



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL EJE CROMOSÓMICO
DURANTE LA MEIOSIS DE *Zea mays***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Biól. Yared Gutiérrez Pinzón

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Arnaud Ronceret
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en el departamento de Biología Molecular de Plantas en el laboratorio de Citogenómica de la Meiosis bajo la asesoría del Dr. Arnaud Ronceret. Este proyecto fue financiado por la DGAPA-PAPIIT UNAM a través del proyecto IA201217. Yared Gutiérrez Pinzón recibió una beca de maestría por parte del CONACYT (CVU 819411)

Agradecimientos

Al Dr. Arnaud Ronceret por permitirme desarrollar este proyecto en su laboratorio y por todas sus enseñanzas.

A la Biól. Elda Patricia Rueda Benítez por su infinito apoyo en las cuestiones técnicas dentro del laboratorio.

A los miembros de mi comité tutor y miembros del jurado por todas sus observaciones a este trabajo

Agradecimientos personales

A R2D2 ya eres uno con la fuerza ¡Te amo! ¡Gracias infinitas!

A pequeñita por todo su amor y apoyo incondicional, ahora que ya estoy de este lado de la barrera empiezo a comprender ese amor infinito que siempre has tenido para conmigo, gracias por todos tus esfuerzos y todo ese apoyo.

A Lula mi hermana y mejor amiga, por todo su cariño y apoyo

A Chuy, gracias por darme ese empujón para terminar ¡Te amo!

A Lucy mi Xanana tu eres mi inspiración ¡Te amo!

A mis amigos de la maestría por hacerla más llevadera. Mil gracias a Karen Angoa, Paulina Anaya, Irene Castillo, David Morales y Lety Guzmán.

Por supuesto a Paty Rueda por ser esa amiga que todos necesitan.

A Glow y a Yaz por estar siempre ahí ¡Las adoro!

Abreviaturas utilizadas

AD: Dominio de activación.

BD: Dominio de unión a ADN.

CDS: Región codificante

CS: Complejo Sinaptonémico

dNTPs: deoxinucleósidos trifosfatos

EC: Elemento Central del Complejo Sinaptonémico

EA/EL: Elemento Axial/Lateral del Complejo Sinaptonémico

ET: Elemento Transversal del Complejo Sinaptonémico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de la transcripción inversa. PCR cuantitativa

RC: Región Central del Complejo Sinaptonémico

RDC: Ruptura de Doble Cadena del ADN

SD: Medio de Dextrosa sintético

3'UTR: Región 3' no traducida

5'UTR: Región 5' no traducida

Y2H (*Yeast Two Hybrid System*): Ensayo de dos híbridos en levadura

Índice

Abreviaturas utilizadas	5
Resumen	8
Introducción	10
El uso de <i>Zea mays</i> como organismo modelo en estudios genéticos y de la meiosis	10
El proceso meiótico	13
El desarrollo de la profase I meiótica	15
El complejo sinaptonémico y su importancia en el proceso meiótico	17
El estudio de la interacción proteína-proteína en los componentes del CS por medio del ensayo de dos híbridos	20
Antecedentes	22
ZmAFD1 (<i>Absence of FirstDivision 1</i>)	23
ZmASY1 (<i>Asynaptic 1</i>)	26
ZmDSY2 (<i>Desynaptic 2</i>)	28
ZmPCH2 (<i>Pachytene Checkpoint 2</i>)	29
ZmP31 ^{comet} /ZmBVF1 (<i>Bivalent Formation 1</i>)	31
ZYP1 (<i>Zipper 1</i>)	32
Interacciones conocidas entre los componentes del CS	35
Justificación	38
Hipótesis	39
Objetivo general	39
Objetivos particulares	39
Materiales y Métodos	41
Análisis bioinformático	41
Colecta de muestras	42
Análisis de expresión	42
Extracción de ARN total	42
Síntesis de ADN complementario (cDNA) y RT-PCR semicuantitativa	44
Análisis de expresión por medio de RTqPCR	45
Clonación de los plásmidos utilizados en el proyecto	48
Cepas de bacterias utilizadas en la clonación	48
Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	48
Amplificación ATG-STOP	49
Ligación con el vector pJET1.2	50
Transformación por electroporación	52

Comprobación de la inserción en el vector pJET1.2blunt por medio de PCR en colonia.....	52
Obtención de plásmidos por medio de minipreparaciones.....	52
Comprobación de los plásmidos obtenidos mediante digestión enzimática.....	52
Clonación con el sistema GATEWAY en el vector donador y los vectores de expresión	53
Evaluación de interacciones proteína-proteína por medio del ensayo de dos híbridos en levadura.....	58
PCR en colonia de levadura	63
Resultados	65
Análisis bioinformático	65
Análisis de la acumulación de los transcritos para las proteínas del CS en hoja, raíz, inflorescencia masculina e inflorescencia femenina.....	77
Análisis de la acumulación de los transcritos para las proteínas del CS en maíz por RT-qPCR	80
Construcciones de plásmidos utilizados en el proyecto	83
Ligación del producto de PCR con el vector pJET1.2 blunt	83
Interacción de los componentes del CS por medio del ensayo de dos híbridos en levadura	86
Discusión.....	92
Expresión de los genes de los componentes del CS en maíz	92
Análisis de las interacciones de los componentes del CS en maíz.....	96
Conclusiones.....	105
Perspectivas.....	106
Referencias	107
ANEXOS	120
ANEXO 1. Oligonucleótidos diseñados.....	120
ANEXO 2. Enzimas utilizadas para la comprobación de pJET1.2-blunt+CDS.	122
ANEXO 3. Protocolo de purificación con PEG	122
ANEXO 4. Reacciones BP y LR.....	123
ANEXO 5. Digestiones con VspI para comprobar pDONOR221+CDS	123
ANEXO 6. Corroboración de construcciones obtenidas.....	123
ANEXO 7. Medios y soluciones utilizadas en el ensayo de Y2H	124
ANEXO 8. Repeticiones técnicas de la PCR semicuantitativa.....	124
ANEXO 9. Repeticiones técnicas del ensayo de Y2H.....	126

Resumen

El maíz es un organismo que ha sido utilizado desde hace más de un siglo como modelo biológico en estudios de genética. Esto debido a características que facilitan su estudio en el campo de la genética y citogenética. Además, el maíz es considerado un organismo de importancia económica y cultural en nuestro país.

Durante la meiosis ocurren procesos de suma importancia que requieren ser altamente regulados. La sinapsis es uno de estos eventos, en ella los cromosomas homólogos se aparean longitudinalmente para posteriormente llevar a cabo el intercambio de información genética. Durante la sinapsis se forma el complejo sinaptonémico. El complejo sinaptonémico es una estructura proteica en forma de cremallera, encargada de mantener a los dos ejes de cromosomas homólogos estrechamente unidos de manera longitudinal durante la sinapsis.

En este trabajo evaluamos la expresión de seis de los componentes del complejo sinaptonémico (CS) en maíz: *ZmAFD1*, *ZmASY1*, *ZmDSY2*; *ZmP31*, *ZmPCH2* y *ZmZYP1*. Los genes seleccionados solo presentan una copia en el genoma del maíz. A partir de los resultados obtenidos de las RT-PCRs y RT-qPCRs demostramos que, aunque la estructura del eje cromosómico es exclusiva del proceso meiótico a nivel transcripcional sus componentes se expresan tanto en órganos somáticos como en órganos meióticos. Sin embargo, observamos un enriquecimiento en la expresión de los genes que codifican para los componentes del CS en órganos que presentan células meióticas, como la inflorescencia femenina y la inflorescencia masculina.

Seleccionamos cuatro genes *ZmAFD1*, *ZmDSY2*, *ZmP31* y *ZmPCH2* los cuales codifican para proteínas que forman parte del CS. Se amplificaron las secuencias codificantes completas de estos genes y se probaron sus interacciones por medio del ensayo de dos híbridos.

Nosotros amplificamos dos secuencias codificantes completas de *ZmP31*, las cuales nombramos *ZmP31A* y *ZmP31B*. La proteína para la que transcribe *ZmP31B* presenta la retención del tercer intrón añadiendo 69 pb a su CDS, presentando los

dos motivos *coiled-coil* observados en los ortólogos de P31 en *Oryza sativa*. Mientras que en *ZmP31A* la falta de los 69 pb trunca, en la proteína, el segundo motivo *coiled-coil*. Hasta el momento no se ha descrito la presencia de otra isoforma P31 en alguna otra especie.

Las secuencias completas codificantes de *ZmAfD1*, *ZmDSY2*, *ZmP31* (A y B) y *ZmPCH2* fueron amplificadas y clonadas en vectores de expresión para el sistema de dos híbridos en levadura (pGADT7GW y pGBKT7GW). Identificamos y clonamos dos isoformas de *ZmP31*. Hasta el momento no existen reportes de la existencia de dos o más isoformas de P31 en otros organismos. Además, por medio de ensayos de dos híbridos en levadura, comprobamos que las isoformas de *ZmP31* tienen un patrón de interacción distinto entre ellas. Consideramos que *ZmP31* (parte del elemento transversal -ET- del CS) funciona como enlace entre los elementos laterales (*ZmAfD1*, *ZmDSY2*) y el elemento central del CS (*ZmPCH2*) en maíz, debido a que *ZmP31B* puede interactuar con *ZmAfD1*, *ZmDSY2* y *ZmPCH2*. *ZmAfD1* puede interactuar con *ZmDSY2*, pero ninguno de estos interactúa con *ZmPCH2*.

Introducción

El uso de *Zea mays* como organismo modelo en estudios genéticos y de la meiosis

Gran parte de nuestro conocimiento sobre la herencia, el desarrollo, la fisiología y los procesos celulares y moleculares subyacentes se deriva de los estudios de organismos modelo o de referencia. A pesar de la gran biodiversidad, se puede extraer una base común de principios compartidos de algunas formas de vida, seleccionadas en función de su capacidad para los estudios experimentales. Los organismos modelo comparten características tales como un desarrollo rápido, presentar un ciclo de vida corto o bien que produzcan muchos descendientes en poco tiempo. Otras características de estos organismos es la importancia económica que presentan, así como tener un amplio uso en la industria. Además, otro aspecto importante para la elección de organismos modelo es el estado de la secuenciación y el análisis de su genoma, lo cual abre oportunidades sin precedentes para estudios de transcriptómica y proteómica a gran escala (Kellogg y Birchler, 1993).

Entre las especies mayormente utilizadas como organismos modelo podemos citar a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el gusano *Caenorhabditis elegans*, el ratón *Mus musculus* y en plantas *Arabidopsis thaliana*, el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays*). Especialmente el maíz ha sido reconocido como un organismo modelo para los estudios y avances de la genética. Iniciando con los trabajos de Gregor Mendel, quien en 1869 utilizó al maíz para corroborar sus estudios en *Pisum sativum*. Como los chícharos, el maíz es una planta larga que permite el análisis fenotípico, así como el análisis genético de mutantes (Mercier *et al.*, 2014; Strable y Scanlon, 2009).

Barbara McClintock obtuvo en 1983 el Nobel de medicina y fisiología por el descubrimiento de los elementos genéticos transponibles (transposones) en maíz. Además, desarrolló otros estudios como el análisis de los microesporocitos tetraploides, de cuyo análisis sugirió la explicación del origen de la triploidía y otras formas de poliploidías en maíz. Por otra parte, Barbara McClintock fue la primera

científica en observar la translocación entre cromosomas durante la división celular meiótica. Además, junto con su alumna Harriet Creighton obtuvo la primera demostración citogenética de un entrecruzamiento (Creighton y McClintock, 1931; Kass y Chomet, 2009).

La meiosis se ha estudiado en varios organismos modelo (*D. melanogaster*, *Szi. pombe*, *S. cerevisiae*, *Pisum sativum*) debido en parte a que se trata de un proceso celular conservado (Cande *et al.*, 2009). *Zea mays* presenta características especiales que permiten su estudio durante el proceso meiótico. Por ejemplo, sus cromosomas tienen un mayor tamaño que los de *S. cerevisiae* o *Arabidopsis*, lo que permite un análisis citológico más detallado. Otros organismos utilizados como *D. melanogaster* y *C. elegans*, presentan características meióticas poco convencionales, como el emparejamiento de cromosomas homólogos independiente de SPO11, la proteína que ha sido descrita como el principal componente del complejo proteico responsable de llevar a cabo las rupturas de doble cadena durante la meiosis en diversos organismos. El maíz complementa estos otros sistemas, pues es uno de los pocos organismos con un genoma grande donde la estructura de la cromatina, el emparejamiento de los cromosomas homólogos y la sinapsis son susceptibles de ser analizados por una combinación de técnicas citológicas, genéticas, moleculares y bioquímicas. Entre muchos fenómenos meióticos, el maíz se ha utilizado para analizar la cinética del emparejamiento de cromosomas, la formación de elementos axiales y la recombinación (Cande *et al.*, 2009).

Por otra parte, en maíz es relativamente fácil obtener una gran cantidad de meiocitos en una sola etapa meiótica. Pues las anteras contienen meiocitos masculinos sincronizados en el mismo subestadio de la meiosis. También se tiene la oportunidad de dividir las etapas meióticas en un grado mucho más preciso y determinar si la expresión génica es un mecanismo de control significativo de una etapa a la siguiente (Cande *et al.*; 2009; Strable y Scanlon, 2009; Nelms y Walbot, 2019).

Finalmente, la excelente citología del maíz permitirá una correlación precisa entre la etapa meiótica y los perfiles de transcripción. Debido a que el maíz tiene cromosomas meióticos grandes, se han desarrollado criterios precisos para clasificar las células meióticas en función de los cambios en la morfología de los cromosomas, la arquitectura nuclear, el ancho de los cromosomas y la apariencia celular; incluso se pueden distinguir subetapas de la profase I como el leptoteno, el cigoteno y el paquiteno (Cande *et al.*, 2009; Nelms y Walbot, 2019).

El maíz, además, presenta una diversidad genética sorprendente y es altamente adaptable. Se trata de un organismo que ha sido fácilmente cultivado en un rango biogeográfico amplio que incluye una diversidad en la composición del suelo, clima, duración del día y elevación. Las líneas de maíz más utilizadas en laboratorio son B73, Mo17 y W22 (Strable y Scanlon, 2009). Aunado a ello actualmente se cuenta con una cantidad de mutantes meióticos naturales. Hasta el año 2009 se contaban con 50 mutantes meióticos (Cande *et al.*, 2009). La mayoría de mutantes producen esterilidad masculina. Una vez que se encuentra un mutante estéril, se verifica el número de bivalentes y univalentes presentes en la Profase I. Esto último ya que las mutaciones que afectan el emparejamiento homólogo, la recombinación, la sinapsis o la estructura de la cromatina meiótica suelen tener defectos en su capacidad para formar bivalentes (Cande *et al.*, 2009).

Los mutantes meióticos del maíz se pueden agrupar según sus fenotipos: como los mutantes que comprometen el proceso meiótico en general, los mutantes desinápticos que afectan uno o más eventos de la profase I, los mutantes de cohesión de cromátidas hermanas y mutantes de segregación de los cromosomas homólogos. Con el análisis de mutantes se ha podido aprender mucho sobre el proceso meiótico en maíz, y en general en plantas (Cande *et al.*, 2009).

Finalmente, el genoma de la línea B73 de maíz fue secuenciado en el año 2009, lo que permite tener un genoma de referencia contra el cuál comparar nuestros resultados experimentales (Schnable *et al.*, 2009). Sin embargo, la anotación de este se ha llevado a cabo de una manera automatizada.

El proceso meiótico

La característica esencial de la reproducción sexual es la unión de los genomas de diferentes individuos de una especie en una célula (Kohli y Hartsurker, 2001). Una vez fusionados estos genomas por medio de la fecundación, se establece un nuevo genoma completo y funcional (Kohli y Hartsurker, 2001). La meiosis es un proceso de división celular que permite el emparejamiento completo de dos genomas parentales, su recombinación sin pérdida de genes y posteriormente la segregación de este material genético en cuatro células, cada una con conjuntos completos de cromosomas haploides (Kohli y Hartsurker, 2001; Mercier *et al.*, 2014).

La meiosis incluye un solo evento de replicación seguido por dos divisiones celulares, conocidas como meiosis I y meiosis II (Figura 1), por lo que se reduce el número de cromosomas a la mitad (Keeney *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2014; Choi y Henderson, 2015; Lee *et al.*, 2015; Zickler y Kleckner, 2015; Lambing *et al.*, 2017).

Las dos divisiones celulares de la meiosis se componen de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. En la Figura 1 se ilustran y describen brevemente los acontecimientos ocurridos en la meiosis de plantas.

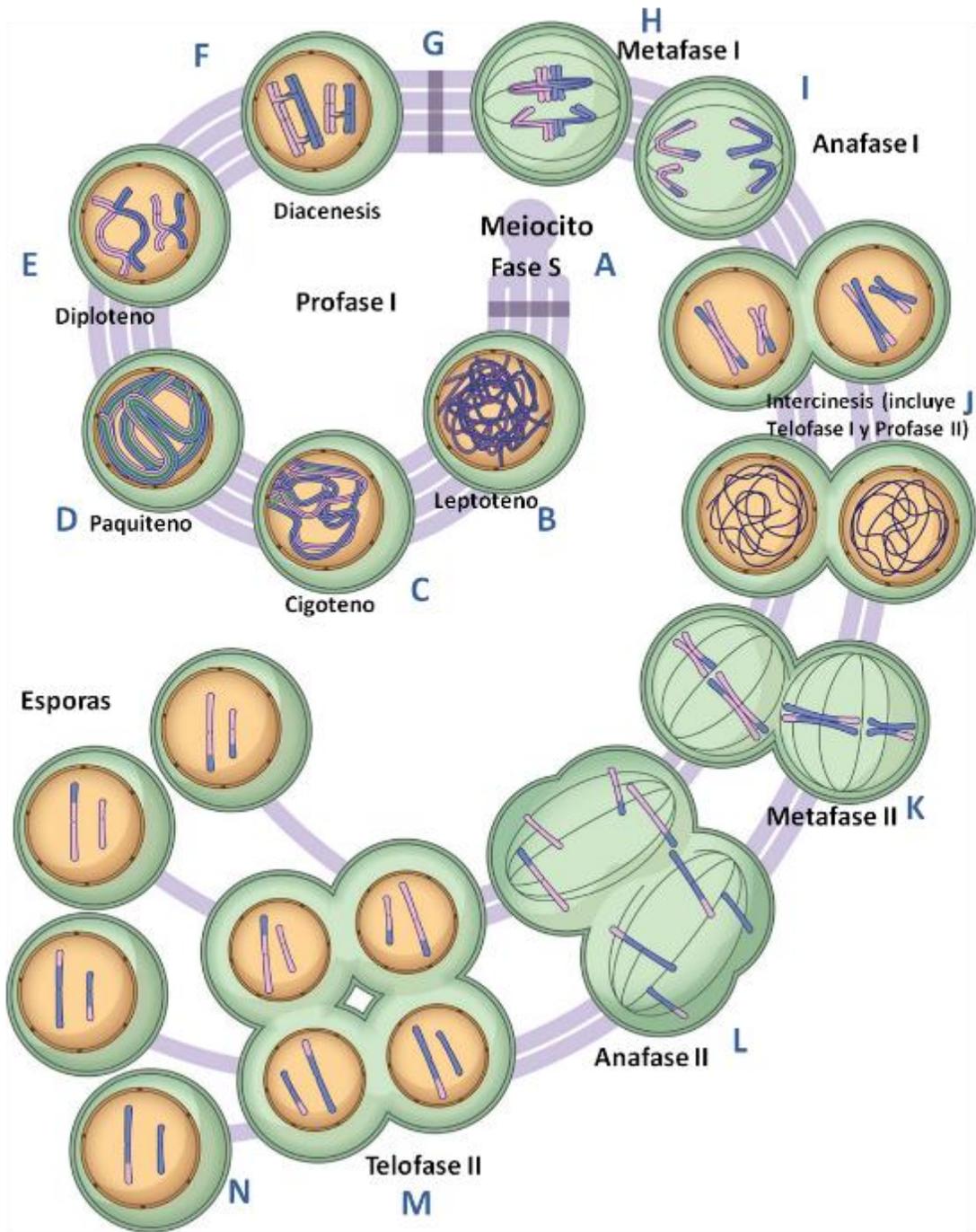


Figura 1. Descripción general del proceso meiótico. (A) La premeiosis abarca la diferenciación de los meiocitos y la fase S meiótica. (B) En el leptoteno, se forman los ejes cromosómicos y se inicia la recombinación. (C) En cigoteno, la sinapsis tiene lugar a través de la polimerización del CS (verde) y la recombinación progresa. (D) En paquiteno, la sinapsis se completa y la recombinación avanza, el CS se encuentra completamente polimerizado. (E) En el diploteno, el CS se desmonta. Mientras que los cromosomas homólogos se encuentran conectados por los quiasmas. (F) En la diacinesis, se produce una mayor condensación de los cromosomas y los bivalentes se hacen visibles. (G) La profase I termina y la envoltura nuclear se rompe. (H) En la metafase I, el huso acromático alinea los bivalentes en la placa de la metafase. (I) En la anafase I, la liberación de la cohesión de las

cromátidas a lo largo de los brazos permite la migración de los cromosomas hacia los dos polos. Sin embargo, en la región pericentromérica la cohesión continúa. (J) En la intercinesis, se forman dos núcleos y los cromosomas se descondensan brevemente. Esta etapa abarca la telofase I y la profase II. En monocotiledóneas, la citocinesis se produce antes de que comience la meiosis II; en las dicotiledóneas, como el maíz, la citocinesis ocurre solo en la telofase II. (K) En la metafase II, se forman dos ejes que alinean los cromosomas en dos placas de metafase. (L) En la anafase II, las cromátidas hermanas se separan después de la liberación de cohesión centromérica. (M) En la telofase II, se forman cuatro núcleos. (N) En la citocinesis, se liberan las esporas haploides (Adaptado de Mercier *et al.*, 2014).

En las plantas vasculares, las células haploides resultantes de la meiosis forman un pequeño tejido dentro de las flores de la planta diploide, produciendo gametos y otras células especializadas (Kohli y Hartsurker, 2001). En el maíz, los meiocitos masculinos (microsporocitos) se desarrollan en las anteras nacidas en la borla (inflorescencia terminal) cada antera da lugar a cientos de meiocitos que a su vez generan cuatro granos de polen, cada uno con un núcleo vegetativo y dos núcleos de esperma, todos en sincronía (Cande *et al.*, 2009). Los meiocitos femeninos (megasporocitos) se desarrollan en el óvulo nacido en la mazorca meiótica dentro del óvulo (Cande *et al.*, 2009).

El desarrollo de la profase I meiótica

En la profase I de la primera división celular (meiosis I) ocurren eventos claves como el apareamiento de los cromosomas homólogos, la recombinación y la sinapsis (Bai *et al.*, 1999; Mercier *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). A continuación, se describen las subetapas de la profase I meiótica las cuales se pueden visualizar en los incisos A-G de la Figura 1.

- **Leptoteno:** los cromosomas se hacen visibles debido a la compactación de la cromatina y se completa la instalación de los elementos axiales del complejo sinaptonémico (CS). La configuración que presentan los cromosomas en esta subetapa se le conoce como “cromosoma del leptoteno”. Las cromátidas hermanas se encuentran totalmente comprimidas a lo largo de la longitud del cromosoma y están unidas mediante complejos proteicos de cohesinas. Las rupturas de doble cadena se originan en este estadio (Pawlowski *et al.*, 2005; Cande *et al.*, 2009).

En la transición de leptoteno a cigoteno se produce la remodelación de la arquitectura de la cromatina, separando un poco las cromátidas hermanas (Dawe *et al.*, 1994). Además, los telómeros se adhieren a la envoltura nuclear y comienzan a agruparse. Este “ramo de telómeros” es un evento meiótico altamente conservado que se piensa que facilita muchos procesos subsiguientes de profase meióticas, como el emparejamiento homólogo y la sinapsis (Cande *et al.*, 2009). En maíz, en la transición de leptoteno-cigoteno, hay un cambio abrupto en el comportamiento de los telómeros y los centrómeros. Antes del cigoteno, los centrómeros se limitan a un hemisferio nuclear; después, no tienen una organización nuclear obvia. Los telómeros se comportan de manera opuesta: antes del cigoteno no hay una polaridad observable, mientras que después los telómeros se encuentran polarizados y agrupados en la envoltura nuclear, creando un ramillete (*Bouquet*) de telómeros (Gelei, 1921; Carlton y Cande, 2002).

- **Cigoteno:** los cromosomas homólogos comienzan a emparejarse y hacen sinapsis. El emparejamiento homólogo requiere del inicio de la recombinación. Durante este estadio, la recombinasa RAD51, se localiza a lo largo de los cromosomas. Se requiere de RAD51 para un emparejamiento de cromosomas homólogos eficiente en maíz y en otros organismos (Cande *et al.*, 2009). La sinapsis requiere la formación del CS entre los dos cromosomas de apareamiento (véase más adelante). La sinapsis es un evento específico de la meiosis, pero es completamente independiente de la búsqueda de homología. Es decir, aunque los cromosomas no sean homólogos podrían presentar sinapsis (Pawlowski, *et al.* 2005; Mercier *et al.*, 2014).
- **Paquiteno:** en esta etapa se completa la sinapsis y la recombinación. En el paquiteno cada par de cromosomas homólogos, o bivalente, aparece como una hebra gruesa formada por dos homólogos junto con sus dos cromátidas hermanas, para un total de 4 moléculas de ADN. En esta etapa los cromosomas del maíz se observan a menudo para estudios de citología, ya que los cromosomas son más visibles en las preparaciones citológicas teñidas con acetocarmina (Cande *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2014).

- **Diploteno:** los cromosomas se condensan aún más a medida que se desintegra el CS, liberando los cromosomas homólogos a lo largo de su longitud, excepto en los sitios donde se ubican los quiasmatas, los cuales son manifestaciones citológicas de los eventos de entrecruzamientos. La formación de los quiasmas es un evento exclusivo de la meiosis cuya función es esencial para mantener a los cromosomas homólogos juntos hasta que se separen en la primera metafase reductora (Cande *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2014).
- **Diacenesis:** en este estado los cromosomas se condensan más y se desprenden de la envoltura nuclear. Después de esta etapa la envoltura nuclear se rompe y los meiocitos entran en metafase. A diferencia de los cromosomas mitóticos, la cohesión centromérica se mantiene entre las hermanas, lo que permite la segregación de los cromosomas homólogos, pero no de las hermanas, en la división reductiva (Meiosis I). Los quiasmatas son responsables de mantener los cromosomas homólogos juntos hasta el inicio de la anafase I, y por lo tanto permiten la separación meiótica única de los cromosomas homólogos (Cande *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2014).

En el maíz, el análisis de la meiosis ha sido muy exitoso a nivel citológico durante más de 90 años. Más recientemente, el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la clonación de varios genes meióticos en este organismo (Cande *et al.*, 2009).

El complejo sinaptonémico y su importancia en el proceso meiótico

El **eje cromosómico** es una estructura proteínica, la cual consiste en un núcleo de cohesinas y, posteriormente, del CS ensamblado. Esta estructura se forma entre las cromátidas hermanas durante el leptoteno y algunos de sus componentes como los elementos laterales (ELs) del CS permanecen hasta la segunda división meiótica manteniéndolas unidas (Armstrong *et al.*, 2002; Kleckner, 2006; Storlazzi *et al.*, 2008; Mets y Meyer; 2009; Golubovskaya *et al.*, 2011; Bolcun-Filas y Schimenti; 2012).

El **CS** es una estructura proteica en forma de cremallera, específica de la meiosis la cual mantiene a los dos ejes de cromosomas homólogos estrechamente unidos de manera longitudinal durante el proceso llamado sinapsis (Bai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2010; Cahoon y Hawley; 2016). No todos los organismos forman el CS, sin embargo, si presentan un eje cromosómico al cual se “anclan” los bucles de cromatina, como ocurre en *Schizosaccharomyces pombe* (West *et al.*, 2018).

Por medio de microscopía electrónica, se ha identificado que el complejo sinaptonémico está compuesto por los siguientes elementos: dos elementos laterales (ELs), los cuales se encuentran separados por el elemento central (EC) y el elemento transversal (ET) (Wang *et al.*, 2009). Tanto el EC como el ET forman la región conocida como región central (RC) del CS (Schücker *et al.*; 2015). Los ET conectan al EC con los ELs. En maíz, se han identificado algunas proteínas que componen el CS (Golubovskaya *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015). En la figura 2 se observa la composición protéica y estructural del CS en maíz, en la sección de antecedentes se profundiza en el conocimiento de las proteínas que componen en CS en maíz.

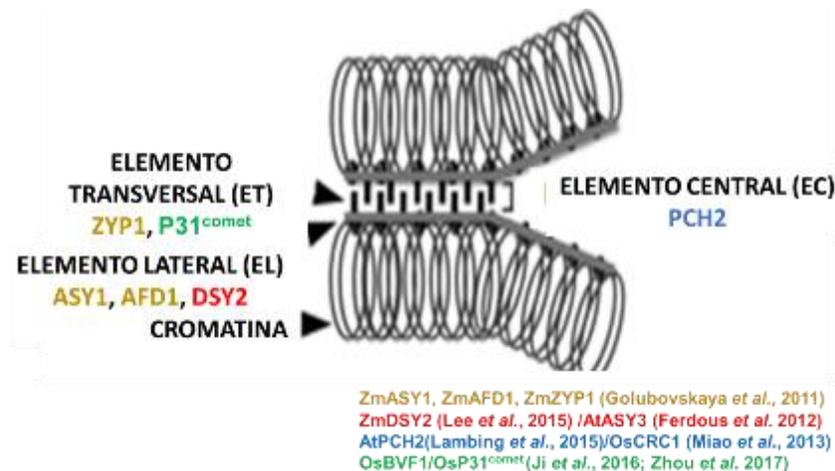


Figura 2. Composición del CS en maíz. Golubovskaya y colaboradores (2011) identificaron a las proteínas ASY1 y AFD1 como componentes del elemento lateral del CS en maíz, así como a ZYP1 como componente del elemento central del CS en maíz (en amarillo). En el año 2015 Lee y colaboradores identificaron a ZmDSY2 como componente del EL en el CS de maíz. Se ha identificado también la proteína PCH2 en *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, se sabe de la existencia de su ortólogo en maíz y forma parte del EC del CS. Recientemente, en el año 2016 se identificó la proteína P31^{comet}, la cual forma parte del ET en el CS de arroz (Adaptado de Golubovskaya *et al.*, 2011).

A continuación, se describe el proceso de ensamblaje y desensamblaje por el que atraviesa el CS durante la profase I meiótica. Durante el leptoteno los cromosomas comienzan el proceso de compactación, en el cual los complejos de cohesina de cada cromosoma se alinean y forman los elementos axiales (EA) (Wang *et al.*, 2009; Bolcun-Filas y Schimenti, 2012; Fraune *et al.*, 2012; Ortíz *et al.*, 2016; Gao y Colaiácovo; 2018). En esta misma etapa ocurre la formación de rupturas de doble cadena (RDC) en el ADN, las cuales son la base para que posteriormente se lleve a cabo la recombinación entre cromosomas homólogos (Ortíz *et al.*, 2016). En el cigoteno, comienza un proceso de polimerización de proteínas (sinapsis) entre los dos EA emparejados, formando el EC. A partir de este momento los EA se renombran como EL y de esta manera se forma el CS. (Fraune *et al.*, 2012; Ortíz *et al.*, 2016). En maíz y en otras especies con un genoma grande, el CS comienza a polimerizarse en sitios cercanos a los telómeros, así como en diversos sitios internos, excepto en regiones centroméricas (Wang *et al.*, 2009; Burnham *et al.*, 1972; Zickler y Kleckner, 1999; Golubovskaya *et al.*, 2011). Durante el paquiteno los cromosomas homólogos están completamente emparejados y el CS está completamente polimerizado a lo largo del eje cromosómico (Bolcun-Filas y Schimenti, 2012; Fraune *et al.*, 2012; Ortíz *et al.*, 2016). Finalmente, mientras avanza la etapa del diploteno, el CS comienza a desensamblarse, aunque los cromosomas permanecen físicamente conectados por la formación de quiasmatas (Bolcun-Filas y Schimenti, 2012; Fraune *et al.*, 2012; Ortíz *et al.*, 2016).

Aún no se conoce la función real del CS, sin embargo, debido a su conservación estructural a través de las especies, así como su asociación temporal y espacial con la sinapsis de los cromosomas y con los eventos de recombinación homóloga, se considera que esta estructura proteica cumple una función primordial durante las primeras etapas de la meiosis en la mayoría de las especies (Armstrong *et al.*, 2002; Storlazzi *et al.*, 2008). Una de las hipótesis de su función es su asociación con la regulación de sitios de recombinación en el cromosoma. Por lo que se cree que el CS está estrechamente relacionado con el fenómeno conocido como “interferencia de entrecruzamientos”, el cual dicta que si se activa un “punto caliente” o “*hot-spot*”

de recombinación este restringe que ocurra otro evento de recombinación en su cercanía (Panizza *et al.*, 2011).

Se ha descrito que en *S. cerevisiae*, mamíferos y plantas existen dos vías de formación de entrecruzamientos. La principal depende de la integridad del CS y produce el fenómeno de interferencia. Mientras que el segundo tipo, es independiente del CS y no presenta interferencia (Marsolier-Kergoat *et al.*, 2018).

Parte de la dificultad para conocer las dimensiones del CS decae en el límite de difracción de la luz visible (250-350nm), por lo que la microscopía óptica era una herramienta ineficiente. Sin embargo, con el avance de la microscopía de super-resolución y ultra-resolución, se ha podido conocer poco a poco y con más detalle la composición y estructura del CS, especialmente en algunas especies como *C. elegans* y *D. melanogaster* (Wang *et al.*, 2009; Cahoon *et al.*, 2017; Köhler *et al.*, 2017).

El estudio de la interacción proteína-proteína en los componentes del CS por medio del ensayo de dos híbridos

La estructura general del CS parece estar altamente conservada a través de los organismos con reproducción sexual, sin embargo, a nivel de secuencia de aminoácidos de las proteínas que componen al CS parece no haber una gran similitud (Armstrong *et al.*, 2002; Gao y Colaiácovo; 2018). Sin embargo, existen características proteicas conservadas (como la presencia de ciertos tipos de dominios protéicos), así como la organización de los componentes del CS. Lo cual se cree puede contribuir a la función biológica del CS. Por ejemplo, se sabe que los componentes de la RC del CS en levaduras, moscas, gusanos, mamíferos y plantas presentan dominios *coiled-coil*, los cuales promueven interacciones proteína-proteína. Permitiendo la formación de homodímeros y también de heterodímeros, o bien interacciones más complejas que involucran tres o más proteínas (Gao y Colaiácovo; 2018). Las proteínas involucradas en interacciones, regularmente, contienen varios dominios, los cuales pueden ser identificados por sus secuencias de aminoácidos altamente conservadas, como en el caso de los dominios tipo *coiled-coil* o las regiones intrínsecamente desordenadas que han sido propuestas

como promotoras de interacciones proteína-proteína e interacciones proteína-ADN (Perkins *et al.*, 2010).

La manera en la que las proteínas interactúan es por medio de enlaces covalentes o no covalentes. Aunque es mucho más probable encontrar proteínas interactuando mediante enlaces no covalentes, como las interacciones hidrofóbicas, de van der Waals, las fuerzas electrostáticas y los enlaces de hidrógeno (Perkins *et al.*, 2010). Por otra parte, los enlaces covalentes permiten una unión más fuerte, pero mucho más restringida. Muchas interacciones proteína-proteína son reversibles y controladas por otras proteínas. Este control a menudo se logra mediante la modificación química de sitios específicos de la proteína (Perkins *et al.*, 2010). Tal como ocurre con el CS, el cual es capaz de reorganizarse y modificarse, incluyendo su ensamblaje y desensamblaje, así como presentar cambios en sus componentes, especialmente enlaces de tipo covalente, por ejemplo; fosforilaciones, acetilaciones o SUMOilaciones (Cahoon y Hawley; 2016; Gao y Colaiácovo; 2018).

Existen varias técnicas para analizar las interacciones proteína-proteína. En los últimos años se han utilizado enfoques bioquímicos, como la co-inmunoprecipitación, la cromatografía de afinidad seguida de espectrometría de masas y la técnica de visualización de fagos o viriones, aunque estas técnicas suelen requerir mucho tiempo y son laboriosas. En su lugar, el ensayo de dos híbridos de levadura permite la identificación rápida de varias interacciones de proteínas (Paiano *et al.*, 2019). El gran éxito de esta técnica se puede atribuir a la versatilidad del sistema, demostrado por el hecho de que se han desarrollado numerosas modificaciones del sistema en los últimos años. Estos enfoques permiten la identificación y el análisis de diferentes tipos de interacciones, como las interacciones que involucran proteínas de membrana, proteínas de unión a ADN y proteínas de unión a ARN (Paiano *et al.*, 2019). En el caso del CS, como se verá más adelante, el análisis de las interacciones entre proteínas de este complejo se ha analizado mediante esta técnica no solo en plantas sino en otros organismos como ratones, humanos, gusanos y levaduras.

Antecedentes

Aunque de manera estructural el CS se encuentra ampliamente conservado, la divergencia que se percibe en cuanto a su secuencia es significativa, lo que nos indica que la evolución de los componentes del CS ha sido muy rápida en cada especie y, por lo tanto, la manera de interactuar entre ellas podría ser algo distinta entre especies.

La composición proteica de los elementos laterales, así como de los elementos centrales del CS ha sido identificada en diversas especies incluyendo hongos, animales y plantas (Smith y Roeder, 1997; Bai *et al.*, 1999; Caryl *et al.* 2000; Dong *et al.*, 2001; Lee y Orr-Weaver, 2001; Armstrong *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2003; Page y Hawley, 2003; Hamant *et al.*, 2005; Golubovskaya *et al.* 2006; Nonomura *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Fukuda *et al.* 2010; Golubovskaya *et al.*, 2011; Ishiguro *et al.*, 2011; Lee y Hirano; 2011; Wang *et al.*, 2011; Ferdous *et al.*, 2012; Ishiguro *et al.*, 2014; Zamariola *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Rosenberg y Corbett, 2015; Zickler y Kleckner, 2015; Colas *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018; Chambon *et al.*, 2018; Osman *et al.*, 2018; West *et al.*, 2018; Lambing *et al.*, 2019). Los componentes del elemento central incluyen a los filamentos transversos, proteínas del tipo *coiled-coil*, así como otras proteínas que se localizan en la región central (Cahoon y Hawley, 2016). Por otra parte, los componentes de los elementos laterales incluyen proteínas específicas del CS, como proteínas con dominios tipo HORMA (ZmASY1 y AtASY1), así como cohesinas (ZmAFD1), proteínas con dominios en espiral (AtASY3 y AtASY4, ZmDSY2) y topoisomerasas tipo II (Cai *et al.*, 2003; Golubovskaya *et al.*, 2006; Golubovskaya *et al.*, 2011; Ferdous *et al.*, 2012; Zamariola *et al.*, 2014; Zickler y Kleckner, 2015; Chambon *et al.*, 2018; Osman *et al.*, 2018; West *et al.*, 2018). Los complejos de cohesinas se organizan uniéndose a la cromatina de ADN; mientras que las proteínas de la familia HORMA ayudan en la regulación y formación de rupturas de doble cadena (RDC), así como de entrecruzamientos durante la recombinación meiótica (West *et al.*, 2018). En la siguiente tabla se resumen los ortólogos para los seis genes que han sido objeto de análisis en este trabajo.

Tabla 1. Ortólogos de algunas proteínas que forman parte del CS

Proteína/ Ortólogos	Posición en el CS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Saccharomyces cerevisie</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ZmAFD1	EA/EL	SYN1	REC8	Scs1	Rec8	REC8	VTD	REC8
ZmASY1	EA/EL	ASY1	PAIR2	Hop1	HormaD1/ HormaD2	HORMAD1/ HORMAD2		HIM-3
ZmDSY2	EA/EL	ASY3	PAIR3	Red1	Sycp2	SYCP2		
ZmP31 ^{comet}	ET/RC		P31 ^{comet} / BVF1			MAD2L- binding protein		
ZmPCH2	EC/RC	PCH2	CRC1	Pch2	Trip13	TRIP13	pch2	PCH2
ZmZYP1	ET/RC	ZYP1a ZYP1b	ZEP1	Zip1	Sycp1	SYCP1	TF	SYP1

ZmAFD1 (*Absence of First Division 1*)

AFD1 (*Absence of First Division 1*) es una proteína perteneciente a la familia de las cohesinas (Schleiffer *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009). En maíz fue identificado por primera vez como un mutante que no logra mantener la cohesión de los centrómeros requerida para la división reductiva en la meiosis (Golubovskaya y Mashnenkov, 1975). Desde entonces se ha destacado su papel como un componente regulador de la estructura y función de la cromatina, al ser un elemento clave del complejo de cohesinas, por lo que es absolutamente necesario para la segregación cromosómica durante la meiosis (Golubovskaya *et al.*, 2006). Como se describirá a continuación ZmAFD1 reemplaza a la proteína SCC1 (*sister chromatid cohesion 1*) mitótica como la subunidad α -kleisina del complejo de cohesina en meiosis. Este cambio es esencial pues permite que la separación de las cromátidas ocurra durante la segunda división meiótica y no en la primera.

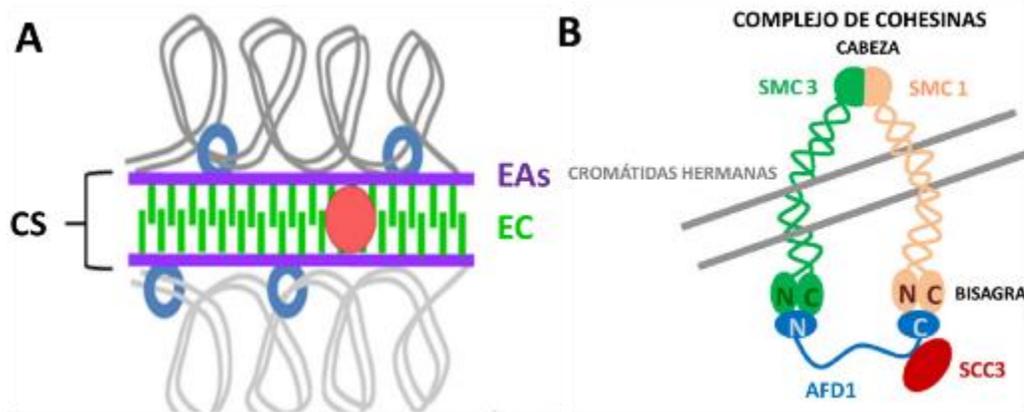


Figura 3. Estructura del complejo de cohesinas y su distribución en el CS. (A) Los complejos de cohesina se instalan en los EAs/ELs del CS manteniendo unidas a las cromátidas hermanas que se encuentran formando bucles conectados al eje cromosómico. (B) Estructura del complejo de cohesinas formado por dos proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) las cuales forman una estructura en forma de “V” y se conectan con la α -kleisina del complejo, este finalmente se estabiliza con la incorporación de SCC3 (Adaptado de Zamariola *et al.*, 2014).

Las cohesinas participan en la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis y la meiosis, además, son un componente esencial en la formación y mantenimiento de los EAs/ELs en maíz (Dong *et al.*, 2001; Hamant *et al.*, 2005; Golubovskaya *et al.* 2006; Wang *et al.*, 2009), pues se han identificado de manera bilateral en imágenes de microscopía de ultra resolución en los ejes pareados del CS (Wang *et al.*, 2009). De manera general, los complejos de cohesina regulan diversos procesos como la condensación cromosómica, la segregación de cromosomas en mitosis y meiosis; la expresión genética, así como la replicación, recombinación y reparación de ADN (Uhlmann 2016; Lambing *et al.*, 2019). Todos estos procesos los llevan a cabo por medio de la formación de anillos, los cuales están compuestos por cuatro miembros centrales altamente conservados en eucariotas: dos proteínas de la familia SMC (*structural maintenance of chromosomes*) SMC1 y SMC3, y dos subunidades SCC auxiliares (*sister chromatid cohesion*) SCC3 y la subunidad α -kleisina AFD1/REC8 (Wang *et al.*, 2009; Zamariola *et al.*, 2014; Lambing *et al.*, 2019). En la figura 3 se describe en forma general la estructura del complejo de cohesinas que participa en la meiosis, así como su posición en el CS. Se ha propuesto un modelo de acción de los complejos de cohesina, el cual requiere la conexión de los dominios SMC para formar un heterodímero (SMC1/SMC3) en forma de “V”. La cromátidas hermanas son

encerradas por un arco cerrado que se forma con la conexión de la α -kleisina con el dominio C-terminal de SMC1 y al dominio N-terminal de SMC3. La estabilización de esta estructura depende del reclutamiento de SCC3 por la subunidad α -kleisina (Zamariola *et al.*, 2014; Lambing *et al.*, 2017; Lambing *et al.*, 2019). Los anillos formados por los complejos de cohesina experimentan ciclos dinámicos de asociación y disociación con las cromátidas, por lo que el ADN puede entrar y salir de estos anillos (Uhlmann 2016; Lambing *et al.*, 2017; Lambing *et al.*, 2019).

Los complejos de cohesina que se forman durante la meiosis y la mitosis difieren en su subunidad α -kleisina. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* y en *Mus musculus*, se han identificado dos subunidades α -kleisina RAD21 y REC8, que actúan exclusivamente durante la mitosis y meiosis, respectivamente (Bai *et al.*, 1999; Golubovskaya *et al.*, 2006; Ishiguro *et al.*, 2011; Lee y Hirano; 2011; Ishiguro *et al.*, 2014). Siendo REC8 el ortólogo de AFD1 de maíz. En ratón se localizó una nueva subunidad α -kleisina meiótica la cual nombraron RAD21L, que al igual que REC8 actúa en el ensamblaje de los EAs, pero que parece ser más cercana a RAD21 mitótica. Se ha observado que los complejos de cohesina que contienen REC8 y los que contienen a RAD21L, en ratón, presentan patrones de localización simétricos y mutuamente excluyentes (Ishiguro *et al.*, 2011; Bolcun-Filas y Schimenti; 2012). Sin embargo, el análisis de mutantes de las subunidades α -kleisina meióticas en diferentes organismos como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* y *Mus musculus*, ha demostrado que el papel de estas subunidades en la cohesión meiótica se conserva en todos los reinos (Lee y Orr-Weaver, 2001; Page y Hawley, 2003; Golubovskaya *et al.*, 2006).

Se piensa que las cohesinas meióticas son probablemente las primeras proteínas en organizar los ejes cromosómicos meióticos y localizarse en la cromatina antes de la formación del eje (Ishiguro *et al.*, 2014). En maíz, AFD1 es completamente necesario para que se forme los EA en leptoteno. En ausencia de AFD1, muchos procesos meióticos posteriores como la recombinación meiótica, la búsqueda de homología entre cromosomas, el emparejamiento de cromosomas y la sinapsis son deficientes o están ausentes (Wang *et al.*, 2009). En maíz, AFD1 ha sido identificado

como un componente del CS asociado a los EAs/ELs durante el cigoteno y el paquiteno. Aunque AFD1 no se requiere para el establecimiento de los EAs, es necesario para la regulación de la elongación de los EAs, así como su maduración en ELs durante el proceso de sinapsis (Wang *et al.*, 2009).

En maíz, Golubovskaya y colaboradores (2006) identificaron que ZmAFD1 se necesita para el establecimiento de la estructura característica de los cromosomas en leptoteno, la formación del *bouquet*, el apareamiento, así como la búsqueda y la sinapsis de los cromosomas homólogos. Aunque AFD1 no es requerida para el reclutamiento inicial de los ejes axiales, se considera que juega un papel importante en la extensión de estos, así como en la maduración de los elementos laterales durante la sinapsis, esto se ha observado en maíz y *Arabidopsis* (Golubovskaya *et al.*, 2006; Lambing *et al.*, 2017; Lambing *et al.*, 2019). La distribución que presenta ZmAFD1 a lo largo del elemento lateral es discontinua y conservada entre los dos elementos laterales, por lo que se sugiere que su distribución puede estar determinada por información de secuencia o epigenética y/o por la cinética del ensamblaje de los elementos laterales (Wang *et al.*, 2009).

ZmASY1 (Asynaptic 1)

ZmASY1 pertenece a la familia del dominio HORMA (Hop1-Rev7-MAD2), esta proteína forma parte del eje cromosómico y parece estar ampliamente conservado en eucariotas (Armstrong *et al.*, 2002; Rosenberg y Corbett, 2015; Colas *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018). En levaduras sólo se ha identificado Hop1 como miembro meiótico de esta familia, pero en eucariontes se han localizado múltiples componentes. Por ejemplo, HTP-1, HTP-2 y HTP-3 en *C. elegans*; ASY1 y ASY2 en *Arabidopsis*; PAIR2 en arroz y HORMAD1 y HORMAD2 en mamíferos (Caryl *et al.* 2000; Martínez-Pérez y Villeneuve 2005; Nonomura *et al.*, 2006; Fukuda *et al.* 2010; Colas *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018). Los homólogos ASY1 han sido clonados y caracterizados en *Arabidopsis thaliana*, trigo, cebada, *Brassica oleracea*; arroz (PAIR2), *C. elegans* (HIM-3) y en ratón (HORMAD-1 y 2) (Zetka *et al.*, 1999; Armstrong *et al.*, 2002; Nonomura *et al.*, 2006; Boden *et al.*, 2007; Wojtasz *et al.*, 2009; Colas *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018).

Se predice que las proteínas del dominio HORMA forman una estructura globular que puede detectar estados de cromatina especializados, como los asociados con RDC (rupturas de doble cadena) u otras formas de daño en el ADN, así como su reparación (Shin *et al.*, 2010). En el proceso meiótico, los miembros de la familia de proteínas HORMA han sido implicados en promover el reconocimiento de los cromosomas homólogos, así como en la carga de complejos de cohesión meiótica, en la regulación del ensamblaje del CS, en promover el inicio de la recombinación meiótica e inhibir la recombinación entre hermanas cromátidas (Shin *et al.*; 2010; Osman *et al.*, 2018).

En *Arabidopsis*, ASY1 puede ser detectado justo antes del leptoteno en focos distribuidos a lo largo de la cromatina y después íntimamente asociado con los ECs hasta que los cromosomas comienzan a separarse en el diploteno (Armstrong *et al.*, 2002). En ratones HORMAD-1 desaparece una vez que los cromosomas se encuentran en sinapsis, sin embargo, reaparece durante el diploteno justo cuando comienza la pérdida de sinapsis entre cromosomas homólogos, algo similar ocurre con ASY1 de trigo y cebada (Wojtasz *et al.*, 2009; Colas *et al.*, 2017). En maíz, la localización de ASY1 llega a ser indetectable cuando los cromosomas se encuentran completamente en sinapsis en paquiteno (Golubovskaya *et al.*, 2006).

De manera general se sabe que el ensamblaje SC está estrechamente coordinado con la eliminación de las proteínas HORMA del eje cromosómico por la AAA+ ATPasa PCH2, pero que a su vez las proteínas de la familia HORMA son reclutadas por proteínas centrales del eje cromosómico como ScRed1 (ortólogo de ZmDSY2). Se cree que este mecanismo es clave para el control de los entrecruzamientos durante el proceso de recombinación, pues es necesario el ensamblaje del CS para que se lleve a cabo la maduración de los entrecruzamientos (West *et al.*, 2018). Por ejemplo, tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*, la eliminación de HOP1 provoca una disminución en la recombinación meiótica y el emparejamiento cromosómico homólogo (Brown *et al.*, 2018). En ratones con deficiencia de Hormad1, los cromosomas homólogos no se emparejan y, por lo tanto, no se lleva a cabo la

sinapsis, lo cual desemboca en defectos en la recombinación (Bolcun-Filas y Schimenti; 2012).

ZmDSY2 (*Desynaptic 2*)

La proteína DESYNAPTIC2 (DSY2) en maíz posee un dominio *coiled-coil* en su región C-terminal que también ha sido identificado en proteínas en otros organismos como en *A. thaliana* (ASY3), *O. sativa* (PAIR3), *M. musculus* (SYCP2/SYCP3) y *C. elegans* (HIM-3) (Smith y Roeder, 1997; Wang *et al.*, 2011; Ferdous *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). Estas proteínas están relacionadas evolutivamente y juegan roles equivalentes en el ensamblaje del eje cromosómico. (West *et al.*, 2018). Recientemente se identificó otra proteína con dominio *coiled-coil*, (ASY4) que parece estar estrechamente relacionada con ASY3 en *A. thaliana*, pues se ha comprobado su interacción con la parte C-terminal de ASY3 y ambos parecen ser importantes en la formación del eje cromosómico (West *et al.*, 2018; Chambon *et al.*, 2018; Osman *et al.*, 2018). Parecido a lo que ocurre con SYCP2 y SYCP3, los cuales se ha demostrado que son interdependientes para su localización en el eje, inclusive la falta de la región terminal de SYCP2 impide la carga de SYCP3 al eje (West *et al.*, 2018).

Se sabe que ZmDSY2 media la formación de RDC y está directamente involucrada en el ensamblaje del CS (Lee *et al.*, 2015). Por medio de microscopía de alta resolución se ha detectado que ZmDSY2 se encuentra localizada en el EA del CS y forma un patrón alterno al de ZmASY1 (Lee *et al.*, 2015).

Cuando se marca a ZmDSY2 para su análisis con microscopía fluorescente aparece por primera vez como numerosos focos durante la interfase tardía y comienza a formar fragmentos discontinuos a lo largo de los ejes cromosómicos en el leptoteno. Durante el cigoteno y el paquiteno, las señales de ZmDSY2 se vuelven continuas a lo largo del CS. Cuando la sinapsis está completa, ZmDSY2 se encuentra en los ELs. Al final del paquiteno, cuando el CS se desensambla, la señales de ZmDSY2 disminuyen (Lee *et al.*, 2015).

La mutante *dsy2*, en maíz, exhibe defectos en el apareamiento de los cromosomas homólogos, la sinapsis se reduce por completo, también se observa una reducción en la producción de RDC así como de entrecruzamientos, lo que en conjunto produce esterilidad (Franklin *et al.*, 2003; Golubovskaya *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015). En *dsy2* la localización de ZmASY1 se ve afectada al igual que la carga de ZmZYP1. Por lo tanto, se considera que ZmDSY2 se necesita para estabilizar la carga de ASY1 y ZYP1 en el CS. De igual manera en *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *A. thaliana*, *B. oleracea* y *O. sativa*, los ortólogos de DSY2 (Red1, HIM-3, At/BoASY3 y PAIR3) son necesarios para la localización normal de los ortólogos de ASY1 (Hop1, HTP-3, At/BoASY1 y PAIR2, respectivamente) (Smith y Roeder, 1997; Wang *et al.*, 2011; Ferdous *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). En *S. cerevisiae* se ha analizado la necesidad de SUMOilación de Red1 para interactuar con Zip1 (Gao y Colaiácovo; 2018).

En los mutantes *asy3* (*A. thaliana*) y *pair3* (*O. sativa*) se observó un número reducido de entrecruzamientos, una perturbación en la formación del complejo sinaptonémico y un déficit en el emparejamiento de los cromosomas homólogos, la sinapsis y el ensamblaje del CS (Wang *et al.*, 2011; Ferdous, 2012; Lee *et al.*, 2015).

ZmPCH2 (Pachytene Checkpoint 2)

PCH2 (*Pachytene Checkpoint 2*) es una proteína altamente conservada en la secuencia del dominio AAA-ATPasa que se localizó como un componente de la RC del CS (Miao *et al.*, 2013; Lambing *et al.*, 2015; Vader 2015; Ye *et al.*, 2017). Durante la meiosis, participa en la remodelación del eje cromosómico a través de la profase I, así como en la formación de RDC, la recombinación y sinapsis de cromosomas homólogos y es, además, un factor importante en los puntos de control de G2/Profase, donde interactúa con MAD2 y P31 (Joshi *et al.*, 2009; Vader, 2015; Ye *et al.*, 2017). Los ortólogos de ZmPCH2 se han identificado en *A. thaliana*, *O. sativa*, *S. cerevisiae*, *M. musculus* como PCH2, CRC1, Pch2, TRIP13, respectivamente (Roig *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2013). En ScPch2 se identificó un dominio NH2-terminal (NTD) no catalítico cercano al dominio AAA+ATPasa (Vader, 2015). En arroz y *Arabidopsis*, se ha identificado su aparición cercana a la RC del CS de

manera dependiente de ZEP1/ZIP1, una proteína del ET del CS (Miao *et al.*, 2013; Lambing *et al.*, 2015). En *A. thaliana* y *B. oleracea*, se ha observado que PCH2 forma focos a lo largo del CS que se correlacionan con regiones donde se ha agotado la señal de ASY1 (Chen *et al.*, 2014; Lambing *et al.*, 2015).

En *S. cerevisiae*, *M. musculus* y *A. thaliana*, se ha observado que Pch2, TRIP13, AtPCH2, respectivamente, tienen una estrecha relación física con Hop1, HORMAD1/HORMAD2 y AtASY1, al regular su agotamiento, por medio de un cambio conformacional, para que se lleve a cabo el ensamblaje del CS con normalidad (Börner *et al.*, 2008; Roig *et al.*, 2010; Lambing *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2017). En arroz, al contrario, se requiere al ortólogo de PCH2, CRC1, para que el ortólogo de ASY1, PAIR2, sea reclutado en el eje cromosómico (Miao *et al.*, 2013; Lambing *et al.*, 2015).

En *S. cerevisiae*, en la mutación de *pch2* se observa la interrupción de la remodelación del eje cromosómico, la producción de RDC y el proceso de recombinación, por medio de la resolución de entrecruzamientos y no entrecruzamientos (Börner *et al.*, 2008; Lambing *et al.*, 2015). En *D. melanogaster* y *C. elegans*, el ortólogo de PCH2 actúa en un punto de control para controlar los defectos en la recombinación y la estructura cromosómica (Joyce y McKim, 2009; Deshong *et al.*, 2014). En arroz, *Arabidopsis* y ratón, *crc1*, *pch2* y *trip13* evitan que se lleve a cabo la sinapsis de los cromosomas homólogos y presentan una falla en la producción de RDC (Roig *et al.*, 2010; Nonomura *et al.*, 2004; Lambing *et al.*, 2015).

En ratón se ha reportado un defecto en la interferencia de entrecruzamientos asociado con la mutación de TRIP13 y la pérdida de sinapsis en los cromosomas meióticos (Zanders y Alani, 2009; Roig *et al.*, 2010; Lambing *et al.*, 2015). Aunque no ocurre lo mismo en *Arabidopsis*, *S. cerevisiae* y *S. macrospora*, (Joshi *et al.*, 2009) donde se ha observado una interferencia de entrecruzamientos normal a pesar de la mutación de PCH2 (Lambing *et al.*, 2015). Aunque todos los organismos coinciden en una formación anormal del número y distribución de RDC en los

mutantes de PCH2, en comparación con los de genotipo silvestre (Lambing *et al.*, 2015).

En ratones se conoce mejor la acción de TRIP13 como un regulador del complejo MAD2-P31. MAD2 es una proteína de la familia HORMA, muy similar a HORMAD1 y HORMAD2. En ratón se sabe que MAD2 tiene dos conformaciones: una abierta y una cerrada. En su conformación cerrada la región C-terminal se envuelve alrededor de MAD1 o P31, mientras que en la conformación abierta esta misma región se dobla hacia atrás evitando la unión de MAD1 o P31. Este complejo actúa en el punto de control de la correcta unión del huso acromático (*Spindle assembly checkpoint*) (Ji *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2017). El cual retrasa el inicio de la anafase al inhibir la actividad del complejo promotor de la anafase (APC/C), que involucra la unión de MAD2 con CDC20 en el cinetocoro. Para evitar que este activador siga actuando, P31 se une a MAD2, funcionando como un adaptador para que TRIP13 pueda causar el cambio conformacional de MAD2 pasando de su configuración abierta a la cerrada. Se considera que TRIP13 puede utilizar un mecanismo físico común entre ambos sustratos para desmontar los complejos HORMAD meióticos, aunque actualmente no se ha probado directamente (Ye *et al.*, 2017).

ZmP31^{comet}/ZmBVF1 (Bivalent Formation 1)

En ratón, la proteína P31^{comet} (en adelante P31) ha sido descrita como un participante del punto de control en la verificación de la correcta unión del huso acromático (*Spindle assembly checkpoint*) al interactuar con MAD2 (*mitotic arrest deficient 2*), así como la coordinación del ciclo celular durante la mitosis en células HeLa (Ji *et al.*, 2016). La estructura cristalina del dímero MAD2-p31, parece dejar en claro que P31 imita la estructura de MAD2 para inhibir la dimerización de MAD2, lo que permite la transición de metafase a anafase durante la mitosis. TRIP13 parece ayudar a desmontar el complejo del punto de control (que contiene a MAD2), al ayudar a montar a P31 al complejo (Ji *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2017). Recientemente en 2016, Ji y colaboradores y posteriormente Zhou y colaboradores en 2017, describieron a esta proteína como un posible componente del CS en el proceso meiótico en arroz.

Por medio de la identificación de un mutante estéril con defectos meióticos se aisló el gen OsP31/BVF1, esta proteína conserva dos motivos *coiled-coil* y un dominio de membrana externa (OmpH) (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). Por medio de una búsqueda de homología, P31 parece estar conservada en diversas especies de plantas como: *Oryza brachyantha* (identidad de 89% con OsBVF1), *Brachypodium distachyon* (76.9%), *Sorghum bicolor* (75.1%), *Setaria italic* (80.2%), *Triticum aestivum* (76.9%) y *Zea mays* (74.4%) (Zhou *et al.*, 2017).

Los mutantes *p31*, en arroz, no se lleva a cabo el emparejamiento de cromosomas homólogos y presentan un déficit en la formación de RDC, lo que deriva en la ausencia de sinapsis. Durante la diacinesis *bvf* formó 24 univalentes, a diferencia de lo observado en el tipo silvestre donde se lleva a cabo la formación de 12 bivalentes. Lo que propició una segregación errónea en ambas anafases y un fenotipo estéril (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). P31^{comet} parece tener un papel importante en la formación de RDC (Ji *et al.*, 2016).

En arroz, el ortólogo de ZmDSY2, PAIR3 colocaliza con P31 a lo largo del eje cromosómico de manera casi superpuesta al inicio del paquiteno, mientras que desde el paquiteno tardío hasta el diploteno temprano, P31 se observa como señales intermitentes entre los dos ejes paralelos que forma OsPAIR3 (Ji *et al.*, 2016). Para determinar la localización de P31 en el CS Ji y colaboradores (2016) llevaron a cabo un ensayo de inmunotinción triple con REC8 (presente en ELs), ZEP1 (ETs) y P31. Desde el cigoteno hasta el diploteno, P31 y ZEP1 presentaron patrones de colocalización durante los procesos de instalación y desinstalación del CS. Aunque siempre entre las dos capas de los ELs observados con la tinción de REC8 (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017).

ZYP1 (*Zipper 1*)

ZmZYP1 (*Zipper 1*) es una proteína del ET del CS, cuyos ortólogos han sido identificados en *S. cerevisiae* (Zip1), *M. musculus* (Sycp1), *C. elegans* (SYP-1/SYP-2), *D. melanogaster* (C(3)G), *O. sativa* (ZEP1) y *A. thaliana* (ZYP1a/ZYP1b) (Meuwissen *et al.*, 1992; Sym *et al.*, 1993; Dong y Roeder, 2000; Page y Hawley,

2001; MacQueen *et al.*, 2002; Colaiacovo *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2005; Golubovskaya *et al.*, 2010; Bolcun-Filas y Schimenti; 2012).

Las proteínas del ET presentan estructuras similares como motivos *coiled-coil* a lo largo de la proteína, especialmente en la región central, y dominios globulares en ambos extremos. Sin embargo, presentan una divergencia en su secuencia (Dong y Roeder, 2000; Golubovskaya *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Fraune *et al.* 2012). Los motivos *coiled-coil* de estas proteínas permiten la formación de dímeros de ZYP1 alineándolos en estructuras paralelas parecidas a una escalera en la región central del CS. Los extremos N-terminales de ZYP1 interactúan en la RC del CS, mientras que los extremos C-terminales lo hacen colindando con los ELs (Figura 4) (Dong y Roeder, 2000; MacQueen *et al.* 2002; Higgins *et al.*, 2005; Fraune *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2017; Gao y Colaiácovo, 2018). Además, se ha demostrado que la longitud del dominio *coiled-coil* es el factor determinante del ancho de SC CR (Fraune *et al.*, 2012).

En ratones, la región C-terminal de SYCP1 parece ser esencial para el ensamblaje del CS. Esta conclusión se basa en el hecho de que las moléculas SYCP1 que carecen del dominio C-terminal permanecen distribuidas difusas en los experimentos de transfección y no son capaces de formar policomplejos, formados por varios dímeros de SYCP1 alineados en paralelo (Dong y Roeder, 2000; Fraune *et al.*, 2012). La región N-terminal también es importante ya que su eliminación reduce significativamente, aunque no lo elimina por completo, la capacidad de ensamblaje de los policomplejos (Fraune *et al.* 2012). En *A. thaliana*, se ha demostrado que la instalación adecuada de ZYP1 a lo largo de los cromosomas depende de la proteína asociada al elemento axial, ASY1 (Khoo *et al.*, 2012).

ZYP1 es reconocida por formar parte del complejo de iniciación de la sinapsis junto con ZIP2, ZIP3, ZIP4 y SPO16, llamado ZMM (Ferdous *et al.*, 2012; Cahoon y Hawley, 2016). En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes redundantes ZYP1a y ZYP1b que codifican para proteínas que presentan un 93% de similitud entre ellas y que juntas son descritas como ZYP1. A diferencia de *A. thaliana*, y como ocurre

en la mayoría de las especies, en maíz se ha identificado un único gen que codifica para ZYP1 (Higgins *et al.*, 2005; Golubovskaya *et al.*, 2011).

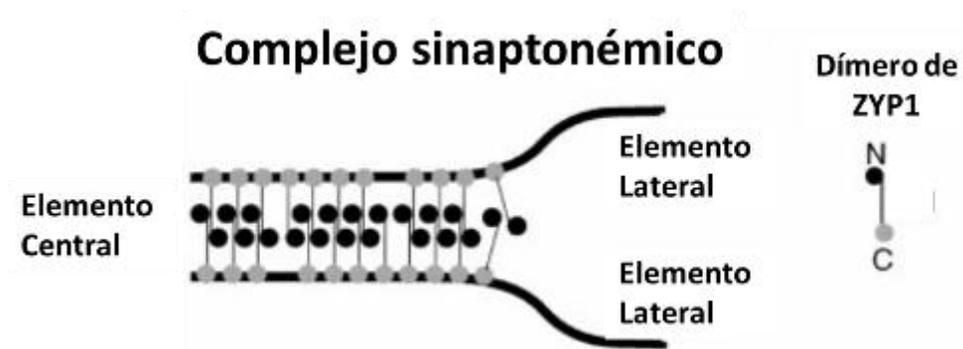


Figura 4. Modelo de organización de ZYP1 en el CS. Dos dímeros de ZYP1, que se encuentran que se encuentran cabeza a cabeza, los cuales abarcan el ancho del CS, conectando la región central y los ELs (Adaptado de Dong y Roeder, 2000).

El papel que ZYP1 tiene durante la meiosis y específicamente en la formación del eje cromosómico y posteriormente del CS ha sido analizada en diferentes especies. Por ejemplo, en los mutantes *syp-1* de *C. elegans* se observan 12 cromosomas univalentes en los núcleos de diacinesis, lo que refleja un fallo en la formación de quiasmas y, por tanto, conduce a la segregación incorrecta de cromosomas homólogos y esto a su vez a la formación de gametos aneuploides (MacQueen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010). En *S. cerevisiae*, en hembras de *D. melanogaster* y en los espermatozoides de *M. musculus* se ha observado que ZYP1 es necesaria para el apareamiento de los centrómeros. Las proteínas del ET son necesarias para el agotamiento programado de proteínas relacionadas con la recombinación en muchos organismos. Por ejemplo, en ratón *sycp1*, del 50 al 70% de los focos RAD51/DMC1, RPA y MSH4 encontrados en el cigoto continuaron persistiendo en el diploteno, mientras que la mayoría de estos focos desaparecieron en la misma etapa en el tipo silvestre (de Vries *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010). En *C. elegans*, los mutantes de *Syp1* presentan la persistencia de los focos de RAD51 (Colaiacovo *et al.*, 2003). En cuanto a los entrecruzamientos en *Arabidopsis* y cebada, la mutación de *zyp1* da como resultado una reducción en la formación de entrecruzamientos, mientras que en arroz la mutación de ZEP1 incrementa la

formación de entrecruzamientos y una sinapsis deficiente (Wang *et al.*, 2010; Lambing *et al.*, 2015).

En maíz, ZYP1 aparece en el leptoteno como una tinción difusa en el núcleo. Durante el cigoteno, ZYP1 se carga en las regiones en sinapsis y forma señales lineales entre los cromosomas homólogos. Al principio del cigoteno, la proteína se carga en las regiones subteloméricas asociadas con el *bouquet* y solo se pueden observar unos pocos tramos cortos de tinción en las regiones intersticiales de los cromosomas. Durante el paquiteno, ZYP1 forma una línea continua entre los cromosomas homólogos. Al final del paquiteno, ZYP1 se fragmenta y comienza a dispersarse (Golubovskaya *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). También se considera que ZmDSY2 está involucrada en el ensamblaje de ZYP1. Esto debido a que en mutantes *dsy2* presentan un defecto en la instalación de ZYP1 en los ejes cromosómicos (Golubovskaya *et al.*, 2010).

Interacciones conocidas entre los componentes del CS

Por medio del sistema de Y2H se identificó que la parte C-terminal de la proteína de *S. cerevisiae* Red1 interactúa físicamente con Hop1 (Spirek *et al.*, 2010). De igual manera el motivo *coiled-coil* presente en la región C-terminal de AtASY3 y BoASY3 interactúa con AtASY1/BoASY1 (Ferdous *et al.*, 2012). Y esta misma región de AtASY3 interactúa con AtASY4, una proteína recientemente analizada (Chambon *et al.*, 2018; Osman *et al.*, 2018; West *et al.*, 2018).

En arroz, por medio de experimentos de Y2H se ha observado la interacción física entre OsP31 y OsCRC1, el cual también ha sido relacionado con la formación de RDC. También se probó su probable interacción con OsPAIR2, OsPAIR3 y OsZEP1, pero no se obtuvieron resultados positivos, aunque sí observaron la interacción de CRC1 con la parte N-terminal de ZEP1 (Miao *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). Con estos resultados Ji y colaboradores (2016) propusieron que en arroz P31 realiza su función en la instalación del CS a través de la interacción con CRC1, el cual podría actuar como un puente para conectar P31 con ZEP1. En ratones, *S. cerevisiae* y *C. elegans*, se ha informado la interacción de P31 con TRIP13 (ortólogo de CRC1), y se sabe que la interacción entre estas proteínas promueve la liberación

de Mad2 anulando el punto de control entre metafase y anafase (Lambing et al., 2015; Ji et al., 2016).

Por medio de ensayos con Y2H y BiFC se demostró que ZmZYP1 interactúa con ZmDSY2, pero no lo hace con ZmASY1. De esta manera ZmDSY2 funge como una especie de puente entre los ELs y la RC del CS (Lee et al., 2015). Al igual que en maíz, en levadura, ratón y *Arabidopsis* también se comprobó la interacción de Hop1, SYCP2 y AtASY1 con Red1, HORMAD2 y AtASY3, respectivamente (Hollingsworth y Ponte, 1997; Smith y Roeder, 1997; de los Santos y Hollingsworth, 1999; Ferdous et al., 2012; West et al., 2018). Además, se comprobó que la interacción entre AtASY3 con AtASY1 depende de los residuos de aminoácidos 623-793 de AtASY3, correspondientes a la región del motivo *coiled-coil* (Ferdous et al., 2012).

Por medio de ensayos de Y2H se ha observado en ratón y en *Arabidopsis* que las regiones *coiled-coil* de SYCP3/SYCP2 y ASY3/ASY4, respectivamente, se asocian entre ellas (West et al., 2018). También se ha observado que SYCP3 puede formar homotetrámeros antiparalelos en *H. sapiens* y *M. musculus*, en ausencia de SYCP2 (West et al., 2018). De igual manera se ha observado que AtASY1 puede interactuar consigo mismo a través del dominio HORMA ubicado en el extremo N-terminal y su extremo C-terminal (West et al., 2018).

Algunas de las proteínas del CS en maíz presentan una interacción conservada (como CRC1/PCH2 con PAIR2/ASY1 presente en *Oryza sativa* y en *Arabidopsis thaliana*, respectivamente) mientras que otras interacciones entre proteínas parecen diferir entre especies (como la interacción de ZYP1 con DSY2 presente en maíz, pero no en *Arabidopsis*). Otras interacciones no han sido exploradas en maíz ni en otros organismos, por lo que nos resulta interesante conocer cómo se lleva a cabo la interacción entre los componentes del CS en maíz. Así como las diferencias o similitudes que pueden tener estas interacciones con respecto a otras especies. Hasta el momento no se había evaluado la interacción de AFD1 con algún otro componente del CS en maíz u otra especie.

En este trabajo, nosotros evaluamos la interacción que presentan cuatro de los CS en maíz: ZmAFD1, ZmDSY2, ZmP31 y ZmPCH2.

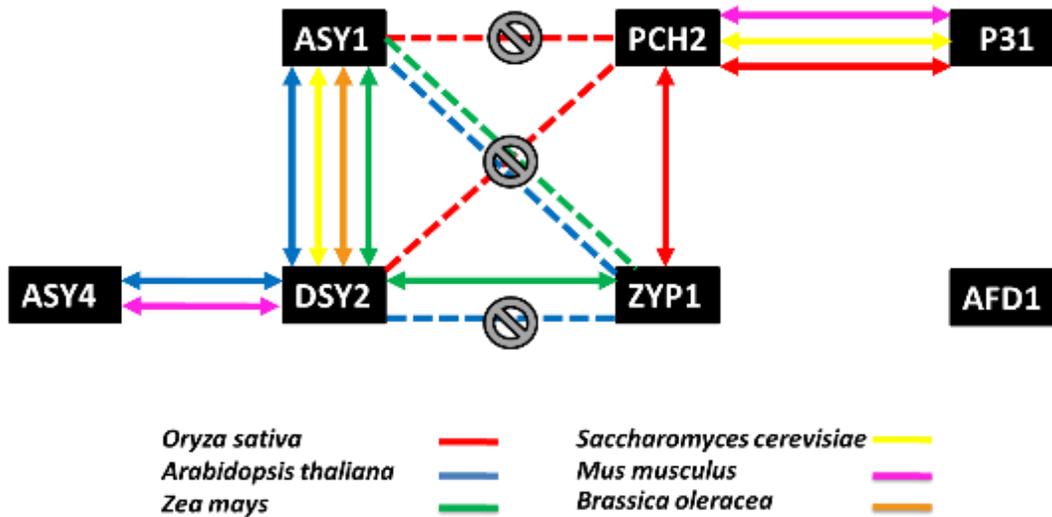


Figura 5. Interacciones comprobadas de los componentes del CS por medio de Y2H en diferentes organismos. Con flechas sólidas se muestran las interacciones comprobadas en los componentes del CS por medio de ensayos de Y2H. Por otra parte, aquellas interacciones que fueron evaluadas por medio de Y2H, pero no tuvieron resultados positivos se muestran con líneas punteadas.

Justificación

En los últimos años se ha estudiado la composición, así como la interacción de las proteínas relacionadas con el eje cromosómico, en levaduras y en mamíferos. Además, se ha podido observar un progreso considerable en la identificación de genes que codifican para las proteínas asociadas y estructurales del eje cromosómico, así como del CS. Sin embargo, en plantas vasculares se han identificado muy pocos genes relacionados al eje cromosómico y al CS. El maíz es uno de los pocos organismos con su genoma secuenciado en los cuales es fácilmente distinguible la estructura y composición del CS, por medio de técnicas citológicas, genéticas, moleculares y bioquímicas (Wang *et al.*, 2009; Golubovskaya *et al.*, 2011).

La conservación estructural general del CS nos permite conocer acerca de su importancia en el proceso meiótico. Sin embargo, a nivel de secuencia primaria existe una mayor variación entre los componentes del CS entre especies. Recientemente se ha identificado que las proteínas del CS están sujetas a una selección positiva rápida (Wright *et al.*, 2015). Rog y colaboradores (2017) proponen que las fuerzas selectivas para mantener las propiedades del CS derivan en la diversidad de secuencias observadas en sus componentes.

Aunque existen diversas interacciones de proteínas del complejo sinaptonémico comprobadas en diferentes organismos, así como en maíz. Al comparar la interacción de estas proteínas entre diversos organismos no se puede distinguir claramente un patrón conservado de interacción entre los componentes protéicos del CS. Por lo que sería interesante conocer las interacciones protéicas de esta estructura meiótica en maíz.

Hipótesis

Las proteínas ZmAFD1, ZmASY1, ZmDSY2, ZmPCH2, ZmP31 y ZmZYP1 forman un complejo proteínico relacionado con el establecimiento del eje cromosómico en *Zea mays*. Además, algunas de estas proteínas interactúan entre sí para poder llevar a cabo el establecimiento y funciones específicas del eje cromosómico en maíz. Nosotros proponemos que algunas de las interacciones no descritas anteriormente podrán ser evaluadas en este proyecto. Especialmente las relacionadas con la proteína P31, la cual se descubrió recientemente en maíz. Así como de AFD1, de la que se desconocen las posibles interacciones que puede presentar en maíz.

Debido a que las proteínas que participan en el eje cromosómico forman parte de un evento exclusivamente meiótico es de esperarse una regulación en su expresión, lo que implicaría una expresión diferencial entre tejidos meióticos y tejidos somáticos en maíz.

Ya que el proceso de instalación y funcionamiento del CS requiere de varios participantes es de esperarse que aquellas proteínas que participan en sitios aledaños o en el mismo momento interactúen. De igual manera se esperaría que las proteínas que se expresan más pudieran tener una mayor interacción con el resto de las proteínas del CS.

Objetivo general

Evaluar los patrones de expresión e interacción de los genes que codifican para las proteínas (y sus isoformas) relacionadas al eje cromosómico AFD1, ASY1, DSY2, CRC1, P31 y ZYP1 en *Zea mays*.

Objetivos particulares

Realizar un análisis bioinformático de los componentes del CS de maíz. Llevando a cabo su anotación genética.

Evaluar el patrón de acumulación de los transcritos de los genes que codifican para las proteínas asociadas al eje cromosómico en órganos somáticos y órganos meióticos. Mediante una PCR semicuantitativa de punto final y una RTqPCR.

Evaluar la interacción entre proteínas pertenecientes al complejo sinaptonémico que no habían sido previamente analizadas, por medio del ensayo de Y2H. Incluyendo aquellos componentes previamente descritos como ZmAFD1 o proteínas recientemente descubiertas en maíz como ZmP31.

Materiales y Métodos

Análisis bioinformático

Se realizó el análisis bioinformático para cada uno de los genes seleccionados en este estudio. Para ello se obtuvieron las secuencias de los transcritos a partir de las bases de datos: *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*, *Gramene* y *MaizeGDB* (la versión V4 del genoma de maíz) en formato GeneBank. Posteriormente se llevó a cabo la anotación bioinformática para cada gen que incluyó la caracterización de los exones, intrones, UTRs (*UnTranslated Region*) así como los dominios teóricos indicados en las bases de datos de referencia. Además, se realizó un alineamiento con la secuencia de las proteínas de organismos relacionados a *Zea mays*. Tal como *Oryza sativa japonica*, *Arabidopsis thaliana* y *Sorghum bicolor*; por medio de la herramienta BLAST de la página de la NCBI y un alineamiento de múltiples secuencias con Clustal-Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Además, se realizó una búsqueda de motivos y dominios de las secuencias de nuestras proteínas de interés en el motor de búsqueda de dominios conservados de proteínas de la NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y en el programa SMART (*a Simple Modular Architecture Research Tool*: http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1). Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos para cada uno de los genes a analizar (ANEXO 1). Un par para la amplificación de la secuencia codificante completa (ATG a STOP). Los oligonucleótidos diseñados fueron evaluados con el programa *Oligoanalyzer*. Finalmente se diseñaron oligonucleótidos *attb*, necesarios para la clonación en vectores del sistema *GATEWAY*. Para el diseño de oligonucleótidos *attb* se utilizó el protocolo sugerido por la guía de usuario de Invitrogen (*Invitrogen Gateway Technology*). Los oligonucleótidos diseñados se resumen por gen en las tablas del ANEXO 1.

Colecta de muestras

Se utilizaron plantas de la línea B73 para la obtención de órganos somáticos (hoja y raíz) y reproductivos (inflorescencia masculina e inflorescencia femenina en estadio meiótico).

Las semillas para obtener las raíces se germinaron en condiciones estériles y en oscuridad por 96 h, una vez transcurrido este tiempo, se cortaron las raíces con una longitud aproximada de 3 a 4 cm, en una campana de flujo laminar y con el uso de una navaja previamente desinfectada con etanol al 70%. Las hojas se extrajeron de plantas con 15 días de germinación, las cuales se plantaron en macetas en tierra estéril. Los órganos meióticos (espiga meiótica y mazorca meiótica) se obtuvieron de organismos sembrados en el campo experimental de la UAEM (Universidad Autónoma de Morelos) con ocho semanas de germinación. Todos los órganos se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de cosecharse de las plantas y se mantuvieron a -70 °C antes de procesarse para la extracción del ARN.

Análisis de expresión

Extracción de ARN total

La extracción del ARN total se llevó a cabo de órganos somáticos y meióticos. Para el procesamiento de la raíz, la inflorescencia masculina y la inflorescencia femenina se utilizó el buffer GS (Isotiocianato de guanidina 5 M, Lauril sarcosinato de sodio 5%, Citrato de sodio 50 mM, β -mercaptoetanol 0.3%). Para hoja se utilizó el buffer Z6 (Clorhidrato de guanidina 8 M, MES 20 mM, EDTA 20 mM y β -mercaptoetanol 0.3%). El material se molió con nitrógeno líquido hasta obtener la textura de un talco. Posteriormente se agregaron 500 μ L del buffer correspondiente, una vez homogenizada la mezcla, se agregaron 250 μ L de fenol y 250 μ L de cloroformo.

Se centrifugó el homogenizado durante 5 minutos a 10000 g. Se colectó la fase acuosa y se precipitó con un 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y un volumen de isopropanol. Esta mezcla se dejó precipitando a -20°C durante tres horas. Se centrifugó a 10000 g por 10 minutos. La pastilla se lavó con etanol 70% y se

centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. Se procedió a un lavado con acetato de sodio 3 M se centrifugó una vez más, y se realizó otro lavado con etanol 70%, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en agua MQ estéril. Finalmente se midió la absorbancia del ARN a 260 nm en un Nanodrop 1000 (*Thermo*). Se comprobó la integridad del ARN a partir de un gel de agarosa al 1.2% en el cual se cargó 1 µg de cada muestra de ARN total. Para realizar este gel se pesaron 0.6 g de agarosa a los cuales se les añadió 5 mL de Buffer MOPS 10X (3-(N-morpholino) ácido propanosulfónico y EDTA 10 mM. con pH 7.0), 2 mL de formaldehído y 43 mL de agua MQ. Se corrió en un buffer de MOPS 1X con pH 7.

Se extrajo ARN total de los cuatro órganos a analizar: hoja, raíz, inflorescencia femenina meiótica e inflorescencia masculina meiótica. Por cada órgano se extrajeron 6 muestras de ARN total. De las cuales se seleccionaron cuatro para obtener ADNc por medio de RT-PCR para cada órgano. Las muestras de ARN total obtenidas se muestran en la figura 6.

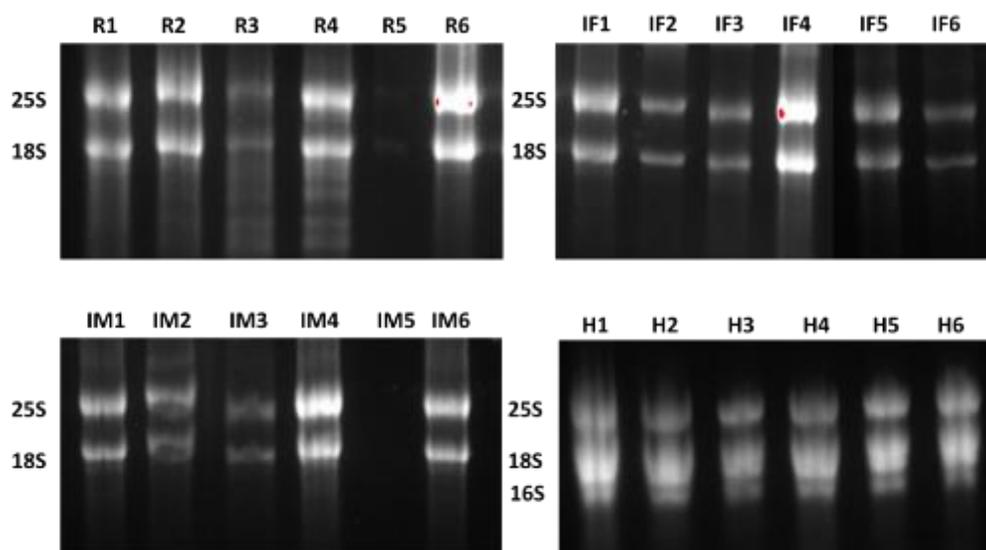


Figura 6. Muestras de ARN total obtenidas de los cuatro órganos. R=raíz, IF= Inflorescencia femenina, IM= Inflorescencia masculina, H=Hoja.

Tabla 2. Concentración de las muestras de ARN seleccionadas.

Órgano	Número de muestra	Concentración ng/µl
HOJA	1	1249.53

RAÍZ	2	1315.12
	4	1056.98
	6	726.02
	1	427.05
	2	797.87
	4	1865.53
INFLORESCENCIA FEMENINA	6	692.53
	1	3895.69
	2	1020.17
	4	2059.79
INFLORESCENCIA MASCULINA	6	199.53
	1	1582.96
	2	1188.13
	4	1099.05
	5	3054.78

Síntesis de ADN complementario (cDNA) y RT-PCR semicuantitativa

Se realizó un tratamiento con ADNasa I a las muestras de ARN total, con el fin de evitar la contaminación con ADN genómico. Esto se llevó a cabo con la enzima ADNasa I (Invitrogen™AM2222) a partir de 1 µL de ARN a una concentración de 1 µg/µL. Para ello, se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Descrito a continuación. En un tubo se añadieron 1µg de RNA, 1µL del buffer de reacción de la ADNasa I (10X) con MgCl₂, 1 µL ADNasa I y 7 µL de agua MQ estéril. Se incubó a 37°C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió 1 µL de una solución 50 mM de EDTA y se incubó a 65°C durante 10 minutos, con el fin de desactivar la actividad enzimática de la ADNasa I. Posteriormente, se procedió a obtener el ADN complementario (ADNc) de las muestras tratadas con ADNasa I, por medio de la acción de la retrotranscriptasa reversa (Roche 03531295001) y el OligodT. Para ello se preparó una mezcla de 20 µL. La cual consistía en 1µL de OligodT (10 µM), 1.5 µL de agua MQ esterilizada, 4 µL del Buffer de reacción (5X), 2 µL del mix de dNTPs (10 nM) y 0.5 µL de la enzima RT (20 U/µL).

Para verificar la calidad del ADNc se realizó una PCR de comprobación con oligonucleótidos específicos de las secuencias de nuestros seis genes de interés

(AFD1, ASY1, DSY2, PCH2, P31 y ZYP1), además de un gen de referencia (cianasa/cianato deshidrogenasa). La PCR se llevó a cabo utilizando una mezcla de 16 μL utilizando 1.25 unidades de la GoTaq ADN polimerasa (GoTaq Green Master Mix, Promega) como se describe en la tabla 3.

El tiempo de desnaturalización dado fue de 45 s a 94°C . El alineamiento se programó para una duración de 45 s a la temperatura de alineamiento recomendada para cada par de oligonucleótidos. Para la extensión de la polimerasa se dejó actuar a una temperatura de 72°C , la cuál es la recomendada para la GoTaq polimerasa (GoTaq Green Master Mix, Promega) y el tiempo de duración se calculó de acuerdo con lo propuesto por el fabricante de la enzima (60 s por cada Kb). La PCR se llevó a 30, 32, 35 y 37 ciclos.

Tabla 3. Composición de la mezcla utilizada para la RT-PCR semicuantitativa. En paréntesis se presenta la concentración de trabajo requerida para la mezcla.

Sustancia	Cantidad (concentración)
GoTaq Green Master Mix 2X	7.5 μL (incluye: 1.25 U de Taq polimerasa, dATP 400 μM , dCTP 400 μM , dGTP 400 μM , dTTP 400 μM y MgCl_2 3 mM)
Oligonucleótidos	0.25 μL (10 μM cada uno)
gADN/ ADNc	1 μL (50 ng/ μL)/ 0.5 μL (1 ng/ μL)
DMSO	0.5 μL (100%)
Agua ultrapura estéril	6.5 μL

Análisis de expresión por medio de RTqPCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real o RT-PCR/RTqPCR se utilizó por primera vez en 1993 por Higuchi y colaboradores. Esta técnica permite la cuantificación precisa de ácidos nucleicos específicos en una mezcla compleja aun cuando la cantidad inicial de la muestra problema se encuentra en una baja concentración. Esto se logra debido al monitoreo del proceso de amplificación de la secuencia blanco en tiempo real usando fluorescencia. La rapidez con la que el amplificado de la secuencia problema alcanza el umbral de detección dependerá de la cantidad inicial de la muestra problema (Fraga *et al.*, 2008). Para realizar la RTqPCR utilizamos SYBR Green como molécula fluorescente.

Para conocer si los oligonucleótidos utilizados son comparables entre sí (Tabla 4), se analizó su eficiencia, con respecto a la amplificación del ADNc a diferentes concentraciones iniciales. Esto se realizó mediante el análisis de sus curvas de eficiencia. Para ello se hicieron diluciones partiendo de un stock con una concentración de 50 ng/μL y fue diluida de manera serial 1:2, 1:4 y 1:8 obteniendo de esta manera concentraciones de 25 ng/μL, 12.5 ng/μL y 6.25 ng/μL del ADNc, respectivamente. El ADNc utilizado fue de inflorescencia masculina. Todos los oligonucleótidos fueron comparados con los resultados obtenidos de la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la cianato deshidrogenasa de maíz, nuestro gen de referencia. En la tabla 5 se resume la mezcla utilizada para el mix de 10uL para el ensayo de la RTqPCR. Para el cálculo de la eficiencia se utilizó la siguiente fórmula: $E=10^{-1/PENDIENTE}$ tanto en nuestro gen de referencia como en nuestros genes blanco.

Una vez que se comprobó la eficiencia de los oligonucleótidos se procesaron las muestras de cDNA de los cuatro órganos y para los seis genes de interés. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos de la cianato deshidrogenasa. El análisis de datos se realizó mediante una prueba ANOVA y finalmente se comprobó la diferencia significativa entre los porcentajes de expresión con respecto a la cianato deshidrogenasa con una prueba de Tukey.

La RTqPCR se llevó a cabo en el termociclador LightCycler Nano (Roche 06 327 672 001). El programa utilizado para realizar la RTqPCR se muestra en la tabla 6.

Tabla 4. Características de las amplificaciones esperadas para cada una de las secuencias en los ensayos de RT-PCR

Gen	Primers utilizados	Tamaño esperado (cDNA)	Tm	Tiempo de extensión
AFD1	AR121, AR122	219pb	60°C	15"
ASY1	AR467, AR468	190pb	60°C	12"
DSY2	AR257, AR258	225pb	60°C	15"
P31comet	AR485, AR486	252pb	60°C	17"
PCH2	AR469, AR470	231pb	60°C	15"
ZYP1	AR483, AR484	178pb	60°C	25"
Cianasa	AR452, AR453	170pb	60°C	12"

Tabla 5. Composición de la mezcla utilizada para la PCR cuantitativa (de punto final)

Sustancia	Cantidad
SYBR green	5µL
Primer específico (forward)	0.25 µL (10 µM)
Primer específico (reverse)	0.25 µL (10 µM)
ADNc	1 µL (50 ng/µL)
Agua libre de nucleasas	3.5 µL
Total	10 µL

Tabla 6. Programa utilizado durante la RTqPCR

Ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)
1	5'	94
40	30"	94
	30"	Tm específica
	Según tamaño del fragmento	72
1	3'	72

Clonación de los plásmidos utilizados en el proyecto

Cepas de bacterias utilizadas en la clonación

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α para la clonación en los diferentes vectores (pJET1.2-blunt; pDONOR221, pGBKT7GW, pGADT7GW, pYFC43 y pYFN43). Mientras que la cepa DB3.1 se utilizó para la propagación de los plásmidos utilizados para la recombinación con la tecnología GATEWAY.

El medio utilizado para la preparación de bacterias electrocompetentes así como para su mantenimiento fue el medio LB (Luria Bertani). Cuya composición es la siguiente: Bacto peptona (Peptona de caseína) 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio (NaCl) 10 g/L. El pH se ajusta a 7 utilizando una solución 3M de hidróxido de sodio (NaOH). Para el medio sólido se añaden 1.5 % de agar por L de medio LB líquido. Se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 121°C. El protocolo para la obtención de células de *E. coli* electrocompetentes se describe a continuación.

Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

Las células electrocompetentes se obtuvieron utilizando el siguiente procedimiento. Se tomó una colonia de bacterias *E. coli*-DH5 α y se incubó en un tubo de cultivo con 4 ml de medio LB durante 12 h a 37°C y con agitación de 1200 rpm. En un matraz esterilizado de 1 L se colocaron 500 ml de medio LB bajo en sales (con la mitad de NaCl de la receta original), en este matraz se vertió el inóculo. Se dejó incubando a 37°C y 1200 rpm hasta obtener una DO entre 0.6-0.8. Una vez obtenida la DO esperada se dejó enfriar durante 30 minutos a 4°C. El resto del procedimiento se llevó a cabo en cubetas con hielo con el fin de mantener esta temperatura. El cultivo se distribuyó en tubos cónicos con capacidad de 50 ml los cuales se centrifugaron a 700 g durante 5 minutos con una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 25 ml de agua MQ esterilizada. La resuspensión se realizó suavemente con la ayuda de una pipeta, evitando tocar el botón celular. Se centrifugaron nuevamente a 700 g durante 5 minutos con una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 ml de una solución de glicerol al 10% estéril. Se repitió el proceso de

centrifugado y resuspensión ahora en un volumen de 10 ml y posteriormente en 5ml. Finalmente las células se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10%. La suspensión de células obtenidas se dividió en alícuotas de 150 µL, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido. Y fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Amplificación ATG-STOP

Con los oligonucleótidos diseñados se llevó a cabo la amplificación de la región codificante de cada gen (CDS). Para ello se realizaron pruebas para comprobar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos diseñados con una polimerasa de baja fidelidad (GoTaq).

Una vez establecidas las condiciones de la amplificación. Se realizó una nueva PCR (20 µL) utilizando a la polimerasa de alta fidelidad *Phusion High fidelity*. Se comprobó la calidad de la amplificación mediante el corrimiento de una fracción (7 µL) del producto de PCR en un gel de agarosa 1% a 100 mV. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada uno de nuestros genes de interés se resumen en la siguiente tabla. En la figura 7 se observa la composición de los transcritos canónicos de los genes evaluados en este proyecto. También se observa la posición de los oligonucleótidos utilizados para evaluar su expresión, así como amplificación de los CDS.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la CDS de cada gen

Gen	Primers utilizados	Tamaño esperado (pb)
ZmAFD1	AR519, AR520	1835 pb
ZmASY1	AR529, AR530	1845 pb
ZmP31	AR548, AR549	A 869 pb B 800 pb
ZmPCH2	AR556, AR557	1455 pb
ZmZYP1	AR566, AR567	2635 pb

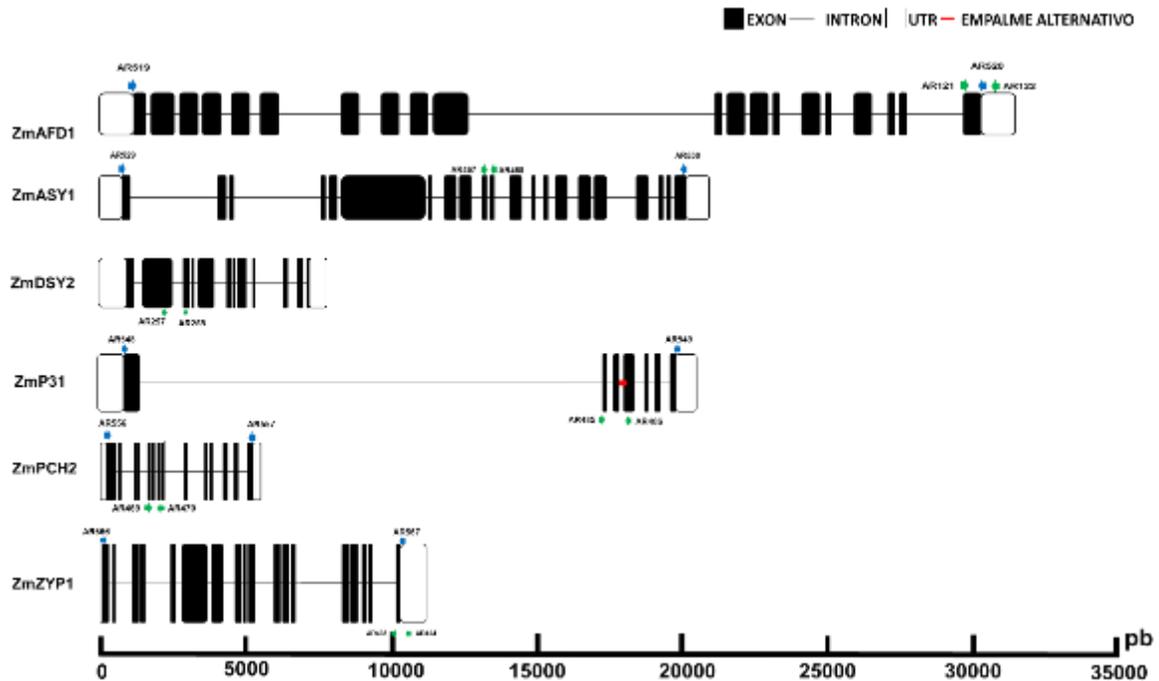


Figura 7. Anotación de los transcritos canónicos de los seis genes analizados en este trabajo. Se muestra la disposición de exones, intrones y regiones UTR. Además, para el gen ZmP31 se observa la retención del intrón en rojo, el cual origina a la isoforma B. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la CDS

Ligación con el vector pJET1.2

pJET1.2 es un vector de clonación el cual acepta insertos de 6 pb a 10 Kb. Éste contiene el gen (Eco471/T7) que codifica para una endonucleasa de restricción la cuál es letal para todas las cepas de *Escherichia coli* que suelen ser utilizadas en clonación, incluyendo a DH5 α . Cuando ocurre la ligación del vector con un fragmento de ADN, el gen letal es interrumpido. Por lo que solo aquellas células con plásmidos recombinantes podrán crecer en medio selectivo (con el antibiótico ampicilina/carbenicilina). En la figura 8 se presenta el mapa del vector pJET1.2-blunt.

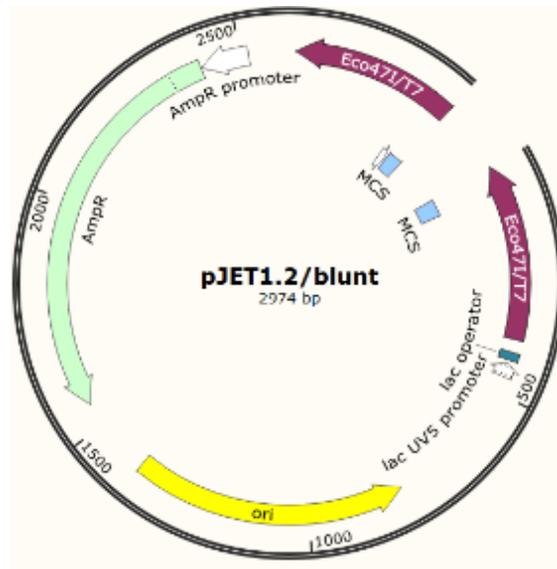


Figura 8. Mapa teórico del vector de clonación pJET1.2-blunt

Para llevar a cabo la ligación con este vector de clonación seguimos las indicaciones del fabricante. El protocolo es descrito a continuación: Debido a que durante la amplificación de las CDS utilizamos la polimerasa *Phusion High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific F-530XL), la cual deja una terminación tipo romo, no es necesario realizar el tratamiento sugerido para los extremos romos con la enzima “*blunt*” proporcionada en el kit. Para la reacción se colocaron los componentes descritos en la tabla 8.

Tabla 8. Mezcla para la reacción de ligación con pJET1.2-blunt+CDS

Sustancia	Cantidad
Buffer de reacción (2X)	5 µL
Producto de PCR	0.1-0.5 µL
Vector pJET1.2-blunt (50 ng/µL)	0.5 µL
Agua MQ estéril	3.5-3.9 µL
T4 DNA Ligasa	0.5 µL

Transformación por electroporación

Para la transformación se utilizaron como control positivo células DH5 α transformadas con pUC19 y como control negativo células sometidas al proceso de transformación, pero agregando agua en lugar de un plásmido. La transformación se llevó a cabo por electroporación en celdas de 0.2 cm de la marca *BIO-RAD*. El electroporador utilizado fue el *micropulser* de *BIO-RAD* (165-2100). Se colocaron 2 μ L del producto de ligación en 150 μ L de células electrocompetentes. Para la electroporación se dio un único pulso de 2.5 kV. Una vez electroporadas, las células se recuperaron en 500 μ L de medio LB y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL estéril. Se dejaron incubar durante una hora a 37°C con una agitación de 1200 rpm.

Las células se plaquearon utilizando dos volúmenes del cultivo (100 μ L y 50 μ L) en cajas de Petri (10 cm de diámetro) con medio LB sólido y antibiótico selectivo (carbenicilina con una concentración de 50 mg/mL).

Comprobación de la inserción en el vector pJET1.2blunt por medio de PCR en colonia

Se realizó una PCR en colonia en 15 μ L de reacción con la GoTAq polimerasa. Se utilizó un oligonucleótido interno del CDS insertado y los oligonucleótidos (forward y reverse) de pJET1.2-blunt. Esto con el fin de verificar la correcta inserción del gen completo en el vector.

Obtención de plásmidos por medio de minipreparaciones

Las minipreparaciones se realizaron en aquellas colonias que presentaban una correcta inserción del gen (comprobado por medio de PCR en colonia). Y se realizó utilizando el kit GeneJet (#K0503) de ThermoScientific. Para ello se siguieron las indicaciones del fabricante. Una vez obtenidos los plásmidos se cuantificaron en nanodrop para verificar su calidad.

Comprobación de los plásmidos obtenidos mediante digestión enzimática

Se llevó a cabo la comprobación de los plásmidos por medio de una digestión enzimática. Utilizando enzimas de restricción que cortaban tanto en el fragmento amplificado como en el vector pJET1.2-blunt. En el ANEXO 2 se resumen las

enzimas utilizadas, así como los fragmentos esperados para cada plásmido en cada comprobación. Finalmente se mandaron a secuenciar aquellos plásmidos que contenían el patrón de digestión deseado.

La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación del IBt-UNAM. Por medio del método de Sanger. Una vez obtenida la secuencia se llevó a cabo un alineamiento con los mapas teóricos. Se seleccionaron aquellos plásmidos que no presentaban mutaciones en la secuencia para realizar la clonación con el sistema Gateway.

Clonación con el sistema GATEWAY en el vector donador y los vectores de expresión

Decidimos utilizar la tecnología Gateway para obtener nuestras construcciones en los vectores de expresión para el sistema de Y2H debido a su eficiencia, versatilidad y practicidad. El sistema de clonación Gateway es un método robusto para generar una variedad de construcciones de expresión de proteínas para su uso en múltiples sistemas huésped, tal como Y2H o BIFC (Esposito *et al.*, 2009).

Este sistema requiere generar dos tipos de clones: los clones de entrada, que son clones "maestros", a partir de los cuales se generan el segundo tipo, los clones de expresión. Los clones de entrada son transcripcionalmente silenciosos y se requiere verificar su secuencia. Los clones de expresión son los clones finales de producción de proteínas generados por la recombinación de los clones de entrada. Ya que la reacción de recombinación específica del sitio de recombinación de Gateway no implica la amplificación por PCR, no es necesario volver a secuenciar los clones de expresión siempre que sus clones de entrada originales hayan sido verificados en secuencia (Esposito *et al.*, 2009).

Las reacciones que permiten la introducción de los CDS al vector de entrada y el intercambio de este a los vectores de expresión son impulsadas por la recombinación entre sitios de unión (sitios att), que vienen en cuatro variedades, attP, attB, attL y attR. Todas las reacciones son conservadoras, direccionales y conducen a la interconversión de estos sitios. Los clones de entrada contienen sitios

attL, mientras que los clones de expresión contienen sitios attB (Esposito *et al.*, 2009).

Las secuencias de codificación de proteínas de los clones Gateway siempre están flanqueadas por dos sitios att ligeramente diferentes, identificados con números como en attB1 y attB2. Los sitios att1 y att2 no pueden recombinarse entre sí y, por lo tanto, producen el orden único de las reacciones de recombinación que mantiene el marco de lectura y elimina la necesidad de detección direccional. El intercambio de la CDS ocurre en dos reacciones diferentes. Primero la reacción BP permite transferir la CDS a un vector de entrada, mientras que el intercambio a los vectores de expresión se lleva a cabo por medio de la reacción LR (Esposito *et al.*, 2009).

En este trabajo, una vez obtenidas las construcciones pJET1.2 blunt con nuestra secuencia de interés. Se realizaron las amplificaciones correspondientes con los oligonucleótidos *attb1* y *attb2* diseñados previamente (ANEXO 1). Para ello, se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Phusion HF* (ThermoScientific). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 μ L, y se utilizaron plásmidos digeridos con la enzima Adel o NcoI, dependiendo el gen, pues estas enzimas solo realizaban un corte en la región 3' del gen insertado en nuestra construcción, sin cortar la región CDS insertada. Con ensayos previos habíamos observado que el producto de PCR con oligonucleótidos *attb*, era más abundante en plásmidos digeridos a diferencia de aquellos no digeridos. Por lo que se decidió realizar la linearización previa, así como la inactivación de la enzima utilizando una temperatura de 65°C durante 10 minutos. En la Tabla 9 se resume la mezcla de PCR para la amplificación de los productos de PCR attb.

Tabla 9. Mezcla de PCR para la obtención de productos *attb* con el uso de la polimerasa *Phusion HF*

Sustancia	Cantidad
Buffer GC	4 μ L
Primer específico (forward)	1 μ L (10 μ M)
Primer específico (reverse)	1 μ L (10 μ M)
MixdNTPs (10mM)	0.4 μ L
DMSO	0.6 μ L
DNA polimerasa <i>Phusion HF</i>	0.2 μ L
Plásmido	5 ng
Agua MQ	Hasta un total de 20 μ L
Total	20 μ L

Una vez obtenidos los fragmentos con las terminaciones *attb*, se realizó una purificación del producto de la PCR como lo indica el manual del sistema Gateway (Invitrogen) (ANEXO 3). Las reacciones BP y LR se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del proveedor del sistema Gateway (Invitrogen), el protocolo puede revisarse en el ANEXO 4.

Como vector de entrada se utilizó el vector pDONR221 y como vectores de expresión los vectores pGBKT7GW (también conocido como pDEST-GBKT7 / ABRC stock: CD3-764) y pGADT7GW (también conocido como pDEST-GADT7 / ABRC stock: CD3-763) para el sistema de dos híbridos (Rossignol *et al.*, 2007). En la figura 9 se presentan el mapa de los vectores utilizados en este proyecto.

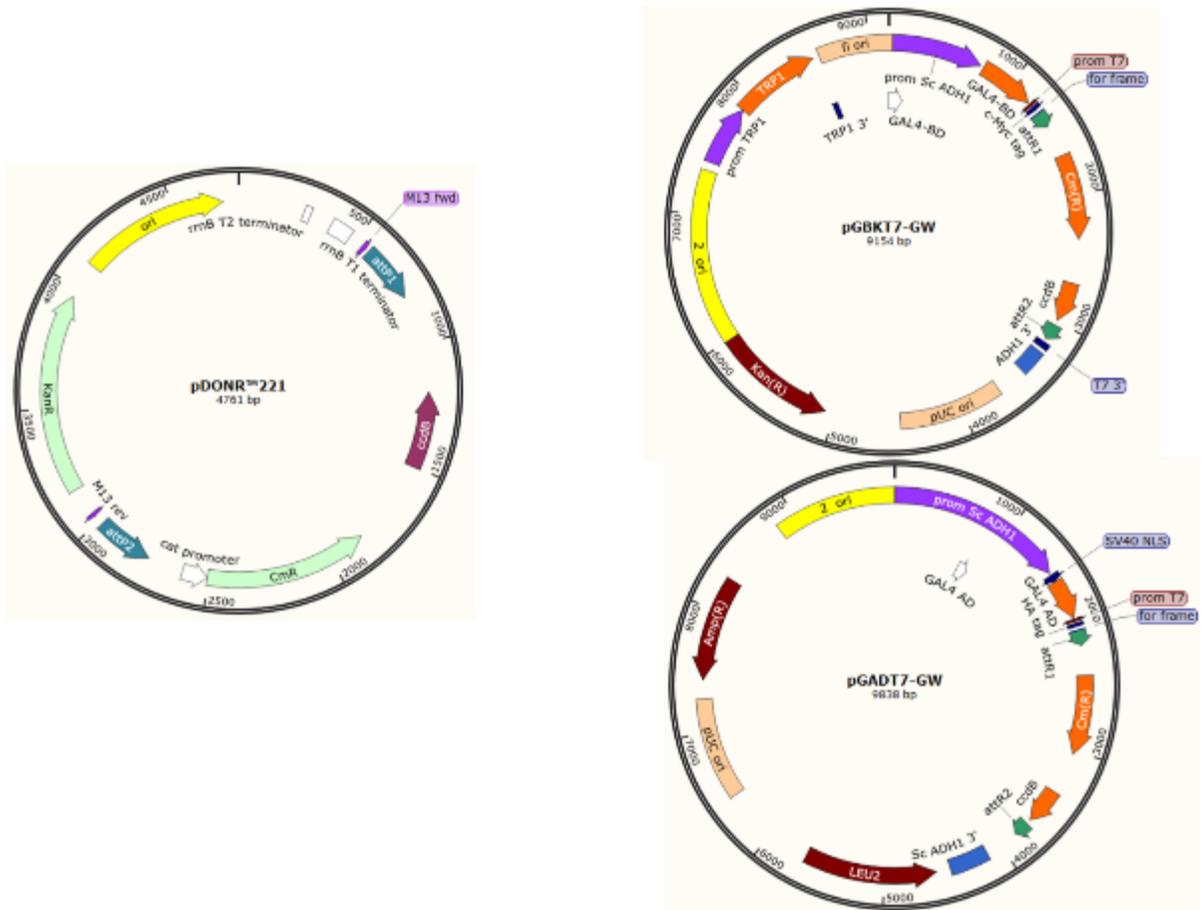


Figura 9. Mapa de los vectores utilizados en el sistema Gateway

La transformación se llevó a cabo en cepas DH5 α de *E. coli*, por medio de electroporación. Véase la sección Transformación por electroporación. Para pDONR221 y pGBKT7-GW las células transformadas se plaquearon en placas de LB+Kanamicina (50 mg/mL). Para pGADT7-GW las células se plaquearon en placas de medio LB+Carbenicilina (50 mg/mL).

Debido a que pDONR221 y pGBKT7-GW presentan la misma resistencia a Kanamicina. Realizamos una digestión enzimática con VspI a los pDONOR221+CDS que habían sido secuenciados y no presentaban mutaciones. Esto con el fin de hacer tres cortes sin interferir con las secuencias de recombinación ni la CDS insertada en pDONR221. En el ANEXO 5 se muestra el patrón de digestión esperado con VspI para las construcciones: pDONR221ZmAFD1, pDONR221ZmP31-A, pDONOR221ZmP31-B y pDONR221ZmDSY2.

Al igual que en la clonación en pJET1.2-blunt. En el caso de estas nuevas construcciones se realizaron PCRs en colonia para cada construcción utilizando diferentes oligonucleótidos. En el caso de pDONR221 el oligonucleótido M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') Para pGBKT7-GW se utilizó el oligonucleótido BD 5' (5'- AAGAGAGTAGTAACAAAG-3'), mientras que para pGADT7 se utilizó el oligonucleótido T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'). En todas las construcciones se utilizó además un oligonucleótido interno del CDS insertado, los cuales se resumen en la tabla 10.

Se llevaron a cabo las minipreparaciones de aquellas colonias que presentaban el fragmento esperado en la PCR en colonia. Finalmente se realizó una digestión con enzimas de restricción. Esto con el fin de corroborar que se trataba de los plásmidos que queríamos obtener en el ANEXO 6 se describen las enzimas utilizadas para cada construcción.

En el caso de pDONR221+CDS se secuenciaron aquellos plásmidos que presentaron un patrón de digestión enzimática esperado. Solo aquellos plásmidos sin mutaciones fueron utilizados en la reacción LR del sistema GATEWAY en pGADT7-GW y pGBKT7-GW. De esta manera obtuvimos los ADNc de longitud completa de los genes ZmAFD1, ZmP31-A y B, ZmDSY2 y ZmPCH2 como fusiones en marco con el dominio de unión al ADN GAL4 (BD) y el dominio activador GAL4 (AD). Es decir, en pGBKT7-GW y pGADT7-GW, respectivamente.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para cada CDS insertado en los tres vectores utilizados (pDONR221, pGADT7-GW y pGBKT7-GW)

CDS insertado	Oligonucleótido interno
ZmAFD1	AR527 (5'-GCATGAGATCACTTATCTTGGTTG-3')
ZmP31-A	AR553 (5'- AACTTGGTTAGAGCATGTTCTTTGGC-3')
ZmP31-B	AR553 (5'- AACTTGGTTAGAGCATGTTCTTTGGC-3')
ZmDSY2	AR541 (5'- CACAACCTTCATCCTGAGCATCTCAC-3')
ZmPCH2	AR561 (5'- AAGCTAGAGAGTGTATCATCCTCGCT-3')

Evaluación de interacciones proteína-proteína por medio del ensayo de dos híbridos en levadura

El ensayo de dos híbridos (Y2H: *yeast two hybrid system*) fue desarrollado en 1989 por Fields y Song. Este sistema se basa en el hecho de que un factor de transcripción puede ser dividido en dos dominios: el dominio de unión a ADN (BD) y el dominio de activación (AD) (Mela *et al.*, 2015; Reece-Hoyes y Walhout, 2018).

En el sistema de Y2H una proteína “x” se fusiona con el BD del factor de transcripción *Gal4*. Esta fusión se conoce como cebo. BD puede unirse a la secuencia UAS (*Upstream Activating Sequence*) de algún promotor. Pero la activación de la transcripción solo puede ocurrir si hay un AD presente. Simultáneamente, se fusiona otra proteína con AD, esta fusión es conocida como presa. El AD puede activar la transcripción, pero no puede unirse al promotor de un gen informador sin un BD. Por lo tanto, solamente si se reconstruye el factor de transcripción mediante la interacción de las proteínas unidas a sus dominios se podrá transcribir un gen reportero como *HIS3*, *URA3* o *ADE2* (Mela *et al.*, 2015; Lin y Lai., 2017; Reece-Hoyes y Walhout, 2018). Las cepas que se usan para el sistema Y2H poseen deficiencias de los genes reporteros, por lo que no pueden crecer en medios carentes de los aminoácidos que no pueden sintetizar (Reece-Hoyes y Walhout, 2018). Los AD y BD, unidos a las proteínas de interés pueden coexpresarse en la misma célula de levadura o bien en dos diferentes cepas de levadura con tipos de apareamiento opuesto (Mela *et al.*, 2015).

Este sistema nos permite evaluar interacciones de proteínas débiles y transitorias, que en muchos otros sistemas no pueden observarse. Debido a que este sistema se lleva a cabo de un modo *in vivo*, las proteínas que se están probando tienen más probabilidades de encontrarse en sus conformaciones nativas, lo que conduce a una mayor sensibilidad y precisión de detección (Lin y Lai., 2017).

El ensayo de dos híbridos se realizó de acuerdo con el manual del sistema: *Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2* (TakaraBio/Clontech) por medio de

co transformación en las células de levadura de la cepa Y2HGold utilizando el método de PEG/LiAc.

Y2HGold deriva de la cepa PJ69-2A (James et al. 1996). En Y2HGold se reemplaza la mutación *ade2-101* por el reportero GAL2-Ade2. El genotipo de Y2HGold es: *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1UAS–Gal1TATA–His3, GAL2UAS–Gal2TATA–Ade2 URA3 :: MEL1UAS–Mel1TATA AUR1-C MEL1*.

En la cepa Y2HGold tres promotores (G1, G2 y M1) controlan la expresión de cuatro genes reporteros (*AUR1-C, ADE2, HIS3* y *MEL1*). G1 controla la expresión de *HIS3*, G2 a *ADE2*, mientras que M1 controla a *MEL1* y *AUR1-C*. Estos últimos no están relacionados excepto por los sitios cortos de unión a proteínas en la secuencia UAS (*Upstream Activating Sequence*) que están específicamente unidos por Gal4-BD. Por lo tanto, las proteínas que interactúan con secuencias no relacionadas dentro del UAS (es decir, falsos positivos) se eliminan automáticamente.

Los genes reporteros de Y2HGold se describen a continuación:

- *AUR1-C*. Es una versión mutante del gen *AUR1* el cual codifica para la enzima inositol fosforil ceramida sintasa. *AUR1-C* se expresa en Y2HGold cuando ocurre la interacción proteína-proteína cerca de Gal4. En *S. cerevisiae*, su expresión le confiere resistencia al antibiótico Aureobasidin A. El cual se utiliza como un indicador altamente restrictivo que evita la confusión con falsos positivos.
- *HIS-3*: Debido a que Y2HGold no puede sintetizar histidina y, por lo tanto, no puede crecer en medios que carecen de este aminoácido esencial. Cuando el AD y el BD se unen debido a la interacción de las proteínas unidos a ellos, la expresión de His3 sensible a Gal4 permite que la célula biosintetice histidina y crezca en este medio carente de histidina.
- *ADE2*. Al igual que en *HIS3*, la cepa Y2HGold tampoco puede crecer en medios mínimos que no contengan adenina. Sin embargo, cuando dos

proteínas interactúan, se activa la expresión de *Ade2*, lo que permite que estas células crezcan en este medio.

- *MEL1*: Codifica para una α -galactosidasa, una enzima naturalmente presente en muchas cepas de levadura. Como resultado de las interacciones de dos híbridos, las células de levadura expresan y secretan α -galactosidasa (*MEL1*). Las colonias de levadura que expresan *Mel1* se vuelven azules en presencia del sustrato cromogénico X- α -Gal. Tanto *AUR1-C* como *MEL1*, fueron considerados en este trabajo como reporteros altamente restrictivos.

Las células competentes de levadura se obtuvieron el mismo día en el que se llevó a cabo el ensayo. Para obtenerlas se dejó incubando un inóculo en 30 mL de medio YPDA (ANEXO 7) a 30°C durante 16 h. El cultivo se transfirió a un matraz esterilizado con 100 mL de medio YPDA y se dejó en incubación hasta que se alcanzó una DO (600 nm) cercana a 0.6. Una vez obtenida la DO deseada se transfirió el cultivo a dos tubos cónicos esterilizados de 50 mL. Se centrifugaron a 700 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado con 25 mL de agua MQ estéril en uno de los tubos, una vez resuspendidas las células se trasladaron al segundo tubo. Se centrifugó a 700 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1.5 mL de 1.1X TE/LiAc (ANEXO 7). La suspensión se transfirió a tubos de 1.5 mL de capacidad y se centrifugaron durante 15 segundos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 600 μ L de TE/LiAc.

Para la cotransformación se colocaron los reactivos como se indican en la tabla 11 en un tubo eppendorf de 1.5 mL.

Tabla 11. Mezcla utilizada para la cotransformación por medio de PEG/LiAc en levadura.

Sustancia	Cantidad
ADN plasmídico (BD)	100 - 500 ng*
ADN plasmídico (AD)	100 - 500 ng*
Células competentes	100 μ L

PEG/LiAc	500 μ L	
ssADN de espermatozoos de salmón	10 μ L	

Se mezcló el contenido del tubo y se dejó incubar durante 30 minutos a 30°C, mezclando cada 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 50 μ L de DMSO estéril, y se incubaron a 42°C durante 20 minutos mezclando cada 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 21.300 g durante 15 minutos y el sobrenadante se desechó. A cada tubo se añadió 1 mL de medio (2X) YPDA (ANEXO 7). Y se dejaron incubar durante 90 minutos a 30°C y a 200 rpm. Los tubos se centrifugaron durante 15 segundos a velocidad máxima y se desechó el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de NaCl 0.9% (ANEXO 7).

La fuerza de la interacción se analizó mediante una serie de diluciones en las placas con medio selectivo (Tabla 12). Las diluciones utilizadas fueron: 1:10; 1:100 y 1:1000 de la cotransformación. Se goteó un volumen de 50 μ L en cada medio y por cada dilución. Se incubaron a 30°C en oscuridad durante 4 días. En la tabla 13 se especifican las co-transformaciones realizadas y en el ANEXO 7 se describe la preparación de cada medio utilizado.

El grado de selectividad de los medios se afinó con el uso de la aureobasidina A (AbA) y X- α -gal. AbA es un antibiótico aislado del hongo filamentoso *Aureobasidium pullulans*, que es tóxico para la levadura en bajas concentraciones (0.1–0.5 μ g / ml). Su acción radica en la inhibición de una enzima de levadura, la inositol fosforilceramida sintasa (IPC), que se expresa a partir del gen AUR1 (Takesako *et al.* 1993, Hashida-Okado *et al.* 1996). La cepa Y2Hgold presenta la mutación del gen *AUR1-C*, la interacción entre las proteínas de interés, permite la expresión de *AUR1-C*, lo que le confiere resistencia a AbA.

X- α -gal es un substrato cromogénico que detecta la actividad del gen *MEL1*. El cual codifica la excreción de la enzima α -galactosidasa, la cual hidroliza el X- α -Gal incoloro en un producto de color azul.

La interacción positiva de las proteínas se determinó por su crecimiento en medio SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp o SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal/AbA a 30 ° C durante al menos 4 días.

Como control positivo se llevó a cabo la co-transformación con la proteína p53 (pGBKT7-p53) y el antígeno T de SV40 (pGADT7-T) cuya interacción había sido previamente descrita (Li y Fields, 1993; Iwabuchi *et al.*, 1993).

Además, se llevó a cabo una prueba de autoactivación para todas las construcciones utilizadas. Esto se realizó co-transformando la construcción de interés (pGBK+CDS o pGAD+CDS) más su contraparte vacía (pGADGW o pGBKGW). Las cotransformaciones obtenidas se crecieron en medio SD/-Trp y SD/-Trp/X- α -Gal/AbA, si se trataba de pGBKGW+CDS. O en medio SD/-Leu y SD/-Leu/X- α -Gal/AbA en el caso de pGADGW+CDS. También comprobamos su posible toxicidad comparando el crecimiento de estas cotransformaciones con el del control pGBT9, el cual es muy tóxico y fomenta un crecimiento lento y la producción de colonias de tamaño más pequeño a lo esperado.

Tabla 12. Medios utilizados para el ensayo de dos híbridos

Grado de selectividad	Medio
Control de co-transformación	SD/-Leu y SD/-Trp
Comprobación de interacción de menor rigor	SD/-Leu/-Trp
Comprobación de interacción de rigor medio	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp
Comprobación de interacción de rigor alto	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal/AbA

Tabla 13. Cotransformaciones realizadas en levadura

Clave	pGADGW	pGBKGW
C+	p53	T7
C-	LAM	T7
1	ZmAFD1	ZmAFD1
2	ZmDSY2	ZmDSY2
3	ZmPCH2	ZmPCH2
4	ZmP31-B	ZmP31-B

5	ZmP31-A	ZmP31-A
6	ZmAFD1	ZmDSY2
7	ZmAFD1	ZmPCH2
8	ZmAFD1	ZmP31-B
9	ZmAFD1	ZmP31-A
10	ZmDSY2	ZmAFD1
11	ZmPCH2	ZmAFD1
12	ZmP31-B	ZmAFD1
13	ZmBIVF1-A	ZmAFD1
14	ZmDSY2	ZmPCH2
15	ZmDSY2	ZmP31-B
16	ZmDSY2	ZmP31-A
17	ZmPCH2	ZmDSY2
18	ZmP31-B	ZmDSY2
19	ZmP31-A	ZmDSY2
20	ZmPCH2	ZmP31-B
21	ZmPCH2	ZmP31-A
22	ZmP31-B	ZmPCH2
23	ZmP31-A	ZmPCH2
24	ZmP31-B	ZmP31-A
25	ZmP31-A	ZmP31-B

PCR en colonia de levadura

Se comprobó la presencia de los BD y AD transformados por medio de PCR en colonia de levadura de aquellas colonias que presentaban interacción. Para ello se utilizó una mezcla de 25 μ L para cada reacción. Se tomó con una punta esterilizada una colonia con el cuidado de no tomar parte del medio y se resuspendió en 50 μ L de agua. Para cada una de las interacciones se llevaron a cabo dos amplificaciones utilizando en una el oligonucleótido para amplificar un fragmento de AD más un oligonucleótido interno del CDS insertado.

Tabla 14. Mezcla utilizada para llevar a cabo el PCR en colonia de levadura

Sustancia	Volumen (μ L)
Buffer Taq polimerasa (10X)	5 μ L
Mezcla de dNTPs (10 mM)	1 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 μ L
Oligonucleótido (10 μ M)	2 μ L

Oligonucleótido (10 μM)	2 μ L
Taq polimerasa	1 μ L
Agua MQ estéril + colonia de levadura	11.5 μ L
Total	25 μ L

Se tomaron los 10 μ L de la mezcla y se añadieron a los 20 μ L que contenían la colonia de levadura. La PCR se llevó a cabo con el siguiente programa:

Tabla 15. Programa utilizado en las PCR en colonia de levadura

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	5'	95°C
37	30"	95°C
	30"	Tm
	60"/Kb	72°C
1	5'	72°C

Resultados

Análisis bioinformático

Para la secuencia del gen que codifica para la proteína AFD1 y cuyo número de acceso es GRMZM2G059037 (*Gramene* <http://plants.ensembl.org>), Zm00001d039133 (NCBI) y ZM06G32090 (Plaza). Se anotaron tres transcritos provenientes de la base de datos NCBI, además del transcrito canónico, descrito previamente por Golubovskaya y colaboradores en 2006.

El ADNc del transcrito canónico (T01), fue aislado y clonado por Golubovskaya y colaboradores (2006) a partir de inflorescencias femeninas y masculinas. Aislaron una ADNc de 2300 pb de longitud. El gen comprende 20 exones y 19 intrones (Golubovskaya *et al.*, 2006). La CDS que identificamos para este transcrito fue de 1806 pb y codifica una proteína de 602 aa.

Además del transcrito canónico se anotaron otros tres transcritos, los cuales comprenden 20 exones y 19 intrones, al igual que T01. T02 presenta una secuencia codificante de 1812 pb y la proteína esperada con un tamaño de 604 aa (isoforma 1). T03 y T04, ambos con una longitud de 1809 pb y cuyas proteínas esperadas serían de 603 aa (isoforma 2 y 3, respectivamente). En las proteínas para las que codifican T01 y T02, radica en la inserción de una glicina (al inicio del exón 12) y una alanina (al final del exón 14) para la isoforma codificada por T02, a comparación de T01. La proteína codificada por T03 sólo presenta una adición de glicina al inicio del exón 12, mientras que la proteína que codifica T04 presenta la adición de una alanina al final del exón 14.

El alineamiento con las proteínas ortólogas de AFD1 en *Arabidopsis thaliana* (SYN1 con una longitud de 627 aa), *Oryza sativa* (Rec8 con una longitud de 722 aa), *Sorghum bicolor* (608 aa) mostró una similitud del 41%, 72% y 84.92% de identidad, respectivamente.

Se identificó un motivo de unión a ADN tipo hélice-giro-hélice (*Winged helix-turn-helix*) en la parte C-terminal de la proteína ZmAFD1 en la región comprendida entre las posiciones 460-572. Además, como ya lo habían descrito Golubovskaya y

colaboradores (2006), *ZmAfd1* presenta conservados los dominios típicos N-terminal (1-106) y C-terminal (544-602) de REC8/RAD21. En la figura 9 se observa gráficamente la estructura del gen que codifica para la proteína *ZmAfd1*, mientras que en la figura 10, se presenta el alineamiento con las proteínas ortólogas mencionadas anteriormente.

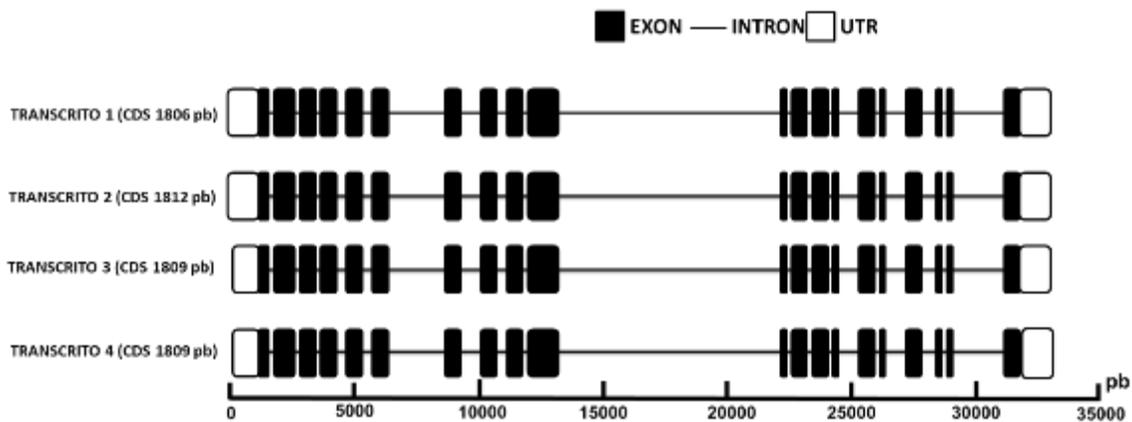


Figura 9. Mapa de los transcritos anotados de *ZmAfd1*. En blanco se representan los UTR. Los cuadros en negro representan los exones, las líneas negras delgadas representan los intrones.

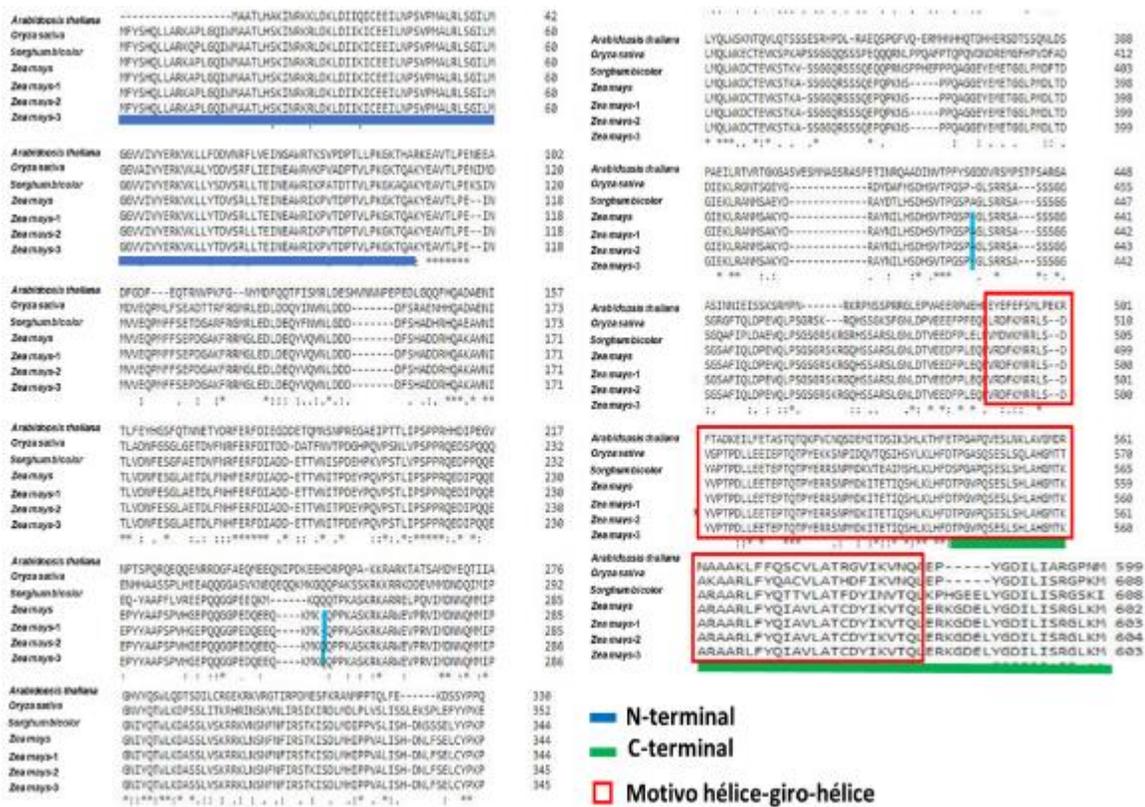


Figura 10. Alineamiento de las proteínas ortólogas de ZmAFD1 así como sus isoformas. En azul y en verde se subraya la región conservada N-terminal y C-terminal, respectivamente, en los homólogos de ZmASY1. En rojo se encuadra el motivo hélice-giro-hélice predicho en el análisis. En azul turquesa se subraya la diferencia entre las isoformas de ZmAFD1.

Para ASY1 se descargaron los datos en formato GeneBank de las secuencias con número acceso: GRMZM2G035996; Zm00001d006089; ZM02G33240 y LOC103647573. La anotación bioinformática incluye tres transcritos. El transcrito 01 (T01) presenta una longitud de 1830 pb el cual codifica para una proteína de 610 aa (proteína canónica). Mientras que el T02 presenta 1818 pb (y codifica para una proteína de 606 aa -isoforma 2-). Tanto el T01 como el T02 están compuestos por 21 exones y 20 intrones. En la figura 11 se muestra gráficamente la anotación de los dos transcritos ZmASY1. La diferencia entre las proteínas que codifican estos transcritos corresponde a un cambio de cuatro aminoácidos (Valina, Treonina, Tirosina e Histidina) en las posiciones 474 a 478. Ambas proteínas presentan el dominio HORMA (posición 15-221), el cual se encuentra conservado en la parte amino terminal de la mayoría de sus ortólogos (Armstrong *et al.*, 2002). El alineamiento con sus ortólogos en plantas se puede observar en la figura 12.

AtASY1 (596 aa), OsPAIR2 (610 aa) y SbPAIR2 (619 aa) mostraron una identidad del 56.33%, 82.36% y 91.25%, respectivamente, al compararla con la isoforma 1. Mientras que la isoforma 2 presenta un 56.51%, 81.82% y 91.73% al compararla con OsPAIR2 y SbASY1, respectivamente.

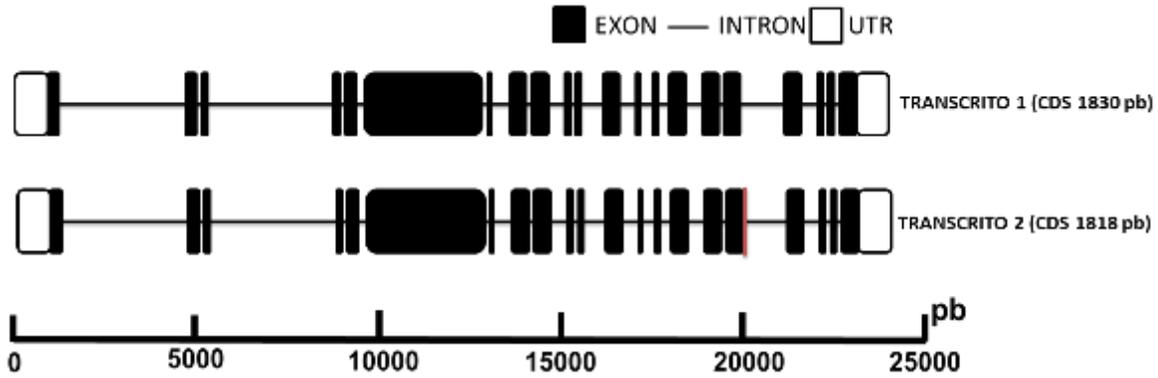


Figura 11. Mapa de los transcritos de ZmASY1. En blanco se representan los UTR. Los cuadros en negro representan los exones, las líneas negras delgadas representan los intrones. La línea roja representa las 12 pb que tiene de más el Transcrito 1 a diferencia del Transcrito 2 al final del exón 17.



Figura 12. Alineamiento de las proteínas ortólogas para ZmASY1. En rojo se enmarca el dominio HORMA presente en todos los ortólogos de ZMASY1. En azul se subraya la diferencia entre las isoformas de ZmASY1.

Para el caso de ZmDSY2 se identificaron las secuencias pertenecientes a este gen con el número de acceso Zm00001d015469 (para *Gramene*) y LOC103626703 (NCBI), se muestra en la figura 13. La anotación incluye el transcrito canónico descrito por Lee y colaboradores (2015) cuya secuencia codificante presenta una longitud de 2274 pb, compuesto por 12 exones y 11 intrones, que codifica para la proteína ZmDSY2 de 758 aa.

El alineamiento con sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana* (ASY3 de 793 aa), *Sorghum bicolor* (PAIR3 de 762 aa) y *Oryza sativa* (PAIR3 de 844 aa), presentó un 34.88%, 87.65% y 74.83% de identidad, respectivamente. Además, se identificaron dos dominios tipo *coiled-coil*, el primero en la posición 649 a 679, mientras que el segundo se encuentra más próximo al carboxilo terminal en la posición 718 a 740, se muestra en la figura 14. Los cuales habían sido anotados previamente por Lee y colaboradores en 2015.

Adicionalmente, con la búsqueda de motivos y dominios de ZmDSY2. Se localizaron dos repeticiones internas RPT1 en las posiciones 282-428 y en 443-595. Además de un dominio conservado de la familia de las apolipoproteínas en la posición 594-743.

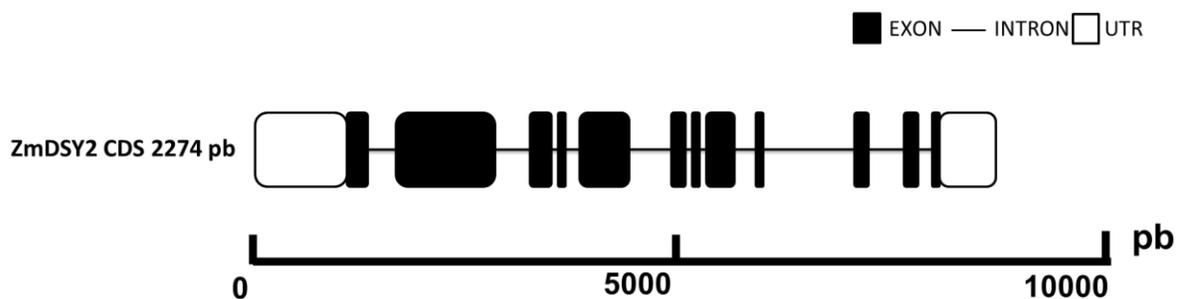


Figura 13. Mapa del transcrito canónico de ZmDSY2. En blanco se representan los UTR. Los cuadros en negro representan los exones, las líneas negras delgadas representan los intrones.

Se utilizó el número de acceso de la proteína OsP31 comet descrita en el trabajo de Ji y colaboradores (2016) para realizar una búsqueda de su ortólogo en maíz, lo cual se había realizado previo a mi incorporación al proyecto. Una vez identificado el número de acceso de la proteína, realizamos la búsqueda del gen que codifican para dicha proteína cuyo número de acceso en *Gramene* es: GRMZM2G701566 y en NCBI es el ZM03G12660; LOC100382572.

A partir de la secuencia del gen se identificaron dos transcritos, los cuales nombramos P31A y P31B. P31A presenta una secuencia codificante de 800 pb mientras que P31B presenta una CDS de 869 pb. P31A está compuesto por 7 exones y 6 intrones. P31B presenta la inclusión de un intrón entre las secuencias correspondientes a los exones 3 y 4 de P31A. Por lo que P31B presenta 6 exones y 5 intrones, mostrado en la figura 15. Ninguna de estas secuencias genera un codón de paro que se traduzca en una proteína truncada.

En el caso de P31A se identificó un motivo *coiled-coil* ubicado en las posiciones 55 a 77 conservado en OsP31 (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). Mientras que para P31B se identificaron dos motivos *coiled-coil*, el primero en la misma posición que el de la isoforma A (55-77) y otro en la posición 86-106. Además, se observó que el dominio OmpH identificado en OsP31 (Zhou *et al.*, 2017) se conserva en ZmP31B en la posición 62-152.

Se efectuó un alineamiento, el cual se muestra en la figura 16, con las proteínas ortólogas para P31 comet de *Arabidopsis thaliana* (265 aa), *Oryza sativa* (286 aa) y *Sorghum bicolor* (268 aa). El análisis arrojó un porcentaje de identidad de 38.08%, 70.15% y 82.39%, para la isoforma A y 43.08%, 76.12%, 90.49% para la isoforma B, respectivamente (Figuras 15 y 16). Observamos que la isoforma B de ZmP31 tiene una mayor similitud con OsP31 a nivel de secuencia, pero también en la conservación y posición del dominio OmpH y los motivos *Coiled-coil* (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). Además, Zhou y colaboradores (2017) señalaron que casi todos los homólogos de OsP31 pueden formar uno o dos motivos *coiled-coil*.

en ZmP31-B y fue reportado para OsP31^{comet} (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). En el cuadro verde se representa el dominio OmpH conservado en arroz y la isoforma ZmP31-B. En turquesa se subrayan las diferencias entre las isoformas ZmP31A y ZmP31B.

Para el gen *ZmPCH2* se descargaron las secuencias con los números de acceso GRMZM2G019621 y Zm00001d025687 (para *Gramene*) y LOC100193425 (Para NCBI). Se anotó el transcrito canónico con una secuencia codificante de 1452 pb. Presenta 14 exones que codifican para una proteína de 484 aa (figura 17). En la búsqueda de dominios se identificó un dominio AAA+ATP-asa, la cual está presente entre las posiciones 218-370. La conservación de la secuencia de este dominio se ha podido rastrear en organismos lejanos evolutivamente al maíz, como *S. cerevisiae* y *M. musculus* (Miao *et al.*, 2013).

El alineamiento múltiple con las proteínas ortólogas de *ZmPCH2* en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa japonica*, dio como resultado un porcentaje de identidad de 71.59% y 82.44%, respectivamente (figura 18).

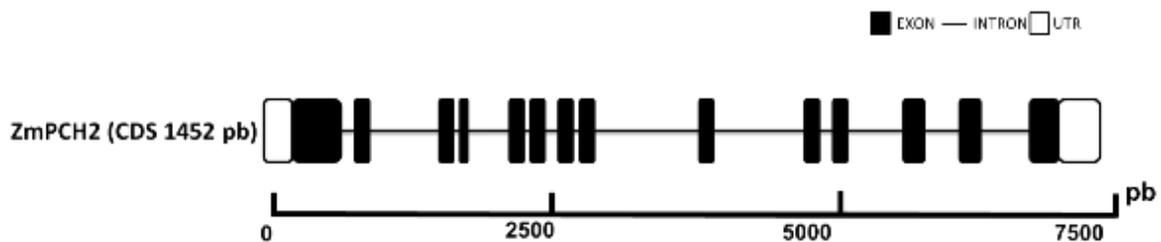


Figura 17. Mapa del transcrito canónico de ZmPCH2. En blanco se representan los UTR. Los cuadros en negro representan los exones, las líneas negras delgadas representan los intrones.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	MQKLGFPAMKSLDKPRSLGSGANMYSFSNRKPP---DSVSSGFSN	KLTAELVKDQA	56
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	MQKLGFPAMKSFQQLRSLPGSAKYFFSTRPPQ---DSVSSGFSN	KLTAELVKDQA	56
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	MQKLGSLRGLRLEGFRLSAGSTSTAAPKPNPKPSSDIGGSTYGSFAN	KITAELVKQEQA	60
<i>Zea mays</i> ZYP1	--MQKHSGLRSLRLEGFRLSAGSTSTAMKVNPRPSPDTGGISYGSFAN	KITAELVKQEQA	58
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	-----MFWC		4
<hr/>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	AMRTDLELANCKLKKSMHVYALEEKLQNAFNENAKLRVRKKEDEKLRGLRLESKFSSTKT		116
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	AMRTDLELANCKLKKSMHVYALEEKLQSAFNENAKLRVRKKEDEKLRGLRLESKFSSTKT		116
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	SVKTDLEMTHTKLRRAEQINLLLEAKLQAVNENAKLKVKQTEDSKLWQGLDSKVSSTKT		120
<i>Zea mays</i> ZYP1	SVKTDLEMAHVKLRRATFQITITFGKIQOALNFAKLVKQTFDSKLVQGLDSKVSSTKT		118
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	NRLNMLKCEHIKLRRAEQINLLLEAKLQAVNENAKLKVKQTEDSKLWQGLDSKVSSTKT		64
<hr/>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	LCDQLTETLQHLASQVQDAEKDGGFFETKFTSSEAIIDSLNQQMRDMSLRDAAKEEITS		176
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	LCDQLTETLQHLASQVQDAEKDGGFFETKFTSSEAINSLNQQMRDMSLRDAAKEEITS		176
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	LCHQLTETLQQLASQTERAEEDKKFFEEILGKNSKAFEEFNCLLDHSSIKLECAEQMIIS		180
<i>Zea mays</i> ZYP1	LCDQLTETLQQLASQTEQAEEDKKFFEEMLGKNSKALDEFNCLLRDLSTKLEVAEQKIIS		178
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	LCDQLTERLQQLASQTEQAEEDKKFFEEMLGKNSKDLDEFNCLLRDLSTKLEQLSQKIIS		124
<hr/>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	RDKEEELKLEKQKEMFYQTERCGTASLIEKKDAVITKLEASAAERKLNIEINLSQLEK		236
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	RDKEEELKLEKQKEMFYQTERCGTASLIEKKDAVITKLEASAAERKLNIEINLSQLEK		236
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	GKQEMLRKQKEEHDQSYKELQYASDTTIREKNSLIKQLEDSEIQNKARLLVYDSRLEC		240
<i>Zea mays</i> ZYP1	GRQEMLOTKQKEEHDQSYKGLYSNDTTIKEKDSLKQLEGSDDNKSRLIYDLSRLQC		238
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	GRQEMLQIKQKEEHDQSYKERLYSNDTTIKEKDSVIKQLEGSVDENKSRLTCLDSCLQC		184
<hr/>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	VHLELTTKEDEVKDLVSIQEKLEKETSQVLSADNCFEKLVSSEQEVKLDLDELVQYVLAE		296
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	LHLELTTKEDEVHILVSIQEKLEKETSQVLSADNCFEKLVSSEQEVKLDLDELVHVLIAE		296
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	MEQELKLEKEDVCIKLENLASESEKNDLKRNEGTYLVEQKLSKONKELNELLSGFTVK		300
<i>Zea mays</i> ZYP1	MEQELKLEKDDVCIKLGKLNASSESEKNSLELMMKGHILETKKLCQNKDLNELLSSFMVK		298
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	MEQELKLEKDDVCIKLGKLNASSESEKNSLELMMKGHILEIEKLCQNKDLNELLSSFMVK		244
<hr/>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	LTELDKKILTFKEKFDKLSGLYDTHIMLLQKDRDLALDRAQRSDNLQGEFLRVAATKEA		356
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	LTELDKKILTFKEKFDKLSGLYDTHIMLLQKDRDLASDRAQRSDNLQGEFLRVAAEKEA		356
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	VTELDKEHTSISSHVTQLISSFERYDGGVHEEKMLMKSADKFEHLQNYVNLISENNA		360
<i>Zea mays</i> ZYP1	VTELDKEHASMSSHVSRLISSFERFYEMAQEEKMLMARSSKDFEHLQSYVDLISENNA		358
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	VTELDKEHASVSSHVSRLISSFERFYEMAQDEKMLMARPYKDFEHLQSYVDLISENNA		304
<hr/>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	LESAGNELNEKIVELQNDKESLISQLSGLRCSTSQIDKLESEAKGLVSKHDAESAISQ		416
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	LESSGNELSEKIVELQNDKESLISQLSGVRCASQSIDKLEFEAKGLVKNAAETESVISK		416
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	LQTEIEELKSRIEELQKTQEIWMVQHVVEECQVAEDKIRRIESEAEISASNISQLEKVASD		420
<i>Zea mays</i> ZYP1	LKTEIEELKSRLIELQRTQEIWMVQHVVEECQVAEDKIRRIESEAEVSASNTNQLKLAFL		418
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	LKTEIEELKSRLVELQRTQEIWLQHVVEERQVAEDKIRRIESEAEVSASNTNQLKLAFL		364
<hr/>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1a	LKEEMETLLESVKTSEDKKQELSLKLSLEMESEKCEKQLQADAQRQVELETQKESSES		476
<i>Arabidopsis thaliana</i> ZYP1b	LKEEIDTLLESVRTSEDKKKELSKLSLEIESKDKYEKQLQADAQRQVGELETQKESSES		476
<i>Oryza sativa japonica</i> ZEP1	LEGRVQKLEDSRSAENHKQELQKILKLESNDQELLGRVQSVLNEKSNOTESLQGEIAK		480
<i>Zea mays</i> ZYP1	LOGRIQKLEEDSTFAENHKQELQKILKLESNDQELLGOMOSIMEEKSNNAAESIHGIEITK		478
<i>Sorghum bicolor</i> ZEP1	LQGRIQKLEEDSTLAENHKQELQKILKLESNDQELLRGVQSVIMEEKSNNAAETLQGEITK		424

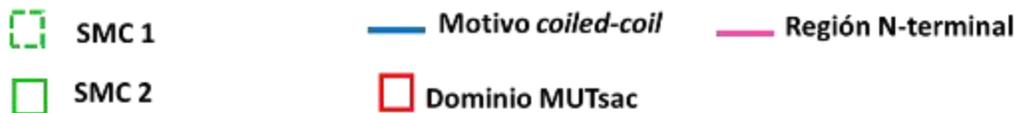
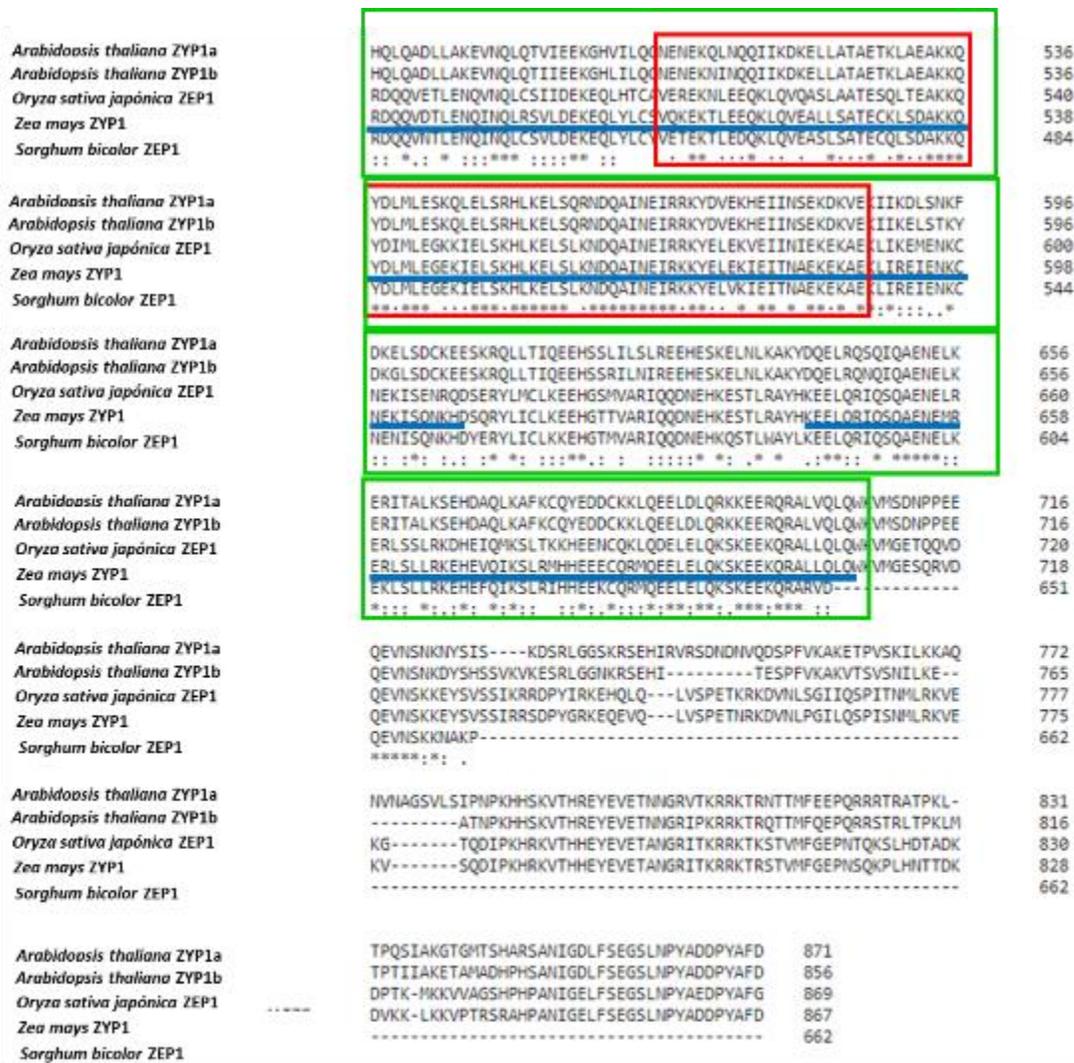


Figura 20. Alineamiento múltiple de los ortólogos de ZmZYP1. La región N-terminal está subrayada con una línea de color rosa. Con los cuadrados verdes se encierran los motivos SMC, el primero con líneas punteadas y el segundo con líneas sólidas. En los cuadros rojos se representa el dominio MUTsac. Los tres motivos *coiled-coil* se representan con líneas azules sólidas.

Análisis de la acumulación de los transcritos para las proteínas del CS en hoja, raíz, inflorescencia masculina e inflorescencia femenina

Se realizaron las PCR de punto final de cada uno de los seis genes utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen a 30,32,35 y 37 ciclos de PCR. Los

resultados de esta amplificación se representan en la Figura 21 y las dos repeticiones técnicas se pueden consultar en el ANEXO 8.

De manera general observamos una expresión diferencial entre los órganos reproductivos y los órganos somáticos. La mayoría de los genes se expresan en órganos somáticos durante los ciclos más tardíos (32 o 35) o bien no se expresan. como ocurre con *ZmPCH2* cuya expresión no se observa en hoja. Aunque sí lo hace en raíz a partir del ciclo 32 y en órganos reproductivos lo hace desde el ciclo 30. El fragmento de *ZmASY1* no pudo ser amplificado en las dos repeticiones biológicas. Su amplificación en el primer experimento nos permitió saber que su expresión ocurre en ciclos tardíos para todos los órganos, tanto somáticos como meióticos, pues su expresión se observa a partir del 35. La expresión de *ZmP31*, es tardía inclusive en los órganos reproductivos, ocurriendo a partir del ciclo 35.

Por otra parte, *ZmZYP1*, presenta una expresión desde el ciclo 30 en la inflorescencia masculina mientras que en la inflorescencia femenina ocurre hasta el ciclo 32. Su expresión en órganos somáticos comienza a partir del ciclo 32. Finalmente, *ZmAFD1*, tiene una expresión diferencial entre órganos meióticos y somáticos. Pues en hoja y raíz se observa su expresión a partir del ciclo 35 mientras que en espiga se observa desde el ciclo 30 y en mazorca a partir del ciclo 32. Todo esto con respecto al gen de referencia (cianato deshidrogenasa) utilizado.

De manera general parece existir una expresión basal en todos los órganos para la mayoría de los genes analizados en este proyecto.

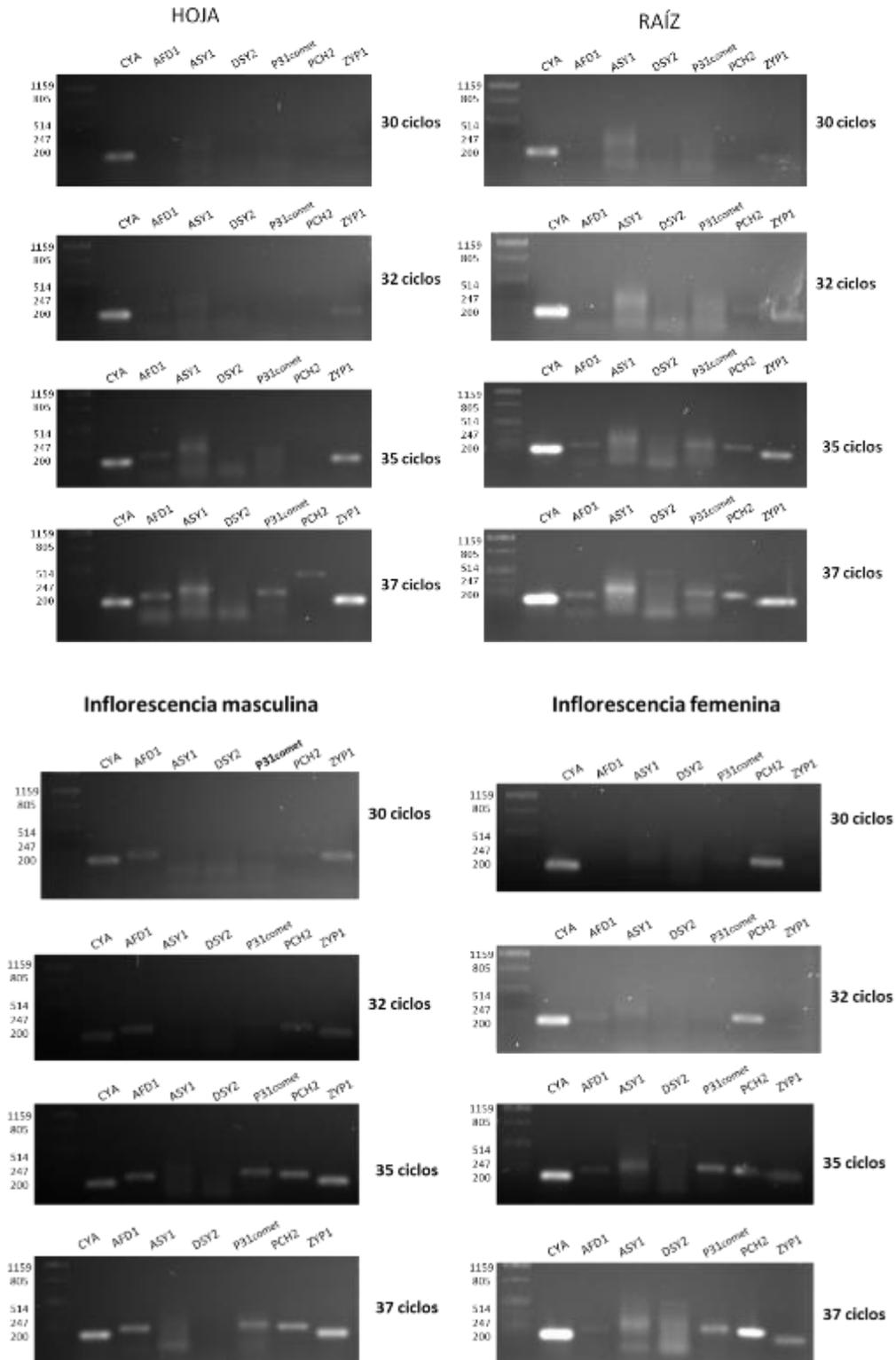


Figura 21. Amplificación del gen de referencia y de los genes *ZmAFD1*, *ZmASY1*, *ZmDSY2*, *ZmP31^{comet}*, *ZmPCH2* y *ZmZYP1* por ciclos (30, 32, 35 y 37 ciclos) y ADNc (hoja, raíz, inflorescencia femenina e inflorescencia masculina) del gen de referencia cianato deshidrogenasa (CYA) (Gel de agarosa al 1% y a 100 mV).

Análisis de la acumulación de los transcritos para las proteínas del CS en maíz por RT-qPCR

Se pudo constatar que la eficacia de amplificación de los transcritos de los genes analizados fue comparable entre ellos. Debido a que su rango de eficiencia se encontraba entre los valores 1.85 y 2.15. Este valor se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal obtenida de la curva estándar realizada con las diluciones descritas previamente.

Como se esperaba de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en el análisis semicuantitativo, podemos observar que la mayoría de los genes tienen una expresión basal en los órganos somáticos. A pesar de que estas proteínas pertenecen a un complejo exclusivo del proceso de la meiosis y no así de la mitosis. Sin embargo, la expresión diferencial en la mayoría de los genes analizados es evidente entre los órganos reproductivos y los órganos somáticos. Como lo demostró el análisis de las diferencias significativas entre órganos con la prueba de Tukey (figura 22).

ZmAFD1 presenta un mayor porcentaje de expresión con respecto a la cianato deshidrogenasa en inflorescencia femenina y masculina (67.8% y 76.3%, respectivamente) a diferencia de hoja y raíz (18.8%, 29.6% respectivamente). Mientras que *ZmASY1* no presentó amplificación en hoja ni raíz y el porcentaje de expresión con respecto a la cianasa fue de 14.5% para inflorescencia masculina y 12.4% para la femenina.

ZmDSY2 presentó porcentajes de expresión bajos en los órganos somáticos (0.7% en hoja y 2.7% en raíz), a diferencia de los órganos con células meióticas cuyo porcentaje de expresión fue mayor (31.8% en inflorescencia masculina y 20.6% en inflorescencia femenina).

ZmP31 presenta también una expresión baja en hoja y raíz (0.03% y 11.5%, respectivamente) a diferencia de la inflorescencia masculina y femenina (13.73 y 17.73%). Mientras que *ZmPCH2* presentó un porcentaje de expresión del 1.09% en hoja y 18.2% en raíz. En los órganos con células en proceso meiótico presentaron el 29.3% y 39.97% en inflorescencia masculina y femenina, respectivamente. En *ZmZYP1* hoja y raíz (3.8% y 9.43%, respectivamente) presentaron un porcentaje de

expresión menor que en los órganos con células meióticas (63.3% inflorescencia masculina y 60.7% inflorescencia femenina).

En *ZmASY1* y *ZmP31* su porcentaje de expresión fue baja en los cuatro órganos. Mientras que *ZmAfD1* y *ZmYP1* presentaron de manera general una mayor expresión en la mayoría de los órganos analizados, pero especialmente en los órganos con células meióticas.

El porcentaje de expresión entre los órganos reproductivos no presentó una diferencia significativa en *ZmASY1*, *ZmP31*, *ZmZYP1*. Mientras que fue mayor en inflorescencia masculina en el caso de *ZmAfD1* y *ZmDSY2*, en comparación de la inflorescencia femenina. En *ZmPCH2* el porcentaje de expresión de la inflorescencia femenina fue significativamente mayor que en la inflorescencia masculina.

Además, se analizó la tasa de expresión entre los diferentes órganos, utilizando los porcentajes de expresión con respecto a la cianato deshidrogenasa. Nosotros distinguimos tres grupos el primero constituido por *ZmASY1* y *ZmDSY2*, los cuales presentan las tasas de 14.45 y 14.98 de expresión diferencial entre los órganos reproductivos y los órganos somáticos. El segundo grupo se compone por *ZmZYP1* con una tasa de 9.34 de expresión diferencial entre órganos reproductivos y somáticos. Finalmente, el tercer grupo compuesto por *ZmP31*, *ZmAfD1* y *ZmPCH2* con tasas de 1.41, 2.97 y 3.6, respectivamente (tabla 17).

Tabla 17. Tasa de expresión diferencial entre órganos. IF= inflorescencia femenina, IM= Inflorescencia masculina, H= hoja, R= raíz.

Transcrito	IF/H	IM/H	IF/R	IM/R	IFIM/HR
<i>ZmAfD1</i>	3.6	4.05	2.29	2.57	2.97
<i>ZmASY1</i>	13.78	16.18	13.77	16.18	14.98
<i>ZmDSY2</i>	22.79	35.05	7.59	11.67	14.45
<i>ZmP31</i>	4.95	3.83	1.59	1.23	1.41
<i>ZmPCH2</i>	36.61	36.61	2.2	1.61	3.6
<i>ZmZYP1</i>	15.8	16.47	6.44	6.71	9.34

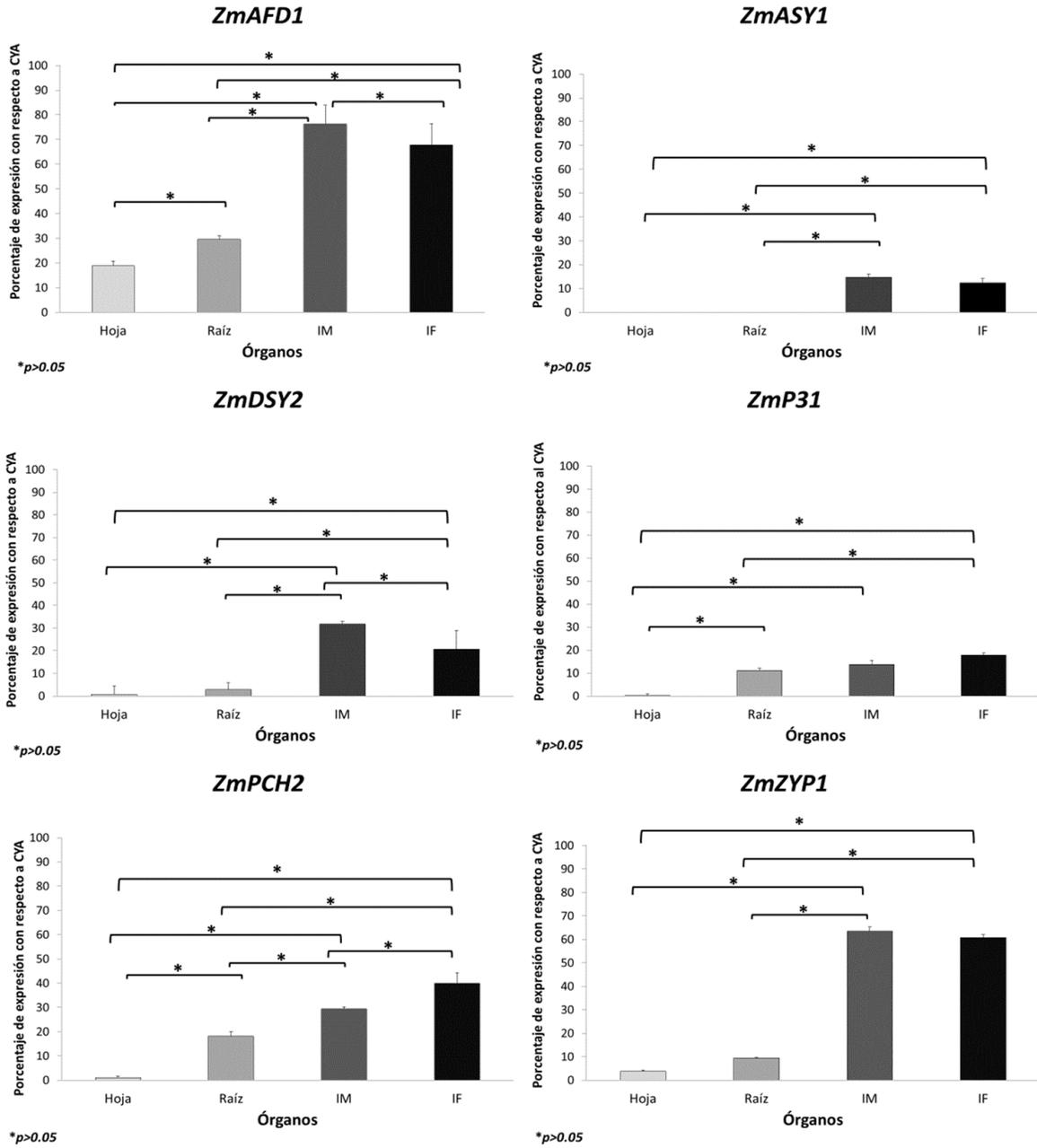


Figura 22. Porcentajes de expresión de cada uno de los genes analizados por medio de RTqPCR con respecto a la cianato deshidrogenasa. Con asterisco se marcan las diferencias significativas obtenidas de la prueba de Tukey.

Construcciones de plásmidos utilizados en el proyecto

Se logró amplificar cuatro de los seis genes con la polimerasa GoTaq (*ZmAfd1*, *ZmASY1*, *ZmP31* y *ZmPCH2*). A excepción de *ZmZYP1*, del cual se logró su amplificación directamente con la polimerasa *Platinum HF*. Al establecer las condiciones de amplificación se procedió a amplificar con la polimerasa *Platinum HF* al resto de los genes. En la figura 23 se pueden observar las imágenes de los fragmentos obtenidos de la amplificación. Para el gen *ZmDSY2* utilizamos una secuencia clonada en el vector pDONR221 donada por el grupo de Rachel Wang (Academia Sinica, Taiwan).

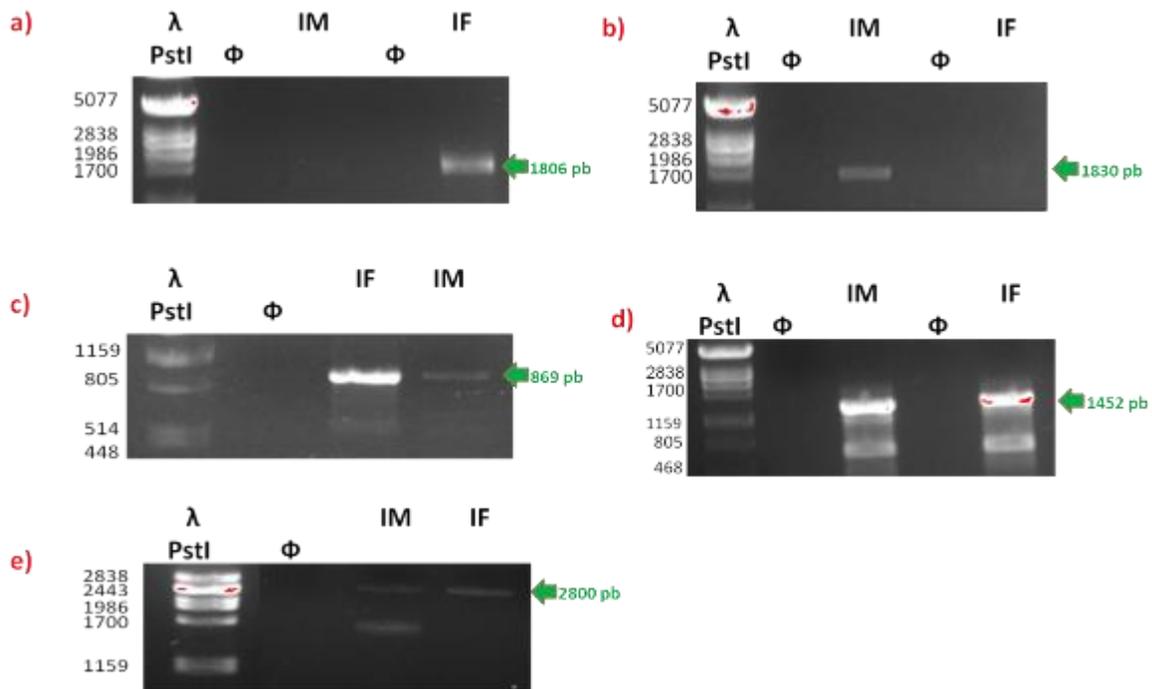


Figura 23. Amplificación de la secuencia codificante completa de a) *ZmAfd1*, b) *ZmASY1*, c) *ZmP31*, d) *ZmPCH2*, e) *ZmZYP1*.

Ligación del producto de PCR con el vector pJET1.2 blunt

Se realizó la ligación con el vector pJET1.2 blunt para los cinco CDS amplificados. Aunque, solo obtuvimos colonias con la construcción pJET1.2blunt+CDS para los *ZmAfd1*, *ZmP31* y *ZmPCH2*.

Se realizaron en promedio 20 PCR en colonia por gen con el fin de corroborar la correcta inserción de los CDS en el vector pJET1.2-blunt. En la figura 24 se observa el resultado de una PCR en colonia de pJET1.2-ZmP31. El fragmento esperado para corroborar un resultado positivo es de 593 pb para el transcrito de *ZmP31B* y de 524 pb para el transcrito *ZmP31A*. En ese momento observamos una diferencia en el tamaño del fragmento amplificado por medio de la PCR en colonia. Y comenzamos a sospechar que habíamos obtenido colonias que contenían uno u otro transcrito de *ZmP31*.

Seleccionamos en promedio 10 colonias de cada construcción que contenían los fragmentos esperados para cada gen y que presentaban una mayor intensidad de banda.

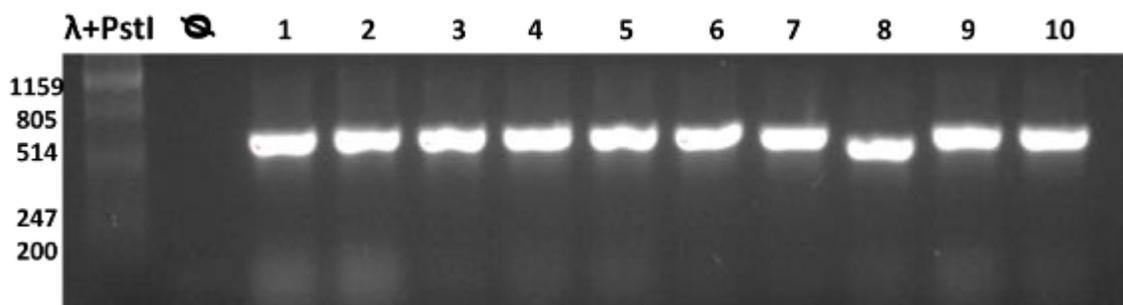


Figura 24. PCR en colonia de las colonias seleccionadas para pJET1.2+ZmP31. Se utilizó el primer pJET1.2-Forward y AR553. El fragmento esperado es de 593 pb para el transcrito *ZmP31B* y de 524 pb para el transcrito *ZmP31A*. Como se puede apreciar en la imagen la colonia 8 presenta un tamaño menor con respecto al resto de las colonias.

Se realizaron minipreparaciones de *ZmAFD1*, *ZmPCH2* y *ZmP31*. De las cuales únicamente se seleccionaron aquellas cuya absorbancia 260/280 y 260/230 tuviera valores cercanos a 2. Y cuya cuantificación fuera lo suficientemente alta para poder tener el volumen suficiente para los siguientes procedimientos. De cada construcción se mandaron a secuenciar dos plásmidos. Eligiendo aquel que no tuviera mutaciones o las mutaciones que presentó no afectan a la estructura general de la proteína.

Obtuvimos un plásmido con estas características para los genes *ZmAFD1*, *ZmPCH2*. Mientras que para *ZmP31* pudimos obtener las dos isoformas que

habíamos descrito en el análisis bioinformático. En este caso se utilizaron las dos isoformas para la clonación Gateway.

El resultado de la secuenciación nos permitió reconocer que efectivamente habíamos obtenido la clonación en el vector pJET1.2-blunt de los CDS de *ZmAFD1*, *ZmPCH2* y de los dos transcritos de *ZmP31*, seleccionamos solo aquellas construcciones en las que no observamos ningún error en la secuencia. En la figura 25 se muestra un fragmento del alineamiento con el resultado de dos construcciones de pJET1.2+ZmP31 y confirmamos la clonación de los dos transcritos de ZmP31.

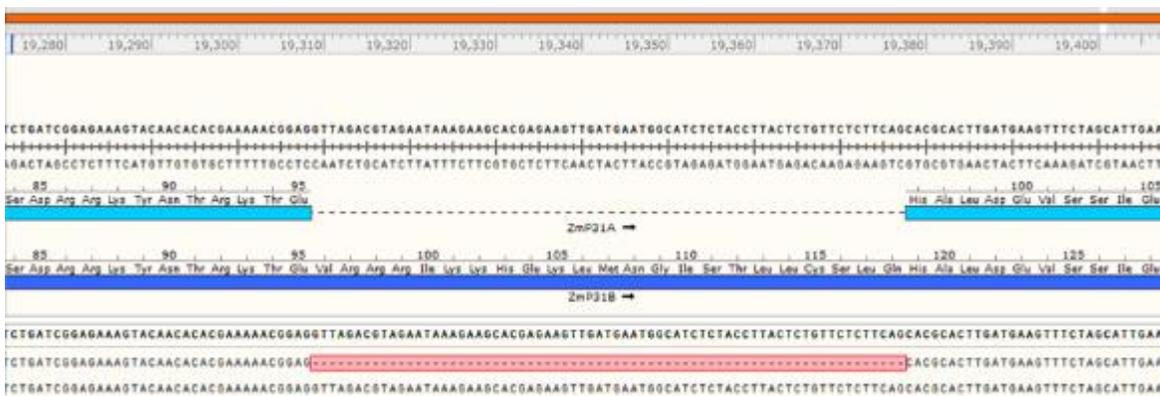


Figura 25. Fragmento del alineamiento de los resultados de secuenciación de pJET1.2+ZmP31. Se observa que ambos transcritos fueron clonados, así como la retención del tercer intrón en *ZmP31B*.

Se amplificaron con los oligonucleótidos *attb* de las construcciones: pJET1.2-blunt+ZmAFD1, pJET1.2-blunt+ZmPCH2, pJET1.2-blunt+ZmP31A y pJET1.2-blunt+ZmP31B. Después de la clonación BP con los fragmentos obtenidos de esta amplificación, obtuvimos los pDONOR+CDS de los cuatro CDS obtenidos. Y de cada uno, obtuvimos construcciones que no presentaban ningún error en su secuencia. Estos fueron utilizados para realizar la clonación LR realizándola además para pDONOR-ZmDSY2. En la tabla 18 se resumen las construcciones obtenidas a lo largo del proyecto.

Tabla 18. Construcciones obtenidas a lo largo del proyecto

CDS	Amplificación	pJET1.2-blunt	pDONOR221	pGADT7GW	pGBKT7GW
ZmAFD1	✓	✓	✓	✓	✓
ZmASY1	✓	X	X	X	X
ZmDSY2	N/A	N/A	✓	✓	✓
ZmP31A	✓	✓	✓	✓	✓
ZmP31B	✓	✓	✓	✓	✓
ZmPCH2	✓	✓	✓	✓	✓
ZmZYP1	✓	X	X	X	X

Interacción de los componentes del CS por medio del ensayo de dos híbridos en levadura

Utilizamos los medios SD/-L y SD/-W para comprobar que la co-transformación se llevó a cabo de manera correcta. En el caso de las tres repeticiones técnicas se obtuvo crecimiento en estos dos medios para las 27 co-transformaciones, así como en el medio SD/-L/-W (DDO), comprobando de esta manera que la co-transformación fue exitosa.

Ninguno de los plásmidos utilizados presento una actividad de autoactivación. Los controles tanto negativo (pGADT7+pGBKT7-LAM) como positivo (pGADT7+pGBKT7-p53) crecieron de manera esperada en los medios selectivos. Es decir, ambos crecieron en SD/-L, SD/-W y DDO. Pero solamente el control positivo creció en medio SD/-L/-W/X/AbA (DDO/X/A), SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (QDO) y SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X/AbA (QDO/X/AbA).

Las cotransformaciones en levadura que presentaron un crecimiento en el medio QDO se consideraron como interactuantes como se había descrito previamente en otros trabajos donde se evaluó la interacción de los componentes del eje cromosómico en otros organismos (Ferdous *et al.*, 2012). Por lo tanto, observamos autointeracciones para ZmDSY2, ZmPCH2 y ZmP31B, pero no para ZmP31A. Además de estas interacciones la autointeracción de ZmPCH2 también se presentó en el medio selectivo más restrictivo: QDO/X/AbA, por lo que presenta una interacción más fuerte que las otras dos (Figuras 26 y 27).

En medio QDO también se distinguieron la interacción de ZmAFD1 con ZmDSY2, pero sólo cuando se trataba de la co-transformación pGBKT7GW-ZmDSY2+pGADT7GW-ZmAFD1, pero no en dirección opuesta (pGBKT7GW-ZmAFD1+pGADT7GW-ZmDSY2). Esta interacción se pudo observar en el medio más restrictivo QDO/X/AbA (figura 28) Las interacciones con ZmAFD1 resultan novedosas, pues no habían sido exploradas anteriormente ni en maíz ni en ningún otro organismo, al menos por medio del ensayo de dos híbridos.

P31A puede interactuar con P31B (pGADT7GW-ZmP31B + pGBKT7GW-ZmP31A) pero no al revés (pGADT7GW-ZmP31A + pGBKT7GW-ZmP31B). Este resultado es novedoso, pues no se ha descrito aún la presencia de otra isoforma de P31 en algún otro organismo.

Ji y colaboradores en 2016 habían descrito la interacción de OsP31 con OsCRC1, el ortólogo en arroz de ZmPCH2. En maíz, nosotros pudimos obtener los dos transcritos de *ZmP31* y observamos por medio del ensayo de dos híbridos que las isoformas codificadas por ambos transcritos interactúan con ZmPCH2 (pGBKT7GW-ZmPCH2 + pGADT7GW-ZmP31A y pGBKT7GW-ZmPCH2 + pGADT7GW-ZmP31B). Tanto la isoforma B que es la más parecida a OsP31 como la isoforma A, la cual carece de uno de los motivos *coiled-coil* presentes en OsP31. Aunque la interacción no es recíproca (pGBKT7GW-ZmP31A + pGADT7GW-ZmPCH2 y pGBKT7GW-ZmP31B + pGADT7GW-ZmPCH2).

Las dos isoformas de ZmP31 pueden interactuar con ZmDSY2 (pGBKT7GW-ZmDSY2 + pGADT7GW-ZmP31A y pGBKT7GW-ZmDSY2 + pGADT7GW-ZmP31B), pero no de manera recíproca (pGBKT7GW-ZmP31A + pGADT7GW-ZmDSY2 y pGBKT7GW-ZmP31B+pGADT7GW-ZmDSY2). Esta interacción también es novedosa.

ZmAFD1 interactúa con ZmP31B (pGBKT7GW-ZmP31B + pGADT7GW-ZmAFD1) pero no lo hace con ZmP31A (pGBKT7GW-ZmP31A + pGADT7GW-ZmAFD1). La interacción entre ZmAFD1 y ZmP31B se observó en el medio más restrictivo (QDO/X/AbA), lo que nos indicaría una interacción más fuerte que las observadas

solamente en QDO. Aunque ZmPCH2 no interactúa directamente con ZmAFD1 (pGBKT7GW-ZmPCH2 + pGADT7GW-ZmAFD1, pGBKT7GW-ZmAFD1 + pGADT7GW-ZmPCH2) ni con ZmDSY2 (pGBKT7GW-ZmPCH2 + pGADT7GW-ZmDSY2, pGBKT7GW-ZmDSY2 + pGADT7GW-ZmPCH2), parecen estar formando un complejo vía ZmP31B. En la figura 29 se representan las interacciones de los componentes del CS en maíz observadas en este proyecto. En la tabla 19 se resumen las interacciones observadas en las tres repeticiones técnicas del ensayo de dos híbridos en levadura.

Tabla 19. Resumen de las interacciones observadas en las tres repeticiones técnicas del ensayo de dos híbridos. Con los signos + se representan interacciones positivas observadas en el medio QDO.

		BD (pGBKT7GW)				
		AFD1	DSY2	P31A	P31B	PCH2
AD (pGADT7GW)	AFD1	---	+++	---	+++	---
	DSY2	---	+++	---	---	---
	P31A	---	+++	---	---	+++
	P31B	---	+++	+++	+++	+++
	PCH2	---	---	---	---	+++

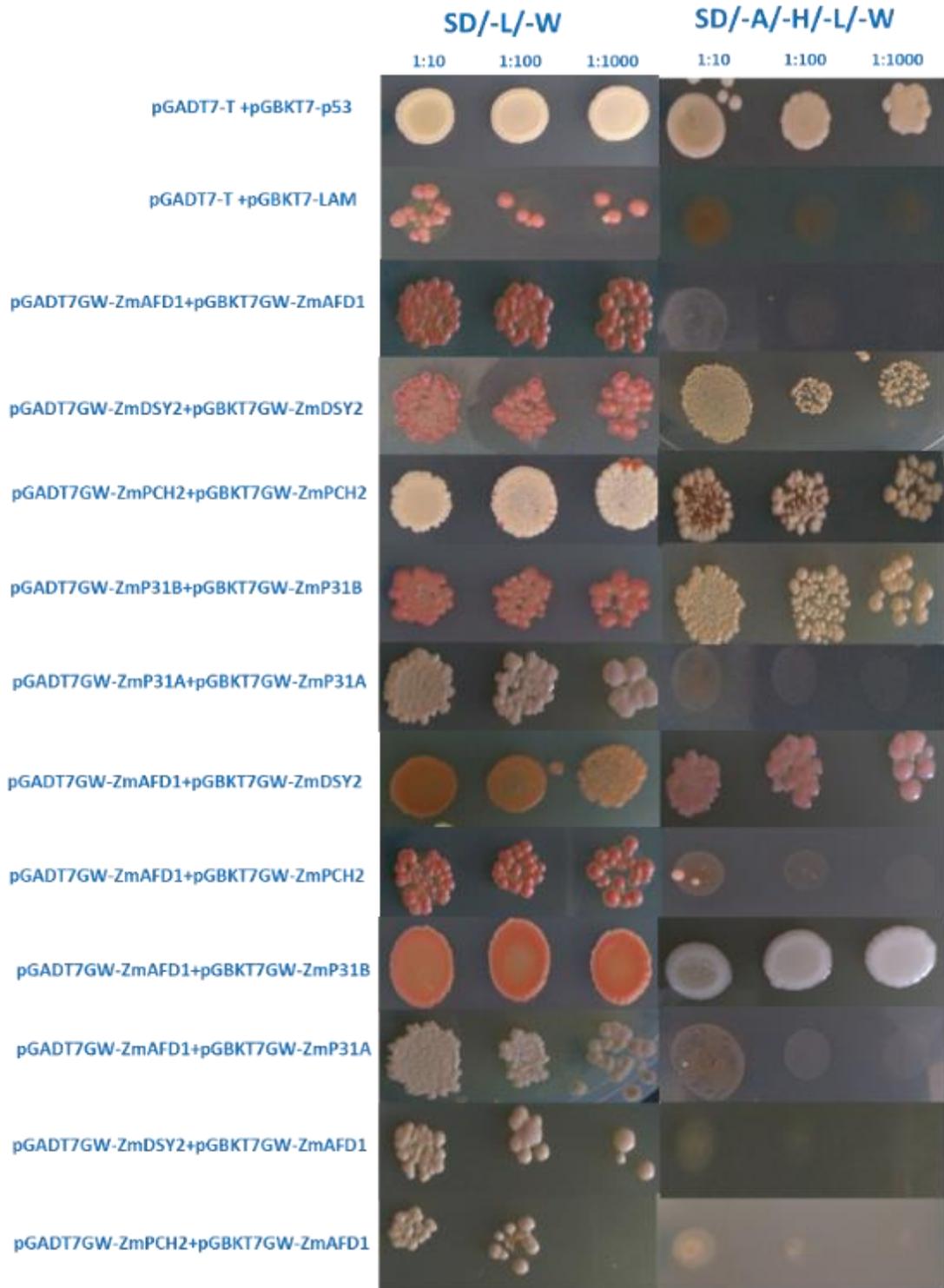


Figura 26. Resultados del experimento del ensayo de dos híbridos en levadura



Figura 26 (continuación) Resultados del experimento del ensayo de dos híbridos en levadura

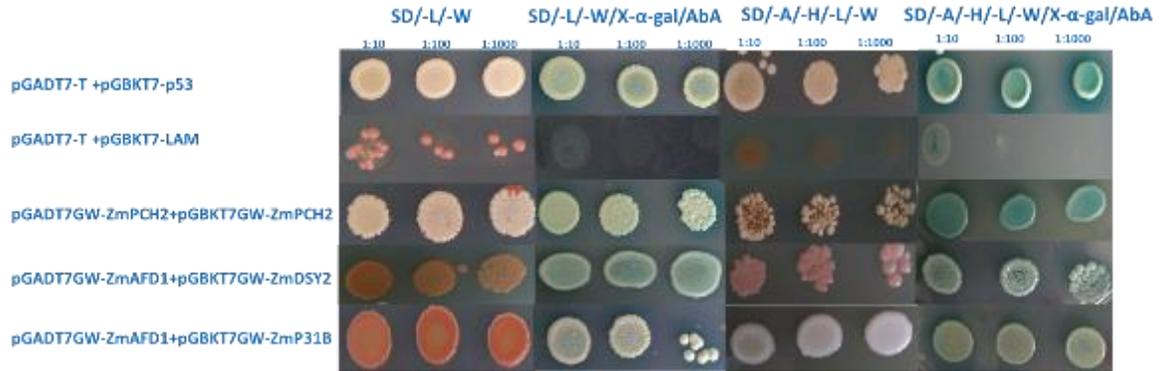


Figura 27. Resultados de las interacciones observadas en los medios más restrictivos (DDO/X/AbA y QDO/X/AbA).

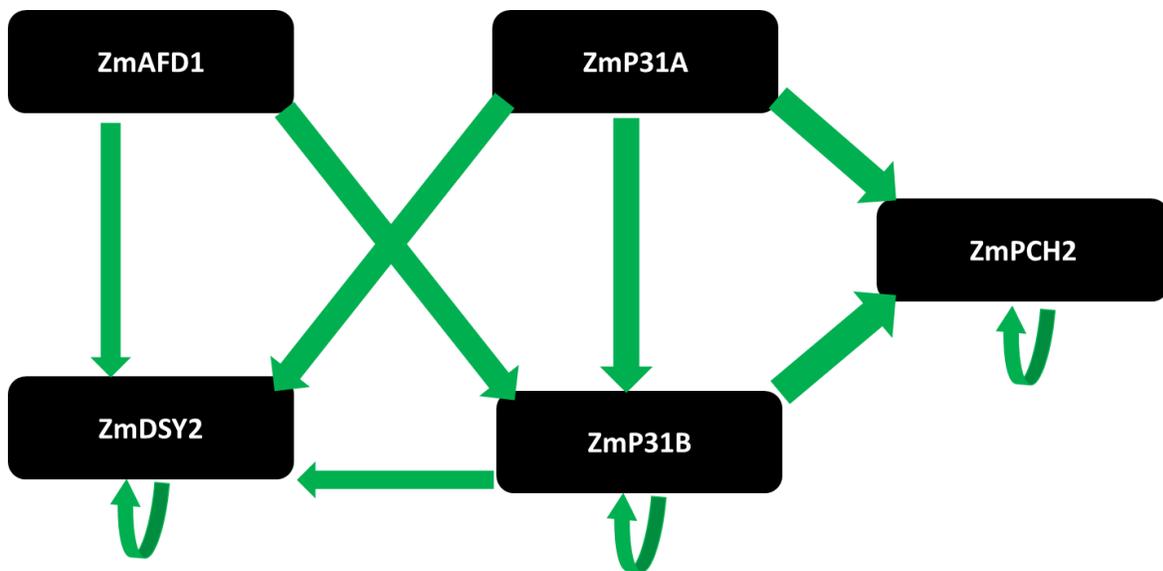


Figura 28. Interacciones de los componentes del CS observadas en este proyecto por medio del ensayo de dos híbridos en levadura.

En el ANEXO 9 se pueden revisar las tres repeticiones técnicas del ensayo de dos híbridos.

Discusión

Expresión de los genes de los componentes del CS en maíz

Hemos comparado la cantidad de transcritos de los componentes del CS (*ZmAfd1*, *ZmASY1*, *ZmDSY2*, *ZmP31*, *ZmPCH2* y *ZmZYP1*) con respecto a la cianato deshidrogenasa por medio de una RT-PCR y una RT-qPCR en órganos somáticos y en órganos meióticos. Golubovskaya y colaboradores (2006) realizaron un análisis de expresión de *ZmAfd1* por medio de RT-qPCR, y llegaron a la conclusión de que este gen no se expresa exclusivamente en el proceso meiótico, puesto que se había observado una expresión basal baja en hoja y en raíz (Golubovskaya *et al.*, 2006), al igual que los resultados de nuestro trabajo. Detectamos la expresión de *ZmAfd1* en hojas y en menor medida en raíces. Además, como se demostró también en este trabajo, *ZmAfd1* tiene una mayor expresión en inflorescencia masculina y femenina, con respecto a los órganos somáticos. Y su porcentaje de expresión fue significativamente mayor en la inflorescencia masculina en comparación a la inflorescencia femenina.

En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado el gen *SYN1* que presenta dos transcritos alternativos. Estos transcritos codifican para dos proteínas de 627 aa y 617 aa, respectivamente (Bai *et al.*, 1999). Ambos transcritos presentan una gran similitud en la parte que codifica para la región amino terminal de la proteína, mientras que la parte carboxilo terminal de las proteínas respectivas difieren claramente entre una y otra. El transcrito más largo de ellos se acumula en bajos niveles en la mayoría de los tejidos, mientras que el más corto sólo se acumula en tejidos meióticos, muy parecido a lo que ocurre con las proteínas pertenecientes a la familia RAD21/Rec8 en levadura (Bai *et al.*, 1999; Cai y Makaroff; 2001). Por lo que alguno de los cuatro transcritos de *ZmAfd1* podría estar expresándose también en órganos somáticos ya que la actividad de los complejos de cohesinas son esenciales tanto en meiosis como en mitosis. Sin embargo, nosotros no pudimos observar alguna diferencia en la expresión de los cuatro transcritos de *ZmAfd1*. Esto debido a su amplia similitud y al diseño de los oligonucleótidos, el cual no permitía la diferenciación entre transcritos.

Observamos una acumulación diferencial de los transcritos para ZmAFD1 ya que se detectó una mayor acumulación de éstos en órganos con células meióticas en comparación a la detectada en órganos somáticos. Por otra parte, se ha observado que la distribución de las cohesinas a lo largo de los cromosomas se concentra en ciertas regiones que requieren cambios epigenéticos para que ocurra la acumulación de Rec8. Por ejemplo, en *S. pombe* se ha observado un enriquecimiento centromérico de cohesinas; además, para que ocurra la acumulación de Rec8 se requiere también de la proteína de heterocromatina Swi6 y la metilación de H3K9 (Bernard *et al.* 2001; Nonaka *et al.* 2002; Mizuguchi *et al.* 2014), lo que indica una conexión directa entre las marcas epigenéticas heterocromáticas y el reclutamiento de cohesina (Lambing *et al.*, 2019).

La acumulación del transcrito de *ASY1* en los órganos vegetativos y meióticos de *A. thaliana* es baja con respecto al gen de referencia utilizado (cianato deshidrogenasa), lo cual había sido previamente reportado (Caryl *et al.*, 1999). En arroz y ratón, los transcritos para *OsPAIR2* y *Hormad1*, respectivamente, se acumulan más en órganos reproductivos que en órganos vegetativos (Nonomura *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010). En levadura, la acumulación del transcrito para este gen, *ScHOP1*, se limita a células de esporulación, por lo cual se sugiere que este patrón de acumulación es el resultado de una regulación transcripcional (Nonomura *et al.*, 2006).

Nosotros observamos, la expresión de ZmASY1 en órganos con alto contenido de células meióticas (inflorescencia femenina y masculina), pero no así en órganos somáticos (raíz y hoja). Además, la acumulación de este transcrito inclusive en órganos reproductivos es muy baja de acuerdo a los datos obtenidos por PCR semicuantitativa y por la RT-qPCR (figuras 22 y 23). Esto podría deberse a una participación controlada en la formación del CS, que solo ocurre durante un periodo breve en la meiosis I, por lo que sería interesante conocer los patrones de su expresión en diferentes estadios de la meiosis.

En *Arabidopsis* se había demostrado la ausencia de actividad de AtASY1 por medio de inmunolocalización y por experimentos tipo *western-blot*. Estos datos

demonstraron que la expresión de esta proteína está restringida a las células meióticas (Armstrong *et al.*, 2002). En maíz aún falta conocer su expresión a nivel proteico.

En *Arabidopsis thaliana* *ASY3*, el ortólogo de *ZmDSY2*, tiene un patrón de acumulación exclusivo de órganos meióticos, por lo que se ha sugerido su participación en la etapa reproductiva o de crecimiento (Ferdous *et al.*, 2012). En maíz se había identificado la expresión de *ZmDSY2* en anteras (Lee *et al.*, 2015). En este trabajo observamos que la acumulación del transcrito para *ZmDSY2* es baja en órganos somáticos, especialmente en hoja, mientras que tiene una mayor acumulación en los órganos que contienen células meióticas. Además, observamos una diferencia significativa en la acumulación de este transcrito en la inflorescencia femenina en comparación de la inflorescencia masculina. Siendo esta última la que presentaba un mayor porcentaje de acumulación del transcrito.

En arroz, *P31* presenta una expresión en órganos somáticos, así como en órganos meióticos y en mayor grado en las anteras en proceso meiótico (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). En este trabajo observamos que la acumulación del transcrito *ZmP31* en órganos meióticos (inflorescencias femenina y masculina) es mayor que en órganos somáticos. Por lo tanto, consideramos que, aunque la expresión ocurre tanto en órganos somáticos como meióticos, existe un enriquecimiento en los órganos meióticos. Además, sabemos que *P31* participa en el punto de control del huso en meiosis y mitosis, que ha sido estudiado en modelos murinos (Hagan *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2017). Por lo tanto, se esperaría una expresión transcripcional en órganos que atraviesan por un proceso mitótico o meiótico.

En arroz, *CRC1* se expresa en órganos meióticos y en somáticos como raíces, pero no lo hace en hojas (Miao *et al.*, 2013). En maíz observamos que la acumulación del transcrito *ZmPCH2* ocurre en órganos tanto somáticos como meióticos. Aunque el porcentaje de acumulación es mayor en órganos meióticos a comparación de hoja y raíz. Por lo que se observa un enriquecimiento de *ZmPCH2* en los órganos que poseen células meióticas. Además, la acumulación del transcrito en la inflorescencia femenina es significativamente mayor a la masculina.

En *A. thaliana*, los dos genes que codifican para AtZYP1a y AtZYP1b, se expresan en yemas florales meióticas, pero no en hojas (Higgings *et al.*, 2005). En arroz, OsZEP1 se expresa en órganos meióticos y en un nivel menor en órganos somáticos como hoja y tallo (Wang *et al.*, 2010). En cebada (*Hordeum vulgare*) la expresión de ZYP1 ocurre en órganos reproductivos y en raíces, pero no se expresa en hojas ni tallo (Barakate *et al.*, 2014). En maíz ZmZYP1, se expresa tanto en órganos somáticos como meióticos. Aunque lo hace en menor medida en los órganos somáticos, siendo aún más baja en hoja, al igual que en OsZEP1 y AtZYP1a/AtZYP1b.

Los datos obtenidos hasta ahora sugieren que existe una regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican para las proteínas que forman parte del CS, pues se observa un enriquecimiento en órganos meióticos en comparación con los órganos somáticos en los genes analizados en este proyecto. Sabemos que no existe una relación lineal entre la transcripción de los ARNm y el nivel celular de las proteínas correspondientes. En proteínas meióticas existe evidencia que las modificaciones postraduccionales juegan un papel clave en su función (Osman *et al.*, 2018). Por ejemplo, ScRed1 requiere ser SUMOilado para poder cargarse al eje cromosómico y reclutar a ScHop1 (Cheng *et al.*, 2006; de Carvalho y Colaiacovo, 2006; Bolcun-Filas y Schimenti., 2012); la fosforilación de AtASY1 y AtASY3 es necesaria para que se lleve a cabo su carga en el eje cromosómico (Yang *et al.*, 2019). En otros organismos, la fosforilación de las proteínas del eje cromosómico es importante para regular su actividad durante la meiosis (Rogers *et al.*, 2002; Brar *et al.*, 2006; Carballo *et al.*, 2008; Katis *et al.*, 2010; Fukuda *et al.*, 2012; Penedos *et al.*, 2015; Sakuno y Watanabe, 2015). Recientemente se ha identificado la acción de quinasas como la PLK2 (*Polo like kinase 2*), la cual promueve el desensamblaje del CS al final de la profase I, mediante la fosforilación de las proteínas de los elementos laterales (Harper *et al.*, 2011; Rog *et al.*, 2017). En *Arabidopsis* y *B. oleracea* la instalación de ZYP1 para formar el CS depende del agotamiento del eje cromosómico de ASY1 mediado por PCH2 (Lambing *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2018).

Análisis de las interacciones de los componentes del CS en maíz

El eje cromosómico es muy importante para el mantenimiento y anclaje de los bucles de cromatina durante la profase I meiótica. La microscopía electrónica ha permitido observar la composición estructural general de la formación del eje cromosómico y posteriormente la polimerización del CS. Además, se ha observado que los componentes del CS tienden a ensamblarse en policomplejos ordenados en compartimentos con propiedades cristalinas líquidas. (Page y Hawley, 2004; Rog *et al.*, 2017). Recientemente, Rog y colaboradores (2017) dedujeron que el CS parece tener una estructura en forma de bicapas de cristal líquido esméctico, estructuralmente análogas a las bicapas lipídicas (Rog *et al.*, 2017).

Algunos de los componentes del CS presentan motivos o dominios en su estructura que permiten la auto-interacción o la interacción con otros componentes del complejo. En el CS los motivos *coiled-coil*, parecen ser muy importantes en la autopolimerización o la formación de homopolímeros y heteropolímeros (Bolcun-Filas y Schimenti; 2012). En esta tesis se presenta el análisis de interacción de algunos de los componentes como son ZmDSY2, ZmP31 y ZmZYP1.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los ortólogos de **ZmAFD1** nos permitió determinar que los extremos amino (posiciones 1-110) y carboxilo terminal (posiciones 545-602), donde se ubica la región menos hidrofílica en las proteínas tipo alfa kleisinas, están conservados. Además, se detectó una mayor variabilidad hacia el centro de la secuencia, como se había descrito anteriormente para los alineamientos de la familia RAD21/REC8 en diferentes organismos. En esta familia se observó que el tamaño diferencial es debido a inserciones o deleciones ubicadas en esta región. La parte central es la sección más hidrofílica en todas las proteínas ortólogas; además que en esta región presenta un motivo hélice-giro-hélice, lo que sugiere que esta región juega un papel importante en la unión del complejo de cohesinas a la cromatina (Bai *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2001).

Nosotros logramos amplificar la CDS de ZmAFD1. Los resultados obtenidos mediante Y2H son novedosos en maíz. En este proyecto identificamos interacciones directas con ZmDSY2 y las dos isoformas de ZmP31 (A y B). En A.

thaliana y *S. cerevisiae* se había observado que se requiere de SYN1/Rec8 para la formación de policomplejos de ASY1/ASY3 y Hop1/Red1, respectivamente (Kugou *et al.*, 2009; Panizza *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2015; Lambing *et al.*, 2019). Por lo que nosotros consideramos que ZmAFD1 podría ser esencial para la formación de los complejos de heterodímeros de ZmASY1 y ZmDSY2. Sin embargo, debido a que nosotros no logramos la clonación de ZmASY1 no pudimos evaluar la interacción de ZmAFD1 con ZmASY1. Por lo que sería interesante conocer si la interacción se lleva a cabo solo por medio de ZmDSY2, o si ZmAFD1 también puede interactuar con ZmASY1. En levadura aún no se conoce si Rec8 interactúa directamente con Red1 y/o Hop1 (Sun *et al.*, 2015).

Nosotros identificamos dos transcritos de ZmASY1 con un dominio HORMA en su región N-terminal. El dominio HORMA se encuentra conservado en **ZmASY1** y sus ortólogos en *A. thaliana*, *O. sativa* y *S. bicolor*. El dominio HORMA (nombrado así por encontrarse en las proteínas Hop1, Rev7 y MAD2) se ha observado en una variedad de proteínas que interactúan con cromatina que contiene aductos de ADN, rompimiento de doble cadena y se ha observado que está presente en proteínas que participan en la formación del CS, en la reparación de ADN o en la síntesis de ADN (Caryl *et al.*, 2000; Nonomura *et al.*, 2006). El dominio HORMA es un módulo de interacción proteína-proteína estructuralmente único, con funciones funcionales clave en una serie de vías de señalización eucariotas (Hara *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2017). En hongos se ha observado la presencia de un motivo estructural dedo de zinc en su región central, el cual parece ser importante para la unión al ADN (Hollingsworth *et al.* 1990; Tripathi *et al.* 2007).

El dominio HORMA es importante en el reclutamiento de la proteína al eje cromosómico, así como en su autoensamblaje en complejos homoméricos (Kim *et al.* 2014; Rosenberg y Corbett 2015; Brown *et al.*, 2018). En mamíferos HORMAD1 y HORMAD2 poseen motivos cortos en sus regiones C-terminal que se asocian con los dominios HORMA (Kim *et al.*, 2014; West *et al.*, 2018), de forma equivalente a los motivos de cierre de Hop1 en levadura (Niu *et al.*, 2005; West *et al.*, 2018). Además, en levadura, ScHop1 en su región cercana al dominio HORMA presenta

varios residuos (S/T) Q que representan sitios potenciales de fosforilación por Tel1/ATM-Rad3/Mec1/ATR, los cuales permiten que las proteínas con dominios HORMA puedan actuar como adaptadores estructurales para alguna cinasa de punto de control meiótico (Sanchez-Moran *et al.* 2007; Brown *et al.*, 2018; Osman *et al.* 2018). Sería interesante conocer si ocurre lo mismo en *Zea mays*, además que en esta especie no se ha identificado un dominio de cierre como el localizado en ScHop1.

En la mayoría de los organismos que requieren del CS para llevar a cabo el proceso meiótico, los ortólogos de ZmASY1 regulan su polimerización (West *et al.*, 2018). Además, en *S. pombe* Hop1 presenta una función meiótica importante en la promoción de la formación de RDC y la recombinación entre los cromosomas homólogos (Brown *et al.*, 2018). Por lo que sería interesante conocer las interacciones que tendría esta proteína no solo con los componentes del eje cromosómico en maíz sino también con los componentes del complejo del recombinosoma temprano que incluye a proteínas como SPO11, SKI8 o MTOPVI.

Con respecto a ZmDSY2 pudimos observar la presencia de dos regiones con repeticiones internas desordenadas, las cuales se consideran importantes para el cambio de fase en los cristales líquidos esmécticos. Además del motivo *coiled-coil* altamente conservado en la región C-terminal de la proteína, y que como se ha demostrado anteriormente es la responsable de llevar a cabo la interacción con ZmASY1, en maíz y la de AtASY1 con AtASY3 en *Arabidopsis* y *B. oleracea* (Ferdous *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2018; West *et al.*, 2018). El alineamiento con los ortólogos de ZmDSY2, demuestra una conservación de la región C-terminal, siendo la región amino terminal la menos conservada. Probablemente la conservación de la parte C-terminal se debe a la importancia que tiene esta región para la interacción con otras proteínas y su auto-asociación, que ha sido demostrada en levadura (Hollingsworth y Ponte, 1997; Woltering *et al.*, 2000).

Osman y colaboradores (2018) demostraron que BoASY1 y BoASY3 se fosforilan en diversos sitios, lo que probablemente es importante en la interacción de estas

dos proteínas. Especialmente la fosforilación de AtASY1 es necesaria para su reclutamiento en el eje cromosómico por medio de AtASY3, lo que contrarresta la actividad de AtPCH2 la cual por medio de la AAA-ATPasa induce un cambio conformacional en AtASY1 induciendo su separación del eje (Yang et al., 2019). Recientemente, se ha propuesto que la acción de CDKA-1 podría generar una autopolimerización de ASY1 a lo largo del eje (Yang et al., 2019). Sería interesante conocer si los ortólogos en maíz también presentan este tipo de regulación para la formación del eje cromosómico.

Las proteínas centrales del eje forman ensamblajes en espiral enrollados homotetraméricos (Red1) o heterotetraméricos (SYCP2: SYCP3 y ASY3: ASY4) que se oligomerizan aún más en filamentos de micras de longitud. Por lo tanto, el núcleo del eje del cromosoma meiótico en hongos, mamíferos y plantas comparte una arquitectura molecular común, y probablemente también desempeña papeles conservados en el ensamblaje del eje del cromosoma meiótico y el control de la recombinación (West et al., 2018).

Nosotros observamos por medio del ensayo de dos híbridos que ZmDSY2 presenta una autointeracción, por lo que es muy probable que forme complejos consigo mismo. Identificamos la interacción de ZmAFD1 con ZmDSY2. Además, SYCP3 en *Homo sapiens* parece autoasociarse para formar homohexameros y homotetrámeros por medio de sus motivos *coiled-coil* (Syrjänen et al., 2014; West et al., 2018). Aún faltaría observar que tipo de autoasociaciones presenta su ortólogo en maíz.

Probablemente se requiere que ZmDSY2 interactúe con ZmASY1 y ZmASY4, formando heterómeros los cuales a su vez podrían interactuar con ZmAFD1 a través de ZmDSY2, aunque aún falta probar si es solo a través de esta proteína o si ZmASY1 y ZmASY4 pueden interactuar físicamente con ZmAFD1.

Recientemente se ha identificado una proteína nombrada ASY4 en *A. thaliana* (Osman et al., 2018). Esta nueva proteína conserva el 23.9% de identidad y el 40.1% de similitud con la región carboxilo terminal de AtASY3 (Osman et al., 2018).

Se ha comprobado su interacción directa en AtASY3 y AtASY4 por medio del ensayo de 2YH, por lo que sería interesante conocer si esta interacción se encuentra conservada en maíz (Osman *et al.*, 2018; West *et al.*, 2018). También se ha observado la interacción en *M. musculus* de SYCP2 y SYCP3, ortólogos de AtASY3 y AtASY4, los cuales parecen ser interdependientes para su localización en los ejes (Yuan *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2017; West *et al.*, 2018). En maíz se ha propuesto un ortólogo de AtASY4. Sería interesante conocer el patrón de interacción entre ZmDSY2 y ZmASY4, puesto que no todas las interacciones están conservadas entre las especies.

En este proyecto se identificaron dos isoformas de ZmP31, un resultado completamente novedoso. Pues hasta el momento no se había descrito la presencia de otra isoforma P31 en alguna otra especie. Además, logramos su amplificación y clonación por lo que pudimos observar por medio del ensayo de dos híbridos la interacción de las dos isoformas de ZmP31 con otros componentes del CS en maíz. Y nos permitió probar una de las hipótesis de este proyecto, comparar la interacción de diferentes isoformas de una misma proteína. En este caso ZmP31B presenta la retención del tercer intrón añadiendo 69 pb a su CDS, presenta los dos motivos *coiled-coil* observados en los ortólogos de P31, así como el dominio Omph completo. Por tanto, la isoforma B presenta una mayor similitud con los ortólogos de P31 en *O. sativa*, *A. thaliana* y *S. bicolor*. En el caso de ZmP31A la falta de los 69 pb trunca el segundo motivo *coiled-coil* y el dominio Omph. Se ha informado que las proteínas que contienen El dominio Omph, conservado en ZmP31B, pueden desempeñar funciones como catalizadores de plegamiento de proteínas o como chaperonas (Missiakas *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2017). Mientras que los motivos *coiled-coil* juegan un papel importante en la mediación de la oligomerización de subunidades en muchas proteínas (Mason y Arndt, 2004; Zhou *et al.*, 2017).

Mediante el ensayo de Y2H observamos interacciones distintas entre las dos isoformas de ZmP31. Primero, ZmP31B es capaz de interactuar consigo mismo. Mientras que ZmP31A no lo es. Creemos que esto se debe a la ausencia de uno de

los dominios *coiled-coil* en ZmP31A. Por otra parte, ZmP31A es capaz de interactuar con ZmP31B, pero no al revés. Ambas isoformas pueden interactuar con ZmDSY2 y con ZmPCH2. CRC1, ortólogo de PCH2 en arroz interactúa con OsP31, pero hasta el momento no se ha observado otra isoforma de P31 en esta especie (Ji *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017).

Nosotros observamos que ZmAFD1 puede interactuar con ZmP31B, mientras que no lo puede hacer con ZmP31A. Lo cual es un resultado novedoso. Probablemente la diferencia entre las interacciones observadas sea debido al truncamiento del dominio Omph y la pérdida del segundo motivo *coiled-coil* en ZmP31-A. Aunque en el caso de las interacciones conservadas en ambas isoformas el primer motivo *coiled-coil* conservado en ZmP31A y ZmP31B podría ser suficiente para llevar a cabo las interacciones con ZmDSY2 y ZmPCH2.

La interacción de P31 con el ortólogo de PCH2 (TRIP13) había sido observada durante el proceso mitótico en el punto de control del ensamblaje del huso. TRIP13 reconoce a MAD2 con la ayuda de P31, su interacción ocurre por medio del dominio N-terminal de TRIP13. Mientras que TRIP13 despliega a MAD2 en presencia de ATP (Ye *et al.*, 2017). Se sabe que tanto ASY1 como MAD2 presentan motivos de cierre cercanos al dominio HORMA. Cuando estos motivos de cierre son truncados, la unión de PCH2 se afecta, en ambos casos. Es decir, MAD2 no presentará un cambio conformacional por lo que no puede separarse del eje cromosómico y produce un arresto en el progreso de la mitosis (o meiosis). Mientras que ASY1 no puede ser desmantelado del eje cromosómico (Lambing *et al.*, 2015; Vader, 2015; Ye *et al.*, 2017). Esta remodelación del eje mediada por TRIP13 probablemente forma la base de una vía de retroalimentación que regula la recombinación y asegura la fidelidad del emparejamiento de homólogos durante la meiosis (Wojtasz *et al.*, 2009, Keeney *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2017). Probablemente ZmP31B esté involucrado en el reconocimiento y la eliminación de las proteínas de la familia HORMA, como ocurre en mamíferos y probablemente en arroz (Ji *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2017).

Tanto ZmDSY2 como ZmAFD1 forman parte de los ELs del CS, ZmPCH2 forma parte del EC del CS en maíz. Mientras que ZmP31 es parte del ET del CS, por lo que tiene sentido considerar que ZmP31 podría formar una especie de puente al interactuar tanto con componentes de los ELs como con el EC.

ZmPCH2 presenta un dominio AAA-ATPasa, el cual se encuentra conservado en sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. En arroz, se ha comprobado la interacción por medio del dominio AAA-ATPasa con el dominio HORMA de PAIR2, el ortólogo de ZmASY1 (Lambing *et al.*, 2015). Las AAA-ATPasas han sido asociadas con diversas actividades celulares (Hanson y Whiteheart, 2005). Son hidrolasas compuestas de múltiples unidades, regularmente hexaméricas, las cuales actúan como máquinas moleculares que, al alterar la conformación de las macromoléculas blanco, afectando la señalización celular (Vader, 2015). TRIP13 en ratón y Pch2 en levadura, pueden ensamblarse en un homohexámero como otras AAA-ATPasas (Chen *et al.*, 2014; Vader., 2015). Miao y colaboradores (2013) habían observado una auto-interacción de OsCRC1 por medio del ensayo de Y2H. Nosotros también observamos una auto-interacción en ZmPCH2.

A diferencia de *A. thaliana*, especie que presenta dos genes que codifican para ZYP1a y ZYP1b, *Zea mays* presenta un único gen. Golubovskaya y colaboradores (2006) habían descrito un transcrito canónico de ZmZYP1 de 3061 pb que codifica para una proteína de 100.4kDa (867 aa) ortóloga de AtZIP1. La cual presenta una región central rica en motivos *coiled-coil*, flanqueada por dominios globulares (Golubovskaya *et al.*, 2011). Nosotros, identificamos, además, que ZmZYP1 posee dos dominios SMC1 y SMC2, un dominio MUTsac y la región N-terminal, altamente conservada en sus ortólogos.

Al igual que otros componentes del CS (ZmPCH2, ZmDSY2, ZmP31) ZmZYP1 tiene la capacidad de autoensamblarse (Sym y Roeder, 1995; Dong y Roeder, 2000). Probablemente debido a sus motivos *coiled-coil* (Gao y Colaiácovo, 2018). Se ha predicho que dos proteínas podrían enrollarse alrededor de un eje común para formar un dímero extendido en forma de barra (Dong y Roeder, 2000). De tal forma

que su dominio N-terminal se localiza en el EC del CS, mientras que el dominio C-terminal se encuentra incrustado en un EL (Dong y Roeder, 2000).

El ensamblaje de CS parece ser similar en la mayoría de las especies eucariontes. Primero la asociación de los complejos de cohesina al eje. Posteriormente la incorporación de las proteínas de los ELs DSY2 (asociado a AFD1) la cual recluta a ASY4 y ASY1 (y otras proteínas con dominios HORMA). Así como la asociación de las proteínas del ET (P31, ZYP1) con los complejos de cohesina. Finalmente se requiere la acción de la proteína del EC, la ATPasa PCH2, para fosforilar a ASY1 y de esta manera promover que se disocie del eje. Nosotros pudimos observar la interacción de ZmAFD1 con ZmDSY2 y ZmP31B, con lo que se comprueba esta hipótesis, aunque aún falta corroborar su interacción con ZmASY1 y ZmASY4.

Nosotros creemos que debido a que utilizamos la CDS de cada gen de interés fue difícil observar las interacciones en ambos sentidos. Se sabe que no todas las interacciones pueden ser detectables con proteínas de longitud completa. Esto debido a que pueden que no se plieguen adecuadamente en levadura o porque la proteína de longitud completa podría estar bloqueada en una configuración cerrada, la cual enmascara algunos de los dominios de interacción potenciales (Boxem *et al.* 2008; Reece-Hoyes y Walhout, 2018). Se ha demostrado que los subdominios pueden interactuar mejor que los clones de longitud completa, probablemente reflejando la función del dominio durante el plegamiento de la proteína (Van Criekinge y Beyaert; 1999). Por ello, sugerimos el uso de fragmentos de proteína, al menos los correspondientes con los fragmentos N-terminal y C-terminal de las proteínas aquí analizadas. Con lo que se incrementaría la sensibilidad del sistema de dos híbridos para evaluar las interacciones de los componentes del CS.

En los últimos años se ha investigado más acerca de la relación del eje cromosómico y el proceso de recombinación meiótica. Por lo que se ha analizado la co-localización de proteínas del recombinosoma temprano (SPO11-1, MTOPVIB, PRD1). Por ejemplo, se ha observado una correlación entre las RDC y los niveles de AtSYN1, y se ha propuesto que AtSYN1 pudiese tener un papel fundamental en la organización de la arquitectura cromosómica meiótica y la recombinación

homóloga en *Arabidopsis* y que se había observado previamente en *S. cerevisiae* (Panizza et al., 2011; Sun et al., 2015; Lambing et al., 2019). Recientemente se ha sugerido que las regiones N-terminales de Zip1 en *S. cerevisiae*, son cruciales para su papel durante la sinapsis y la formación de entrecruzamientos, se considera que Zip1 sirve como un enlace, facilitando que se produzcan ambos procesos (Voelkel-Meiman et al., 2019). Al igual que en *S. cerevisiae*, en *C. elegans*, se ha analizado el papel que tienen los componentes del EC del CS para la reparación de RDC del ADN como entrecruzamientos. Lo más probable es que las proteínas SYP (homólogo de ZmZYP1 en *C. elegans*) promueven la formación de CO al promover la localización de factores que promueven los entrecruzamientos dentro de un compartimento del CS (Cahoon et al., 2019). Es necesario que en estudios futuros se analice con más detalle el papel de estos dos complejos meióticos durante procesos de suma importancia como la recombinación meiótica.

Conclusiones

A pesar de que eje cromosómico es una estructura exclusiva del proceso meiótico. Nosotros observamos un enriquecimiento en el porcentaje de expresión de los seis genes analizados en este proyecto en órganos meióticos.

En este proyecto identificamos dos isoformas de la proteína ZmP31^{comet} en *Zea mays*: ZmP31A y ZmP31B, ZmP31B proviene de un *splicing* alternativo de retención del tercer intrón de *ZmP31*, cuya transcripción no genera un codón de paro prematuro. Este resultado es novedoso, pues hasta el momento no se ha reportado la existencia de isoformas de esta proteína en otras especies. Además, nosotros pudimos observar un patrón de interacción directa distinto entre las dos isoformas mediante el ensayo de dos híbridos en levadura. Debido a que ZmP31B puede autointeractuar, mientras que ZmP31A no. Por otra parte, ZmP31B interactúa con ZmAFD1, mientras que ZmP31A no lo hace. Sin embargo, estas dos isoformas también presentan interacciones compartidas con ZmDSY2 y ZmPCH2, además de interactuar entre ellas. Otra interacción novedosa observada fue la de ZmAFD1 con ZmDSY2. Además de ZmP31B, ZmDSY2 y ZmPCH2 también autointeractúan. Por lo que creemos que como lo hacen sus ortólogos en *S. cerevisiae* y *M. musculus*, estas proteínas podrían formar dímeros para llevar a cabo su función dentro del CS.

Finalmente, nosotros no observamos una interacción directa entre ZmAFD1, ZmDSY2 y ZmPCH2. Sin embargo, consideramos que ZmP31B juega un papel primordial como enlace entre los ELs (ZmAFD1, ZmDSY2) y el EC (ZmPCH2) del CS en maíz.

Perspectivas

Proponemos realizar un análisis de las interacciones observadas en este proyecto en otro sistema de evaluación de interacciones de proteínas como BiFC. Además, consideramos interesante que se explore la interacción de las proteínas del CS considerando su composición en cuanto a dominios y la actividad que estos pudieran tener. Es decir, realizar construcciones de la región N-terminal y C-terminal de cada proteína analizada y evaluar sus interacción con el resto de los componentes del CS en maíz.

Además, sugerimos el análisis de las proteínas homólogas del CS en maíz que recientemente han sido descritas en otros organismos como AtASY4 en *Arabidopsis thaliana*, y de la cual se sabe existe un ortólogo en maíz.

Además, creemos necesario un análisis a detalle de la relación entre los componentes del eje cromosómico y los componentes del complejo de recombinación meiótica.

Referencias

- Armstrong, S., A. Caryl, G. Jones y C. Franklin. (2002). Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *Journal of Cell Science*, 115 (18): 3645-3655.
- Bai, X., B. Peirson, F. Dong, C. Xue y C. Makaroff. (1999). Isolation and characterization of SYN1, a RAD21-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 11: 417-430.
- Barakate, A., Higgins, J. D., Vivera, S., Stephens, J., Perry, R. M., Ramsay, L., ... & Armstrong, S. J. (2014). The synaptonemal complex protein ZYP1 is required for imposition of meiotic crossovers in barley. *The Plant Cell*, 26(2), 729-740.
- Bernard, P., Maure, J. F., & Javerzat, J. P. (2001). Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nature Cell Biology*, 3(5), 522.
- Bhatt, A., C. Lister, T. Page, P. Fransz, K. Findlay, G. Jones, H. Dickinson y C. Dean. (1999). The DIF1 gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family. *The Plant Journal*, 19 (4): 463-472.
- Boden, S. A., Shadiac, N., Tucker, E. J., Langridge, P., y Able, J. A. (2007). Expression and functional analysis of TaASY1 during meiosis of bread wheat (*Triticum aestivum*). *BMC Molecular Biology*, 8(1), 65.
- Bolcun-Filas, E., y Schimenti, J. C. (2012). Genetics of meiosis and recombination in mice. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 298, pp. 179-227). Academic Press.
- Borde, V., y de Massy, B. (2015). Meiosis: early DNA double-strand breaks pave the way for inter-homolog repair. *Developmental cell*, 32(6), 663-664.
- Boxem, M., Maliga, Z., Klitgord, N., Li, N., Lemmens, I., Mana, M., Litchtervelde, L., Simonis, N., Devos M., Yildirim M., Cokol M., Kao H., de Smet S., Wang H., Schlaitz, A., Hao T., Milstein, S., Fan, C., Tipsword, M., Drew, K., Galli, M., Rhrissorrakrai, K., Drechsel, D., Koller, K., Roth, F., K. Dunker, R. Bonneau, K. Gunsalus, D. Hill, F. Piano, J. Tavernier, A. Hyman, Vidal, M. (2008). A protein domain-based interactome network for *C. elegans* early embryogenesis. *Cell*, 134(3), 534-545.
- Börner, G. V., Barot, A., y Kleckner, N. (2008). Yeast Pch2 promotes domainal axis organization, timely recombination progression, and arrest of defective recombinosomes during meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), 3327-3332.

- Boxem, M., Maliga, Z., Klitgord, N., Li, N., Lemmens, I., Mana, M., ... y Simonis, N. (2008). A protein domain-based interactome network for *C. elegans* early embryogenesis. *Cell*, 134(3), 534-545.
- Brar, G. A., Kiburz, B. M., Zhang, Y., Kim, J. E., White, F., y Amon, A. (2006). Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature*, 441(7092), 532.
- Brown, S. D., Jarosinska, O. D., y Lorenz, A. (2018). Genetic interactions between the chromosome axis-associated protein Hop1 and homologous recombination determinants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics*, 64(5), 1089-1104.
- Burnham, C., J. Stout, W. Weinheimer, R. Kowles y P. Phillips. (1972). Chromosome pairing in maize. *Genetics*, 71 (1): 111-126.
- Cahoon, C. y S. Hawley. (2016). Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nature structural & molecular biology*, 23 (5): 369-377.
- Cahoon, C., Z. Yu, Y. Wang, F. Guo, J. Unruh, B. Slaughter y S. Hawley. (2017). Superresolution expansion microscopy reveals the three-dimensional organization of the *Drosophila* synaptonemal complex. *PNAS*, E6857-E6866.
- Cahoon, C. K., Helm, J. M., & Libuda, D. E. (2019). Synaptonemal Complex Central Region Proteins Promote Localization of Pro-crossover Factors to Recombination Events During *Caenorhabditis elegans* Meiosis. *Genetics*, 213(2), 395-409.
- Cai, X., F. Dong, R. Edelman y C. Makaroff. (2003). The *Arabidopsis* SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *Journal of Cell Science*, 116 (14): 2999-3007.
- Cai, X., y Makaroff, C. A. (2001). The *dsy10* mutation of *Arabidopsis* results in desynapsis and a general breakdown in meiosis. *Sexual Plant Reproduction*, 14(1-2), 63-67.
- Carlton, P. M., y Cande, W. Z. (2002). Telomeres act autonomously in maize to organize the meiotic bouquet from a semipolarized chromosome orientation. *The Journal of cell biology*, 157(2), 231-242.
- Caryl, A. P., Armstrong, S. J., Jones, G. H., y Franklin, F. C. H. (2000). A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma*, 109(1-2), 62-71.

- Causier, B. y B. Davies. (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology*, 50 (1): 855-870.
- Cande, W. Z., Golubovskaya, I., Wang, C. J. R., & Harher, L. (2009). Meiotic genes and meiosis in maize/Bennetzen JL, Hake S.(eds.) Maize handbook. *Genetics and Genomics–Springer Science, Business Media LLC*, 2, 353-375.
- Chambon, A., West, A., Vezon, D., Horlow, C., De Muyt, A., Chelysheva, L., ... y Franklin, F. C. H. (2018). Identification of ASYNAPTIC4, a component of the meiotic chromosome axis. *Plant physiology*, 178(1), 233-246.
- Chen, C., Jomaa, A., Ortega, J., & Alani, E. E. (2014). Pch2 is a hexameric ring ATPase that remodels the chromosome axis protein Hop1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E44-E53.
- Cheng, C. H., Lo, Y. H., Liang, S. S., Ti, S. C., Lin, F. M., Yeh, C. H., ... y Wang, T. F. (2006). SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 20(15), 2067-2081.
- Choi, K. y I. Henderson. (2015). Meiotic recombination hotspots- a comparative view. *The Plant Journal*, 83 (1): 52-61.
- Colaiácovo, M. P., MacQueen, A. J., Martinez-Perez, E., McDonald, K., Adamo, A., La Volpe, A., y Villeneuve, A. M. (2003). Synaptonemal complex assembly in *C. elegans* is dispensable for loading strand-exchange proteins but critical for proper completion of recombination. *Developmental cell*, 5(3), 463-474.
- Colas, I., Darrier, B., Arrieta, M., Mittmann, S. U., Ramsay, L., Sourdille, P., & Waugh, R. (2017). Observation of extensive chromosome axis remodeling during the “diffuse-phase” of meiosis in large genome cereals. *Frontiers in plant science*, 8, 1235.
- Creighton, Harriet B. and Barbara McClintock. 1931. A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 17: 492–497.
- Dawe, R. K., Sedat, J. W., Agard, D. A., y Cande, W. Z. (1994). Meiotic chromosome pairing in maize is associated with a novel chromatin organization. *Cell*, 76(5), 901-912.
- de Carvalho, C. E., y Colaiácovo, M. P. (2006). SUMO-mediated regulation of synaptonemal complex formation during meiosis. *Genes & development*, 20(15), 1986-1992.
- de los Santos, T., y Hollingsworth, N. M. (1999). Red1p, a MEK1-dependent phosphoprotein that physically interacts with Hop1p during meiosis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1783-1790.

- de Vries, F. A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., ... y Pastink, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes & development*, *19*(11), 1376-1389.
- Deshong, A. J., Alice, L. Y., Lamelza, P., y Bhalla, N. (2014). A quality control mechanism coordinates meiotic prophase events to promote crossover assurance. *PLoS genetics*, *10*(4), e1004291.
- Dong, F., X. Cai y C. Makaroff. (2001). Cloning and characterization of two *Arabidopsis* genes that belong to the RAD21/REC8 family of chromosome cohesion proteins. *Gene*, *271*(1): 99-108.
- Dong, H., & Roeder, G. S. (2000). Organization of the yeast Zip1 protein within the central region of the synaptonemal complex. *The Journal of cell biology*, *148*(3), 417-426.
- Esposito, D., Garvey, L. A., y Chakiath, C. S. (2009). Gateway cloning for protein expression. In *High Throughput Protein Expression and Purification* (pp. 31-54). Humana Press.
- Feng, J., Fu, S., Cao, X., Wu, H., Lu, J., Zeng, M., ... y Shen, Y. (2017). Synaptonemal complex protein 2 (SYCP2) mediates the association of the centromere with the synaptonemal complex. *Protein & cell*, *8*(7), 538-543.
- Ferdous, M., J. Higgins, K. Osman, C. Lambing, E. Roitinger, K. Mechtler, S. Armstrong, R. Perry, M. Pradillo, N. Cuñado y C. Franklin. (2012). Inter-homolog crossing-over and synapsis in *Arabidopsis* meiosis are dependent on the chromosome axis protein AtASY3. *Plos genetics*, *8* (2): 1-15.
- Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, *340*(6230), 245-246.
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, (1), 10-3.
- Franklin, A. E., Golubovskaya, I. N., Bass, H. W., y Cande, W. Z. (2003). Improper chromosome synapsis is associated with elongated RAD51 structures in the maize desynaptic2 mutant. *Chromosoma*, *112*(1), 17-25.
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., y Benavente, R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental cell research*, *318*(12), 1340-1346.

- Fukuda, T., Daniel, K., Wojtasz, L., Toth, A., y Höög, C. (2010). A novel mammalian HORMA domain-containing protein, HORMAD1, preferentially associates with unsynapsed meiotic chromosomes. *Experimental cell research*, 316(2), 158-171.
- Fukuda, T., Pratto, F., Schimenti, J. C., Turner, J. M., Camerini-Otero, R. D., y Höög, C. (2012). Phosphorylation of chromosome core components may serve as axis marks for the status of chromosomal events during mammalian meiosis. *PLoS genetics*, 8(2), e1002485.
- Gao, J., y Colaiácovo, M. P. (2018). Zipping and unzipping: protein modifications regulating synaptonemal complex dynamics. *Trends in Genetics*, 34(3), 232-245.
- Gelei, G. (1921). Weitere Studien über die Oögenese von Dendrocoelum. II. III. *Arch. f. Zell*, 16, 88-169.
- Golubovskaya IN , Mashnenkov AS. Genetic control of meiosis. I. Meiotic mutation in corn (*Zea mays* L.) *afd*, causing the elimination of the first meiotic division , *Genetika (Russ)* , 1975 , vol. 11 (pg. 810 -816
- Golubovskaya, I., O. Hamant, L. Timofejeva, C. J. Wang y D. Braun. (2006). Alleles of *afd1* dissect REC8 functions during meiotic prophase I. *Journal of Cell Science*. 119(1): 3306–3315.
- Golubovskaya, I. N., Wang, C. R., Timofejeva, L., & Cande, W. Z. (2010). Maize meiotic mutants with improper or non-homologous synapsis due to problems in pairing or synaptonemal complex formation. *Journal of experimental botany*, 62(5), 1533-1544.
- Golubovskaya, I., R. Wang, L. Timofejeva y Z. Cande. (2011). Maize meiotic mutants with improper or non-homologous synapsis due to problems in pairing or synaptonemal complex formation. *Journal of Experimental Botany*, 62(5): 1533-1544.
- Hagan, R. S., Manak, M. S., Buch, H. K., Meier, M. G., Meraldi, P., Shah, J. V., ... & Doxsey, S. J. (2011). p31^{comet} acts to ensure timely spindle checkpoint silencing subsequent to kinetochore attachment. *Molecular biology of the cell*, 22(22), 4236-4246.
- Hamant, O., I. Golubovskaya, R. Meeley, E. Fiume, L. Timofejeva, A. Schleiffer, K. Nasmyth y W. Cande. (2005). A REC8-dependent plant shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Current Biology*, 15 (1): 948-954.
- Harper, N. C., Rillo, R., Jover-Gil, S., Assaf, Z. J., Bhalla, N., & Dernburg, A. F. (2011). Pairing centers recruit a Polo-like kinase to orchestrate meiotic chromosome dynamics in *C. elegans*. *Developmental cell*, 21(5), 934-947.
- Hanson, P. I., y Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(7), 519.

- Hashida-Okado, T., Ogawa, A., Endo, M., Yasumoto, R., Takesako, K., & Kato, I. (1996). AUR1, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: a study of defective morphologies in Aur1p-depleted cells. *Molecular and General Genetics MGG*, 251(2), 236-244.
- Higgins, J. D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S. J., Jones, G. H., & Franklin, F. C. H. (2005). The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes & development*, 19(20), 2488-2500.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026.
- Hollingsworth, N. M., & Ponte, L. (1997). Genetic interactions between HOP1, RED1 and MEK1 suggest that MEK1 regulates assembly of axial element components during meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 147(1), 33-42.
- Ishiguro, K. I., Kim, J., Fujiyama-Nakamura, S., Kato, S., & Watanabe, Y. (2011). A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO reports*, 12(3), 267-275.
- Ishiguro, K. I., Kim, J., Shibuya, H., Hernández-Hernández, A., Suzuki, A., Fukagawa, T., ... & Höög, C. (2014). Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes. *Genes & development*, 28(6), 594-607.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., & Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, 8(6), 1693-1696.
- Ji, J., Tang, D., Shen, Y., Xue, Z., Wang, H., Shi, W., ... & Cheng, Z. (2016). P31comet, a member of the synaptonemal complex, participates in meiotic DSB formation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(38), 10577-10582.
- Joshi, N., Barot, A., Jamison, C., & Börner, G. V. (2009). Pch2 links chromosome axis remodeling at future crossover sites and crossover distribution during yeast meiosis. *PLoS genetics*, 5(7), e1000557.
- Joyce, E. F., & McKim, K. S. (2009). *Drosophila* PCH2 is required for a pachytene checkpoint that monitors double-strand-break-independent events leading to meiotic crossover formation. *Genetics*, 181(1), 39-51.
- Kass, L. B., y Chomet, P. (2009). Barbara McClintock. En: *Handbook of Maize* (pp. 17-52). Springer, New York, NY.

- Keeney, S., J. Lange y N. Mohibullah. (2014). Self-organization of meiotic recombination initiation: general principles and molecular pathways. *Annual Review in Genetics*. 48 (1): 187-214.
- Kellogg, E. A., y Birchler, J. A. (1993). Linking phylogeny and genetics: *Zea mays* as a tool for phylogenetic studies. *Systematic Biology*, 42(4), 415-439.
- Khoo, K. H., Able, A. J., & Able, J. A. (2012). The isolation and characterisation of the wheat molecular ZIPper I homologue, Ta ZYP1. *BMC research notes*, 5(1), 106.
- Kim, Y., Rosenberg, S. C., Kugel, C. L., Kostow, N., Rog, O., Davydov, V., ... & Corbett, K. D. (2014). The chromosome axis controls meiotic events through a hierarchical assembly of HORMA domain proteins. *Developmental cell*, 31(4), 487-502.
- Kleckner, N. (2006). Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma*, 115 (1): 175-194.
- Köhler, S., M. Wojcik; K. Xu y A. Dernburg. (2017). Superresolution microscopy reveals the three-dimensional organization of meiotic chromosome axes in intact *Caenorhabditiselegans* tissue. *PNAS*, E4734-E4743.
- Kohli, J., y Hartsuiker, E. (2001). Meiosis. *eLS*.
- Lambing, C., K. Osman, K. Nuntasontorn, A. West, J. D. Higgins, G. Copenhaver, S. Armstrong, K. Mechtler, E. Roitinger y F. Franklin. (2015). Arabidopsis PCH2 mediates meiotic chromosome remodeling and maturation of crossovers. *PloSGentetics*, 11(7).
- Lambing, Ch., C. Franklin y Ch. Wang. 2017. Understanding and manipulating meiotic recombination in plants. *Plant Physiology*, 173 (1): 1530-1542.
- Lambing, C., Tock, A. J., Choi, K., Topp, S. D., Kuo, P. C., Blackwell, A. R., ... y Henderson, I. R. (2019). REC8-cohesin, chromatin and transcription orchestrate meiotic recombination in the Arabidopsis genome. *bioRxiv*, 512400.
- Lee, D., Y. Kao, J. Ku, C. Lin, R. Meeley, Y. Jan y C. Wang. (2015). The axial element protein DESYNAPTIC2 mediates meiotic double-strand break formation and synaptonemal complex assembly in maize. *The plant cell*, 27: 2516-2529.
- Lee, J., y Hirano, T. (2011). RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *The Journal of cell biology*, 192(2), 263-276.

- Lee, J. Y., y Orr-Weaver, T. L. (2001). The molecular basis of sister-chromatid cohesion. *Annual review of cell and developmental biology*, 17(1), 753-777.
- Li, B., y Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *The FASEB Journal*, 7(10), 957-963.
- Li, J., D. Tang, Y. Shen, Z. Xue, H. Wang, W. Shi, C. Zhang, G. Du, Y. Li y Z. Cheng. (2016). P31^{comet}, a member of the synaptonemal complex, participates in meiotic DSB formation in rice. *PNAS*, 113(38): 10577-10582.
- Lin, J. S., y Lai, E. M. (2017). Protein–protein interactions: yeast two-hybrid system. In *Bacterial Protein Secretion Systems* (pp. 177-187). Humana Press, New York, NY.
- MacQueen, A. J., Colaiácovo, M. P., McDonald, K., & Villeneuve, A. M. (2002). Synapsis-dependent and-independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes & development*, 16(18), 2428-2442.
- Marsolier-Kergoat, M. C., Khan, M. M., Schott, J., Zhu, X., & Llorente, B. (2018). Mechanistic view and genetic control of DNA recombination during meiosis. *Molecular cell*, 70(1), 9-20.
- Martinez-Perez, E., & Villeneuve, A. M. (2005). HTP-1-dependent constraints coordinate homolog pairing and synapsis and promote chiasma formation during *C. elegans* meiosis. *Genes & development*, 19(22), 2727-2743.
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem*, 5(2), 170-176.
- Mehla, J., Caufield, J. H., & Uetz, P. (2015). The yeast two-hybrid system: a tool for mapping protein–protein interactions. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(5), pdb-top083345.
- Mercier, R., C. Mézard, E. Jenczewski, N. Macaisne y M. Grelon. (2015). The molecular biology of meiosis in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 66(1): 5.1-5.31.
- Mets, D. G., & Meyer, B. J. (2009). Condensins regulate meiotic DNA break distribution, thus crossover frequency, by controlling chromosome structure. *Cell*, 139(1), 73-86.
- Meuwissen, R. L., Offenberg, H. H., Dietrich, A. J., Riesewijk, A., van Iersel, M., & Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *The EMBO journal*, 11(13), 5091-5100.
- Miao, C., D. Tang, H. Zhang, M. Wang, Y. Li, S. Tang, H. Yu, M. gu y Z. Cheng. (2013). CENTRAL REGION COMPONENT1, a novel synaptonemal complex component, is essential for meiotic recombination initiation in rice. *The Plant Cell*, 25 (1): 2998-3009.

- Missiakas, D., Betton, J. M., & Raina, S. (1996). New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of Escherichia coli SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Molecular microbiology*, 21(4), 871-884.
- Mizuguchi, T., Fudenberg, G., Mehta, S., Belton, J. M., Taneja, N., Folco, H. D., ... & Grewal, S. I. (2014). Cohesin-dependent globules and heterochromatin shape 3D genome architecture in *S. pombe*. *Nature*, 516(7531), 432.
- Nelms, B., y Walbot, V. (2019). Defining the developmental program leading to meiosis in maize. *Science*, 364(6435), 52-56.
- Nonomura, K. I., Nakano, M., Fukuda, T., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., & Kurata, N. (2004). The novel gene HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1 of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *The Plant Cell*, 16(4), 1008-1020.
- Nonomura, K., M. Nakano, M. Eiguchi, T. Suzuki y N. Kurata. (2006). PAIR2 is essential for homologous chromosome synapsis in rice meiosis I. *J. Cell. Sci.* 119 (1): 217-225.
- Ortiz, R., Kouznetsova, A., Echeverría-Martínez, O. M., Vázquez-Nin, G. H., & Hernández-Hernández, A. (2016). The width of the lateral element of the synaptonemal complex is determined by a multilayered organization of its components. *Experimental cell research*, 344(1), 22-29.
- Osman, K., Yang, J., Roitinger, E., Lambing, C., Heckmann, S., Howell, E., ... & Armstrong, S. (2018). Affinity proteomics reveals extensive phosphorylation of the Brassica chromosome axis protein ASY 1 and a network of associated proteins at prophase I of meiosis. *The Plant Journal*, 93(1), 17-33.
- Page, S. L., & Hawley, R. S. (2001). c (3) G encodes a Drosophila synaptonemal complex protein. *Genes & development*, 15(23), 3130-3143.
- Page, S. L., & Hawley, R. S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science*, 301(5634), 785-789.
- Page, S. L., & Hawley, R. S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 525-558.
- Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M., y Bucci, C. (2019). Yeast two-hybrid assay to identify interacting proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 95, e70. doi: 10.1002/cpps.70
- Panizza, S., M. Mendoza, M. Berlinger, L. Huang, A. Nicolas, K. Shirahige y F. Klein. (2011). Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination. *Cell*, 146(1): 372-383.

- Pawlowski, W. P., y Cande, W. Z. (2005). Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends in cell biology*, 15(12), 674-681.
- Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G., & Orengo, C. (2010). Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure*, 18(10), 1233-1243.
- Reece-Hoyes, J. S., & Walhout, A. J. (2018). Gateway-compatible yeast one-hybrid and two-hybrid assays. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(7), pdb-top094953.
- Rog, O., Köhler, S., & Dernburg, A. F. (2017). The synaptonemal complex has liquid crystalline properties and spatially regulates meiotic recombination factors. *Elife* 6, e21455.
- Roig, I., Dowdle, J. A., Toth, A., de Rooij, D. G., Jasin, M., & Keeney, S. (2010). Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS genetics*, 6(8), e1001062.
- Ronceret, A., M. Sheehan, W. Pawlowski. (2007). Chromosome dynamics in meiosis. En: D. Verma y Z. Hong. *Cell division control in plants*. Springer Science & Business Media, 417p.
- Rosenberg, S. C., & Corbett, K. D. (2015). The multifaceted roles of the HORMA domain in cellular signaling. *J Cell Biol*, 211(4), 745-755.
- Rossignol, P., Collier, S., Bush, M., Shaw, P., & Doonan, J. H. (2007). Arabidopsis POT1A interacts with TERT-V (I8), an N-terminal splicing variant of telomerase. *Journal of cell science*, 120(20), 3678-3687.
- Sakuno, T., & Watanabe, Y. (2015). Phosphorylation of cohesin Rec11/SA3 by casein kinase 1 promotes homologous recombination by assembling the meiotic chromosome axis. *Developmental cell*, 32(2), 220-230.
- Sanchez-Moran, E., Santos, J. L., Jones, G. H., & Franklin, F. C. H. (2007). ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. *Genes & development*, 21(17), 2220-2233.
- Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K., & Eisenhaber, F. (2003). Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Molecular cell*, 11(3), 571-575.
- Schücker, K., Holm, T., Franke, C., Sauer, M., y Benavente, R. (2015). Elucidation of synaptonemal complex organization by super-resolution imaging with isotropic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 2029-2033.
- Sidhu, G., T. Warzecha y W. Pawlowski. (2017). Evolution of meiotic recombination genes in maize and teosinte. *BioMed Central Genomics*, 18 (106): 1-17.

- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... y Minx, P. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326(5956), 1112-1115.
- Shin, Y. H., Choi, Y., Erdin, S. U., Yatsenko, S. A., Kloc, M., Yang, F., ... & Rajkovic, A. (2010). Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis. *PLoS genetics*, 6(11), e1001190.
- Smith, A. V., & Roeder, G. S. (1997). The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes. *The Journal of cell biology*, 136(5), 957-967.
- Storlazzi, A., S. Tesse, G. Ruprich-Robert, S. Gargano, S. Pöggeler, N. Kleckner y D. Zickler. (2008). Coupling meiotic chromosome axis integrity to recombination. *Genes and Development*, 22(1): 796-809.
- Strable, J. y M. Scanlon. (2009). Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4 (10).
- Spirek, M., Estreicher, A., Csaszar, E., Wells, J., McFarlane, R. J., Watts, F. Z., & Loidl, J. (2010). SUMOylation is required for normal development of linear elements and wild-type meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma*, 119(1), 59-72.
- Sun, X., Huang, L., Markowitz, T. E., Blitzblau, H. G., Chen, D., Klein, F., & Hochwagen, A. (2015). Transcription dynamically patterns the meiotic chromosome-axis interface. *Elife*, 4, e07424.
- Sym, M., Engebrecht, J., & Roeder, G. S. (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell*, 72(3), 365-378.
- Sym, M., & Roeder, G. S. (1994). Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. *Cell*, 79(2), 283-292.
- Syrjänen, J. L., Pellegrini, L., & Davies, O. R. (2014). A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *Elife*, 3, e02963.
- TAKESAKO, K., KURODA, H., INOUE, T., HARUNA, F., YOSHIKAWA, Y., KATO, I., ... & YAMAGUCHI, H. (1993). Biological properties of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. *The Journal of antibiotics*, 46(9), 1414-1420.
- Uhlmann, F. (2016). SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(7), 399.
- Vader, G. (2015). Pch2 TRIP13: controlling cell division through regulation of HORMA domains. *Chromosoma*, 124(3), 333-339.
- Van Criekinge, W., & Beyaert, R. (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological procedures online*, 2, 1–38. doi:10.1251/bpo16.

- Voelkel-Meiman, K., Cheng, S. Y., Parziale, M., Morehouse, S. J., Feil, A., Davies, O. R., ... & MacQueen, A. J. (2019). Crossover recombination and synapsis are linked by adjacent regions within the N terminus of the Zip1 synaptonemal complex protein. *PLoS genetics*, 15(6), e1008201.
- Wang, M., K. Wang, D. Tang, C. Wei, M. Li, Y. Shen, Z. Chi, M. Gu y Z. Cheng. (2010). The central element protein ZEP1 of the synaptonemal complex regulates the number of crossovers during meiosis in rice. *The Plant Cell*, 22(1): 417-430.
- Wang, Ch., P. Carlton, I. Golubovskaya y W. Z. Cande. (2009). Interlock formation and coiling of meiotic chromosome axes during synapsis. *Genetics*, 183(1): 905-915.
- Wang, K., Wang, M., Tang, D., Shen, Y., Qin, B., Li, M., & Cheng, Z. (2011). PAIR3, an axis-associated protein, is essential for the recruitment of recombination elements onto meiotic chromosomes in rice. *Molecular biology of the cell*, 22(1), 12-19.
- West, A. M., Rosenberg, S. C., Ur, S. N., Lehmer, M. K., Ye, Q., Hagemann, G., ... & Corbett, K. D. (2018). A conserved mechanism for meiotic chromosome organization through self-assembly of a filamentous chromosome axis core. *bioRxiv*, 375220.
- Woglar, A., & Villeneuve, A. M. (2018). Dynamic architecture of DNA repair complexes and the synaptonemal complex at sites of meiotic recombination. *Cell*, 173(7), 1678-1691.
- Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., ... & McKay, M. J. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS genetics*, 5(10), e1000702.
- Woltering, D., Baumgartner, B., Bagchi, S., Larkin, B., Loidl, J., de los Santos, T., & Hollingsworth, N. M. (2000). Meiotic segregation, synapsis, and recombination checkpoint functions require physical interaction between the chromosomal proteins Red1p and Hop1p. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6646-6658.
- Wright, K., Arnold, B., Xue, K., Surinova, M., O'Connell, J., & Bomblies, K. (2015). Habitat and cytotype associated selection on meiosis proteins in *Arabidopsis arenosa*. *Mol Biol Evol*, 32, 944-955.
- Yang, C., Sofroni, K., Wijnker, E., Hamamura, Y., Carstens, L., Harashima, H., ... & Pochon, G. (2019). The *Arabidopsis* Cdk1/Cdk2 homolog CDKA; 1 controls chromosome axis assembly during plant meiosis. *The EMBO journal*.
- Yanagida, Mitsuhiro. (2014). The role of model organisms in the history of mitosis research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6: a015768.
- Ye, Q., Kim, D. H., Dereli, I., Rosenberg, S. C., Hagemann, G., Herzog, F., ... & Corbett, K. D. (2017). The AAA+ ATPase TRIP13 remodels HORMA domains through N-terminal engagement and unfolding. *The EMBO journal*, 36(16), 2419-2434.

- Zamariola, L., Tiang, C. L., De Storme, N., Pawlowski, W., & Geelen, D. (2014). Chromosome segregation in plant meiosis. *Frontiers in plant science*, 5, 279.
- Zanders, S., & Alani, E. (2009). The pch2Δ mutation in baker's yeast alters meiotic crossover levels and confers a defect in crossover interference. *PLoS genetics*, 5(7), e1000571.
- Zetka, M. C., Kawasaki, I., Strome, S., & Müller, F. (1999). Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes & development*, 13(17), 2258-2270.
- Zhang, J., Pawlowski, W. P., & Han, F. (2013). Centromere pairing in early meiotic prophase requires active centromeres and precedes installation of the synaptonemal complex in maize. *The Plant cell*, 25(10), 3900-3909.
- Zickler, D. y N. Kleckner. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annual Review of Genetics*: 33(1): 603-754.
- Zickler, D. y N. Kleckner. (2015). Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6): 1-26.
- Zhou, L., J. Huan; Y. Chen; Y. Wang y Y. Liu. (2017). Bivalent Formation 1, a plant-conserved gene, encodes an OmpH/coiled-coil motif-containing protein required for meiotic recombination in rice. *Journal of Experimental Botany*. P. 17.

ANEXOS

ANEXO 1. Oligonucleótidos diseñados

Tabla A1. Oligonucleótidos diseñados para el gen ZmAFD1

	Descripción	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm	GC %
AR519	ATG	GGTCGAGAATGTTCTACTCGCATC	24	58 °C	50
AR520	STOP	TCCAACATCACCAAGTCACATCTT	24	58 °C	42
AR521	SECUENCIA 1	TACACACAGCAGCAACCACCGAAA	24	64 °C	58
AR522	SECUENCIA 2	TTCGGTGGTTGCTGCTGTGTGTAAAA	26	62 °C	46
AR523	SECUENCIA 3	TATCCATGCCGGGGAAGAGGTGGCT	25	67 °C	60
AR524	SECUENCIA 4	AAGACCCTCACCTCGATGGCGTTCGTC AAG	30	69 °C	60
AR525	SECUENCIA 5	TACACACAGCAGCAACCACCGAAA	24	61 °C	50
AR526	SECUENCIA 6	CCTGAAGAAGCTTTTGTGGACTT	23	57 °C	57
AR527	SECUENCIA 7	GCATGAGATCACTTATCTTTGGTTG	24	61 °C	50
AR528	SECUENCIA 8	AGATAAGTGATCTCATGCACATCC	23	57 °C	42
AR598	Attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GAATGTTCTACTCGCATCAGCT	22	57 °C	46
AR599	Attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG TCACATCTTTAATCCTCTGGAGA	24	56 °C	47

Tabla A2. Oligonucleótidos diseñados para el gen ZmASY1

	DESCRIPCIÓN	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm	GC %
AR529	ATG	CGATGCAGGTGATGGCTCAGAAGA	24	60 °C	54
AR530	STOP	TACTCCTGTCACCCACCTCACTGA	25	61 °C	56
AR531	SECUENCIA 1	AATTCCTCCCCTGTTCAAGCCCGGAT	26	66 °C	54
AR532	SECUENCIA 2	TACTCCTGTCACCCACCTCACTG	26	62 °C	58
AR533	SECUENCIA 3	TTACTATGCTGTAGGCAAAGCTGT	24	57 °C	42
AR534	SECUENCIA 4	GTACATGATATGTTACCATCTTTTCGCC	28	58 °C	39
AR535	SECUENCIA 5	CACAGTCATGCCATCACCTTCGCTGT	26	66 °C	54
AR536	SECUENCIA 6	GCATGACTGTGGATAATGAGTCTG	24	57 °C	46
AR537	SECUENCIA 7	TCACTGAGCCTGAGGGTTTTGG	22	60 °C	55
AR538	SECUENCIA 8	TTGGGAAGTTAGCTCTTCCTCATG	24	57 °C	50
AR539	SECUENCIA 9	CTTCCCAAGTGAAGGAGTGGATATGC	26	60 °C	56
AR600	Attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TGATGGCTCAGAAGACGAAGGA	22	58 °C	47
AR601	Attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TCACTGAGCCTGAGGGTTTTG	22	60 °C	53

Tabla A3. Oligonucleótidos diseñados para el gen ZmDSY2

	DESCRIPCIÓN	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm	GC%
AR540	SECUENCIA 1	ATGGAAGTTGAGCTGCCAAACATC	24	60°C	46
AR541	SECUENCIA 2	CACAACCTTCATCCTGAGCATCTCAC	25	60°C	48
AR542	SECUENCIA 3	GGAGATCCTTGGTGGCACTTCA	22	58°C	55
AR543	SECUENCIA 4	TTTAATCCCTTCATCCTCAGTTGGAG	26	57°C	42
AR544	SECUENCIA 5	GGGTAGGAAATCAAATCTAAAAGAGGACAG	30	59°C	40
AR545	SECUENCIA 6	TTCATCTTCAGTTGGAGAAAGGGG	24	58°C	46
AR546	SECUENCIA 7	AAGTTCCGAACAAAGCTTTGCCAAAAGG	27	61°C	41
AR547	SECUENCIA 8	CAATCAACAGTCTCTGTGATAAGCTC	26	57°C	42

Tabla A4. Oligonucleótidos diseñados para el gen ZmP31

	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm	GC %
AR548	TCACGACGAGATGGAGACTGACATCT	26	61°C	50
AR549	CATGAACACATCACCCCTTCTAGTG	24	57°C	46
AR550	CACACGAAAAACGGAGGTTAGACGTAG	27	61°C	48
AR551	CTTCATCAAGTGCGTGCTGAAG	22	58°C	50
AR552	TCACGACGAGATGGAGACTGACATCT	26	61°C	50
AR553	AACTTGGTTAGAGCATGTTCTTTGGC	26	60°C	42
AR554	ATCCGTGCTCTTGTATCACGTG	22	59°C	50
AR555	CATGAACACATCACCCCTTCTAGTG	24	57°C	46
AR602	GggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctAGATGGAGACTGA CATCTCTTCAT	24	57°C	43
AR603	GgggaccacttttgtacaagaagctgggtATCACCCCTTCTAGT GACGCCTT	22	60°C	51

Tabla A5. Oligonucleótidos diseñados para el gen ZmPCH2

	DESCRIPCIÓN	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm	GC %
AR556	ATG	TCCGAAAACCATGAGCGCC	20	62°C	60
AR557	STOP	AGGTTGAACTAACCACGTGACTCC	24	61°C	50
AR558	SECUENCIA 1	CTAGGTATTCTATGTGTCAATTGATTGAAG	30	56°C	33
AR559	SECUENCIA 2	TTTTACATTCCACCATACACAAAAGGTA	28	56°C	32
AR560	SECUENCIA 3	TCCGAAAACCATGAGCGCC	20	62°C	60
AR561	SECUENCIA 4	AAGCTAGAGAGTGTATCATCCTCGCT	26	60°C	46
AR562	SECUENCIA 5	TAATGAGTGGGCCTTACCTGCCAA	24	61°C	50
AR563	SECUENCIA 6	GTCTGCCCTGTCAACAAATGCAATAT	26	59°C	42
AR564	SECUENCIA 7	GACATTAAGGCATATGTCGGACCCC	25	61°C	52

AR565	SECUENCIA 8	AGGTTGAACTAACCACGTGACTCC	24	61° C	50
AR604	Attb1	gggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctC CATGAGCGCCCTATGGAGAT	22	62° C	51
AR605	Attb2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtAC TAACCACGTGACTCCAAGACTTC	25	60° C	50

Tabla A6. Oligonucleótidos diseñados para el gen ZmZYP1

DESCRIPCIÓN		Secuencia	Tamaño (pb)	Tm	GC%
AR566	ATG	CCACCGTTGACAGGATGCAAAA	22	59°c	50
AR567	STOP	CAAGTTATCACCTTCTAGTCAAAAAGC	26	56°c	38
AR568	SECUENCIA 1	CGTATCCAAACTTAGTGAATAGACGG	26	57°C	42
AR569	SECUENCIA 2	CACTAAGGATGCATCATGAGGAAG	24	58°C	46
AR570	SECUENCIA 3	CCACCGTTGACAGGATGCAAAA	22	59°c	50
AR571	SECUENCIA 4	CATCTAGAGCTTTGGAATTCTTCCC	25	57°C	44
AR572	SECUENCIA 5	ATGAATTCAACTGCTTGTGGCGTGA	25	60°C	46
AR573	SECUENCIA 6	TGAGTTCTCTGCAACTCTATGAGTC	25	57°C	44
AR574	SECUENCIA 7	CCAAGTGGCTGAAGATAAGATCAG	24	57°C	46
AR575	SECUENCIA 8	GATCGCCTGGTCATTTTGTAGAGATA	26	58°C	42
AR576	SECUENCIA 9	CAGGCGATCAATGAAATCCGTAA	23	56°C	43
AR577	SECUENCIA 10	CAAGTTATCACCTTCTAGTCAAAAAGC	26	56°c	38
AR606	Attb1	GggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctG ATGCAAAAAGCACTCGGGGC	20	61°C	52
AR607	Attb2	GggggaccactttgtacaagaaagctgggtCT AGTCAAAAAGCATAAGGGTCGTCA	26	57°C	48

ANEXO 2. Enzimas utilizadas para la comprobación de pJET1.2-blunt+CDS

CDS	Enzima (s)	Fragmentos esperados
ZmAFD1	PstI	3504 pb, 1829 pb
ZmP31A	HindIII	3323 pb, 492 pb
ZmP31B	HindIII	3392pb, 492 pb
ZmPCH2	Vspl	2110 pb, 1235 pb, 1095 pb, 62 pb

ANEXO 3. Protocolo de purificación con PEG

Tomar 25 µL de la reacción de PCR (*attb*). Diluir en 75 µL de amortiguador TE (10 mM, Tris-HCl pH7.5-8, 1 mM EDTA), añadir 50 µL de PEG 8000/30 mM MgCl₂ al 30%. Mezclar bien y cetrifugar durante 15 minutos a máxima velocidad. Remover el sobrenadante con cuidado y resuspender el botón en 20 µL de amortiguador TE.

ANEXO 4. Reacciones BP y LR

La reacción BP se llevó a cabo utilizando el kit de *Invitrogen, Gateway BP clonase II Enzyme mix*. Se mezclaron 150 ng del producto de PCR con *attb* purificado. 150 ng del vector donador (pDONOR221) y la cantidad suficiente de amortiguador TE (pH 8) hasta obtener un volumen de 8 μ L. Se añadieron 2 μ L de la mezcla de enzimas BP (kit) se mezcló y se dejó incubando durante 4 horas a 25 °C. Se añadió 1 μ L de proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

La reacción LR se llevó a cabo utilizando el kit de *Invitrogen, Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix*. Se mezclaron de 50-150 ng del vector pDONOR221+CDS con 150 ng del vector destino (pADT7GW/pGBKT7GW), con amortiguador TE (pH 8.0) hasta obtener un volumen de 8 μ L. Se añadieron 2 μ L de la mezcla de enzimas LR (del kit), se mezcló y se dejó incubando durante 4 horas a 25°C. A la mezcla se le añadió 1 μ L de proteinasa K y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C.

ANEXO 5. Digestiones con *Vspl* para comprobar pDONOR221+CDS

PDONOR221+CDS	ENZIMA	FRAGMENTOS ESPERADOS
AFD1	<i>Vspl</i>	3155 pb, 1148 pb, 59 pb
DSY2	<i>Vspl</i>	3618 pb, 1148 pb, 59 pb
P31A	<i>Vspl</i>	2120 pb, 1148 pb, 59 pb
P31B	<i>Vspl</i>	2189 pb, 1148 pb, 59 pb
PCH2	<i>Vspl</i>	1461 pb, 1346 pb, 1148 pb, 59 pb

ANEXO 6. Corroboración de construcciones obtenidas

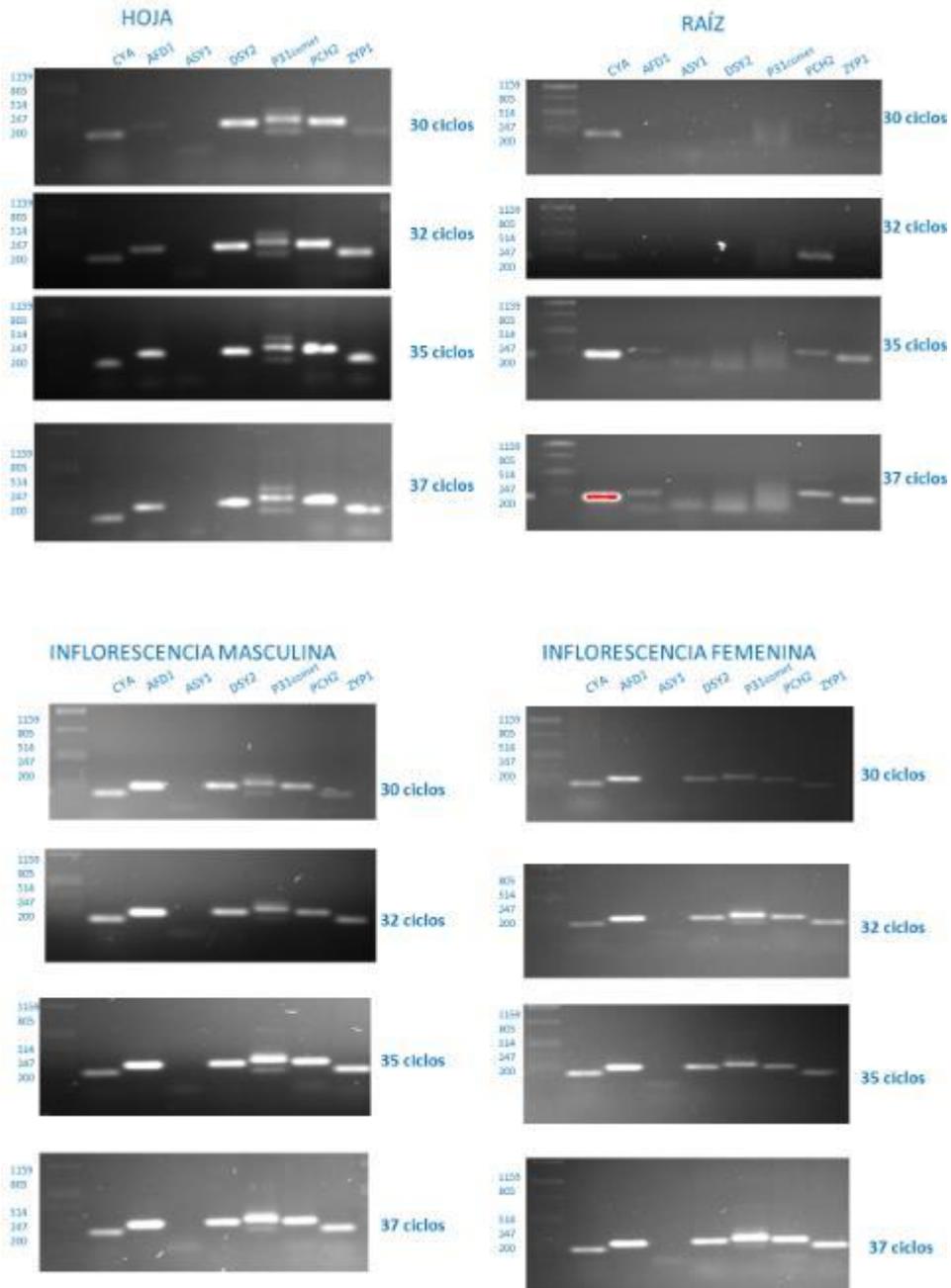
CDS	CONSTRUCCIÓN	ENZIMA UTILIZADA	PATRÓN DE DIGESTIÓN
AFD1	pGADT7GWZmAFD1	<i>NcoI</i>	11706 pb, 504 pb
	pGBKT7GWZmAFD1	<i>Hind II</i>	8991 pb, 153 pb
DSY2	pGADT7GWZmDSY2	<i>Hind III</i>	7188 pb, 2076 pb, 1000 pb
	pGBKT7GWZmDSY2	<i>Hind II</i>	7302 pb, 2152 pb, 153 pb
P31A	pGADT7GWZmP31A	<i>Hind III</i>	7188 pb, 1192 pb, 514 pb
	pGBKT7GWZmP31A	<i>Hind II</i>	8025 pb, 153 pb
P31B	pGADT7GWZmP31B	<i>HindIII</i>	7188 pb, 1093 pb, 485 pb
	pGBKT7GWZmP31B	<i>Vspl</i>	4133 pb, 1902 pb, 1901 pb, 114 pb, 59 pb
PCH2	pGADT7GWZmPCH2	<i>Hind III</i>	7188pb, 1481 pb, 843 pb
	pGBKT7GWZmPCH2	<i>Hind II</i>	7439 pb, 1204 pb, 153 pb

ANEXO 7. Medios y soluciones utilizadas en el ensayo de Y2H

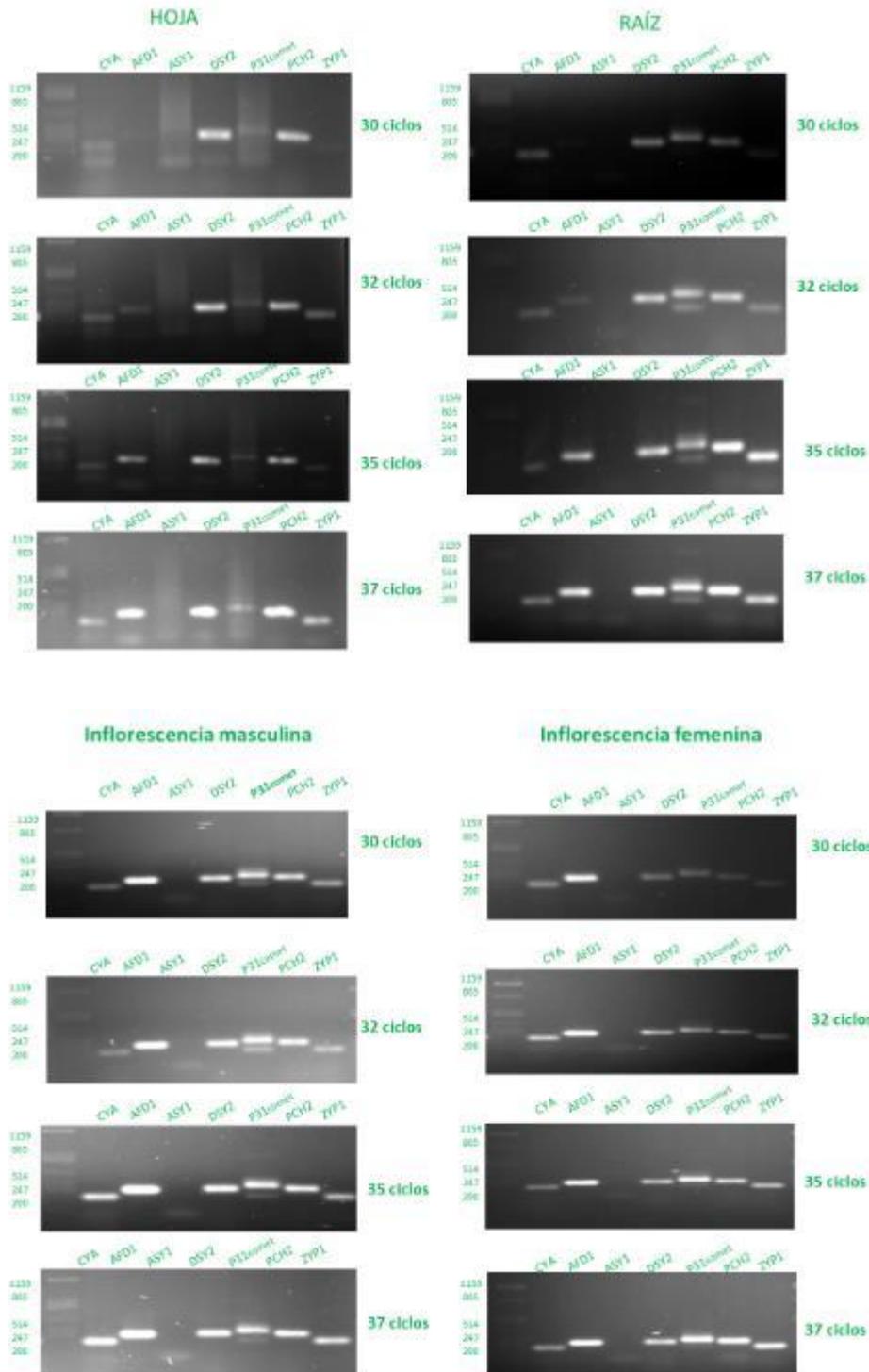
MEDIO YPDA (1 L)		MEDIO YPDA 2X					
Extracto de levadura	10 g	Extracto de levadura	20 g				
Peptona	20 g	Peptona	40 g				
Glucosa	20 g	Glucosa	40 g				
Hemisulfato de Adenina	40 mg	Hemisulfato de Adenina	80 mg				
*Sólido: Bacto agar	20 g	*Sólido: Bacto agar	40 g				
**Esterilizar a 115°C durante 15 minutos							
Medio SD (<i>Synthetic minimal glucose medium</i>) 1 L							
Bacto yeast nitrogen base (w/o aa)			6.7 g				
Dextrosa			20 g				
Bacto agar			20 g				
**Dependiendo del tipo de medio mínimo añadir el complemento de aminoácidos:							
SD-W			1.92 g				
SD-L			1.62 g				
SD-W/-L			1.54 g				
**Esterilizar a 115°C durante 15 minutos							
NaCl 0.9%							
Disolver 0.9g de NaCl en 100 mL de agua MQ estéril. Esterilizar por filtración.							
PEG/LiAc				1.1% TE/LiAc			
PEG 50%	8 mL	1.1 mL 10X de amortiguador TE					
Amortiguador TE 10X	1 mL	1.1 mL de 1 M LiAc					
LiAc (10 M)	1 mL	Aforar a 10 mL					

ANEXO 8. Repeticiones técnicas de la PCR semicuantitativa

Anexo 8.1. Segunda repetición técnica de la PCR semicuantitativa



Anexo 8.2. Tercera repetición técnica de la PCR semicuantitativa



ANEXO 9. Repeticiones técnicas del ensayo de Y2H

Se presentan las interacciones observadas durante las tres replicas técnicas del ensayo de dos híbridos en levadura. Los números representan las interacciones descritas en la tabla 13.

