de <i>ZmWee1</i> en pDEST15.....	47
5.3.1 Interacción de <i>ZmCDKA1</i> con <i>ZmCycD2;2a</i>	49
5.3.2 Coexpresión del complejo <i>ZmCDKA1-ZmCycD2;2a</i> con <i>Cak1p</i>	52
5.3.3 Coexpresión del complejo <i>ZmCDKA1-ZmCycD2;2a</i> con <i>ZmWee1</i>	53
5.4.1 Fosforilación de la <i>ZmCDKA1</i>	55
5.5.1 Actividad cinasa del complejo <i>ZmCycD2;2-MBP*His-ZmCDKA1</i>	58

6.5 Inhibición de la actividad cinasa del complejo <i>ZmCycD2;2-MBP*His-ZmCDKA1</i> ...	63
7. Análisis de resultados	69
7.1. <i>ZmCycD2;2</i> interacciona con <i>ZmCDKA1</i> y el complejo se asocia con <i>ZmWee1</i> <i>in vitro</i>	70
7.2 <i>ZmCDKA1</i> se fosforila cuando se coexpresa con Cak1p o <i>ZmWee1</i>	74
7.3 Mecanismos que llevan a la activación de <i>ZmCDKA1</i>	78
7.4 El complejo <i>ZmCycD2;2-ZmCDKA1</i> fosforila diferencialmente diversos sustratos.....	82
7.5 Inhibición de la actividad de cinasa por la proteína <i>Wee1</i> de maíz.....	87
8. Conclusiones	94
9. Materiales y métodos	96
9.1 Material biológico.....	96
9.1.1 Ejes embrionarios.....	96
9.1.2 Cepas.	96
9.1.2 Plásmidos.	96
9.1.3 Cultivos bacterianos.	96
9.1.4 Imbibición de ejes embrionarios.	97
9.2 Técnicas generales.	98
9.2.1.1 Electroforesis de DNA.	98
9.2.1.2 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	98
9.2.1.3 Purificación de DNA plasmídico.	98
9.2.1.4 Preparación de células competentes.	99
9.2.1.5 Transformación de células competentes.	99
9.2.1.6 Extracción de RNA.	100
9.2.1.7 Obtención de cDNA.	100
9.2.1.8 Amplificación de DNA.....	100
9.2.1.9 Fusión de <i>ZmCycD2;2a</i> y <i>malE</i>	102
9.2.1.10 Adenilación de DNA.	103
9.2.1.11 Ligación en pGEMT-Easy.	103
9.2.1.12 Ligación en pENTR/D-TOPO.....	103
9.2.1.13 Ligación en pCDFDuet-1.	103
9.2.1.14 Recombinación con pDEST15.....	104
9.2.2.1 Sobreexpresión de proteína recombinante.	104
9.2.2.2 Purificación de proteína recombinante.....	105

9.2.2.3 Diálisis, concentración y cuantificación de proteína.....	106
9.2.2.4 Electroforesis de proteínas	107
9.2.2.5 Western blot.	108
9.2.2.6 Ensayo de fosfatasa.	109
9.2.2.7 Ensayo de actividad cinasa.	109
9.2.3.1 Expresión en el transcriptoma de maíz.	110
9.2.3.2 Obtención de la secuencia de <i>ZmWee1</i>	110
9.2.3.3 Alineamientos.....	110
10. Apéndice.	111
11. Bibliografía	135

Índice de figuras y esquemas

1. Fases del ciclo celular	6
2. Cambios conformacionales en la CDK provocados por la unión de la ciclina.....	10
3. Efecto de la fosforilación en la T160 de la CDK en el complejo Ciclina-CDK.....	11
4. Panorama general del control del ciclo celular en plantas	20
5. Niveles de mRNA de <i>ZmWee1</i> en mazorca y durante la imbibición de ejes embrionarios de maíz.....	45
6. Subclonación de <i>ZmWee1L</i> y <i>ZmWee1S</i> a pDEST15.....	49
7. Copurificación de <i>ZmCycD2</i> ;2-MBP con His- <i>ZmCDKA1</i>	50
8. Copurificación de <i>ZmCycD2</i> ;2-MBP y GST-Cak1p con His- <i>ZmCDKA1</i>	52
9. Copurificación de <i>ZmCycD2</i> ;2-MBP y GST- <i>ZmWee1</i> con His- <i>ZmCDKA1</i>	54
10. Identificación de las fosforilaciones en <i>ZmCDKA1</i>	56
11. Desfosforilación de <i>ZmCDKA1</i>	57
12. Actividad cinasa del complejo <i>ZmCycD2</i> ;2a-MBP*His- <i>ZmCDKA1</i>	58
13. Reconstitución de la actividad cinasa de His- <i>ZmCDKA1</i>	60
14. Fosforilación de <i>ZmRBR1</i> por el complejo <i>ZmCycD2</i> ;2a-MBP*His- <i>ZmCDKA1</i>	62
15. Inhibición de la actividad cinasa del complejo <i>ZmCycD2</i> ;2a-MBP*His- <i>ZmCDKA1</i>	64
16. Inhibición de la actividad cinasa que el complejo <i>ZmCycD2</i> ;2a-MBP*His- <i>ZmCDKA1</i> tuvo sobre Histona H1 y RBR.	65
17. Inhibición de la actividad cinasa que el complejo <i>ZmCycD2</i> ;2a-MBP*His- <i>ZmCDKA1</i> tuvo sobre <i>ZmCycD2</i> y RBR.....	66
18. Mecanismos que llevan a la activación de <i>ZmCDKA1</i>	94
19. Mecanismos que inhibirían la actividad de <i>ZmCDKA1</i>	95
Esquema A1. Vector pGEM-T Easy.....	111
Esquema A2. Vector pCDFDuet-1.	111
Esquema. A3. Regiones de expresión/clonación en pCDFDuet-1.	112
Esquema A4. Vector pGEX-4T-2.....	112
Esquema A5. Vector pENTR/D-TOPO.....	113
Esquema A6. Vector pDEST-15.	113
Esquema A7. Fusión de <i>ZmCycD2</i> ;2a con malE.....	114

Índice de figuras en Apéndice

Figura. A1. Conservación de residuos blanco fosforilación en las CDKs.....	116
Figura A2. Subclonación de <i>ZmCDKA1</i> en el vector pGEMT-Easy.....	116
Figura A3. Clonación de <i>ZmCDKA1</i> en pCDFDuet-1.	117
Figura A4. Fusión de <i>ZmCycD2;2a</i> con <i>malE</i>	117
Figura A5. Amplificación de <i>ZmCycD2;2a-malE</i> a partir de colonias transformadas con la ligación de <i>ZmCycD2;2a-malE</i> a pGEMT-Easy.....	118
Figura A6. Clonación de <i>ZmCycD2;2a-malE</i> en pCDFDuet-1.....	118
Figura A7. Clonación de <i>ZmCycD2;2a-malE</i> en pCDFDuet-1* <i>ZmCDKA1</i>	119
Figura A8. Clonación de <i>Cak1</i> en pENTR.	119
Figura A9. Subclonación de <i>Cak1</i> en pDEST15.....	120
Figura A10. Alineamiento de la secuencia putativa de aminoácidos de diferentes proteínas Wee1 de plantas.....	121
Figura A11. Rampa de temperatura para la amplificación de <i>ZmWee1</i>	123
Figura A12. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de <i>ZmWee1</i>	124
Figura A13. Clonación de <i>ZmWee1S</i> y <i>ZmWee1L</i> en pENTR.....	125
Figura A14. Interacción de <i>ZmCycD2;2a-MBP</i> con la columna de Ni-NTA agarosa.....	125
Figura A15. Interacción de MBP con His- <i>ZmCDKA1</i>	126
Figura A16. Interacción de GST con His- <i>ZmCDKA1-ZmCycD2;2a-MBP</i>	127
Figura A17. Cuantificación de proteína recombinante.....	128
Figura A18. Desfosforilación de <i>ZmCDKA1</i>	128
Figura A19. Activación del complejo <i>ZmCycD2;2a-MBP*His-ZmCDKA1</i>	129
Figura A20. Actividad cinasa de <i>ZmWee1L</i> sobre <i>ZmCDKA1</i>	130
Figura A21. Actividad del complejo His- <i>ZmCDKA*ZmCycD2;2a-MBP</i> coexpresado con <i>ZmWee1L-GST</i>	131
Figura A22. Identificación de las proteínas presentes después de la purificación, diálisis y concentración de <i>ZmCDKA1</i> que fue expresada bajo diferentes esquemas de coexpresión.....	132
Figura A23. Identificación de las proteínas recombinantes <i>ZmWee1</i> , <i>Cak1p</i> y <i>ZmRBR1</i>	133
Figura A24. Comparación de la posición espacial de la Y15 en dos conformaciones de la CDK2 de humano.....	134

Índice de tablas

I. Concentraciones de antibióticos utilizadas durante los cultivos.....	97
II. Cebadores diseñados para la clonación de secuencias	101
III. Cebadores utilizados para la amplificación de secuencias clonadas en plásmidos.	101
IV. Condiciones utilizadas para las PCRs	109
V. Plásmidos o combinaciones de plásmidos utilizadas para la expresión o coexpresión de proteínas recombinantes.....	105
VI. Diluciones de anticuerpo primario y secundario utilizadas en los ensayos de “western blot”	108
AI. Porcentaje de identidad entre la secuencia putativa de aminoácidos de las proteínas Wee1.....	122

Abreviaturas

aa	Aminoácido
ABA	Ácido abscísico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APC/C	Complejo promotor de la anafase o Ciclosoma
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAK	Cinasa activadora de CDK
CAKAKs	Cinasa activadora de cinasa activadora de CDK
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CIP/KIP	Proteína que interactúa con CDK/Proteína inhibidora de cinasa
cDNA	DNA complementario
CKIs	Inhibidores de CDKs
CKS	Subunidad ciclina-cinasa
Cyc	Ciclina
CTD	Dominio carboxilo terminal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Compañero de dimerización
DYRK	Cinasas con especificidad dual reguladas por fosforilación en tirosina
E2F	Factor de unión al promotor E2 de adenovirus
FSBA	5-fluorosulfonilbenzoiladenosina

Abreviaturas

GST	Glutati3n S-Transferasa
KRPs	Prote3na relacionada a Kip
MAPKs	Prote3na cinasa activada por mit3geno
MAT1	<i>m3nage 3 trois</i>
MBP	Prote3na de uni3n a maltosa
MCM	Prote3na de mantenimiento de mini cromosomas
MCS	Sitio m3ltiple de clonaci3n
mRNA	RNA mensajero
ORF	Marco abierto de lectura
PKA	Prote3na cinasa dependiente de AMPc
PCNA	Ant3geno nuclear de proliferaci3n celular
PCR	Reacci3n en cadena de la polimerasa
RB	Prote3na de retinoblastoma
RBR	Prote3na relacionada a retinoblastoma
RNA	3cido ribonucleico
RNR	Ribonucle3tido reductasa
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Resumen

La actividad cinasa de diferentes complejos ciclina-CDK es necesaria para la progresión del ciclo celular, y uno de los mecanismos de regulación más importantes que modulan la actividad de las CDKs es el de la fosforilación, adicionalmente, la asociación con una ciclina también es indispensable para la actividad de la cinasa. Tanto en plantas como en animales, cinasas activadoras de CDKs (CAKs) fosforilan un residuo equivalente a la T160 de la CDK2 de humano y dicha fosforilación es indispensable para la activación de las CDKs. Sin embargo, mientras que en animales la fosforilación de la Y15, mediada por la proteína Wee1, es necesaria para regular negativamente la actividad de la CDK y la transición G2/M, al parecer esto último no en todas las plantas es necesario.

En nuestro grupo se han estudiado, durante la germinación de maíz, a dos tipos de CDKs que en diferentes plantas han demostrado ser importantes para la regulación del ciclo celular: las CDKs tipo A y B. Dichas CDKs tienen una actividad diferencial dependiendo de la ciclina a la que se encuentran asociadas y al parecer su actividad está regulada por la fosforilación, aunque lo anterior no había sido demostrado. Por lo anterior, en la presente tesis se estudió *in vitro*, mediante la metodología de coexpresión robusta en células de *E. coli*, la regulación de la actividad cinasa del complejo CycD2;2a-CDKA1 por la fosforilación de la CDKA1. Se determinó que el complejo se activó por la vía clásica, que implicó la formación del complejo CycD2;2a-CDKA1 y posteriormente la fosforilación de la CDKA1 por una CAK. Adicionalmente, la CDK se activó por un segundo mecanismo; en éste, la CDKA1 primero fue fosforilada por la CAK, lo cual no llevó a la activación de la CDKA1; sin embargo, cuando se adicionó CycD2;2a, la CDKA1 fue activada.

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que la proteína Wee1 favorecería la inhibición de la CDKA1 mediante dos mecanismos. Uno de ellos implicaría la fosforilación de la CDKA1 en la Y15, de manera similar a como se ha demostrado en otros organismos. Sin embargo, en el segundo mecanismo, Wee1 estaría compitiendo con CycD2;2a por la unión a la CDKA1, lo que provocaría una disminución en la actividad de la CDK; dicho mecanismo no ha sido reportado con anterioridad.

1 Introducción

1.1. El ciclo celular

Casi dos billones de años de evolución han generado una vasta y sorprendente variedad de vida eucarionte. La misma comprende aproximadamente 8.7 millones de especies (Mora *et al.*, 2011) y el crecimiento y reproducción de todos estos organismos depende de la duplicación fiel de sus cromosomas y su distribución a una célula hija en un proceso conocido como ciclo celular (Harashima *et al.*, 2013). Cada célula es producto de un ciclo celular, el cual es controlado de manera precisa por la maquinaria que controla la división celular; esto asegura que la célula se divida en el momento correcto y que los componentes importantes se repliquen con la fidelidad adecuada.

El ciclo celular comprende dos eventos: división celular, durante la cual la célula replica su genoma y lo reparte a una célula hija; y crecimiento celular, en el que la célula incrementa su masa por la síntesis de proteínas, membranas lipídicas y otros componentes esenciales. Mientras que el crecimiento celular y la mayoría de los procesos bioquímicos son continuos, el ciclo celular ocurre en etapas discretas. En las células eucariontes, proteínas cinasas, fosfatasas y proteasas especializadas han evolucionado para funcionar como interruptores y en consecuencia imponer un modo gradual en la progresión de los procesos de duplicación y repartición del DNA durante la citocinesis. Esta red de proteínas involucradas en monitorear la progresión del ciclo celular también es capaz de acoplar las etapas del mismo con las condiciones medioambientales, de tal forma que la división celular sólo ocurre cuando las condiciones son favorables (Inzé y De Veylder, 2015).

El último ancestro común de plantas, animales y fungi vivió hace aproximadamente 1750 millones de años (Hedges *et al.*, 2004), y a pesar de esta gran distancia en su evolución y las diferencias aparentes de los organismos pluricelulares modernos, la maquinaria celular que realiza las funciones fundamentales, incluyendo las moléculas que regulan los ciclos de división, están altamente conservadas en todos los eucariontes existentes. Esto no significa que las moléculas son reguladas de manera

similar en todos los organismos. Por ejemplo: plantas y animales usan diferentes estrategias para controlar su homeostasis celular; en animales, las células dañadas o muertas son reemplazadas por la división celular, lo cual asegura que el organismo mantenga el tamaño de su cuerpo y su forma por largos periodos de tiempo. Este proceso requiere de células madre especializadas que definen una gran variedad de linajes celulares y un balance adecuado entre división celular y muerte celular programada, lo cual asegura un número correcto de células. En contraste, las plantas crecen constantemente por la formación repetida de sus órganos, y en caso de daño o muerte de alguno de sus órganos, éste es reemplazado completamente.

Así que los animales han evolucionado hacia el desarrollo de mecanismos regulatorios muy elaborados que les permiten prevenir una proliferación celular inadecuada; si los mecanismos de regulación fallaran, existirían consecuencias catastróficas (p. ej. desarrollo de cáncer). Típicamente, en plantas no se observa la división celular no controlada, aunque la razón de esta diferencia con respecto a animales no es del todo clara (Doerner, 2000).

1.1.2. Fases del ciclo celular

El ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M (**Fig.1**). En la primera fase (en la que la célula puede permanecer detenida bajo ciertas circunstancias) la célula debe percibir las señales (externas e internas) adecuadas que le comuniquen que se encuentra en un entorno favorable para llevar a cabo su división. Ocurrido lo anterior, la célula deberá prepararse para iniciar la replicación de su genoma (p. ej. sintetizar proteínas necesarias para la replicación del DNA), verificar que su DNA se encuentra íntegro para que pueda ser correctamente duplicado y aumentar su tamaño. Una vez que el DNA se ha replicado durante la fase S (síntesis), en la fase G2 la célula se asegura de que la replicación del DNA se ha completado correctamente, y sólo entonces la célula estará preparada para dividirse. Finalmente, durante la fase M (mitosis) los cromosomas son repartidos y la célula se divide. Posterior a la división, la

célula avanza nuevamente a G1 y ésta puede estar en condiciones de iniciar una nueva ronda de división celular (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

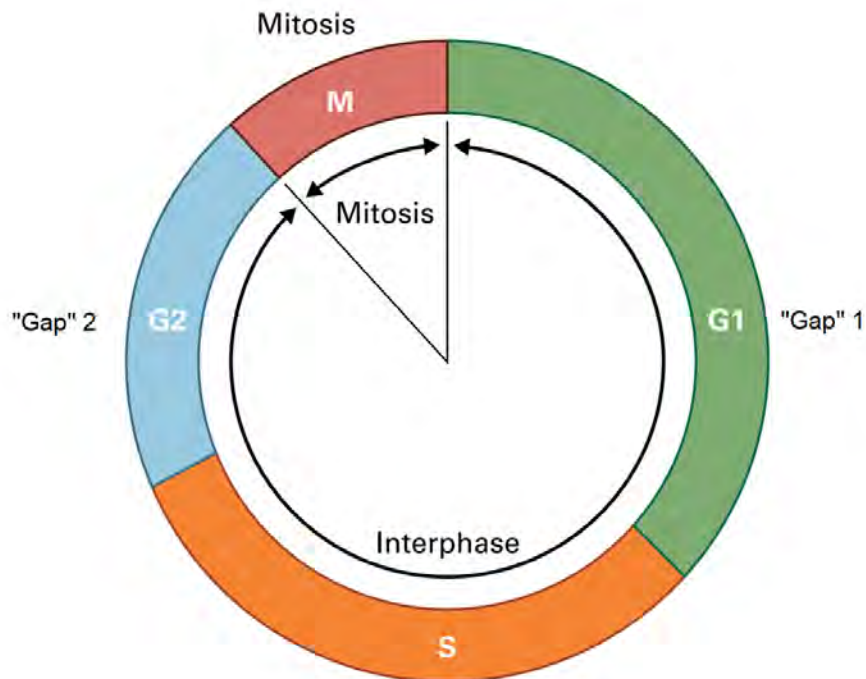


Figura 1. Fases del ciclo celular. La investigación microscópica del ciclo celular reveló dos diferentes estados: mitosis, caracterizada por la condensación de los cromosomas y la división nuclear; e interfase, durante la cual los cromosomas parecen difusos y la célula no se divide. El descubrimiento de que la síntesis del DNA ocurre durante la interfase llevó a la identificación de las cuatro fases del ciclo celular: mitosis (M), síntesis (del DNA) (S), y dos fases “gap” (G1 y G2) que separan estos eventos (Modificado de Inzé y De Veylder, 2015).

Durante el ciclo celular se han identificado varios puntos de regulación o “checkpoints” importantes. El primero de ellos se encuentra en la transición G1/S, otro en G2/M y un tercero en la transición de metafase a anafase durante la mitosis. En cada “checkpoint” están involucradas proteínas conocidas como ciclinas, las que deben su nombre a sus fluctuaciones durante el ciclo celular y a que, asociadas a una unidad catalítica conocida como CDK (cinasa dependiente de ciclina), se encargan de regular las transiciones durante el ciclo celular. La actividad cinasa de diferentes complejos ciclina-CDK fosforila un gran número de sustratos en los puntos de control G1/S y G2/M, permitiendo con ello la replicación del DNA y la mitosis, respectivamente.

1.2. Proteínas que regulan la progresión del ciclo celular

1.2.1. CDKs

Las CDKs son una gran familia de proteínas cinasas de serinas y treoninas cuya actividad depende de una subunidad regulatoria (ciclina). Con base en la secuencia de aminoácidos que conforman su dominio cinasa, las CDKs se han clasificado en el grupo de cinasas CMGC (nombrado así por las iniciales de algunos de sus miembros); en este grupo también se agrupan las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), miembros de la familia de cinasas con especificidad dual reguladas por fosforilación en tirosina (DYRK) y las cinasas CDC-like (Manning *et al.*, 2002). En cinasas relacionadas, como las MAPKs, la especificidad por el sustrato es conferida por sitios de andamiaje separados del sitio catalítico, mientras que las CDKs se caracterizan por depender de subunidades separadas de la CDK (ciclinas), que proveen secuencias adicionales requeridas para la actividad enzimática (revisado en Malumbres, 2014). Adicionalmente, la ciclina discrimina entre distintas proteínas sustrato (revisado en Inzé y De Veylder, 2006), aunque estudios *in vitro* tanto en plantas como en animales sugieren que la CDK también podría participar en la discriminación de diferentes sustratos (Pan *et al.*, 1993; Harashima y Schnittger, 2012).

Aunque originalmente fueron identificadas como enzimas que controlan la progresión del ciclo celular, miembros de la familia de CDK también están involucrados en otros procesos celulares. En humanos, sólo 4 CDKs (CDK1, 2, 4 y 6) están involucradas directamente en el control del ciclo celular. Las CDKs 1 y 2 operan principalmente en las fases M y S, respectivamente; mientras que las CDKs 4 y 6 regulan la entrada al ciclo celular (revisado en Malumbres y Barbacid, 2001). En contraste, en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y en la de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, todos los eventos del ciclo celular están controlados por una sola CDK (Cdc2 y Cdc28, respectivamente), la cual es homóloga a la CDK1 de humanos (revisado en Morgan, 1997). Existe otra familia de miembros (CDK7) que contribuye indirectamente a la progresión del ciclo celular al actuar como cinasas activadoras de CDKs (CAKs, por sus siglas en inglés), cuya función específica se discutirá más adelante.

Las CDKs también son componentes de la maquinaria que controla la transcripción basal de genes mediante la regulación de la RNA pol II (CDKs 7, 8 y 9) y también están involucradas en el control de la diferenciación de las células nerviosas (CDK5) (revisado en Malumbres, 2014).

Las CDKs ejercen sus efectos en el ciclo celular por la fosforilación de un gran número de proteínas en la célula, particularmente en mitosis, cuando muchos aspectos de la arquitectura celular y el metabolismo son alterados. Como otras cinasas CMGC, las CDKs son proteínas cinasas de serinas y treoninas, en las que la fosforilación del residuo blanco está dirigida por una prolina con cierta preferencia por la secuencia [S/T*]PX[K/R] (las letras S/T* indican la serina o treonina blanco de fosforilación, la letra X representa cualquier aminoácido y las letras K/R representan los aminoácidos básicos lisina o arginina, respectivamente). La preferencia por la secuencia es consecuencia de la presencia de un “pocket” hidrofóbico cerca del sitio catalítico en el que se acomoda el residuo de prolina (posición +1) (Brown *et al.*, 1999b). Sin embargo, la presencia de un residuo básico en la posición +3 no es necesario para la CDK4 o las CDKs que participan en la transcripción, las cuales requieren una secuencia consenso menos estricta [S/T*]PX. Algunos miembros de otras familias, como la CDK7 o la CDK9, no dirigen su fosforilación necesariamente mediante una prolina, ya que éstas pueden fosforilar residuos en ausencia de una prolina en la posición +1 (revisado en Echaliier *et al.*, 2009).

Las CDKs tienen el mismo plegamiento que existe en otras proteínas cinasas eucariontes, que fue dilucidado por primera vez en la estructura cristalográfica de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Knighton, *et al.*, 1991). La estructura consiste de un lóbulo N-terminal rico en β -láminas, un lóbulo C-terminal grande rico en α -hélices y una hendidura formada entre los dos lóbulos que es el sitio de la catálisis y de unión del ATP. En la estructura monomérica de la CDK2, que ha sido una de las CDKs más estudiadas a nivel atómico, existen tres características que distinguen a su estructura de la dilucidada en otras cinasas canónicas. Existe una α -hélice (también presente en otras cinasas) que tiene una secuencia PSTAIRE (código de aminoácidos de una letra) que sólo es encontrada en CDKs. También posee un “loop” largo y flexible

(“loop”-T o “loop” de activación) que surge del lóbulo carboxilo-terminal para bloquear la unión de la proteína sustrato en la entrada del sitio activo. Por último, las cadenas laterales de varios aminoácidos importantes en el sitio activo no están posicionadas correctamente para permitir la transferencia del grupo fosfato del ATP al sustrato (**Fig. 2a**) (De Bondt *et al.*, 1993).

Cuando la ciclina A se une a un lado de la hendidura catalítica de la CDK2, interactúa con ambos lóbulos formando una interface proteína-proteína continua. Los contactos que hace la ciclina con la hélice PSTAIRE tienen un papel clave en la interface, lo cual explica porque las CDKs, y no las cinasas independientes de ciclina, tienen esta secuencia característica. Otros contactos también se establecen con el “loop”-T y partes de lóbulo N y C. La unión de la ciclina provoca cambios conformacionales en la cinasa que provocan su activación parcial: induce el movimiento de la hélice PSTAIRE hacia la hendidura catalítica rotándola 90° y provoca cambios en la estructura y posición del “loop”-T. El significado funcional de la hélice PSTAIRE recae en que en ésta se encuentra el residuo catalítico, Glu51, que está conservado en todas las proteínas cinasas eucariotas. Sin la ciclina, la cadena lateral del ácido glutámico se encuentra fuera de la hendidura catalítica; cuando la ciclina se une, el cambio en la hélice PSTAIRE lleva a la cadena lateral del ácido glutámico dentro de la hendidura, en la que, junto con un residuo de lisina, un residuo de ácido aspártico y un ión magnesio, coordina los átomos de fosfato del ATP y los orienta correctamente para la catálisis. Uno de los cambios más obvios en el “loop”-T ocurre en la hélice L12, que es cambiada a una β -lámina, la cual no ocluye más el sitio de unión para la proteína sustrato (**Fig. 2b**) (Jeffrey *et al.*, 1995).

Ha sido posible cristalizar otros complejos ciclina-CDK y se ha podido observar que la extensión de la interface ciclina-CDK varía en las estructuras de la CDK4, la CDK9 o la CDK de levadura Pho85. Por ejemplo, el área de interacción de la ciclina D con la CDK4 se limita al lóbulo N en la CDK, y diferente a lo que se observa en el complejo CycA-CDK2, la unión de ciclina D3 no impone una conformación activa en la CDK4, ya que la hendidura catalítica se mantiene inaccesible para el sustrato después de que la ciclina D interacciona con la CDK (revisado en Malumbres, 2014).

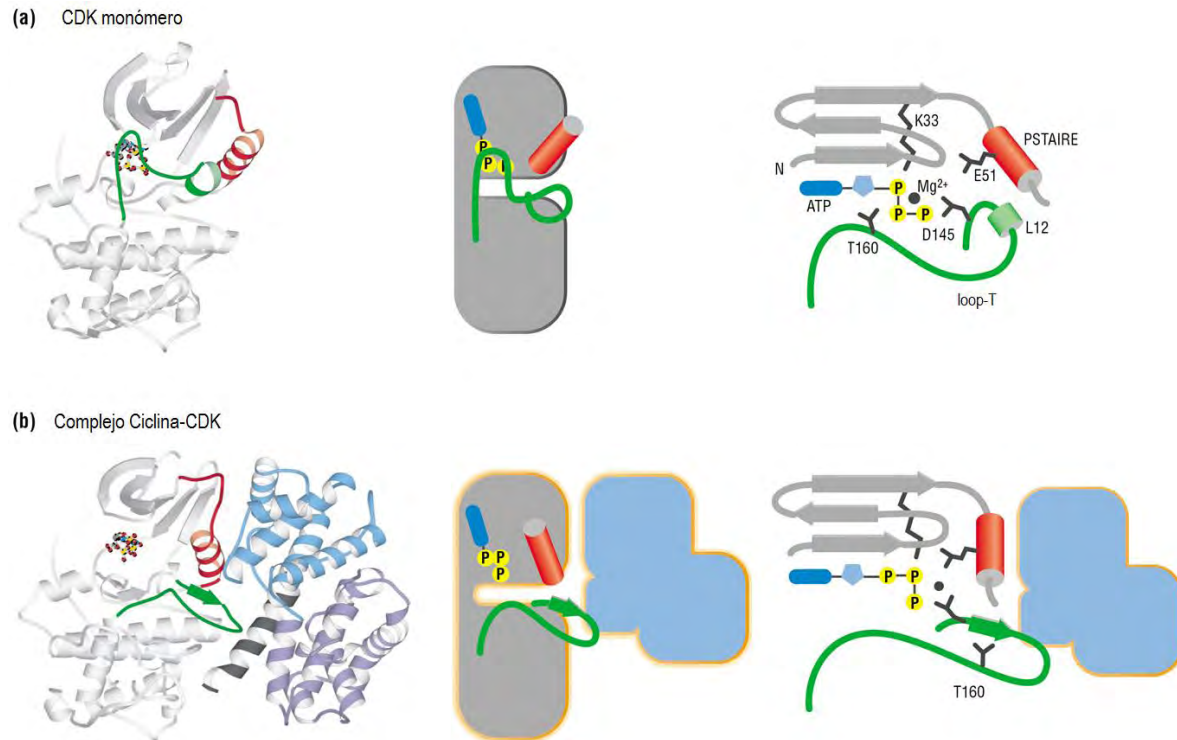
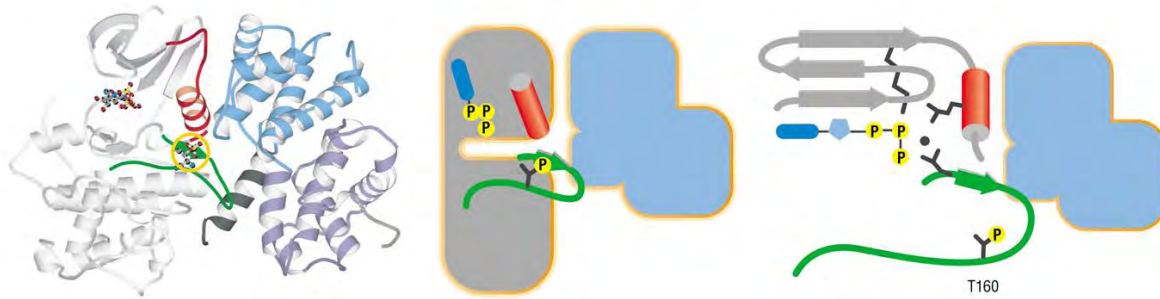


Figura 2. Cambios conformacionales en la CDK provocados por la unión de la ciclina. El diagrama ilustra la estructura de la CDK2 de humano en dos diferentes estados conformacionales. En cada caso la estructura completa es representada hacia la izquierda (PDB 1hck, 1fin). Mientras que hacia la derecha se provee una visión esquemática que enfatiza estructuras clave, incluyendo el ATP en el sitio activo, el “loop”-T (en verde) y la hélice PSTAIRE (en rojo). (a) En el monómero inactivo de CDK2 la hélice pequeña L12 al lado del “loop”-T empuja hacia afuera a la hélice PSTAIRE, la cual contiene al glutamato 51 (E51), un residuo importante en el posicionamiento de los fosfatos del ATP. El “loop”-T también bloquea la hendidura del sitio activo. (b) Cuando la ciclina A se une a la CDK2, la hélice PSTAIRE se mueve hacia el interior y la hélice L12 cambia su estructura para formar una lámina beta; en consecuencia, el residuo E51 se mueve hacia el interior para interactuar con la lisina 33 (K33), mientras el aspartato 145 (D145) también cambia su posición. Estos cambios permiten la orientación correcta de los fosfatos del ATP. El “loop”-T también es dirigido hacia afuera de la entrada del sitio activo (Modificado de Morgan, 2007).

Para el complejo CycB-CDK1, cuya estructura se ha resuelto recientemente, también se ha observado una interface más reducida que la observada para el complejo CycA-CDK2 y aunque en general el complejo CycB-CDK1- muestra una estructura más parecida al complejo CycA-CDK2- que al complejo CycD-CDK4, existen características que lo distinguen de sus homólogos más cercanos (Brown *et al.*, 2015).

(a) Complejo Ciclina-CDK + fosforilación en T160



(b) Complejo Ciclina-CDK + fosforilación en T160 + péptido sustrato

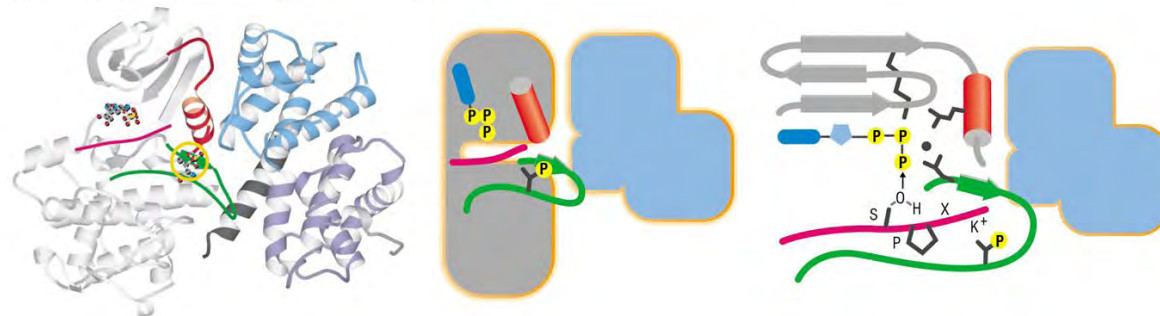


Figura 3. Efecto de la fosforilación en la T160 de la CDK en el complejo Ciclina-CDK. El diagrama ilustra la estructura del complejo CycA-CDK2 de humano cuando la T160 de la CDK2 es fosforilada. En cada caso, la estructura completa es representada en la columna izquierda (PDB 1jst, 1gy3), mientras las columnas derechas proveen una visión esquemática que enfatiza estructuras clave, incluyendo el ATP en el sitio activo, el “loop”-T (verde) y la hélice PSTAIRE (rojo). (a) La fosforilación de la T160 en el “loop”-T (círculo amarillo en la columna izquierda) provoca que el mismo sea empujado e interaccione de manera más extensa con la ciclina A; (b) La fosforilación en el “loop”-T permite que éste interaccione efectivamente con una proteína sustrato que contenga la secuencia consenso SPXK (en rosa). La prolina en la segunda posición de esta secuencia interacciona con la cadena principal del “loop”-T, mientras el residuo de lisina cargado positivamente en la cuarta posición (K^+) interacciona, en parte, con el fosfato cargado negativamente en la T160. El oxígeno del hidroxilo del residuo de serina (S) en el sustrato es posicionado para poder ser atacado por el fosfato gamma del ATP, lo cual es catalizado por las cadenas laterales de los aminoácidos en la región del sitio activo. (Modificado de Morgan, 2007).

La activación total de las CDKs requiere la asociación de una ciclina, la remoción de posibles fosforilaciones inhibitorias y la presencia de una fosforilación activadora; dicha fosforilación ocurre dentro del “loop”-T en un residuo conservado de treonina (T160 y T161 en la CDK2 de humano y CDC2, respectivamente). Este evento es catalizado por las ya mencionadas CAKs. Cuando la T160 es fosforilada, el fosfato queda

insertado en un “pocket” catiónico por debajo del “loop”-T y entonces actúa como el nodo central de una red de puentes de hidrógeno que se expande hacia afuera para estabilizar interacciones cercanas tanto en la ciclina como en la CDK. El “loop”-T es empujado y movido hacia la ciclina (**Fig. 3a**); esta región sirve como una parte clave para la unión de proteínas sustrato que contienen el sitio consenso de fosforilación para CDKs. Entonces, de manera general se puede observar que la fosforilación completa la reorganización del sitio de unión del sustrato que fue iniciada por la ciclina (Russo *et al.*, 1996). Aunque los complejos binarios que involucran a la CDK2 fosforilada en la T160 (pT160CDK2) comparten en general una organización similar alrededor de la región del sitio de fosforilación dentro del “loop”-T, la ciclina que acompaña a la CDK en cada complejo que ha sido cristalizado impone ligeras diferencias en las interacciones alrededor del residuo fosforilado (revisado en Echaliér *et al.*, 2009).

1.2.1.1. Cinasas Activadoras de CDKs (CAKs)

La subunidad catalítica (CAK) que se encarga de la fosforilación en la T160 de las CDKs, también pertenece a la familia de CDKs y tiene una preferencia por el sitio aceptor de fosforilación: TXXVVTL (en el que la primer treonina es fosforilada y en la que X indica la ausencia de conservación). En vertebrados, la proteína CDK7/ p40^{MO15} es la encargada de realizar dicha función, y la subunidad reguladora es la ciclina H (Fisher y Morgan, 1994; Labbé *et al.*, 1994; Mäkelä *et al.*, 1994). Por sí misma, la CDK7 tiene poca actividad como CAK; sin embargo, en presencia de ciclina H la actividad de la CDK7 es significativamente estimulada. La activación completa de la CDK7 requiere su fosforilación en el “loop”-T (T-170) (Fisher y Morgan, 1994; Poon *et al.*, 1994); sin embargo, diferente a otras CDKs, dicha fosforilación no es esencial para la actividad de la CAK ya que, en su ausencia, la unión al complejo de una proteína dedo de zinc RING, MAT1 (*ménage à trois* 1) es suficiente para la activación total del complejo CDK7/CycH (Fisher *et al.*, 1995).

Aparentemente, la actividad de la CAK no es regulada durante el ciclo celular, ya que ésta es constitutiva durante el ciclo celular somático. Reflejo de lo anterior es que la asociación y la presencia de las tres proteínas que forman el complejo es casi estequiométrica e invariable durante el ciclo (Tassan *et al.*, 1994).

Distinto a otras CDKs, la CAK exhibe una función más que consiste en controlar los niveles basales de transcripción. Esto lo realiza mediante la fosforilación del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA polimerasa II (RNAP II). El complejo trimérico existe como un componente intrínseco del factor general de la transcripción TFIIH, el cual participa en el despeje del promotor y en la progresión de la transcripción desde la fase de preiniciación hasta la fase de iniciación (revisado en Lolli y Johnson, 2005)

En la levadura de gemación *S. cerevisiae*, la activación de Cdc28 es controlada por la proteína Cak1. Esta proteína exhibe muy baja homología con la CDK7 y tiene la particularidad de fosforilar el “loop”-T de Cdc28 sin estar asociada a ninguna ciclina (Kaldis *et al.*, 1996). Algo que contrasta con las CAKs de otros organismos es que la Cak1p no es capaz de fosforilar el CTD de la RNAP II; aun así, la proteína es capaz de estimular de manera indirecta la transcripción ya que fosforila y activa a una segunda cinasa que está más relacionada a CDK7 (Kin28), y que se asocia con los homólogos de ciclina H y MAT1 (Cc11p y Rig2p/Tfb3p, respectivamente) para fosforilar el CTD de la RNAP II como parte del factor general de la transcripción TFIIH (revisado en Doonan y Kitsios, 2009).

Como se mencionó, la Cak1p no necesita la asociación de alguna ciclina ni tampoco ninguna modificación postraducciona para su activación total; incluso, la proteína eluye como monómero de una columna de filtración en gel en la que se han pasado extractos crudos de levadura (revisado en Kaldis *et al.*, 2000-2013). Un aspecto interesante de cómo se controla la actividad de Cdc28 en *S. cerevisiae* y que es diferente a lo que ocurre en otros organismos, consiste en el orden de activación, ya que en la mayoría de organismos la fosforilación de las diferentes CDKs requiere primero la asociación de una ciclina para que posteriormente la CDK7 o algún homólogo pueda activar totalmente a la CDK; sin embargo, en la levadura de gemación

la fosforilación de la CDK antecede a la unión de la ciclina y de hecho mediante estudios *in vitro* se ha determinado que la Cak1p fosforila más eficientemente la forma monomérica de Cdc28 que la versión en complejo con la ciclina. En contraste, la CDK7 tiene una mayor actividad hacia las CDKs que se encuentran en complejo con una ciclina, mientras que la fosforilación de las CDKs monoméricas es poco eficiente (revisado en Kaldis *et al.*, 2000-2013).

1.2.1.2. CAKs en plantas

La proteína R2 de arroz fue la primera CAK que se identificó en plantas; esta proteína está estructuralmente relacionada a la CDK7 (Hata, 1991) y posterior a su identificación se demostró que la proteína se asocia con ciclinas tipo H de plantas y que esta asociación estimula *in vitro* la actividad cinasa sobre la CDK2 de humano (Yamaguchi *et al.*, 2000). Además, inmunoprecipitados de la proteína R2 fueron capaces de fosforilar el CTD de la RNAP II (Yamaguchi *et al.*, 1998).

Posteriormente, en *Arabidopsis thaliana* se identificaron tres CAKs, proteínas que mostraron una alta homología con la CDK7 de humano y de manera similar a ésta, dos de las CAKs se asociaron con la ciclina H (de *A. thaliana*) para fosforilar en mayor o menor medida el CTD de la RNAP II o a CDK2. Actualmente conocidas como CDKs tipo D, sólo la CDKD3 en su forma monomérica fue capaz de fosforilar a la CDK2 y suprimir la mutación de *Cak1^{ts}* en células de *S. cerevisiae*; esta CAK mostró una mayor actividad para fosforilar a la CDK2, mientras que la CDKD2 tuvo mayor actividad sobre el CTD de la RNAP II; por otra parte, no se observó que la CDKD1 se pudiera asociar con la ciclina H, ni que fuera capaz de fosforilar el CTD de la RNAP II o a la CDK2 (Shimotohno *et al.*, 2003 y 2004).

A. thaliana posee una cuarta CAK (actualmente conocida como CDKF), que no mostró homología con ninguna CAK o CDK de algún otro organismo (exceptuando en el dominio cinasa). La CAK fue capaz de suprimir la mutación de *Cak1^{ts}* en levaduras y, de manera similar a la Cak1p, la actividad cinasa de la proteína no se estimuló por la presencia de ciclina H. La CDKF tuvo actividad sobre CDKD2; sin embargo, no pudo

fosforilar el CTD de la RNAP II (Umeda *et al.*, 1998; Shimotohno *et al.*, 2004). Además de ser activa como monómero y de no poder fosforilar el CTD de la RNAP II, la CDKF guarda otras similitudes con la Cak1p, por ejemplo: ambas son insensibles al inhibidor irreversible 5-fluorosulfonilbenzoiladenosina (FSBA, por sus siglas en inglés), el cual modifica una lisina conservada en la gran mayoría de las proteínas cinasas que es necesaria para posicionar el ATP (Hanks y Hunter, 1995); también, ambas proteínas fosforilan mejor a la CDK2 en su forma monomérica (Tsakraklides y Solomon, 2002).

Inicialmente se demostró que la CDKF de *A. thaliana* puede fosforilar a la CDK2 de humano y que plantas de *A. thaliana* deficientes en la CDKD1 o la CDKD3 crecen normalmente bajo condiciones control. Lo anterior, junto con el hecho de que la CDKF activaba a la CDK tipo A al ser coexpresada con ésta, llevó a postular que la CDKF era la cinasa principal que se encargaba de fosforilar el “loop”-T de las CDKs en *A. thaliana* (Shimotohno *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios genéticos y moleculares permitieron demostrar posteriormente que la CDKF controla principalmente la transcripción mediante la fosforilación de las CDKs tipo D, actuando como una cinasa activadora de CAKs (CAKAKs, por sus siglas en inglés) (Takatsuka *et al.*, 2009; Hajheidari *et al.*, 2012), similar a la función que tiene la Cak1p sobre Kin28p en *S. cerevisiae*. Por otra parte, se demostró que tanto la CDKD1 como la CDKD3 activan redundantemente a las CDKs que controlan el ciclo celular en *A. thaliana*, ya que plantas deficientes en dichas proteínas ven altamente comprometida la generación de granos sanos de polen, proceso para el que es indispensable la actividad de las CDKs tipo A y B (Takatsuka *et al.*, 2015).

1.2.2. CDKs en plantas: La CDKs tipo A y B

Todos los organismos eucariontes estudiados a la fecha poseen al menos una CDK con el motivo PSTAIRE (Dewitte y Murray, 2003). Diferentes variantes de este motivo son conocidas y las diferencias entre las variantes han sido usadas para clasificar a las CDKs en diferentes subgrupos. Para su clasificación en animales se ha adoptado la nomenclatura CDK, seguida de números que van del 1 al 20 (Malumbres *et al.*,

2009); por otra parte, en plantas, la ausencia de equivalentes directas (excepto entre CDK1 y CDKA), ha llevado a la adopción de un sufijo alfabético (Joubès *et al.*, 2000) que ha permitido la clasificación de las CDKs en plantas en CDKA a G y CKLs (Menges *et al.*, 2005).

La función de las CDKs ha sido marcadamente bien conservada durante la evolución y la naturaleza conservada del control del ciclo celular por las CDKs se refleja en el hecho de que una CDK de humano puede complementar una mutante de CDK en levadura (Lee y Nurse, 1987) a pesar de los 1000 a 1500 millones de años de divergencia evolutiva que existen entre estos dos organismos. Ésta y otras evidencias ilustran que la función de las CDKs, y por lo tanto el control del ciclo celular, ha permanecido fundamentalmente sin cambios por cientos de millones de años de evolución eucarionte.

Los primeros datos funcionales de las CDKs en plantas fueron revelados por la complementación de mutantes *cdc2/cdc28* de levadura con cDNAs de maíz, *A. thaliana* y alfalfa (Colasanti *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1991; Hirt *et al.*, 1991). La primera CDKA identificada fue inicialmente clonada en alfalfa; originalmente conocida como *cdc2Ms* (Hirt *et al.*, 1991), el gen fue capaz de complementar a una mutante de *cdc2* en levadura. Posteriormente, un segundo tipo de CDK se identificó en *A. thaliana* (*cdc2b*); actualmente se conoce como una de las CDKs tipo B de *A. thaliana*; sin embargo, ésta no complementó a las mutantes en *cdc2* de levadura (Imajuku *et al.*, 1992). Interesantemente, las CDKs tipo B de *O. tauri* y *C. reinhardtii* sí son capaces de complementar a la levadura *S. cerevisiae* mutante en *cdc28* (Corellou *et al.*, 2005, Čížková *et al.*, 2008).

En plantas, las CDKs tipo A son las únicas que conservan el motivo PSTAIRE encontrado en otras CDKs “universales” (*Cdc28* en *Saccharomyces cerevisiae*, *Cdc2* en *S. pombe* y CDK1 en animales). Mientras que en *A. thaliana* sólo existe un miembro de esta familia, la identificación de las CDKs tipo A en otras plantas ha permitido la clasificación de éstas en dos subtipos: CDKA1 y CDKA2 (Dudits *et al.*, 2007).

El mensajero de la *CDKA* se expresa más o menos constitutivamente con respecto al ciclo celular y a los tejidos de diferentes plantas (Martínez *et al.*, 1992; Magyar *et al.*, 1993; Menges y Murray, 2002; Sauter, 1997; Sorrell *et al.*, 2001). A nivel de proteína, el patrón de expresión constitutivo también se mantiene durante el ciclo celular y la actividad cinasa asociada a la *CDKA* es mayor durante la fase S y en la transición G2/M en células de tabaco y alfalfa; mientras que en células de trigo la actividad es mayor durante la transición G1/S (Magyar *et al.*, 1997; Boniotti y Gutierrez, 2001; Sorrell *et al.*, 2001; Porceddu *et al.*, 2001).

Las *CDKs* tipo B son el segundo grupo más grande de *CDKs* en plantas y son cinasas específicas de plantas que, junto con las *CDKs* tipo A, participan directamente en el control del ciclo celular. Existen dos subtipos: *CDKB1* y *CDKB2*, que contienen los motivos PPTALRE y PPTTLRE, respectivamente (Joubès *et al.*, 2000) y ambos subgrupos están representados por dos genes en *A. thaliana* (*CDKB1;1*, *CDKB1;2*, *CDKB2;1* y *CDKB2;2*).

La característica más destacable de los genes de la *CDKB* en *A. thaliana* es que sólo se expresan en células mitóticas: los genes de la *CDK* tipo B1 se expresan desde la fase S y tienen un pico en G2, mientras que los genes de la *CDK* tipo B2 se expresan más tarde durante la transición G2/M (Menges *et al.*, 2005). Un patrón de expresión muy similar para ambos subtipos de *CDKs* también se observa para células de alfalfa y tabaco, mientras que a nivel de proteína los picos máximos se observan en la transición G2/M y este comportamiento es similar al patrón de actividad cinasa (Magyar *et al.*, 1997; Sorrell *et al.*, 2001; Porceddu *et al.*, 2001).

1.2.2.1 *CDKs* tipo C y E

Las plantas poseen también *CDKs* tipo C y E; sin embargo, no es claro que tengan un papel directo en el control del ciclo celular. Las *CDKs* tipo C contienen un motivo PITAIRE o SPTAIRE e interaccionan con CycT, complejo que es capaz de estimular la transcripción mediante la fosforilación del CTD RNA polimerasa II (Barrôco *et al.*, 2003; Fülöp *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2007), sugiriendo un papel similar al del complejo

CycT-CDK9 en humanos. Estudios más recientes han demostrado que CDKC colocaliza con componentes del espliceosoma, indicando que CDKC podría conectar la transcripción con el aparato de “splicing” (Kitsios *et al.*, 2008).

Por otra parte, la CDKE tiene un motivo SPTAIRE y, similar a la CDKC, fosforila el CTD de la RNA polimerasa II (Wang y Chen, 2004). Esta CDK se asocia a ciclinas tipo D (Boruc *et al.*, 2010); sin embargo, no se ha demostrado que específicamente la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa sea mediada por su asociación a dichas ciclinas. Recientemente se ha reportado que la CDKC se puede asociar a ciclina C y, como su contraparte en humanos, CDK8, formar parte del complejo multiproteico “mediator” (Zhu *et al.*, 2014).

1.2.3. Ciclinas

Las ciclinas son proteínas que a pesar de las variaciones en su estructura primaria, se piensa que poseen una estructura terciaria similar, la cual posee dos dominios compactos formados por cinco α -hélices cada uno. El primer paquete de α -hélices corresponde a la caja de ciclina, que a nivel de aminoácidos es la región más conservada entre todas las ciclinas y además es la responsable de la interacción con las CDKs. El segundo paquete de α -hélices conserva la misma estructura terciaria que se observa en el primero, a pesar de la limitada similitud de secuencia entre los dos subdominios (revisado en Morgan, 2007).

El principio básico de la progresión del ciclo celular es que la síntesis y degradación regulada de las ciclinas proporciona ondas de actividad de CDK que impulsan las dos transiciones cruciales del ciclo celular: la entrada de la fase G1 a la fase S y de la fase G2 a la fase M. En levaduras y vertebrados, las ciclinas que controlan la transición G1/S (Cln1 y Cln2 en *S. cerevisiae*, ciclina E en vertebrados) aumentan tempranamente en G1 y caen en tiempos tardíos de la fase S. La función de estas ciclinas es llevar la progresión del ciclo hacia el punto de restricción (“START” en levaduras; pasado este punto las células pueden progresar a través de la fase S, independientemente de la presencia de mitógenos), punto en el que la célula se

compromete a replicar su DNA y completar un ciclo celular (revisado en Sherr y Roberts, 2004). El aumento de las ciclinas de la transición G1/S es acompañado por la aparición de las ciclinas de fase S (Clb5 y Clb6 en levaduras de gemación, ciclina A en vertebrados), éstas forman los complejos ciclinas de fase S-Cdks, los cuales son responsables de estimular la replicación del DNA (Coverley *et al.*, 2002). Los niveles de ciclinas de fase S permanecen altos durante las fases S, G₂ y mitosis temprana, periodo en el que ayudan a promover eventos mitóticos tempranos. Las ciclinas de fase M (Clb1, 2, 3 y 4 en levaduras de gemación, ciclina B en vertebrados) son las últimas en aparecer y sus concentraciones aumentan cuando el ciclo celular se aproxima a mitosis y presentan un pico de expresión durante metafase. Los complejos de ciclinas de fase M-Cdks son los responsables de los sorprendentes cambios celulares que llevan al ensamblaje del huso mitótico y al alineamiento de los pares de cromátidas hermanas en el huso durante metafase; su destrucción durante la anafase promueve la salida de mitosis y la citocinesis (revisado por Nigg, 2001). Las ciclinas de G₁, representadas por Cln3 en levaduras de gemación y ciclinas D en vertebrados, ayudan a coordinar el crecimiento celular con la entrada a un nuevo ciclo celular. Las ciclinas de G₁ se incrementan gradualmente en respuesta al crecimiento celular y a señales externas que regulan el crecimiento (revisado en Morgan, 2007).

Aunque inicialmente las ciclinas se nombraron así por el patrón de acumulación y degradación que se observó en una proteína de huevos de erizo de mar (revisado en Jackson, 2008), ahora se sabe que no todas las ciclinas siguen dicho patrón de acumulación y es por eso que actualmente una ciclina se define por la conservación de una caja de ciclina.

En metazoarios, al menos 16 clases de ciclinas han sido identificadas (nombradas como ciclina A a la L y O, T, Y y Fam58) aunque hasta el momento sólo las ciclinas tipo A, B, D, E, L y T se encuentran conservadas en todos los genomas de los animales analizados (Ma *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2014). En plantas, un gran número de ciclinas ha sido identificado y de acuerdo a su similitud con algunas ciclinas de animales, éstas se han clasificado como ciclinas tipo A, B, C, D, F, H, L, P, Q, T, U, Z, SDS y J18M. Las ciclinas tipo U y J18 sólo se han encontrado en *A. thaliana* y tomate, las ciclinas

tipo F y P sólo se han descrito en arroz y maíz, mientras que las ciclinas Q y Z sólo se reportaron en álamo (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

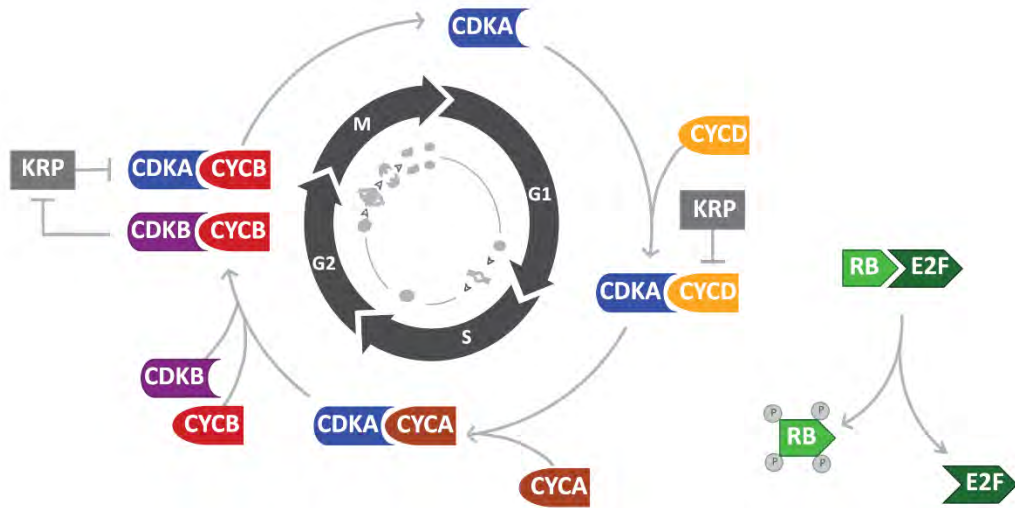


Figura 4. Panorama general del control del ciclo celular en plantas. La progresión de la fase G1 es iniciada por la fosforilación de la proteína RBR por la CDKA, la cual es activada por la unión de las ciclinas tipo D. Las proteínas relacionadas a Kip (KRPs, por sus siglas en inglés) son capaces de interactuar tanto con la ciclina D o la CDKA e inhibir la actividad cinasa asociada al complejo. Las ciclinas tipo A se asocian con CDKA durante la fase S y permiten la duplicación del DNA. Las CDKs tipo B específicas de mitosis junto con las ciclinas tipo B son necesarias para la mitosis, en este punto las KRPs que podrían encontrarse inhibiendo los complejos Cyc-CDK necesarios para la progresión hacia M, son inactivadas por su fosforilación permitiendo la progresión hacia la fase M (Scofield *et al.*, 2014).

Similar a lo que ocurre en animales, en las plantas no todas las ciclinas participan directamente en el control del ciclo celular, ya que sólo se ha demostrado la participación de las ciclinas A, B y D. De manera general, se piensa que las ciclinas D regulan la transición G1/S, las ciclinas tipo A controlan la transición de la fase S a la M y las ciclinas tipo B controlan tanto la progresión de S a M, así como el punto de control que existe en la mitosis (**Figura 4**), aunque se ha reportado un número de desviaciones a la asignación general del funcionamiento de las ciclinas. Por ejemplo: en alfalfa se ha demostrado que CycA2 contribuye a la especificidad de la actividad cinasa no sólo en la entrada a la fase S, sino también durante la transición de G2 a M y en contraste a lo observado en animales, existe evidencia que indica que algunas

ciclinas tipo D podrían participar también en la transición de la fase G2 a M (revisado en Inzé y De Veylder, 2006).

1.2.3.1. Ciclinas tipo D en plantas

En plantas, las ciclinas D están representadas por un grupo mucho mayor de genes en comparación a los únicos tres presentes en mamíferos. Todas las plantas superiores tienen 6 subgrupos conservados de genes de ciclinas D, nombrados como CYCD1-CYCD7 (los subgrupos CYCD2 y CYCD4 no se pueden distinguir en base a la homología de sus secuencias) (Menges *et al.*, 2007). Existen 10 genes en *A. thaliana*, mientras que otras plantas como maíz y arroz poseen 17 y 14 genes, respectivamente (La *et al.*, 2006; Buendía-Monreal *et al.*, 2011). Aunque la complejidad de las ciclinas en plantas puede atribuirse parcialmente a eventos de duplicación en su genoma (Panchy *et al.*, 2016), el gran número de ciclinas podría reflejar la alta plasticidad que poseen las plantas para poder responder rápidamente a señales intrínsecas durante su desarrollo, así como a factores ambientales. Como su contraparte en animales, algunos genes de ciclinas D han mostrado responder a factores de crecimiento, como hormonas (citocininas, auxinas, brasinoesteroides y giberelinas) y azúcares (revisado en Inzé y De Veylder, 2006).

Existe muy baja homología entre las ciclinas D en plantas y las presentes en animales, así que una relación entre ortólogos no puede ser establecida (Wang *et al.*, 2004), es por eso que cuando se identificaron las primeras ciclinas tipo D en *A. thaliana* y alfalfa por la complementación de mutantes de levadura deficientes en ciclinas de G1 (CLN) (Dahl *et al.*, 1995; Soni *et al.*, 1995), la mayor sorpresa fue encontrar que dichas ciclinas contenían, cerca de su región N-terminal, una secuencia LXCXE (en la que X es cualquier aminoácido) la cual había sido identificada previamente en ciclinas D de mamífero y era responsable de la interacción con la proteína de retinoblastoma (RB, por sus siglas en inglés). Experimentos *in vitro* utilizando a ciclinas D de plantas, posteriormente demostraron que este motivo también era necesario para la interacción

con la proteína relacionada a retinoblastoma (RBR, por sus siglas en inglés) (Ach *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 1998).

1.2.4. La vía RB-E2F y el control de la transición G1/S

En humanos, la proteína RB es miembro de una pequeña familia de proteínas que comparten un dominio “pocket”. Una de las principales funciones de las proteínas “pocket” es unir a una clase de factores de transcripción conocidos como E2F (Factor de unión al promotor E2 de adenovirus), los cuales, en asociación con un compañero de dimerización (DP, por sus siglas en inglés), unen al DNA para promover la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S. La unión de RB a E2F mediante su dominio “pocket” bloquea su actividad de activador transcripcional, por lo que la progresión hacia la fase S se encuentra bloqueada. La progresión hacia S requiere la activación de E2F, es decir, se necesita remover la interacción de RB con E2F. Lo anterior ocurre mediante la hiperfosforilación de la proteína RB por las CDKs de tipo 4 y 6 en asociación con ciclinas tipo D (en mamíferos). La actividad cinasa sobre RB en la fase G1 provoca que las células alcancen el punto de restricción, ya que la activación de E2F provoca la expresión de uno de sus blancos clave: la ciclina E; el aumento de los niveles de ciclina E conlleva un aumento en la fosforilación de RB y esto a su vez estimula la actividad de E2F, provocando un circuito de retroalimentación positiva que junto con la degradación de p27^{Kip1} (un inhibidor de los complejos Cyc-CDK que controlan la transición de G1 a S), obliga a que la célula se comprometa a duplicar su genoma para posteriormente dividirse (revisado en Scofield *et al.*, 2014; Harashima *et al.*, 2013).

El hallazgo de la proteína RB en mamíferos fue seguido por la identificación de la proteína relacionada en plantas: RBR. El hallazgo fue sorprendente ya que ésta no había sido encontrada en otros organismos, por lo que se había considerado que su presencia estaba limitada a mamíferos. En plantas surgieron tempranamente dos evidencias que sugirieron que la vía RB-E2F también regulaba la transición de la fase G1 a la fase S. La primera fue el hallazgo de la conservación de la caja LXCXE en las

ciclinas tipo D y la segunda fue la identificación de proteínas en geminivirus (virus de DNA que infectan plantas) que también contenían el motivo LXCXE, motivo que era necesario para la duplicación del DNA viral en las células infectadas. De manera análoga a lo que se había demostrado para proteínas virales en mamíferos que contenían el motivo LXCXE, se especulaba que en las plantas, las proteínas virales también unirían a una proteína homóloga a RB (hasta entonces no descrita), e inhibiría su actividad de represor transcripcional permitiendo la activación de E2F y consecuentemente de la maquinaria de replicación que permitiría la replicación del DNA viral (Xie *et al.*, 1995).

El cDNA que codifica para la proteína RBR fue aislado por primera vez en maíz y la proteína mostró una homología significativa con la proteína RB de humano, particularmente en una región del dominio “pocket” (Grafi *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996). Finalmente, los factores de transcripción E2F y sus compañeros de dimerización fueron identificados en diversas plantas y se demostró que su expresión se asociaba a células en proliferación, de manera particular a células que transitaban de la fase G1 a la fase S. Además, E2F fue capaz de interactuar con la proteína RBR (Ramírez-Parra *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 1999; Magyar *et al.*, 2000; Ramírez-Parra y Gutiérrez, 2000). El hallazgo de que en las plantas los principales actores que regulaban la transición de la fase G1 a la fase S se encontraban conservados, puso de manifiesto que el control de la transición G1/S sería regulado de forma más similar a como se había demostrado para mamíferos y no como se había descrito en levaduras, que fue el tipo de regulación que inicialmente se propuso para las plantas, debido a la similitud que se encontró entre las primeras ciclinas y CDKs descritas en plantas y su contraparte en levaduras.

Posteriormente se demostró más claramente, mediante ensayos genéticos y moleculares, que las principales características del control de la transición G1/S son muy similares entre plantas y otros eucariontes superiores. Por ejemplo, se demostró que complejos ciclinas-CDKs son capaces de fosforilar a la proteína RBR y que la hiperfosforilación de la proteína RBR está asociada a la fase S y a la transición G2/M (revisado en Dudits *et al.*, 2011); mientras que la forma hipofosforilada se encuentra

más representada en células en G1. Hirano *et al.* (2008) demostraron que la forma no fosforilada de la proteína AtRBR1 era capaz de unir a la proteína E2Fa, mientras que la forma hiperfosforilada fue incapaz de interaccionar con E2Fa. El papel directo de RBR en el control de la división celular se demostró con una mutante de tabaco en la que se silenció la expresión de *NtRBR1*. En la mutante se observó un fenotipo hiperproliferativo, así como la sobre-expresión de E2F y genes importantes para la fase S, como la ribonucleótido reductasa (*RNR*), el antígeno nuclear de proliferación celular (*PCNA*), la proteína de mantenimiento de mini cromosomas (*MCM*) y la proteína de activación del origen de replicación *CDC6* (Park *et al.*, 2005). Resultados muy similares se obtuvieron en *A. thaliana*, en la que, mediante la expresión inducible de la proteína RepA de geminivirus, se inactivó a la proteína AtRBR y se observaron zonas hiperproliferativas en algunos tejidos de la planta y la sobreexpresión de los genes: *PCNA*, *CDC6*, *CDT1*, *ORC2* y *ORC3* (Desvoyes *et al.*, 2006).

Experimentos más recientes, utilizando polen como sistema modelo, permitieron ensamblar en una red de regulación las proteínas que controlan la entrada a la fase S en *A. thaliana*. Esta red mostró similitudes interesantes, pero también diferencias respecto a las cascadas de señalización encontradas en animales y levaduras. Una característica conservada aparece en la regulación por una retroalimentación doblemente negativa entre el componente represor RBR y su inhibidor (en mamíferos la inactivación inicial por CycD-CDK4/CDK6 permite la expresión de CycE y CycA, que a su vez mejora fuertemente la inactivación inicial de RB). Sin embargo, los reguladores o su relativa importancia difieren en *A. thaliana*: RBR1 reprime a E2F, éste a su vez puede activar la transcripción de *FBL17* (una proteína F-BOX-LIKE que actúa como proteína adaptadora para permitir la ubiquitinación y posterior degradación de proteínas vía proteasoma), la cual a su vez es capaz de liberar la represión de CDKA mediante la degradación de las KRPs. Las KRPs son proteínas específicas de plantas que mediante la interacción con las CDKs y las ciclinas asociadas inhiben la actividad cinasa del complejo, de manera similar a como en animales lo hace una de las familias de inhibidores de CDKs (CKIs, por sus siglas en inglés): “proteína que interactúa con cdk/proteína inhibidora de cinasa” (CIP/KIP, por sus siglas en inglés) (revisado en Pavletich, 1999). Una vez suprimida la inhibición de la KRP, la CDKA puede fosforilar

a RBR1, presumiblemente inactivándola por completo. Entonces, más que liberar un factor positivo, como una ciclina, las plantas inactivan otro represor; no obstante, debido al conocimiento aún limitado sobre las ciclinas en plantas, no se puede excluir una vía que lleve a la activación transcripcional de las ciclinas por E2F en plantas (Zhao *et al.*, 2012). Interesantemente, las CDKs tipo B específicas de plantas son reguladas por el circuito de retroalimentación E2F-RBR1, por lo tanto, éstas podrían contribuir a incrementar la actividad cinasa en tipos celulares específicos (Harashima *et al.*, 2013).

1.2.5. El control de la transición G2/M

Al igual que la transición de la fase G1 a la fase S, la entrada a mitosis parece tener propiedades semejantes a un “switch”, ya que una vez que las células se comprometen al avance en la transición, no hay retorno. Sin embargo, a diferencia de la transición G1/S, en la que la forma en que se controla el “switch” parece estar más conservada entre organismos, la manera como se controla el “switch” de la transición hacia mitosis parece diferir; no obstante, el núcleo del “switch” parece ser el mismo en todas las células: la activación del complejo CDK1-Ciclina B.

Una combinación de técnicas de genética, biología celular y bioquímica llevaron a la identificación de la CDK1 como un regulador clave de la mitosis, el cual está conservado desde levaduras hasta humanos, y aunque usualmente las ciclinas tipo B son esenciales para la mitosis, una excepción existe en *Drosophila melanogaster*, en la que la ciclina tipo A es más importante (Knoblich y Lehner 1993; Jacobs *et al.* 1998). El complejo mitótico también puede unir a una pequeña proteína conocida como subunidad ciclina-cinasa (CKS, por sus siglas en inglés), esta proteína tiene un sitio de unión a catión que le permite unir residuos fosforilados de serinas y treoninas; en consecuencia, el complejo puede retener interacciones con sustratos fosforilados por complejos ciclina-CDK, lo que le permite al complejo CycB-CDK1 hiperfosforilar a sus sustratos aun en los sitios de menor afinidad. Lo anterior ha demostrado ser importante

en la activación de sustratos tales como Cdc25 y el complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C, por sus siglas en inglés) (revisado en Wieser y Pines, 2015).

La unión de la ciclina y la fosforilación por CAK pueden ser usadas para controlar la entrada a mitosis directamente si un umbral de actividad del complejo ciclina-CDK debe ser alcanzado, como ocurre en las levaduras de fisión (Coudreuse y Nurse, 2010). En otros sistemas, sin embargo, los complejos ciclina-CDK mitóticos se acumulan de forma inactiva mediante la fosforilación en un residuo conservado de tirosina (en algunos organismos también se fosforila el residuo de treonina adyacente) y la fosforilación de este residuo previene la transferencia del fosfato a un sustrato mediante dos mecanismos: uno de ellos disminuye la afinidad que tiene la CDK por el sustrato, mientras que el otro impide que la molécula de ATP se una correctamente a la CDK para que el γ -fosfato se pueda transferir al sustrato (Atherton-Fessler *et al.* 1993; Welburn *et al.*, 2007). Posteriormente el complejo puede ser rápidamente activado por la desfosforilación de los sitios inhibitorios, lo cual le permite a la célula avanzar hacia la mitosis.

La familia de cinasas Wee1/Mik1 se encarga de la fosforilación inhibitoria en el residuo de tirosina (posición 15) y se encuentra conservada en animales, levaduras y plantas; mientras que la proteína Myt1 que fosforila principalmente el residuo de treonina (posición 14) sólo está conservada en animales (Parker y Piwnica-Worms, 1992, Mueller *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 1997). Es importante destacar que con excepción de CDK7, todas las secuencias de aminoácidos en las CDKs de humano (CDK1-CDK8) contienen un residuo de tirosina fosforilable en la posición 15 equivalente a la de CDK1, aunque *in vivo* sólo se ha reportado la fosforilación en las CDKs 1, 2, 4 y 6 (revisado en Solomon y Kaldis, 1998). Por otra parte, la familia de fosfatasas CDC25 tiene una actividad dual sobre los residuos fosforilados inhibitoriamente y ésta se encuentra conservada tanto en animales como en levaduras, mientras que en plantas su conservación funcional no está del todo clara (Francis, 2011).

El “switch” que controla la progresión hacia mitosis en embriones de *Xenopus leavi* ha sido de los más estudiados. Inicialmente el complejo CycB-CDK1 fosforila a Wee1 en dos diferentes grupos de sitios de fosforilación. El primer grupo de sitios que son

fosforilados no afectan la actividad cinasa de Wee1, pero sirven para amortiguar al sistema, de manera que la actividad del complejo CycB-CDK1 debe alcanzar un umbral crítico antes de que éste pueda fosforilar al segundo grupo de sitios de fosforilación. La fosforilación de ambos grupos de sitios inhibe la actividad de Wee1, estableciendo un circuito de retroalimentación doblemente negativa, lo cual implica que entre más se reduce la actividad de Wee1, se permite que haya cada vez un mayor número de complejos CycB-CDK1 activos (Kim y Ferrell, 2007). De manera similar, un circuito de retroalimentación positiva se establece entre el complejo CycB-CDK1 y CDC25, ya que el complejo CycB-CDK1 fosforila y activa a CDC25, que a su vez desfosforila a CDK1 y estimula su actividad (Kumagai y Dunphy, 1992; Trunnell *et al.*, 2011). Juntos, los circuitos de retroalimentación aseguran que una vez que el complejo CycB-CDK1 alcanza un umbral de actividad, la activación se complete rápidamente. En otros organismos, sin embargo, el panorama es diferente: por ejemplo, en células de humano, Wee1 no parece ser inhibido por la fosforilación de complejos ciclinas-CDKs; en su lugar, la fosforilación sobre Wee1 es una señal para su degradación (Watanabe *et al.*, 1995).

1.2.5.1. Proteínas que controlan la transición G2/M en plantas

Como se mencionó anteriormente, debido a los picos de actividad cinasa tanto de la CDKA como de la CDKB, se tiene el consenso de que ambos tipos de CDKs participan en el control de la transición hacia la fase M en plantas. Sobre las ciclinas que son importantes para la transición, inicialmente se demostró que algunas ciclinas B de *A. thaliana*, maíz y tabaco pueden conducir la progresión hacia la fase M, ya que al inyectar su mensajero a ovocitos de *X. levis* que se encontraban arrestados en la transición G2/M, las ciclinas fueron capaces de inducir la maduración de los ovocitos (Hemerly *et al.*, 1992; Renaudin *et al.*, 1994; Qin *et al.*, 1996). La secuenciación de los genomas de diferentes plantas permitió identificar que existen 3 clases de ciclinas B en plantas: CycB1, CycB2 y CycB3. Los grupos CycB1 y CycB2 se encuentran conservados tanto en monocotiledóneas como en eudicotiledonias, mientras que

miembros del grupo CycB3 sólo se han encontrado en eudicotiledonias (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

Estudios de expresión de RNAs mensajeros en cultivos sincronizados de células de *A. thaliana* permitieron conocer que los niveles de transcrito de la gran mayoría de los miembros que conforman las 3 clases de ciclinas B tienen picos de expresión en la transición G2/M (Menges *et al.*, 2005). Cuando un miembro del subgrupo CycB1 de *A. thaliana* se expresó ectópicamente en tricomas de esta misma planta, promovió divisiones extras de los mismos. Los tricomas son células que normalmente duplican su DNA sin dividirse (endoreduplican su DNA), por lo tanto, la división inducida por la sobreexpresión indica que CycB1 es suficiente para promover la transición de la fase G2 a la M (Schnittger *et al.*, 2002). Por otra parte, en cultivos de células de tabaco que fueron transformados con una construcción inducible de *MsCycB2;2*, se observó que la inducción de la ciclina aceleró la entrada a mitosis (Weingartner *et al.*, 2003). Experimentos recientes en los que se estudió a la ciclina *ZmCycB2;2* durante el desarrollo del endospermo de maíz, el cual se caracteriza por tener dos fases: una de proliferación celular y una de endoreduplicación, permitieron observar que los niveles de proteína se mantienen constantes durante ambas fases, mientras que la actividad cinasa asociada a la ciclina disminuye drásticamente cuando el tejido comienza la fase endoreduplicativa (Sabelli *et al.*, 2014). Todo lo anterior es indicativo de que las ciclinas tipo B en plantas, como en metazoarios, son las responsables de promover la transición de la fase G2 a M. Es curioso que durante la fase endoreduplicativa del endospermo de maíz la ciclina B no se degrade, ya que previamente se ha demostrado para ciclinas B en otras plantas que éstas son degradadas hacia el final de la mitosis (Criqui *et al.*, 2000; Weingartner *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2003), además de que la degradación de la ciclina es necesaria para la segregación de los cromosomas y la citocinesis (Weingartner *et al.*, 2004).

1.2.5.1. Regulación de la transición G2/M: La proteína CDC25 en plantas

La forma en que se regulan los complejos ciclina-CDK que permitirá la progresión hacia la fase M en plantas, es algo que parece estar menos conservado respecto a metazoarios o levaduras, ya que a pesar de que existe una fosfatasa en plantas que es similar a CDC25 (CDC25-like), ésta carece de una región en el extremo N-terminal que es importante para su regulación (Landrieu *et al.*, 2004; Dissmeyer *et al.*, 2010). *In vitro*, la fosfatasa CDC25-like de *A. thaliana* fue capaz de estimular la actividad cinasa de complejos ciclina-CDK; sin embargo, ésta no fue capaz de complementar levaduras deficientes en CDC25 (Landrieu *et al.*, 2004). “Knock-outs” en CDC25 y sobreexpresantes del mismo gen en *A. thaliana* carecieron de algún fenotipo evidente bajo condiciones normales de crecimiento (Dissmeyer *et al.*, 2009; Spadafora *et al.*, 2011). Adicionalmente, las plantas sobreexpresantes que se sometieron a estrés replicativo por medio de un tratamiento con hidroximetilurea, fueron resistentes al tratamiento; mientras que las plantas “knock-out” resultaron hipersensibles. Por lo anterior, se sugirió que, al menos en *A. thaliana*, CDC25 no participa en regular la transición hacia la fase M como su contraparte en animales, sino más bien es uno de los componentes que interviene en el “checkpoint” de la replicación del DNA (Spadafora *et al.*, 2011).

Estudios en tabaco, sin embargo, apuntan a que CDC25 o una fosfatasa regulada por citocininas, podría tener alguna participación en regular la transición hacia la fase M, ya que cuando se sobreexpresó la proteína *cdc25* de levadura (*Spdc25*) en cultivos celulares de tabaco se observó una transición prematura hacia la fase M, y este comportamiento fue acompañado por una activación temprana de la CDKB1 (Orchard *et al.*, 2005). Similar a lo que se observa en levaduras cuando *cdc25* es sobreexpresada (Russell y Nurse, 1986), a pesar del acortamiento de la fase G2, no existe una menor duración del ciclo celular, ya que existe un efecto compensatorio y las células pasan un mayor tiempo en la fase G1.

De manera normal, los cultivos celulares de tabaco requieren la presencia de citocininas exógenas para avanzar hacia la fase M (revisado en Lipavská *et al.*, 2011). Interesantemente, las células de tabaco que sobreexpresan a *Spdc25* no requieren

la presencia de la hormona; por otra parte, las células que son tratadas con lobastatina (un inhibidor de la biosíntesis de citocininas) y sobreexpresan a Spcdc25 son capaces de avanzar a la fase M, mientras que las células que no sobreexpresan a la proteína permanecen detenidas en G2 (Orchard *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha observado que las células que sobreexpresan a Spcdc25 o que son tratadas con citocininas exhiben una menor fosforilación de la CDKA en la tirosina 15, lo cual coincide con mayores niveles de actividad. Todo lo anterior apunta a que, al menos en las células de tabaco, la transición de G2/M está controlada por las citocininas, que mediante la desfosforilación de las CDKs controlan la progresión hacia la fase M (Zhang *et al.*, 1996 y 2005). Lo anterior parecería estar en oposición a la evidencia obtenida en *A. thaliana* sobre cómo participaría CDC25 en el control de la transición G2/M; sin embargo, es probable que como ha sido sugerido anteriormente para *A. thaliana* y otras plantas: la proteína CDC25 en plantas se dividió en dos dominios: el CDC25-like, en el que quedó conferida la actividad fosfatasa, y otro dominio regulatorio similar al extremo amino de la proteína CDC25 en metazoarios, el cual sería necesario sobreexpresar junto con la proteína CDC25-like para observar algún fenotipo. Otra posibilidad es que exista otra fosfatasa diferente a CDC25 que cumpla redundantemente su función, ya que como se ha observado para otros puntos de control del ciclo celular, tanto en animales como en plantas existe cierto nivel de redundancia en las vías que regulan la progresión del ciclo.

1.2.5.1.2. Regulación de la transición G2/M: La proteína Wee1 en plantas

La otra fuerza que en animales, junto con la proteína CDC25, regula la progresión hacia la fase M es la proteína Wee1, que se encuentra más conservada en las plantas que la proteína CDC25-like, ya que por lo general la secuencia de aminoácidos de Wee1 en plantas tiene una mayor identidad con proteínas Wee1 de animales; además, la longitud es similar a la de otros homólogos y en *A. thaliana* la proteína conserva en su N-terminal algunos posibles sitios fosfoaceptores que son importantes para la regulación de la proteína (Dissmeyer *et al.*, 2010). A pesar de lo anterior, la proteína Wee1 de *A. thaliana* no es capaz de complementar mutantes condicionales de

levadura que han perdido toda la actividad cinasa asociada a Wee1; sin embargo, su sobreexpresión en el mismo sistema produce un fenotipo alargado (Sorrell *et al.*, 2002), mismo que es producido cuando la proteína Wee1 de humano o maíz se sobreexpresan en las levaduras (Igarashi *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1999); dicho fenotipo es indicativo de un arresto en G2.

Plantas de *A. thaliana* deficientes en la proteína Wee1 no muestran ningún fenotipo en su crecimiento o alguna alteración del ciclo celular, mientras que la sobreexpresión inducible de la proteína detiene el crecimiento de la raíz y las células arrestan su ciclo principalmente en G2 (De Schutter *et al.*, 2007). Lo anterior es indicativo de que en *A. thaliana*, bajo condiciones “normales” de crecimiento, el control de la progresión hacia la fase M no recae en la funcionalidad de la proteína Wee1, aunque cabe la posibilidad de que existan mecanismos redundantes que en la ausencia de Wee1 puedan asumir el control de la progresión.

Cuando plantas de *A. thaliana* fueron expuestas a agentes que provocan estrés replicativo (hidroxiurea o afidicolina) se observó una fuerte inducción de *Wee1*; dicha inducción fue acompañada de la fosforilación de un residuo de tirosina en la CDKA y la actividad asociada a dicha cinasa se disminuyó; además, se observó una disminución dramática del número de células en mitosis. Por otra parte, las plantas que carecían de *Wee1* fueron hipersensibles al estrés replicativo y se observó sólo un pequeño decremento en el número de células mitóticas; aunado a esto, no se observó la fosforilación de la CDKA en el residuo de tirosina, ni tampoco disminuyó su actividad cinasa. Lo anterior llevó a sugerir que las plantas deficientes en *Wee1* no pudieron activar el arresto en G2 y progresaron hacia mitosis con un genoma que no estaba totalmente duplicado (Schutter *et al.*, 2007); sin embargo, estudios posteriores evidenciaron que en condiciones de estrés replicativo las plantas silvestres acumulan a *Wee1* principalmente en la fase S, por lo que se sugiere que su función está circunscrita a dicha fase (Cools *et al.*, 2011).

En otros experimentos se demostró que para establecer el punto de control derivado del estrés replicativo, no es necesaria la fosforilación de los residuos de T14 y Y15 en la CDKA, que son los sitios que fosforila *Wee1* para inhibir la actividad de la cinasa, ya

que plantas mutantes de *A. thaliana*, en las que los residuos de T14 y Y15 de la CDKA fueron sustituidos por los residuos no fosforilables A14 y F15, no mostraron ningún fenotipo cuando se trataron con hidroxiaurea. Interesantemente, cuando las plantas mutantes se crecieron en condiciones normales, éstas tampoco presentaron fenotipo alguno. Dado que la evidencia experimental sugiere que en *A. thaliana* el principal blanco de Wee1 es la CDKA, los experimentos con las mutantes en CDKA y Wee1 llevaron a Dissmeyer *et al.* (2009) a proponer que Wee1 no es un regulador central del ciclo celular, sino más bien su función es actuar como una cinasa de punto de control. En tales condiciones, Wee1 podría fosforilar a la CDKA pero su función principal podría ser más como la de un inhibidor estequiométrico tipo CKI, es decir, unirse directamente a las CDKs e inhibir su actividad independientemente de su actividad cinasa (Dissmeyer *et al.*, 2009), mecanismo similar al observado en *S. cerevisiae*, en el que Swe1 (ortólogo de Wee1) inhibe a Cdc28p, independientemente de su fosforilación en los residuos equivalentes de T14 y Y15 (McMillan *et al.*, 1999).

Ya que en *A. thaliana*, ni la proteína CDC25-like ni la proteína Wee1 parecen ser indispensables para la progresión normal del ciclo celular, se ha sugerido, con base en evidencias experimentales, que la transición está controlada negativamente por las KRPs que se encontrarían inhibiendo a las CDKs necesarias para la progresión hacia la fase M. Posteriormente, para permitir la mitosis, las mismas CDKs (CDKs tipo A y/o B) u otras se encargarían de fosforilar a las KRPs para promover su degradación y permitir con esto la progresión del ciclo (Boudolf *et al.*, 2006; Dissmeyer *et al.*, 2009 y 2010; Ortiz-Gutiérrez *et al.*, 2015).

En otras plantas, sin embargo, el papel que podría estar jugando Wee1 sería distinto a lo que se ha reportado en *A. thaliana*. Hace casi dos décadas la secuencia parcial que codifica para la proteína Wee1 de maíz fue reportada; ésta se clonó y sobreexpresó en células de levaduras, en las que se observó el fenotipo alargado característico de un arresto en G2. La expresión del gen se asoció principalmente a células endoreduplicativas y mediante ensayos *in vitro* se demostró que la proteína recombinante era capaz de inhibir la actividad cinasa de CDKs de maíz (Sun *et al.*, 1999). Más recientemente, se estudiaron plantas de tomate en las que se silenció la

expresión de *Wee1* mediante la expresión de una secuencia antisentido y en los casos en los que se logró un mayor abatimiento del transcrito se observaron plantas y frutos más pequeños; a nivel molecular se determinó que los complejos ciclina-CDK recuperados de las plantas silenciadas tenían una mayor actividad de cinasa sobre histona H1. Lo anterior correlacionó con menores niveles de fosforilación en la Y15 de la CDKA. En los órganos analizados de las plantas silenciadas (cotiledones, hojas jóvenes y tallos) también se observaron células más pequeñas, mientras que en los frutos que también poseían algunas capas con células más pequeñas, los niveles de ploidía que se alcanzaron fueron mucho menores en comparación con las plantas control (Gonzalez *et al.*, 2007). Cuando la proteína *Wee1* de tomate se sobreexpresó en células BY-2 de tabaco, se observaron células más grandes debido a que éstas permanecieron más tiempo en G2. Lo anterior llevó a sugerir que el fenotipo de células más pequeñas observado en las plantas silenciadas podría ser una consecuencia de que las células estuvieron menor tiempo en G2 y entraron prematuramente a la mitosis (Gonzalez *et al.*, 2007). Los experimentos anteriores han llevado a sugerir que *Wee1* no sólo controla el tamaño de las células en los órganos de tomate, sino también podría estar controlando la expansión celular y el tamaño de los frutos mediante la endoreduplicación (Gonzalez *et al.*, 2007). Aunque poco es conocido sobre las bases moleculares que controlan el tamaño de las células, en levaduras de fisión se ha establecido que la cinasa *Wee1* tiene un claro papel en detener la entrada a mitosis hasta que las células alcanzan un tamaño crítico (Fantès y Nurse, 1977) y un papel similar ha sido propuesto para *Swe1* en las levaduras de gemación (Harvey y Kellog, 2003).

Dado que en tomate, bajo condiciones “normales de crecimiento”, *Wee1* estaría jugando un papel importante al menos en la endoreduplicación y la expansión celular, aunado a que en maíz se han observado niveles elevados del transcrito en células con altos niveles de endoreduplicación y esto no es similar a los estudios realizados en *A. thaliana*, entonces se ha sugerido que la función de *Wee1* es especie dependiente (Dissmeyer *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2007), por lo que se hace necesario profundizar más en el papel que jugaría la proteína *Wee1* en el control del ciclo celular.

Uno de los pocos trabajos que profundizó más en averiguar el papel que desempeña Wee1 en el control del ciclo celular, fue el realizado por Cook *et al.* (2013) en células de tabaco. En el trabajo se estudió la abundancia de la proteína Wee1, la cual tendió a disminuir cuando las células entraron a mitosis, por otra parte, la actividad cinasa asociada a Wee1 mostró un pico durante la fase S y fue menor durante la mitosis. En el mismo estudio también se demostró en cortes de raíz de *A. thaliana*, que la proteína Wee1 fusionada a GST desaparece totalmente sólo durante la metafase y que un tratamiento con MG132 (un inhibidor del proteasoma) estabiliza su presencia.

2. Antecedentes y planteamiento del proyecto

El grupo de investigación en el que se desarrolló la presente tesis se ha enfocado en estudiar el papel que desempeñan las proteínas que controlan el ciclo celular durante la primera ronda de divisiones celulares en ejes embrionarios de maíz, siendo la imbibición de los ejes en agua la señal que desencadena las divisiones. Desde una visión más molecular que fisiológica, en el grupo, a este proceso se le ha denominado “germinación” y sin lugar a duda, el establecimiento del ciclo celular en el embrión le permitirá a éste convertirse en una plántula (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Uno de los acercamientos que ha realizado el grupo para conocer el papel de las proteínas, ha sido observar los patrones de acumulación que siguen algunas CDKs y ciclinas (CDKs tipo A y B, Ciclinas tipo D y B), la asociación entre éstas y la actividad cinasa asociada a los complejos ciclina-CDK (Sánchez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008; Godínez *et al.*, 2013; Garza-Aguilar *et al.*, 2017). Inicialmente, el grupo se interesó principalmente en estudiar algunas proteínas que actúan canónicamente en la fase G1 del ciclo celular. Como se mencionó en la introducción, uno de los principales reguladores de esta fase son las ciclinas D, las cuales responden a factores mitogénicos como lo son algunas hormonas; en este contexto, algunos de los primeros análisis consistieron en estudiar cómo algunas hormonas afectaban los niveles proteicos de algunas ciclinas D y CDKs durante la “germinación” de ejes embrionarios de maíz. En dichas condiciones también se evaluó la actividad cinasa de complejos ciclina-CDK y se llegó a observar que existían incrementos en los niveles de actividad, a pesar de que los niveles de la CDK o de la ciclina se mantenían o disminuían. Este fue el caso de una CDK tipo A cuya abundancia disminuyó cuando los ejes se trataron con ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés); sin embargo, la actividad asociada a la CDK mostraba niveles altos de actividad cinasa, incluso mayores a los observados en los ejes control en los que los niveles proteicos de la CDKA eran mayores a los observados en los ejes embebidos con la hormona (Sánchez *et al.*, 2005). En otro estudio se observó que cuando en el medio de imbibición para los ejes se incluyó a la hormona benciladenina, existió una activación temprana de las CDKs asociadas a CycD5, ya que sólo en presencia de la hormona la actividad cinasa asociada a la ciclina

fue fuertemente estimulada durante las primeras horas de imbibición y el aumento en la actividad no fue atribuible a un aumento en los niveles de la CDK o la ciclina, ya que éstas mantuvieron, en mayor o menor medida, un patrón de acumulación similar, tanto en los ejes control como en los tratados con la hormona. Por lo tanto, se sugiere que podría existir una CAK que responda a la hormona y que active a las CDKs que se encuentran asociadas a la ciclina (Lara-Núñez *et al.*, 2008).

Existen pocos estudios en los que se ha intentado relacionar la presencia de una hormona con el estado de fosforilación y activación de las CDKs; sin embargo, un estudio realizado en plantas de trigo, aunque de manera indirecta, relacionó el estrés hídrico, que generalmente desencadena una respuesta mediada por un aumento en los niveles de la hormona ácido abscísico (revisado en Vishwakarma *et al.*, 2017), con un menor grado de fosforilación en la Y15 de la CDKA. Las plantas sometidas al estrés también mostraron una disminución en el nivel de actividad cinasa asociado a la CDKA (Schuppler *et al.*, 1998). Por otra parte, como se mencionó en la introducción, también se ha observado que existe una correlación entre un menor nivel de fosforilación en la Y15 de la CDKA y una mayor actividad de la cinasa en células de tabaco que son tratadas con citocininas (Zhang *et al.*, 1996 y 2005).

La posible modificación postraduccional de las CDKs por el tratamiento con hormonas también podría ser una respuesta desencadenada por la sacarosa, ya que cuando ésta se incluyó en el medio de imbibición para “germinar” ejes embrionarios de maíz, se observó un incremento de la actividad cinasa asociada a CycD3;1 sin que existiera un aumento de los niveles proteicos de al menos dos de las principales CDKs que controlan el ciclo celular: CDKA y CDKB1;1. Por lo tanto, una posible explicación es que en presencia de la sacarosa se favorezca la activación de las CDKs que se encuentran asociadas a las CycD3;1 (Garza-Aguilar *et al.*, 2017) y se podría especular que esta activación está mediada por una CAK.

La modificación de la actividad de las CDKs por su posible fosforilación podría no ser un efecto exclusivo de la imbibición con hormonas o azúcares, sino que *per se* podría ser uno de los mecanismos que controla la actividad cinasa de los complejos ciclina-CDK a lo largo de la progresión del ciclo celular durante la “germinación” de los ejes

embrionarios. En el grupo se describió el patrón proteico de la ciclina D2;2, así como su actividad cinasa asociada durante las primeras 24 horas de imbibición de ejes embrionarios de maíz. Se observó que los mayores niveles de la ciclina se presentan hacia las 6 horas de imbibición; sin embargo, el máximo de actividad se observa hacia las 15 horas, tiempo en el que la proteína ya es al menos la mitad del máximo observado (Gutiérrez *et al.*, 2005). Así que una mayor activación de las CDKs asociadas a CycD2;2 hacia las 15 horas podría explicar la discrepancia entre los niveles de proteína y la actividad observada.

Una evidencia clara de la importancia que tiene la fosforilación en las CDKs de maíz que se asocian a la CycD2;2 vino de experimentos en los que se inmunoprecipitó a la ciclina y posteriormente los inmunocomplejos se trataron con fosfatasa alcalina para eliminar cualquier fosforilación en la CDK; posteriormente se ensayó la actividad cinasa de los inmunoprecipitados y se comparó con la actividad de inmunoprecipitados que no fueron tratados con la fosfatasa. Se observó que los inmunocomplejos recuperados a diferentes tiempos de “germinación” habían perdido su actividad después del tratamiento con la fosfatasa. Además, este comportamiento también se observó en inmunoprecipitados que incluían a las ciclinas D4;2 y D5;3 (Godínez-Palma, 2015).

Ya que en ninguno de los casos estudiados en el grupo se ha demostrado que la fosforilación de la CDK es lo que está modificando la actividad de la CDK bajo las diferentes condiciones de “germinación” (imbibición en presencia de hormonas o azúcares), entonces en el presente trabajo se planteó, en parte, validar las herramientas que permitirían posteriormente identificar los estados de fosforilación de la CDKA1 de maíz. En animales, una de las principales herramientas que se han utilizado para identificar los estados de fosforilación de las CDKs han sido anticuerpos que se venden comercialmente y que se desarrollaron para reconocer las fosforilaciones en los residuos de T14, Y15 y T160 de la CDK2 de humano; estos anticuerpos también se han utilizado para reconocer la fosforilación de la T160 y la Y15 en la CDKA de algunas plantas (Harashima *et al.*, 2007; Harashima y Schnittger, 2012); sin embargo, para tener la certeza de que en el modelo de estudio en el se

quisieron identificar las fosforilaciones de las CDKs esto ocurría adecuadamente, fue necesario realizar una validación más sistemática que nos permitiera asegurar lo anterior. Aunado a esto, en el grupo de investigación en el se desarrolló el estudio presentado en esta tesis ya se ha intentado correlacionar el estado de fosforilación de algunas CDKs con su actividad cinasa durante la imbibición de los ejes embrionarios; sin embargo, aunque parece existir una correlación bien definida entre la fosforilación de la CDKA y su actividad durante la imbibición de los ejes, los resultados obtenidos para otras CDKs no parecen mostrar la misma correlación (Godínez-Palma, 2015).

Por otra parte, también fue necesario comprobar que la fosforilación de las CDKs de maíz por una CAK realmente se correlacione con un mayor nivel de actividad, y que, de manera similar la fosforilación por Wee1 inhiba la actividad de la CDK, ya que esto podría no ser necesariamente cierto. En humanos, por ejemplo, se ha reportado que la fosforilación de la CDK5 en la posición equivalente a la Y15 de la CDK2, provoca su activación (Zukerberg *et al.*, 2000); por lo tanto, fue pertinente comprobar que cada fosforilación correspondiera con los estados de activación que clásicamente se han reportado.

Un argumento a favor de que en maíz la actividad se regula de forma similar a sus homólogos de plantas y animales, es la conservación de los residuos blanco de fosforilación de las CAKs y de Wee1; por otra parte, también la conservación de los residuos alelaños podría implicar que los anticuerpos comerciales reconocerán adecuadamente las fosforilaciones en las CDKs de maíz (Ver **Apéndice, Fig. A1**).

Una metodología que posiblemente es la mejor opción para obtener CDKs fosforiladas, que se pueden utilizar posteriormente para evaluar su actividad cinasa, así como para realizar la validación de los anticuerpos que reconocen las fosforilaciones en la CDK, es la coexpresión robusta desarrollada por Harashima y Schnitgger (2012). La metodología retoma estudios realizados con la Cak1p en los que se demostró que la proteína podía fosforilar y activar a CDKs de humano.

En el sistema de coexpresión robusta, la coexpresión y purificación de las proteínas recombinantes (la CDK, la ciclina y la Cak1p) se realizó a partir de bacterias de *E. coli*.

Lo anterior fue posible mediante la cotransformación de las bacterias con dos plásmidos que contenían orígenes de replicación diferentes y compatibles (CloDF13 y Col1); además, cada plásmido confería diferente resistencia a antibióticos, lo que permitió una fácil selección de las células que contenían ambos vectores. Uno de los plásmidos (pCDFDuet-1) poseía dos sitios múltiples de clonación, (MCS, por sus siglas en inglés) lo que permitió la clonación de dos marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) en un solo vector (la CDK y la Cak1); mientras que en otro vector (pHMGWA) se clonó el tercer componente necesario para reconstituir la actividad de la CDK (la ciclina). Es así que cuando en la bacteria los tres componentes se coexpresaron, se observó la máxima actividad de los complejos ciclina-CDK y además se identificó la fosforilación de la CDK en la T160 por un anticuerpo comercial contra una CDK de humano fosforilada en la posición equivalente (Harashima y Schnitgger, 2012).

En este trabajo experimental se utilizó el sistema de coexpresión robusta para obtener a la CDKA1 de maíz fosforilada en diferentes posiciones. Lo anterior sirvió para validar que los anticuerpos comerciales diseñados para reconocer las diferentes fosforilaciones en la CDK2 de humano (pT14, pY15 y pT160) reconocieran correctamente las fosforilaciones en la CDK de maíz. Además, se aprovechó el sistema de coexpresión para explorar los mecanismos que podría seguir la CDKA de maíz para su activación.

Por otra parte, cuando en el sistema de coexpresión robusta, en vez de la Cak1p se coexpresó a la proteína Wee1 de *A. thaliana*, se identificó la fosforilación de la CDK en la Y15 con un anticuerpo comercial (Harashima y Schnitgger, 2012); sin embargo, no se demostró que el resultado de la fosforilación fuese la inhibición de la actividad cinasa del complejo ciclina-CDK. Por tal motivo, en este trabajo también se evaluó que la reconstitución del sistema con los componentes que debieran causar la inhibición de la actividad, efectivamente provocaran esto.

3. Hipótesis

La coexpresión del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* con la Cak1p de *S. cerevisiae* influirá positivamente en su actividad cinasa, mientras que la fosforilación de *ZmCDKA1* mediada por la proteína *ZmWee1* inhibirá su actividad cinasa.

4. Objetivo General

Evaluar el efecto en la actividad cinasa del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* cuando éste es fosforilado por las cinasas Cak1 y/o *ZmWee1*.

4.1. Objetivos particulares

- Clonar a *ZmWee1*.
- Estudiar, *in vitro*, la asociación entre *ZmCDKA1* y *ZmCycD2;2a*.
- Evaluar, mediante la coexpresión robusta, la asociación del complejo *ZmCDKA1-ZmCycD2;2a* a las cinasas *ZmWee1* y Cak1p.
- Estudiar cómo se modifica la fosforilación de *ZmCDKA1* por su coexpresión con *ZmWee1* y Cak1p.
- Estudiar cómo se modifica la actividad cinasa del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* por su coexpresión con la Cak1p.
- Evaluar cómo la proteína *ZmWee1* modifica la actividad cinasa del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1*.

5. Resultados

5.1.1 Clonación de *ZmCDKA1*, *ZmCycD2;2a* y *Cak1*

Para realizar la coexpresión de la CDK, la ciclina y la Cak1p en bacterias fue necesario realizar la clonación de las secuencias que codifican para dichas proteínas en diferentes vectores. Diferente a lo realizado por Harashima y Schnitgger (2012), en este trabajo, además de clonar individualmente tanto a la secuencia que codifica para la ciclina como a la secuencia que codifica para la CDK, se clonó la secuencia que codifica para ambas proteínas en el vector pCDFDuet1, mientras que la secuencia que codifica para la cinasa (Cak1p o *ZmWee1*) se clonó en el vector pDEST15.

El primer paso para la clonación de *ZmCDKA1* en pCDFDuet-1 fue la subclonación de la secuencia codificante en el vector pGEMT-Easy (ver **Apéndice, Esquema A1**), ya que la secuencia se encontraba en el vector pPROEX-HT. La clonación a pGEMT-Easy se verificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y también por la digestión del plásmido con una enzima de restricción. Tanto por la PCR como por la restricción se verificó la correcta amplificación y escisión de *ZmCDKA1*, respectivamente (ver **Apéndice, Fig. A2**). Uno de los plásmidos se envió a secuenciar y se verificó la correcta clonación de *ZmCDKA1* en pGEMT-Easy.

Previo a la subclonación de *ZmCDKA1* en el MCS1 de pCDFDuet-1 (ver **Apéndice, Esquemas A2 y A3**), se verificó la identidad del vector mediante su secuenciación. Lo anterior debido a que el vector provino de una donación. Posteriormente, se subclonó a *ZmCDKA1* en pCDFDuet-1 y mediante la PCR se verificó su clonación: primero se realizó un “screening” en las colonias que crecieron después de ser transformadas con el producto de la ligación entre *ZmCDKA1* y pCDFDuet-1 (ver **Apéndice, Fig. A3, a**), luego se obtuvo plásmido de tres de las colonias probadas y se realizó otra PCR con una combinación de cebadores que permitió asegurar la correcta clonación de *ZmCDKA1* en pCDFDuet-1 (ver **Apéndice, Fig. A3, a**).

La secuencia que codifica para *ZmCycD2;2a* también se clonó inicialmente en el vector pGEMT-Easy; sin embargo, previo a esto la secuencia se fusionó por su extremo 3' a la secuencia que codifica para la MBP (*malE*), para que la proteína recombinante tuviera en su extremo carboxilo un "tag" que aumentara su solubilidad. Para la fusión se utilizó la técnica de fusión de genes por la PCR (ver **Apéndice, Esquema A7**) (Szewczyk *et al.*, 2006), por lo que primero se amplificó cada secuencia de manera individual (ver **Apéndice, Fig. A4, a y b**). Para la fusión y amplificación de las secuencias, se evaluó la presencia de 3% de dimetilsulfóxido (DMSO) en las reacciones, así como el efecto de usar los cebadores desde el inicio de la reacción o 10 ciclos después de iniciada ésta. Tanto la adición de DMSO como el uso de los cebadores, 10 ciclos después de iniciada la PCR, favorecieron la fusión y/o amplificación de las secuencias codificantes (ver **Apéndice, Fig. A4, c**). Dichas condiciones se utilizaron para amplificar a la secuencia fusionada y posteriormente ésta se clonó en el vector pGEMT-Easy. La clonación se confirmó por la PCR (Ver **Apéndice, Fig. A5**) y tres plásmidos que fueron positivos a la amplificación se enviaron a secuenciar para verificar la correcta fusión de las secuencias.

En dos de los tres vectores secuenciados la fusión se realizó correctamente (resultado no mostrado), así que la secuencia *ZmCycD2;2a-malE* de una de estas construcciones se subclonó al MCS2 del vector pCDFDuet-1. Luego mediante la PCR se realizó el "screening" para identificar a las colonias que contenían al vector de expresión con el inserto clonado (ver **Apéndice, Fig. A6, a**). A partir de tres colonias en las que se amplificó a *ZmCycD2;2a-malE* se obtuvo plásmido y el mismo se utilizó para realizar una doble restricción que confirmó la clonación del inserto en pCDFDuet-1 (ver **Apéndice, Fig. A6, b**).

A continuación, se obtuvo el vector de expresión que contenía clonada tanto a la ciclina como a la CDK. Para ello, la secuencia *ZmCycD2;2a-malE* se subclonó de la construcción pGEMT-Easy**ZmCycD2;2a-malE* a la construcción pCDFDuet-1**ZmCDKA1*. El "screening" de las colonias que contenían el plásmido de expresión con la secuencias *ZmCycD2;2a-malE* se realizó por una PCR y todas las colonias probadas fueron positivas a la amplificación (ver **Apéndice, Fig. A7, a**). Se obtuvo

plásmido de tres de las colonias probadas y se realizó una doble restricción que confirmó la subclonación de *ZmCycD2;2a-malE* en pCDFDuet-1**ZmCDKA1* (ver **Apéndice, Figura A7, b**).

La clonación de la *Cak1* en el vector de entrada (pENTR) se realizó a partir de la construcción pCDFDuet-1**AtCDKA*GST-Cak1* (Harashima y Schnittger, 2012). La construcción provino de una donación y debido a que no se conocía qué porción de *Cak1* se encontraba clonada, antes de iniciar la subclonación se realizó la secuenciación de la secuencia codificante que se encontraba clonada en el MCS2 de la construcción mencionada al inicio. Toda la secuencia codificante para la *Cak1p* se encontró clonada, así que se diseñaron cebadores para la subclonación de *Cak1* a pENTR. La secuencia se amplificó y ligó al vector, y con el producto de la reacción se transformaron bacterias de *E. coli*.

Mediante una PCR se realizó el “screening” para identificar algunas colonias que tuvieran la secuencia ligada a pENTR (ver **Apéndice, Fig. A8**) y de dos de las colonias positivas se obtuvo plásmido para su secuenciación. La secuencia se encontró clonada correctamente, así que se realizó la recombinación entre pENTR**Cak1* y pDEST15; luego, con el producto de la reacción se transformaron bacterias y posteriormente por la PCR se verificó que algunas colonias tuvieran la secuencia codificante recombinada en el vector de expresión; además, en las mismas colonias se comprobó la pérdida de la resistencia a cloranfenicol.

En cuatro de las cinco colonias se confirmó la recombinación de *Cak1* (ver **Apéndice, Fig. A9, a**), dichas colonias fueron sensibles al antibiótico (resultado no mostrado), mientras que la colonia que no funcionó como templado para amplificar a *Cak1* conservó la resistencia al cloranfenicol. De tres colonias positivas al “screening” se obtuvo plásmido y éste se usó como templado para PCRs en las que, con una combinación de cebadores diferente a la utilizada para el “screening” inicial, se confirmó la recombinación de *Cak1* en pDEST15 (ver **Apéndice, Fig. A9, b**).

5.2.1 Caracterización de *ZmWEE1*

En los antecedentes se mencionó que existe un trabajo previo en el que se demostró que *ZmWee1* fusionada a GST actúa como inhibidor de la actividad cinasa de complejos ciclina-CDK (Sun *et al.*, 1999); sin embargo, en dicho estudio, sólo se empleó un fragmento de la proteína, por lo que se decidió clonar la secuencia que codifica para la proteína completa.

Se obtuvo la secuencia de *ZmWee1* mediante su búsqueda en la base de datos de Gramene (<http://www.gramene.org>). Se identificó un número de acceso (*Zm00001d053998*) con un “E-value” de 0; además, el gen asociado al número de acceso codifica (*in silico*) para una proteína de 538 aa que contiene un dominio cinasa que abarca casi la mitad de la proteína. Al alinear la secuencia obtenida en la base de datos con la reportada previamente (Sun *et al.*, 1999), se observó una identidad casi del 100% (alineamiento no mostrado). Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos que conforman a *ZmWee1*, con la secuencia de aminoácidos de *Wee1* de *A. thaliana* y de otras especies relacionadas a maíz. Se observó que en los primeros 100 aminoácidos del extremo amino existe la mayor variabilidad entre las diferentes especies, mientras que, hacia el extremo carboxilo, región en la que se encuentra el dominio cinasa, la identidad aumenta considerablemente (ver **Apéndice, Fig. A10**). Al realizar una matriz de identidad para conocer cuál era el porcentaje de identidad entre las proteínas alineadas, se observó que la mayor identidad ocurre entre las poáceas (*Sorghum*, *Setaria*, *Brachypodium* y *Oryza*), mientras que con *A. thaliana* la identidad fue menor (ver **Apéndice, Tabla A1**).

Se diseñaron cebadores para amplificar la secuencia que codifica para *ZmWee1* y posteriormente clonarla en el vector pENTR. Los cebadores se probaron en una PCR en la que el templado fue cDNA obtenido de ejes embrionarios embebidos por 0 ó 24 horas; sin embargo, no se observó amplificación. Se probaron rampas de temperatura para el alineamiento de los cebadores, así como la adición de agentes caotrópicos a la PCR y el uso de cDNA de otros tejidos sin obtener una amplificación exitosa.

En una base de datos de transcriptómica (Sekhon *et al.*, 2011) se encontró que el mensajero de *ZmWee1* está altamente expresado durante el desarrollo de la mazorca, así que se obtuvieron mazorcas sin polinizar (etapa R1), las cuales se diseccionaron para la obtención de cDNA. A partir de ejes embrionarios embebidos por 0, 12, 24 y 36 horas también se sintetizó nuevo cDNA y además se diseñó otro cebador “forward” (Fwd2 Wee1), el cual se aparearía 400 pares de bases río abajo de donde se encuentra el sitio de inicio de la traducción. Con el cDNA se realizaron PCRs utilizando tanto el primer par de cebadores diseñados, como el nuevo cebador “forward”, acompañado del cebador “reverse” previamente diseñado. La secuencia que codifica para la proteína completa solo no se amplificó a partir de los ejes extraídos de semilla seca (0 horas) y de los embebidos por 12 horas (carriles **5** y **6**, **Fig. 5a**), mientras que en el resto de tejidos se observó una amplificación en el tamaño esperado (1600 pares de bases). Para la amplificación parcial de *ZmWee1* se observó una banda muy cercana a 1200 pares de bases (tamaño esperado) y un patrón de amplificación muy similar al obtenido con el par de cebadores que amplificó a la secuencia que codifica para la proteína completa, aunque en este caso sí se observó la amplificación de *ZmWee1* a las 0 y 12 horas de imbibición (carriles **5** y **6**, **Fig. 5b**).

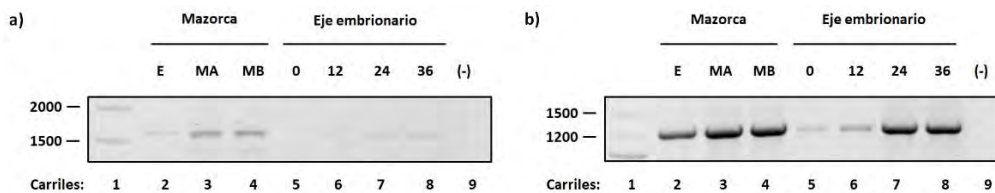


Figura 5. Niveles de mRNA de *ZmWee1* en mazorca y durante la imbibición de ejes embrionarios de maíz. **a)** Amplificación de *ZmWee1* utilizando el par de cebadores que amplifican a la secuencia que codifica para la proteína completa. En **1** el marcador de tamaño de DNA; en los carriles **2**, **3** y **4**, la amplificación del gen a partir de cDNA obtenido de estigmas (**E**), el extremo apical (**MA**) y el extremo basal (**MB**) de una mazorca en una etapa de desarrollo anterior a su fertilización (etapa R1); en los carriles **5**, **6**, **7** y **8**, la amplificación a partir de cDNA obtenido de ejes embrionarios embebidos por 0, 12, 24 y 36 horas; en el carril **9**, un control negativo de amplificación en el que no se agregó templado a la reacción. **b)** Amplificación parcial de *ZmWee1*. Para las amplificaciones se utilizó un cebador “forward” (Fwd2 Wee1) que se alinea 400 pares de bases río abajo del sitio de inicio de la traducción, mientras que el cebador “reverse” y el cDNA utilizado para las reacciones fue el mismo que en **a**.

Fue evidente que existió una menor amplificación de *ZmWee1* cuando se utilizaron los cebadores que amplifican a la secuencia que codifica para la proteína completa; una posible causa de esto podría ser un alto contenido de GC, por lo que se realizó un análisis del porcentaje de GC (<http://www.endmemo.com/>) que hay en las primeras 400 pares de bases de la secuencia que codifica para *ZmWee1*; dicho porcentaje fue del 72%. Más aun, cuando se analizaron sólo las primeras 100 pares de bases, el porcentaje de GC fue del 81%. Al realizar el análisis de la secuencia omitiendo las primeras 400 pares de bases, el porcentaje de GC fue del 48%. Es altamente probable que la diferencia en los niveles de amplificación observados al realizar la amplificación con los diferentes pares de cebadores, se debiera al elevado porcentaje de GC que existe al inicio de la secuencia codificante. Para comprobar dicha hipótesis se realizó la amplificación de la secuencia en presencia de DMSO al 3% y se utilizó una rampa de temperatura que iba de 53 a 63 °C.

Tanto la adición de DMSO como una mayor temperatura de alineamiento de los cebadores favorecieron la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína completa, mientras que cuando no se agregó DMSO no se observó amplificación (ver **Apéndice, Fig. A11**). Esto fue contrario al resultado en el que se observó la amplificación a partir del extremo apical de la mazorca sin la adición de DMSO (**Fig. 5**). Se realizó nuevamente la amplificación sin DMSO, utilizando cDNA obtenido de un par de tejidos en los que previamente se había tenido éxito en la amplificación y nuevamente no se logró la amplificación, mientras que en presencia de DMSO la amplificación seguía siendo positiva. Para descartar que lo amplificado en presencia de DMSO fuera un artefacto, el producto de dicho proceso se envió a secuenciar. Se consiguió secuenciar el 93% de la secuencia que codifica para la proteína completa y la identidad entre lo secuenciado y la secuencia putativa de *Wee1* en maíz (*Zm00001d053998*), obtenido de la base de datos de Gramene, fue del 97%.

En el alineamiento realizado para obtener la identidad de lo secuenciado se observó que había dos “gaps”: uno de 6 pares de bases en la secuencia putativa y otro de 24 pares de bases en el producto de la PCR (ver **Apéndice, Fig. A12**). Ambos eran múltiplos de 3 y estaban en marco, por tanto, no existió un rompimiento en el marco

de lectura. Se averiguó si la secuencia obtenida por la secuenciación del producto de la PCR era particular del maíz chalqueño, que es la variedad a partir de la cual se amplificó *ZmWee1*, para lo cual se realizaron búsquedas en diferentes bases de datos. La búsqueda a partir del NCBI con la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) arrojó que existen dos mensajeros (EU973733 y NM001348116), obtenidos a partir de evidencia experimental, que tienen una identidad casi del 100% con lo secuenciado a partir del producto de la PCR; mientras que una segunda búsqueda con la herramienta UniGene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) permitió obtener cinco marcadores de secuencias expresadas (ESTs) que alineaban en la región del “gap” de 24 pares de bases. Cuando se realizó un alineamiento de lo obtenido por la secuenciación, la secuencia de *ZmWee1* reportada en la base de datos de Gramene y las secuencias obtenidas a partir del NCBI, se observó que la secuencia reportada en Gramene era la única que tenía la inserción de 24 nucleótidos (ver **Apéndice, Fig. A12**). Se analizó la estructura del gen reportado en Gramene (exones e intrones) y se observó que los 24 nucleótidos adicionales correspondían a las últimas 24 pares de bases de lo que se reportó como el primer exón (análisis no mostrado), que para el resto de secuencias alineadas fueron los primeros 24 nucleótidos del primer intrón. Cabe mencionar que los ESTs utilizados se obtuvieron a partir de la mezcla de diversos tejidos (estigma, mazorca, polen, puntas del tallo, hojas, etc.) y condiciones de crecimiento (estrés salino, hídrico, osmótico, etc.); además, tres de los ESTs alineados correspondían a la variedad B73, a partir de la cual se construyó la base de datos de Gramene.

5.2.2 Clonación de *ZmWee1* en pDEST15

A partir del cDNA previamente obtenido del extremo basal de una mazorca se amplificó la secuencia que codifica para la proteína *ZmWee1* completa (*ZmWee1L*), así como la secuencia que codifica para la proteína *ZmWee1* parcial (*ZmWee1S*; 1200 pares de bases). Los productos de amplificación se purificaron y ambos se hicieron reaccionar independientemente con pENTR/D-TOPO. Se transformaron células competentes y posteriormente, por medio de una PCR, se monitorearon 5 colonias de cada

construcción. Se identificaron 3 colonias de cada construcción que contenían la secuencia que se deseaba clonar, se obtuvo plásmido a partir de las colonias y éstos sirvieron como templado para PCRs en las que, con los cebadores M13, se amplificó la secuencia insertada en el vector. El tamaño de amplificación esperado para las clonas que contenían la secuencia que codifica para la proteína parcial era de 1540 pares de bases (ver **Apéndice**, carriles **2-4**, **Fig. A13**), mientras que para las clonas que contenían la secuencia codificante para la proteína completa se esperaba un amplicón de 1900 pares de bases (ver **Apéndice**, carriles **5-7**, **Fig. A13**).

Se enviaron a secuenciar dos plásmidos de cada construcción para verificar que las secuencias se hubieran ligado correctamente a pENTR, y la secuenciación mostró que en ambas construcciones las secuencias habían sido correctamente clonadas y que estas, al ser traducidas *in silico*, tenían una identidad cercana al 100% comparado con la secuencia de aminoácidos de *ZmWee1* obtenida de Gramene (resultado no mostrado). Para la recombinación con pDEST15, se eligieron los plásmidos cuyas secuencias al ser traducidas *in silico* tuvieron una identidad a nivel de aminoácidos más cercana a la secuencia reportada en Gramene, y con el producto de la recombinación se transformaron células competentes. Posteriormente, colonias presuntamente transformadas con las construcciones pDEST15**ZmWee1S* y pDEST15**ZmWee1L*, respectivamente, fueron monitoreadas por la PCR. Por cada construcción se utilizaron cinco colonias, y para todas se observó la amplificación de las secuencias codificantes en el tamaño esperado: 1700 pares de bases para *ZmWee1L* (carriles **2-6**, **Fig. 6a**) y 1350 pares de bases para *ZmWee1S* (carriles **8-12**, **Fig. 6a**).

Se obtuvo plásmido de tres colonias de cada construcción, el cual sirvió como templado para PCRs, en las que se amplificó a *GST-ZmWee1L* y *GST-ZmWee1S*. Lo anterior para confirmar la recombinación de *ZmWee1* a pDEST15. Para todos los plásmidos probados se observó la amplificación de las secuencias codificantes en los tamaños esperados para cada construcción: 2550 pares de bases para *GST-ZmWee1L* (carriles **2-4**, **Fig. 6b**) y 2160 pares de bases para *GST-ZmWee1S* (carriles **5-7**, **Fig. 6b**).

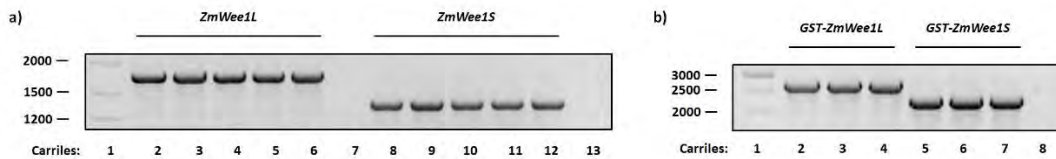


Figura 6. Subclonación de *ZmWee1L* y *ZmWee1S* a pDEST15. **a)** Amplificación de *ZmWee1L* y *ZmWee1S* a partir de colonias. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **6**, la amplificación de *ZmWee1L* por la PCR a partir de colonias que fueron transformadas con el producto de la recombinación entre los vectores pENTR**Wee1L* y pDEST15; como cebador “forward” se utilizó a FwdWee1. De **8** a **12**, la amplificación de *ZmWee1S* por la PCR a partir de colonias que fueron transformadas con el producto de la recombinación entre los vectores pENTR**Wee1S* y pDEST15; como cebador “forward” se utilizó a Fwd2Wee1. En los carriles **7** y **13** se muestran los controles negativos de amplificación que fueron utilizados para cada construcción, en las reacciones de estos controles no se adicionó templado. Para todas las amplificaciones se utilizó el mismo cebador “reverse”: T7 Terminador. **b)** Amplificación de *GST-ZmWee1L* y *GST-ZmWee1S* a partir de pDEST15**Wee1L* y pDEST15**Wee1S*. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **4**, la amplificación de *GST-ZmWee1L* a partir de plásmido extraído a cultivos provenientes de las colonias que se utilizaron para las amplificaciones de los carriles **3**, **4** y **5** mostradas en **a**; de **5** a **6**, la amplificación de *GST-ZmWee1S* a partir del plásmido extraído de cultivos provenientes de las colonias que se utilizaron para las amplificaciones de los carriles **8**, **9** y **12** mostradas en **a**; en **8**, un control de amplificación en el que se utilizó el vector pDEST15 sin recombinar. Para todas las amplificaciones mostradas en **b** se utilizaron los cebadores T7 (FwdT7 y T7 Terminador).

5.3.1 Interacción de *ZmCDKA1* con *ZmCycD2;2a*

En el grupo se ha estudiado la asociación *in vivo* entre proteínas CDKs y ciclinas durante la imbibición de ejes embrionarios de maíz (Lara-Núñez *et al.*, 2008 Godínez-Palma *et al.*, 2013; Garza-Aguilar *et al.*, 2017). Una de las interacciones que se demostró fue entre *ZmCDKA* y *ZmCYCD2;2a*; sin embargo, no se sabe si la sola presencia de estas proteínas es suficiente para la interacción, ya que ésta fue probada mediante ensayos de coimmunoprecipitación. Para demostrar que la sola presencia de las proteínas es suficiente para su interacción, se realizó la transformación de células Tuner con el vector pCDFDuet-1**ZmCDKA1***CycD2;2a*-MBP. Una vez transformadas las bacterias, se picó una de las colonias transformadas y se utilizó para la inducción de proteína recombinante. Tras verificar la sobreexpresión de ambas proteínas (His-*ZmCDKA1* y *ZmCycD2;2a*-MBP), se purificó a His-*ZmCDKA1* mediante una resina de

Ni-NTA agarosa y se analizó por duplicado, mediante una SDS-PAGE, cada una de las fracciones celulares y de purificación. Uno de los geles resultantes se tiñó con azul Coomassie (**Fig.7a**), mientras que, las proteínas en el otro gel se transfirieron a una membrana, y ésta se utilizó para detectar tanto a la CDK como a la ciclina con anticuerpos específicos (**Fig.7b**). En la **Fig. 7a** (carril 3) se observa la inducción tanto de la ciclina como de la CDK. Ambas proteínas se encontraron en la fracción soluble (**Fig. 7b**, carril 5) y al momento de realizar la purificación de la CDK, la ciclina también se copurificó (carriles 7,8 y 9, **Fig.7a** y **7b**).

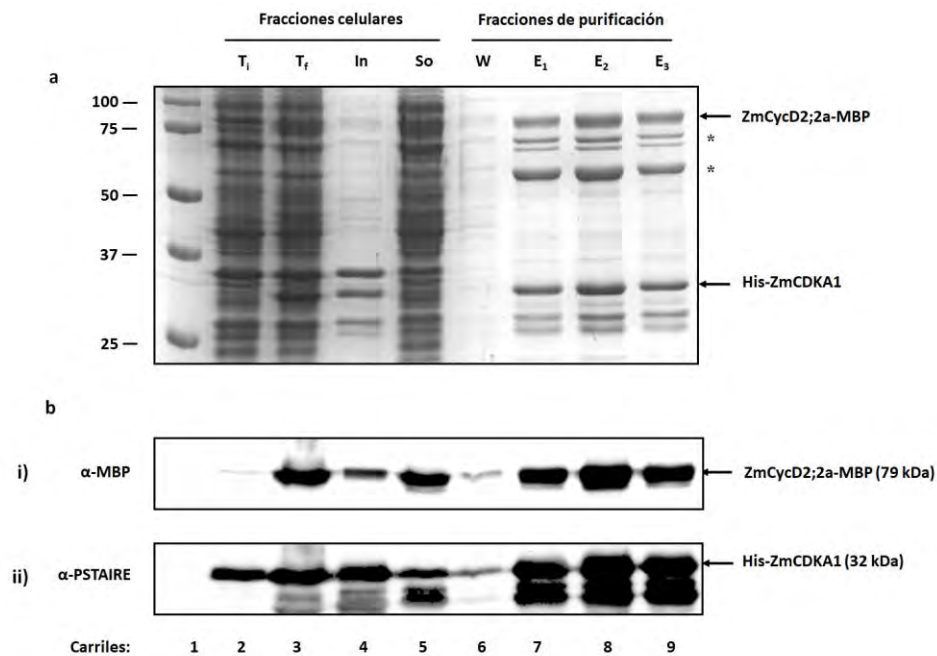


Figura 7. Copurificación de *ZmCycD2;2a-MBP* con *His-ZmCDKA1*. **a)** Análisis de las fracciones de purificación por SDS-PAGE. En 1, los estándares de masa molecular; en 2, el lisado de bacterias antes de iniciar la inducción; en 3, el lisado de bacterias después de 4 horas de inducción; en los carriles 4, 5 y 6, la fracción insoluble, soluble y de lavado, respectivamente; de 7 a 9, las fracciones del eluato (indicadas con un asterisco proteínas que copurificaron inespecíficamente). **b)** Inmunoblot de las fracciones de purificación. **i)** Identificación de *ZmCycD2;2a-MBP* en las mismas fracciones analizadas en **a** por medio de un anticuerpo comercial anti-MBP. **ii)** Identificación de *His-CDKA* por medio de un anticuerpo comercial anti-PSTAIRES en la misma membrana en la que se identificó a *ZmCycD2;2a-MBP*.

Existía la posibilidad de que la ciclina no estuviera interaccionando realmente con la CDK, y que su presencia en las fracciones del eluato se debiera a una interacción inespecífica con la columna de níquel. Para comprobar si esto estaba sucediendo, se

transformaron bacterias competentes (Tuner) con la construcción pCDFDuet-1* *CycD2;2a-MBP*, y después se realizó la inducción de la ciclina; el cultivo se fraccionó y la fracción soluble se pasó por la resina de níquel. Se analizaron las fracciones de purificación tanto por SDS-PAGE como por inmunoblot y no se observó que la proteína recombinante interaccionara con la columna (ver **Apéndice**, carriles **7, 8 y 9, Fig. A14**, paneles **a y b**), aun cuando la ciclina estaba en cantidades similares a cuando se observó su copurificación con la CDK.

Otra posibilidad era que la interacción que se observó entre la CDK y la ciclina hubiera sido mediada por el "tag" de MBP que tiene la ciclina, y no por las proteínas CDK y ciclina *per se*. Para descartar esta posibilidad, se realizó un experimento en el que se cotransformaron células Tuner con los plásmidos pCDFDuet-1**ZmCDKA1* y pMALc-5X. Posteriormente, se realizó la inducción de proteína recombinante a partir de una colonia transformada con ambos vectores y la fracción soluble se pasó por la resina de níquel. En las fracciones del eluato se obtuvo a la CDK; sin embargo, una pequeña fracción de MBP se detectó en el inmunoblot (no mostrado). Un inconveniente que surgió al realizar el experimento fue que la cantidad inducida de MBP a partir del vector pMAL fue excesivamente alta, mientras que la inducción de la CDK estuvo muy por debajo de la cantidad observada en la coexpresión con la ciclina. Es complicado regular la cantidad de proteína inducida a partir de cada vector, por esta razón se decidió realizar la inducción de cada proteína por separado. Para ello, se transformaron células Tuner con el vector pCDFDuet-1**ZmCDKA1*, mientras que otra alícuota de células competentes se transformó con el vector pMALc-5x. Después de la inducción, una octava parte de las bacterias que indujeron a la MBP se mezcló con una parte de las bacterias que indujeron a la CDK, las bacterias se lisaron y la fracción soluble se pasó por la columna de níquel. Las fracciones de purificación se analizaron por SDS-PAGE y por "Western Blot", y no se observó, ni en el gel de poliacrilamida ni en el inmunoblot, que la MBP copurificara con la CDK (ver **Apéndice**, carriles **7,8 y 9, Fig. A15**, paneles **a y b**).

5.3.2. Coexpresión del complejo *ZmCDKA1-ZmCycD2;2a* con *Cak1p*

El complejo ciclina-CDK se coexpresó con la cinasa activadora de CDKs de *S. cerevisiae*: *Cak1p*. Para esto se cotransformaron bacterias (Tuner) competentes con los plásmidos *pCDFDuet-1*ZmCDKA1*CycD2;2a-MBP* y *pDEST15*GST-Cak1*. Luego, se seleccionaron bacterias transformadas con ambas construcciones y se realizó la inducción y purificación de las proteínas recombinantes con la resina de Ni-NTA.

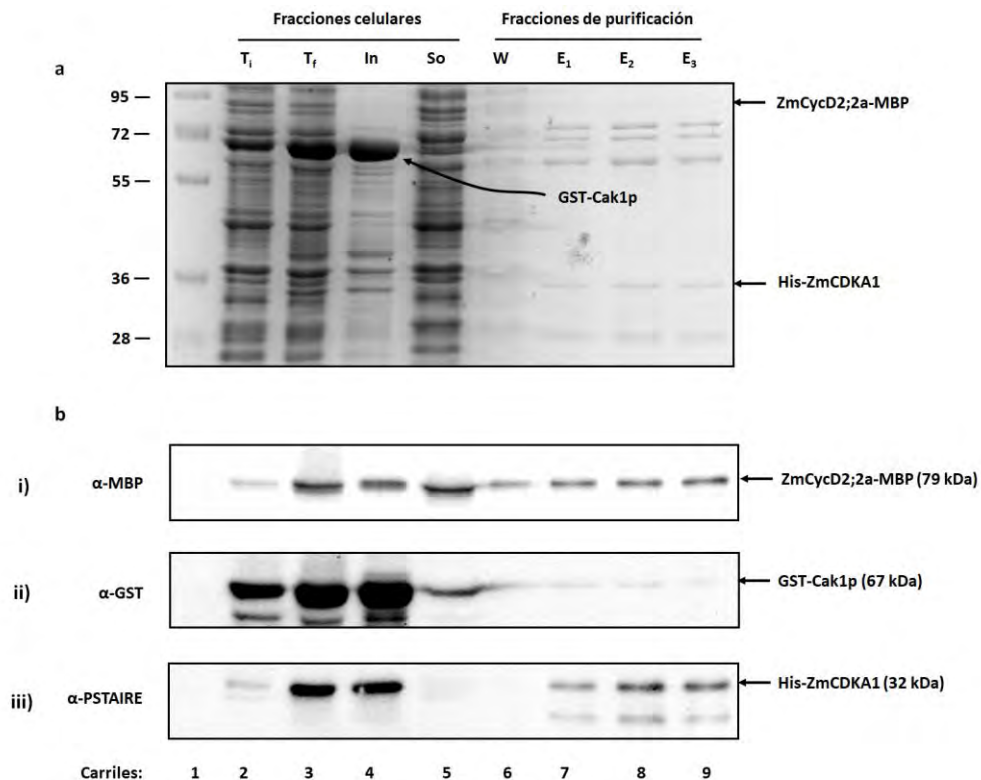


Figura 8. Copurificación de *ZmCycD2;2-MBP* y *GST-Cak1p* con *His-ZmCDKA1*. **a)** Análisis de las fracciones de purificación por SDS-PAGE. En **1**, los estándares de masa molecular; en **2**, el lisado de bacterias antes de iniciar la inducción; en **3**, el lisado de bacterias después de 4 horas de inducción; en los carriles **4**, **5** y **6**, la fracción insoluble, soluble y de lavado, respectivamente; de **7** a **9**, las fracciones del eluato. **b)** Inmunoblot de las fracciones de purificación. **i)** Identificación de *ZmCycD2;2a-MBP* en las mismas fracciones analizadas en **a** por medio de un anticuerpo comercial anti-MBP. **ii)** Identificación de *GST-Cak1p* por un anticuerpo comercial anti-GST en la misma membrana en que se realizó la detección de la ciclina. **iii)** Identificación de *His-ZmCDKA1* por un anticuerpo comercial anti PSTAIRES en la misma membrana en que se realizó la detección de la ciclina y la *Cak1p*.

En el gel de poliacrilamida se observó que los niveles de inducción de la ciclina y la CDK estuvieron muy por debajo de los niveles de inducción observados cuando sólo se realizó la coexpresión de la ciclina y la CDK. En contraste, se observó una gran inducción de GST-Cak1p (carril **3**, **Fig. 8a**).

En las fracciones del eluato que se monitorearon mediante el gel, se vio que la cantidad purificada de complejo Cyc-CDK fue baja (carriles **7**, **8** y **9**, **Fig. 8a**), aunque en el inmunoblot se apreció mejor su purificación (carriles **7**, **8** y **9**, **Fig. 8b**, paneles **i** y **iii**). También mediante el inmunoblot, pequeñas cantidades de GST-Cak1p se lograron detectar en las fracciones del eluato (carriles **7**, **8** y **9**, **Fig. 8b**, panel **ii**), lo que estaría indicando que existe interacción de la Cak1p con el complejo ciclina-CDK.

5.3.3. Coexpresión del complejo *ZmCDKA1-ZmCycD2;2a* con *ZmWee1*

Algunos complejos ciclina-CDK tienen una actividad de cinasa basal (Hagopian *et al.*, 2001), así que en este trabajo también se quiso evaluar el efecto de la coexpresión del complejo ciclina-CDK con la proteína *ZmWee1*, tanto a nivel de asociación como a nivel de la modificación de la actividad cinasa del complejo. Para evaluar el efecto en la asociación, se realizó la cotransformación de células Tuner con las construcciones pCDFDuet-1**ZmCDKA1***CycD2;2a-MBP* y pDEST15**ZmWee1L* y, posteriormente, se realizó la inducción a partir de una colonia transformada con ambas construcciones. Las células se lisaron y la fracción soluble se pasó por la resina de Ni-NTA. Luego, cada una de las fracciones de purificación se monitoreó por SDS-PAGE y por "western blot".

En el gel de poliacrilamida se observó la copurificación de GST-*ZmWee1* con His-CDKA (carriles **7**, **8** y **9**, **Fig. 9a**), aunque no se apreció la presencia de la ciclina. Sin embargo, cuando las fracciones se analizaron por "western blot" se observó que la ciclina sí se encontraba presente en los complejos purificados (carriles **7**, **8** y **9**, **Fig. 9b**, panel **ii**). Es importante notar que la cantidad de *ZmCycD2;2a-MBP* presente en la fracción soluble, comparada con la cantidad presente en la fracción insoluble, es mayor en la coexpresión del complejo ciclina-CDK con *ZmWee1* (carriles **4** y **5**, **Fig. 9b**, panel

ii) que la misma relación de proteína soluble-insoluble observada cuando la expresión del complejo se realizó en presencia de la Cak1p. Y a pesar de que la cantidad de proteína soluble *ZmCycD2;2a* fue mayor en la coexpresión con *ZmWee1* y que la cantidad de His-CDKA obtenida en la purificación también fue mayor, la presencia de la ciclina en las fracciones del eluato fue menor.

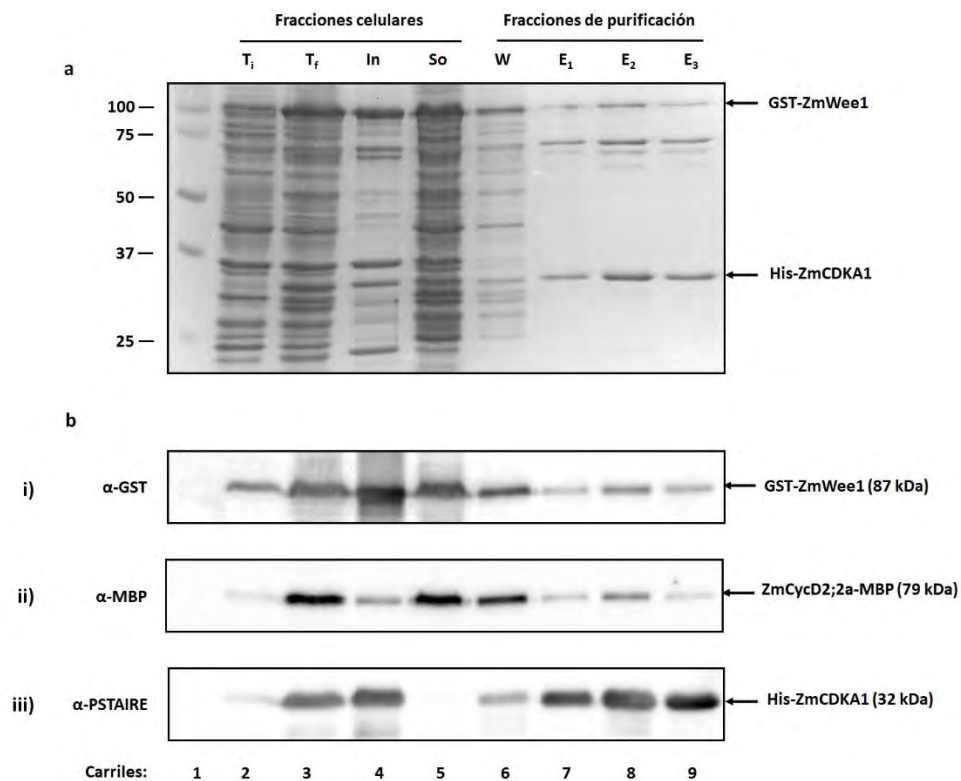


Figura 9. Copurificación de *ZmCycD2;2*-MBP y GST-*ZmWee1* con His-*ZmCDKA1*. **a)** Análisis de las fracciones de purificación por SDS-PAGE. En **1**, los estándares de masa molecular; en **2**, el lisado de bacterias antes de iniciar la inducción; en **3**, el lisado de bacterias después de 4 horas de inducción; en los carriles **4**, **5** y **6**, la fracción insoluble, soluble y de lavado, respectivamente; de **7** a **9**, las fracciones del eluato. **b)** Inmunoblot de las fracciones de purificación. **i)** Identificación de GST-*ZmWee1* en las mismas fracciones analizadas en **a** por medio de un anticuerpo comercial anti-GST. **ii)** Identificación de *ZmCycD2;2a*-MBP por un anticuerpo comercial anti-MBP en la misma membrana en que se realizó la detección de Wee1. **iii)** Identificación de His-*ZmCDKA1* por un anticuerpo comercial anti PSTAIRE en la misma membrana en que se realizó la detección de Wee1 y la ciclina.

Finalmente, para comprobar que las interacciones observadas del complejo ciclina-CDK, tanto con GST-Cak1p como con GST-*ZmWee1* se debían a las proteínas y no al “tag” de GST presente en las fusiones, se realizó la coexpresión del complejo ciclina-

CDK con la proteína GST. Luego, se cotransformaron células Tuner competentes con los plásmidos pCDFDuet-1**ZmCDKA1***CycD2;2a-MBP* y pGEX4T-2 (**Esquema A4**) y se realizó la inducción de proteína a partir de una colonia transformada con ambos plásmidos. Las bacterias se lisaron y de la fracción soluble se purificó al complejo ciclina-CDK mediante la resina de Ni-NTA. Las fracciones de purificación se monitorearon por SDS-PAGE y "western blot", y no se observó que la proteína GST estuviera presente en las fracciones del eluato, a pesar de que se encontró en grandes cantidades en la fracción soluble (ver **Apéndice, Fig. A16**).

5.4.1. Fosforilación de *ZmCDKA1*

A continuación, se identificó el estado de fosforilación de *ZmCDKA1* tras ser coexpresada con las diferentes cinasas (*Cak1p* y *ZmWee1*). Adicionalmente, se evaluó la especificidad de dos anticuerpos comerciales que reconocen tanto la fosforilación de la T14 y Y15 (inhibidoras), como de la T160 (activadora) de la CDK2 de humano.

Previo a la identificación de las fosforilaciones, las fracciones del eluato (obtenidas de los diferentes esquemas de coexpresión) que contenían la mayor cantidad de *ZmCDKA1* se dializaron y concentraron, y una alícuota de cada purificación se cuantificó mediante una curva de concentraciones conocidas de albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés). En la **Fig. A17** (ver **Apéndice**) se muestra uno de los geles de poliacrilamida utilizados para la cuantificación.

En el experimento también se identificó el nivel de fosforilación de *ZmCDKA1* cuando ésta fue coexpresada sólo en presencia de la *Cak1p*, ya que existen estudios *in vitro* que demuestran que esta última fosforila más eficientemente a CDKs monoméricas (Kaldis *et al.*, 1998). En este caso la fosforilación de *ZmCDKA1* fue menor que cuando se realizó la coexpresión junto con la ciclina (comparar carriles **4** y **5**, **Fig.10a**). Algo similar también se observó cuando la CDK fue coexpresada sólo con *ZmWee1*: su fosforilación fue menor que cuando se realizó la coexpresión junto con la ciclina (comparar carriles **6** y **7**, **Fig.10b**).

Respecto a la especificidad de los anticuerpos, el anticuerpo anti pT14 y anti pY15 sólo mostró reconocimiento cuando la CDK se coexpresó en presencia de ZmWee1, mientras que el anticuerpo anti pT160 reconoció a la CDK, aun cuando ésta fue la única proteína expresada (carril **1**, **Fig.10a**). En los demás carriles en los que no se esperaba reconocimiento por parte del anticuerpo anti pT160 (carriles **2, 3, 6 y 7**, **Fig. 10a**), la señal observada es similar a cuando la CDK no fue coexpresada con alguna otra proteína.

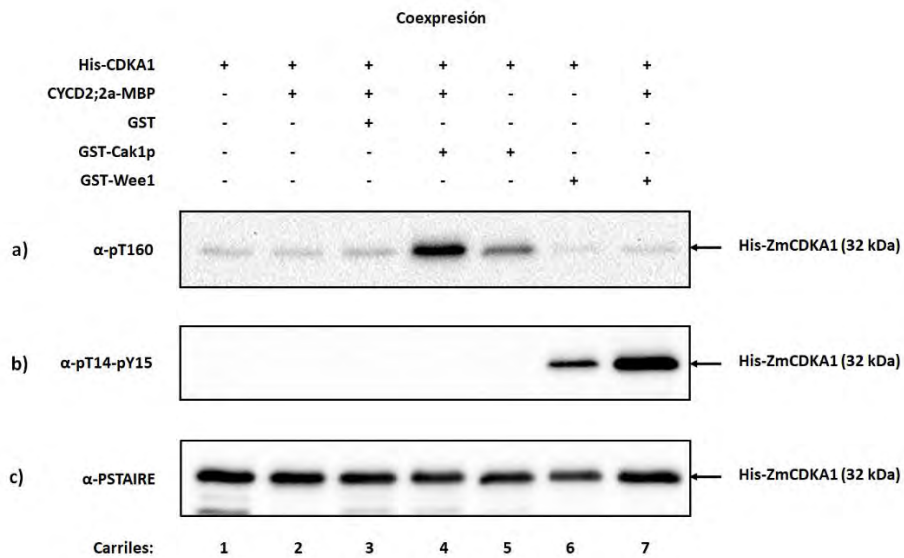


Figura 10. Identificación de las fosforilaciones en *ZmCDKA1*. **a)** Identificación de la fosforilación de *ZmCDKA1* por Cak1p. *ZmCDKA* (200 ng) proveniente de una clona con sólo *ZmCDKA1* (carril **1**) o la coexpresión con *ZmCycD2;2a-MBP* (carril **2**), o *ZmCycD2;2a-MBP* y GST (carril **3**), o *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-Cak1p (carril **4**), o GST-Cak1p (carril **5**), o GST-*ZmWee1L* (carril **6**) o *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-*ZmWee1L* (carril **7**). Se reconoció con un anticuerpo comercial que reconoce la fosforilación en la T160 de CDK2. **b)** Identificación de la fosforilación de *ZmCDKA1* por *ZmWee1*. 200 ng de *ZmCDKA1* que fue purificada a partir de los esquemas de expresión o coexpresión indicados en **a**, se reconoció con un anticuerpo comercial que reconoce la fosforilación en los residuos de T14 y Y15 de CDK2. **c)** Control de la cantidad cargada de *ZmCDKA1*. Se realizó un inmunoblot con un anticuerpo comercial anti-PSTAIRA para conocer la cantidad presente de *ZmCDKA1* en cada carril.

Para confirmar que lo observado en el inmunoblot provenía de una fosforilación, se realizó un ensayo de fosfatasa, tanto para la CDK que se coexpresó sólo con una de las cinasas (Cak1p o *ZmWee1*), como para la CDK que se expresó con la ciclina y alguna de las cinasas. En la **Fig. 11** se observa que en todos los casos en los que se

presumía que la CDK estaba fosforilada, después del tratamiento con la fosfatasa, la señal detectada disminuyó (carriles **2**, **4** y **8**, **Fig. 11**) o se abatió (carril **6**, **Fig. 11**). Sin embargo, en el carril **2** de la **Fig. 11a** se observa que a pesar de que la fosforilación que se deseaba abatir no se encontraba muy representada (carril **1**, **Fig. 11a**), como sí lo estaba cuando la CDK se coexpresó también con la ciclina (carril **3**, **Fig. 11a**), después del tratamiento con la fosfatasa, en ambos casos, el reconocimiento de la CDK por el anticuerpo anti pT160 fue muy similar (carriles **2** y **4**, **Fig. 11a**).

Existía la posibilidad de que el reconocimiento por el anticuerpo anti pT160, después de que la CDK se trató con la fosfatasa, se debiera a que no toda la proteína fue desfosforilada; no obstante, en la **Fig. 10a** (carriles **1** y **2**) se observó que la CDK sola o coexpresada con la ciclina fue reconocida por el anticuerpo. Se realizó un ensayo de fosfatasa sobre la proteína CDKA1 que fue coexpresada con la ciclina y no se observó un cambio en la señal por el anticuerpo que reconoce la fosforilación en la T160 después del tratamiento (ver **Apéndice**, comparar carriles **1** y **2**, **Fig. A18a**), mientras que sí se observó una gran disminución en el reconocimiento de la CDK que fue coexpresada con la ciclina y la Cak1p después del tratamiento con la fosfatasa (ver **Apéndice**, comparar carriles **3** y **4**, **Fig. A18b**).

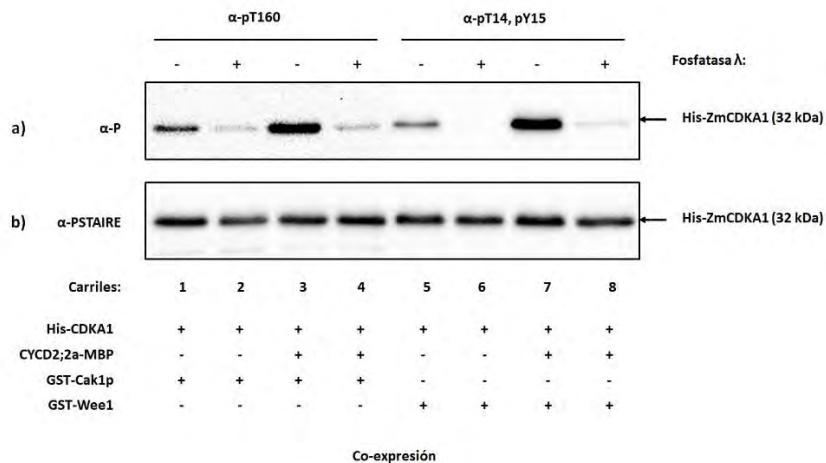


Figura 11. Desfosforilación de *ZmCDKA1*. **a)** Identificación de la fosforilación de *ZmCDKA1* con un anticuerpo comercial que reconoce la fosforilación en la T160 (carriles **1-4**) o en la T14 y Y15 (carriles **5-8**) de CDK2, después de que 200 ng de *ZmCDKA1*, que fueron purificados a partir de la coexpresión con GST-Cak1p (carriles **1** y **2**), *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-Cak1p (carriles **3** y **4**), GST-*ZmWee1L* (carriles **5** y **6**) o con *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-*ZmWee1L* (carriles **7** y **8**), fueron incubados con 400

(continuación, **Figura 11**) unidades de fosfatasa λ (carriles **2, 4, 6 y 8**) o sólo con el amortiguador de la fosfatasa (carriles **1, 3, 5 y 7**). **b)** Control de la cantidad cargada de *ZmCDKA1*. Se realizó un inmunoblot con un anticuerpo comercial anti-PSTAIRE para conocer la cantidad presente de *ZmCDKA1* en cada carril.

5.5.1. Actividad cinasa del complejo *ZmCycD2;2-MBP*His-ZmCDKA1*

Cuando la CDK se coexpresó con la ciclina, hubo un nivel basal de actividad sobre histona H1 (carril **3, Fig 12a**), el cual no se estimuló cuando el complejo se coexpresó con GST (carril **5, Fig 12a**), mientras que cuando el “tag” de GST llevaba fusionada a la proteína Cak1p, la actividad cinasa del complejo ciclina-CDK sobre la histona se estimuló importantemente (carril **6, Fig 12a**). Adicionalmente se observó que en las reacciones en las que la ciclina se encontraba coexpresada con la CDK, la ciclina fue fosforilada (carriles **3-7, Fig 12a**).

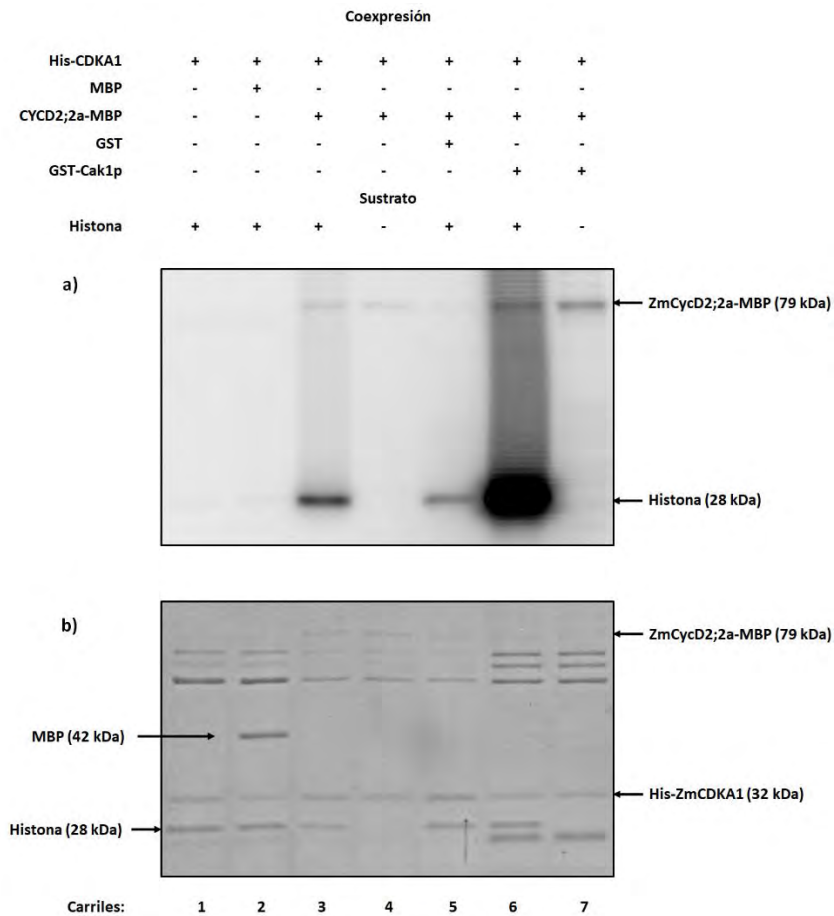


Figura 12. Actividad cinasa del complejo *ZmCycD2;2a-MBP*His-ZmCDKA1*. **a)** Autoradiografía del gel de poliacrilamida en la que se corrieron los ensayos de actividad cinasa de 100 ng de *ZmCDKA1* que

(continuación, **Figura 12**) había sido purificada, dializada y concentrada a partir de la expresión de His-ZmCDKA1 (carriles **1** y **2**) o la coexpresión de His-ZmCDKA1 con ZmCycD2;2a-MBP (carriles **3** y **4**), ZmCycD2;2a-MBP y GST (carril **5**) o ZmCycD2;2a-MBP y GST-Cak1p (carriles **6** y **7**). La actividad se midió en presencia de 250 ng de histona H1 (carriles **1**, **2**, **3**, **5** y **6**) o en su ausencia (carriles **4** y **7**). En la reacción de cinasa que se corrió en el carril **2** se agregó la cantidad necesaria de MBP para tener la misma concentración molar presente de la CDK en la reacción (98 nM). **b**) Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

Se trató de reconstituir la actividad de la CDK agregando cada una de las proteínas, purificadas por separado, en el ensayo *in vitro*. Cuando en la reacción sólo había ciclina y CDK no hubo fosforilación de la histona, aunque se observó la fosforilación de la ciclina, sin embargo, no al mismo nivel que se observó cuando la CDK provino de la coexpresión con la ciclina (comparar carriles **1** y **7**, **Fig. 13a**). Cuando además de la ciclina se incluyó a la Cak1p, se observó la fosforilación de la CDK (carril **3**, **Fig. 13a**); no obstante, esto no provocó que se estimulara la fosforilación de la histona o la ciclina, como sí ocurrió cuando la CDK provino de la coexpresión con la ciclina y la Cak1p (carril **9**, **Fig. 13a**).

En el análisis de la coexpresión de la Cak1p y la CDK se observó que esta última se fosforiló (carril **5**, **Fig. 10a**), de manera que se investigó si la adición de ciclina recombinante exógena podría reconstituir la actividad de la CDK. La CDK que se coexpresó con la Cak1p en presencia de MBP agregada exógenamente, apenas fosforiló a la histona (carril **5**, **Fig. 13a**); mientras que cuando en vez de la MBP se agregó la ciclina fusionada a la MBP, se observó que la actividad cinasa sobre la histona se estimuló importantemente (carril **6**, **Fig. 13a**), aunque los niveles de actividad no fueron tan altos como los que se observaron para la CDK que se purificó a partir de la coexpresión con la ciclina y la Cak1p (carril **9**, **Fig. 13a**).

Al reconstituir la actividad a partir de la coexpresión de la CDK y la Cak1p, se observó que la ciclina adicionada se fosforiló incluso mejor que la histona (carril **6**, **Fig. 13a**). Para descartar que la fosforilación que se observó se debiera al “tag” de MBP que traía la ciclina, el “tag” se utilizó como sustrato para la CDK que se purificó de la coexpresión con la ciclina y la Cak1p; en la reacción también se incluyó a la histona, que previamente se mostró fosforilada por el complejo ciclina-CDK. En la **Fig. 13a** (carril

8.) se observa que la MBP no fue fosforilada por el complejo ciclina-CDK, mientras que la histona sí. Cuando en lugar de la MBP se incluyó a *ZmCycD2;2a-MBP*, se observó que esta aparece fuertemente fosforilada, al igual que la histona presente en la reacción (carril **9**, **Fig. 13a**).

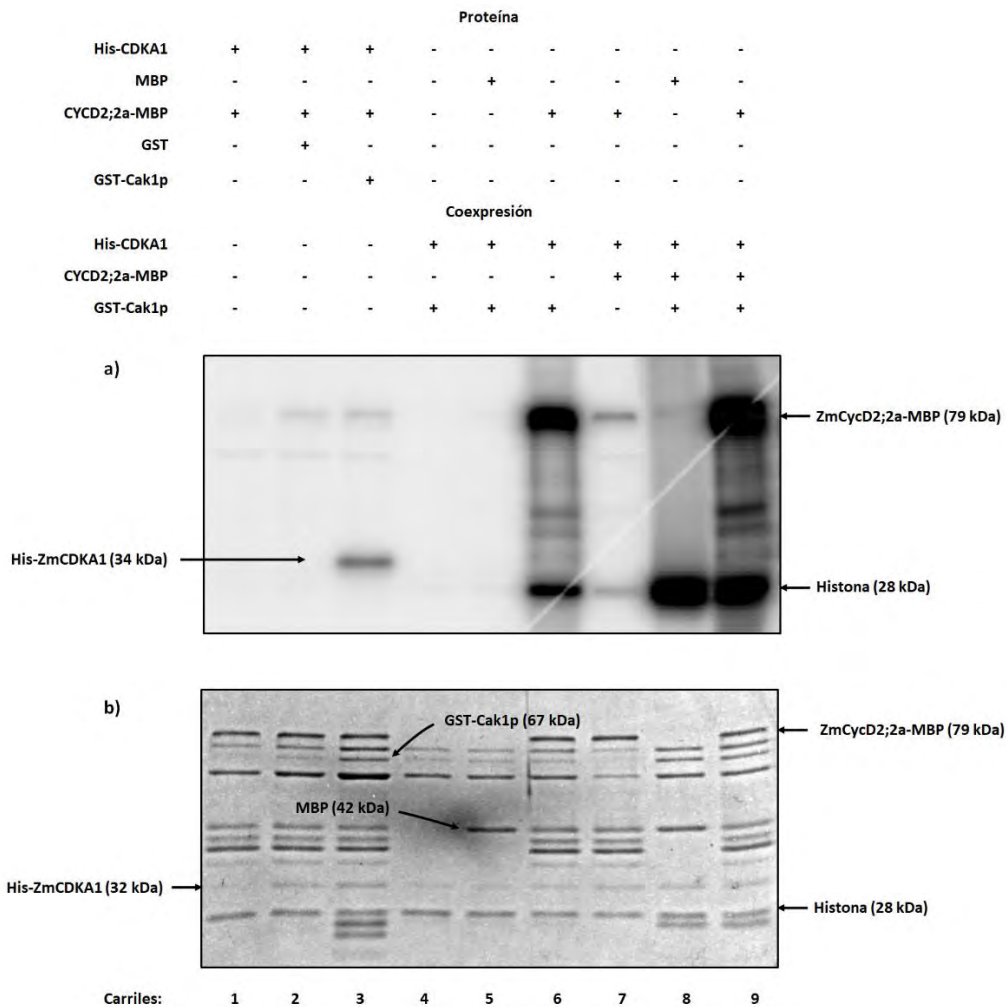


Figura 13. Reconstitución de la actividad cinasa de His-*ZmCDKA1*. **a)** Autoradiografía del gel de poliacrilamida en la que se corrieron los ensayos de actividad cinasa de 100 ng de *ZmCDKA1* que había sido purificada individualmente (carriles **1-3**) o a partir de la coexpresión con Cak1p-GST (carriles **4-6**), *ZmCycD2;2a-MBP* (carril **7**), o *ZmCycD2;2a-MBP* y Cak1p-GST (carriles **8** y **9**). Para reconstituir la actividad en los primeros tres carriles, además de la CDK, se agregó la cantidad necesaria de *ZmCycD2;2a-MBP* (carril **1**), *ZmCycD2;2a-MBP* y GST (carril **2**) o *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-Cak1p (carril **3**) para tener una concentración molar de cada una de las proteínas igual a la de la CDK en la reacción (98 nM). Mientras que cuando se reconstituyó la actividad a partir de la CDK que fue coexpresada con GST-Cak1p (carril **4**), se agregó la cantidad necesaria de MBP (carril **5**) o de

(continuación, **Figura 13**) *ZmCycD2;2a-MBP* (carril **6**) para obtener una cantidad equimolar a la de la CDKA en la reacción. En el carril **7** se cargó una reacción control de la cantidad basal de actividad de la CDKA. Ésta se purificó a partir de la coexpresión con la ciclina y a la reacción se adicionó la cantidad necesaria de *ZmCycD2;2a-MBP* para obtener la misma concentración molar de CDKA en la reacción. En los últimos dos carriles se corrieron reacciones en las que se evaluó la capacidad del complejo Cyc-CDK coexpresado con GST-Cak1p, para fosforilar al mismo tiempo a histona H1 y a *ZmCycD2;2a-MBP* (carril **9**) o a histona H1 y a la MBP (carril **8**). En las reacciones restantes (carriles **1-7**) también se agregaron 250 ng de Histona como sustrato. **b)** Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

En el carril 3 de la **Fig. 13a** se observa que a pesar de que la CDK está siendo fosforilada, y en consecuencia activada, la histona no fue fosforilada. Una posibilidad era que el complejo ciclina-CDK no se estuviera formando. Para comprobar dicha hipótesis se decidió fosforilar el complejo ya formado (que provino de la coexpresión de ambas proteínas) y en la misma reacción probar su actividad contra histona. En la **Fig. A19a**, carril **6** (ver **Apéndice**), se observa que la CDK se fosforiló mejor cuando ésta se encontraba en complejo con la ciclina, comparado a cuando se probó la fosforilación sólo de la CDK (carril **3**, **Fig. A19a**); sin embargo, a pesar de que la CDK se encontraba en complejo con la ciclina y además estaba siendo activada por la Cak1p, la fosforilación del sustrato fue menor que cuando el mismo complejo se incubó sólo con el “tag” de la Cak1p (ver **Apéndice**, comparar carriles **5** y **6**, **Fig. A19a**).

En adición a los sustratos probados, histona H1 y *ZmCycD2;2a*, se probó la fosforilación de la proteína *ZmRBR1*, ya que su homólogo en animales es ampliamente conocido por su participación en la transición G1/S, además es un conocido sustrato de los complejos ciclina-CDK que contienen ciclinas D (revisado en Scofield *et al.*, 2014). Se probaron dos versiones de la proteína RBR1: una que contenía principalmente el dominio carboxilo terminal (RBRCT), y otra que además contenía el dominio “pocket” (RBRPC).

Se observó una fosforilación basal de ambas versiones del sustrato, (carriles **2** y **3**, **Fig. 14a**), la cual no se estimuló cuando la CDK, además de la ciclina, fue coexpresada con GST (carriles **5** y **6**, **Fig. 14a**); mientras que cuando la CDK se purificó de la

coexpresión con la ciclina y la Cak1p, se observó un gran incremento de la actividad cinasa sobre ambos sustratos (carriles **8** y **9**, Fig. 14a).

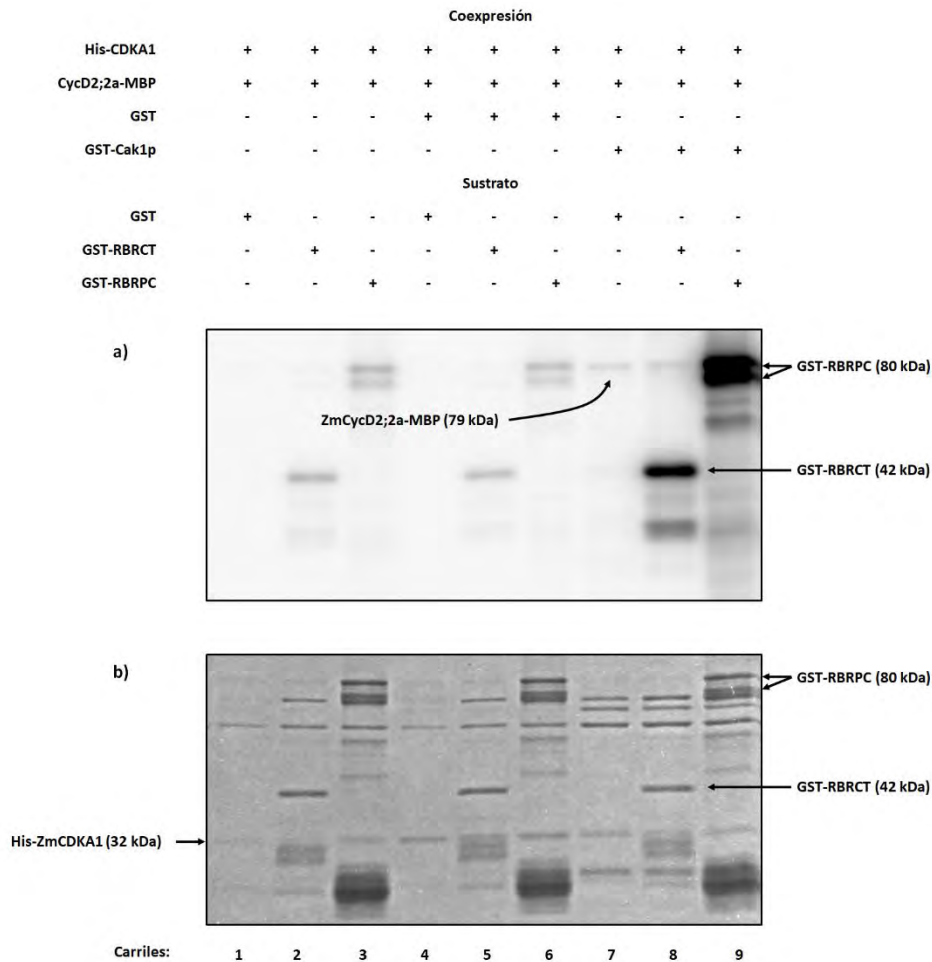


Figura 14. Fosforilación de *ZmRBR1* por el complejo *ZmCycD2;2a-MBP***His-ZmCDKA1*. **a)** Autoradiografía del gel de poliacrilamida en la que se corrieron los ensayos de actividad cinasa de 100 ng de *ZmCDKA1* que había sido coexpresada con *ZmCycD2;2a-MBP* (carriles **1-3**), *ZmCycD2;2a-MBP* y GST (carriles **4-6**) o *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-Cak1p (carriles **7-9**). Como sustrato se utilizó a GST (carriles **1, 4 y 7**), el carboxilo terminal de RBR fusionado a GST (GST-RBRCT) (carriles **2, 5 y 8**) o la región “pocket” y carboxilo de RBR fusionada a GST (GST-RBRPC) (carriles **3, 6 y 9**). La cantidad utilizada de cada sustrato fue la necesaria para tener una concentración molar igual a la de CDKA (98 nM). **b)** Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

6.5. Inhibición de la actividad cinasa del complejo *ZmCycD2;2a-MBP*His-ZmCDKA1*

Finalmente, se evaluó la capacidad de la proteína *ZmWee1* de inhibir la actividad cinasa de *ZmCDKA1*, para lo cual se emplearon las dos versiones de la proteína *ZmWee1*: la proteína completa y la proteína que carecía de los primeros 126 aminoácidos de extremo amino terminal. La inhibición se probó sobre *ZmCDKA1* que se purificó de la coexpresión con *ZmCycD2;2a* y la *Cak1p*. En un mismo ensayo, además de *ZmCDKA1*, se agregó tanto la proteína *ZmWee1* como el sustrato de la CDK. Aunado a lo anterior, se probaron dos concentraciones de *ZmWee1*: la primera correspondió a la misma concentración molar que había de *ZmCDKA1* en el ensayo, mientras que la segunda correspondió al doble de la concentración de *ZmCDKA1*.

A una concentración equimolar de *ZmCDKA1* y de la proteína incompleta de *ZmWee1* (*ZmWee1S-GST*), se observó apenas un modesto decremento de la actividad, en comparación a cuando en el ensayo, en vez de *ZmWee1S-GST*, se agregó sólo el “tag” de GST (comparar carriles **5** y **6**, **Fig. 15a**). Cuando la concentración de *ZmWee1S-GST* se duplicó en el ensayo, la inhibición se acentuó un poco más, en comparación a cuando sólo se duplicó la concentración del “tag” (comparar carriles **8** y **9**, **Fig. 15a**).

La proteína *Wee1* completa (*ZmWee1L-GST*), a las mismas concentraciones en que se probó la proteína incompleta, tuvo un nivel de inhibición más alto que el observado con la proteína incompleta, tanto cuando la concentración de *ZmWee1L* fue equimolar a la de *ZmCDKA1* (comparar carriles **6** y **7**, **Fig. 15a**), como cuando la concentración del inhibidor fue del doble de la presente de *ZmCDKA1* (comparar carriles **9** y **10**, **Fig. 15a**). En este último caso se abatió casi por completo la actividad cinasa de la CDK.

Cuando ambas versiones de *ZmWee1* se incubaron en presencia de ATP³² y sustrato (carriles **2** y **3**, **Fig. 15a**), se observó la aparición de una señal que corresponde con el peso de ambas proteínas. Dicha señal se incrementó cuando en el ensayo también se encontraba el complejo ciclina-CDK (carriles **6** y **7**, **Fig. 15a**), aunque el incremento de la señal de fosforilación fue mayor para la proteína *ZmWee1S-GST* (carril **6**, **Fig. 15a**).

Cabe mencionar que en ningún carril se detectó una señal que correspondiera a la fosforilación de *ZmCDKA1* por *ZmWee1*, ni siquiera cuando la concentración del inhibidor fue la máxima utilizada y la inhibición fue la máxima observada (comparar carriles **3** y **10**, **Fig. 15a**).

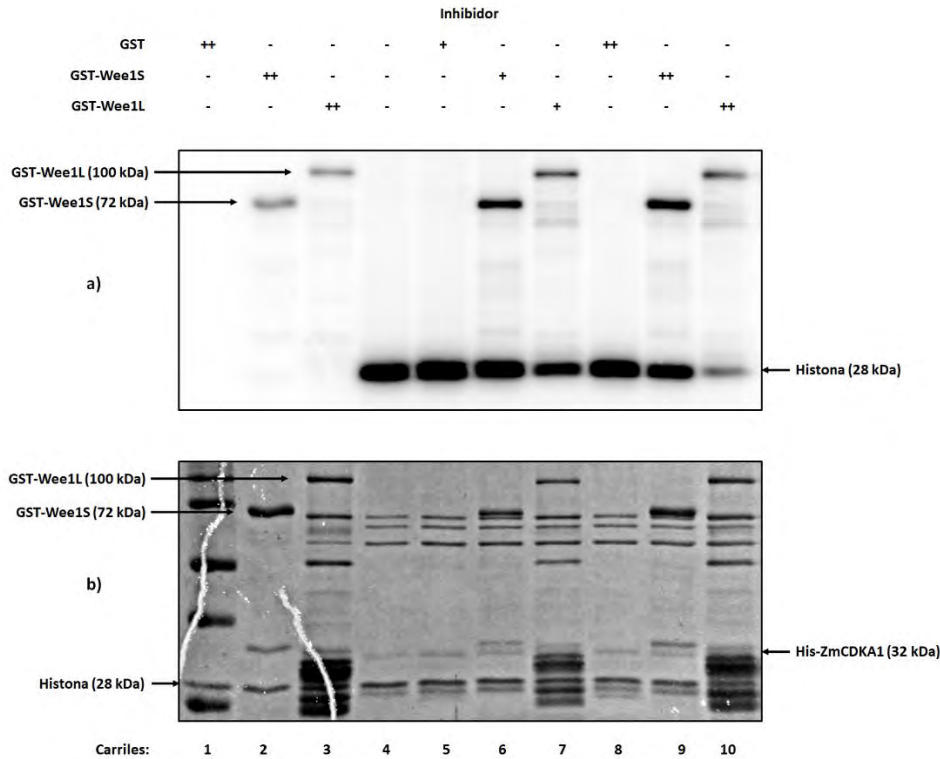


Figura 15. Inhibición de la actividad cinasa del complejo *ZmCycD2*;2a-MBP*His-*ZmCDKA1*. **a)** Autoradiografía del gel de poliacrilamida en la que se corrieron los ensayos de actividad cinasa de 100 ng de *ZmCDKA1* que había sido purificada a partir de la coexpresión con *ZmCycD2*;2a-MBP y Cak1p-GST (carriles **4-10**). Como control en los carriles **1**, **5** y **8** se agregó sólo el “tag” de GST, mientras que en los carriles **2**, **6** y **9** se agregó una versión de la proteína *ZmWee1* que carecía de los primeros 126 primeros aminoácidos y que además se encontraba fusionada a GST (GST-Wee1L). En los carriles **3**, **7** y **10** se agregó la proteína *ZmWee1* completa fusionada a GST (GST-Wee1S). Exceptuando los carriles **5**, **6** y **7**, en todos los carriles se agregó la cantidad necesaria de proteína (GST, GST-Wee1S o GST-Wee1L) para obtener una concentración del doble de la concentración molar presente de CDKA, mientras que en los carriles **5**, **6** y **7** la concentración de las proteínas (GST, GST-Wee1S o GST-Wee1L) fue la misma que la de CDKA (98 nM). (En el carril **1** además de la proteína GST también se incluyeron los estándares de masa molecular). Como sustrato, en todas las reacciones se agregaron 250 ng de histona H1. **b)** Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

A continuación, se probó si ambas versiones de *ZmWee1* podrían abatir la fosforilación de otros sustratos. Previamente se demostró que *ZmCycD2;2a* y RBRPC fueron buenos sustratos del complejo ciclina-CDK, así que inicialmente se probó la inhibición de la actividad sobre RBRPC. La actividad sobre RBRPC disminuyó modestamente cuando se incluyó a GST-*ZmWee1S* en el ensayo, aunque debido a la autofosforilación de *ZmWee1S* (carril 8, **Fig. 16a**) es difícil saber si también se inhibió la fosforilación de un producto incompleto de RBRPC que también es fosforilado por la CDK (señalado con un asterisco en el carril 7, **Fig. 16a**); ya que tanto GST-*ZmWee1S* como el producto incompleto de *ZmRBRPC* se sobreponen. Por otra parte, en el ensayo en el que el inhibidor fue GST-*ZmWee1L*, se observó una caída importante de la actividad cinasa sobre el sustrato (carril 9, **Fig. 16a**), teniendo en consideración que también se inhibió la fosforilación del producto incompleto de RBRPC.

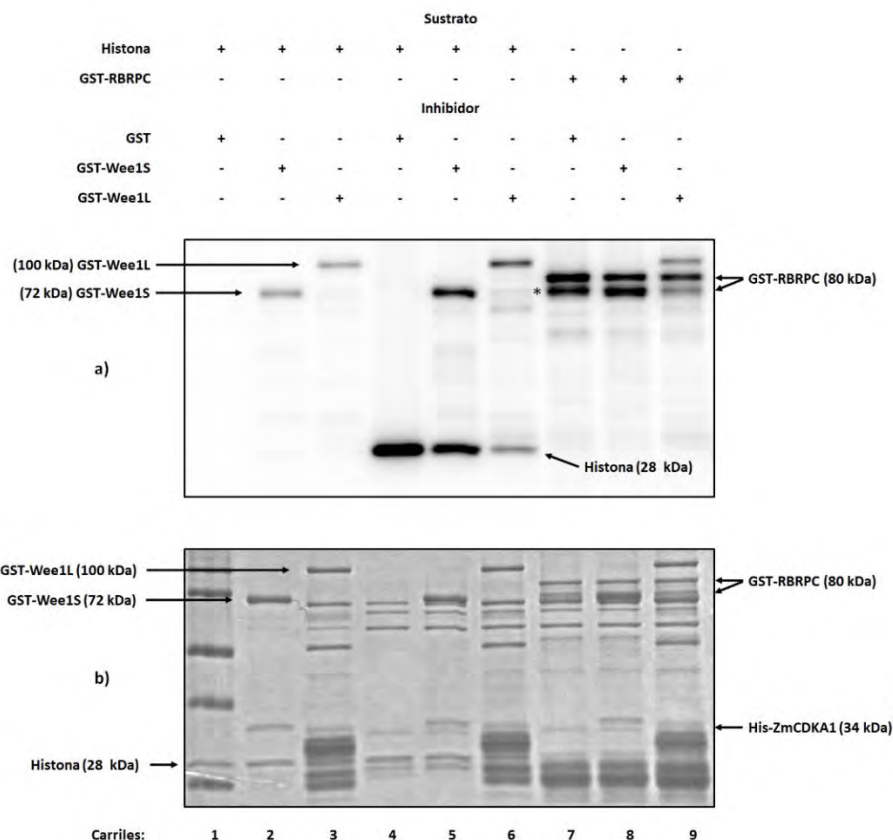


Figura 16. Inhibición de la actividad cinasa que el complejo *ZmCycD2;2a*-MBP*His-*ZmCDKA1* tuvo sobre Histona H1 y RBR. **a)** Autoradiografía del gel de poliacrilamida en la que se corrieron los ensayos de actividad cinasa de 100 ng de *ZmCDKA1* que había sido purificada a partir de la coexpresión con

(continuación, **Figura 16**) *ZmCycD2;2a*-MBP y Cak1p-GST (carriles **4-9**). Como sustrato se agregaron 250 ng de histona (carriles **4-6**) o la cantidad necesaria de GST-*ZmRBRPC* para obtener una concentración molar igual a la presente de *ZmCDKA1* en la reacción (98 nM) (carriles **7-9**). Como inhibidor se utilizó una concentración de GST (carriles **1, 4 y 7**), GST-*ZmWee1S* (carriles **2, 5 y 8**) o GST-*ZmWee1L* (carriles **3, 6 y 9**) del (continuación, **Fig. 16**) doble de la de la CDK. En los primeros 3 carriles también se agregaron 250 ng de histona H1 a cada reacción. Señalado con un asterisco en el carril **7**, un producto incompleto de GST-RBRPC que también fue fosforilado. En el carril **1** además de la proteína GST también se incluyeron los estándares de masa molecular. **b**) Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

Por último, se probó la inhibición de la fosforilación sobre *ZmCycD2;2a*, aunque sólo se utilizó la versión completa de *ZmWee1*, ya que fue la que mostró los niveles más altos de inhibición. Adicionalmente, una réplica de la inhibición de la fosforilación sobre RBRPC se realizó.

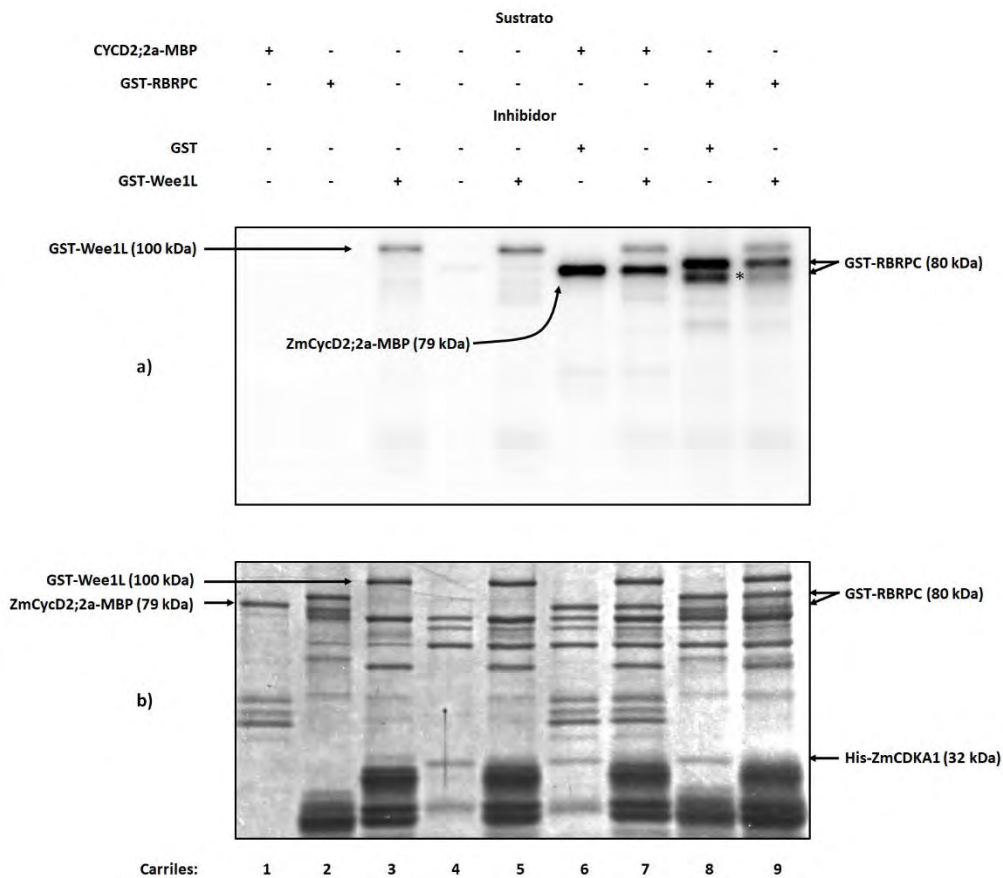


Figura 17. Inhibición de la actividad cinasa que el complejo *ZmCycD2;2a*-MBP*His-*ZmCDKA1* tuvo sobre *ZmCycD2;2a* y RBR. **a**) Autoradiografía del gel de poliacrilamida en la que se corrieron los

(continuación, **Figura 17**) ensayos de actividad cinasa de 100 ng de *ZmCDKA1* que había sido purificada a partir de la coexpresión con *ZmCycD2;2a-MBP* y *Cak1p-GST* (carriles **4-9**). En los carriles **6 y 7** el sustrato fue *ZmCycD2;2a-MBP*, mientras que en los carriles **8 y 9** el sustrato utilizado fue GST-RBRPC. Para inhibir la actividad (continuación, **Figura 17**) cinasa en los carriles **7 y 9** se agregó la cantidad necesaria de recombinante para obtener una concentración molar de GST-*ZmWee1L* del doble de la de la CDKA en la reacción. Como control, en las reacciones de los carriles **6 y 8**, sólo se agregó el “tag” de GST a una concentración final igual a la utilizada de GST-*ZmWee1L*. En los carriles **1, 2 y 3**, las proteínas *ZmCycD2;2a-MBP*, GST-RBR1PC y GST-*ZmWee1L*, respectivamente, se incubaron sólo con ^{32}P ; mientras que en los carriles **5 y 4** el complejo cyc-CDK se incubó en presencia de GST-*ZmWee1L* o en su ausencia. **b)** Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

La fosforilación de *ZmCycD2;2a* no disminuyó de forma importante cuando se agregó GST-*ZmWee1L* (comparar carriles **6 y 7**, **Fig. 17a**), mientras que cuando el sustrato fue RBRPC el grado de inhibición fue muy similar al que se observó cuando se realizó el experimento por primera vez (comparar carriles **8 y 9**, **Fig. 17a**). Cabe señalar que en este experimento tampoco se observó la fosforilación de la CDK por *ZmWee1* (comparar carriles **3, 5, 7 y 9**, **Fig. 17a**). Con la finalidad de tener un control de la inhibición en un sustrato ya probado y también de tener una réplica del experimento, nuevamente se ensayó la inhibición de la fosforilación sobre GST-RBRPC.

Cuando se realizó la coexpresión de *ZmCDKA1* con *ZmWee1L* se identificó con el anticuerpo que reconoce la fosforilación de la T14 y la Y15 de CDK2, que existe una fosforilación en la CDK que se acentúa cuando la ciclina también es coexpresada; sin embargo, en los ensayos de inhibición de actividad con marca radioactiva no se observó la fosforilación de la CDK. En un ensayo adicional se intentó fosforilar a la CDK que provino de la coexpresión con la ciclina (ver **Apéndice**, carril **7**, **Fig. A20a**) o con la ciclina y la *Cak1p* (ver **Apéndice**, carril **8**, **Fig. A20a**); de igual forma se intentó fosforilar a la CDK que se expresó sola (ver **Apéndice**, carril **6**, **Fig. A20a**). Sin embargo, en ninguno de los ensayos se observó una clara fosforilación de la CDK; mientras que en reacciones en las que sólo la CDK o la CDK purificada a partir de la coexpresión con la ciclina fueron incubadas con la *Cak1p*, se observó claramente la fosforilación de *ZmCDKA1* (ver **Apéndice**, carriles **9 y 10**, **Fig. A20a**).

Adicionalmente, en un ensayo en el cual se evaluó la actividad de la CDK que se purificó de la coexpresión con la ciclina y *ZmWee1L*, se observó que existió una disminución de la actividad basal de la CDK sobre histona H1, comparado a cuando en la coexpresión no se incluyó a *ZmWee1* (ver **Apéndice**, comparar carriles **2** y **3**, **Fig. A21a**). Interesantemente, en este ensayo se observó la fosforilación de la CDK (ver **Apéndice**, carril **3**, **Fig. A21a**), putativamente por la proteína *ZmWee1*, ya que ésta copurificó con el complejo ciclina-CDK (**Fig. 9**). La señal de la fosforilación por *ZmWee1* es consistente con la fosforilación que se observa en un carril contiguo en el que la CDK fue fosforilada por la Cak1p (ver **Apéndice**, carril **1**, **Fig. A21a**).

En algunos de los geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie que se incluyen como control de carga de las autoradiografías, no es clara la presencia de todas las proteínas que copurificaron con la CDK. Por otra parte, existe la posibilidad de que los complejos o las proteínas que se dializaron y concentraron se hubieran degradado, así que con la finalidad de corroborar qué proteínas estuvieron presentes en los ensayos de actividad cinasa, se realizó un inmunoblot de las proteínas que copurificaron con *ZmCDKA1* (después de la diálisis y concentración) a partir de los diferentes esquemas de coexpresión (ver **Apéndice**, **Fig. A22**). Adicionalmente, se identificaron los sustratos utilizados en los ensayos de actividad, así como las cinasas *ZmWee1* (L y S) y Cak1p (ver **Apéndice**, **Fig. A23**). En la mayoría de interacciones que se habían demostrado previamente, se identificaron los mismos componentes en el último análisis, exceptuando lo que se observó en la copurificación de la CDK que se realizó a partir de la coexpresión con la ciclina y la Cak1p, ya que esta última inicialmente se vio que copurificó con la CDK. Sin embargo, después de que los eluatos se dializaron y concentraron, ya no se observó la presencia de la proteína en las fracciones que se utilizaron para los ensayos de actividad cinasa (ver **Apéndice**, carril **6**, **Fig. A21b**).

En la identificación realizada también fue posible observar que *ZmCDKA1* interactuó con *ZmWee1L* cuando se coexpresaron ambas proteínas (ver **Apéndice**, carril **7**, **Fig. A22b**); mientras que cuando *ZmCDKA1* fue coexpresada con la Cak1p, la interacción de estas dos proteínas no fue muy evidente (ver **Apéndice**, carril **5**, **Fig. A22b**).

7. Discusión de resultados

En la mayoría de los estudios, tanto en animales como en plantas, han existido limitaciones para estudiar la regulación de la actividad de las CDKs *in vitro*, ya que la naturaleza misma de la CDK requiere que ésta primero se asocie a una ciclina y posteriormente se fosforile por una CAK. Por ejemplo, estudios *in vitro* realizados para la caracterización bioquímica de CDKs de humanos, han evaluado el potencial de formación de complejos ciclina-CDK, tanto para complejos que se formaron por la mezcla de los cultivos que expresaron a cada proteína, como para complejos que se formaron por su coexpresión en células de insectos (Desai *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1994). En ambos casos se puede recuperar actividad cinasa asociada a los complejos, sin embargo, la actividad es mayor en el segundo caso debido principalmente a dos factores: la asociación de la ciclina a la CDK es mayor, y existe una mayor fosforilación de la CDK en el residuo equivalente a la T160. Cabe mencionar que cuando la coexpresión es realizada en células de un organismo eucarionte, existe una fosforilación por las CAKs endógenas de las células del organismo, lo que se traduce en una mayor actividad cinasa (Kato *et al.*, 1994). En plantas, el sistema de coexpresión en células de insecto también ha sido utilizado exitosamente para obtener complejos ciclina-CDK activos, y posteriormente evaluar su actividad hacia diferentes sustratos (Nakagami *et al.*, 2002; Kono *et al.*, 2003; Nakai *et al.*, 2006; Harashima *et al.*, 2007), sin embargo, un inconveniente de la coexpresión en las células de insecto es que además de las CAKs endógenas, otras cinasas podrían fosforilar al complejo expresado de forma heteróloga, u otras proteínas que modifican la actividad podrían copurificar junto con el complejo modificando su actividad, lo que es un problema si lo que se desea es estudiar la regulación de la actividad del complejo.

Harashima y Schnittger (2012) desarrollaron un sistema de coexpresión en bacterias que elimina las variables que en el sistema eucarionte podrían modificar la actividad de los complejos ciclina-CDK expresados, y demostraron que mediante dicho sistema era posible obtener complejos activos que incluían a CDKs (A y B) y ciclinas (B y D). La activación de los complejos en la bacteria se llevó a cabo cuando en la coexpresión

se incluyó a la Cak1p, la cinasa activadora de CDKs que en *S. cerevisiae* activa a Cdc28, la única CDK que controla el ciclo celular en la levadura.

7.1. *ZmCycD2;2* interacciona con *ZmCDKA1* y el complejo se asocia con *ZmWee1* *in vitro*

En el laboratorio donde se realizó este trabajo, previamente se observó *in vivo*, la interacción de *ZmCycD2;2* con CDKs tipo A. Estos complejos aparentemente realizan su función más importante en las primeras 12 horas de germinación, tiempo en el que se ha determinado que las células en el eje embrionario de maíz transitan de la fase G1 a la S (Baiza *et al.*, 1989), ya que la actividad cinasa de los complejos sobre la proteína RBR fue mayor en los tiempos de germinación mencionados (Godínez-Palma *et al.*, 2013). Por lo anterior, se investigó *in vitro*, si la fosforilación de *ZmCDKA1* en el complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* podría estar contribuyendo a regular la actividad cinasa del complejo. Adicionalmente, en plantas, la activación de las CDKs solo se ha estudiado en *A. thaliana*, y algo similar ocurre para la regulación negativa de la actividad mediante la fosforilación en el residuo equivalente a la Y15 de la CDK2 por la proteína Wee1. Por lo tanto, fue importante investigar si los mecanismos que regulan la actividad mediante la fosforilación de las CDKs se conservan de manera similar en otras plantas, particularmente maíz en este estudio.

Para estudiar la activación se utilizó el sistema de coexpresión robusta (Harashima y Schnittger, 2012), que como se mencionó, ofrece diversas ventajas sobre otros sistemas de expresión heteróloga para el estudio de la activación de las CDKs. En la metodología original de coexpresión la CDK y la Cak1p estaban clonadas en el vector pCDFDuet-1, mientras la ciclina se encontraba en un vector "gateway". Este esquema de clonación permite evaluar la actividad de una misma CDK con diferentes ciclinas, sin embargo, en este trabajo se clonó tanto a *ZmCDKA1* como a *ZmCycD2;2* en el vector Duet, mientras que la Cak1p se clonó en el vector "gateway", lo anterior permitió estudiar diferentes mecanismos que pueden llevar a la activación de *ZmCDKA1*.

La fusión de la secuencia que codifica para la MBP (*malE*) a *ZmCycD2;2a* se realizó con la finalidad de conservar el “tag” asociado a la ciclina reportado en la metodología original, ya que el MCS2 del vector pCDDFDuet-1 en el que se clonó a la ciclina tiene asociado un “S-tag” (ver **Apéndice, Esquema A2 y A3**). En el laboratorio, previamente, se han clonado secuencias que codifican para fragmentos de ciclinas, y se ha observado que en repetidas ocasiones la ciclina fusionada a un “tag” de GST es recuperada en la fracción insoluble de lisados bacterianos. Es sabido que la MBP confiere una alta solubilidad a las proteínas que le son fusionadas, incluso se sugiere que la proteína tiene propiedades similares a las de una chaperona, lo que favorece el correcto plegamiento de las proteínas que le son fusionadas (Revisado en Francis y Page, 2010). Así que la conservación del “tag” de MBP en la ciclina, se realizó para favorecer la presencia de la ciclina y de las proteínas asociadas a ésta en la fracción soluble de los lisados bacterianos, y posteriormente facilitar su purificación.

Un inconveniente de utilizar a la proteína MBP es su tamaño, ya que al ser una proteína de 42 kDa es posible que fusionada a una proteína, interfiera con la interacción de otras proteínas. Este problema se trató de minimizar al momento de realizar la fusión de *ZmCycD2;2a* con *malE*; mediante la incorporación de un “linker” de 21 nucleótidos entre la secuencia que codifica para la ciclina y la secuencia que codifica para el “tag”. Los 21 nucleótidos codifican para siete aminoácidos (GNSLGNS) que se caracterizan por tener una alta flexibilidad (Huang y Nau, 2003), de esta forma el “tag” de MBP quedaría con una alta movilidad, lo que facilitaría la interacción con otras proteínas.

En la coexpresión de *ZmCycD2;2-MBP* y *ZmCDKA1*, tanto la cinasa como la ciclina quedaron en la fracción soluble después de la lisis, aunque en mayor medida la ciclina, probablemente debido a la presencia del “tag” de MBP (comparar carriles **4 y 5, Fig. 7b**, panel **i y ii**). Sin embargo, cuando el complejo ciclina-CDK se coexpresó en presencia de la Cak1p, la cantidad purificada de complejo ciclina-CDK fue muy baja (carriles **7, 8 y 9, Fig. 8**). Lo anterior fue consecuencia de la baja sobreexpresión de la ciclina y la CDK cuando la Cak1p se incluyó en la coexpresión (carriles **2 y 3, Fig. 8**) y aunque la Cak1p fue importantemente sobreexpresada, la proteína quedó principalmente en la fracción insoluble (carril **4, Fig. 8**).

En ambos plásmidos en los que están codificadas las proteínas (pCDFDuet-1 y pDEST15), la expresión de ellas está bajo el control del promotor T7, y debido a sus orígenes de replicación, ambos plásmidos deberían conservar un número de copias más o menos similar por célula, así que lo anterior no podría ser una razón por la que se sobreexpresara mayoritariamente la Cak1p. Sin embargo, es obvio que debido a los dos plásmidos presentes en la bacteria, la maquinaria de transcripción y traducción debió distribuirse entre los dos plásmidos, lo que explicaría la menor producción de ciclina y CDK. Mientras que, una posible mejor transcripción y/o traducción de la Cak1p podría explicar la alta sobreexpresión de la proteína.

Existe un menor porcentaje GC en la secuencia que codifica para la Cak1p (42%), en comparación al porcentaje GC de las otras secuencias (54% para la ciclina y 50% para la CDK), y esto podría favorecer una mayor traducción y/o sobreexpresión de la Cak1p. Así que, algo inherente a la secuencia que va en el plásmido y no el plásmido *per se* podría ser la causa de las diferencias en la expresión observada, ya que cuando se realizó la coexpresión de la ciclina y la CDK con *ZmWee1* (**Fig. 9**), cuya secuencia codificante se clonó en el mismo vector en el que se había clonado a *Cak1*, se observó que la sobreexpresión de *ZmWee1* no fue similar en cantidad a la observada para la Cak1p. Como se mencionó anteriormente en los resultados, la secuencia que codifica para *ZmWee1* tiene un alto porcentaje GC en los primeros cuatrocientos pares de bases, así que esto podría haber influido negativamente en su traducción, posiblemente debido a la formación de estructuras secundarias (con una alta estabilidad) en el mRNA que codifica para la proteína. La formación de dichas estructuras podría haber influido en la cantidad de proteína recombinante sobreexpresada, ya que existen estudios realizados en *E. coli* en los que se sugiere que la estructura secundaria formada por mRNAs heterólogos, principalmente en el extremo 5', tiene un impacto directo en los niveles de expresión de la proteína heteróloga (Zhang *et al.*, 2006; Kudla *et al.*, 2009; Behloul *et al.*, 2017).

Además de la diferencia en los niveles de expresión que se observan para *ZmWee1* y la Cak1p, existen otras diferencias interesantes entre ambas coexpresiones. Hubo una menor cantidad de *ZmCycD2;2a* copurificada cuando la coexpresión se realizó en

presencia de *ZmWee1* (ver **Apéndice**, comparar **Figuras 8b** y **9b**, panel **i**, carriles **7**, **8** y **9**), esto a pesar de que en la coexpresión que incluye a *ZmWee1*, la cantidad de *ZmCycD2;2a* en la fracción soluble fue mayor (comparar carril **5**, panel **ii**, **Fig. 9b** con el carril **5**, panel **i**, **Fig. 8b**) y de que la cantidad purificada de *ZmCDKA1* también fue mayor (comparar **Figuras 8b** y **9b**, panel **iii**, carriles **7**, **8** y **9**).

Se observó que una cantidad importante de *ZmWee1* copurificó con el complejo ciclina-CDK, mientras que una cantidad apenas detectables de la Cak1p copurificó con el complejo. La coexpresión de *ZmCDKA1* solo con *ZmWee1* sugiere que la asociación de esta última al complejo ciclina-CDK, podría estar mediada principalmente por una asociación directa con *ZmCDKA1*, ya que cuando se comparan los niveles de *ZmWee1* que copurificaron cuando la coexpresión con *ZmCDKA1* se realizó en presencia o ausencia de la ciclina, se observa que niveles similares de *ZmWee1* son copurificados (ver **Apéndice**, comparar carriles **7** y **8**, **Fig. A22b**). Hasta donde se tiene conocimiento, en humanos no existen estudios *in vitro* de asociación entre las CDKs y Wee1, sin embargo, los estudios de fosforilación *in vitro* sugieren que Wee1 requiere de la asociación de una ciclina a la CDK para fosforilar a esta última, ya que la fosforilación de la CDK solo ocurre en presencia de la ciclina (Parker *et al.*, 1992; McGowan y Rusell, 1995; Watanabe *et al.*, 1995). En *A. thaliana*, sin embargo, se ha demostrado mediante ensayos de doble híbrido que la CDKA1 es capaz de interaccionar con Wee1 (De Schutter *et al.*, 2007), además, CDKs recombinantes tipo D de *A. thaliana* pueden ser fosforiladas por una versión de la proteína Wee1 fusionada a GST sin la necesidad de que exista alguna ciclina asociada a las CDKs (Shimotohno *et al.*, 2006). Lo anterior indicaría que en plantas la proteína Wee1 no requiere de la presencia de la ciclina para su asociación a las CDKs.

Otro aspecto muy interesante observado en la coexpresión del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* con *ZmWee1*, fue la estabilidad de la interacción entre estas proteínas. En *S. cerevisiae* se ha observado que la proteína Swe1 (proteína homóloga a Wee1) es capaz de actuar como un pseudosustrato de complejos ciclina-Cdc28, lo cual inhibe la actividad de los complejos. Sin embargo, cuando el ensayo se diluye y se recuperan los complejos por una cromatografía de afinidad, y posteriormente se vuelve a evaluar

la actividad, se puede observar que los complejos recuperan su actividad (Booher *et al.*, 1993). Lo anterior indica que al menos en levaduras la interacción entre la CDK y Wee1 es poco estable, sin embargo, en el trabajo realizado la interacción observada entre *ZmWee1* y *ZmCDKA1* fue bastante estable, ya que ésta resistió el proceso de purificación del complejo que incluyó lavados con una fuerza iónica intermedia y detergentes. Además, posteriormente las fracciones del eluato se dializaron y concentraron, y mientras la interacción de *ZmWee1* con la CDK o el complejo siguió siendo muy evidente (ver **Apéndice**, carriles 7 y 8, **Fig. A22b**), la interacción de la Cak1p con el complejo ciclina-CDK ya no se observó (ver **Apéndice**, carril 6, **Fig. A22b**).

Por otra parte, se ha demostrado que la CDK2 de humano, tanto fosforilada como no fosforilada en la T160, tiene una afinidad muy similar por ciclina A (Brown *et al.*, 1999a). En este trabajo cuando se realizó la purificación del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* en presencia o ausencia de la Cak1p, no se observó una diferencia importante en la cantidad de *ZmCycD2;2a* copurificada (ver **Apéndice**, **Fig. A22c**, comparar carriles 3 y 4), lo cual indicaría de manera indirecta que *ZmCDKA1* fosforilada por la Cak1p no tiene una mayor afinidad por la *CycD2;2*. Lo anterior además es congruente con ensayos *in vitro* de formación de complejos, en los que se ha reportado que la CDK2 no fosforilada forma complejos de manera estable también con ciclina E, y que la CDK1 no requiere la fosforilación activadora para asociarse con ciclina B. Aunque no hay que perder de vista que existen complejos como el formado por CDK1 y ciclina A que requieren la fosforilación de la cinasa para su asociación (Desai *et al.*, 1995).

7.2. *ZmCDKA1* se fosforila cuando se coexpresa con Cak1p o *ZmWee1*

Cuando *ZmCDKA1* se coexpresó con la Cak1p, la fosforilación de la CDK no fue tan eficiente como cuando en la coexpresión también se incluyó a *ZmCycD2;2a* (comparar carriles 5 y 6, **Fig. 10a**); esto es contrario a estudios que indican que la Cak1p fosforila mejor a las CDKs monoméricas, y no a las que se encuentran en complejo con una ciclina (Kaldis *et al.*, 1998). Cuando se realizó la coexpresión de la Cak1p con la CDK,

se observó que la cantidad de Cak1p en la fracción soluble fue menor (resultado no mostrado) que cuando *ZmCDKA1* y la Cak1p se coexpresaron incluyendo a la ciclina. Esto pudo influir en la cantidad de Cak1p disponible para fosforilar a la CDK monomérica, sin embargo, cuando se ensayó la fosforilación de la CDK tanto monomérica como en complejo con la ciclina, por la Cak1p previamente purificada de *E. coli* y en presencia de ATP marcado radioactivamente (ver **Apéndice, Fig. A19a**, carriles **3** y **6**), se observó un comportamiento muy similar al observado en la coexpresión. Lo anterior sugiere que la Cak1p fosforila más eficientemente a la CDK cuando está en complejo con la ciclina, no obstante, otros experimentos en este trabajo sugieren que *ZmCDKA1* monomérica podría no estar en su estado nativo, lo cual también podría explicar porque la Cak1p no fosforiló eficientemente a la CDK.

Al utilizar el anticuerpo que reconoce la fosforilación en el residuo de T160 de la CDK2 de humano, se determinó que existe un reconocimiento inespecífico de *ZmCDKA1* (carriles **1** y **2**, **Fig. 10a**), que no es debido a una posible fosforilación de la CDK en la bacteria, ya que el reconocimiento por el anticuerpo no se abatió cuando la proteína recombinante se trató con fosfatasa λ (ver **Apéndice, Fig. A18a**, comparar carriles **1** y **2**), una fosfatasa de residuos de treonina, serina y tirosina fosforilados, que se ha utilizado exitosamente para remover fosforilaciones tanto en la CDK4 que se encuentra en complejo con ciclina D3, como en la CDK2 monomérica, ambas fosforiladas en la T160 (Takaki *et al.*, 2009). Adicionalmente se comprobó la especificidad del anticuerpo anti pT160 para reconocer solo la fosforilación de la CDK que fue mediada por la Cak1p, ya que el anticuerpo no incrementó su reconocimiento inespecífico por las CDKs que se coexpresaron con *ZmWee1* (**Fig. 10a**, comparar carriles **6** y **7** con carriles **1** y **2**), las cuales deberían estar fosforiladas en el residuo equivalente a la Y15 de la CDK2.

Cabe resaltar que la fosfatasa λ pudo remover la fosforilación de *ZmCDKA1* cuando ésta se encontraba en complejo con *ZmCycD2;2a*, lo que indicaría que el efecto de la fosforilación de *ZmCDKA1* en el residuo equivalente a la T160 cuando se encuentra en complejo con *ZmCycD2;2*, podría ser diferente a lo que se reportó para el complejo CycA-CDK2 de humano, en el que se observó que la T160 fosforilada quedaba

embebida en una red de interacciones dentro de la estructura del complejo (Russo *et al.*, 1996), haciéndola inaccesible a la fosfatasa λ (Takaki *et al.*, 2009). Por otra parte, la desfosforilación de *ZmCDKA1* monomérica sugiere que la conformación del “loop” de activación de la CDK fosforilado en el residuo equivalente a la T160, podría ser similar al “loop” de activación de la CDK2 fosforilada en la misma posición, ya que se ha determinado que esta última tiene un “loop” flexible y accesible que permite su desfosforilación por una fosfatasa específica (Brown *et al.*, 1999a).

De manera similar a lo reportado para *A. thaliana* (Shimotohno *et al.*, 2006; Harashima *et al.*, 2012), se comprobó que en ausencia de la ciclina, *ZmCDKA1* también pudo ser fosforilada por la proteína *ZmWee1*, sin embargo, como se mencionó en párrafos anteriores, a pesar de que parece que la ciclina no es importante para la asociación de *ZmWee1* con la CDK, parece que si es un factor que incrementa la fosforilación de la CDK (**Fig. 10**, comparar carriles **6** y **7**). Será interesante determinar el mecanismo por el cual *ZmCycD2;2a* estimula la fosforilación de *ZmCDKA1*, ya que no fue evidente que ésta promoviera la asociación de *ZmWee1* a *ZmCDKA1*. Se puede sugerir que existe un rearrreglo de la estructura de la CDK tras la unión de la ciclina, aunque se ha reportado que el mayor cambio que existe en la CDK posterior a la unión de la ciclina es en la región que comprende al “loop” de activación (Jeffrey *et al.*, 1995).

Se decidió realizar un alineamiento de la estructura tridimensional de la CDK2 sola o en complejo con ciclina A (ver **Apéndice, Fig. 24b**), y se observó que sí existe un movimiento del “loop” P (región en la que se localiza la Y15) después de la asociación con la ciclina. El movimiento es acompañado por un cambio en la posición del residuo de tirosina (ver **Apéndice, Fig. 24b**), sin embargo, dicho residuo sigue estando orientado hacia el interior de la CDK, lo que dificultaría su fosforilación por *Wee1*. Un análisis similar también se realizó para la CDK1, y se observó que aún en presencia de ciclina B el residuo de Y15 queda oculto hacia el interior de la CDK (alineamiento no mostrado). Lo anterior sugiere que es necesario un rearrreglo del residuo de tirosina en *ZmCDKA1*, inducido tanto por *ZmCycD2;2a* como por *ZmWee1*, para que ésta última pueda fosforilar a la CDK. El que la ciclina favorezca la fosforilación de la CDK por *ZmWee1*, parece contradictorio, ya que en la coexpresión que incluye a las tres

proteínas se observó que la cantidad de ciclina unida al complejo es mucho menor que la cantidad de ciclina copurificada cuando la CDK se coexpresó con Cak1p (ver **Apéndice, Fig. A22c**, comparar carriles **6** y **8**). Sin embargo, se puede sugerir un mecanismo para conciliar la aparente contradicción anterior: primero *ZmCycD2;2a* se asocia con *ZmCDKA1* e induce un cambio conformacional que favorece la fosforilación de la CDK por *ZmWee1*, posteriormente *ZmWee1* fosforila a la CDK y se queda unida la proteína en el mismo sitio ocupado por la ciclina o uno muy cercano, lo que provoca una disminución de la cantidad de ciclina unida a la CDK.

En humanos y levaduras se ha encontrado que la ciclina es el factor que determina la fosforilación de ciertas CDKs por Wee1 (Booher *et al.*, 1993 y 1997; Watanabe *et al.*, 1995), lo que tiene sentido si se toma en cuenta que Wee1 tiene su función principal en la transición G2/M, que es controlada por complejos de ciclinas de fase M-CDKs, por lo tanto, se esperaría que las CDKs en complejo con ciclinas de fase M fueran el blanco de fosforilación de Wee1. En *S. cerevisiae* se ha demostrado que Swe1 solo es capaz de fosforilar e inhibir la actividad de Cdc28 en complejo con clb2 (una ciclina de G2), mientras que no es capaz de fosforilar a Cdc28 en complejo con cln1 (una ciclina de G1) (Booher *et al.*, 1993). En humanos Wee1 solo puede fosforilar a CDKs en complejo con ciclinas A, B, y E, mientras que no es capaz de fosforilar a CDKs asociadas a ciclinas D (Watanabe *et al.*, 1995; Booher *et al.*, 1997). En este sentido fue muy interesante observar que *ZmWee1* pudo fosforilar a *ZmCDKA1* en complejo con una ciclina tipo D, una ciclina que canónicamente se ha asociado al control de la fase G1, sin embargo, cabe mencionar que en el grupo se ha descrito que complejos de ciclinas D-CDKs tienen actividad de cinasa incluso en tiempos de germinación en los que las células están transitando hacia fases tardías del ciclo celular (G2 y M), sugiriendo que las ciclinas D de maíz son importantes para regular a las CDKs que controlan las transiciones G1/S y G2/M (Godínez-Palma *et al.*, 2013). En ese contexto, no sería raro que *ZmWee1* pudiera fosforilar a CDKs en complejo con ciclinas tipo D durante la transición G2/M para regular su actividad cinasa, e incluso durante la transición G1/S si es que *ZmWee1* pudiera tener algún papel en el control de dicha transición.

7.3. Mecanismos que llevan a la activación de *ZmCDKA1*.

Diferentes estudios han demostrado que existe una variedad de desviaciones al mecanismo clásico de activación descrito para el complejo CycA-CDK2, por ejemplo, cuando se cristalizó a la CDK4 en complejo con ciclina D3, se observó que cuando la ciclina se unió a la CDK, no se modificó su conformación a una parcialmente activa como ocurre en la CDK2 tras la unión de ciclina A; además, cuando la CDK4 fue fosforilada en la T160 tampoco adquirió una conformación activa, así que posiblemente es hasta que la CDK reconoce al sustrato, que la cinasa adquiere dicha conformación (Takaki *et al.*, 2009). Es posible que el modelo de activación propuesto a partir de la cristalización de la CDK2 no es el que siguen todas las CDKs para su activación, y aunque la evidencia de que algunas CDKs no requieren la fosforilación en el residuo equivalente a la T160 de la CDK2 para su activación, proviene de CDKs que no participan directamente en el control de ciclo celular (Qi *et al.*, 1995; Nishizawa *et al.*, 1999), la diversidad en los mecanismos de activación de las CDKs también se extiende a las CDKs que participan en el control del ciclo celular.

Cuando se caracterizó a la Cak1p, la CAK monomérica de la levadura *S. cerevisiae* que controla la activación de Cdc28, se descubrió que la cinasa tenía una mayor preferencia por la fosforilación de las CDKs que se encontraban en su forma monomérica (Kaldis *et al.*, 1998). Posteriormente, se determinó *in vivo* que el mecanismo de activación que predomina es aquel en el que primero se fosforila Cdc28, y posteriormente se une la ciclina, ya que también se determinó que Cdc28 en su forma no fosforilada tiene poca afinidad por las ciclinas, mientras que Cdc28 fosforilada en el residuo equivalente a la T160 de CDK2 es activada eficientemente por la adición de ciclina (Ross *et al.*, 2000). En humanos también se ha determinado *in vitro* que la CAK (formada por el complejo Cych-CDK7), es capaz de fosforilar a la CDK2 en su forma monomérica (Fisher y Morgan, 1994), y la actividad de dicha CDK puede ser estimulada posteriormente por la adición de ciclina A3 (Brown *et al.*, 1999a). Lo que sugiere que pueden existir mecanismos alternativos de activación en adición a la vía clásica de activación (Fisher y Morgan, 1994).

En *A. thaliana* se ha comprobado que la fosforilación de la CDKA en el residuo equivalente a la T160 de la CDK2, es necesaria para que la cinasa tenga actividad (Dissmeyer *et al.*, 2007; Harashima *et al.*, 2007; Harashima y Schnittger, 2012), sin embargo, poco se ha estudiado sobre los diferentes mecanismos que pudieran llevar a la activación de las CDKs, lo anterior cobra aún más relevancia si se considera que las plantas poseen una CAK monomérica (CDKF) que bioquímicamente es muy parecida a la Cak1p (Tsakrklides y Solomon, 2002). Es en este contexto que se evaluaron dos mecanismos que llevaron a la activación de la CDKA1 de maíz.

Primero se evaluó el mecanismo clásico de activación, que consistió en obtener a la CDK fosforilada por la Cak1p en complejo con la ciclina. Una posible desventaja del sistema de coexpresión para estudiar el mecanismo de activación, es que el sistema no permite asegurar qué está ocurriendo primero en la bacteria, si la asociación de la CDK y la ciclina y posteriormente la fosforilación de la CDK por la Cak1p, o primero la fosforilación de la CDK y posteriormente su asociación con la ciclina. Sin embargo, el que tanto la CDK como la ciclina se encuentren en el mismo plásmido implica que tanto su transcripción como su traducción ocurriría en un mismo sitio en la bacteria, lo que finalmente favorecería la formación del complejo ciclina-CDK. Adicionalmente, los ensayos de fosforilación *in vitro* de la CDK por Cak1p, sugieren que lo predominante en la bacteria es la fosforilación de la CDK en complejo con la ciclina, ya que la CDK en el complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* se fosforiló con mayor eficiencia que *ZmCDKA1* (ver **Apéndice, Fig. A19a**, comparar carriles **3** y **6**), resultado que coincide con el nivel de fosforilación detectado mediante “western blot”, al inmunodetectar la fosforilación de la CDK que se coexpresó solo con la Cak1p, o con la ciclina y la Cak1p (**Fig. 10a**, comparar carriles **4** y **5**).

ZmCDKA1 como monómero no tuvo actividad, mientras que en complejo con *ZmCycD2;2,a* tuvo un nivel basal de actividad (**Fig. 12a**, carril **3**), lo anterior es similar a lo que se observó para el complejo CycA-CDK2 de humano (Connell-Crowley *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1999a), el cual tiene un pequeño nivel de actividad cuando se lleva a cabo la formación del complejo, aunque no se puede generalizar que siempre la asociación de la ciclina a la CDK promoverá la activación parcial de esta última, ya que

por ejemplo, no se detectó actividad cinasa cuando ciclina D3 y la CDK4 de humano se asociaron (Takaki *et al.*, 2008). La CDK que se coexpresó con la ciclina y Cak1p, tuvo una fuerte estimulación de su actividad de cinasa (**Fig. 12a**, carril **6**), lo cual indica que la Cak1p pudo activar a *ZmCDKA1*, presuntivamente, por su fosforilación en el residuo equivalente a la T160 de la CDK2. Se descarta que la fosforilación del sustrato, durante los ensayos de actividad, se haya debido a la copurificación de la Cak1p que inicialmente se detectó interaccionando con el complejo (**Fig. 8b**, panel **iii**, carriles **7-9**), ya que como fue mencionado, antes de realizar los ensayos de actividad, los complejos ciclina-CDK recombinantes se dializaron y concentraron, y posteriormente ya no se detectó la presencia de la Cak1p en los complejos (ver **Apéndice, Fig A22b**, carril **6**). Adicionalmente se evaluó la actividad de la Cak1p usando histona H1 como sustrato, y similar a lo ya reportado, ésta no tuvo actividad sobre histona H1 (Kaldis *et al.*, 1996) (ver **Apéndice, Fig. A19a**, carril **7**).

Cuando se intentó reconstituir la actividad de *ZmCDKA1* por la adición de *ZmCycD2;2a* que fue purificada por separado, no fue posible lograr la activación parcial de la CDK; ni siquiera cuando también se incluyó a la Cak1p en el ensayo (**Fig. 13**, carriles **1 y 3**). Algo que podría explicar lo anterior es que no se esté llevando a cabo la formación del complejo ciclina-CDK. Se ha reportado que el complejo CycA-CDK2 de humano formado *in vitro*, necesita 10 minutos de pre incubación para que sea observable su actividad cinasa, por lo tanto, se sugiere que la preincubación es necesario para que se ensamble el complejo (Pan *et al.*, 1993). Con lo anterior en mente se realizó una preincubación de las proteínas recombinantes, sin embargo, nuevamente no se observó la reconstitución de la actividad de la CDK (resultado no mostrado). Existen varias posibilidades por las cuales no se podría haber llevado a cabo la reconstitución de la actividad, una de ellas es que la cantidad adicionada de ciclina esté por debajo de la constante de formación del complejo, otra posibilidad es que las proteínas sobreexpresadas y purificadas por separado no se estén plegando correctamente, y en consecuencia no sean capaces de asociarse, aunque esta posibilidad quedaría descartada al menos para la ciclina, ya que en un experimento posterior se observó que *ZmCycD2;2a* fue capaz de estimular la actividad cinasa de *ZmCDKA1* monomérica fosforilada por la Cak1p. Sin embargo, queda la posibilidad de que la CDK

expresada en ausencia de la ciclina esté plegada incorrectamente, además esto podría explicar porque la CDK monomérica se fosforiló con menor eficiencia por la Cak1p, en comparación a la CDK que estaba en complejo con la ciclina (ver **Apéndice, Fig. A19a**, comparar carriles **3** y **6**), siendo que se esperaba lo contrario. Por otra parte, cuando se intentó activar al complejo *ZmCycD2;2-ZmCDKA1* (obtenido por la coexpresión), mediante la adición de la Cak1p purificada al ensayo, no se observó la estimulación de la actividad sobre la histona, sino por el contrario, la actividad basal de la CDK en el complejo se vio comprometida (ver **Apéndice, Fig. A19a**, comparar carril **5** y **6**). Es probable que la Cak1p se quede unida al complejo ciclina-CDK e impida que éste reconozca el sustrato, ya que como se observó en la purificación del complejo que se coexpresó con la Cak1p, ésta tiene cierta afinidad por el complejo (**Fig. 8b**, panel **iii**, carriles **7-9**).

La ineficiente fosforilación de *ZmCDKA1* por la Cak1p en ausencia de la ciclina durante la coexpresión (**Fig. 10a**, comparar carriles **4** y **5**), podría explicar porque la activación de dicha CDK fue poco eficiente cuando a esta se le agregó *ZmCycD2;2a* purificada, esto comparado a la activación que se observó cuando la CDK se coexpresó con la ciclina y la Cak1p (**Fig. 13**, comparar carriles **6** y **8**). Estudios de coexpresión de la Cak1p o de la CDKF de *A. thaliana* con la CDKA1 de la misma planta, sugieren que la CAK monomérica de *A. thaliana* (CDKF) fosforila mucho más eficientemente a la CDKA1 (Harashima y Schnittger, 2012), por lo tanto, si *ZmCDKA1* se hubiera obtenido de la coexpresión con la CDKF1 de maíz, y posteriormente se hubiera agregado a *ZmCycD2;2a* para activar a la CDK, es probable que se hubieran alcanzado niveles de activación similares a los observados cuando *ZmCDKA1* se purificó de la coexpresión con *ZmCycD2;2a* y la Cak1p.

Como se mencionó anteriormente, la CAK de humanos fosforila con poca eficiencia a la CDK2, entonces a pesar de que se ha demostrado que la CDK2 monomérica fosforilada puede ser activada por la adición de ciclina A (Brown *et al.*, 1999a), el mecanismo de activación sería poco relevante *in vivo*, sin embargo, el que las plantas tengan una CAK capaz de fosforilar y activar CDKs monoméricas (CDKF) (Tsakraklides y Solomon, 2002; Harashima y Schnittger, 2012), y que además otras

CDKs tipo D que actúan como CAKs puedan fosforilar a la CDK2 en su forma monomérica (Shimotohno *et al.*, 2004), hace interesante el estudio del mecanismo de activación, en el que primero la CDK se fosforila y posteriormente la ciclina se une para activar a la CDK, ya que podría contribuir de manera significativa a la activación de las CDKs en plantas.

7.4. El complejo *ZmCycD2;2-ZmCDKA1* fosforila diferencialmente diversos sustratos

Al momento de ensayar la activación de *ZmCDKA1* monomérica fosforilada (por Cak1p) por la adición de ciclina, fue muy evidente la fosforilación de esta última; dicha fosforilación se identificó desde que se ensayó la actividad de *ZmCDKA1* obtenida por la coexpresión con la ciclina y la CAK, sin embargo, apenas fue visible, lo cual indicaría que durante la coexpresión de las tres proteínas en la bacteria, la ciclina fue eficientemente fosforilada. En ensayos de actividad *in vitro* de complejos ciclina-CDK en levaduras, animales y plantas, a menudo se ha observado la fosforilación de la ciclina que forma parte del complejo, sin embargo, pocas veces se ha estudiado la función de dicha fosforilación (Booher *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1995; Kaldis *et al.*, 1998; Harashima *et al.*, 2016).

La fosforilación de un residuo de la ciclina en el complejo Cych-CDK7 estimula la actividad cinasa del complejo (Schneider *et al.*, 2002), mientras que en el complejo CycD1-CDK4 de humano, la fosforilación de la ciclina en el residuo de treonina 156 es necesario para la actividad del complejo (Diehl y Sher, 1997). Por lo anterior, se investigó si la fosforilación de la ciclina podría estar estimulando la actividad del complejo *in vitro*. *ZmCDKA1* monomérica fosforilada se preincubó con *ZmCycD2;2a* en presencia de ATP frío para que la ciclina pudiera ser fosforilada, posteriormente se adicionó histona H1 y ATP³² para evaluar el nivel de actividad de la CDK, mismo que fue comparado con la actividad de la CDK cuando todos los componentes en el ensayo se adicionaron al mismo tiempo. La fosforilación de la ciclina en presencia de ATP³² fue menor cuando esta se incubó previamente con ATP frío y la CDK monomérica

fosforilada, esto indicaría que durante la preincubación la ciclina se fosforiló, sin embargo, la fosforilación de la histona en el ensayo fue similar a la que se observó cuando la ciclina y la histona se agregaron al mismo tiempo para su fosforilación (resultados no mostrados). Será interesante fosforilar con el complejo Cyc-CDK activo a *ZmCycD2;2a*, y posteriormente recuperar a la ciclina para reconstituir la actividad de *ZmCDKA1* monomérica fosforilada, para así evaluar de manera más confiable si la fosforilación de la ciclina tiene alguna influencia en la activación de la CDK. Para el complejo CycD3;3-CDKA;3 de tabaco se ha descrito que la fosforilación de la ciclina es importante para la activación y la actividad cinasa del complejo (Nakagami *et al.*, 2002), por lo que no sería raro encontrar que *ZmCycD2;2a* fosforilada si tiene un efecto en la activación de *ZmCDKA1*. De cualquier manera, también existen otras funciones en las que podría influir la fosforilación de la ciclina, una de ellas podría ser el control del transporte del complejo dentro de la célula, como se ha observado para los complejos CycB-CDK1 y CycD1-CDK4 de humano y el complejo CycD3;3-CDKA;3 de tabaco, en los que la fosforilación de la ciclina es importante para el importe nuclear (Diehl y Sher, 1997, Nakagami *et al.*, 2002, revisado en Lindqvist *et al.*, 2009).

Interesantemente la fosforilación de la ciclina fue mejor que la fosforilación de la histona, tanto cuando se reconstituyó la actividad de la CDK a partir de *ZmCDKA1* monomérica fosforilada, como cuando se utilizó al complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* activado por la coexpresión con la Cak1p (**Fig. 13a**, carriles **6** y **9**). Lo anterior a pesar de que la concentración molar de ciclina utilizada en los ensayos de actividad fue de solo $\frac{1}{4}$ de la concentración utilizada de histona H1. Al realizar un análisis de la cantidad de sitios putativos de fosforilación por CDKs para cada sustrato con una herramienta bioinformática (análisis no mostrado) (Song *et al.*, 2017), solo se identificó un sitio de fosforilación en la ciclina, mientras que en la histona fueron tres los sitios identificados. Los sitios en la histona tienen la secuencia consenso de fosforilación por CDKs: TPXR (en el que la letra T indica la treonina blanco de fosforilación, la letra X representa cualquier aminoácido y la letra R representa al aminoácido básico arginina), mientras que el sitio identificado en la ciclina es una serina seguida de una prolina, entonces el sitio no sería una secuencia óptima de fosforilación, debido a la ausencia de un

aminoácido básico (lisina o arginina) en la posición +3, si se considera que la treonina blanco de fosforilación es la posición 0 (Holmes y Solomon, 1996) .

La secuencia consenso de fosforilación por CDKs se determinó principalmente para los complejos CycA-CDK2, CycE-CDK2, CycA-CDK1 y CycE-CDK2 de humano, los cuales mostraron una preferencia más o menos similar para fosforilar la secuencia consenso (Holmes y Solomon, 1996). Sin embargo, cuando se estudió la secuencia consenso de fosforilación para el complejo CycD1-CDK4, se observó en un péptido que contenía la secuencia consenso, que cuando la treonina blanco de fosforilación era antecedida por una alanina la eficiencia de fosforilación disminuía un 70%, incluso, el complejo fue incapaz de fosforilar a histona H1. Cuando en la secuencia consenso la treonina blanco de fosforilación se sustituyó por una serina, la eficiencia de fosforilación se incrementó un 100% (Kitagawa *et al.*, 1996). Lo anterior junto con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, sugiere que las preferencias de fosforilación por complejos que incluyen a ciclinas tipo D se conservan entre plantas y animales, ya que por una parte, en la histona que se utilizó para evaluar la actividad del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1*, todos los sitios putativos de fosforilación están precedidos por una alanina, lo que podría explicar porque la histona se fosforiló con menor eficiencia que *ZmCycD2;2a*, aunque cabe destacar que el complejo estudiado si pudo fosforilar a histona H1, de manera similar a lo que se ha reportado para otros complejos que incluyen a ciclinas D en plantas (Boniotto y Gutiérrez, 2001; Nakagami *et al.*, 2002; Koroleva *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2005). Por otra parte, el sitio de fosforilación que se identificó en *ZmCycD2;2a* mediante la herramienta bioinformática es una serina, que como se mencionó, es un residuo sobre el que el complejo CycD1-CDK4 de humano tiene una mayor eficiencia de fosforilación. Además de la serina identificada como posible blanco de fosforilación, *ZmCycD2;2a* tiene una serina más que se encuentra seguida de una prolina. La serina probablemente no se predijo como posible blanco de fosforilación debido a que no se encuentra en una región de alta accesibilidad, sin embargo, está cerca del extremo carboxilo terminal, mismo que podría sufrir algún cambio conformacional cuando la ciclina es reconocida por el complejo ciclina-CDK, lo que podría incrementar la exposición de los residuos favoreciendo su fosforilación.

La fosforilación de histona H1 por complejos CycD-CDKs en plantas, podría ser consecuencia de la plasticidad que se ha sugerido podrían tener los complejos ciclina-CDK que incluyen a ciclinas tipo D, para participar en otras fases del ciclo celular (Kono *et al.*, 2003, Koroleva *et al.*, 2004; Godínez-Palma *et al.*, 2013), lo cual implicaría la fosforilación de sustratos diferentes a RBR, que en su mayoría tiene residuos de serina como blanco de fosforilación (Boniotti y Gutiérrez, 2001; Kawamura *et al.*, 2006), similar a los blancos putativos de fosforilación encontrados en *ZmCycD2;2a*.

Se requieren hacer estudios más detallados para determinar si realmente existe una secuencia consenso diferente para complejos ciclina-CDK que incluyen a ciclinas tipo D. Lo anterior será de gran interés, ya que por lo general se asume que la secuencia consenso de fosforilación para las CDKs es la misma para todo tipo de complejos ciclina-CDK, sin embargo, en este trabajo los experimentos sugieren que podría no ser así, similar a lo que se determinó para el complejo CycD1-CDK4 de humano (Kitagawa *et al.*, 1996). Por otra parte, para complejos ciclina-CDK de plantas no existen estudios sobre las secuencias que se fosforilan preferencialmente, lo cual hace aún más interesante el estudio de la secuencia o las secuencias consenso de fosforilación de los complejos ciclina-CDK en plantas.

Cuando se evaluó la fosforilación de diferentes fragmentos de la proteína RBR, cuyo papel en la regulación de la transición G1/S en las plantas ha sido demostrado (Park *et al.*, 2005; Desvoyes *et al.*, 2006), no existió diferencia entre utilizar a la RBR que incluía solo el extremo carboxilo terminal (RBRCT) o a la RBR que incluía el dominio “pocket” y el extremo carboxilo terminal (RBRPC) (**Fig. 14**, carriles **8** y **9**). Parece haber una mejor fosforilación de la proteína que incluye el dominio “pocket”, sin embargo, la cantidad de proteína que se incluyó para realizar el ensayo se hizo con respecto a la banda de más alta masa (80 kDa), y no se consideró para la cuantificación un producto incompleto o de degradación que está por debajo de la banda de 80 kDa (ver **Apéndice, Fig. A23 a** y **b**, carril **5**), así que si solo se considera la banda de más alta masa se observa que ambos sustratos se fosforilan mas o menos a niveles similares. Cuando se realizó la fosforilación de RBRPC con el complejo *ZmCycD2;2-ZmCDKA1* parcialmente activado, fue más fácil observar que son dos bandas las que están siendo

fosforiladas y que el nivel de fosforilación entre RBRPC y RBRCT es muy similar (**Fig.14**, carriles **2** y **3**).

Tanto en plantas como en animales se ha determinado que la mayor cantidad de sitios blanco de fosforilación por CDKs en las proteínas RB y RBR se encuentran en el extremo carboxilo terminal (Connell-Crowley *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1999; Boniotti y Gutiérrez, 2001; Kawamura *et al.*, 2006). Además, en humanos se ha demostrado que diferentes complejos de ciclinas-CDKs fosforilan a la proteína de manera diferencial, tanto en el extremo amino terminal, como en el dominio “pocket” y el extremo carboxilo terminal (Connell-Crowley *et al.*, 1997; Zarkowska y Mitnacht, 1997), siendo la fosforilación de ciertos residuos del extremo carboxilo terminal, importante para impedir la interacción de RB con el factor de transcripción E2F (Knudsen y Wang, 1997). En humanos la fosforilación es mediada principalmente por el complejo CycD1-CDK4 (Connell-Crowley *et al.*, 1997), mientras que estudios en plantas indican que también complejos ciclina-CDKs que contienen a ciclinas tipo D, median la fosforilación de RBR para impedir su interacción con E2F (Boniotti y Gutiérrez, 2001; Nakagami *et al.*, 2002; Koroleva *et al.*, 2004). Tomando en cuenta lo anterior, tiene sentido el no haber observado una diferencia en la fosforilación de las dos versiones de RBR, ya que el complejo que se está utilizando incluye a una ciclina D, que dirigiría la fosforilación hacia los residuos que se encuentran principalmente en el extremo carboxilo terminal.

Es probable que no todos los sitios en RBRPC estén siendo fosforilados eficientemente, ya que a pesar de que RBRPC tiene siete sitios putativos de fosforilación por CDKs en su extremo carboxilo, el nivel de fosforilación que se observa entre RBR y CycD2;2 es muy similar (**Fig. 17a**, comparar carriles **6** y **8**). Cuando se analizó la secuencia de CycD2;2 para encontrar los sitios putativos de fosforilación, se observó la presencia de una secuencia RXL, dicho motivo ha sido reportado necesario para la fosforilación de ciertos residuos en la proteína p107 (un miembro de la familia de proteínas “pocket” a la que también pertenece RB) por el complejo CycD1-CDK4 (Leng *et al.*, 2002), entonces, la presencia del motivo RXL en *ZmCycD2;2a* podría favorecer su fosforilación, mientras que en RBRPC su ausencia podría explicar porque

la proteína no se fosforiló tan eficientemente a pesar de tener siete sitios putativos de fosforilación. Será interesante evaluar la funcionalidad del motivo en el reconocimiento de sustratos por complejos ciclina-CDK de plantas, ya que solo existen estudios en humanos y levaduras en los que se hace evidente la importancia de este motivo para que ciertos complejos ciclina-CDK reconozcan y fosforilen a sustratos que contienen el motivo (revisado en Ubersax y Ferrell, 2007).

7.5. Inhibición de la actividad de cinasa por la proteína Wee1 de maíz.

No en todos los eucariontes parece esencial el papel de Wee1 en el control de la transición G/2 M. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* la fosforilación de Cdc28 por la proteína Swe1 (homólogo de la proteína Wee1) en el residuo equivalente a la tirosina 15 y su posterior desfosforilación no son esenciales para la iniciación de la mitosis (Amon *et al.*, 1992). Sin embargo, la fosforilación se vuelve esencial para la viabilidad de la levadura en respuesta a perturbaciones en la morfología de la gema o del citoesqueleto de actina (McMillan *et al.*, 1998). En tales condiciones, la activación de Cdc28 es inhibida por el “checkpoint” de morfogénesis, una vía que previene la inactivación de Swe1, bloqueando con ello la entrada a mitosis (Revisado en Keaton y Lew, 2006). Adicionalmente, como fue previamente discutido en la introducción, la funcionalidad de Wee1 en plantas parece ser especie dependiente.

En maíz, se ha sugerido que Wee1 podría estar regulando la endorreproducción (Sun *et al.*, 1999), sin embargo, su papel como regulador del ciclo celular no ha sido estudiado. En el laboratorio donde se desarrolló esta tesis, se ha investigado, *in vivo*, si la fosforilación de las CDKs tipo A y B en el residuo equivalente a la Y15 controla su actividad. Para *ZmCDKA* se observó una clara correlación entre menores niveles de actividad y una putativa fosforilación en la Y15, sin embargo, a pesar de que *ZmCDKB1;1* fue activa, no existió una correlación entre la putativa fosforilación en la Y15 y una modificación de la actividad cinasa (Godínez-Palma, 2015). Este resultado en apariencia contradictorio, hace surgir la pregunta de si realmente la fosforilación de

las CDKs de maíz en los residuos equivalentes a la T14 y Y15 o en ambos, provoca la inhibición de la actividad cinasa.

Con lo anterior en mente, se evaluó el efecto de incubar al complejo *ZmCycD2;2-ZmCDKA1* (obtenido de la coexpresión con la *Cak1p*) con la proteína *ZmWee1*, y fue evidente que para obtener mayores niveles de inhibición fue necesaria la proteína intacta. Estudios de la proteína *Wee1* de humano han demostrado que en el extremo amino se encuentran aminoácidos importantes para que *Wee1* reconozca a sus sustratos, ya que cuando solo el dominio cinasa es utilizado para fosforilar a su blanco fisiológico: el complejo *CycB-CDK1*, el dominio cinasa es incapaz de fosforilar a la CDK, mientras que la proteína completa si fosforila a la CDK1 en el complejo (Parker *et al.*, 1992) ; por otra parte, cuando una versión de *Wee1* que carece de un fragmento del extremo amino es utilizada para fosforilar a la CDK1 monomérica, o a un péptido de 14 aminoácidos que contiene a la Y15 de la CDK1, la cinasa es capaz de fosforilar a los sustratos, en contraste, cuando se utiliza a la proteína *Wee1* completa para fosforilar a los mismos sustratos, en ambos casos la cinasa es incapaz de llevar a cabo la fosforilación (Parker *et al.*, 1995). Entonces, parece que al menos en maíz, la funcionalidad del extremo amino para que *Wee1* reconozca a sus blancos está conservada, además, como lo sugieren los estudios realizados en humano, la presencia del extremo amino terminal parece fundamental para una función con significado fisiológico. Cuando se realizó la purificación del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* a partir de la coexpresión del mismo con la proteína *ZmWee1L*, se observó la copurificación de ésta última (**Fig. 9b**, panel i, carriles 7, 8 y 9), por lo que para confirmar la funcionalidad del extremo amino en el reconocimiento del complejo ciclina-CDK, será necesario realizar la coexpresión del complejo *ZmCDKA1-ZmCycD2;2a* con *ZmWee1S*, y verificar en la purificación del complejo que una menor cantidad de *ZmWee1S* copurifica.

En el ensayo de inhibición de la actividad se observó la autofosforilación de *ZmWee1*, ya que cuando esta se agregó al ensayo de actividad solo con ATP³², apareció una señal a la altura tanto de *Wee1L* como de *Wee1S* (**Fig. 15a**, carriles 2 y 3). La autofosforilación de *Wee1* es algo que previamente se ha observado en ensayos de

fosforilación de CDKs utilizando Wee1 (Parker *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1995, Booher *et al.*, 1997). *In vivo*, tanto en humano como en *X. laevis*, se ha determinado que dicha autofosforilación es importante para la actividad de Wee1, sin embargo, se ha demostrado que la mutación de los sitios de autofosforilación de Wee1 en *X. laevis* no afectan la habilidad de Wee1 para fosforilar a la CDK1 *in vitro* (revisado en Perry y Kornbluth, 2007). Se tendrá que verificar si en *ZmWee1* la autofosforilación tiene algún efecto en su actividad.

En los ensayos en los que además de cualquiera de las dos versiones de *ZmWee1* se incluyó al complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* (activo), se observó un incremento en la señal de fosforilación de *ZmWee1*, lo que pudo deberse a dos posibilidades: la primera es que el complejo Cyc-CDK fosforile a *ZmWee1* directamente, y la segunda es que se estimule la autofosforilación de *ZmWee1* debido a la presencia del complejo. En el extremo carboxilo terminal de la proteína Wee1 de diferentes especies, existe un número considerable de sitios de fosforilación por CDKs (Kim y Ferrell, 2007), adicionalmente, en humano se ha reportado que *in vivo* el complejo CycB1-CDK1 fosforila y en consecuencia inhibe la actividad de Wee1 (Revisado en Wieser y Pines, 2015), aunque *in vitro* la fosforilación de Wee1 por el mismo complejo no tiene ningún efecto (Watanabe *et al.*, 1995). Entonces, en los ensayos realizados es probable que lo que está ocurriendo sea la fosforilación de *ZmWee1* por el complejo Cyc-CDK, ya que cuando el complejo está en presencia de *ZmWee1S*, que inhibió menos eficiente la actividad de la CDK, la fosforilación de *ZmWee1S* se incrementó; en contraste, la *ZmWee1L* que fue más eficiente para inhibir la actividad del complejo se ve menos fosforilada (**Fig. 15a**, comparar carriles **9** y **10**). No obstante, será necesario mediante mutantes catalíticamente inactivas, tanto de *ZmCDKA1* como de *ZmWee1*, definir a quien se debe el incremento en la fosforilación de *ZmWee1*, y de forma similar a la autofosforilación, definir si la fosforilación de *ZmWee1* por el complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1*, o un incremento de la autofosforilación tiene algún efecto en la actividad de *ZmWee1*.

Fue de llamar la atención que a pesar de que se observó la inhibición de la actividad del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1*, ni con *ZmWee1S*, ni con *ZmWee1L* se observó

una evidente fosforilación de *ZmCDKA1*. Cabe mencionar que cuando *ZmWee1L* se preincubó con ATP frío y el complejo ciclina-CDK activo, y posteriormente a la misma reacción se agregó ATP³² e histona para verificar la inhibición de la actividad de la CDK, no se observó una mayor inhibición, ni un patrón de fosforilación diferente, comparado a cuando todos los componentes se agregaron al mismo tiempo a la reacción (resultado no mostrado). Lo anterior se realizó con la finalidad de incrementar la fosforilación de la CDK por *ZmWee1L* y en consecuencia aumentar la inhibición, sin embargo, el no observar un incremento de la inhibición sugiere que realmente no hubo fosforilación de la CDK. Cabe mencionar que para el experimento descrito no se utilizó la máxima concentración de *ZmWee1L*, que fue capaz de abatir casi por completo la fosforilación de histona H1.

El que la histona y *ZmCDKA1* estén cercanas en peso podría estar dificultando observar la fosforilación de la CDK, sin embargo, cuando se utilizó un segundo sustrato (*ZmRBRPC*) para tratar de observar la fosforilación de la CDK al mismo tiempo que se inhibía su actividad, tampoco fue evidente la fosforilación de *ZmCDKA1* (**Fig. 16a**, carril **9**), mientras que se observó nuevamente que *ZmWee1L* fue mejor inhibiendo la actividad de la CDK que *ZmWee1S* (**Fig. 16a**, comparar carriles **8** y **9**), en este último caso, en apariencia *ZmWee1S* no parece estar inhibiendo la fosforilación de *ZmRBRPC*, sin embargo, hay que considerar que hay dos bandas que corresponden al sustrato y que la banda por debajo de 80 kDa se sobrelapa con la banda de fosforilación de *ZmWee1S*, entonces esto impidió observar la inhibición de la fosforilación de la proteína RBRPC de menor masa molecular.

A diferencia del abatimiento de la fosforilación por *ZmWee1* que se observó sobre RBRPC o sobre histona H1, la fosforilación sobre *ZmCycD2;2a* no fue inhibida con la misma eficiencia (**Fig. 17a**, comparar carriles **6** y **7**). Esto podría explicarse, como se mencionó anteriormente, por la aparente competencia que existe entre *ZmCycD2;2a* y *ZmWee1* por unirse a *ZmCDKA1*, que podría ser el mecanismo que estaría utilizando *ZmWee1* para inhibir la actividad cinasa de la CDK. Entonces, durante el ensayo de inhibición *ZmWee1L* desplazaría a la ciclina en el complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* (activo), formando el complejo *ZmWee1L-ZmCDKA1* que carecería de actividad, sin

embargo, al haber un exceso de ciclina en el ensayo ésta desplazaría el equilibrio hacia la formación del complejo ciclina-CDK, provocando una recuperación de la actividad. Para demostrar el mecanismo propuesto será importante realizar un ensayo con otro sustrato y la adición de un exceso de ciclina, lo que debería provocar que la actividad del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* no sea importantemente modificada por la adición de *ZmWee1*. También realizar los ensayos de actividad utilizando la mutante catalíticamente inactiva de *Wee1L*, corroboraría que *ZmWee1* es capaz de inhibir la actividad del complejo ciclina-CDK independientemente de su actividad cinasa.

En adición a lo anterior, otro mecanismo que podría ayudar a inhibir la actividad del complejo Cyc-CDK independientemente de la fosforilación de la CDK por *ZmWee1*, es que esta última actuara como un sustrato que se fosforila con poca eficiencia y se une con alta afinidad, este sería el caso de *ZmWee1L*; que interaccionó de manera estable con *ZmCDKA1* y no se fosforiló tan eficientemente como *ZmWee1S*. El mecanismo sugerido podría explicar porque *ZmWee1* inhibió con mayor eficiencia la fosforilación de la histona, que al parecer fue un peor sustrato, en comparación a la inhibición que se observó para la ciclina, misma que en experimentos anteriores pareció ser mejor sustrato que la histona; en consecuencia, sería más difícil para *ZmWee1* desplazar a la ciclina que a otros sustratos que se unen con menor afinidad al complejo ciclina-CDK. El mecanismo de inhibición sugerido también se ha propuesto para inhibidores que forman complejos de larga duración con complejos ciclina-CDK, y que al mismo tiempo son fosforilados por el complejo (Ferrell y Kim, 2007).

Los ensayos realizados sugieren que *ZmWee1* estaría inhibiendo la actividad cinasa del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1* independientemente de la fosforilación de la CDK. Esta forma de inhibición de CDKs por *Wee1*, es algo que se ha reportado previamente en *S. cerevisiae*. Aparentemente el mecanismo de inhibición en la levadura implica que *Swe1* se queda unido como un pseudosustrato al complejo ciclina-CDK, aunque la interacción es reversible (Booher *et al.*, 1993; McMillan *et al.*, 1999). Sin embargo, en este trabajo la interacción de *ZmWee1L* con *ZmCDKA1*, pareció ser más persistente, además los experimentos sugieren que *ZmWee1L*

desplazó a *ZmCycD2;2a* de *ZmCDKA1*, provocando con ello la caída de la actividad del complejo, por lo que *ZmWee1* estaría actuando por un mecanismo no descrito con anterioridad en otro sistema para inhibir la actividad del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA1*, aunque no se puede descartar que *ZmWee1L* también esté actuando como un pseudosustrato para el complejo Cyc-CDK.

Finalmente, la inhibición de la actividad basal del complejo *ZmCycD2;2a-ZmCDKA* que se observó cuando el complejo se purificó de la coexpresión con *ZmWee1* (**Fig. A21a**, comparar carriles **2** y **3**), podría deberse a que una menor cantidad de *ZmCycD2;2a* copurificó con *ZmCDKA1* (ver **Apéndice, Fig. 22c**, comparar carriles **4** y **8**). Adicionalmente, no se puede descartar que la fosforilación de la CDK por *ZmWee1*, y la presencia de esta interaccionando con el complejo ciclina-CDK estén contribuyendo a la inhibición de la actividad. La fosforilación de *ZmCDKA1* en el ensayo de actividad, podría estar mediada por la proteína *ZmWee1L* que copurificó con el complejo ciclina-CDK, y es probable que algo en la bacteria favorezca dicha fosforilación, ya que como se mencionó, en ninguno de los ensayos *in vitro* utilizando tanto a la CDK como al complejo Cyc-CDK purificado, fue evidente la fosforilación de la CDK por *ZmWee1*. Para que Swe1 fosforile a Cdc28 en el residuo equivalente a la Y15 de la CDK2, se ha reportado que primero es necesario que el complejo Clb2-Cdc28 fosforile a Swe1, la fosforilación de esta favorece su asociación al complejo y también su activación, para que posteriormente Swe1 fosforile a Ccd28 e inhiba su actividad (Harvey *et al.*, 2005). Un mecanismo similar que implique la fosforilación de *ZmWee1L* por el complejo *ZmCycD2;2-ZmCDKA1* para su activación, y que este mecanismo se vea favorecido en la bacteria por la coexpresión del complejo ciclina-CDK con *ZmWee1*, podría explicar porque en la bacteria si ocurrió la fosforilación de *la CDKA* por *ZmWee1*.

Estará por ser demostrado que la fosforilación de *ZmCDKA1* por *ZmWee1* inhibe su actividad; y si esto resultara cierto, *ZmWee1* dispondría de al menos dos mecanismos para inhibir la actividad de *ZmCDKA1*. El que pudiera actuar uno u otro mecanismo *in vivo*, podría depender de la concentración de *ZmWee1*. Tal vez a bajas concentraciones *ZmWee1* actúe fosforilando a las CDKs e inhibiendo su actividad, y dicho mecanismo sería dependiente de una ciclina unida a la CDK, ya que como se

demonstró en este trabajo, la fosforilación por *ZmWee1* se estimuló en presencia de *ZmCycD2;2a*. Para este mecanismo también podría ser importante qué tipo de ciclina está unida a la CDK, ya que como fue mencionado, existen reportes de que Wee1 solo fosforila e inhibe la actividad de CDKs en complejo con ciertas ciclinas. Por otra parte, a altas concentraciones de *ZmWee1*, la proteína podría actuar más como un inhibidor tipo KRP, y como se demostró en este trabajo, dado que aparentemente no es necesaria la presencia de la ciclina para la interacción de *ZmWee1* con *ZmCDKA1*, la inhibición sería hasta cierto punto independiente de la ciclina asociada a la CDK, tal vez solo importaría con qué afinidad se une la ciclina a la CDK para que pudiera o no ser desplazada con facilidad de la CDK por *ZmWee1*. Para este mecanismo tal vez sería importante la CDK, ya que estará por ser demostrado si *ZmWee1* interacciona con otras CDKs de maíz, p. ej. CDKs tipo B.

8. Conclusiones.

La metodología de coexpresión robusta permitió estudiar diferentes aspectos de la cinasa *ZmCDKA1*, entre los que destacan: su asociación *in vitro* con proteínas del ciclo celular, los mecanismos que pueden llevar a su activación, su preferencia para, en complejo con *ZmCycD2;2a*, fosforilar preferencialmente a ciertos sustratos, y la inhibición de su actividad por la cinasa *ZmWee1*.

Con respecto a la asociación, fue evidente que la sola presencia de *ZmCDKA1* y *ZmCycD2;2a* fue suficiente para su interacción, por otra parte, la CDK se asoció eficientemente a *ZmWee1* y en menor medida a la *Cak1p*. Los resultados de asociación entre la CDK, la ciclina y *Wee1* permitieron sugerir que estas dos últimas compiten por un mismo sitio para su asociación a la CDK, lo cual podría ser relevante en el mecanismo que estaría utilizando *ZmWee1* para inhibir la actividad cinasa de *ZmCDKA1*.

La coexpresión del complejo ciclina-CDK con la *Cak1p* permitió la eficiente reconstitución de la actividad de la CDK, lo que se debió en gran medida a la fosforilación de la CDK por la *Cak1p* (**Fig. 18a**). Cuando se identificó dicha fosforilación se determinó que el anticuerpo utilizado no fue muy específico, ya que este también identificó a la CDK que no estaba fosforilada, aunque en menor medida.

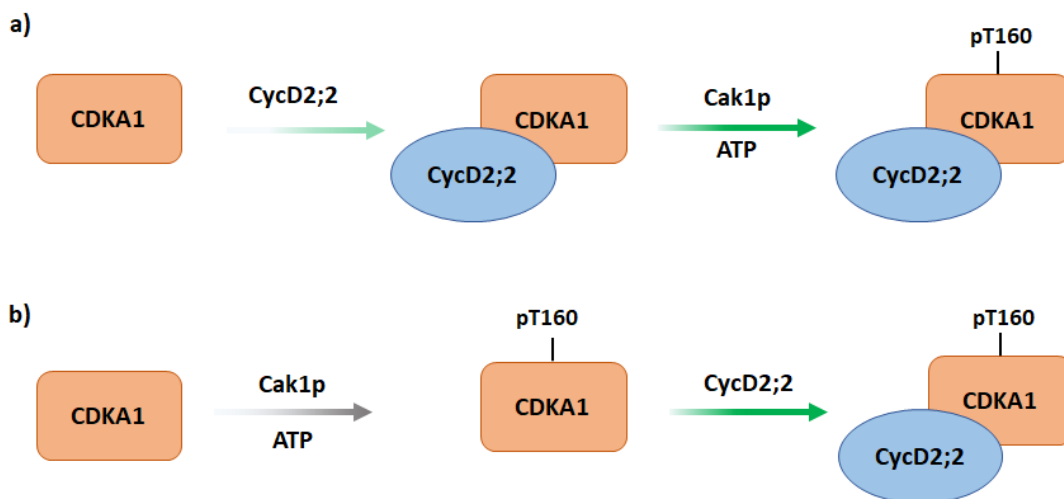


Figura 18. Mecanismos que llevan a la activación de *ZmCDKA1*.

Por otra parte, se determinó que se puede reconstituir la actividad de la CDK por su fosforilación por la Cak1p y la posterior asociación con *ZmCycD2;2a*, (**Fig. 18b**), dicho mecanismo podría ser relevante para la activación de la CDK in vivo, ya que al igual que en otras plantas, en maíz existen cinasas putativas que podrían fosforilar la forma monomérica de la CDK. Cuando se estudió la actividad de la CDK sobre diferentes sustratos se hizo evidente una cierta preferencia por la fosforilación de *ZmCycD2;2a*, que podría ser consecuencia del contexto en el que se encuentran los aminoácidos susceptibles de fosforilación, aunque será necesario realizar estudios más dirigidos que permitan sustentar lo anterior.

Finalmente, se tuvo éxito al inhibir la actividad cinasa de *ZmCDKA1* con la proteína *ZmWee1*, y el grado de inhibición dependió de una *ZmWee1* intacta y de su concentración. Con base en los estudios de asociación y los ensayos de actividad cinasa se sugiere que la inhibición no dependería de la actividad cinasa de *ZmWee1*; en su lugar, *ZmWee1* desplazaría a la ciclina del complejo ciclina-CDK, lo que provocaría la caída de la actividad de la CDK (**Fig. 19a**). Adicionalmente, no se pudo determinar si la fosforilación de *ZmCDKA1* por *ZmWee1*, que pudo ser detectada exitosamente mediante un anticuerpo comercial, pudo contribuir a reducir la actividad cinasa de la CDK mediante el mecanismo que se ha reportado clásicamente (**Fig. 19a**).

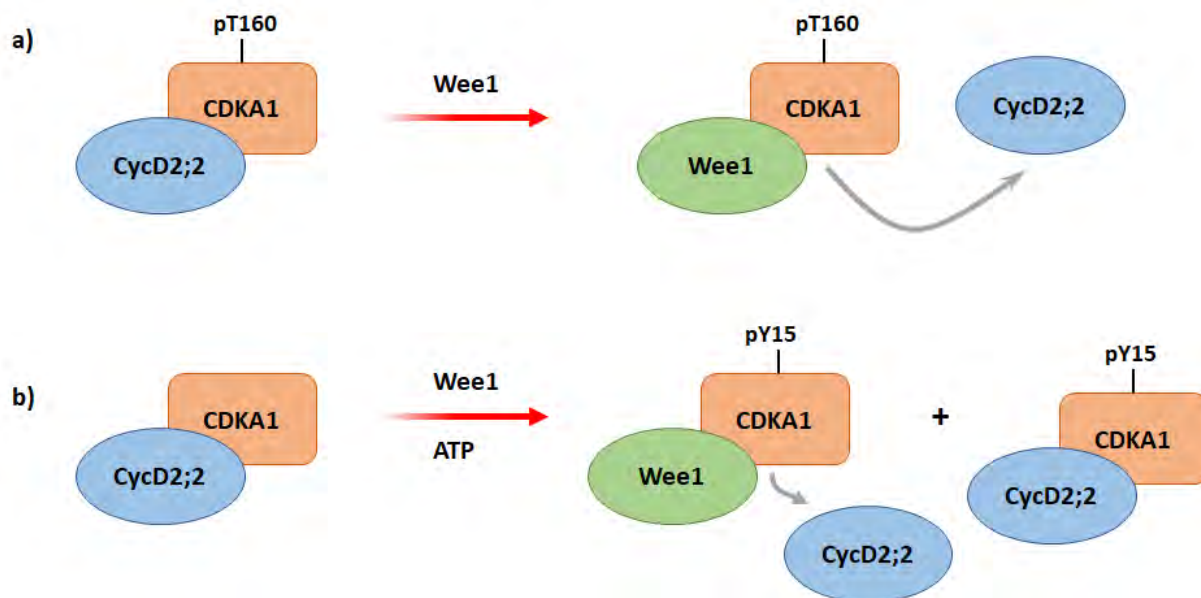


Figura 19. Mecanismos que inhibirían la actividad de *ZmCDKA1*.

9. Materiales y métodos

9.1. Material biológico

9.1.1. Ejes embrionarios

Los ejes se extrajeron de semillas de maíz (*Zea mays* var. Chalqueño) que se encontraban almacenadas a 4° C; previo a su imbibición, los ejes fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y agua desionizada estéril.

9.1.2. Cepas

Para la clonación de los plásmidos de clonación y expresión se utilizó la bacteria *E. coli* cepas: XL10-GOLD, XL1-BLUE. TOP-10 y DB3.1; mientras que para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó a la bacteria *E. coli* cepa Tuner.

9.1.2. Plásmidos

La clonación de *ZmCDKA* y *ZmCYCD2;2-malE* se realizó en el vector pGEM-T Easy (Promega®) (ver **Apéndice, Esquema A1**); éste contiene como marcador de selección a una secuencia que codifica para un fragmento la β -galactosidasa, la cual facilitó la identificación de colonias que contenían al vector con el inserto que se deseaba clonar. Posteriormente, las secuencias clonadas en pGEM-T Easy se subclonaron al vector pCDFDuet-1 (Novagen®, cat: 71340-3) (ver **Apéndice, Esquema A2 y A3**) para su expresión. Por otra parte, tanto *Cak1* como ambas versiones de *ZmWee1* (S y L) se clonaron en el vector de entrada pENTR (Invitrogen®, cat: K2400-20) y posteriormente las secuencias codificantes clonadas se recombinaron al vector pDEST15 (Invitrogen®, cat: 11802014) (ver **Apéndice, Esquema A6**) para su expresión.

9.1.3. Cultivos bacterianos

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) (Invitrogen®) con los antibióticos requeridos a las concentraciones indicadas en la **Tabla I**. Cuando en el cultivo se requirió utilizar más de un antibiótico debido a la presencia de más de un plásmido en la bacteria, se utilizó la mitad de la concentración de cada antibiótico.

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Ampicilina	100
Estreptomina	50
Cloranfenicol	35
Kanamicina	50

Tabla I. Concentraciones de antibióticos utilizadas durante los cultivos.

La incubación de precultivos se realizó a una temperatura de 37° C a 150 revoluciones por minuto (rpm) por 16 horas; mientras que cuando en el cultivo se realizó la inducción de proteína recombinante, la agitación se aumentó a 200 rpm. Los cultivos de volúmenes pequeños (≤ 5 mL) se incubaron en tubos de ensayo de 18 mm X 100 mm, mientras que para volúmenes grandes (≥ 50 mL) se emplearon matraces Erlenmeyer con un volumen de al menos tres veces el volumen utilizado de medio de cultivo. Los cultivos sólidos se realizaron en cajas Petri de plástico con agar; tanto el caldo como el agar LB se esterilizaron en autoclave con calor húmedo. Cuando el agar LB se utilizó para monitorear la clonación en pGEMT-Easy®, se adicionó X-gal (SIGMA-ALDRICH®, cat: 10745740001) (previamente disuelto en N,N-dimetilformamida) a una concentración final de 20 µg/mL, IPTG (Calbiochem®, cat: 420322) a una concentración final de 0.5 mM y ampicilina (100µg/mL), previo descenso de la temperatura ($\approx 40^\circ$ C). Para el resto de cultivos que requirieron agar LB más algún antibiótico, este último se disolvió en una disolución “stock” conforme a lo indicado por el fabricante y posteriormente se adicionó a las cajas con agar, de acuerdo a la concentración indicada en la **Tabla I**.

9.1.4. Imbibición de ejes embrionarios.

En una campana de flujo laminar, los ejes embrionarios desinfectados fueron colocados en cajas Petri de plástico estériles que contenían un papel filtro (estéril) en el fondo, previamente humectado con 1 mL de solución amortiguadora (estéril) de imbibición (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, sacarosa 2% p/v, pH 7.4). Las cajas se cerraron e incubaron a 25° C en una estufa por 6, 12, 24 o 36 h.

9.2. Técnicas generales.

9.2.1.1. Electroforesis de DNA

Para monitorear el DNA proveniente de la extracción de plásmido, de las reacciones de amplificación y de las de digestión de DNA, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 0.9%. El gel se preparó con solución amortiguadora TAE 1X (Tris 50mM, acetato de sodio 1mM, EDTA 2mM) pH 8.5 y agarosa (Invitrogen®); la mezcla se calentó en un horno de microondas y se agitó hasta la total disolución de la agarosa; por cada 100 mL de disolución se adicionaron 5 µL de bromuro de etidio (10mg/mL).

Según el volumen a cargar en cada pozo, a cada muestra se adicionó amortiguador de carga para DNA 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen cianol FF, 30% de glicerol en agua) para una concentración final 1X. Posteriormente, se agregó solución amortiguadora TAE 1X a la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel y las muestras se cargaron en los pozos del gel; finalmente, la electroforesis se corrió a 85 volts (V). El gel se observó en un transiluminador (UV-Transilluminator, UVP inc) y los geles se fotodocumentaron en un equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

9.2.1.2. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.

La purificación de productos de amplificación o digestión de DNA se realizó con el kit comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymoresearch®, cat: D4001), siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.2.1.3. Purificación de DNA plasmídico

La purificación de plásmidos (vectores de clonación y de expresión) se realizó con el kit comercial Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymoresearch®, cat: D4036), siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.2.1.4. Preparación de células competentes

Las células competentes de las cepas utilizadas se prepararon inoculando 3 mL de medio LB con la cepa correspondiente; posteriormente, el cultivo se creció toda la noche (O/N) a 37° C y 150 rpm. Del precultivo se tomaron 0.5 mL para inocular 50 mL de medio LB (estéril) contenido en un matraz Erlenmeyer y éste se incubó 3 h a 37° C en agitación constante (150 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación, el matraz se incubó en hielo por 15 minutos y después el cultivo se vertió a un tubo Falcon estéril. El tubo se centrifugó a 5000 rpm, durante 10 minutos (4° C). El “pellet” se resuspendió cuidadosamente en 20 mL de cloruro de calcio 0.1 M y posteriormente las células se volvieron a incubar en hielo por 20 minutos. Nuevamente los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos (4° C) y el “pellet” se resuspendió cuidadosamente en 1.5 mL de cloruro de calcio 0.1 M (glicerol 15% v/v). El volumen final se repartió en alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf de 1.5 mL y luego los tubos se incubaron en hielo durante una hora. Finalmente, los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido y las células fueron almacenadas a -70° C.

9.2.1.5. Transformación de células competentes

La transformación de una alícuota de células competentes con los productos de ligación se realizó con el volumen indicado posteriormente para cada tipo de reacción de ligación; mientras que cuando se utilizó plásmido cerrado para transformar, se utilizaron 5 ng del mismo. Por otra parte, para las cotransformaciones se utilizaron 100 ng de cada plásmido. El DNA se homogenizó cuidadosamente con las bacterias y posteriormente, las bacterias se incubaron en hielo durante 30 minutos; a continuación, se aplicó un choque térmico a 42° C durante el tiempo estipulado por el fabricante para cada cepa (alrededor de 30 segundos) y cada tubo se incubó en hielo por 2 minutos más. Se añadieron 0.9 mL de medio LB (sin antibiótico) y las bacterias se recuperaron durante 80 minutos en agitación (150 rpm) a 37° C.

Cuando se transformó con los productos de ligación, las bacterias se centrifugaron por 1 minuto a 4000 rpm, se desecharon 900 µL del medio de cultivo y las células se resuspendieron en el medio restante, para posteriormente plaquear todo el volumen

en cajas Petri con agar LB y antibiótico. Cuando la transformación se realizó con plásmido cerrado, directamente se tomaron 50 μ L de las bacterias recuperadas en el medio LB y éstas se plaquearon en agar LB con antibiótico. Finalmente, las cajas Petri inoculadas se incubaron O/N a 37° C.

9.2.1.6. Extracción de RNA

Los ejes embrionarios o los tejidos obtenidos a partir de la mazorca, fueron utilizados para la obtención de RNA, el cual se extrajo con el reactivo TRIzol® (Invitrogen®, cat: 15596026) de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante. La integridad del RNA se monitoreó en un gel de agarosa al 1.5% y posteriormente el RNA fue cuantificado.

9.2.1.7. Obtención de cDNA

2 μ g de RNA fueron digeridos con DNAasa I (grado amplificación) (SIGMA-ALDRICH®, cat: AMPD1-1KT) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al RNA se le agregaron 2 μ L de una mezcla de oligo dT (500 μ g/mL) y la mezcla con el RNA se incubó por 5 minutos a 70° C, concluida la incubación la mezcla se sumergió inmediatamente en hielo. La retrotranscripción se realizó con la transcriptasa reversa M-MLV (Promega®, cat: M1701) y se siguieron las instrucciones del fabricante para su realización; dicha retrotranscripción se llevó a cabo a 37° C durante una hora.

9.2.1.8. Amplificación de DNA

Para la amplificación del DNA que codificaría para las proteínas que se deseaba clonar o subclonar, se diseñaron cebadores con ayuda de los programas AmpliFX v.1.7.0 y Oligo7 v.7.57. Según se requirió, a los cebadores que servirían para clonar a las secuencias que codifican para las proteínas CDKA1 y CycD2;2-MBP se les agregó, en su extremo 5', secuencias que son reconocidas por diversas enzimas de restricción; lo anterior con la finalidad de realizar una clonación dirigida en los vectores de expresión. Por otra parte, a los cebadores que amplificarían a las secuencias *Wee1* (S y L) y *Cak1* se adicionaron secuencias específicas para su clonación dirigida en el vector pENTR/D-TOPO. Lo anterior de acuerdo a las instrucciones del fabricante (**Tabla II**).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción	Temperatura de alineamiento (°C)
Fwd CDKA	GGATCCGGAGCAGTACGAGAAGGTG	<i>Bam</i> HI	61
Rev CDKA	CTTAAGCCTGTACCACTTCAAGGTC	<i>Afl</i> III	57
Fwd CYCD2	CATATGGTGCCTGGCTATGACT	<i>Nde</i> I	56
Rev CYCD2	AGAGTTACCCAAAGAATTGCCAGTGATCCTTCTCCTTGC	N/A	67
Fwd MBP	GGCAATTCTTTGGGTAAGTCTTCGGCTCTCGCCAAAATCG	N/A	68
Rev MBP	CCTAGGCTTTCAGGGCTTCATCGACA	<i>Avr</i> II	62
Fwd WEE1	CACCATGCTGAGGACCAAGACCC	N/A	61
Fwd2 WEE1	CACCTTCTGCACCCCGGACTACAT	N/A	62
Rev WEE1	CTACTTCGATGAGGCCTTGT	N/A	53
Fwd Cak1	CACCATGAAACTGGATAGTATAGACA	N/A	54
Rev Cak1	TTATGGCTTTTCTAATTCTTGC	N/A	49

Tabla II. Cebadores diseñados para la clonación de secuencias codificantes. (N/A) No aplica.

Una serie más de cebadores fue utilizada. Dichos cebadores son comerciales y sirvieron para amplificar las secuencias clonadas en los vectores de clonación y expresión (**Tabla III**).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Templado	Temperatura de alineamiento (°C)
Fwd M13	GTAAAACGACGGCCAG	pENTR	49
Rev M13	CAGGAAACAGCTATGAC		46
DuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	pCDFDuet-1	57
DuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACAA		55
DuetUP2	TTGTACACGGCCGATAATC		55
FwdT7	TAATACGACTCACTATAGGG	pGEMT-Easy	68
T7 Terminador	GCTAGTATTGCTCAGCGG	pDEST15 pCDFDuet-1	53

Tabla III. Cebadores utilizados para la amplificación de secuencias clonadas en plásmidos.

Los cebadores mostrados en las tablas **II** y **III** se mandaron a sintetizar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM. La temperatura de alineamiento utilizada para los pares de cebadores se calculó con ayuda de los programas AmpliFX

(<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx>) y Oligo7 (Rychlik, 2007). La amplificación del DNA que codifica para las proteínas *ZmCDKA1*, *ZmCycD2;2*, MBP y la Cak1p se realizó a partir de los vectores: pPROEX-*ZmCDKA*, pGEX4T2-*ZmCYCD2;2*, pMALc-5x y pCDFDuet-1**AtCDKA-GSTCak1* (Harashima y Schnittger, 2012), respectivamente; mientras que la amplificación de *ZmWee1* se realizó a partir del cDNA obtenido en la retrotranscripción.

La amplificación de las secuencias codificantes para su clonación en los vectores de clonación se realizó con la enzima iProof™ HF Master Mix (BIO-RAD®, cat: 172-5310); mientras que para identificar bacterias que tuvieran los plásmidos con las secuencias de interés, se utilizó la enzima JumpStart™ Taq ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH, cat: P2893). Las condiciones utilizadas para cada enzima se indican en la **Tabla IV**.

Mix	Condiciones
iProof™ HF Master Mix	30 s 98°C. 35 ciclos (10 s a 98 °C, 20 s a 53-58 °C, 45s a 72 °C) 10 min 72°C
JumpStart Taq Ready Mix.	2 min a 94 °C. 35 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 53-58°C, 30 s a 72°C) 5 min 72°C

Tabla IV. Condiciones utilizadas para las PCRs.

9.2.1.9. Fusión de *ZmCycD2;2a* y *malE*

Para la fusión de las secuencias codificantes, tanto *ZmCycD2;2a* como *malE* se amplificaron de forma independiente con los pares de cebadores Fwd CYCD2-Rev CYCD2 y Fwd MBP-Rev MBP, respectivamente (**Tabla III**); posteriormente, las reacciones de amplificación se corrieron en geles de agarosa y las bandas que correspondieron a la amplificación de *ZmCycD2;2a* y *malE* se escindieron y purificaron. A continuación, cada secuencia codificante amplificada y purificada se incluyó en una PCR que incluyó también a los cebadores Fwd CYCD2 y Rev MBP (**Tabla III**). Finalmente, el producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa y la banda que correspondió en tamaño a los genes fusionados se cortó y purificó para su posterior adenilación y ligación al vector pGEMT-Easy. Para un esquema más detallado del proceso de fusión, consultar el **Esquema A7** (ver **Apéndice**).

9.2.1.10. Adenilación de DNA

Las secuencias *ZmCDKA1* y *ZmCycD2;2a-malE* amplificadas con la enzima iProof y que se ligaron posteriormente a pGEMT-Easy, fueron adenilados previo a su ligación de la siguiente manera: se preparó una reacción que contenía el DNA que se iba a adenilar (100 ng), 1 µL de dATP (2mM), 1 µL de Taq DNA polimerasa (5 U/µL) (Invitrogen®, cat: 10342-020), 1 µL de PCR Buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen®) y agua inyectable estéril c.b.p. 10 µL. La reacción se incubó a 70° C durante 30 minutos y finalmente, el volumen necesario de reacción que contenía la cantidad de DNA necesario para la ligación con pGEMT-Easy, se utilizó directamente.

9.2.1.11. Ligación a pGEMT-Easy

El DNA amplificado, purificado y adenilado se ligó a pGEM-T Easy, utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1 y a la ligasa de DNA T4 (Promega®, cat: M1804). La reacción se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y ésta se incubó por al menos 20 h a 4° C. Posteriormente, 5 µL de la reacción se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* cepa XL-10 y finalmente, las células se plaquearon e incubaron en cajas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL) O/N a 37° C.

9.2.1.12. Ligación a pENTR/D-TOPO

La ligación a pENTR se realizó mediante el kit pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit (Invitrogen®, cat: K2400-20); se siguieron las instrucciones indicadas en el kit para llevar a cabo la ligación, utilizando una relación 1:1 de inserto y vector. 2 µL del producto de la ligación se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* cepa TOP-10. Las células se plaquearon posteriormente en cajas de agar LB con kanamicina (50 µg/mL) e incubadas O/N a 37° C.

9.2.1.13. Ligación a pCDFDuet-1

Después de verificar que tanto *ZmCDKA1* como *ZmCycD2;2a-malE* se habían clonado correctamente en pGEMT-Easy, se realizó su escisión del vector con la combinación de enzimas *Bam*HI-*Afl*I y *Nde*I-*Avr*II, respectivamente. La restricción se separó por una electroforesis en gel de agarosa al 0.9% y las secuencias codificantes escindidas

durante la restricción se purificaron a partir del gel de agarosa. Las secuencias se ligaron al vector de expresión pCDFDuet-1, previa digestión de éste con las mismas enzimas de restricción utilizadas para escindir el inserto del vector de clonación. Para la ligación se utilizó a la ligasa de DNA T4 y una relación molar 3:1 de inserto y vector; la reacción se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se incubó al menos durante 14 h a 4° C. Células competentes de *E. coli* cepa XL10-GOLD o XL1-BLUE fueron transformadas con 4 µL de la reacción de ligación y luego plaqueadas en cajas de agar LB con estreptomycin (100 µg/mL) e incubadas O/N a 37° C.

9.2.1.14. Recombinación con pDEST15

Las secuencias codificantes clonadas en pENTR fueron recombinadas al vector pDEST15, utilizando la LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen®, cat: 11791), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Tras 90 minutos de incubación a temperatura ambiente, la clonasa se inactivó adicionando 1 µL de proteinasa K (2 µg/µL) (Invitrogen®, cat: 25530049). La reacción fue incubada 10 minutos a 37° C y 1 µL de la reacción se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* cepa XL1-BLUE y TOP-10. Las células se plaquearon en cajas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron O/N a 37° C.

9.2.2.1. Sobreexpresión de proteína recombinante

Para obtener a las proteínas expresadas o coexpresadas, las diferentes construcciones realizadas o plásmidos se transformaron o cotransformaron en células de *E. coli* cepa Tuner, de acuerdo al esquema mostrado en la **Tabla V**.

Realizada la selección con el antibiótico señalado en la **Tabla V**, una colonia se picó y creció en medio LB con el antibiótico adecuado O/N y a 37° C. Posteriormente, 150 mL de medio LB con antibiótico se inocularon con 1.5 mL de precultivo y el cultivo se dejó crecer hasta una densidad de entre 0.4 y 0.6; a continuación, se agregó la cantidad necesaria de IPTG para una concentración final de 0.05 mM.

Después de la adición de IPTG, el cultivo se dejó crecer por 4 h y posteriormente las bacterias se cosecharon a 4000 g por 10 minutos a 4° C. La inducción de Cak1p se

realizó de acuerdo a lo reportado por Kaldis *et al.*, (1996): brevemente, el cultivo se creció durante 3 h a 37° C y luego se continuó el crecimiento a 16° C durante 1.5 h; posteriormente, se adicionó la cantidad necesaria de IPTG para una concentración final de 0.05 mM y la inducción de proteína se realizó durante 29 h a 16° C. Por otra parte, los cultivos en los que la Cak1p se coexpresó con alguna otra proteína, se realizaron de acuerdo a lo que se describió inicialmente.

Construcción	Proteína(s)	Resistencia
pCDFDuet1* <i>ZmCDKA1</i>	His- <i>ZmCDKA1</i>	Estreptomicina
pCDFDuet1* <i>ZmCycD2;2a-MBP</i>	<i>ZmCycD2;2a-MBP</i>	Estreptomicina
pCDFDuet1* <i>ZmCDKA1</i> * <i>ZmCycD2;2a-MBP</i>	His- <i>ZmCDKA1</i> y <i>ZmCycD2;2-MBP</i>	Estreptomicina
pDEST15* <i>Cak1</i>	GST- <i>Cak1p</i>	Ampicilina
pDEST15* <i>Wee1L</i>	GST- <i>ZmWee1L</i>	Ampicilina
pDEST15* <i>Wee1LS</i>	GST- <i>ZmWee1S</i>	Ampicilina
pGEX-4T2	GST	Ampicilina
pMALc-5X	MBP	Ampicilina
pCDFDuet1* <i>ZmCDKA1</i> * <i>ZmCycD2;2a-MBP</i> + pDEST15* <i>Cak1</i>	His- <i>ZmCDKA1</i> , <i>ZmCycD2;2-</i> MBP y GST- <i>Cak1p</i>	Estreptomicina y Ampicilina
pCDFDuet1* <i>ZmCDKA1</i> * <i>ZmCycD2;2a-MBP</i> + pDEST15* <i>Wee1L</i>	His- <i>ZmCDKA1</i> , <i>ZmCycD2;2-</i> MBP y GST- <i>Wee1L</i>	Estreptomicina y Ampicilina
pCDFDuet1* <i>ZmCDKA1</i> + pDEST15* <i>Cak1</i>	His- <i>ZmCDKA1</i> y GST- <i>Cak1p</i>	Estreptomicina y Ampicilina
pCDFDuet1* <i>ZmCDKA1</i> + pDEST15* <i>Wee1L</i>	His- <i>ZmCDKA1</i> y GST- <i>ZmWee1L</i>	Estreptomicina y Ampicilina
pCDFDuet1* <i>ZmCDKA1</i> * <i>ZmCycD2;2a-MBP</i> + pGEX-4T2	His- <i>ZmCDKA1</i> , <i>ZmCycD2;2-</i> MBP y GST	Estreptomicina y Ampicilina

Tabla V. Plásmidos o combinaciones de plásmidos utilizadas para la expresión o coexpresión de proteínas recombinantes.

9.2.2.2. Purificación de proteína recombinante

La purificación de la CDKA1 expresada sola o en conjunto con otras proteínas se realizó mediante una resina de Ni-NTA Agarosa (QIAGEN®, cat: 30210), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones al protocolo de purificación. Las bacterias provenientes de un cultivo de 150 mL se resuspendieron en una disolución de amortiguador LEW 1X (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) (5 mL) con glicerol (10% v/v); a continuación, las bacterias se incubaron con 10 unidades de lizosima

(SIGMA-ALDRICH®, cat: L6876) por 30 minutos a temperatura ambiente; al lisado se le agregó β -mercaptoetanol e imidazol, para una concentración final de 5 mM y 25 mM, respectivamente, y el lisado se sonicó (SONICS Vibra Cell®, VC 505) a una amplitud del 20%, con 5 pulsos de 20 segundos (20 segundos entre cada pulso). Posteriormente, al lisado se le adicionó Triton X-100 para una concentración final de 1% (v/v) y luego se incubó a 4° C durante 20 minutos en agitación. El lisado se centrifugó por 40 minutos a 12 000 g; a continuación, la fracción soluble se filtró por una membrana de 0.45 μ m (Millipore®, cat: HAWP02500) y se incubó durante 1 hora con la resina de Ni-NTA Agarosa (200 rpm). La resina se lavó (10 mL, cuatro veces) con amortiguador LEW 1X suplementado con imidazol (25 mM), β -mercaptoetanol (5 mM), Triton X-100 (1% v/v) y glicerol (5% v/v); para los lavados y el resto de la purificación se utilizó una columna desechable (Pierce®, cat: 29922), se realizaron dos lavados más (10 mL c/u) con amortiguador LEW 1X suplementado con glicerol a una concentración final de 5% (v/v). Finalmente, la proteína se eluyó de la resina con 750 μ L de amortiguador LEW 1X suplementando con imidazol y glicerol para una concentración final de 250 mM y 5% (v/v), respectivamente; la elución con el amortiguador se repitió 5 veces, y en cada elución el eluato se colectó y almacenó a 4° C para su posterior diálisis.

La purificación de las proteínas que tenían como “tag” a GST (Cak1p, Wee1, RBRPC y GST) se realizó por columna, con una resina de glutatión agarosa (SIGMA-ALDRICH®, cat: G4510), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Por otra parte, tanto CycD2;2a-MBP como la MBP, se purificaron por columna con una resina de amilosa agarosa (NEB®, cat: E8021S), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

9.2.2.3. Diálisis, concentración y cuantificación de proteína

Las disoluciones de proteína recombinante se colocaron en bolsas de diálisis de 16 mm de diámetro y 3.5 kDa de corte molecular (Snake Skin® Thermo® cat: 88242), previa hidratación de las mismas en agua. Posteriormente, las bolsas se colocaron en un volumen de amortiguador de diálisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 0.5 mM, glicerol 5% v/v) de al menos 500 veces el volumen contenido en la bolsa de diálisis. Las proteínas se dializaron por 4 h en agitación a 4° C. Concluido el tiempo

de incubación, el amortiguador de diálisis se reemplazó por amortiguador fresco y se continuó la diálisis por 4 horas más.

Las proteínas se concentraron en unidades de filtración-centrifugación (Millipore® Amicon Ultracel®-10K cat: UFC501024), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de la concentración de un volumen de 400 µL, el volumen concentrado se recuperó para evitar la pérdida de proteína por su adhesión a la unidad de filtración. Todos los volúmenes concentrados que correspondían a una misma proteína o complejo de proteínas se colectaron en un mismo tubo; luego de lo cual se dividieron en alícuotas para su congelación en nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a -70° C. Para la cuantificación, se descongeló una de las alícuotas de proteína y ésta se corrió, junto a cantidades conocidas de BSA (500, 250, 125, 62.5 y 32.5 ng) (BIO-RAD® cat: 500-0207) en una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). El gel se tiñó con una disolución de azul Coomassie (Sambrook *et al.*, 1989) y se fotodocumentó en un equipo ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad®); posteriormente, las bandas se analizaron y cuantificaron con el software Image Lab™ (Bio-Rad®) y se determinó la concentración de las proteínas.

9.2.2.4. Electroforesis de proteínas

Para verificar la presencia de proteínas y los ensayos de “western blot”, se realizó una SDS-PAGE. El gel se preparó a una concentración de 8.5 %, como se indica en Sambrook *et al.*, 1989, y se corrió a 85 V hasta que el frente de corrida pasó el gel concentrador; luego, el voltaje se aumentó a 107 V hasta la finalización de la electroforesis. El amortiguador de electrodos utilizado fue Tris-glicina-SDS 1X (glicina 250 mM, Tris 25 mM, SDS 0.1% p/v) (Sambrook *et al.*, 1989).

Antes de ser corridas en los geles, las muestras se prepararon añadiendo amortiguador de carga para proteínas 4X para una concentración final 1X (SDS 2%, β-mercaptoetanol 2mM, glicerol 4%, Tris-HCl pH 6.8 40mM, azul de bromofenol 0.01%) y posteriormente, las muestras se desnaturalizaron a 87° C por 8 minutos.

9.2.2.5. Western blot.

Para los ensayos de “western blot”, las muestras se corrieron en una SDS-PAGE y, posteriormente, las proteínas en los geles se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (0.45 μ m) Transfer Membrane (Millipore®) por el método de transferencia húmeda en un equipo Mini Trans-Blot® Cell (BIO-RAD®) (número de catálogo: 170-3930). La transferencia se realizó en amortiguador A (glicina 192 mM, Tris 25 mM, pH 8.3) por una hora, a un voltaje constante de 100 V y en agitación.

Las membranas fueron bloqueadas con una disolución al 10% (p/v) de leche en PBS 1X (NaCl 300 mM, fosfatos 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4), Tritón X-100 0.16% (v/v) por 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución indicada en la **Tabla VI**. Cuando se identificó la fosforilación de proteína con los anticuerpos α -pT14-pY15 y α -pT160, las membranas se bloquearon con una disolución al 30% (v/v) de suero fetal bovino en PBS 1X. En ambos casos, después del bloqueo, la incubación con el anticuerpo primario se realizó en una disolución de PBS 1X, Tritón X-100 0.16% (v/v) durante una hora a temperatura ambiente.

Anticuerpo	Dilución de primario	Dilución de secundario
α -PSTAIRE	1: 30 000	1: 30 000
α -MBP	1:40 000	1: 30 000
α -GST	1: 20 000	1: 20 000
α -pT14-pY15	1: 2000	1: 20 000
α -pT160	1: 5000	1: 20 000

Tabla VI. Diluciones de anticuerpo primario y secundario utilizadas en los ensayos de “western blot”.

Concluida la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron cuatro lavados de 8 minutos con PBS 1X, Tritón X-100 0.16% (v/v) y luego las membranas se incubaron con anticuerpo secundario α -conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology), a la dilución indicada en la **Tabla VI**, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación, con PBS 1X, Tritón X-100 0.16% (v/v); posteriormente, los cuatro lavados de 8 minutos se repitieron. Finalmente, las membranas se bañaron con

0.5 mL de solución de detección por quimioluminiscencia, preparada por la mezcla de dos disoluciones en una proporción 1:1 (disolución A: luminol 5mM, ácido p-cumárico 0.4 mM, Tris 100 mM, pH 8.6; disolución B: H₂O₂ 0.036% v/v, Tris 100 mM, pH 8.6). La fotodocumentación se realizó mediante el equipo ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad®) y las imágenes se analizaron con el “software” ImageLab™ (Bio-Rad®).

9.2.2.6. Ensayo de fosfatasa.

200 ng de *ZmCDKA1* se incubaron con 400 unidades de fosfatasa λ (NEB®, cat: P0753S) en amortiguador NEB para Proteínas Metalofosfatasas (NEB®) (concentración final 1X) y agua c.b.p. 15 µL. La reacción se incubó durante 1 hora a 30 °C y posteriormente, se adicionaron 5 µL de amortiguador de carga para proteínas 4X para detener la reacción. Por último, las muestras se desnaturalizaron, se corrieron en una SDS-PAGE para su posterior transferencia a una membrana y la fosforilación se analizó por “western blot”.

9.2.2.7. Ensayo de actividad cinasa.

La cantidad indicada de proteína para cada ensayo de actividad se colocó en amortiguador de cinasa (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, EGTA 1mM, DTT 1mM), junto con alguno de los siguientes sustratos: 250 ng de Histona H1 (NEB®, cat: M2501S), 124 ng de RBRCT, 267 ng de RBRPC (Zamora-Zaragoza, 2014) o 232.26 ng de CycD2;2a. La reacción se inició por la adición de una mezcla de ATP frío y ATP [³²P], para una concentración final en la reacción de 20 µM y 3 µCi de actividad, respectivamente. Las reacciones se incubaron a 30° C por 30 minutos y, concluido el tiempo de incubación, las reacciones se detuvieron por la adición de amortiguador de carga para proteínas 4X, desnaturalizando como se indicó previamente. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida (8.5% m/v) mediante una SDS-PAGE y, posteriormente, los geles se tiñeron durante 16 horas con una disolución de azul Coomassie coloidal (azul Coomassie G-250 0.08% m/v, etanol 20% v/v, (NH₄)₂SO₄ 0.6 M, H₃PO₄ ~2.5% v/v). Los geles se destiñeron por 6 horas con agua y papel absorbente (Petal®) para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, los geles se deshidrataron en un secador de geles al vacío (BIO-RAD®, modelo: 543) entre un papel filtro

(Wathman®, cat: 3030917) y papel celofán. Los geles secos se expusieron en una Imaging Screen-K (KODAK®, cat: 1707841) y posteriormente la pantalla se reveló en un equipo Molecular Imager FX (BIO-RAD, cat: 170-9400).

9.2.3.1. Expresión en el transcriptoma de maíz.

El número de acceso del gen que codifica para *ZmWEE1* fue utilizado para obtener el patrón de expresión de su transcrito en el transcriptoma de maíz (http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Sekhonetal) (Sekhon *et al.*, 2011).

9.2.3.2. Obtención de la secuencia de *ZmWee1*.

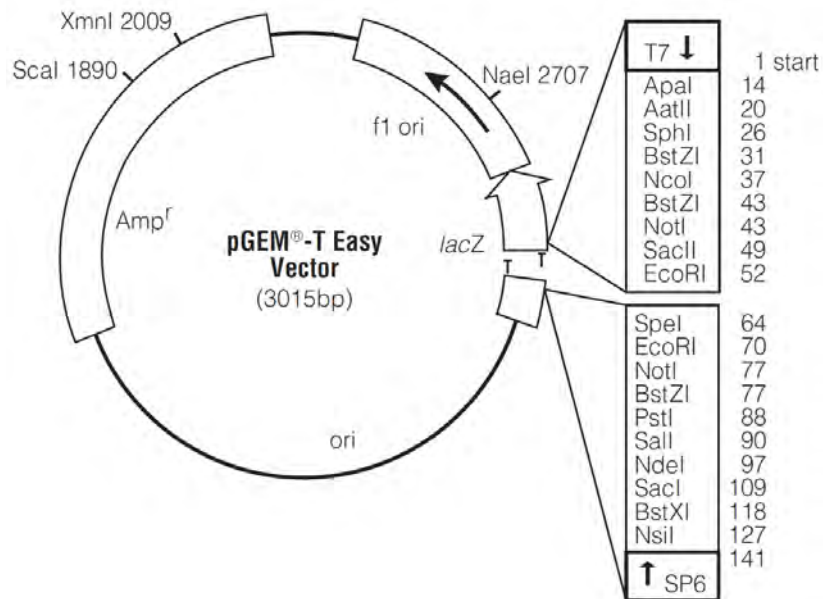
La secuencia que codifica para *ZmWee1* se obtuvo mediante un BLAST en la base de datos del genoma del maíz (http://ensembl.gramene.org/genome_browser/index.html); como “*query*” se utilizó la secuencia que codifica para *Wee1* de *A. thaliana*. La secuencia proteica de *Wee1* en otras plantas se obtuvo también mediante la herramienta BLAST, en la base de datos de gramene (<http://www.gramene.org/>); como “*query*” se utilizó tanto la secuencia de *Wee1* de *A. thaliana* como la de maíz.

La secuencia de mensajeros obtenidos a partir de evidencia experimental se obtuvo mediante la herramienta BLAST, limitando la búsqueda a *Zea mays* (taxid:4577) en la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); como “*query*” se utilizó la secuencia codificante, obtenida previamente a partir de la base de datos del genoma del maíz. Por otra parte, los ESTs en la base de datos del NCBI se obtuvieron mediante la búsqueda del número de acceso reportado por el NCBI para *Wee1* (EU97373), en la herramienta UniGene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>).

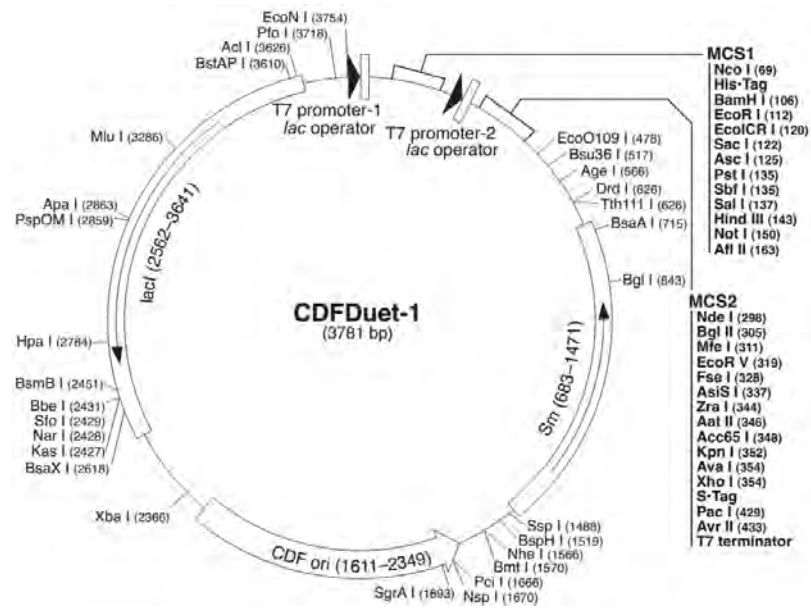
9.2.3.3. Alineamientos.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas y proteicas se realizó mediante el algoritmo Clustal W Multiple Alignment (Thompson *et al.*, 1994) en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.1.3.0 (Hall, 1999). La matriz de identidad de las secuencias alineadas también se realizó con el programa BioEdit.

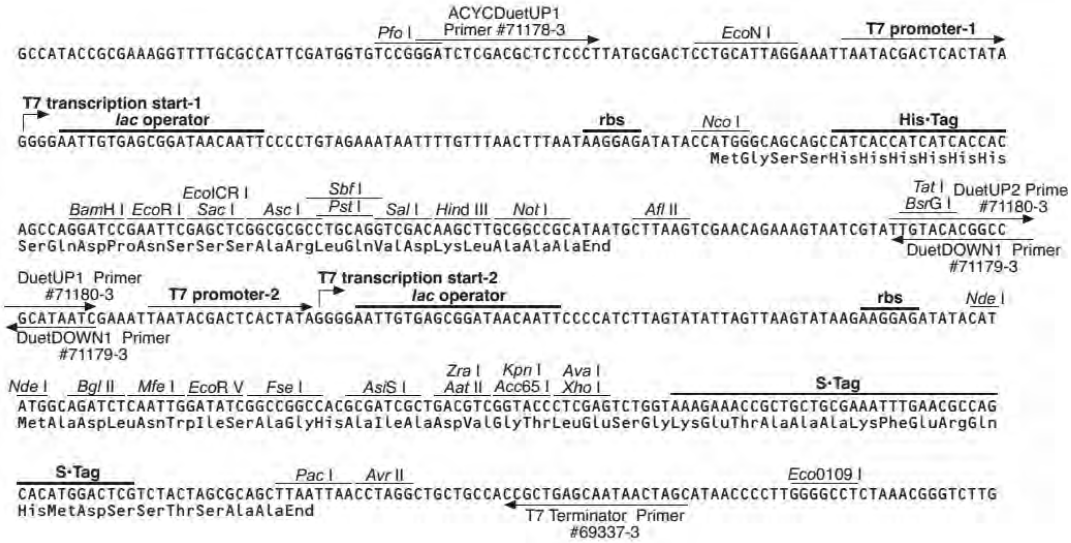
Apéndice



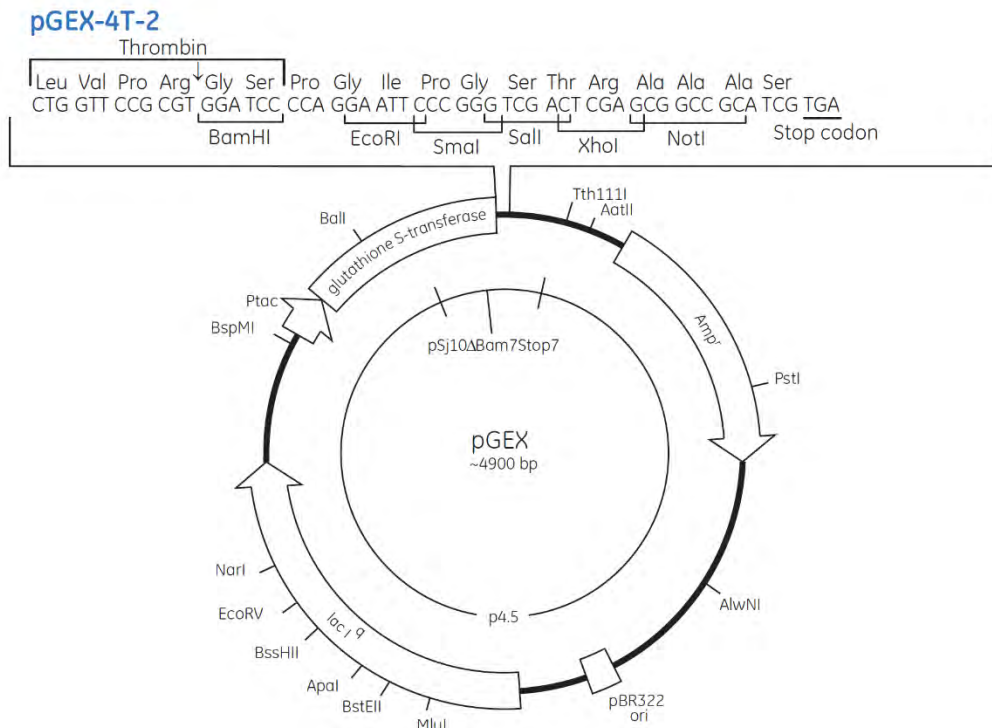
Esquema A1. Vector pGEM-T Easy.



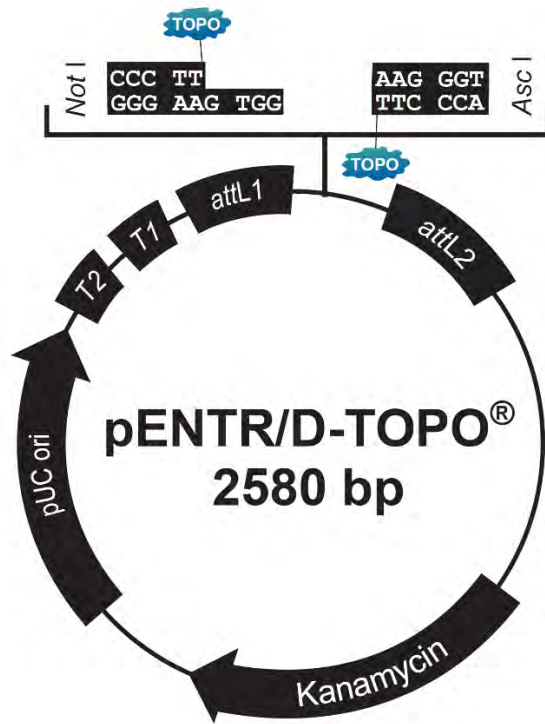
Esquema A2. Vector pCDFDuet-1.



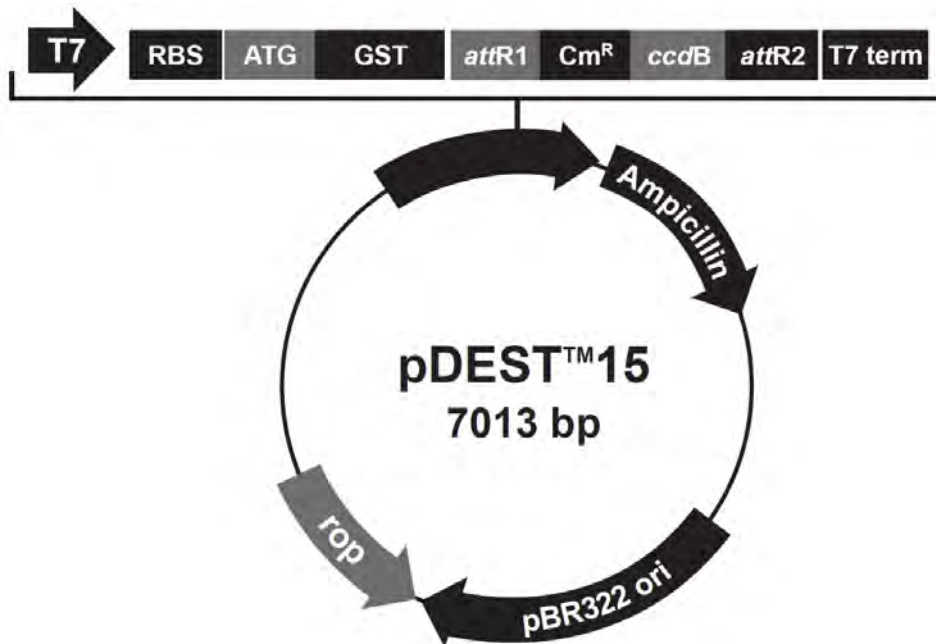
Esquema. A3. Regiones de expresión/clonación en pCDFDuet-1.



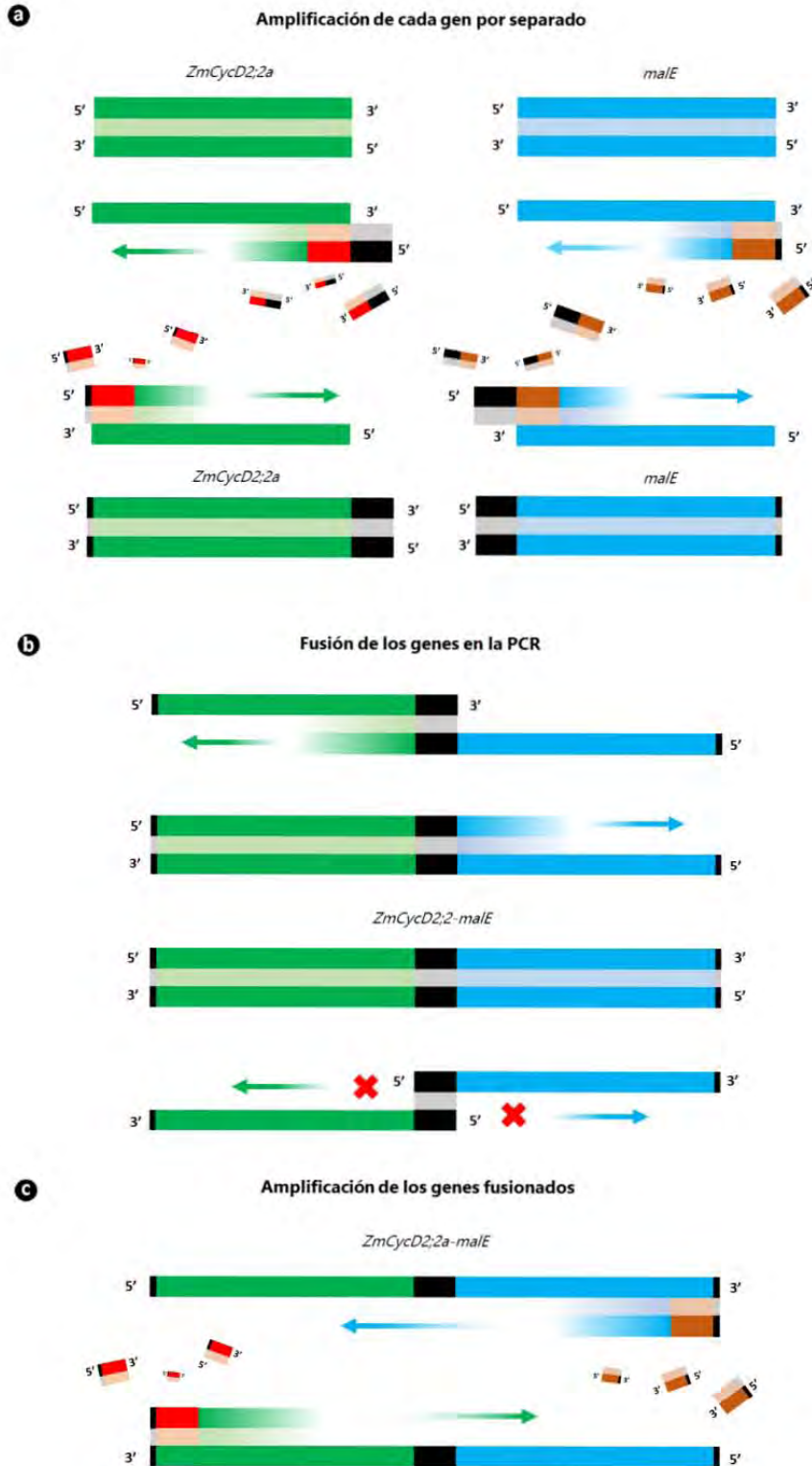
Esquema A4. Vector pGEX-4T-2



Esquema A5. Vector pENTR/D-TOPO.



Esquema A6. Vector pDEST-15.



Esquema A7. Fusión de *ZmCycD2;2a* con *malE* a) En reacciones independientes se amplificó a *ZmCycD2;2a* (en verde) y a *malE* (en azul), utilizando cebadores específicos para cada secuencia codificante. El cebador “forward” utilizado para la amplificación de *ZmCycD2;2* (FwdCYCD2) (en rojo)

(continuación, **Esquema A7**) tiene en su extremo 5' un sitio de restricción *NdeI* (en negro), mientras que al cebador "reverse" (en rojo) (RevCYCD2) se le adicionó una secuencia de 21 nucleótidos (en negro) que permitió la fusión de las secuencias. El cebador "forward" (en marrón) para amplificar a *malE* tiene en su extremo 5' una secuencia de 21 nucleótidos (en negro) que es complementaria a los 21 nucleótidos que se encuentran en el extremo 5' del cebador "reverse" para *ZmCycD2;2a*; mientras que el cebador "reverse" (en marrón) tiene en su extremo 5' un sitio de restricción *AvrII* (en negro). Después de la amplificación de las secuencias codificantes, las reacciones se corrieron en geles de agarosa y las bandas que correspondían a las secuencias de interés se localizaron y escindieron para su purificación. **b)** Los fragmentos purificados se utilizaron para una PCR que incluía los mencionados fragmentos, así como los cebadores "forward" y "reverse", que se utilizaron para la amplificación de *ZmCycD2;2a* y *malE*, respectivamente, *taq* polimerasa y desoxinucleótidos. Como se observa en la figura, el extremo 3' (secuencia de 21 nucleótidos que codifican para un "linker" GNSLGNS) de la cadena sentido de *ZmCYCD2;2* se aparea con el extremo 3' de la cadena antisentido del fragmento amplificado que codifica para la MBP. Cuando esto ocurre, los 21 nucleótidos del extremo 3' del gen de la MBP actúan como un cebador "reverse" que permite la elongación de *ZmCycD2;2a* por la DNA polimerasa; de manera similar, los 21 nucleótidos del extremo 3' de *ZmCycD2;2a* pueden actuar como un cebador "forward" que permite la elongación de *malE*, de tal forma que cuando la DNA polimerasa elongó tanto a *ZmCycD2;2a* como a *malE* se obtuvieron las secuencias codificantes fusionadas. En el esquema se observa que los extremos 5' de ambas secuencias se pueden aparear; sin embargo, cuando esto sucede no puede ocurrir la elongación. **c)** Una vez obtenido el molde de doble cadena de DNA de las secuencias fusionadas, el cebador "forward" y el "reverse" mencionados en el inciso **b** permitieron su amplificación.

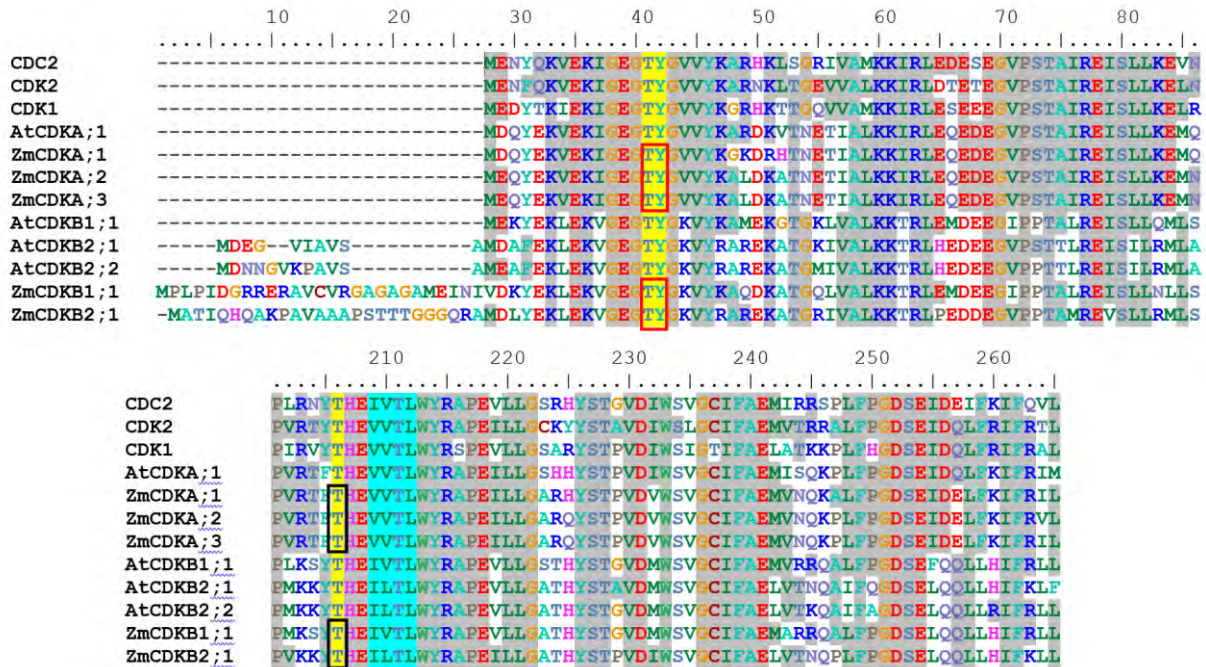


Figura A1. Conservación de residuos blanco fosforilación en las CDKs. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CDC2, CDK2 (humano), AtCDKA;1, ZmCDKA;1, ZmCDKA;2, ZmCDKA;3, AtCDKB1;1, AtCDKB2;1, AtCDKB2;2, ZmCDKB1;1 y ZmCDKB2;1. En el alineamiento superior, en los recuadros rojos se resalta la conservación de los residuos equivalentes a la T14 y Y15 de CDK2 en las CDKs de maíz, mientras que en el alineamiento inferior se resalta en los recuadros negros la conservación de los residuos equivalentes a la T160 de la CDK2. Sombreados en gris, los aminoácidos de las CDKs que tienen un 100% de identidad con los aminoácidos de la CDK2. Nótese en el alineamiento inferior, que aminoácidos a la derecha del residuo equivalente a la T160 de CDK2 están resaltados en turquesa; éstos corresponden a parte del motivo (TXXVVTL) que se ha reportado como preferentemente fosforilado por la CDK7.

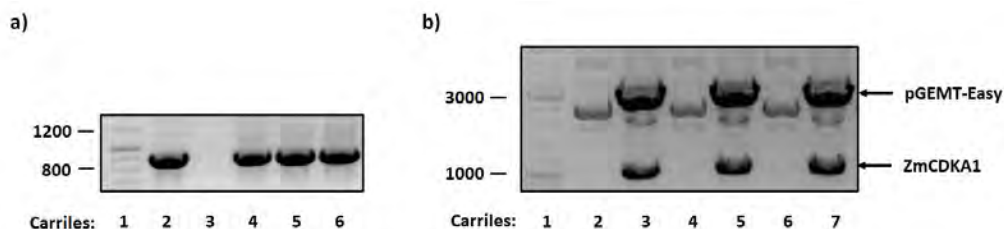


Figura A2. Subclonación de *ZmCDKA1* en el vector pGEMT-Easy. a) Amplificación de *ZmCDKA1* por la PCR a partir del plásmido pGEMT-Easy**ZmCDKA1*. En 1, el marcador de tamaño de DNA; en 2, la amplificación de *ZmCDKA1* utilizando como templado la construcción pPROEX HTb-*ZmCDKA1* (control positivo de amplificación); en 3, un control negativo de amplificación en el que no se agregó templado a

(continuación, **Figura A2**) la reacción; de **4 a 6**, la amplificación de *ZmCDKA1a* a partir del plásmido pGEMT-Easy**ZmCDKA1* extraído a cultivos provenientes de tres colonias que fueron transformadas con la ligación de *ZmCDKA1* a pGEMT-Easy. Para las reacciones se utilizaron los cebadores FwdCDKA y RevCDKA. **b)** Digestión de plásmidos pGEMT-Easy**ZmCDKA1* con la enzima de restricción *NotI*. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; en los carriles **3, 5 y 7**, la digestión de 3 µg de los mismos plásmidos utilizados para las amplificaciones mostradas en los carriles **4, 5 y 6** de **a)** con 5 unidades de *NotI*; a la izquierda de cada restricción (carriles **2, 4 y 6**), 0.5 µg de plásmido sin digerir.



Figura A3. Clonación de *ZmCDKA1* en pCDFDuet-1. **a)** Amplificación de *ZmCDKA1* a partir de colonias transformadas con la ligación de *ZmCDKA1* a pCDFDuet-1. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2 a 6**, la amplificación de *ZmCDKA1* por la PCR a partir de seis colonias que fueron transformadas con la ligación de *ZmCDKA1a* pCDFDuet-1; en **7**, un control negativo en el que se utilizó como templado una colonia transformada con pCDFDuet-1 vacío. Para las amplificaciones se utilizaron los cebadores específicos para el MCS1 de pCDFDuet-1 (DuetUP1 y DuetDOWN1). **b)** Amplificación de *ZmCDKA1* a partir del vector pCDFDuet-1**CDKA1*. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2 a 4**, la amplificación de *ZmCDKA1* por la PCR a partir de plásmido obtenido de las colonias utilizadas para las amplificaciones de los carriles **2, 3 y 4** mostradas en **a)**; en **5**, el control negativo de amplificación en el que el templado fue el plásmido pCDFDuet-1 vacío. Para las amplificaciones se utilizaron los cebadores FwdCDKA y DuetDOWN1.

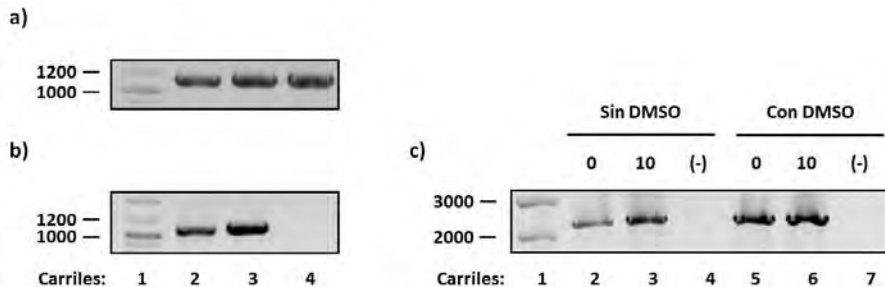


Figura A4. Fusión de *ZmCycD2;2a* con *malE*. **a)** Amplificación de *malE*. La amplificación se realizó por una PCR a partir del vector pMALc-5X a temperaturas de alineamiento de 57, 58 y 59 °C (carriles **2, 3 y 4**, respectivamente). En **1**, el marcador de tamaño de DNA. **b)** Amplificación de *ZmCycD2;2a*. La

(continuación, **Figura A4**) amplificación se realizó por una PCR a partir del plásmido pGEX4T2-*ZmCycD2;2a* (carril **2**) y a partir de una colonia que fue transformada con el plásmido pGEX4T2-*ZmCycD2;2a* (carril **3**); en **4**, un control negativo de amplificación (reacción sin templado). **c**) Amplificación por la PCR del producto de fusión *ZmCycD2;2a-malE*. La amplificación se realizó en presencia de 3% de DMSO (**Con DMSO**) o en su ausencia (**Sin DMSO**); los números **10** y **0** representan el número de ciclos que llevaba de iniciada la PCR cuando se adicionaron los cebadores FwdCycD2 y RevMBP para amplificar el producto de fusión. (-). Control negativo de amplificación (reacción sin templado).

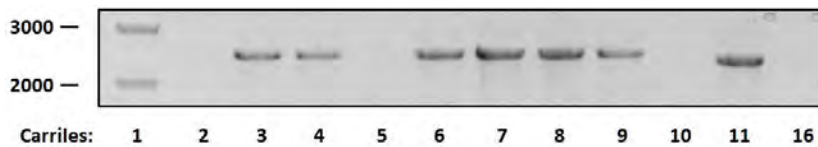


Figura A5. Amplificación de *ZmCycD2;2a-malE* a partir de colonias transformadas con la ligación de *ZmCycD2;2a-malE* a pGEMT-Easy. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **11**, la amplificación de *ZmCycD2;2a-malE* por la PCR a partir de 10 colonias que crecieron después de ser transformadas con el producto de la ligación entre *ZmCycD2;2a-malE* y pGEMT-Easy. Para la amplificación se utilizaron los cebadores FwdT7 y RevMBP. En el carril **16**, un control negativo de amplificación (reacción sin templado).

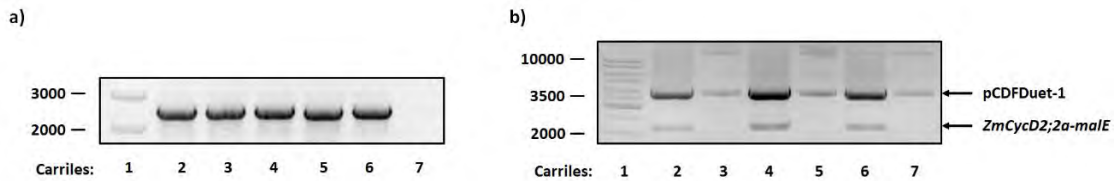


Figura A6. Clonación de *ZmCycD2;2a-malE* en pCDFDuet-1. **a)** Amplificación de *ZmCycD2;2a-malE* a partir de colonias transformadas con la ligación de *ZmCycD2;2a-malE* a pCDFDuet-1. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **6**, la amplificación de *ZmCycD2;2a-malE* por la PCR a partir de las colonias que fueron transformadas con el producto de la ligación entre *ZmCycD2;2a-malE* y pCDFDuet-1; en **7**, un control negativo de amplificación en el que el templado fue la construcción pCDFDuet-1**ZmCDKA1*. Para la amplificación se utilizaron los cebadores DuetUP2 y T7 Terminador. **b)** Restricción de pCDFDuet-1**ZmCycD2;2a-malE* con la enzimas *NdeI* y *AvrII*. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; en **2, 4 y 6**, la digestión de 1 µg de plásmido obtenido de las mismas colonias utilizadas para las amplificaciones de los carriles **2, 3 y 4** mostradas en **a**). A la derecha de cada restricción, 100 ng del plásmido sin digerir (carriles **3, 5 y 7**).

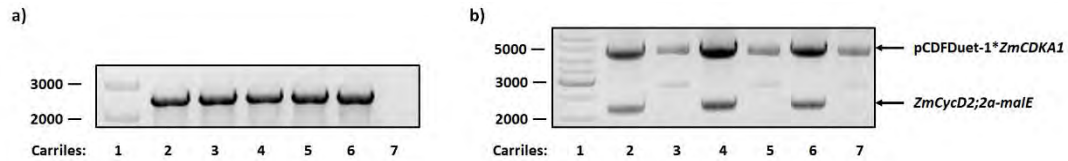


Figura A7. Clonación de *ZmCycD2;2a-malE* en pCDFDuet-1**ZmCDKA1*. **a)** Amplificación de *ZmCycD2;2a-malE* a partir de colonias que fueron transformadas con la ligación de *ZmCycD2;2a-malE* a pCDFDuet-1* *ZmCDKA1*. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **6**, la amplificación de *ZmCycD2;2a-malE* por la PCR a partir de 5 colonias transformadas con el producto de la ligación de *ZmCycD2;2a-malE* a pCDFDuet-1* *ZmCDKA1*; en **7**, un control negativo de amplificación en el que el templado fue la construcción pCDFDuet-1**ZmCDKA1*. Para la amplificación se utilizaron los cebadores DuetUP2 y T7 Terminador. **b)** Restricción de pCDFDuet-1* *ZmCDKA1***ZmCycD2;2a-malE* con la enzimas *NdeI* y *AvrII*. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; en **2**, **4** y **6**, la restricción de 1 µg plásmido proveniente de las colonias utilizadas para las amplificaciones de los carriles **2**, **3** y **4** mostradas en **a)**. A la derecha de cada plásmido digerido, 200 ng del plásmido sin digerir (carriles **3**, **5** y **7**).



Figura A8. Clonación de *Cak1* en pENTR. Amplificación de *GST-Cak1* a partir de colonias que fueron transformadas con el producto de la reacción entre *Cak1* y pENTR/D-TOPO. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **6**, la amplificación de *GST-Cak1* por la PCR a partir de 5 colonias que fueron transformadas con el producto de la reacción entre pENTR/D-TOPO y *Cak1*; en **7**, un control negativo de amplificación (reacción sin templado).

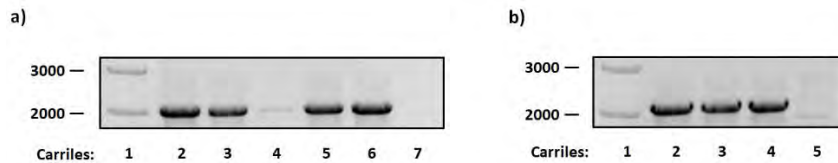


Figura A9. Subclonación de *Cak1* en pDEST15. **a)** Amplificación de *Cak1-GST* a partir de colonias transformadas con la reacción de recombinación entre pENTR**Cak1*p y pDEST15. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **6**, la amplificación de *Cak1-GST* por la PCR a partir de colonias que crecieron después de ser transformadas con la reacción de recombinación entre pENTR**Cak1* y pDEST15; en **7**, un control negativo de amplificación en el que el templado fue el vector pDEST15 sin recombinar. Para la amplificación se utilizaron los cebadores FwdT7 y T7 Terminador. **b)** Amplificación de *Cak1-GST* a partir de pDEST15**Cak1*. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2** a **4**, la amplificación de *Cak1-GST* por la PCR a partir de plásmido extraído a las colonias que se utilizaron como templado para las amplificaciones de los carriles **2**, **3** y **5** mostradas en **a**; en **5**, un control negativo de amplificación en el que el templado fue pDEST15.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
ZmWee1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
SbWee1  MLRTKT---PRPRGGKARRAAPGAASAVKP---AKADGRSPSGELSLQLEHVSLTSLSDRRPAS---GLTRFEVLLLEEEES-----GCYRADPTPQPPR
SiWee1  MLRTKTT--PRPRGGKARPRAAAAASAVKAKPAAAAEGISPSGELSLQLEHVSLFSFLSDRCPTAAASGLTPFEALLEEEED-----GYRADPAAAPPP-
BdWee1  -MRGKSASAARPRAGTSQPRRFSAPRTATK--AAAAGVSSPSGELSRQLESVTLRNFSDA-----PALNPIGEEAPA-----PAPAPA-
OzWee1  MLRTKT---PRPRGGKSRRTAAAGKEREREREREREREREGRSPSGELSLQLEHVSLFSFLADAPREGAAAARTPFTPFEEELLEG-----SCDPDPTPPPP-
AtWee1  -MFEKN-----GRTLLAKRKTQGTIKTRASKKIRKMEG-TLERHSLQFGQLSKISFENRPSNVAS---SAFQGLLSDSS-----ELRN--

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
ZmWee1  LPEPQSMPPPPPP--PPISQASPVDADETMEEKDCCILSQDFFCTPDYITPEMPQVANEFDKDDKENIPCPSPEKSANPRSKRYRTDCSPKAREVITDFS
SbWee1  LPQPQSMPPPPPPPTAAQVPQASPMDADETMEEKDCCILSQDFFCTPDYITPEMPQVANEFDKDD--KENIPCPSPEKSANPRSKRYRTDCSPKGLESTDFS
SiWee1  LPQPQ--PPAPLP-----QEASPMDADEPMEEKDCCILSQDFFCTPDYITPEMPQVANEFDKDD--KENIPCPSPEKSANPRSKRYRTDCSSKGLESTDFS
BdWee1  -----QHPFVDADVPMEDKCCILSQDFFCTPDYITPDAPPLANSFSD--KENIPCPSPEKVA--RSKRYKRDCSPKDLRSVLS
OzWee1  -----LPPLQP-----QATPMDADEVVEEKDSGILSQDFFCTPDYITPDAPQLGSGFDAN--KENIPCNSPEKVC--RSKRYKRDCSPKGLGSDIF
AtWee1  -----QLGSADSDANCGEK--FILSQDFFCTPDYITPDNQNLMSGLDIS--KDHSPCRSPVKLNTVKSKRCRQESFTGNHSNSTWS

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ZmWee1  --FDHQITPVLFDSLTRDDSEEEQPKQPALEKRGYVVSQSAVALRCRVMPPPCVKNPYLNTDPCIDAAVYGGRQCNSAVFSP-SIGGNGLSRYRTDFHEI
SbWee1  --FDHQITPVVFDLSTRDDSEEEQPMQPALEKRGYVVSQSAVALRCRVMPPPCVKNPYLNTDPCIDDAVYGGRQCNSAGFSP-SIGGNGLSRYRTDFHEI
SiWee1  --FDRQITPVHFDSLIQDDSEEEKLMQPALHKRGGYVVSQSAMALRCRVMPPPCVKNPYLNTDPCIDDAVYGVRCNSAGFSP-SIGGNGLSRYRTDFHEI
BdWee1  ELDEQELTPVP-CGLCQDDSEEEQMRPSLQKRGSIQVPSARTLRSQVTPPPCIKNPY-NADPRIDDGVFNVRQKSSGSSP-SIGAYGLSRYRSDFHEI
OzWee1  --DSQWIAPVQFEGE--DDSEEEQLKESSSHKRGSYVVSQSAVALRCRVMPPPCIRNPYLNTDHQIDDNVFGGRQCKSSGFSP-SVDGDGLSRYRTDFHEI
AtWee1  --SKHRVDEQENDDIDTDEVMGDKLQANQTERTG-YVSQAAVALRCRAMPPPCLNKPYVLNQSETATDPFGHQRSKCASFLPVSTSGDGLSRYLTDHEI

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ZmWee1  EKIGYGNFVSVFKVLNRIDGCLYAVKRSIKQLHNDMERRQAVKEVQAMAALGSHENIVRYFTSWFENEQLYIQMELCDRCLS-MNRNQPVKRG--ALEL
SbWee1  EKIGYGNFVSVFKVLNRIDGCLYAVKRSIKQLHNDMERRQAVKEVQAMAALGSHENIVRYFTSWFENEQLYIQMELCDHCLS-MNRNQPVKHGE--AMEL
SiWee1  EKIGHGNFVSVFKVLNRIDGCLYAVKRSIKQLHNDMERRQAVKEVQAMAALGSHENIVRYFTSWFENEQLYIQMELCDRCLS-VNRNQPLKHGE--ALEL
BdWee1  EQIGRGNFSLVFKVLRRIEGCLYAVKRSIKELHSDRRRLALKEVQTLVALGNHENIVGYFTSWFETEKLFIQYIQMELCDRCLS-MNGNPLKHEE--ALEL
OzWee1  EQIGRGNFVSVFKVLKRIDGCLYAVKRSIRQLHNDRERRQAVKEVQALAALGCHENIVGYFTSWFENKQLFIQYIQMELCDRCLS-MDRNQPLKCGE--ALEL
AtWee1  RQIGAGHFSRVFKVLRMDGCLYAVKHSRKLKLYLDSEERRKAMMEVQALAALGFHENIVGYSSWFENEQLYIQLELCHSLALPKKSSSLKVSEREIIVI

```

Figura A10.

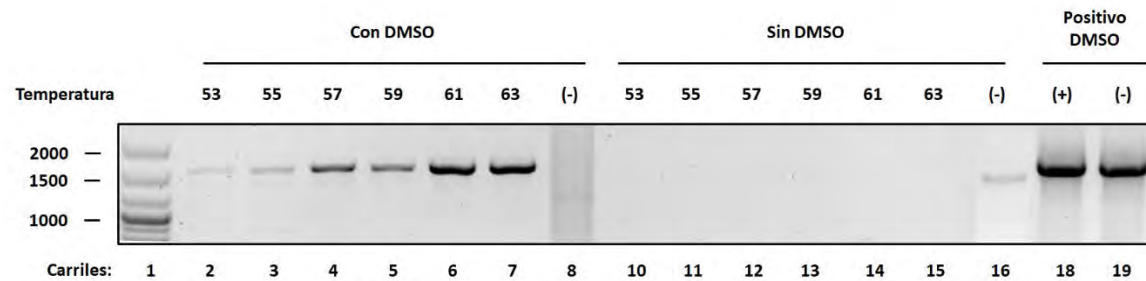


Figura A11. Rampa de temperatura para la amplificación de *ZmWee1*. Se realizó una rampa de temperatura para el alineamiento de los cebadores que fue de 53 a 63 °C (en incrementos de 2 unidades) en presencia de DMSO al 3% (**Con DMSO**) (carriles 2-7) o en su ausencia (**Sin DMSO**) (carriles 10-15). El templado para todas las temperaturas fue cDNA obtenido a partir del extremo apical de la mazorca (antes de su polinización) y en el control negativo de amplificación para cada serie (**Con DMSO** o **Sin DMSO**) no se agregó templado. El control positivo de amplificación para ambas series se muestra en los últimos dos carriles. (+): Amplificación en presencia de DMSO; (-): amplificación en ausencia de DMSO. En el carril 1, el marcador de tamaño de DNA. Con la finalidad de mostrar un mejor orden en los resultados, la figura mostrada es una modificación de la original.

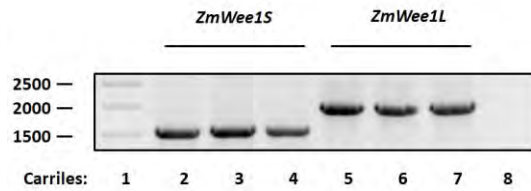


Figura A13. Clonación de *ZmWee1S* y *ZmWee1L* en pENTR. En **1**, el marcador de tamaño de DNA; de **2 a 4**, la amplificación de *ZmWee1S* por la PCR a partir del plásmido extraído a colonias transformadas con la construcción pENTR**ZmWeeS*; de **5 a 7**, la amplificación de *ZmWee1L* por la PCR a partir del plásmido extraído a colonias transformadas con la construcción pENTR**ZmWee1L*. En **8**, un control negativo de amplificación a partir de un plásmido extraído a una colonia que no fue positiva a la amplificación de *ZmWee1L*. Para todas las reacciones se utilizaron los cebadores M13.

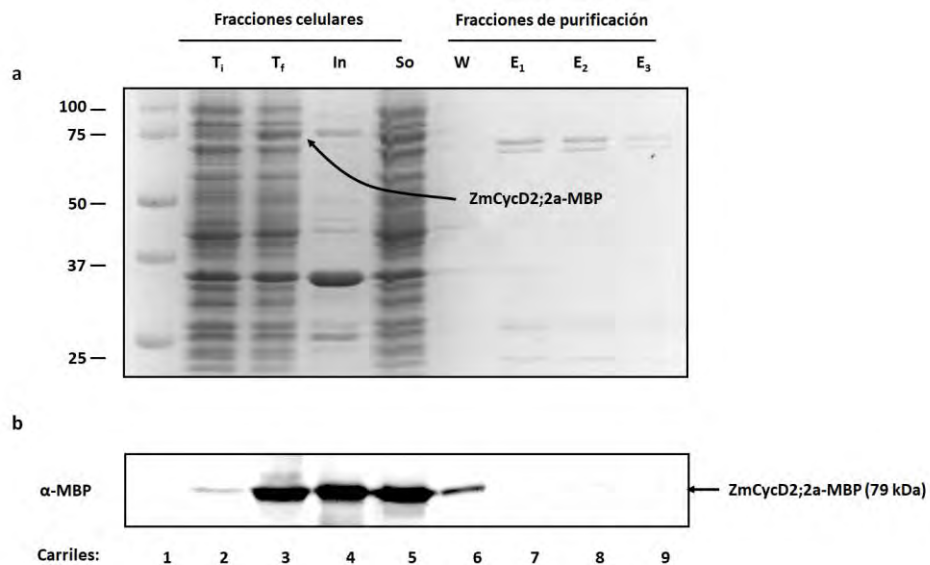


Figura A14. Interacción de *ZmCycD2;2a-MBP* con la columna de Ni-NTA agarosa. **a)** Análisis de las fracciones de purificación por SDS-PAGE. En **1**, los estándares de masa molecular; en **2**, el lisado de bacterias antes de iniciar la inducción; en **3**, el lisado de bacterias después de 4 horas de inducción; en los carriles **4, 5 y 6** la fracción insoluble, soluble y de lavado. respectivamente; de **7 a 9**, las fracciones del eluato. **b)** Inmunoblot de las fracciones de purificación. Identificación de *ZmCycD2;2a-MBP* en las mismas fracciones analizadas en **a** por medio de un anticuerpo comercial anti-MBP.

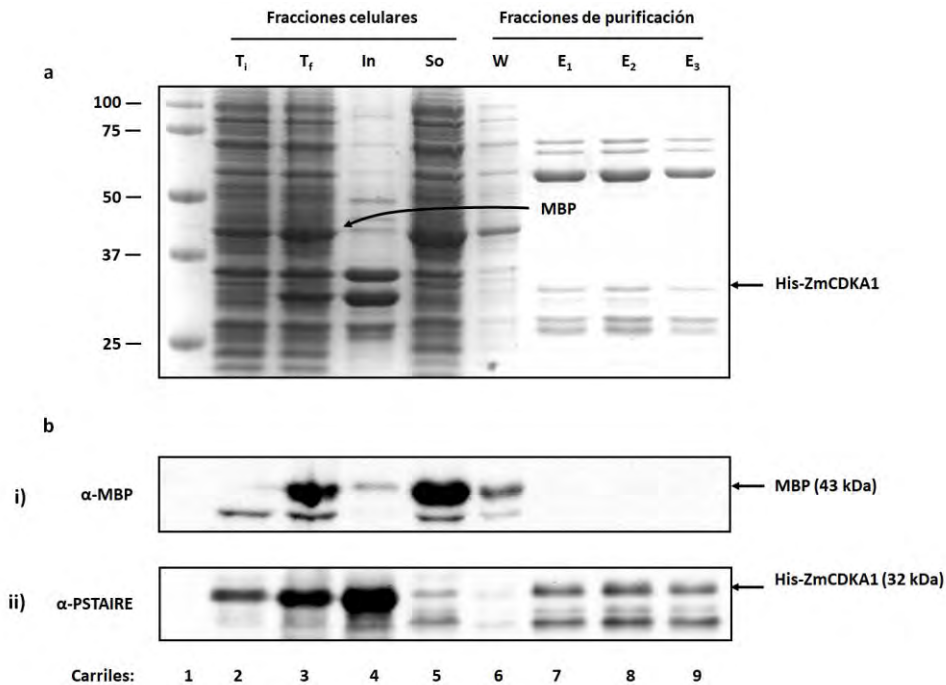


Figura A15. Interacción de MBP con His-*ZmCDKA1*. **a)** Análisis de las fracciones de purificación por SDS-PAGE. En **1**, los estándares de masa molecular; en **2**, el lisado de bacterias antes de iniciar la inducción; en **3**, el lisado de bacterias después de 4 horas de inducción; en los carriles **4**, **5** y **6**, la fracción insoluble, soluble y de lavado, respectivamente; de **7** a **9**, las fracciones del eluato. **b** Inmunoblot de las fracciones de purificación. **i)** Identificación de MBP en las mismas fracciones analizadas en **a** por medio de un anticuerpo comercial anti-MBP. **ii)** identificación de His-CDKA por medio de un anticuerpo comercial anti-PSTAIRES en la misma membrana en la que se identificó a la MBP.

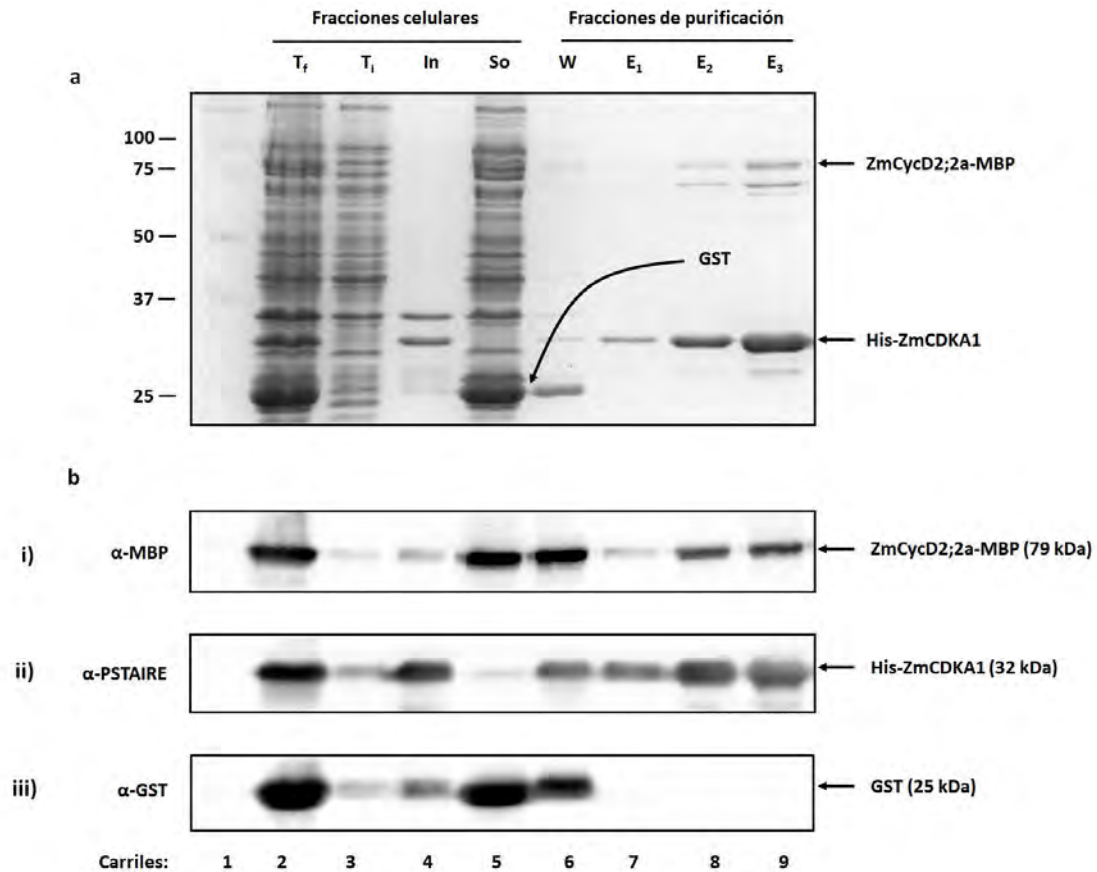


Figura A16. Interacción de GST con His-*ZmCDKA1-ZmCycD2;2a-MBP*. **a)** Análisis de las fracciones de purificación por SDS-PAGE. En **1**, los estándares de masa molecular; en **2**, el lisado de bacterias después de 4 horas de inducción; en **3**, el lisado de bacterias antes de iniciar la inducción; en los carriles **4**, **5** y **6**, la fracción insoluble, soluble y de lavado, respectivamente; de **7** a **9**, las fracciones del eluato. **b)** Inmunoblot de las fracciones de purificación. **i)** Identificación de *ZmCycD2;2a-MBP* en las mismas fracciones analizadas en **a** por medio de un anticuerpo comercial anti-MBP. **ii)** Identificación de His-*ZmCDKA* por medio de un anticuerpo comercial anti-PSTAIRE en la misma membrana en que se identificó a la ciclina. **iii)** Identificación de GST por medio de un anticuerpo comercial anti-GST en la misma membrana en la que se identificó a la ciclina y a la CDK.

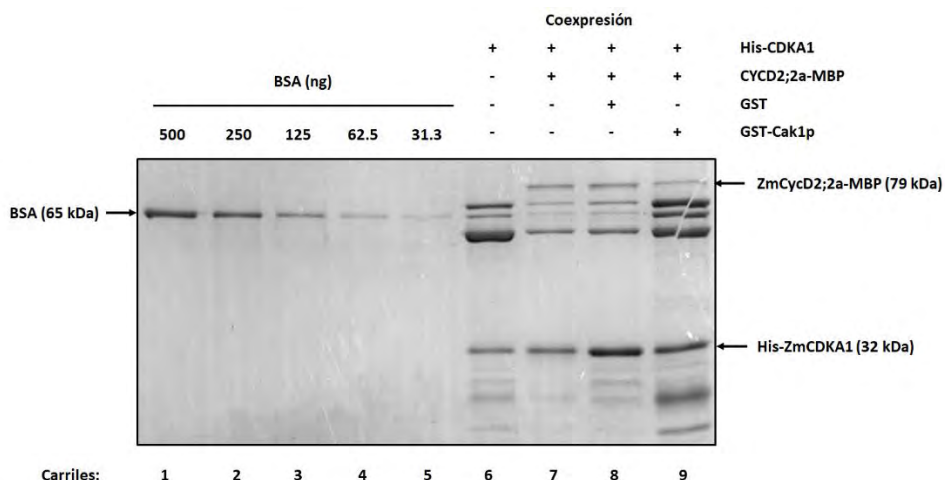


Figura A17. Cuantificación de proteína recombinante. En un gel de acrilamida se cargaron estándares de BSA para obtener una cantidad de 500, 250, 125, 62.5 y 32.5 ng (carriles 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente) de proteína en cada carril. En los carriles contiguos se cargaron 5 μ L de una de las alícuotas, que resultaron después de que la proteína His-ZmCDKA1 fue purificada (dializada y concentrada) a partir de los diferentes esquemas de coexpresión: sólo His-ZmCDKA1 (carril 6), His-ZmCDKA1 y ZmCycD2;2a-MBP (carril 7), His-ZmCDKA1, ZmCycD2;2a-MBP y GST (carril 8) o His-ZmCDKA1, ZmCycD2;2a-MBP y GST-Cak1p (carril 9).

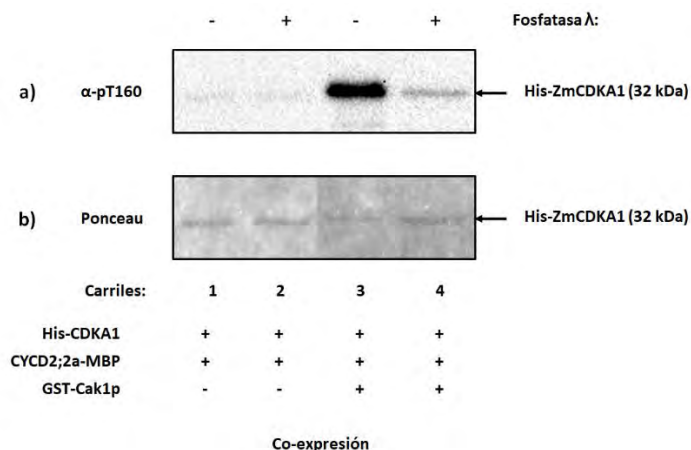


Figura A18. Desfosforilación de ZmCDKA1. **a)** Identificación de la fosforilación de ZmCDKA1 con un anticuerpo que reconoce la fosforilación de la T160 de la CDK2 de humano, después de que 100 ng de ZmCDKA1, que fueron purificados a partir de la coexpresión con ZmCycD2;2a-MBP (carriles 1 y 2) o con ZmCycD2;2a-MBP y GST-Cak1p (carriles 3 y 4), fueron incubados con 200 unidades de fosfatasa λ (carriles 2 y 4) o sólo con el amortiguador de la fosfatasa (carriles 1 y 3). **b)** Control de la cantidad cargada de ZmCDKA1. Después de realizar el inmunoblot, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau, se retiró el exceso de colorante con agua y la membrana se secó y documentó.

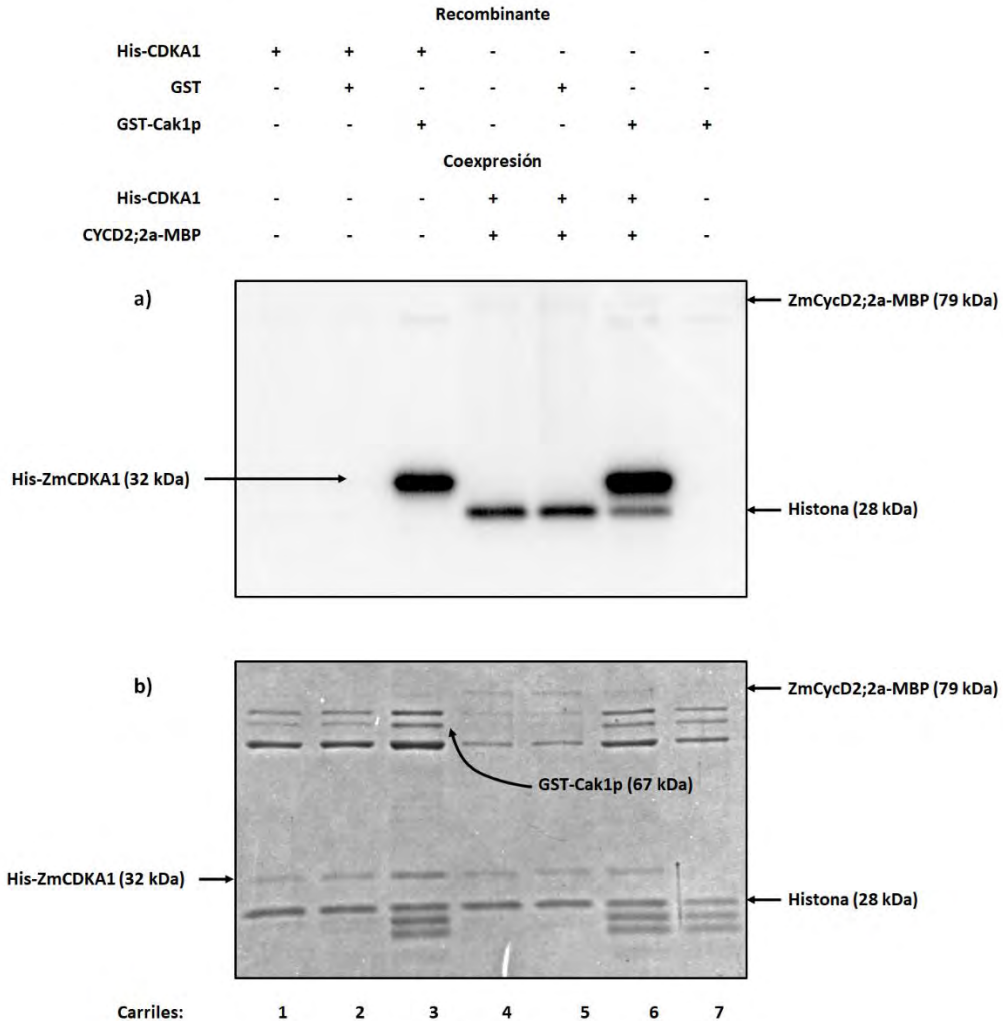


Figura A19. Activación del complejo *ZmCycD2;2a-MBP**His-*ZmCDKA1*. **a)** Autoradiografía del gel de poliacrilamida en el que se corrieron los ensayos de actividad cinasa de 100 ng de *ZmCDKA1* que había sido purificada individualmente (carriles **1-3**) o a partir de la coexpresión con *ZmCycD2;2a-MBP* (carriles **4-6**). En los carriles **3** y **6**, además de la CDK, se agregó a la Cak1p, mientras que en los carriles **2** y **4** se agregó solo el “tag” de la Cak1p (GST); la cantidad agregada de recombinante en las reacciones de los carriles **2, 3, 5** y **6** fue la necesaria para tener una concentración molar igual a la que había de la CDK (98 nM). En el carril **7** se incubó a la Cak1p sólo con 250 ng de histona H1. La misma cantidad de histona fue utilizada como sustrato en las demás reacciones (carriles **1-6**). **b)** Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

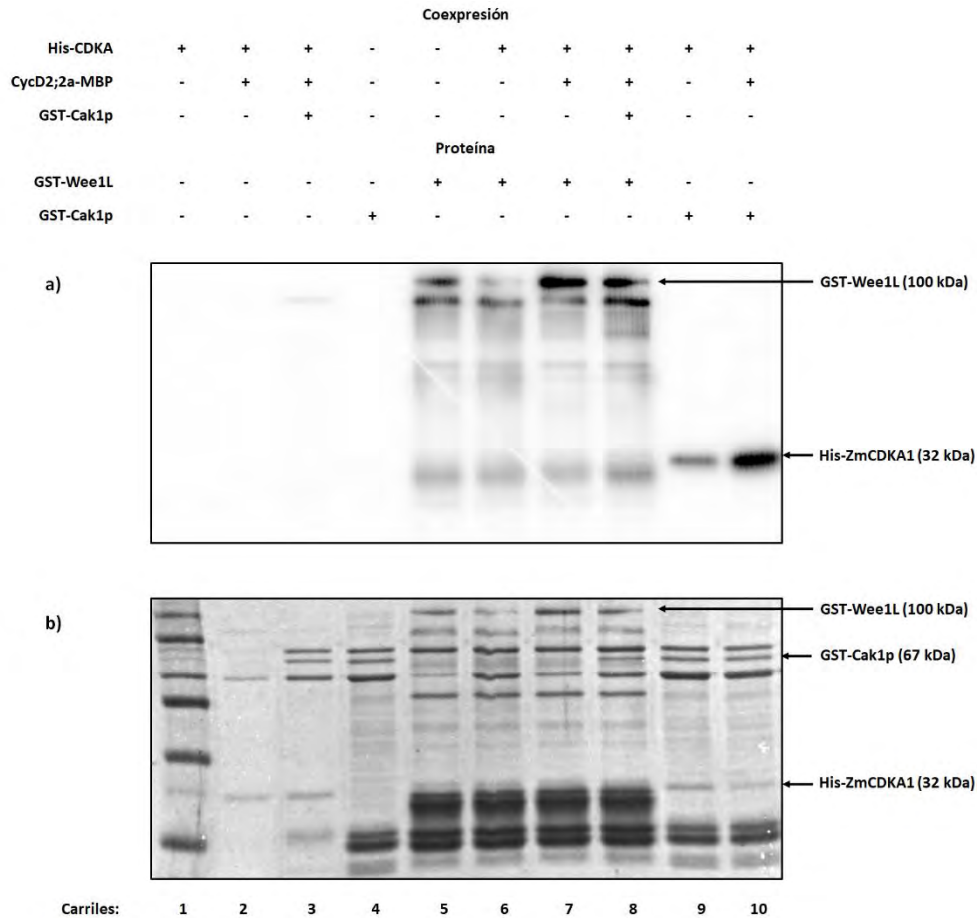


Figura A20. Actividad cinasa de *ZmWee1L* sobre *ZmCDKA1*. **a)** Autoradiografía del gel de poliacrilamida en el que se corrieron los ensayos de la actividad cinasa que *ZmWee1L* (196 nM) tuvo sobre 100 ng de *ZmCDKA1* (98 nM), que había sido purificada a partir de la coexpresión con *ZmCycD2;2a-MBP* (carril 7), *ZmCycD2;2a* y *Cak1p* (carril 8), o sólo la expresión de *ZmCDKA1* (carril 6). En el carril 5 sólo se incubó la proteína *ZmWee1L* con ATP marcado radioactivamente, mientras que en los carriles 1, 2 y 3 se incubó la recombinante *ZmCDKA1* proveniente de los diferentes esquemas de coexpresión (carril 1, sólo la expresión de *ZmCDKA1*; carril 2, la coexpresión con *ZmCycD2;2a*; y carril 3, la coexpresión con *ZmCycD2;2a* y *Cak1p*) con ATP marcado radioactivamente. En el carril 9 se fosforilaron 100 ng de *ZmCDKA1* con la *Cak1p*, mientras que en el carril 10 se fosforiló la misma cantidad de la CDK, que provenía de la coexpresión con *ZmCycD2;2a*, con la misma cinasa (*Cak1p*). En el carril 10 únicamente se incubó la *Cak1p* con ATP marcado radioactivamente. **b)** Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

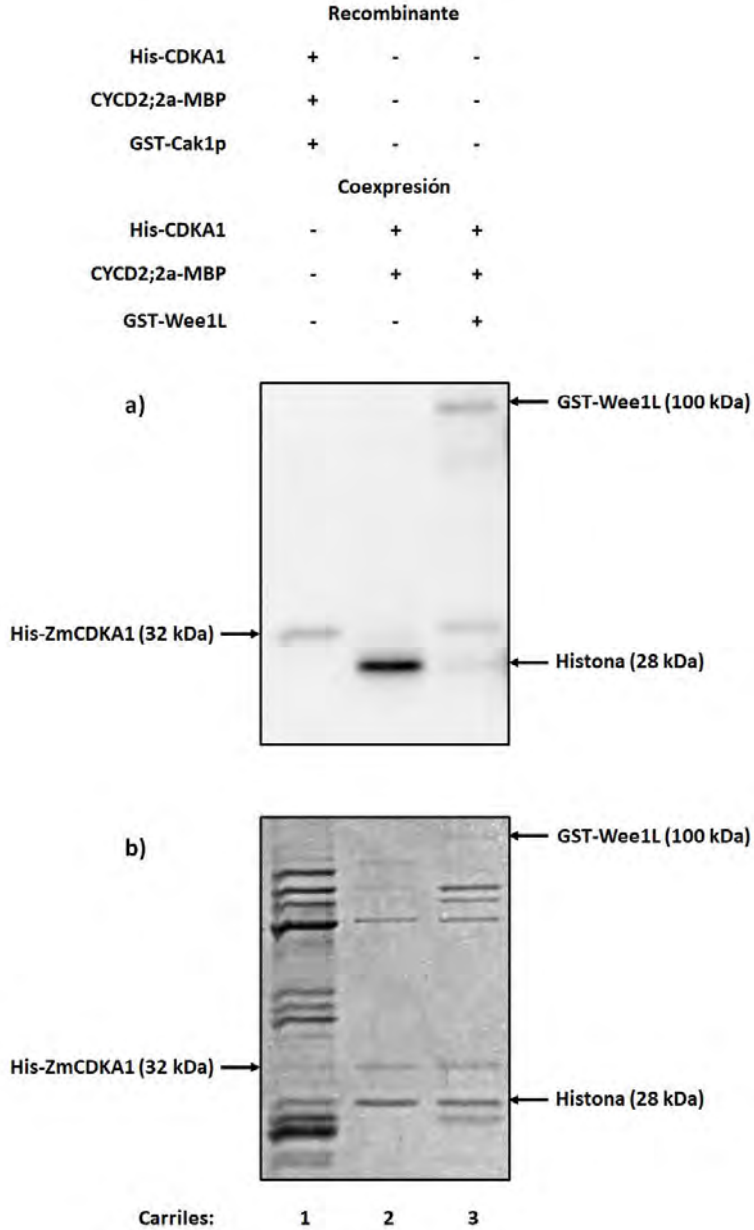


Figura A21. Actividad del complejo His-ZmCDKA*ZmCycD2;2a-MBP coexpresado con GST-ZmWee1L.

a) Autoradiografía del gel de poliacrilamida en el que se corrieron los ensayos de actividad cinasa de 100 ng de ZmCDKA1 (98 nM) que había sido coexpresada con ZmCycD2;2a-MBP (carril 2) o con ZmCycD2;2a-MBP y GST-Wee1L (carril 3). En el carril 1 se ensayó la actividad que GST-Cak1p tuvo sobre 100 ng de His-ZmCDKA1, previa incubación con ZmCycD2;2a-MBP y ATP frío por una hora a 25 °C. Para el ensayo, cada una de las proteínas fue purificada por separado. **b)** Control de carga. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie a partir del cual se tomó la autoradiografía mostrada en **a**.

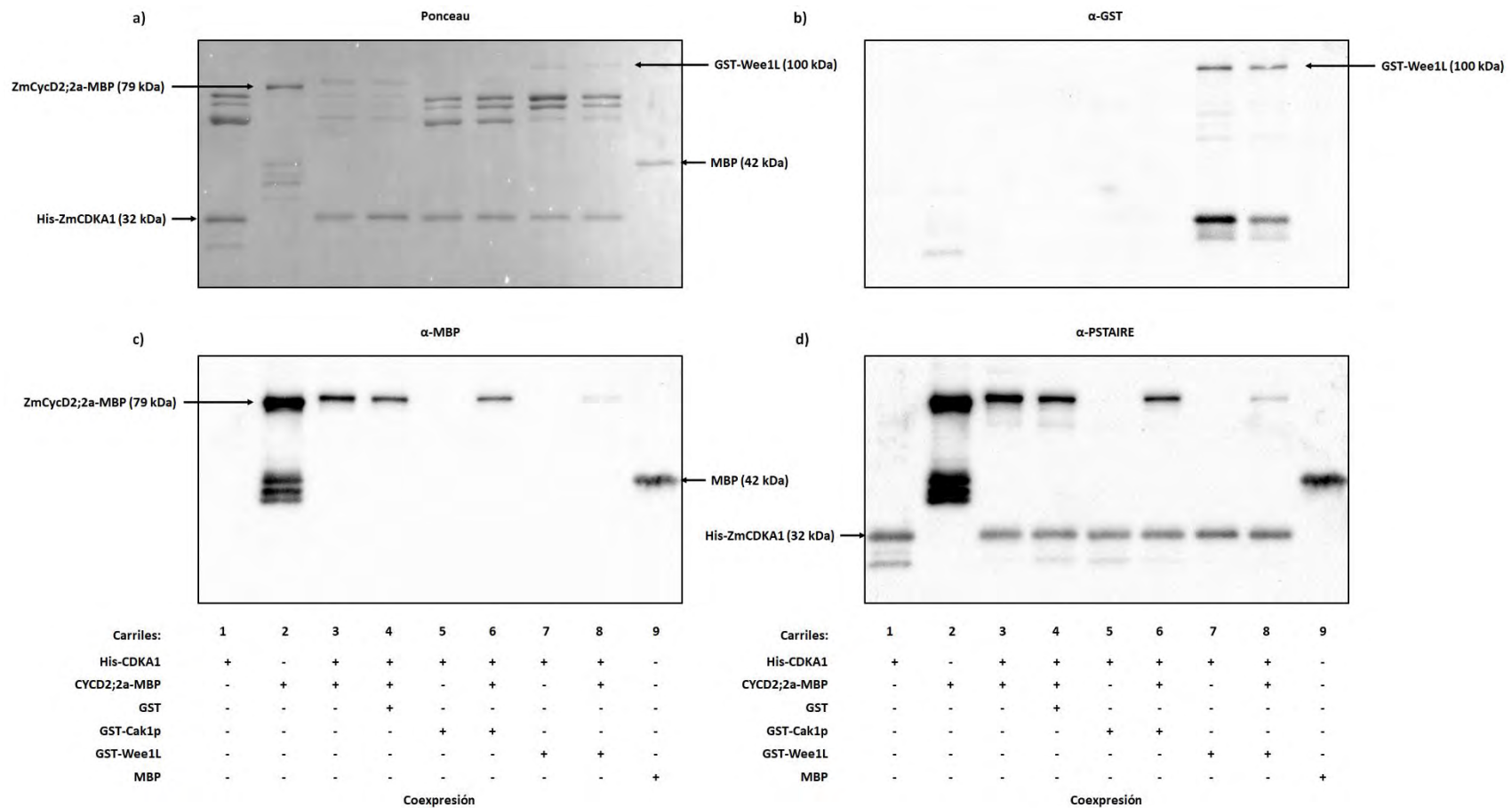


Figura A22. Identificación de las proteínas presentes después de la purificación, diálisis y concentración de *ZmCDKA1* que fue expresada bajo diferentes esquemas de coexpresión. **a)** Tinción con rojo de Ponceau de la membrana a la que fueron transferidos 200 ng de *ZmCDKA1* que había sido purificada, dializada y concentrada a partir de la coexpresión con *ZmCycD2;2a-MBP* (carril **3**), *ZmCycD2;2a-MBP* y GST (carril **4**), GST-Cak1p (carril **5**), *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-Cak1p (carril **6**), GST-*ZmWee1L* (carril **7**), *ZmCycD2;2a-MBP* y GST-*ZmWee1L* (carril **8**) o sólo His-*ZmCDKA1* (carril **1**). En el carril **2** se transfirieron 200 ng de *ZmCycD2;2a-MBP* que habían sido purificados, dializados y concentrados, mientras que en el carril **9** se transfirieron 200 ng de MBP que habían sido sólo purificados y dializados. **b)** Identificación de GST-*Wee1L* a partir de la membrana mostrada

en **a**. (continuación, **Figura A22**) Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo comercial α -GST. **c**) Después del “inmunoblot” mostrado en **b** la membrana se desnudó y posteriormente se identificó a *ZmCycD2*;2a-MBP por medio de un anticuerpo comercial α -MBP. **d**) La misma membrana utilizada para la identificación de la ciclina se lavó con PBS 1X (tween-20 0.2%, NaCl 0.3 M) y luego se incubó con un anticuerpo comercial α -PSTAIRE para la identificación de His-*ZmCDKA1*.

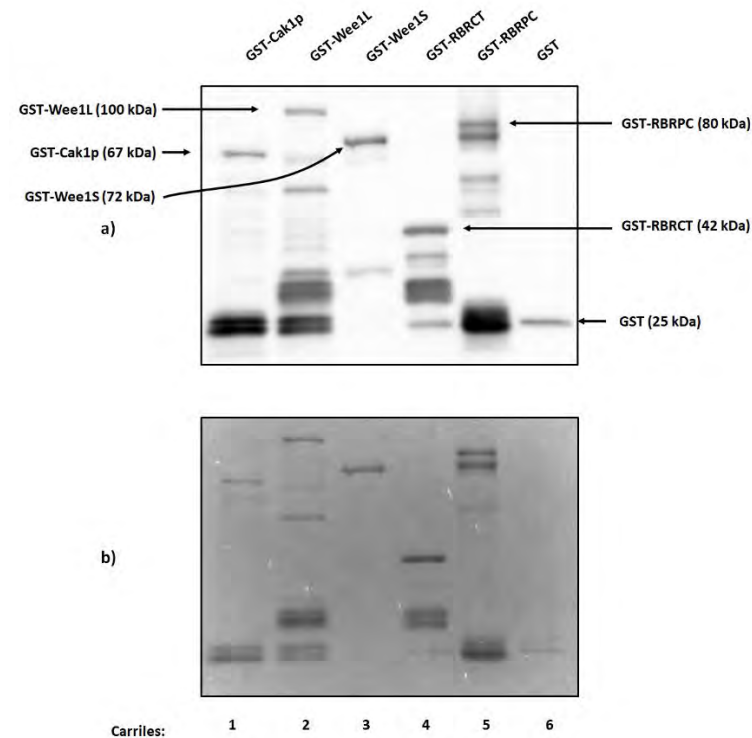


Figura A23. Identificación de las proteínas recombinantes *ZmWee1*, *Cak1p* y *ZmRBR1*. **a)** Después de la purificación, diálisis y concentración, las proteínas se cuantificaron y 200 ng de cada proteína indicada se cargaron en un gel de acrilamida. GST-Cak1p (carril 1), GST-*ZmWee1L* (carril 2), GST-*ZmWee1S* (carril 3), GST-RBRPC (carril 4), GST-RPRPC (carril 5) y GST (carril 6) (la proteína GST sólo se purificó y dializó). Las proteínas se transfirieron a una membrana y las recombinantes se identificaron mediante un “inmunoblot” utilizando un anticuerpo comercial α -GST. **b)** Tinción con rojo de Ponceau de la membrana utilizada para el inmunoblot mostrado en **a**.

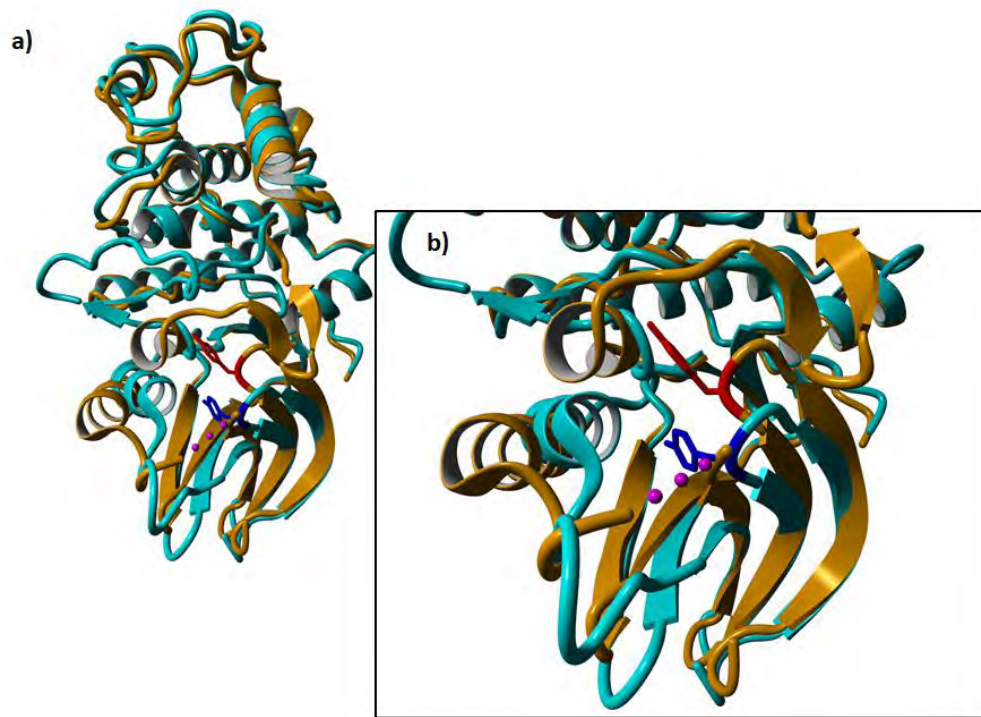


Figura A24. Comparación de la posición espacial de la Y15 en dos conformaciones de la CDK2 de humano. **a)** La estructura tridimensional de la CDK2 antes de su asociación con ciclina A (en naranja) (PDB 1hck) (Schulze-Gahmen *et al.*, 1996), se alineó con la estructura tridimensional de la CDK2 que cristalizó en complejo con ciclina A (en cian) (PDB 1fin) (Jeffrey *et al.*, 1995). El alineamiento se realizó con el programa YASARA (Ver. 18.2.7) (Kriegrer y Vriend, 2014) utilizando el algoritmo MUSTAN (Konagurthu *et al.*, 2004). **b)** Acercamiento del alineamiento mostrado en **a**. En rojo la Y15 de la CDK2 monomérica, en azul la Y15 de la CDK2 que se unió a ciclina A.

11. Bibliografía

Adams P.D., Li X., Sellers W.R., Baker K.B., Leng X., Harper J.W., Taya Y. y Kaelin W.G.J.R. (1999). **Retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes.** *Mol Cell Biol* 19: 1068–1080.

Ach R.A., Durfee T., Miller A.B., Taranto P., Hanley-Bowdoin L., Zambryski P.C. y Grussem W. (1997). **RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein.** *Mol Cell Biol* 17: 5077–5086.

Amon A., Surana U., Muroff I. y Nasmyth K. (1992). **Regulation of p34^{CDC28} tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*.** *Nature* 355: 368–371.

Atherton-Fessler S., Parker L.L., Geahlen R.L. y Piwnica-Worms H. (1993). **Mechanisms of p34cdc2 regulation.** *Mol Cell Biol* 13: 1675 – 1685.

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* 155, 416–421

Barrôco R.M., De Veylder L., Magyar Z., Engler G., Inzé D. y Mironov V. (2003). **Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division.** *Cell Mol Life Sci* 60: 401–412.

Behloul N., Wei W., Baha S., Liu Z., Wen J. y Meng J. (2017). **Effects of mRNA secondary structure on the expression of HEV ORF2 proteins in *Escherichia coli*.** *Microb Cell Fact* 16: 200.

Boniotti M.B. y Gutierrez C. (2001). **A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex.** *Plant J* 28: 341–350.

Booher R.N., Deshaies R.J. y Kirschner M.W. (1993). **Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34^{CDC28} in response to G₁ and G₂ cyclins.** *EMBO J* 12: 3417–3426.

Booher R. N., Holman P. S. y Fattaey A. (1997). **Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity.** *J Biol Chem* 272: 22300–22306.

Boruc J., Van Den Daele H., Hollunder J., Rombauts S., Mylle E., Hilson P., Inzé D., De Veylder L. y Russinova E. (2010). **Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network.** *Plant Cell* 22: 1264–1280.

Boudolf V., Inzé D y De Veylder L. (2006). **What if higher plants lack a CDC25 phosphatase?** *Trends Plant Sci* 11: 474–479.

Brown N.R., Noble M.E., Lawrie A.M., Morris M.C., Tunnah P., Divita G., Johnson L.N. y Endicott J.A. (1999a). **Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity.** J Biol Chem 274: 8746–8756.

Brown N.R., Noble M.E., Endicott J.A. y Johnson L.N. (1999b). **The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases.** Nat Cell Biol 1: 438–443

Brown N.R., Korolchuk S., Martin M.P., Stanley W.A., Moukhametzianov R., Noble M.E., y Endicott J. A. (2015). **CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK.** Nat Commun 6: 6769.

Buendía-Monreal M., Renteria-Canett I., Guerrero-Andrade O., Bravo-Alberto C. E., Martínez-Castilla L. P., García-Ramírez E. y Vázquez-Ramos J. M. (2011). **The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns.** Physiol Plantarum 143: 297–308.

Cao L., Chen F., Yang X., Xu W., Xie J. y Yu L. **Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages.** BMC Evol Biol 2014: 14-10.

Čížková M., Pichová A., Vítová M., Hlavová M., Hendrychová J., Umysová D., Gálová A., Ševčovičová E., Zachleder V. y Bišová K. (2008). **CDKA and CDKB kinases from *Chlamydomonas reinhardtii* are able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** Protoplasma 232:183–191.

Colasanti J., Tyers M. y Sundaresan V. (1991). **Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*.** Proc Natl Acad Sci USA 88:3377–3381.

Connell-Crowley L., Solomon M.J., Wei N. y Harper J.W. (1993). **Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro.** Mol Biol Cell 4: 79–92.

Connell-Crowley L., Harper J.W. y Goodrich D. (1997). **Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation.** Mol Biol Cell 8: 287–301.

Cools T., Iantcheva A., Weimer A.K., Boens S., Takahashi N., Maes S., Van den Daele H., Van Isterdael G., Schnittger A. y De Veylder L. (2011) **The *Arabidopsis thaliana* checkpoint kinase WEE1 protects against premature vascular differentiation during replication stress.** Plant Cell 23: 1435–1448.

Cook G. S., Gronlund A. L., Siciliano I., Spadafora N., Amini M., Herbert R. J., Bitonti M.B., Graumann K., Francis D. y Rogers H. (2013). **Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery.** J Exp Bot 64: 2093–2106.

- Corellou F., Camasses A., Ligat L., Peaucellier G. y Bouget F.Y. (2005). **Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase**. *Plant Physiol.* 138: 1627–1636.
- Coudreuse D. y Nurse P. (2010). **Driving the cell cycle with a minimal CDK control network**. *Nature* 468: 1074 – 1079.
- Coverley D., Laman H. y Laskey R.A. (2002). **Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation**. *Nat Cell Biol* 4: 523-528
- Criqui M.C., Parmentier Y., Derevier A., Shen W.H., Dong A. y Genschik P. (2000). **Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells**. *Plant J* 24: 763–773.
- Cui X., Fan B., Scholz J., y Chen Z. (2007). **Roles of *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase C complexes in cauliflower mosaic virus infection, plant growth, and development**. *Plant Cell* 19: 1388–1402.
- Dahl M., Meskiene I., Bogre L., Ha D.T., Swoboda I., Hubmann R., Hirt H. y Heberle-Bors E. (1995). **The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G₁ cyclin-deficient yeast and is induced in the G₁ phase of the cell cycle**. *Plant Cell* 7: 1847–1857.
- De Bondt H. L., Rosenblatt J., Jancarik J., Jones H. D., Morgan D. O. y Kim S. H. (1993). **Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2**. *Nature* 363: 595–602.
- De Schutter K., Joubès J., Cools T., Verkest A., Corellou F., Babiychuk E., Van Der Schueren E., Beeckman T., Kushnir S., Inze D. y De Veylder L. (2007). ***Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint**. *Plant Cell* 19: 211–225.
- Desai D., Gu Y. y Morgan D.O. (1992). **Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro**. *Mol Biol Cell* 3: 571–582.
- Desai D., Wessling H.C., Fisher R.P. y Morgan D.O. (1995). **Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2**. *Mol Cell Biol* 15: 345–350.
- Desvoves B., Ramírez-Parra E., Xie Q., Chua N.H. y Gutierrez C. (2006). **Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development**. *Plant Physiol* 140: 67–80.
- Dewitte W. y Murray J.A.H. (2003). **The plant cell cycle**. *Annu Rev Plant Mol Biol* 54: 235–264.
- Diehl J.A. y Sherr C.J. (1997). **A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase**. *Mol Cell Biol* 17: 7362–7374.

Dissmeyer N., Nowack M.K., Pusch S., Stals H., Inze D., Grini P.E. y Schnittger A. (2007). **T-loop phosphorylation of *Arabidopsis* CDKA;1 is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue.** Plant Cell 19: 972–985.

Dissmeyer N., Weimer A.K., Pusch S., De Schutter K., Kamei C.L., Nowack M., Novak B., Duan G.L., Zhu Y.G., De Veylder L. y Schnittger A. (2009). **Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1.** Plant Cell 21: 3641–3654.

Dissmeyer N., Weimer A.K., De Veylder L., Novak B. y Schnittger A. (2010). **The regulatory network of cell-cycle progression is fundamentally different in plants versus yeast or metazoans.** Plant Signal Behav 5: 1613–1618.

Doerner P. (2000) Cell Division Regulation. En Buchanan B. B., Gruissem W. y Jones R. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** 1a Ed., pp. 1376. Rockville, MD., John Wiley & Sons.

Dong Q., Zhao Y., Jiang H.Y., He H.S., Zhu S.W., Cheng B.J. y Xiang Y. (2011). **Genome-wide identification and characterization of the cyclin gene family in *Populus trichocarpa*.** Plant Cell Tiss Org 107: 55–67.

Doonan J.H. y Kitsios G. (2009). **Functional evolution of cyclin-dependent kinases.** Mol Biotechnol 42: 14–29.

Dudits D., Cserhádi M., Miskolczi P. y Horváth G. V. (2007). **The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation.** En Inzé D. Cell cycle control and plant development. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd, pp. 1–30.

Dudits D., Abraham E., Miskolczi P., Ayaydin F., Bilgin M. y Horvath GV. (2011). **Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway.** Annals Bot 107: 1193–1202.

Echalier A., Endicott J.A. y Noble M.E.M. (2009). **Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies.** Biochim Biophys Acta 1804: 511–519.

Fantes P. y Nurse P. (1977). **Control of cell size in fission yeast by a growth modulated size control over nuclear division.** Exp Cell Res 107: 377–386.

Ferreira P.C., Hemerly A.S., Villarroel R., Van Montagu M. e Inzé D. (1991) **The *Arabidopsis* functional homolog of the p34cdc2 protein kinase.** Plant Cell, 3:531–540.

Fisher R.P. y Morgan D.O. (1994). **A novel cyclin associates with M015/CDK7 to form the CDK-activating kinase.** Cell 78:713-724.

Fisher R.P., Jin P., Chamberlin H.M. y Morgan D.O. (1995). **Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase.** Cell 83: 47–57.

Francis D.M. y Page R. (2010) **Strategies to optimize protein expression in *E. coli*.** Curr Protoc Protein Sci Capítulo 5: Unidad 5.24.21–9.

Francis D. (2011). **A commentary on the G2/M transition of the plant cell cycle.** Ann Bot 107: 1065–70.

Fülöp K., Pettkó-Szandtner A., Magyar Z., Miskolczi P., Kondorosi E., Dudits D. y Bakó L. (2005). **The *Medicago* CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription.** Plant J. 42: 810–820.

Garza-Aguilar S. M., Lara-Núñez A. García-Ramírez E. y Vázquez-Ramos J. M. (2017). **Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination.** Physiol Plant 160: 84–97.

Godínez-Palma S.K., García E., Sánchez M.P., Rosas F. y Vázquez-Ramos J.M. (2013). **Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination.** J. Exp Bot 64: 5661–5671.

Godínez-Palma S. K. (2015). **Regulación de los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación de maíz.** Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM. México.

Gonzalez N., Gévaudant F., Hernould M., Chevalier C. y Mouras A. (2007). **The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit.** Plant J 51: 642–655.

Grafi G., Burnett R.J., Helentjaris T., Larkins B.A., De Caprio J.A., Sellers W.R. y Kaelin W.G. (1996). **A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication.** Proc Natl Acad Sci USA 93: 8962–8967.

Gutiérrez R., Quiroz-Figueroa F. y Vázquez-Ramos J.M. (2005). **Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination.** Plant & Cell Physiology 46: 166–173.

Hagopian J.C., Kirtley M.P., Stevenson L.M., Gergis R.M., Russo A.A., Pavletich N.P., Parsons S.M. y Lew J (2001). **Kinetic basis for activation of CDK2/cyclin A by phosphorylation.** J Biol Chem 276: 275–280.

Hajheidari M., Farrona S., Huettel B., Koncz Z. y Koncz C. (2012). **CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of *Arabidopsis* RNA polymerase II.** Plant Cell 24: 1626–1642.

Hall T.A. (1999). **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl Acids Symp Ser 41: 95–98.

Hanks S.K. y Hunter T. (1995). **Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.** FASEB J 9: 576–96.

Harashima H., Shinmyo A. y Sekine M. (2007). **Phosphorylation of threonine 161 in plant cyclin-dependent kinase A is required for cell division by activation of its associated kinase.** Plant J 52: 435–448.

Harashima H. y Schnittger A. (2012). **Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria.** Plant Methods 8: 23.

Harashima H., Dissmeyer N. y Schnittger A. (2013). **Cell cycle control across the eukaryotic Kingdom.** Trends Cell Biol 23: 345-56.

Harashima H., Dissmeyer N1., Hammann P., Nomura Y., Kramer K., Nakagami H. y Schnittger A. (2016). **Modulation of plant growth in vivo and identification of kinase substrates using an analog-sensitive variant of CYCLIN-DEPENDENT KINASE A;1.** BMC Plant Biol 16 :209.

Harvey S.L. y Kellog D.R. (2003). **Conservations of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast Wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control.** Curr Biol 13: 264–275.

Harvey S.L., Charlet A., Haas W., Gygi S.P. y Kellogg D.R. (2005). **Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1.** Cell 122: 407–420.

Hata S. (1991). **cDNA cloning of a novel cdc2+/CDC28-related protein kinase from rice.** FEBS Lett 279: 149–152.

Hedges S.B., Blair J.E., Venturi M.L. y Shoe J.L. (2004). **A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life.** BMC Evol Biol. 4: 2.

Hemerly A., Bergounioux C., Van Montagu M. Inze D. y Ferreira P. (1992). **Genes Regulating the Plant Cell Cycle: Isolation of a Mitotic-Like Cyclin from *Arabidopsis thaliana*.** Proc Natl Acad Sci USA 89: 3295-3299.

Hirano H., Harashima H., Shinmyo A. y Sekine M. (2008). ***Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation.** Plant Mol Biol 66: 259–275.

Hirt H., Páy A., Györgyey J., Bakó L., Németh K., Bögre L., Schweyen R. J., Heberle-Bors E. y Dudits D. (1991). **Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34^{cdc2}.** Proc Natl Acad Sci USA 88: 1636–1640.

Holmes J.K. y Solomon M.J. (1996). **A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34^{cdc2} and p33^{cdk2}.** J Biol Chem 271: 25240–25246.

Hu X., Cheng X., Jiang H., Zhu S., Cheng B., Xiang Y. (2010). **Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*)**. *Genet Mol Res* 9: 1490–1503.

Huang F. y Nau W.M. (2003). **A conformational flexibility scale for amino acids in peptides**. *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 2269–2272.

Huntley R., Healy S., Freeman D., Lavender P., de Jager S., Greenwood J., Makker J., Walker E., Jackman M., Xie Q., Bannister A.J., Kouzarides T., Gutierrez C., Doonan J.H. y Murray J.A. (1998). **The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins**. *Plant Mol Biol* 37:155–169.

Igarashi M., Nagata A., Jinno S., Suto K. y Okayama H. (1991). **Wee1⁺-like gene in human cells**. *Nature* 353: 80–83.

Imajuku Y., Hirayama T., Endoh H. y Oka A. (1992). **Exon-intron organization of the *Arabidopsis thaliana* protein kinase genes CDC2a and CDC2b**. *FEBS Lett* 304: 73–77.

Inzé D. y De Veylder L. (2006). **Cell cycle regulation in plant development**. *Annu Rev Genet* 40: 77–105.

Inzé D. y De Veylder L. (2015). **Cell Division**. En Buchanan B. B., Grissem W. y Jones R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2a Ed., pp. 476. Rockville, MD., John Wiley & Sons.

Jackson P. K. (2008). **The hunt for cyclin**. *Cell* 134: 199-202.

Jacobs H.W., Knoblich J.A. y Lehner C.F. (1998). ***Drosophila* Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B**. *Genes Dev*. 12: 3741–3751.

Jeffrey P.D., Russo A.A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massagué J. y Pavletich N.P. (1995). **Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex**. *Nature* 376: 313–320.

Joubès J., Chevalier C., Dudits D., Heberle-Bors E., Inzé D., Umeda M. y Renaudin J.P. (2000). **CDK-related protein kinases in plants**. *Plant Mol Biol* 43: 607–20.

Kaldis P., Sutton A., Solomon M.J. (1996). **The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast**. *Cell* 86: 553–564.

Kaldis P., Russo A. A., Chou H. S., Pavletich N. P. y M. J. Solomon. (1998). **Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities**. *Mol Biol Cell* 9: 2545-2560.

Kaldis P., Tsakraklides V., Ross K.E., y Winter E. (2000-2013). **Activating Phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinases in Budding Yeast**. En: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6329/>

Kato J.Y., Matsuoka M., Strom D.K. y Sherr C.J. (1994). **Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase.** Mol Cell Biol 14: 2713–2721.

Kawamura K., Kato K., Shinmyo A. y Sekine M. (2006). **Tobacco RETINOBLASTOMA-RELATED protein is phosphorylated by different types of cyclin-dependent kinases during the cell cycle.** Plant Biotechnol 23: 467-473.

Keaton M. A. y Lew D. J. (2006). **Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in the yeast morphogenesis checkpoint.** Curr Opin Microbiol 9: 540–546.

Kim S.Y. y Ferrell J.E.J. (2007). **Substrate competition as a source of ultrasensitivity in the inactivation of Wee1.** Cell 128: 1133 – 1145.

Kitagawa M., Higashi H., Jung H.K., Suzuki-Takahashi I., Ikeda M., Tamai K., Kato J., Segawa K., Yoshida E., Nishimura S. y Taya Y. (1996). **The consensus motif for phosphorylation by cyclinD1-CDK4 is different from that for phosphorylation by cyclinA/E-CDK2.** EMBO J 15: 7060–7069.

Kitsios G., Alexiou K.G., Bush M., Shaw P. y Doonan J.H. (2008) **A cyclin-dependent protein kinase, CDKC2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in Arabidopsis.** Plant J. 547: 220–235.

Knighton D. R., Zheng J.H., Ten, Kyck L. F., Ashford V. A., Xuong N. H., Taylor S. S. y Sowadski J. M. (1991). **Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase.** Science 253: 407-414.

Knoblich J.A. y Lehner C.F. (1993). **Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G₂-M transition.** EMBO J 12: 65–74.

Knudsen E.S. y Wang J.Y. (1997). **Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation.** Mol Cell Biol 17: 5771–5783.

Konagurthu A.S., Whisstock J.C., Stuckey P.J. y Lesk A.M. (2006). **MUSTANG: A multiple structural alignment algorithm.** Proteins 64: 559–574.

Kono A., Umeda-Hara C., Lee J., Ito M., Ichimiya H. y Umeda M. (2003). **Arabidopsis D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase.** Plant Physiol 132: 1315–1321.

Koroleva O.A., Tomlinson M., Parinyapong P., Sakvarelidze L., Leader D., Shaw P. y Doonan J.H. (2004). **CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases.** Plant Cell 16: 2364–2379.

Krieger E y Vriend G. (2014). **YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations.** Bioinformatics 30: 2981–2982.

- Kudla G., Murray A.W., Tollervey D. y Plotkin J.B. (2009). **Coding-Sequence Determinants of Gene Expression in *Escherichia coli***. *Science* 324: 255–258.
- Kumagai A. y Dunphy W.G. (1992). **Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts**. *Cell* 70: 139 – 151.
- La H., Li J., Ji Z., Cheng Y., Li X., Jiang S., Venkatesh P.N. y Ramachandran S. (2006). **Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa* L.)**. *Mol Genet Genomics* 275: 374–386.
- Labbé J.C., Martinez A.M., Fesquet, D., Capony J. P., Darbon J.M., Derancourt J., Devault A., Morin N., Cavadore J.C. y Doree M. (1994). **p40^{M015} associates with a p36 subunit and requires both nuclear translocation and Thr176 phosphorylation to generate cdk-activating kinase activity in *Xenopus* oocytes**. *EMBO J* 13: 5155–5164.
- Landrieu I., da Costa M., De Veylder L., Dewitte F., Vandepoele K., Hassan S., Wieruszkeski J.M., Corellou F., Faure J.D., Van Montagu M., Inzé D. y Lippens G. (2004). **A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana***. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13380–13385.
- Lara-Núñez A., de Jesús N. y Vázquez-Ramos J.M. (2008). **Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones**. *Physiol Plant* 132: 79–88.
- Lee J., Das A., Yamaguchi M., Hashimoto J., Tsutsumi N., Uchimiya H. y Umeda M. (2003). **Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase**. *Plant J* 34: 417–425.
- Lee M.G. y Nurse P. (1987). **Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2***. *Nature* 327: 31–35.
- Lee M.S., Enoch T. y Piwnica-Worms H. (1994). **mik1⁺ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34^{cdc2} on tyrosine 15**. *J Biol Chem* 269: 30530–30537.
- Leng X., Noble M., Adams P. D., Qin J. y Harper J. W. (2002). **Reversal of growth suppression by p107 via direct phosphorylation by cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4**. *Mol Cell Biol* 22: 2242–2254.
- Lindqvist A., Rodriguez-Bravo V., y Medema R.H. (2009). **The decision to enter mitosis: Feedback and redundancy in the mitotic entry network**. *J. Cell Biol.* 185:193–202.
- Lipavská H., Mašková P. y Vojvodová P. (2011). **Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase cdc25 induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis**. *Ann Bot* 107: 1071–1086.
- Liu F., Stanton J.J., Wu Z. y Piwnica-Worms H. (1997). **The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex**. *Mol Cell Biol* 17: 571–583.

- Lolli G. y Johnson L.N. (2005). **CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs?** Cell Cycle 4: 572–577.
- Ma Z, Wu Y., Jin J., Yan J., Kuang S., Zhou M., Zhang Y. y Guo A.Y. (2013). **Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes.** Mol Phylogenet Evol 66: 1002–1010
- Magyar Z., Bakó L., Bögre L., Dedeoglu D., Kapros T. y Dénes D. (1993). **Active cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells.** Plant J 4:151–161.
- Magyar Z., Meszaros T., Miskolczi P., Deak M., Feher A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bakó L., Koncz C. y Dudits D. (1997). **Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells.** Plant Cell 9: 223–235.
- Magyar Z., Atanassova A., De Veylder L., Rombauts S. e Inzé D. (2000). **Characterization of two distinct DPrelated genes from Arabidopsis thaliana.** FEBS Lett 486: 79–87.
- Mäkelä T.P., Tassan J.P., Nigg E.A., Frutiger S. Hughes G.J. y Weinberg R.A. (1994). **A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15.** Nature 371: 254–257.
- Malumbres M. y Barbacid M. (2001). **To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer.** Nat Rev Cancer 1: 222–231.
- Malumbres M., Harlow E., Hunt T., Hunter T., Lahti J.M., Manning G, Morgan D.O., Tsai L.H. y Wolgemuth D.J. (2009). **Cyclin-dependent kinases: a family portrait.** Nat Cell Biol 11: 1275–1276.
- Malumbres M. (2014). **Cyclin-dependent kinases.** Genome Biol 15:122.
- Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T. y Sudarsanam S. (2002). **The protein kinase complement of the human genome.** Science. 298 :1912–1934.
- Martínez M.C., Jørgensen J.E., Lawton M.A., Lamb C.J. y Doerner P.W. (1992) **Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development.** Proc Natl Acad Sci USA 89: 7360–7364.
- Matsuoka M., Kato J., Fisher R.P., Morgan D.O. y Sherr C.J. (1994). **Activation of cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) by mouse MO15-associated kinase.** Mol Cell Biol 14: 7265-75.
- McGowan C.H. y Russell P. (1995). **Cell cycle regulation of human WEE1.** EMBO J 14: 2166–2175.
- McMillan J. N., Sia R. A. y Lew D. J. (1998). **A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast.** J Cell Biol. 142: 1487–1499.

McMillan J.N., Sia R.A., Bardes E.S., y Lew D.J. (1999). **Phosphorylation-independent inhibition of Cdc28p by the tyrosine kinase Swe1p in the morphogenesis checkpoint.** Mol Cell Biol 19: 5981–5990.

Menges M. y Murray J. A. H. (2002). **Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity.** Plant J. 30: 203–212.

Menges M., de Jager S. M., Gruissem W. y Murray J. A. (2005). **Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control.** Plant J 41: 546–566.

Menges M., Pavesi G., Morandini P., Bögre L. y Murray J.A.H. (2007). **Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins.** Plant Physiol 145: 1558–1576.

Mora C., Tittensor D.P., Adl S., Simpson A.G.B. y Worm B (2011). **How many species are there on Earth and in the ocean?** PLoS Biol 9: e1001127.

Morgan D.O. (1997). **Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and micro-processors.** Annu Rev Cell Dev Biol 13: 261–291

Morgan D.O. (2007). **The Cell Cycle: Principles of Control.** London: New Science Press.

Mueller P.R., Coleman T.R., Kumagai A. y Dunphy W.G. (1995). **Myt1: A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15.** Science 270: 86–90.

Nakagami H., Kawamura K., Sugisaka K., Sekine M. y Shinmyo A. (2002). **Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco.** Plant Cell 14: 1847–1857.

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.

Nishizawa M., Suzuki K., Fujino M., Oguchi T. y Toh-e A. (1999). **The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (cdk) family, has a regulation mechanism different from cdks functioning throughout the cell cycle.** Genes Cells 4: 627–42.

Nigg E.A. (2001). **Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints.** Nat Rev Mol Cell Biol 2: 21–32.

Orchard C.B., Siciliano I., Sorrell D.A., Marchbank A., Rogers H.J., Francis D., Herbert R.J., Suchomelova P., Lipavska H., AZmi A., y Van-Onckelen H. (2005). **Tobacco BY-2 cells**

expressing fission yeast cdc25 bypass a G₂/M block on the cell cycle. Plant J 44: 290–299.

Ortiz-Gutiérrez E., García-Cruz K., Azpeitia E., Castillo A., de la Paz Sánchez M. y Álvarez-Buylla E.R. (2015). **A dynamic gene regulatory network model that recovers the cyclic behavior of *Arabidopsis thaliana* cell cycle.** PLoS Comput Biol 11(9):e1004486.

Pan Z. Q., Amin A. y Hurwitz J. (1993). **Characterization of the *in vitro* reconstituted cyclin A or B1-dependent Cdk2 and Cdc2 kinase activities.** J Biol Chem 268: 20443–20451.

Panchy N., Lehti-Shiu M. D. y Shiu S. H. (2016). **Evolution of gene duplication in plants.** Plant Physiol 171: 2294–2316.

Park J.A., Ahn J.W., Kim Y.K., Kim S.J., Kim J.K., Kim W.T. y Pai H.S. (2005). **Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants.** Plant J 42: 153–163.

Parker L.L. y Piwnica-Worms H. (1992). **Inactivation of the p34^{cdc2}-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase.** Science: 257(5078): 1955–1957.

Parker L.L., Atherton-Fessler S. y Piwnica-Worms H. (1992) **p107^{wee1} is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34^{cdc2} on tyrosine 15.** Proc Natl Acad Sci USA 89: 2917–2921.

Parker L. L., Sylvestre P. J., Byrnes M. J. III., Liu F. y Piwnica-Worms H. (1995). **Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells.** Proc Natl Acad Sci USA 92: 9638–9642.

Pavletich N.P. (1999). **Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors.** J Mol Biol 287: 821–828.

Perry J.A. y Kornbluth S. (2007). **Cdc25 and Wee1: analogous opposites?** Cell Div 2: 12.

Poon R.Y., Yamashita K., Adamczewski J.P. Hunt T. y Shuttleworth. (1994). **The cdc2-related protein p40^{MO15} is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33^{cdk2} and p34^{cdc2}.** EMBO J 12: 3123–3132.

Porceddu A., Stals H., Reichheld J.P., Segers G., De Veylder L., Barroco R.P., Casteels P., Van Montagu M., Inzé D. y Mironov V. (2001). **A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G₂/M progression in plants.** J Biol Chem 276: 36354–36360.

Qi Z., Huang Q.Q., Lee K.Y., Lew J., y Wang J.H. (1995). **Reconstitution of neuronal Cdc2-like kinase from bacteria-expressed Cdk5 and an active fragment of the brain-specific activator. Kinase activation in the absence of Cdk5 phosphorylation.** J Biol Chem 270: 10847–10854.

Qin L.X., Perennes C., Richard L., Bouvier-Durand M., Trehin C. Inzé D. y Bergounioux C. (1996). **G2-and early-M-specific expression of the NTCYC1 cyclin gene in *Nicotiana tabacum* cells.** Plant Mol Biol 32: 1093–1101.

Ramírez-Parra E, Xie Q., Boniotti M.B.y Gutierrez C. (1999). **The cloning of plant E2F, a retinoblastoma binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators.** Nucleic Acids Res 27: 3527–3533.

Ramírez-Parra E. y Gutierrez C. (2000) **Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F–DNA binding.** FEBS Lett 486:73–78.

Renaudin J.P., Colasanti J., Rime H., Yuan Z. y Sundaresan V (1994). **Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins.** Proc Natl Acad Sci USA 91: 7375–7379.

Ross K.E., Kaldis P. y Solomon M.J. (2000). **Activating phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclin-dependent kinase, Cdc28p, precedes cyclin binding.** Mol Biol Cell 11: 1597–1609.

Russell P. y Nurse P. (1986). ***cdc25⁺* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast.** Cell 45: 145–153.

Russo A.A., Jeffrey P.D. y Pavletich N.P. (1996). **Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation.** Nat Struct Biol 3 :696–700.

Rychlik W. (2007). **OLIGO 7 primer analysis software.** Methods Mol Biol 402: 35–60.

Sabelli P. A., Dante R. A., Nguyen H. N., Gordon-Kamm W. J., Larkins B. A. (2014). **Expression, regulation and activity of a B2-type cyclin in mitotic and endoreduplicating maize endosperm.** Front Plant Sci 5: 561.

Sánchez M.P., Gurusinghe S.H., Bradford K.J. y Vázquez-Ramos J.M. (2005). **Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination.** J Exp Bot 56: 515–523.

Sauter M. (1997). **Differential expression of a CAK (*cdc2*-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and *cdc2* genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin.** Plant J 11: 181–190.

Schneider, E., Kartarius, S., Schuster, N. y Montenarh, M. (2002). **The cyclin H/*cdk7*/*Mat1* kinase activity is regulated by CK2 phosphorylation of cyclin H.** Oncogene 21: 5031–5037.

Schnittger A., Schobinger U., Stierhof Y.D., Hulskamp M. (2002). **Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes.** Curr Biol 12: 415–420.

Schulze-Gahmen U., De Bondt H. L. y Kim S. H. (1996). **High-resolution crystal structures of human cyclin-dependent kinase 2 with and without ATP: bound waters and natural ligand as guides for inhibitor design.** J Med Chem 39: 4540–4546.

Schuppler U., He P.H., John P.C. y Munns R. **Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell cycle kinase activity in wheat leaves.** Plant Physiol 1998 117: 667–678.

Scofield S., Jones A. y Murray J.A. (2014). **The plant cell cycle in context.** J Exp Bot 65: 2557–2562.

Sekhon R.S., Lin H., Childs K.L., Hansey C.N., Buell C.R., de Leon N. y Kaeppler S.M. (2011). **Genome-wide atlas of transcription during maize development.** Plant J 66: 553–563.

Sekine M., Ito M., Uemukai K., Maeda Y., Nakagami H. y Shinmyo A. (1999). **Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants.** FEBS Lett 460: 117–122.

Sherr C.J. y Roberts J.M. (2004). **Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases.** Genes Dev 18: 2699–2711.

Shimotohno A., Matsubayashi S., Yamaguchi M., Uchimiya H. y Umeda M. (2003). **Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*.** FEBS Lett 534: 69–74.

Shimotohno A., Umeda-Hara C., Bisova K., Uchimiya H. y Umeda M. (2004). **The plant-specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*.** Plant Cell 16: 2954–2966.

Shimotohno A., Ohno R., Bisova K., Sakaguchi N., Huang J., Koncz C., Uchimiya H. y Umeda M. (2006). **Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*.** Plant J. 47(5): 701–710.

Solomon M.J. y Kaldis P. (1998). **Regulation of cdks by phosphorylation.** En: Results and Problems in Cell Differentiation: Cell cycle control (ed. Pagano, M.). Heidelberg, Springer, pp. 79– 109.

Soni R., Carmichael J.P., Shah Z.H. y Murray J.A.H. (1995). **A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif.** Plant Cell 7: 85–103.

Song J., Wang H., Wang J., Leier A., Marquez-Lago T., Yang B., Zhang Z., Akutsu T., Webb G.I. y Daly R.J. (2017). **PhosphoPredict: A bioinformatics tool for prediction of human kinase-specific phosphorylation substrates and sites by integrating heterogeneous feature selection.** Sci Rep 7:6862.

Sorrell D.A., Menges M., Healy J.M., Deveaux Y., Amano C., Su Y., Nakagami H., Shinmyo A., Doonan J.H., Sekine M. y Murray J.A. (2001). **Cell cycle regulation of cyclin-**

dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* 126: 1214–1223.

Sorrell D.A., Marchbank A., McMahon K., Dickinson J.R., Rogers H.J. y Francis D. (2002). **A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*.** *Planta* 215: 518–522.

Spadafora N. D., Doonan J. H., Herbert R. J., Bitonti N. B., Wallace E., Rogers H. J. y Francis D. (2011). ***Arabidopsis* T-DNA insertional lines for CDC25 are hypersensitive to hydroxyurea but not to zeocin or salt stress.** *Ann Bot* 107: 1183–1192.

Sun Y., Dilkes B.P., Zhang C., Dante R.A., Carneiro N.P., Lowe K.S., Jug R., Gordon-Kamm W.J. y Larkins B.A. (1999). **Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm.** *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4180–4185.

Szewczyk E., Nayak T., Oakley C.E., Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, Osmani S.A. y Oakley B.R. (2006). **Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*.** *Nat Protoc* 1: 3111–3120.

Takaki T., Echaliier A., Brown N.R., Hunt T., Endicott J.A. y Noble M. E. M. (2009). **The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4171–4176.

Takatsuka H., Ohno R. y Umeda M. (2009). **The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation.** *Plant J* 59: 475-487.

Takatsuka H., Umeda-Hara C. y Umeda M. (2015). **Cyclin-dependent kinase-activating kinases CDKD;1 and CDKD;3 are essential for preserving mitotic activity in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J* 82: 1004-1117.

Tassan J.P., Schultz S.J., Bartek J. y Nigg E.A. (1994). **Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase).** *J Cell Biol* 127: 467–478.

Thompson J. D., Higgins D. G. y Gibson T. J. (1994). **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.

Tsakraklides V. y Solomon M.J. (2002). **Comparison of Cak1p-like cyclin-dependent kinase activating kinase.** *J Biol Chem* 277: 33482–33489.

Trunnell N.B., Poon A.C., Kim S.Y. y Ferrell J.E.J. 2011. **Ultrasensitivity in the regulation of Cdc25C by Cdk1.** *Mol Cell* 41: 263 – 274.

Ubersax J.A. y Ferrell J.E., Jr (2007). **Mechanisms of specificity in protein phosphorylation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 530–541.

Umeda M., Bhalerao R.P., Schell J., Uchimiya H., y Koncz C. (1998). **A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana***. Proc Natl Acad Sci USA 95: 5021–5026.

Vázquez-Ramos J.M. y Sánchez M.P. (2003). **The cell cycle and seed germination**. Seed Sci Res 13: 113-30.

Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., Yadav G., Singh J., Mishra R.K., Kumar V., Verma R., Upadhyay R.G., Pandey M. y Sharma S. (2017) **Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects**. Front Plant Sci 8: 161.

Wang G.F., Kong H.Z., Sun Y.J., Zhang X.H., Zhang W., Altman N., de Pamphilis C.W. y Ma H. (2004) **Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins**. Plant Physiol 135: 1084–1099.

Wang W, Chen X. (2004) **HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis***. Development 131: 3147–3156.

Watanabe N., Broome M. y Hunter T. (1995). **Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle**. EMBO J. 14: 1878–1891.

Weingartner M., Pelayo H.R., Binarova P., Zwerger K., Melikant B., de la Torre C., Heberle-Bors E. y Bogre L. (2003). **A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint**. J Cell Sci 116: 487–498.

Weingartner M., Criqui M.C., Meszaros T., Binarova P., Schmit A.C., Helfer A., Derevier A., Erhardt M., Bogre L. y Genschik P. (2004). **Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast**. Plant Cell 16, 643–657.

Welburn J.P., Tucker J.A, Johnson T, Lindert L., Morgan M., Willis A., Noble M.E. y Endicott J.A. (2007). **How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin- dependent kinase 2-cyclin A**. J Biol Chem 282: 3173–3181.

Wieser S. y Pines J. (2015). **The biochemistry of mitosis**. Cold Spring Harb Perspect Biol 7.

Xie Q., Suarez-Lopez P. y Gutierrez C (1995). **Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication**. EMBO J 14: 4073–4082.

Xie Q., Sanz-Burgos A.P., Hannon G.J. y Gutierrez C. (1996). **Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins**. EMBO J 15: 4900–4908.

Yamaguchi M., Fabian T., Sauter M., Bhalerao R. P., Schrader J., Sandberg G., Umeda M. y Uchimiya H. (2000). **Activation of CDK activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants.** *Plant J* 24: 11–20.

Yamaguchi M., Umeda M., y Uchimiya H. (1998). **A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II.** *Plant J* 16: 613–619.

Zarkowska T. y Mitnacht S. (1997). **Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G₁/S cyclin-dependent kinases.** *J Biol Chem* 272: 12738–12746.

Zhang K., Letham D.S. y John P.C. (1996). **Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase.** *Planta* 200: 2–12.

Zhang K.R., Diederich L. y John P.C.L. (2005). **The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast cdc25 protein tyrosine phosphatase: implications for mechanisms of cytokinin response and plant development.** *Plant Physiol* 137: 308–316.

Zhang W., Xiao W., Wei H., Zhang J. y Tian Z. (2006). **mRNA secondary structure at start AUG codon is a key limiting factor for human protein expression in *Escherichia coli*.** *Biochem Biophys Res Commun* 349: 69–78.

Zhang T., Wang X., Lu Y., Cai X., Ye Z. y Zhang J. (2014). **Genome-wide analysis of the cyclin gene family in tomato.** *Int J Mol Sci* 15: 120–140.

Zhao X., Harashima H., Dissmeyer N., Pusch S., Weimer AK., Bramsiepe J., Bouyer D., Rademacher S., Nowack M.K., Novak B., Sprunck S. y Schnittger A. (2012). **A general G₁/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.** *PLoS Genet* 8:e1002847.

Zhu Y., Schluttenhoffer C.M., Wang P., Fu F., Thimmapuram J., Zhu J.K., Lee S.Y., Yun D.J. y Mengiste T. (2014). **CYCLIN-DEPENDENT KINASE 8 differentially regulates plant immunity to fungal pathogens through kinase-dependent and -independent functions in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 26: 4149–4170.

Zukerberg L.R., Patrick G.N., Nikolic M., Humbert S., Wu C.L., Lanier L.M., Gertler F.B., Vidal M., Van Etten R.A. y Tsai L.H. (2000). **Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth.** *Neuron* 26: 633–46.

