



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Facultad de Química**

**“ASOCIACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AL CICLO CELULAR DE
MAÍZ CON LA PROTEÍNA REPARATIVA RAD51A2.”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

ESTEFANY DAMARIS GUERRERO MOLINA

TUTOR PRINCIPAL

[Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos - Facultad de Química UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra - Facultad de Química UNAM](#)
[Dr. Arnaud Jacques Marcel Ronceret - Instituto de Biotecnología UNAM](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Junio, 2022



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.

COMITÉ TUTOR:

DR. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Dr. Arnaud Jacques Marcel Ronceret

ASESOR TÉCNICO: M EN C. MINGYAR NEFTALÍ LÓPEZ HERNÁNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA LABORATORIO 114, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

“Nacemos de la raíz profunda, del maíz que da la vida; fruto del tiempo somos y del canto del sol”.

Himno al movimiento indígena mazahua.

Agradecimientos

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

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por permitirme ser parte de su grupo de investigación, así como por su asesoría y apoyo constante en la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial integrado por el Dr. Javier Plasencia de la Parra, Dr. Arnaud Jacques Marcel Ronceret y el Dr. Jorge Vázquez Ramos que supervisaron y evaluaron el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del jurado de grado: Dra. Marina Macías Silva, Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. César Cuevas Velázquez y el Dr. Arnaud Jacques Marcel Ronceret por sus aportaciones y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Aurora Lara Núñez por sus observaciones y aportaciones, así como el apoyo profesional y personal.

Al M en C. Mingyar Neftalí López Hernández y al Dr. Elpidio García Ramírez por sus comentarios y asesoramiento técnico durante el desarrollo de este proyecto.

Al M en C. Ulises Martínez Ortega por su orientación en el desarrollo de las técnicas computacionales.

A la Dra. Sara Margarita Garza Aguilar y la Dra. Teresa Vargas Cortez por sus aportaciones, así como el apoyo profesional y personal.

Durante la realización de este proyecto conté con una beca otorgada por CONACyT y posteriormente una beca otorgada por PAPIIT.

Al apoyo financiero y de recursos otorgados para la realización del trabajo experimental por parte de los siguientes programas:

- Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9124.
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN201322.
- Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9130.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) A1-S-9076.
- LANCAD-UNAM-DGTIC-207.
- LANCAD-UNAM-DGTIC-411.

Índice general

Abreviaturas	1
Resumen	3
Introducción	4
1. El maíz.....	4
2. Formación de semilla.....	5
3. Germinación.	7
4. El ciclo celular	8
5. Regulación del ciclo celular en plantas.	11
6. Cinasas dependientes de ciclina.....	12
7. Ciclinas de plantas.	13
8. Regulación de complejos Cyc/CDK	15
9. Daño al DNA.....	15
10. Respuesta ante daño al DNA.....	16
11. Daño al DNA y ciclo celular	20
12. Antígeno Nuclear de Proliferación Celular.....	21
Antecedentes directos.....	25
Justificación	28
Hipótesis	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares.....	29
Metodología	30
Resultados	41
1. Estudio de filogenia.	41
2. Búsqueda de motivos PIP.	43
3. Modelado de estructuras proteicas.	44
4. Acoplamiento molecular	56
5. Modelo experimental.	57
5.1 Clonación e inducción de <i>Rad51A2</i>	57
5.2 Clonación, expresión y purificación de CycB1;2.....	63

5.3 Ensayos de interacción <i>in vitro</i>	66
5.4 Actividad de cinasa	68
6. Establecimiento de un modelo fisiológico para estudiar la reparación del DNA.....	69
7. Modelo de inducción de daño al DNA.....	72
Discusión de resultados.....	74
Conclusiones.....	81
Perspectivas.....	82
Referencias	83
Figuras suplementarias.....	90

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica de la planta de maíz.....	4
Figura 2. Estructura del grano de maíz.	5
Figura 3. Patrón de desarrollo de semillas.....	6
Figura 4. Curva de toma de agua de la semilla en la germinación.....	8
Figura 5. Representación de las fases del ciclo celular y de la mitosis	10
Figura 6. Regulación de la transición G1/S del ciclo celular en plantas.....	12
Figura 7. Árbol filogenético de ciclinas en <i>Zea mays</i>	13
Figura 8. La actividad de las cinasas dependientes de ciclina es regulada a múltiples niveles	15
Figura 9. Vía de señalización ATM en plantas.....	18
Figura 10. Comparación de la vía de Recombinación Homóloga y el pegado de extremos no homólogos en la resolución de una ruptura de doble cadena	20
Figura 11. Árbol filogenético de la secuencia proteica de PCNA y la subunidad beta de distintas especies.....	22
Figura 12. Estructura homotrimérica de PCNA.....	23
Figura 13. Árboles filogenéticos de las familias	42
Figura 14. Estructuras tridimensionales predichas para RAD51A2 de maíz.....	45
Figura 15. Análisis de dinámica molecular de RAD51A2.....	46
Figura 16. Localización de motivos PIP y posibles sitios de fosforilación de RAD51A2.....	47
Figura 17. Estructuras tridimensionales predichas para CDKB1;1 de maíz.	48

Figura 18. Análisis de dinámica molecular de CDKB1;1.....	48
Figura 19. Localización de motivos en CDKB1;1.....	49
Figura 20. Estructuras tridimensionales predichas para CycB1;1 de maíz.	50
Figura 21. Análisis de dinámica molecular de CycB1;1.....	51
Figura 22. Localización de motivos PIP en CycB1;1.....	51
Figura 23. Estructuras tridimensionales predichas para CycB1;2 de maíz.....	52
Figura 24. Análisis de dinámica molecular de CycB1;2.....	53
Figura 25. Localización de motivos en CycB1;2.....	53
Figura 26. Estructuras tridimensionales predichas para PCNA de maíz.	54
Figura 27. Análisis de dinámica molecular de PCNA.....	55
Figura 28. Estructura tridimensional de PCNA y acoplamiento.....	56
Figura 29. Acoplamiento molecular PCNA-RAD51A2.....	57
Figura 30. Alineamiento del cdsDNA de Rad51A1 y Rad51A2.....	58
Figura 31. Construcción <i>pPAL7-Rad51A2</i>	59
Figura 32. Condiciones de amplificación para <i>Rad51A2</i>	60
Figura 33. Verificación de clonación de <i>Rad51A2</i>	61
Figura 34. Purificación e interacción de proteínas recombinantes.....	62
Figura 35. Subclonación de <i>Rad51A2</i>	63
Figura 36. Clonación de <i>cycb1;2</i>	65
Figura 37. Purificación de PCNA.....	66
Figura 38. Interacción RAD51A2-PCNA.....	67
Figura 39. Interacción RAD51A2-CycB1;2.....	67
Figura 40. Actividad de cinasa sobre RAD51A2.....	68
Figura 41. Medición de parámetros fisiológicos.....	69
Figura 42. Planta de maíz de 2 semanas.....	70
Figura 43. Viabilidad medida por ensayo de azul de tetrazolio.....	71
Figura 44. Vigor medido por ensayo de azul de tetrazolio.....	71
Figura 45. Viabilidad y vigor de ejes embrionarios de maíz.....	72
Figura 46. Viabilidad y vigor de ejes embrionarios de maíz tratados con zeocina.....	73
Figura 47. Modelo de daño al DNA.....	74
Figura S1. Porcentaje de identidad entre los miembros de la familia RAD51.....	91

Figura S2. Porcentaje de identidad entre los miembros de la familia CDKB	92
Figura S3. Porcentaje de identidad entre los miembros de la familia CycB	93
Figura S4. Porcentaje de identidad entre PCNA	94
Figura S5. Estadísticos de validación de modelos de RAD51A2.....	96
Figura S6. Estadísticos de validación de modelos de CDKB1;1	97
Figura S7. Estadísticos de validación de modelos de CycB1;1	98
Figura S8. Estadísticos de validación de modelos de PCNA	98
Figura S9. Transcritos de <i>Zmrad51A</i>	99
Figura S10. Alineamiento de las secuencias cdsc y cDNA de <i>Rad51A1</i> y <i>Rad51A2</i>	99
Figura S11. Controles de no unión	100
Figura S12. Medición de parámetros fisiológicos de semillas	101
Figura S13. Planta de maíz de 2 semanas	101

Índice de tablas

Tabla 1. PDB moldes para modelado de estructura terciaria.	31
Tabla 2. Condiciones de amplificación por Touch Down	34
Tabla 3. Soluciones empleadas durante la purificación	35
Tabla 4. Buffers de extracción de gDNA.....	39
Tabla 5. Preparación de 2 geles de poliacrilamida al 12%	40
Tabla 6. Títulos de anticuerpos empleados.....	40
Tabla 7. Proteínas con motivos de interacción a PCNA	43
Tabla 8. Motivos PIP expuestos en la superficie de las proteínas.....	54
Tabla 9. Primers para <i>Rad51A2</i>	59
Tabla 10. Primers de clonación <i>cycb1;1</i> y <i>cycb1;2</i>	64
Tabla suplementaria 1. ID proteínas empleadas para la construcción de filogenias.....	95

Abreviaturas

ATM	Proteína ataxia telangiectasia mutada
ATR	Proteína relacionada a ataxia telangiectasia y Rad3
ATP	Adenosín trifosfato
BER	Reparación por escisión de bases
CAK	Cinasa activadora de CDK
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CID	Dominio de inhibición de CDKs
CKS	Subunidad reguladora de CDKs
Cyc	Ciclina
DDR	Respuesta a Daño a DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerasa
DP	Proteína de dimerización con E2F
E2F	Factor de unión al promotor E2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ET	Extracto total
GST	Glutación S transferasa
HR	Recombinación homóloga
ICK	Proteína inhibidora de CDK
IDCL	Asa conectora de interdominios

IP	Inmunoprecipitado
kDa	Kilodaltones
KRP	Proteína relacionada a Cip/Kip
MMR	Reparación Mediada por Metilos
mRNA	RNA mensajero
MW	Marcador de masa molecular
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	Pegado de extremos no homólogos
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PIP	Motivo de interacción de proteínas con PCNA
RBR	Proteína relacionada a retinoblastoma
RMSD	Root-mean-square deviation
RMSF	Root-mean-square fluctuation
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SOG-1	Suppressor of Gamma Response 1
TLS	Síntesis de translesión
TS	Cambio de Templado

Resumen

La productividad de las cosechas ha sido relacionada directamente con el vigor de las semillas, donde el vigor se asocia con la estabilidad del genoma de las células que conforman a la semilla. Agentes genotóxicos tales como moléculas químicas (metales pesados) o radiación, así como procesos metabólicos durante la formación de semilla, pueden causar daño químico y estructural sobre el DNA. En algunos casos, se afecta severamente la integridad del genoma de las células, lo cual afecta los procesos de replicación y transcripción, desencadenando así la muerte celular.

Existen múltiples mecanismos de reparación de daño al DNA, lo que permite a los eucariontes contender contra distintos tipos de daño. La mayoría de los mecanismos de reparación del DNA, reportados en mamíferos, se encuentran conservados en plantas, lo que implica la presencia de proteínas homólogas o análogas funcionales en ambos organismos, por ejemplo, las cinasas ATM y ATR.

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) es una proteína “plataforma”, es decir, favorece la interacción entre otras proteínas. PCNA se encuentra implicada en diversos procesos celulares como: replicación del DNA, remodelación de la cromatina, regulación del ciclo celular y reparación del daño al DNA. Se ha observado la participación de PCNA en diversos mecanismos de reparación tales como, Reparación por Escisión de Bases (BER), Mismatch Repair (MMR), además, se le ha relacionado de forma importante durante Recombinación Homóloga (RH), donde la actividad de la recombinasa RAD51 es esencial.

Los complejos proteicos Cyc/CDKs son esenciales para la progresión del ciclo celular, proceso que se inhibe al detectar daño al DNA. Complejos CycB1/CDKB1 en plantas están implicados de forma específica en la reparación de rupturas de doble cadena mediante recombinación homóloga.

En este proyecto, a través de estudios *in silico*, así como *in vitro* se muestra la existencia de complejos proteicos compuestos por actores relacionados al ciclo celular como PCNA y CycB1;2, y a la maquinaria de reparación (RAD51A) en maíz. Además, se encontró que existe actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 y a CycB1;2 sobre RAD51A2. Finalmente, se comenzó la estandarización de un modelo de inducción de daño al DNA para posteriormente determinar el comportamiento transcripcional, traduccional y de interacciones entre las proteínas de interés mostrando su participación durante la respuesta ante daño al DNA.

Introducción

1. El maíz

En México, el principal producto agrícola es el maíz con 12.4 millones de toneladas producidas en 2019 (SIAP, 2020), esta planta es empleada tanto para el consumo directo del humano, como para la producción de productos derivados como jarabes, almidones y dextrosa, además, se utiliza para la alimentación de animales bovinos (INEGI, 2017). Por ello, el estudio del maíz es de alto impacto económico, científico, político, social y cultural.

La importancia económica y científica de los cereales ha permitido un gran avance en la investigación sobre su genética, desarrollo y evolución. La secuencia completa del genoma del arroz es emblemática, pues marca la transición a la genómica y a la biología computacional en plantas que también ha penetrado en el estudio de muchos otros cereales como el maíz (Paterson et al., 2005).

Al maíz se le ha considerado uno de los sistemas de plantas superiores más accesibles. Su genoma se encuentra completamente secuenciado, además, se ha desarrollado un conjunto de herramientas citogenéticas, métodos genéticos y marcadores de fenotipo caracterizados. Esto hace que el maíz sea un modelo de estudio de interés más allá de la biología de las plantas (Nannas y Dawe 2015). El maíz tiene un genoma rico en transposones, de aproximadamente 2.1 Gpb, organizado en 10 cromosomas y contiene 39,591 genes que codifican a proteínas (http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Annotation/#assembly). En la figura 1 se muestra la clasificación taxonómica aceptada del maíz.

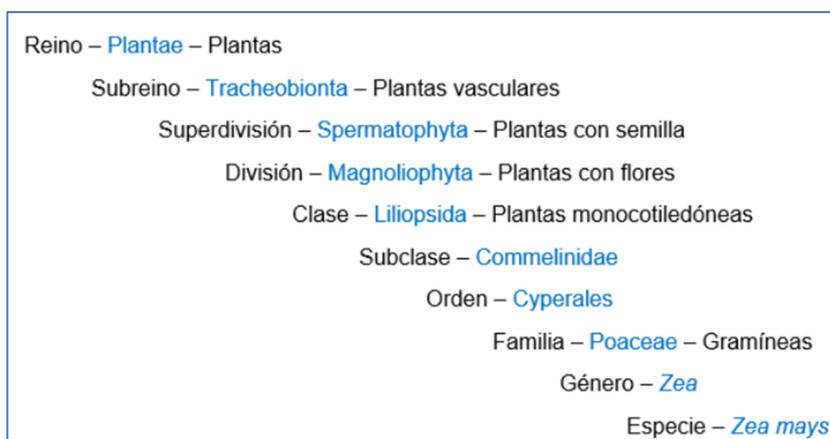


Figura 1. Clasificación taxonómica de la planta de maíz.

Los principales componentes de la semilla de maíz se muestran en la figura 2, entre ellos destacan:

- **Pericarpio:** Forma una cubierta cerosa en la semilla y es la pared del ovario.
- **Endospermo:** Tejido de reserva que alimenta al embrión durante la germinación. Este tejido constituye el mayor volumen de la semilla (82%) y está formado principalmente de almidón.
- **Embrión:** Tejido compuesto de diferentes tipos celulares que formarán la planta. La parte superior del eje embrionario contiene un grupo de células conocidas como meristemo apical del tallo, las cuales al dividirse generan el tallo y la primera hoja (cotiledón), mientras que en la parte inferior se tiene al meristemo apical de la raíz que generará la raíz primaria y posteriormente raíces secundarias.

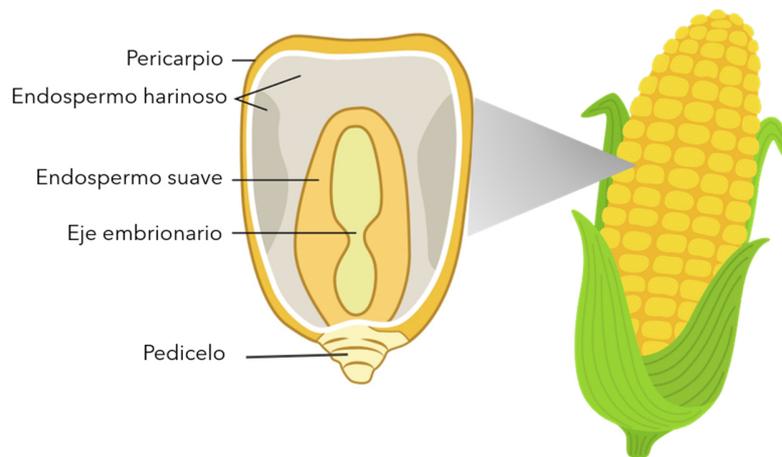


Figura 2. Estructura del grano de maíz.

2. Formación de semilla

Un paso clave para la perpetuación de las plantas es la formación de la semilla. Este órgano se compone por tres tejidos principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 2). El tamaño y peso de la semilla está determinado por el tamaño de las células que la componen, así como por la cantidad de agua y compuestos de almacenamiento (proteínas, lípidos y carbohidratos) (Dante et al., 2014).

Las semillas de cereales y leguminosas típicamente se desarrollan en 3 fases (Figura 3):

- **Fase I:** Inicia con la polinización de una célula huevo, lo cual promueve una rápida proliferación celular que se ve reflejada en el aumento de peso seco. Además, se establecen los tejidos de la semilla, por ejemplo, el conducto que genera la conexión

entre la semilla y el tejido vascular de la planta madre que permite la nutrición y desarrollo de la semilla. Esta fase también se caracteriza por la absorción de una gran cantidad de sacarosa, que se convierte rápidamente en hexosas por la actividad de la enzima invertasa, que se encuentra unida a la pared celular. Se considera que la fase I es crítica para el desarrollo de semilla y el rendimiento del grano (Dante et al., 2014).

- **Fase II:** Llenado de la semilla. El peso seco se incrementa rápidamente debido al crecimiento celular y la acumulación de compuestos de almacenamiento, obteniendo un pico máximo en el peso de la semilla y en la cantidad de agua. Además, se caracteriza por la endorreducción de las células del endospermo (Dante et al., 2014).
- **Fase III:** La cantidad de agua disminuye dramáticamente (10-15%) y se alcanza la madurez fisiológica. Durante la desecación, las semillas almacenan mRNAs y proteínas necesarias para tolerar la baja disponibilidad de agua. Esto es de gran importancia, pues durante la fase III las macromoléculas que son necesarias para mantener con vida a las células, están especialmente comprometidas, ya que su estabilidad depende de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas, que cambian con la pérdida de agua. El daño a macromoléculas durante la desecación es inevitable, sin embargo, ocurre de forma limitada ya que existen mecanismos que previenen el daño masivo por la pérdida de agua. Diversas adaptaciones celulares permiten que, durante las primeras etapas de la germinación, el potencial daño al DNA sea reparado (Dante, et al., 2014; Bewley, et al., 2012; Banerjee y Roychoudhury 2016; Smolikova et al., 2021; Waterworth et al. 2019).

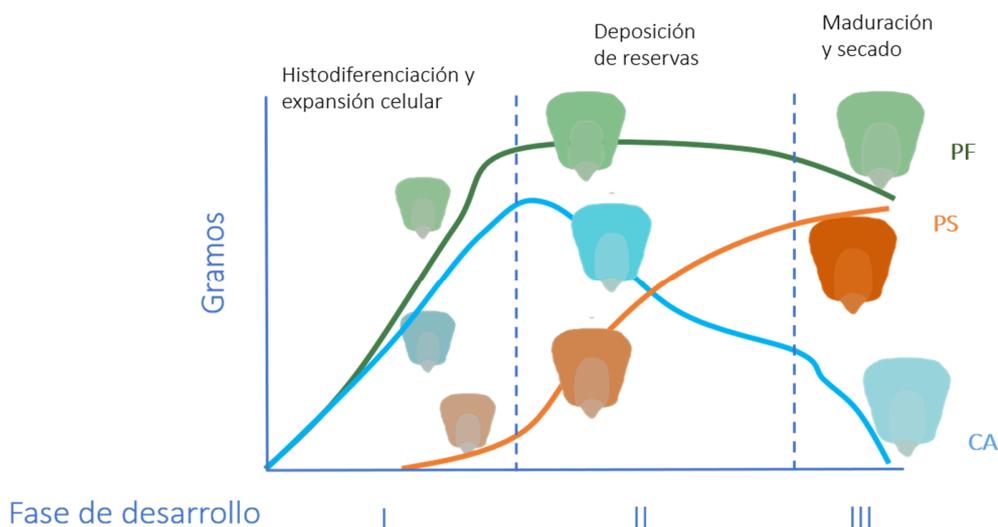


Figura 3. Patrón de desarrollo de semillas. Peso fresco de semillas enteras (PF), peso seco (PS) y contenido de agua (CA). (Modificada de Bewley et al., 2012)

3. Germinación.

La germinación es esencial para la perpetuación de cualquier especie de planta. Desde el punto de vista fisiológico, se considera que la germinación es un proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla, lo cual produce que las células en los tejidos se alarguen y que la radícula logre protruir (Nonogaki et al., 2010). Sin embargo, el enfoque bioquímico indica que la germinación involucra el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de los procesos de desarrollo. Esto significa que las semillas ya contienen la maquinaria necesaria para los procesos bioquímicos involucrados en el programa morfogénico que recrea una planta. En este sentido, la germinación involucra que las células pasen de un estado metabólico inactivo a uno activo que culminará con la primera ronda de división celular sin la necesidad de protruir la radícula (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

El proceso germinativo se ha estudiado para tratar de entender los procesos moleculares que ocurren desde el momento en que la semilla entra en contacto con agua (imbibición), hasta el establecimiento de la planta en eventos post-germinativos. Para tratar de describir lo anterior se toma como modelo la curva de toma de agua de semillas no dormantes (Nonogaki et al., 2010), tal como el maíz, que consta de 3 fases (Figura 4):

- **Fase 1:** En esta fase, ocurre una toma rápida de agua por lo que las membranas celulares comienzan a rehidratarse, inicia la reparación de organelos como las mitocondrias, así como la reparación del DNA que pudo llegar a dañarse a causa del metabolismo y la pérdida de agua durante la formación de la semilla. Además, comienza la síntesis de proteínas a partir de mRNAs almacenados previamente (Nonogaki et al., 2010).
- **Fase 2:** Se trata de la etapa más larga, donde la entrada de agua es restringida, por lo que los niveles de agua permanecen constantes. Los procesos mencionados en la fase 1 continúan y se incrementan, además, comienza la síntesis de mRNAs de *novo* y la producción de proteínas se incrementa. La replicación del DNA comienza y concluye durante esta etapa. La división celular ocurre al final de esta fase dando por concluido el ciclo celular y con ello la germinación (Nonogaki et al., 2010).
- **Fase 3:** Es una fase post-germinativa. Ocurre un segundo periodo de entrada de agua rápida a las células. En esta etapa ocurre la elongación radicular, así como la movilización de reservas de carbohidratos provenientes del endospermo hacia el eje embrionario (Nonogaki et al., 2010).

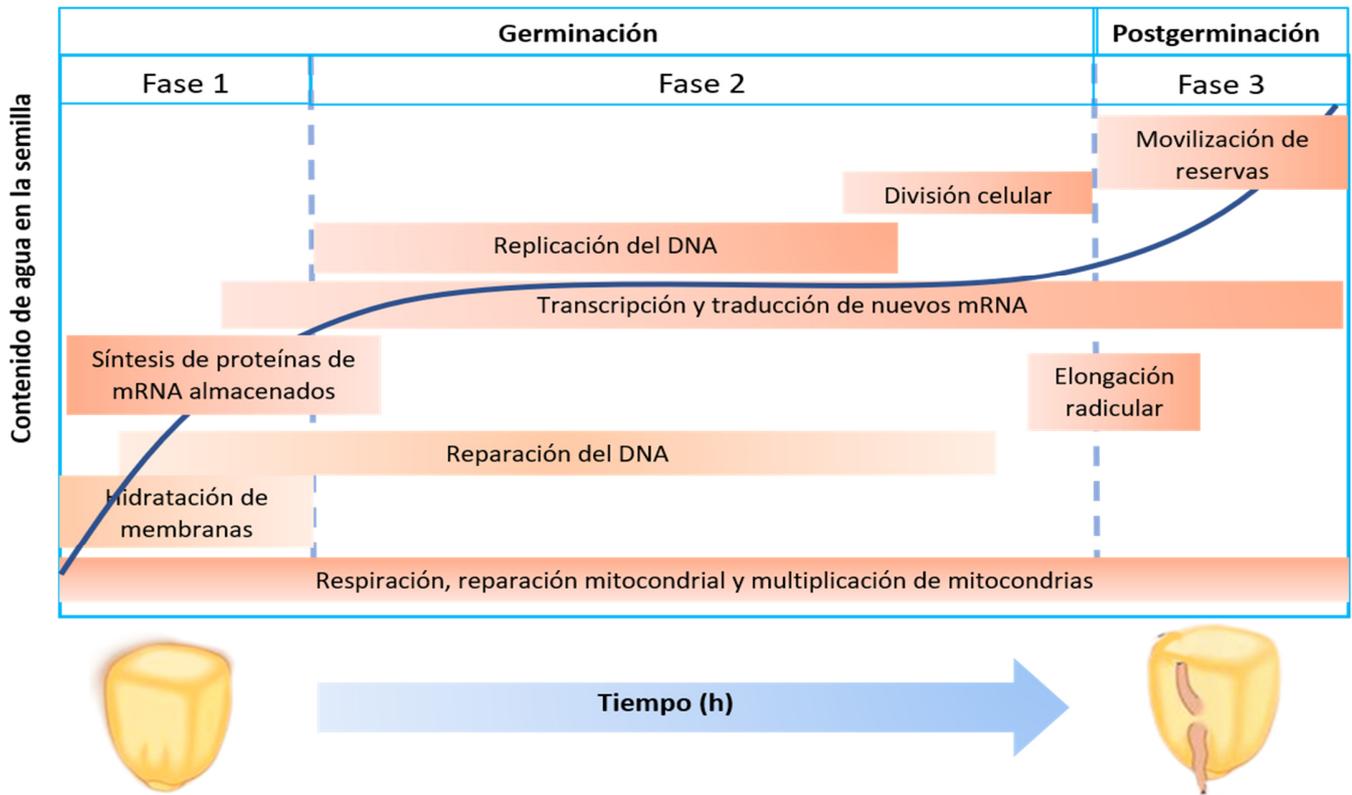


Figura 4. Curva de toma de agua de la semilla en la germinación. Modificado de Nonogaki et al., 2010.

4. El ciclo celular

El establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para el crecimiento tisular y, por lo tanto, su estudio durante la germinación es fundamental. Una eficiente síntesis de proteínas y producción de ATP son requeridos en la fase preparativa G1, para que las células entren al ciclo celular. Para obtener dos células genéticamente idénticas, a través del ciclo celular, se requiere que una célula duplique su contenido de DNA y que posteriormente se divida. Este proceso es altamente regulado por lo que es unidireccional e irreversible.

Para poder estudiar los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren durante el ciclo celular, éste se divide típicamente en dos etapas, la interfase y la mitosis (Figura 5). La interfase se divide a su vez en tres fases:

1. Fase G1: Durante esta etapa las células perciben las señales medioambientales, por ejemplo, los nutrientes presentes en el medio, la presencia de hormonas y

factores de crecimiento. Además, las células crecen hasta obtener un tamaño apto para generar dos células. Ocurre la síntesis de proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular y se percibe si la célula puede generar suficiente energía para llevar a cabo el proceso (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

2. Fase S: El proceso principal que se lleva a cabo durante la fase S es la duplicación del DNA, para este proceso se requiere que se establezcan y avancen las horquillas de replicación. Por otro lado, comienza la transcripción de genes para la producción de proteínas necesarias en las siguientes fases (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).
3. Fase G2: Se verifica que el DNA recién sintetizado sea perfectamente complementario a la hebra madre. Esta fase ocurre en conjunto con la fase S, es decir, la maquinaria de replicación es capaz de detectar si se ha cometido un error, de ser así, las DNA polimerasas en su función 3' exonucleasa puede repararlo (Yurieva y O'Donnell, 2016) o bien se reclutan proteínas de reparación (Moldovan et al., 2007).

Por otro lado, la mitosis se subdivide en cinco fases y posteriormente ocurre la citocinesis (Figura 5):

1. Durante la primera fase de la mitosis, conocida como profase, los cromosomas replicados se condensan hasta obtener a las dos cromátidas hermanas unidas por el cinetocoro construido en la región centromérica del cromosoma. Por su parte, el huso mitótico comienza a formarse fuera del núcleo.
2. En la prometafase, la envoltura nuclear se rompe y las cromátidas hermanas se unen al huso mitótico, esto ocurre cuando los microtúbulos de un polo del huso se adhieren a un cinetocoro y los microtúbulos del polo opuesto capturan el cinetocoro de la cromátida hermana contigua, lo que da como resultado la unión de cada par de cromátidas hermanas al huso.
3. En la metafase ocurre una continua fosforilación y defosforilación del huso por proteínas cinasas, que permite que los cromosomas sean movilizados y finalmente queden alineados en el plano metafásico.
4. Durante la anafase, las cromátidas hermanas se separan de forma sincrónica debido a que los enlaces con la cohesina se rompen, y el huso las posiciona hacia los polos opuestos de la célula. Además, los propios polos del huso se alejan más

entre sí, completando la segregación de las cromátidas hermanas de la célula en división.

- En la telofase, se reconstituye la envoltura nuclear alrededor de cada conjunto de cromosomas y el huso se desmonta, dejando un solo centrosoma asociado con cada conjunto de cromosomas.

Finalmente, ocurre la citocinesis en la cual se lleva a cabo la división física del citoplasma y otros organelos, generando así dos células (Alberts et al., 2005; Morgan, 2007).

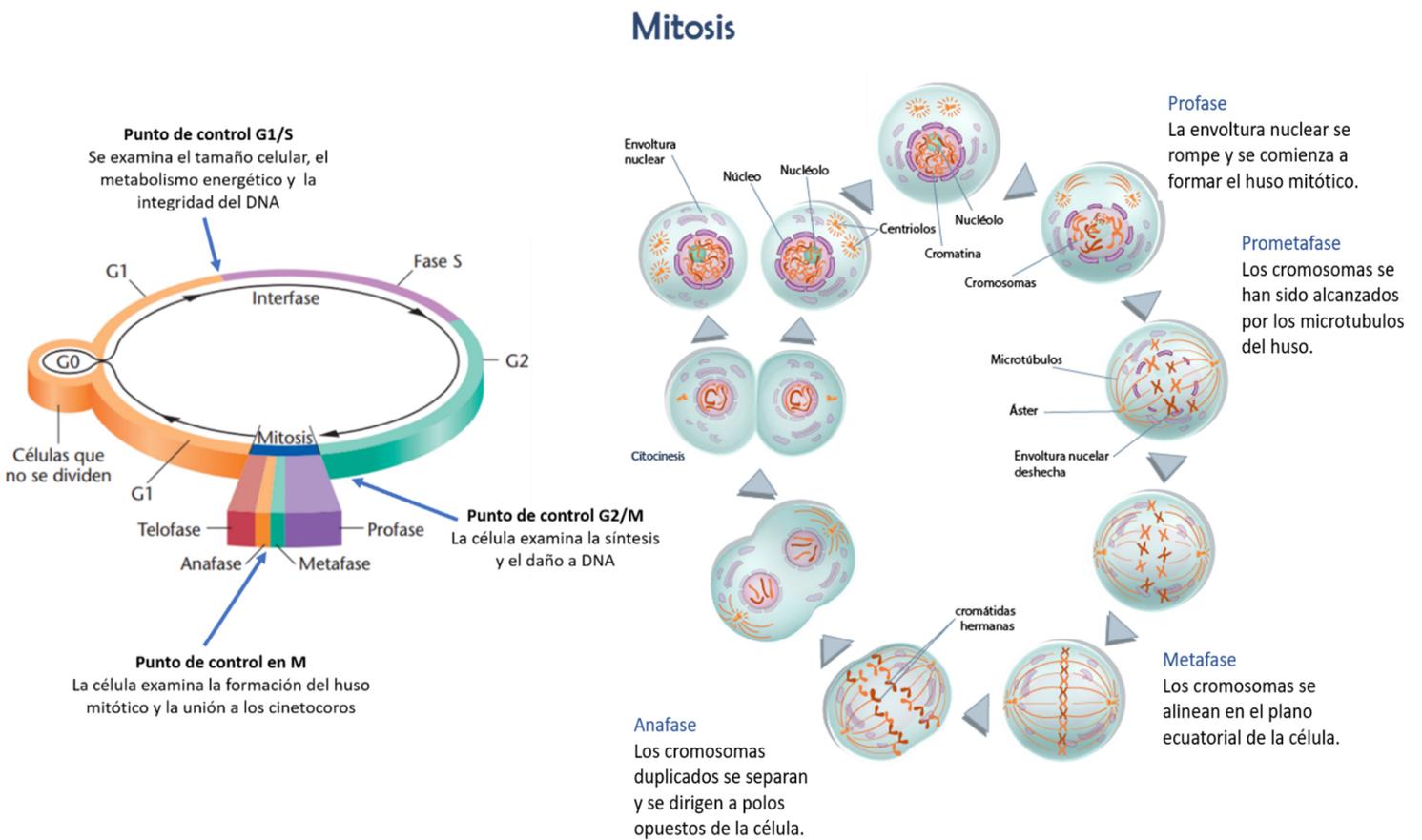


Figura 5. Representación de las fases del ciclo celular y de la mitosis.
Modificado de Klug et al., 2006.

5.Regulación del ciclo celular en plantas.

El ciclo celular se encuentra altamente regulado, lo que ocurre a distintos niveles: 1) transcripcional, 2) traduccional y 3) modificaciones postraduccionales.

En los eucariontes, los principales reguladores proteicos del ciclo celular son los complejos Ciclinas/Cinasas dependientes de ciclinas (Cyc/CDK). Estos complejos controlan las transiciones de fase, G1 a S, G2 a M y metafase a anafase durante la mitosis, los complejos Cyc/CDK se encargan de fosforilar proteínas claves en momentos específicos del ciclo celular para promover su avance.

Durante la transición de la fase G1 a la fase S, se encuentra el primer punto de control. Principalmente, los complejos CycD/CDKA son translocados al núcleo donde fosforilan a la proteína represora RBR (Retinoblastoma Related). Como consecuencia de la hiperfosforilación, RBR es removido, liberando al factor transcripcional E2F-DP, el cual queda activado para favorecer la transcripción de genes blancos necesarios para la progresión de la fase S (Figura 6) (Jonson y Walker, 1999).

El segundo punto de control se encuentra en la transición G2 a M, en donde se verifica que el DNA se encuentre integro y libre de errores, si el DNA tiene algún tipo de daño se induce el arresto de las células en la fase G2. En plantas, se ha encontrado que el daño al DNA es percibido por proteínas cinasas que fosforilan y activan al factor Suppressor Of Gamma Response 1 (SOG1), lo que genera una disminución en la expresión de factores transcripcionales MYB activadores que tienen como genes blanco, proteínas necesarias para la mitosis, además, se induce la expresión de proteínas represoras de complejos Cyc/CDKs, tales como KRPs y SIAMESE-Related, por lo que la actividad de CDKs disminuye. En adición a ello, las proteínas MYB de tipo represoras se estabilizan reprimiendo por completo la expresión de Cycs y CDKs mitóticas. El conjunto de todos estos mecanismos da como resultado el arresto de las células en G2. Por el contrario, si ~~todo~~ el DNA se encuentra en condiciones óptimas, los complejos CycB/CDKBs fosforilan a factores MYB represores que son degradados vía proteasoma, permitiendo el avance del ciclo celular (Umeda et al., 2019).

El último punto de control se encuentra en la transición de metafase a anafase en la cual las células perciben si los microtúbulos se encuentran correctamente unidos al cinetocoro de los cromosomas. De ser así, el complejo promotor de anafase (APC) degrada proteínas como las ciclinas tipo B y la segurina para permitir la progresión de la mitosis (Tin Su, 2001).

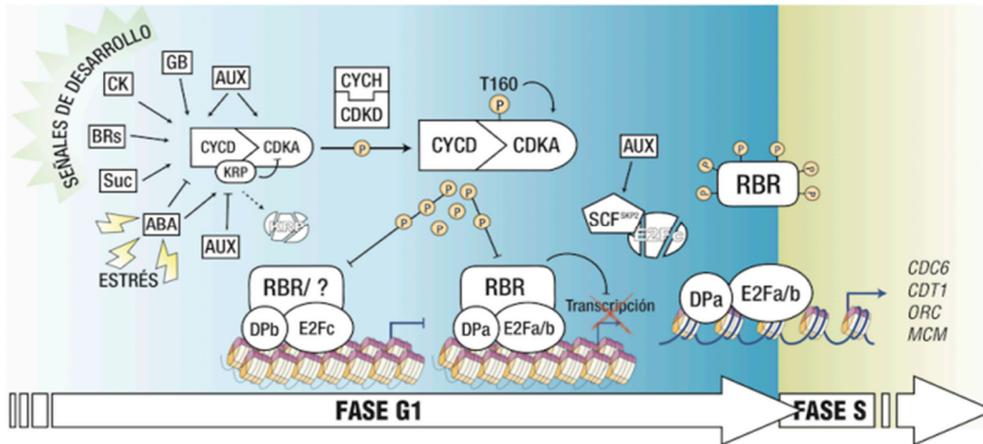


Figura 6. Regulación de la transición G1/S del ciclo celular en plantas.
Tomado de Garza-Aguilar et al., 2014.

6. Cinasas dependientes de ciclina.

Las CDKs son proteínas cinasas de serina y treonina que requieren de las ciclinas para ser funcionales. En plantas existen dos tipos de CDKs involucradas en la regulación del ciclo celular, las tipo A y las tipo B, siendo estas últimas exclusivas de plantas (Inzé y Veylder, 2006).

Las CDKs tipo A dentro de su secuencia primaria contienen un motivo de unión a ciclina constituido por los aminoácidos P-S-T-A-I-R-E. Dada la expresión, actividad constitutiva de la CDKA y la restricción en la expresión de los genes de CDKB hasta la fase tardía de S, se puede asumir que la mayoría de la actividad de cinasa encontrada en la fase G1 es provista por los complejos de CDKA (Jager et al., 2005). Sin embargo, la unión de CDKA con distintas ciclinas cambia con el avance del ciclo, por ello se sugiere que estas cinasas se encuentran involucradas en la proliferación celular (Inzé y Veylder, 2006). Además, se ha observado que la actividad de CDKA no se encuentra restringida a la transición G1/S, pues al asociarse a otras ciclinas como las tipo A, pueden actuar en la transición G2/M (Jager et al., 2005).

Por otro lado, el grupo de CDKs tipo B contienen motivos de unión a ciclina distintos, CDKB1 contiene el motivo PPTALRE mientras que CDKB2 tiene el motivo PPTTLRE. Los genes que codifican a las CDKs tipo B están altamente regulados, por lo que la expresión de CDKB1 comienza en la fase S, teniendo un pico de expresión, niveles de proteína y actividad de cinasa máxima en G2/M. Por otro lado, la expresión de CDKB2 se limita a G2

y mitosis (Jager et al., 2005). En años recientes se ha sugerido una función de CDKB1 en la reparación del daño a DNA, al asociarse a CycB1 para así, fosforilar y activar proteínas clave en la vía de Recombinación Homóloga (RH) en *Arabidopsis thaliana* (Weimer et al., 2016). Por otro lado, en arroz se ha mostrado que la abundancia proteica de CDKB2 se incrementa tras la inducción de daño a DNA con rayos X (Endo et al., 2012).

7. Ciclinas de plantas.

Las ciclinas, como su nombre lo sugiere, fueron descritas como proteínas cuya abundancia fluctúa a lo largo del ciclo celular (Evans et al. 1983). Las ciclinas son necesarias para la activación de las CDKs, además, modifican su estabilidad, su localización y proveen especificidad hacia el sustrato de fosforilación (Inzé y Veylder, 2006).

A través de la evolución, las plantas han acumulado un mayor número de genes que codifican para distintas ciclinas, a diferencia de otros eucariontes, lo cual les permite responder de forma más eficientemente ante diferentes condiciones ambientales. En *Arabidopsis thaliana*, se han reconocido hasta 10 familias de ciclinas, sin embargo, las más estudiadas son las tipo A, B y D (Wang et al., 2004). En maíz se han reportado cerca de 50 miembros de la familia de las ciclinas donde la mayoría no han sido estudiadas (Hu et al., 2010) (Figura 7).

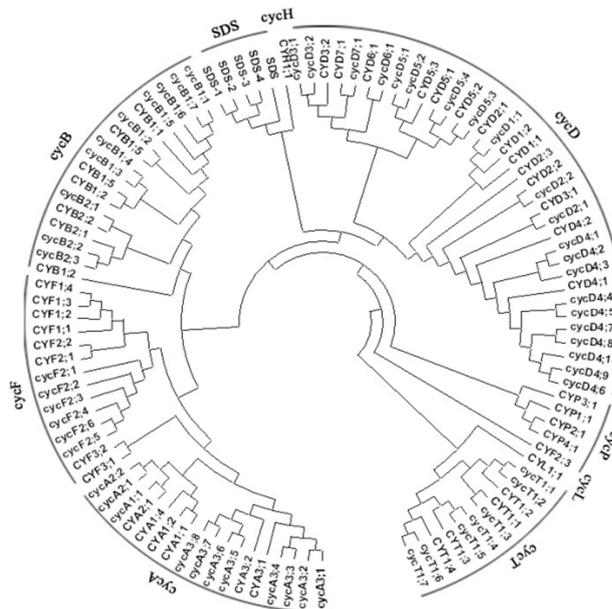


Figura 7. Árbol filogenético de ciclinas en *Zea mays*. Imagen tomada de Hu et al., 2010.

Las 10 ciclinas tipo A de *Arabidopsis thaliana* se asocian a CDKA durante la fase S y en la transición G2/M (Wang et al., 2004). La mayoría de las ciclinas tipo D se unen a CDKA para regular la transición G1/S (Inzé y Veylder, 2006), sin embargo, en maíz y *A. thaliana* se ha observado su asociación con CDKB (Godínez-Palma et al., 2017; Nakai T. et al., 2006). En *Arabidopsis thaliana* existen 10 tipos de ciclinas D, mientras que en arroz se han reportado 14 y en maíz 17, donde todas conservan el dominio amino terminal y la caja ciclina, necesaria para la unión con CDKs (Buendía-Monreal et al., 2011).

Típicamente las ciclinas tipo D se asocian con el inicio o reinicio del ciclo celular en respuesta a señales externas como fuente carbonada, fitohormonas y diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Figura 6) (Świątek et al., 2002).

7.1 Ciclinas tipo B

Las ciclinas tipo B constan de un dominio amino terminal y un carboxilo terminal, cada uno formado por 5 alfa-hélices, denotadas como H1-5 para el amino, y H1'-5' para el carboxilo. En el amino terminal se encuentra la firma característica de estas proteínas (H/Q)x(K/R/Q)(F/L) localizada en H1, además cuentan con un motivo de 9 aminoácidos (caja de destrucción), el cual media la degradación de la proteína vía proteasoma. Se ha mostrado la presencia de otros motivos conservados entre las ciclinas B, sin embargo, se desconoce su función (Renaudin et al., 1996; Dewitte y Murray, 2003).

En *A. thaliana*, se han reportado 9 ciclinas tipo B que regulan la entrada y salida de la mitosis (Wang et al., 2004). En los últimos años se ha estudiado la participación de las CycBs en la reparación del daño al DNA y se ha demostrado que el gen *cycb1;1* en *A. thaliana* se encuentra bajo la regulación de SOG1. Cuando la célula percibe daño a DNA por ruptura de doble cadena, se activa la vía de ATM, esta cinasa activa al factor transcripcional SOG1 quien estimula la expresión de *cycb1;1*, *cycb1;2*, *cycb1;3* y *cycb1;4*, mientras que de forma indirecta se reprime la expresión de otros complejos típicos de ciclo celular (Weimer et al., 2016). Además, se ha mostrado que otros miembros de la familia de CycB1 también están relacionadas con la respuesta al daño al DNA, ya que plantas mutantes de *cycb1;1*, *cycb1;2*, *cycb1;3* y *cycb1;4* son sensibles a la inducción de daño a DNA por diversos agentes químicos (Weimer et al., 2016; Chen et al., 2019). En maíz se han reportado 7 ciclinas B, sin embargo, no se ha mostrado la relación entre estas y la reparación del daño al DNA.

8. Regulación de complejos Cyc/CDK

Existen diferentes mecanismos que regulan la actividad de las CDKs, entre ellos se encuentran: asociación a diferentes ciclinas o a otras proteínas, ya sean inhibidoras como Proteínas relacionadas a Kip (KRPs), o moduladoras como la Subunidad reguladora de las CDKs (CKS), o bien, pueden unirse con el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA). Otra forma de regular la actividad de los complejos Cyc/CDK es mediante modificaciones postraduccionales tales como fosforilaciones activadoras o inhibidoras, por ejemplo, para que los complejos CycD/CDKA sean activos durante la transición G1/S, se requiere una fosforilación activadora en el residuo T160 de CDKA y la remoción de las fosforilaciones inhibitorias en T14 y Y15 (Figura 8) (Dewitte y Murray, 2003).

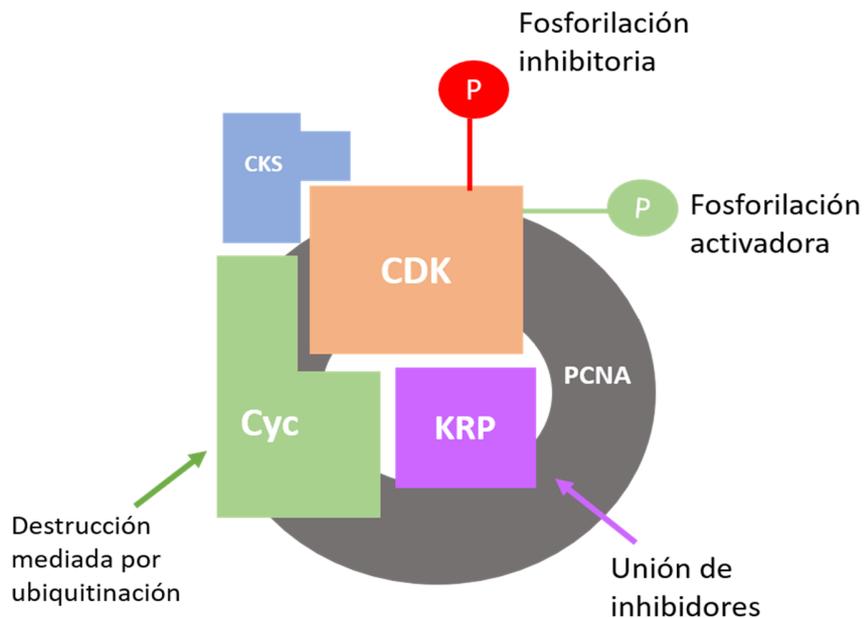


Figura 8. La actividad de las cinasas dependientes de ciclina es regulada a múltiples niveles. Modificado de Dewitte y Murray, 2003.

9. Daño al DNA

Las plantas se encuentran constantemente sometidas a diversos tipos de estrés, y cuentan con múltiples mecanismos de respuesta. Una de las consecuencias más importantes es el daño al DNA. Esto puede ocurrir por exposición a agentes físicos, por ejemplo, radiación o calor; o bien, por agentes químicos, presentes en el suelo o proporcionados de forma artificial; también, puede ocurrir naturalmente por eventos de re-replicación, por conflictos

de replicación-transcripción, donde ambas maquinarias pueden colisionar causando rupturas de doble cadena en el DNA (Li et al., 2018) o, tras diferentes ciclos de desecación y rehidratación en las semillas (Waterworth et al., 2015; Waterworth et al., 2016).

9.1 Daño a DNA en la semilla.

La desecación y la rehidratación de las semillas se asocian con altos niveles de daño, generado por especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en el deterioro de las proteínas, el DNA y las estructuras celulares. En particular, el envejecimiento de la semilla se asocia con la acumulación progresiva de daño al DNA en el embrión, incluido el aumento en la generación de sitios abásicos, modificación de bases, rupturas de una cadena del DNA (SSB: Single-Strand DNA Breaks) y rupturas de doble cadena de DNA (DSB: Double-Strand DNA Breaks) (Waterworth et al., 2016; Waterworth et al., 2019).

El daño al genoma se exagera por las condiciones ambientales adversas, generalmente alta temperatura y alta humedad relativa, que causan un mayor daño oxidativo y envejecimiento de las semillas. Esto resulta en su pérdida de vigor, que se manifiesta como una disminución de la rapidez y la uniformidad de la germinación, lo que lleva a pérdidas significativas en el rendimiento de las especies de cultivo, y finalmente culmina en una pérdida de viabilidad (Waterworth et al., 2016). Por lo tanto, el daño sobre el DNA debe repararse en las primeras etapas de la imbibición antes del inicio de la división celular, lo cual comienza durante la primera toma de agua de la semilla; se trata de un período prolongado de reparación pregerminativa. Esto se observa como altos niveles de síntesis de DNA de *novo* varias horas antes de la entrada de las células a la fase S (Waterworth et al., 2019; Waterworth et al., 2016).

10. Respuesta ante daño al DNA

Las plantas cuentan con múltiples mecanismos de reparación de daño al DNA, los cuales son desencadenados dependiendo del tipo de daño generado. Algunas vías de percepción de daño al DNA, tales como la vía ATM/ATR se encuentra conservada entre mamíferos y plantas. Además, se han reportado la presencia de proteínas homólogas o análogas funcionales de diversos mecanismos de reparación; algunos de estos mecanismos son: Recombinación homóloga (RH), unión de extremos no homólogos (NHEJ), Base Excision Repair (BER), Nucleotide Excision Repair (NER), Mismatch repair (MMR) (Spampinato, 2017).

10.1 Vía ATM/ATR

En plantas y mamíferos se encuentran conservadas, tanto en estructura como en función, las proteínas ataxia telangiectasia mutada (ATM) y ATM relacionada a Rad3 (ATR). Estas proteínas son los principales transductores primarios en respuesta ante daño al DNA (DDR) por rupturas de doble cadena (DSB) o de cadena sencilla (SSB) respectivamente (Yoshiyama et al., 2013).

Cuando ocurre una ruptura de doble cadena, el complejo proteico MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) recluta a la cinasa ATM al sitio de daño, además existe un recambio de nucleosomas para colocar a la histona marcadora de daño γ H2AX, la cual actúa como señalización para el reclutamiento de otras proteínas involucradas en la DDR. ATM es activada mediante autofosforilación, lo cual provoca su dimerización (Pedroza-García et al., 2021). En mamíferos, ATM fosforila en los motivos SQ/TQ de sus diversas proteínas blanco, como BRCA1, p53 y CHK2. La activación de p53, por la fosforilación de ATM, permite la reparación por daño al DNA mediante Recombinación Homóloga, unión de extremos no homólogos, y la vía de síntesis de translesión (TLS). Además, promueve la activación de los puntos de control del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia (Yoshiyama et al., 2013).

Por su parte, ATR es reclutado a los sitios dañados de cadena sencilla por la acción de los complejos 9-1-1, ATRIP y RPA. ATR fosforila los mismos motivos que ATM y tiene como blancos las proteínas BRCA1, p53 y CHK1 en mamíferos. En este punto, las rutas de reparación convergen, logrando activar también otros mecanismos de reparación como BER y NER (Yoshiyama et al., 2013). En maíz se ha mostrado que ATR es necesario para mantener la estabilidad del genoma y prevenir la endoreduplicación temprana, así como la muerte celular programada (Pedroza-García et al., 2021).

En plantas, no se han encontrado homólogos de las proteínas CHK1 y CHK2, pero si los sustratos de estas cinasas, como BRCA1 y E2F, lo cual sugiere la presencia de proteínas análogas funcionales. Además, el genoma de las plantas no contiene el gen *p53*, sin embargo, se ha descrito que el factor transcripcional SOG1 puede funcionar como análogo funcional de la proteína p53, ya que es capaz de regular la respuesta a daño al DNA. SOG1 es activado por ATM y puede desencadenar la reparación del DNA, los puntos de control del ciclo celular y la endoreduplicación (Figura 9) (Bourbousse et al., 2018; Yoshiyama et al., 2013). En mutantes de *sog1* en *A. thaliana*, que han sido expuestas a radiación

ionizante, los genes de respuesta a daño al DNA no son transcritos por lo que le es imposible a la planta contener contra dicho daño, indicando la importancia de SOG1 en la reparación de daño al DNA (Furukawa et al., 2010).

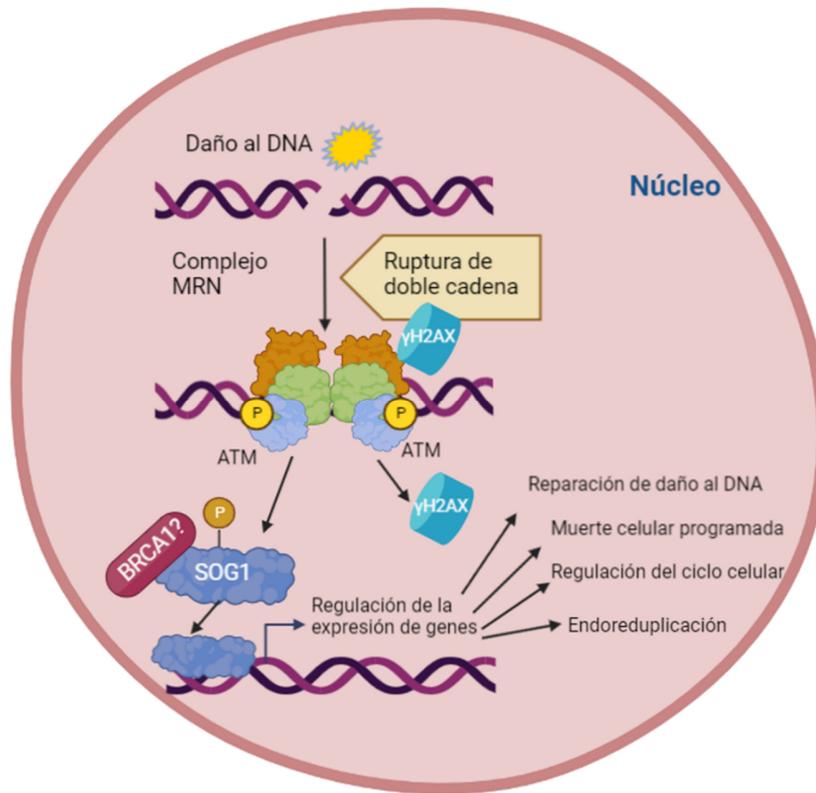


Figura 9. Vía de señalización ATM en plantas.
Modificada de Mahapatra y Roy, 2020.

10.2 Recombinación Homóloga

Uno de los mecanismos para reparar rupturas de doble cadena es la recombinación homóloga, y las proteínas que participan están conservadas en plantas y animales. En esta vía, se requiere la disponibilidad de un templado homólogo y se realiza en 4 pasos generales:

1. **Separación de la doble cadena de DNA y formación del filamento nucleoproteico.** Para la separación de la doble cadena se requiere de la acción del complejo BLM/DNA2 que tiene actividad de helicasa y nucleasa. Para el procesamiento inicial se requiere del posicionamiento del complejo MRN en el sitio de daño. Los extremos 3' son rápidamente recubiertos por la proteína de unión a

cadena sencilla RPA, esta proteína es remplazada por RAD51 formando un filamento nucleoproteico. Para que este último paso ocurra se requiere la acción de otras proteínas como BRCA2 y RAD54. Se han descrito otros miembros de la familia de RAD51 como XRCC2, XRCC3, RAD51C, y RAD51D, sin embargo, no se ha establecido con claridad su función, aunque posiblemente favorezcan la estabilización del filamento (Jing et al., 2019; Spampinato, 2017).

2. **Búsqueda de la homología e invasión de la cadena.** RAD51, con su actividad ATPasa, comienza a buscar la secuencia homóloga y posteriormente invade la doble cadena intacta, formando una estructura conocida como *loop* de desplazamiento (*loop-D*) estabilizada por RAD54 (Spampinato, 2017).
3. **Extensión del heterodúplex.** La cadena que invade el *loop-D* se extiende por la acción de la maquinaria de replicación con DNAPol δ (Spampinato 2017).
4. **Procesamiento del *loop-D*.** Una vez que se ha sintetizado el DNA quedan las cadenas entrecruzadas (estructura de Holliday), las cuales son procesadas por proteínas resolvasas como GEN1, MUS81-EME1, SLX1-SLX4 (Figura 10) (Spampinato, 2017; Punatar et al., 2017).

10.3 Unión de extremos no homólogos

Esta vía de reparación de rupturas de doble cadena, mediante su vía clásica, es propensa a errores pues no emplea un templado homólogo. Consta de 3 pasos generales:

1. **Reconocimiento del DNA dañado.** Las proteínas Ku70 y Ku80 reconocen el sitio dañado y se unen. Al complejo Ku-DNA se asocia la cinasa DNA-PK, formando una estructura muy estable que evita la exposición de los extremos.
2. **Procesamiento.** Dependiendo del grado de daño se reclutan diversas proteínas, usualmente, a través de la interacción con las proteínas Ku, por ejemplo, PNKP, que genera extremos 5'-fosfato y 3'-OH necesarios para la ligación. Por otro lado, se requiere la acción de la endonucleasa Artemis para eliminar nucleótidos dañados.
3. **Ligación.** La DNA ligasa IV es la encargada de cerrar la DSB, y funciona en conjunto con otras proteínas accesorias como XRCC4, XLF y PAXX (Figura10) (Spampinato, 2017).

Existe una vía alternativa de NHEJ, la cual se lleva a cabo en ausencia de factores clave de la vía canónica y puede implicar el alineamiento de secuencias

microhomólogos; por lo tanto, esta vía también se conoce como unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ). Se ha visto que esta vía se activa cuando ocurre daño al DNA durante la replicación (Spampinato, 2017).

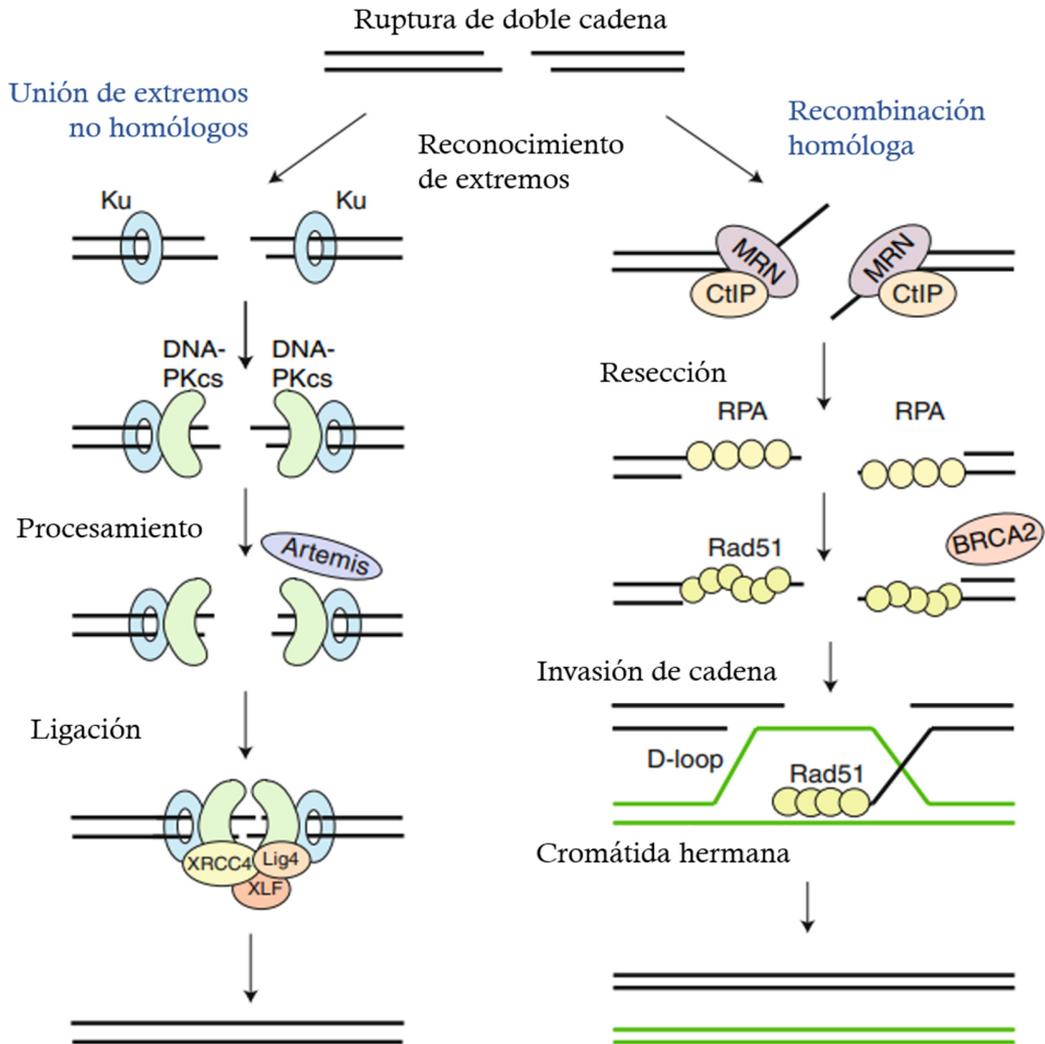


Figura 10. Comparación de la vía de Recombinación Homóloga y el pegado de extremos no homólogos en la resolución de una ruptura de doble cadena. Modificada de Brandsma y van Gent, 2012.

11. Daño al DNA y ciclo celular

Los mecanismos de percepción de daño al DNA están acoplados con la maquinaria del ciclo celular, con lo cual se limitan los efectos potencialmente mutagénicos sobre la replicación del DNA, o la segregación de cromátidas en presencia de daño al DNA (Sancar et al., 2004). Para minimizar las consecuencias celulares del estrés genotóxico, la respuesta

ante daño al DNA (DDR) constituye una red coordinada de respuestas que incluye la activación de los puntos de control del ciclo celular, los factores de reparación del DNA, la muerte celular programada (PCD) y la endorreduplicación (Waterworth et al., 2019).

En las plantas, la respuesta al daño a DNA a través de la transcripción abarca cientos de genes que codifican proteínas involucradas en la reparación del DNA, la remodelación de la cromatina y el metabolismo del DNA (Bourbousse et al., 2018; Culligan et al., 2006). En las primeras etapas de la imbibición de semillas, se reparan las rupturas de doble cadena que pudieron causarse durante la desecación, mediante recombinación homóloga. Las semillas recién embebidas generan respuesta al daño dependiente del factor transcripcional SOG1, indicativo de altos niveles de estrés genotóxico (Bourbousse et al., 2018; Waterworth et al., 2016). Algunos genes blancos de SOG1 están relacionados al ciclo celular como los inhibidores de CDKs *smr5* y *smr7*, donde las proteínas provenientes de estos genes se encuentran presentes en las primeras etapas de imbibición para evitar la progresión del ciclo celular cuando hay daño al DNA (Waterworth et al. 2016; Bourbousse et al., 2018), además, en mamíferos se ha mostrado la unión directa entre ATM y PCNA lo cual regula la síntesis de DNA deteniendo o evitando la replicación (Gamper et al., 2012).

Los puntos de control del daño al DNA son importantes para determinar el vigor y la viabilidad, tanto de las semillas como de las plántulas, destacando la importancia de la señalización del daño al DNA en la germinación, para promover el crecimiento de las plántulas (Waterworth et al., 2019).

12. Antígeno Nuclear de Proliferación Celular

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) es una proteína altamente conservada entre especies eucariontes. Esta proteína es parte de la familia de pinzas deslizantes, que se encuentra presente en levaduras, plantas y animales (Stoimenov y Helleday 2009). En organismos procariontes existe una proteína homóloga funcional conocida como subunidad- β , la cual no tiene una secuencia proteica conservada con respecto a la de PCNA (Figura 11), sin embargo, su estructura tridimensional es similar (Krishna et al., 1994).

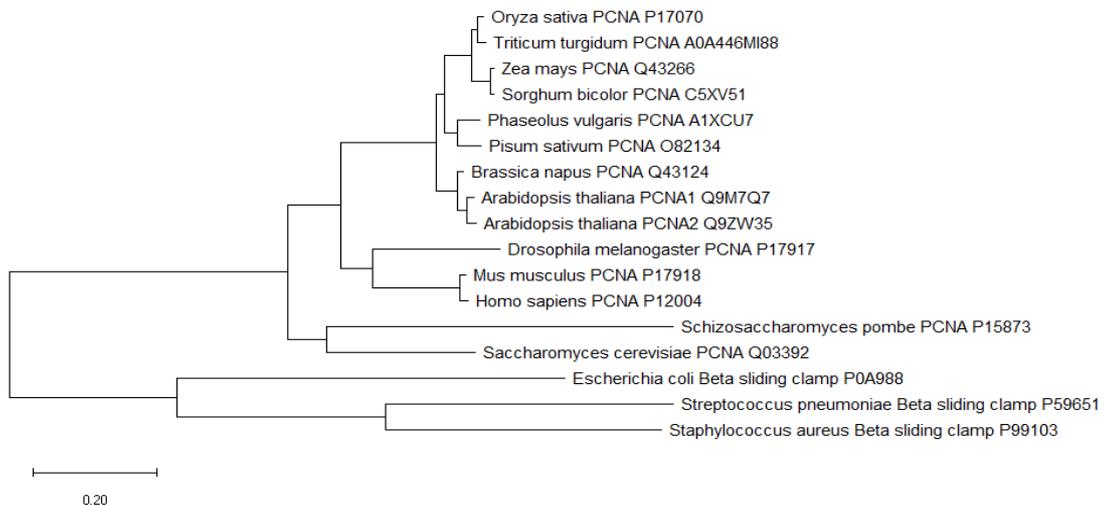


Figura 11. Árbol filogenético de la secuencia proteica de PCNA y la subunidad beta de distintas especies. Secuencias tomadas de www.uniprot.org y construcción mediante BLAST que calcula una alineación por pares entre una secuencia query (ZmPCNA) y el resto de secuencias dadas y comparadas en la base de datos de NCBI.

La proteína PCNA de humano fue cristalizada en 1994 (Krishna et al., 1994) y se determinó que es un homotrímero cuya estructura tiene forma de anillo, donde el amino terminal de cada monómero se une al carboxilo terminal del siguiente mediante una región denominada *connecting loop*. La región del *connecting loop* permite mantener la orientación adecuada del anillo para su función, ya que las caras frontal y posterior no son equivalentes (Figura 12).

El diámetro externo de PCNA mide 80 Å, mientras que el interno mide 30 Å y está enriquecido en aminoácidos cargados positivamente, lo cual le confiere la capacidad de interactuar con los fosfatos presentes en el DNA (Krishna et al., 1994).

En plantas, la secuencia y estructura de PCNA se conserva. El genoma de maíz tiene dos genes de PCNA, *pcna1* y *pcna2*, cuyos patrones de expresión son similares y sus mRNAs producen monómeros de 263 aminoácidos (29.1kDa) cuya identidad es de 98% con cuatro cambios de aminoácidos equivalentes (López I. et al., 1997). De forma similar, en *A. thaliana* existen dos proteínas PCNA, PCNA1 con una masa de 29.1 kDa y PCNA2 con 29.2 kDa. Existe un 96.96% de identidad entre las proteínas, además, existe evidencia de la formación de homotrímeros y heterotrímeros (Strzalka et al., 2012).

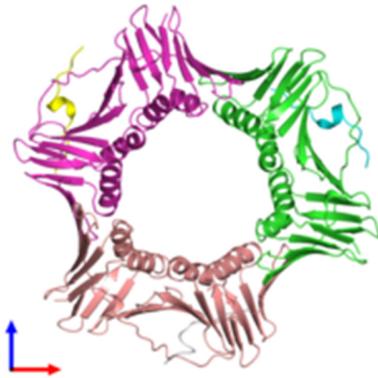


Figura 12. Estructura homotrimérica de PCNA. Tomado de Hishiki et al., 2009.

La función más estudiada de PCNA, en diferentes organismos eucariontes como levaduras, animales y plantas, es funcionar como factor de procesividad para la DNA polimerasa δ , aunque también es capaz de asociarse a otras DNA polimerasas como ϵ y las reparativas β , λ , η , κ y ι (Vivona y Kelman, 2003; Strzalka y Ziemienowicz, 2010). Además de la replicación, PCNA se encuentra involucrado en la regulación de otros procesos celulares como la reparación del daño al DNA, la cohesión de las cromátidas hermanas, la remodelación de la cromatina y el control del ciclo celular (Stoimenov y Helleday, 2009; Li et al., 2018).

Se ha sugerido la participación de PCNA en la regulación del ciclo celular, al unirse a complejos Cyc/CDK que son activos. No se conoce con claridad cuál es la función de esta interacción, sin embargo, se ha especulado de su posible implicación en el reconocimiento de sustratos o en la agregación de complejos proteicos (Sánchez et al., 2002; Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

PCNA funciona como plataforma molecular, al ser capaz de reclutar a distintas proteínas, facilitando que éstas interactúen entre sí. Las proteínas que se unen a PCNA contienen el motivo conservado QXXZXXAA (PIP; *PCNA interacting protein*), donde X representa un aminoácido indistinto, Z un aminoácido alifático, ya sea leucina, isoleucina o metionina (L, I o M) y A un aminoácido aromático (F o Y) (Warbrick, 1998). Existen variaciones de este motivo, por ejemplo, el motivo PIP like en el cual se puede excluir algún aminoácido aromático o la glutamina inicial. Además, existe otro motivo llamado APIM (*AlkB homologue 2 PCNA interacting motif*) el cual consta de los aminoácidos (K/R)-(F/Y/W)-(L/I/V/A)-(L/I/V/A)-(K/R), y se ha mostrado que las proteínas de humano ZRANB3, Topo II y RAD51B pueden unirse a PCNA por este motivo (Hara et al., 2018).

PCNA participa en diversos mecanismos de reparación, por ejemplo, se ha mostrado la asociación con DNA glicosilasas y AP endonucleasas, favoreciendo su actividad en la vía de reparación por escisión de bases (BER). Por otro lado, resulta indispensable la asociación de PCNA con MutL α , con la cual, la maquinaria de MMR reconoce el fragmento

del DNA que debe ser cortado, mientras que para la vía NER se requiere de la función procesiva de PCNA (Spampinato, 2017).

En mamíferos, se ha mostrado que como parte de la respuesta de daño al DNA vía ATM/ATR, se fosforila al factor transcripcional p53 quien a su vez regula el gen de *pcna* activando su expresión (Shan et al., 2003). A pesar de que en plantas no se encuentra presente p53, SOG1 ha mostrado tener genes blancos similares a p53 (Yoshiyama et al., 2013). Además, SOG1 contiene un motivo de unión a PCNA canónico (PIP).

La función mejor estudiada de PCNA en daño al DNA es durante el proceso conocido como “tolerancia al daño”, el cual ocurre cuando existe algún tipo de daño sobre el DNA que no se reparó por la DDR. Este proceso ayuda a que las lesiones sean reparadas en el momento, o bien puedan ser omitidas por las polimerasas y sean reparadas posteriormente evitando el estancamiento y colapso de las horquillas de replicación (Leung et al., 2018).

La tolerancia al daño se puede subdividir en 2 mecanismos: la síntesis de translesión (TLS) donde una polimerasa de baja fidelidad como Pol η , Pol ι o Pol κ , colocan un nucleótido al azar al leer una lesión voluminosa sobre el DNA, por lo que este mecanismo es altamente propenso a errores (*error-prone*). Por otro lado, existe el cambio de templado (TS) en el cual se emplea el material no dañado del dúplex homólogo, similar a la recombinación homóloga, generando un mecanismo sin errores (*error-free*). Estos dos mecanismos están directamente regulados por PCNA; dependiendo del tipo de modificación postraduccional que adquiera la proteína, se favorecerá una vía sobre la otra para tolerar el daño. Si PCNA se encuentra monoubiquitinado en la K164 se favorecerá la vía de TLS, por el contrario, si se poliubiquitina en la misma lisina se desencadena el método TS (Leung et al., 2018).

PCNA también se encuentra implicado en la recombinación homóloga, y su papel en este mecanismo también está influenciado por el tipo de modificación postraduccional presente en la proteína, por ejemplo, en levadura, cuando PCNA se encuentra en una horquilla de replicación durante la fase S, usualmente se encuentra sumoilada en la lisina 164 (K164) lo que promueve que se reclute a la helicasa Srs2 cuya función es evitar la recombinación homóloga no deseada (Pfander et al., 2005; Li et al., 2018). Por otro lado, se ha descrito que la proteína Eco1 de levadura acetila a PCNA en la lisina 20 (K20), lo que estimula la recombinación homóloga; esta modificación es inducida por daño a DNA, por lo que ayuda a proteger la integridad del genoma, además, la acetilación en K20 es mutuamente excluyente a la sumoilación en K164 (Billon et al., 2017). En plantas, se ha mostrado que

la poliubiquitinación en K164 también promueve recombinación homóloga (Sakamoto et al., 2018).

Antecedentes directos.

La germinación, desde el punto de vista bioquímico, se encuentra estrechamente relacionada con el ciclo celular y su regulación (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003). Los puntos de control de daño al DNA son importantes para determinar el vigor y la viabilidad de las semillas, destacando la importancia de la señalización del daño al DNA en la germinación para repararlo y promover el crecimiento de las plántulas (Waterworth et al., 2019).

Durante las últimas dos décadas del siglo XX, quedó bien establecido que durante las etapas tempranas de la germinación ocurre la reparación de las macromoléculas dañadas, en especial del DNA, mostrando síntesis de *ново* que ocurre mucho antes de comenzar la replicación del DNA (Elder y Osborne 1993; Zlatanova et al., 1987; Bewley et al., 2012).

En las primeras etapas de la imbibición se reparan las rupturas de doble cadena y otros tipos de daño al DNA, causados por estrés oxidativo, el cual puede generarse durante la desecación. Se emplean diversos mecanismos de reparación, entre ellos la recombinación homóloga. Las semillas recién embebidas, generan respuesta al daño dependiente del factor transcripcional SOG1, indicativo de altos niveles de estrés genotóxico (Waterworth et al., 2016; Bourbousse et al., 2018).

Agentes genotóxicos tales como moléculas químicas o radiación ionizante pueden causar daño químico y estructural sobre el DNA. En algunos casos, se afecta severamente la integridad del genoma de las plantas, lo cual afecta los procesos de replicación y transcripción, desencadenando la muerte celular (Balestrazzi et al., 2011). Diversos agentes genotóxicos, se han empleado en modelos de inducción de daño a DNA en plantas, para el estudio de los diferentes procesos celulares involucrados en la respuesta (Hirakawa et al., 2017; Da Ines et al., 2013; Endo et al., 2012), sin embargo, pocos han sido desarrollados en un contexto de germinación.

Se ha reportado que, durante la respuesta ante daño al DNA, uno de los primeros procesos en detenerse es el ciclo celular, ya que, de no ser así, se podrían generar células aberrantes con material genético dañado. Además, se ha mostrado que el factor transcripcional SOG1

es capaz de inhibir la expresión de los genes que producen ciclinas y CDKs típicas de ciclo celular, y favorecer la expresión de proteínas inhibidoras de CDKs como Siamese-Related 5 y 7, impidiendo la progresión del ciclo celular (Yi et al., 2014; Weimer et al., 2016; Waterworth et al., 2016; Nisa et al., 2019). Recientemente se ha demostrado que la vía de recombinación homóloga se encuentra activa durante la fase G1 del ciclo celular, aun en ausencia de las cromátidas hermanas empleando ncRNAs que permiten reclutar la maquinaria de reparación (Yilmaz et al., 2021).

Aun cuando SOG1 no regula la expresión de *cdkb1*, si lo hace sobre los genes de *cycb1*, favoreciendo su expresión. Además, plantas mutantes para cada *cycb1* de *A. thaliana* muestran que no son totalmente redundantes y que todas contribuyen en la respuesta al daño al DNA (Chen et al., 2019; Weimer et al., 2016). También, en raíces dañadas por radiación se observa la acumulación progresiva de CycB1-GFP, con un pico máximo 5 h después de la irradiación (Ricaud et al., 2007).

Se ha sugerido que los complejos CycB1/CDKB1 en *A. thaliana* están implicados en la reparación de rupturas de doble cadena mediante recombinación homóloga, al fosforilar a la proteína RAD51 quien es esencial para la formación del filamento nucleoproteico. Estos complejos son específicos, pues la asociación de CycB1 con CDKB2 no tiene efecto sobre plantas con daño a DNA, indicando que estos complejos funcionan como complejos típicos de ciclo celular (Weimer et al., 2016; Schnittger y De Veylder, 2018). Además, se ha mostrado que la formación de foci reparativos de RBR son dependientes de la actividad de complejos CycB1/CDKB1 y de ATM/ATR (Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017; Nisa et al., 2019). Por otro lado, en *Oryza sativa* se ha mostrado mediante un ensayo de inducción de daño al DNA por rayos X, que la proteína CDKB2 se induce tras el tratamiento (Endo et al., 2012).

En respuesta a daño al DNA se ha descartado la función de CDKA, ya que plantas con pérdida de función de esta proteína, en condiciones de daño al DNA, se comportan similar a las plantas wild type (WT), indicando que CDKA no participan en la vía de señalización para reparar el daño (Weimer et al., 2016).

En arroz y *A. thaliana* se ha observado la inducción de *rad51* (Endo et al., 2012; Sidler et al., 2015), así como la localización de la proteína dentro del núcleo tras la generación de daño al DNA por rayos X y zeocina, un intercalante de DNA que genera rupturas de doble cadena (Hirakawa et al., 2017; Da Ines et al., 2013). Por lo que resulta una proteína

marcadora de la reparación del daño de doble cadena vía recombinación homóloga. En maíz se ha reportado que existen dos genes de *Rad51*, inicialmente llamados *rad51a* y *rad51b* que tienen una identidad del 90% (Li et al., 2007). Posteriormente fueron renombrados como *Rad51A1* y *Rad51A2* por su homología con genes de otras especies como trigo y arroz (Sidhu et al., 2017). Recientemente se ha mostrado que RAD51A1 podría interactuar con proteínas involucradas en la respuesta por estrés biótico y abiótico (Milsted et al., 2022).

Por otro lado, el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) está involucrado en múltiples mecanismos de reparación del daño al DNA (ver introducción), sin embargo, resulta de gran interés su participación en la vía de recombinación homóloga. La modificación postraduccional presente influye en la función de la proteína: cuando PCNA se encuentra en una horquilla de replicación en la fase S, usualmente se encuentra sumoilada en K164 con lo cual se recluta a la helicasa Srs2 cuya función es evitar la recombinación homóloga no deseada (Pfander et al., 2005; Li et al., 2018). Por otro lado, se ha descrito que la proteína Eco1 acetila a PCNA en K20, lo que estimula la recombinación homóloga; estas modificaciones son inducidas por daño al DNA, por lo que ayudan a proteger la integridad del genoma, además la acetilación en K20 y la poliubiquitinación en K164 resultan mutuamente excluyentes a K164 sumoilada (Billon et al., 2017).

En mamíferos, se ha mostrado que tras la inducción de daño al DNA mediante radiación y, la cantidad total de PCNA no cambia, sin embargo, existe una mayor cantidad de esta proteína unida a cromatina de forma dosis dependiente al nivel de la radiación recibida. Además, PCNA co-localiza en el DNA en foci donde se ha incorporado BrdU, es decir, donde se ha encontrado síntesis de *novó* de DNA después de la inducción de daño, indicativo de la reparación del daño al DNA (Balajee y Geard, 2001), lo anterior sugiere la participación de PCNA en la reparación de rupturas de doble cadena.

En plantas se han estudiado los sistemas de ubiquitinación y sumoilación de PCNA, tanto los residuos donde ocurren las modificaciones, como la función de estas, y se ha mostrado su conservación en relación a mamíferos, por ejemplo, la poliubiquitinación en K164 desencadena la señalización para la reparación de daño vía recombinación homóloga (Strzalka et al., 2013; Strzalka et al., 2012).

En plantas de *A. thaliana*, donde se indujo daño al DNA por ruptura de doble cadena debido a la presencia de bleomicina, se mostró que el nivel de transcripción de PCNA no parece aumentar de forma significativa, sin embargo esto no es indicativo, necesariamente, de que no se encuentre participando en la reparación, ya que en el mismo estudio se mostró que los niveles de los mensajeros de las cinasas ATM y ATR tampoco son afectados, aun cuando está ampliamente demostrada la función de estas en la reparación del daño al DNA (Biedermann et al., 2017).

Por último, PCNA se postula como una plataforma molecular que permite interacciones entre proteínas, mediadas por el motivo de interacción PIP. En maíz se ha estudiado la interacción entre PCNA y proteínas reguladoras de ciclo celular a lo largo de la germinación, por ejemplo, CycD2;1, CycD3;1, CycD4;2, CycD5;3, CycD6;1, CDKA y CDKB1;1 (Garza-Aguilar et al., 2019; Becerril et al., 2012; Sánchez et al., 2002; Gutiérrez et al., 2005; Lara-Núñez, et al., 2008).

En mamíferos, se ha observado la interacción entre p53 y PCNA, por otra parte, en plantas, no se ha mostrado la interacción de PCNA con SOG1, sin embargo, SOG1 y RAD51 contienen motivos PIP, lo que permitiría su interacción con PCNA.

Justificación

La integridad del DNA es fundamental para el desarrollo de todos los organismos. Para las plantas, es de suma importancia mantener el programa morfogénético que les permitirá generar una nueva planta a partir de una semilla, dentro de este programa se encuentran los mecanismos necesarios para conservar la viabilidad, al mantener la integridad de su material genético. Por ello, resulta de interés el estudio de marcadores moleculares que permitan dilucidar los mecanismos de reparación de macromoléculas, especialmente del DNA.

En los últimos años se ha mostrado evidencia de que algunas proteínas relacionadas con ciclo celular, tales como CycB1, CDKB1 y PCNA también participan en la reparación del daño al DNA; sin embargo se desconoce si estas tres proteínas actúan regulando la misma vía, por lo que será importante mostrar las posibles asociaciones CycB1-PCNA, CDKB1-PCNA y RAD51-PCNA, con la finalidad de mostrar la posible participación de estas proteínas en la reparación de rupturas de doble cadena de DNA, empleando un modelo de inducción de daño al DNA en la germinación de maíz.

Hipótesis

Las proteínas relacionadas a ciclo celular CycB1;2 y PCNA interaccionan de forma independiente con la proteína reparativa RAD51A2, además existe actividad de cinasa específica sobre RAD51A2, mostrando su posible participación durante la respuesta ante daño al DNA.

Objetivo general

Determinar la interacción entre RAD51A2 con CycB1;2 o con PCNA, así como la actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 y CycB1;2 sobre RAD51A2.

Objetivos particulares

1. Generar un modelo *in silico* de la interacción RAD51A2-PCNA.
2. Clonar los genes *Rad51A2* y *cycb1;2* de maíz en vectores de expresión bacterianos.
3. Sobre expresar y purificar las proteínas recombinantes His-PCNA, MBP-CycB1;2, PEX-RAD51A2 y MBP-RAD51A2.
4. Determinar las asociaciones PCNA-RAD51A2, CycB1;2-RAD51A2 y PCNA-CycB1;2.
5. Evaluar la actividad de cinasa asociada a CycB1;2 y CDKB1;1 sobre RAD51A2.
6. Generar y estandarizar un modelo de inducción de daño al DNA en ejes embrionarios de maíz.

Metodología

Búsqueda de motivos de unión a PCNA.

Las secuencias proteicas en formato FASTA se obtuvieron de http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index, así como de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Posteriormente, empleando la herramienta fuzzpro (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzzpro>) asignando los motivos: Q-x-x-[LIM]-x-x-[FY], Q-x-x-[LIM]-x-x-[FY]-[FY], Q-x-x-[LIM] o [FY]-x-x-[MLI]-x-x-Q se recabaron las posiciones en la secuencia primaria de cada una de las proteínas, donde se encuentran estos motivos.

Modelado de estructuras tridimensionales

Modelado por homología

A partir de las secuencias proteicas primarias obtenidas, se realizó un modelo de estructura tridimensional empleando el servidor SWISS-MODEL de ExPASy tools, el cual compara la secuencia proporcionada, con la base de datos de estructuras cristalizadas (PDB), buscando similitudes. Para RAD51 y CDKB1;1 se generaron los modelos basados en la estructura de humanos y para PCNA en las estructuras cristalizadas de *Arabidopsis thaliana*. En el caso de CycB1;1 y CycB1;2, que no mantiene alta conservación, el modelo se realizó con base en la estructura de CycA2 de humanos, logrando predecir únicamente el carboxilo terminal.

También empleando las estructuras primarias se realizó el modelado por homología mediante MODELLER. Para cada modelo obtenido se generó su diagrama de Ramachandran y se analizó mediante QMEAN.

Modelado por plegado

A partir de las secuencias proteicas primarias obtenidas, se realizó un modelo de estructura tridimensional empleando el servidor I-TASSER, el cual fragmenta la secuencia y compara la formación de estructuras secundarias con estructuras cristalizadas, posteriormente se reensambla de acuerdo a la estructura primaria y se minimiza la energía. Cada modelo se analizó mediante RMSD.

Los códigos PDB empleados para cada modelo por homología y plegado se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. PDB moldes para modelado de estructura terciaria.			
Proteína a modelar	Proteína molde	PDB	Servidor
PCNA	AtPCNA	6o09	Swiss-Model
PCNA	AtPCNA	6o09	Modeller
RAD51B	HsRAD51 Homólogo1	5NWL	Swiss-Model
RAD51B	HsRAD51 Homólogo1	5NWL	Modeller
RAD51B	HsRAD51 Homólogo1	5JZC	I-TASSER
CDKB1;1	HsCDK2	6GUE	Swiss-Model
CDKB1;1	HsCDK2	6Q4G	Modeller
CDKB1;1	HsCDK12	4CJY	I-TASSER
CycB1;1	HsCycA2	4CFU	Swiss-Model
CycB1;1	HsCycA2	7B5L	Modeller
CycB1;1	HsCycA	3DDQ	I-TASSER
CycB1;2	HsCycA	4BCO	Swiss-Model
CycB1;2	HsCycB	2JGZ	I-TASSER

Dinámica molecular

Cada sistema fue sometido a simulación por dinámica molecular (DM) por 200 ns utilizando el campo de fuerza AMBER14SB, implementado en el software GROMACS 2019.6. Cada sistema se solvató con moléculas de agua TIP3P en una caja cúbica cuyas caras se encuentran a 1.0 nm de distancia de la proteína. Se añadieron aleatoriamente iones de sodio y cloruro para neutralizar el sistema y alcanzar una concentración de 0.15 M. Se minimizó la energía y se equilibró durante 1.0 ns en condiciones isotérmico-isocórico (NVT) e isotermino-isobáricos (NPT) antes de las producciones de DM. La temperatura se fijó a 300 K, mientras que la presión se mantuvo a 1.0 bar.

Obtención de muestras de raíz

Semillas de maíz Chalqueño fueron desinfectadas con NaClO al 0.2% en agitación constante por 5 min, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua desionizada estéril, se colocaron sobre papel filtro estéril para remover el exceso de agua. Se colocaron en cajas de agar 0.7 % y se incubaron por 36 h a 25 °C en oscuridad. Al menos 15 semillas protruidas se transfirieron a cajas de agar 0.7 % + zeocina 40 µM y se incubaron por 0, 6 o

24 h. Finalmente, se recolectaron raíces (1 cm) y se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Extracción de RNA

Por cada tratamiento se emplearon 15 ejes embrionarios o 15 raíces. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y fueron pulverizadas finamente. Se pesaron 100 mg de cada muestra y se mantuvieron congeladas hasta comenzar el proceso de extracción. Se siguieron las indicaciones sugeridas por el proveedor de Spectrum Plant Total RNA Kit. Se cuantificó el RNA obtenido espectrofotométricamente (Bio-Drop) y se realizó la reacción de DNasa (Promega) siguiendo el manual de usuario. Se monitoreó la integridad del RNA en un gel de agarosa 2 % con TAE-DEPC.

Obtención de cDNA

Partiendo de 1 µg de RNA, se agregaron 2 µL de una mezcla de oligo dT (500 µg/mL) y se incubó por 5 min a 65 °C, concluida la incubación se realizó la retrotranscripción con la transcriptasa reversa M-MuLV (NEB, N° cat. M0253L) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó a 42 °C por 1 h y, por último, la enzima se inactivó incubando la mezcla de reacción a 65 °C por 20 min.

Clonación

Rad51A2

Se diseñaron primers específicos para la amplificación del cdsDNA de *Rad51A2* (Zm00001d041757), agregando los sitios de restricción para el reconocimiento de las enzimas NcoI y NotI en los primers forward y reverse respectivamente. Se tomó en cuenta el número de nucleótidos requeridos por cada enzima para el reconocimiento óptimo. Se eligieron dichas enzimas con la finalidad de realizar clonación sitio-dirigida dentro del vector de expresión *pPAL7*. Los oligos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBT de la UNAM.

Partiendo de cDNA obtenido de los tratamientos en raíz, se optimizaron las condiciones de amplificación y se escaló la reacción a 50 µL empleando la DNA polimerasa de alta fidelidad, I Proof (Bio-Rad N° cat 1725300) a 59 °C como temperatura de alineamiento y 35 ciclos. El producto de PCR se purificó por gel empleando GeneJET gel extraction Kit. Se cuantificó y se realizó una doble restricción con NcoI y NotI en 600 ng de inserto y se purificó mediante Expin PCR Sv protocol (N° cat. 103-102).

A partir de 50 ng de vector pPAL7, previamente digerido con NcoI y NotI, y usando una relación 2:1, se realizó la ligación, Ligasa T4 (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Subclonación de *Rad51A2*

Se realizó una reacción de PCR (50 µL) usando como templado 8 ng de la construcción *pPAL7-Rad51A2* y los primers de clonación con sitios de restricción para NcoI y NotI. El producto de PCR se purificó mediante Expin PCR Sv protocol, se cuantificó y se realizó una doble restricción con NcoI y NotI en 600 ng de inserto y se purificó nuevamente mediante Expin PCR Sv protocol.

A partir de 50 ng de vector pMAL-c5X, previamente digerido con NcoI y NotI, y usando una relación 2:1, se realizó la ligación con Ligasa T4 (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

CycB1;2

Se diseñaron primers específicos para la amplificación del cdsDNA de *cycb1;2* (GRMZM2G034647_P01), agregando los sitios de restricción para el reconocimiento de las enzimas NcoI y EcoRI en los primers forward y reverse respectivamente. Se tomó en cuenta el número de nucleótidos requeridos por cada enzima para el reconocimiento óptimo. Se eligieron dichas enzimas con la finalidad de realizar clonación sitio-dirigida dentro del vector de expresión *pMAL-c5x*.

Partiendo de cDNA obtenido de ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 h, se optimizaron las condiciones de amplificación mediante Touch-Down (Tabla 2) y se escaló la reacción a 50 µL empleando DNA polimerasa de alta fidelidad, Phusion Plus DNA Polymerase (Thermoscientific N° cat F630S). El producto de PCR se purificó por gel empleando GeneJET gel extraction Kit. Se cuantificó y se realizó una doble restricción con NcoI y EcoRI-HF en 600 ng de inserto y se purificó mediante Expin PCR Sv protocol (N° cat. 103-102).

A partir de 50 ng de vector *pMAL-c5x*, previamente digerido con NcoI y EcoRI-HF, y usando una relación 3:1, se realizó la ligación con Ligasa T4 (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2. Condiciones de amplificación por Touch Down			
Step	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	99	180	1
Desnaturalización	99	10	
Alineamiento1*	70-55	45	
Extensión	72	60	
Desnaturalización	99	10	25
Alineamiento2	60	45	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

*Durante cada ciclo la temperatura disminuye 1 °C, de tal forma que el primer ciclo tiene como temperatura de alineamiento 70 °C y el último 55 °C.

Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBT, UNAM.

Inducción de proteína recombinante

Para realizar la expresión de las proteínas de interés, se transformaron células de *E. coli* *BL21-RILP* para His-PCNA, *Rosetta2* para PEX-RAD51A2 y MBP-CycB1;2 y *Tuner* para MBP-RAD51A2 empleando ampicilina (100 µg/mL) como marcador de selección.

Una colonia de cada cultivo se inoculó en 3 mL de medio LB+Amp independientemente y se incubaron a 37 °C ON. Posteriormente, se tomaron 2 mL del precultivo y se añadieron a 200 mL de LB+Amp. Se incubaron a 37 °C en agitación hasta que se obtuvo una densidad óptica entre 0.6 y 0.8, a continuación, se agregó la cantidad necesaria de IPTG para una concentración final de 0.5 mM para las cepas *Rosetta* y *BL21-RILP*, mientras que para la cepa *Tuner* se empleó una concentración final de IPTG de 0.05 mM. Las bacterias se mantuvieron a 37 °C por 3 h. Una vez transcurrido el tiempo necesario se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min, se retiró el medio de cultivo y el botón celular se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento.

Purificación de proteína recombinante

Las bacterias provenientes de la inducción se resuspendieron en 3 mL de buffer de lisis (Tabla 3) y se agregaron 10 unidades de lisozima (SIGMA-ALDRICH®, cat: L6876) por 20

min a temperatura ambiente. Las muestras se sonicaron (SONICS Vibra Cell®, VC 505) a una amplitud del 20 %, con 3 pulsos de 20 s ON/ 20 s OFF. Posteriormente, se agregó inhibidores de proteasas PMSF 1 mM y benzamidina 1 mM. El lisado se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró por una membrana de 0.45 µm. El filtrado se colocó en contacto con la resina en una columna previamente empacada y equilibrada. Se incubó por 30 min a 4 °C en agitación. Para la purificación de PCNA se empleó Co-NTA Agarosa, para MBP-RAD51A2 y MBP-CycB1;2 se empleó Amintra agarosa. Se realizaron 10 lavados de 5 mL cada uno con buffer de lavado. Finalmente se realizaron 4 eluciones con 500 µL.

Solubilización y purificación de PEX-RAD51A2

Las bacterias provenientes de la inducción se resuspendieron en 3 mL de buffer de lisis (Tabla 3) y se agregaron 10 unidades de lisozima (SIGMA-ALDRICH®, cat: L6876) por 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se sonicaron (SONICS Vibra Cell®, VC 505) a una amplitud del 20 %, con 3 pulsos de 20 s ON/ 20 s OFF. Posteriormente, se agregó 1 % de sarkosyl más inhibidores de proteasas y se incubó en agitación a 4 °C por 30 min. Tras la incubación se agregó tritón al 2 % y se mantuvo en agitación por 30 min. Después el lisado se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se diluyó de tal forma que la concentración final de tritón fuera 1 %, se filtró por una membrana de 0.45 µm y el filtrado se colocó en contacto con la resina en una columna (Profinity eXact resin) previamente empacada y equilibrada. Se incubó por 30 min a 4 °C en agitación. Se realizaron 10 lavados de 5 mL cada uno con buffer de lavado. Finalmente se realizaron 3 eluciones con 500 µL incubando cada una por 10 min a temperatura ambiente.

Tabla 3. Soluciones empleadas durante la purificación		
Buffer de Lisis NTA-Co	Buffer de Lisis Profinity Exact System	Buffer de lisis Amintra-agarosa
NaH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 10 mM pH= 8.0 ajustado con NaOH Benzamidina 1 mM se agrega en fresco	NaH ₂ PO ₄ 0.1 M pH= 7.2 ajustado con NaOH	Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM EDTA 1 mM pH= 7.4

PMSF 1 mM se agrega en fresco		
Buffer de lavado NTA-Co	Buffer de lavado Profinity Exact System	Buffer de lavado Amintra-agarosa
NaH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 20 mM pH= 8.0 ajustado con NaOH	NaH ₂ PO ₄ 0.1 M pH= 7.2 ajustado con NaOH	Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM EDTA 1 mM pH= 7.4
Buffer de elución NTA-Co	Buffer de elución Profinity Exact System	Buffer de elución Amintra-agarosa
NaH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 300 mM pH= 8.0 ajustado con NaOH	H ₃ PO ₄ 0.1 M NaH ₂ PO ₄ 0.1 M pH= 7.2 NaF 0.1M	Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM EDTA 1 mM Maltosa 10 mM pH= 7.4
Todos los buffers se usan y almacenan a 4°C.		

Interacción de proteína recombinante

Cada pellet fue resuspendido en 3 mL del buffer correspondiente. Se mezclaron los cultivos de las proteínas a interactuar y se agregaron 10 unidades de lisozima por 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se sonicaron a una amplitud del 20 %, con 3 pulsos de 20 s ON/ 20 s OFF. El lisado se incubó por 1 h a 4 °C en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró por una membrana de 0.45 µm. El filtrado se colocó en contacto con la resina en columna previamente empacada y equilibrada. Se incubó por 30 min a 4 °C en agitación. Se realizaron 10 lavados de 5 mL cada uno con buffer de lavado. Finalmente se realizaron 4 eluciones con 500 µL. En el caso de lavados astringentes se agregó β-mercaptoetanol 5 mM, glicerol 5 % y tritón 1 % al buffer de lavado (50 mL) y posteriormente se lavó con 30 mL de buffer sin astringentes.

Actividad cinasa

Complejos recombinantes

Las proteínas recombinantes CDKB1;1 y CDKA se activaron por la coexpresión con la cinasa activadora Cak1. Los complejos recombinantes CDKB1;1-CycB1;2, CDKB1;1-CycB2;1, CDKA-CycB1;2 y CDKA-CycB2;1 se formaron y se incubaron con buffer de cinasa (Tris-HCl 70 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, EGTA 5 mM, ATP 1 mM) con 1.5 µCi de [γ -³²P] ATP por 1 h a 30 °C. Como sustrato de fosforilación se empleó 500 ng de MBP-RAD51A2. Las reacciones se detuvieron agregando buffer de carga-SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 85 °C por 5 min y se separaron mediante un gel de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE. Tras la electroforesis se enjuagaron los geles para retirar el exceso de SDS, se tiñeron con Azul Coomassie por 10 min y se dejaron desteñir en agua toda la noche. Los geles se secaron al vacío a 80 °C durante 1 h y luego se expusieron durante 5 días a la placa de detección de Europio (Kodak). La detección se realizó escaneando la placa de Europio utilizando el equipo Personal Imager FX (Bio-Rad).

Actividad cinasa asociados a inmunoprecipitados.

Los complejos obtenidos mediante inmunoprecipitación se lavaron con 450 µl de buffer de cinasa. Posteriormente, se incubaron con 20 µl de buffer de cinasa con 2 µCi de [γ -³²P] ATP por 30 min a 30 °C. Como sustrato de fosforilación se empleó 1.5 µg de MBP-RAD51A2. Las reacciones se detuvieron agregando buffer de carga-SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 85 °C por 5 min y se separaron mediante un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE. Tras la electroforesis se enjuagaron los geles para retirar el exceso de SDS, se tiñeron con Azul Coomassie por 10 min y se dejaron desteñir en agua toda la noche. Los geles se secaron al vacío a 80 °C durante 1.5 h y luego se expusieron durante 48 h a la placa de detección de Europio (Kodak). La detección se realizó escaneando la placa de Europio utilizando el equipo Personal Imager FX (Bio-Rad).

Viabilidad y vigor con azul de tetrazolio

Se colocaron 90 semillas o ejes embrionarios en agua por 24 h a temperatura ambiente, para lograr reblandecer los tejidos. Se preparó una solución de cloruro de tetrazolio al 1 % en agua desionizada estéril, la cual se puede almacenar por hasta 24 h a 4 °C en oscuridad.

Para realizar el ensayo, se eliminó el exceso de agua de las semillas o ejes en papel absorbente, se les realizó un corte longitudinal y se recolectó una de las mitades. Se

colocaron en una caja Petri, preparada previamente con papel filtro humedecido en la solución de tetrazolio, de tal forma que el embrión pueda tomar la solución. Se cubrió la caja con papel aluminio y se colocó a 25 °C por 1 h.

Finalmente, se cuantificaron las semillas y ejes donde el embrión se tiñó completamente de color morado (viables), parcialmente teñidas (viables no vigorosas) y las que no se hayan teñido (No viables).

Imbibición de ejes embrionarios

Con ayuda de una navaja se extrajeron los ejes embrionarios de semillas secas de maíz variedad Chalqueño y se retiró el excedente de endospermo. Los embriones fueron desinfectados con NaClO al 0.2 % en agitación constante por 5 min, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua desionizada estéril, se colocaron sobre papel filtro estéril para remover el exceso de agua. Los ejes se colocaron en buffer de imbibición (BI) (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 % m/v sacarosa, 10 mM MgCl₂) y se incubaron por 0 o 1 h en oscuridad a 25 °C. Los ejes fueron transferidos a una caja de Petri pequeña, quedando sumergidos en BI, BI + zeocina 20 µM o BI + zeocina 200 µM. Se colocaron en una cámara de vacío en periodos de 5 min vacío/ 30 s sin vacío hasta completar 45 min totales. Se recolocaron en las cajas iniciales y se agregó más BI. Finalmente, los ejes fueron incubados por 3, 12, o 24 h en oscuridad a 25 °C.

Extracción de DNA genómico

5 ejes embrionarios de maíz congelados en nitrógeno líquido se molieron en mortero hasta obtener polvo fino. Se transfirió a un tubo Eppendorf y se agregaron 500 µL de buffer de lisis (Tabla 4). Se mezcló gentilmente, evitando usar vortex. Se añadió 300 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión durante 5 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron por 5 min a 12000 g a temperatura ambiente. El sobrenadante (~450 µL) se transfirió a un tubo nuevo, se añadió un volumen de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogeneizó por inversión. Se realizó una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones y se recuperó el sobrenadante (~280 µL). Se agregaron 3 volúmenes de la solución de precipitación (Tabla 4), se mezcló gentilmente por inversión y se centrifugó por 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol al 70 %, centrifugando entre cada uno. Se dejó secar el pellet y se agregó 100 µL de buffer TE (Tabla 4) y 1 µL de RNasa A (Thermoscientific

EN0531). Se almacenó a 4 °C toda la noche. El DNA se repurificó repitiendo el protocolo desde la adición de la mezcla cloroformo-isoamílico. Finalmente, se cuantificó a 260/280 nm y se monitorearon 300 ng en un gel de agarosa 1.5 % 60 V por 2 h.

El DNA (1.5 µg) se trató con NaOH a una concentración final de 0.1 N. La muestra se desnaturalizó a 95 °C por 15 min. Finalmente, se monitoreó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE a 70 V por 1.5 h.

Tabla 4. Buffers de extracción de gDNA

Buffer de lisis		Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	
Tris-HCl pH=7.5	50 mM	Fenol pH=7.8-8.0	25 partes
NaCl	250 mM	Cloroformo	24 partes
EDTA pH= 8.0	10 mM	Alcohol isoamílico	1 parte
SDS	1 %	Permitir la separación de fases y no mezclar, almacenar a 4 °C en oscuridad	
Almacenar a temperatura ambiente			
Cloroformo: alcohol isoamílico		Solución de precipitación	
Cloroformo	24 partes	NaCl	266.67 mM
Alcohol isoamílico	1 parte	Etanol	80 %
Almacenar a 4°C		Disolver NaCl en agua y después agregar etanol absoluto. Almacenar a temperatura ambiente	
Buffer TE			
Tris-HCl pH= 7.5-8.0		10 mM	
EDTA pH= 8.0		0.1 mM	
Almacenar a temperatura ambiente			

Extracción de proteína total

30 ejes embrionarios embebidos, se molieron en morteros congelados hasta la obtención de una masa homogénea, se agregaron 3 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 70 mM pH 7.5, MgCl₂ 15 mM, KCl 25 mM, Na₂EDTA*2H₂O 5 Mm pH 8.0, sacarosa 250 mM, β-mercaptoetanol 15 mM, tritón 0.2%, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM y una tableta de inhibidores de proteasas complete (Roche)), se colocó en tubos ependorff y se centrifugaron a 12000 rpm por 30 min a 4 °C. Se recolectó la fase soluble y se sometieron a otras 2 rondas de centrifugación, nuevamente se recolectó la fracción soluble. Finalmente, se alicuotó y cuantificó mediante el método de Lowry.

Electroforesis de proteínas

Se prepararon geles de poliacrilamida como se indica en la tabla 5, se colocaron en una cámara para electroforesis con 1 L de buffer de electrodos (TRIS-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1 %), se cargaron las muestras proteicas desnaturalizadas a 85 °C en buffer de carga (TRIS-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol y β -mercaptoetanol 100 mM) y se separaron por 90 min a 130 V.

Gel concentrador		Gel separador	
H ₂ O	2.52 mL	H ₂ O	3.5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.81 mL	Acrilamida/Bisacrilamida 30%	4.0 mL
TRIS-HCl 1.0 M pH 6.8	1.66 mL	TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	50 μ l	SDS 10%	100 μ l
Persulfato de amonio 10%	50 μ l	Persulfato de amonio 10%	100 μ l
TEMED 99.5%	5 μ l	TEMED 99.5%	8 μ l

Western Blot.

Los geles obtenidos tras la electroforesis SDS-PAGE se colocaron en una cámara húmeda de transferencia con membranas de Immobilon-PSQ (Merck Millipore) con tamaño de poro de 0.2 μ m y 1 L de buffer de transferencia (TRIS-HCl 25 mM, Glicina 192 mM pH 8.3). Las muestras se transfirieron a 60 V y 350 mA por 1 h. Las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente en agitación con una solución al 5 % de leche semi descremada en PBS 1X (NaCl 0.13 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM pH 7.4). Se retiró la leche y posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 6), por 1 h a temperatura ambiente para las proteínas recombinantes. Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS por 10 min cada una, se incubaron con anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch) (1:20000) por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Para la detección se empleó el fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad).

Anticuerpo	Título empleado
α -PCNA	1:10000
α -MBP	1:40000
α -RAD51	1:20000
α -PEX	1:20000

Resultados

1. Estudio de filogenia.

El genoma de maíz tiene dos genes de *rad51*, *ZmRad51A1* y *ZmRad51A2*, localizados en los cromosomas 7 y 3 con un porcentaje de identidad de 84 a nivel nucleotídico y 90 en la estructura primaria (Li et al., 2007). Además de estas dos proteínas, la familia de RAD51 está compuesta por otros miembros parálogos menos conservados, entre los cuales se encuentran: RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 y Dmc1 (Figura 13A, Figura S1). El análisis de filogenia muestra un claro agrupamiento de cada uno de los miembros de la familia de RAD51, al comparar las secuencias proteicas de humanos, levaduras y plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrium patens*, *Oryza sativa* y *Zea mays*. Además, se observa una relación más cercana entre *ZmRAD51A1* y *OsRAD51*, así como *ZmRAD51A2* con *AtRAD51A*. Basado en la semejanza entre estos últimos, a que *ZmRad51A2* es transcrito como mensajero único y que las predicciones de expresión entre *Rad51A1* y *Rad51A2* no cambian, se eligió a *Rad51A2* como el gen candidato para los análisis posteriores.

La familia de cinasas dependientes de ciclina tipo B (CDKB) son proteínas conservadas, exclusivas de plantas y algunas algas. Las CDKs tipo B, se subdividen en las clases 1 y 2 donde sus miembros se agrupan entre plantas monocotiledóneas (maíz, trigo y arroz) y dicotiledóneas (*A. thaliana*, tomate y tabaco) (Figura 13B, Figura S2)

Por otro lado, la familia de ciclinas tipo B (CycB), son un grupo de proteínas menos conservadas en comparación a las CDKBs, donde únicamente conservan los dominios N-terminal y C-terminal. Además, la divergencia entre las ciclinas B de monocotiledóneas y dicotiledóneas es evidente, evitando que puedan ser relacionadas directamente (Figura 13C, Figura S3)

Por último, el análisis filogenético y de alineamientos muestra que PCNA es una proteína altamente conservada entre eucariontes, tal como se ha reportado previamente (Figura 13D, Figura S4) (Iwai, T. et al., 2000). En el caso de maíz se tienen codificados dos genes: *pcna1* (Zm00001d018415) y *pcna2* (Zm00001d051995) cuyos patrones de expresión en tejidos proliferantes son similares y la secuencia proteica es idéntica (López et al., 1997).

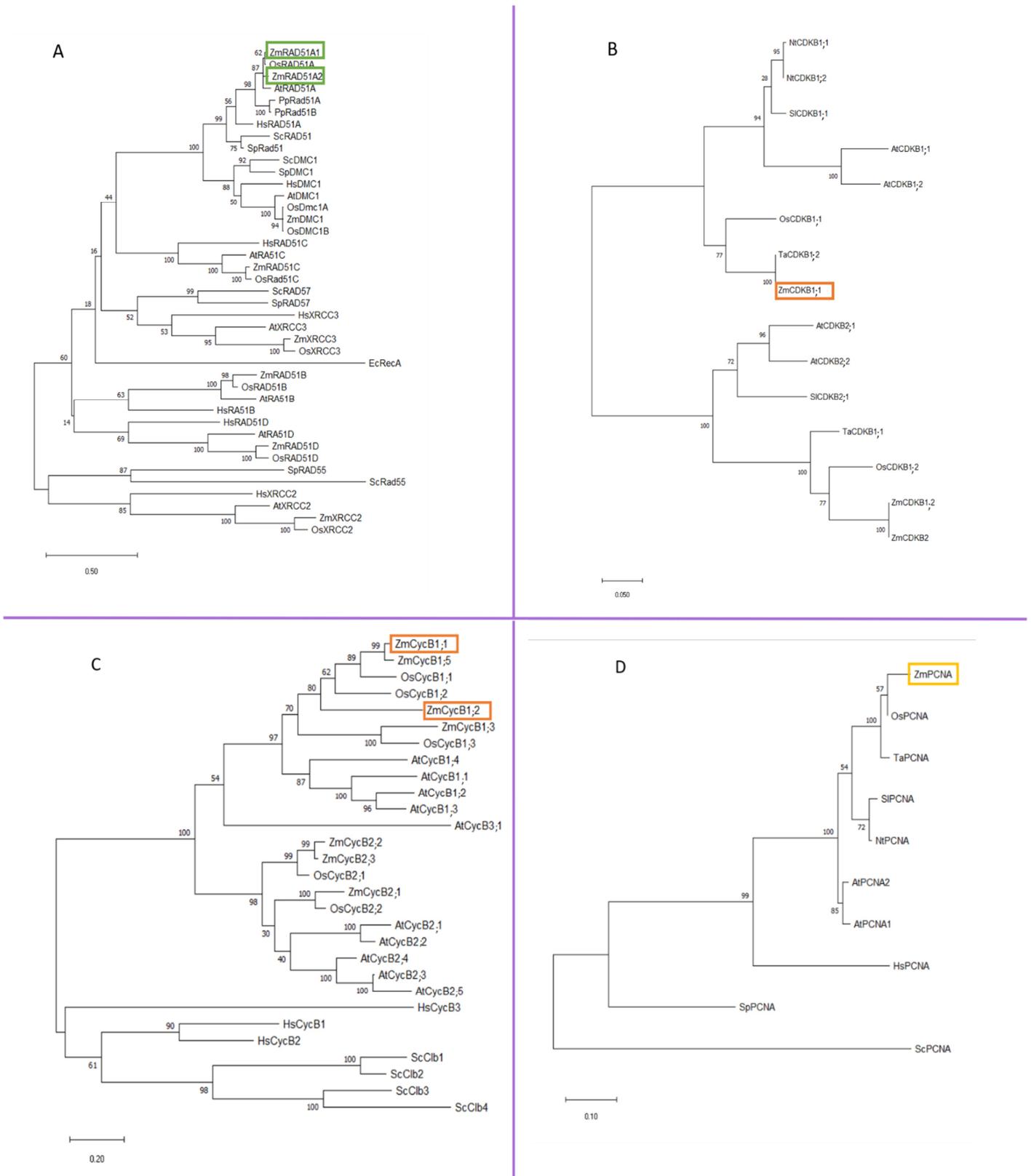


Figura 13. Árboles filogenéticos de las familias: (A) RAD51, (B) CDKB, (C) CycB y (D) PCNA. *A. thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Oryza sativa* (Os), *Triticum aestivum* (Ta), *Physcomitrium patens* (Pp), *Zea mays* (Zm), humanos (Hs), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y *Schizosaccharomyces pombe* (Sp). IDs en Tabla S1.

2. Búsqueda de motivos PIP.

Se ha descrito que las proteínas que interactúan con PCNA contienen motivos conservados conocidos como PIP, PIP-like, APIM y caja KA. Para determinar si las proteínas de interés en diferentes organismos conservan estos motivos, se realizó la búsqueda dentro de la estructura primaria (Tabla 7). Todas las ciclinas tipo B de *A. thaliana* contienen al menos un motivo PIP-Like y CycB1;5 contiene un motivo PIP. Por su parte, en maíz CycB1;1 y 1;4 solo contienen motivos PIP-Like, mientras que CycB1;2 y 1;3 tienen motivos PIP y PIP-Like. Las CDKBs, que únicamente se encuentran en plantas y algunas algas, presentan motivos PIP, así como las proteínas RAD51 de *A. thaliana*, maíz, humano y levadura. Interesantemente, solo RAD51 de humano contiene un motivo APIM, KFLAR en la posición 233-237.

Tabla 7. Proteínas con motivos de interacción a PCNA

Organismo	Proteína	PIP Q-x-x-[MLI]-x-x-[FY]	Posición	PIP-Like Q-x-x-[MLI]	Posición
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CycB1;1			QPDI	189-192
				QVPI	354-357
	CycB1;2			QPPI	53-56
				QPKM	198-201
				QTEM	206-209
	CycB1;3			QMYM	177-180
				QPEI	183-186
				QPKM	472-475
				QTEM	480-483
	CycB1;4			QRGI	12-15
				QPEI	154-157
				QYPI	294-297
	CycB1;5	YLTIPTQ	378-384 (invertido)	QHVL	30-33
				QPPI	165-168
			QPKM	288-291	
			QTEM	296-299	
<i>Zea mays</i>	CycB1;1			QEQI	65-68
				QVEI	214-217
				QPVL	257-260
				QYGL	357-360
	CycB1;2	QLALVDY	180-186		
		QHTINFF	338-344		
	CycB1;3	QYAMLVY	389-395	QEQM	33-36
				QAEI	250-253
	CycB1;4			QYRL	269-272
				QLEI	208-211

				QPVL	251-254
				QYDL	351-354
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CDKB1;1	QQLHIF	226-232	QKLM	120-123
				QNLL	146-149
	CDKB1;2	QQLHIF	228-234	QRFM	122-125
				QNLL	148-151
	CDKB2;1	QQLHIF	229-235		
CDKB2;2	QQLRIF	231-237			
<i>Zea mays</i>	CDKB1;1	QQLHIF	247-253	QNLL	167-170
	CDKB1;2	QQLHIF	242-248	QTIL	102-105
	CDKB;2	QQLHIF	241-247	QTIL	101-104
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RAD51	QMHLAKF	245-251	QEII	100-103
				QLPM	148-151
				QRLL	172-175
				QSRL	203-206
<i>Zea mays</i>	RAD51A1	QMHEMAKF	243-249	QLPL	146-149
				QRLL	170-173
				QSRL	201-204
	RAD51A2	QMHLAKF	243-249	QLPL	146-149
				QRIL	170-173
				QSRL	201-204
<i>Homo sapiens</i>	RAD51	QMHLARF	242-248	QMQL	4-7
				QCGI	30-33
				QGGI	114-117
				QLPI	145-148
				QTQL	200-203
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RAD51	QMHLAKF	300-306	QGEM	64-67
				QIPL	203-206
				QLRL	258-261

3. Modelado de estructuras proteicas.

Con la finalidad de conocer la posición de los motivos PIP y PIP-like en la estructura terciaria de las proteínas, se realizaron diferentes modelados de las estructuras de ZmRAD51A2, ZmCycB1;1, ZmCycB1;2, ZmCDKB1;1 y ZmPCNA, ya que no se cuenta con las estructuras cristalizadas de estas proteínas en maíz.

En la figura 14 se muestran los modelos de Zm RAD51A2, obtenidos por tres servidores distintos, SWISS-Model, Modeller e I-TASSER, donde los dos primeros, emplean modelado por homología, usando como cristal base HsRAD51 homólogo 1 (5NWL), y el tercero, se basa en modelado por plegado, usando principalmente la estructura cristalizada registrada en 5JZC que corresponde a una cristalización independiente de HsRAD51 homólogo 1. En la figura S5 se muestran los estadísticos de cada modelo.

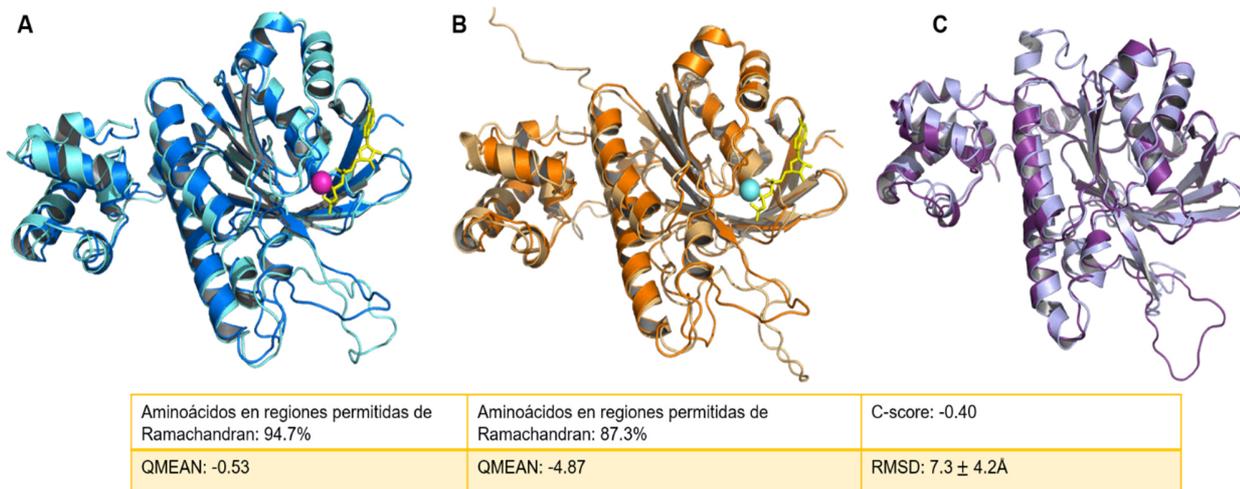


Figura 14. Estructuras tridimensionales predichas para RAD51A2 de maíz. (A) Modelo obtenido mediante SWISS-Model. La estructura azul representa el cristal 5NWL y la estructura azul claro el modelo de ZmRAD51A2. En amarillo se muestra ATP unido al cristal y en magenta un ion Mg^{2+} . (B) Modelo obtenido por Modeller. La estructura anaranjada representa el cristal 5NWL y la estructura color crema el modelo de ZmRAD51A2. En amarillo se muestra ATP unido al cristal y en cian un ion Mg^{2+} . (C) Modelo obtenido por I-TASSER. La estructura morada representa el cristal 5JZC y la estructura lila el modelo de ZmRAD51A2. En la tabla se muestran los estadísticos de cada modelo.

Partiendo del modelo generado en I-TASSER, se realizó dinámica molecular por 200 ns, con la finalidad de obtener el mejor modelo de estructura terciaria de la proteína. En la figura 26A, se muestra la comparación entre el modelo original (azul) y el obtenido tras la dinámica (azul claro). Se analizó la dinámica a través de cálculo de RMSD (Figura 15B), el cual se incrementa durante los primeros 25 ns y posteriormente desciende y se estabiliza. Se determinó mediante RMSF que fluctuaciones de las cadenas laterales se presentan principalmente en la región N-terminal y la región entre los aminoácidos 270-288 (Figura 15C). Finalmente, se realizó un análisis de cluster para determinar cuál es la estructura más estable a lo largo del tiempo (Figura 15D). Del grupo más representado se extrajo una estructura representativa, que se muestra en la figura 15A.

Una vez validado el modelo, se realizó la búsqueda de los motivos PIP contenidos en la proteína, para determinar su localización dentro de esta (Figura 16). Se observa que los motivos PIP-Like de las regiones 146-149 y 170-173 se encuentran en zonas superficiales, mientras que las cadenas laterales de la región 201-204 se encuentran internalizadas hacia el core de la proteína. En el caso del motivo PIP, los aminoácidos Q243 y L246 se encuentran expuestos mientras que la F249 se encuentra más internalizada.

Por otro lado, también se encontraron tres sitios putativos de fosforilación por Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), dos de estos son motivos subóptimos que únicamente

conservan la serina y la prolina (SP) necesarias para la fosforilación. El primero se encuentra en los aminoácidos 11 y 12 posicionados en un loop expuesto. De la misma forma, el motivo contenido en 318-319 se encuentra en una región poco ordenada en la superficie de la proteína. Finalmente el tercer motivo se trata de la secuencia óptima S-P-X-K (56-59) y está localizado en la intersección entre una zona desordenada y una alfa-hélice.

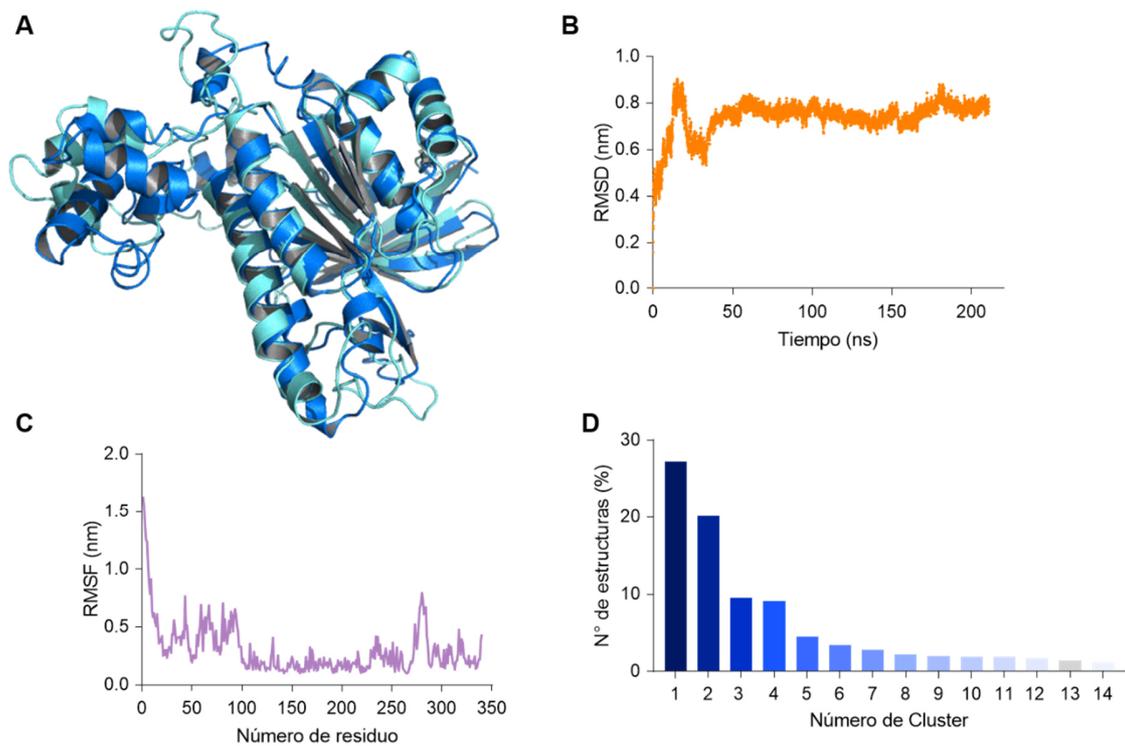


Figura 15. Análisis de dinámica molecular de RAD51A2. (A) Modelo generado por I-TASSER de RAD51A2 en azul, estructura más estable durante la dinámica en azul claro. (B) Análisis de RMSD de la proteína a lo largo del tiempo. (C) Análisis de RMSF de las cadenas laterales. (D) Análisis de cluster de las estructuras proteicas en la dinámica.

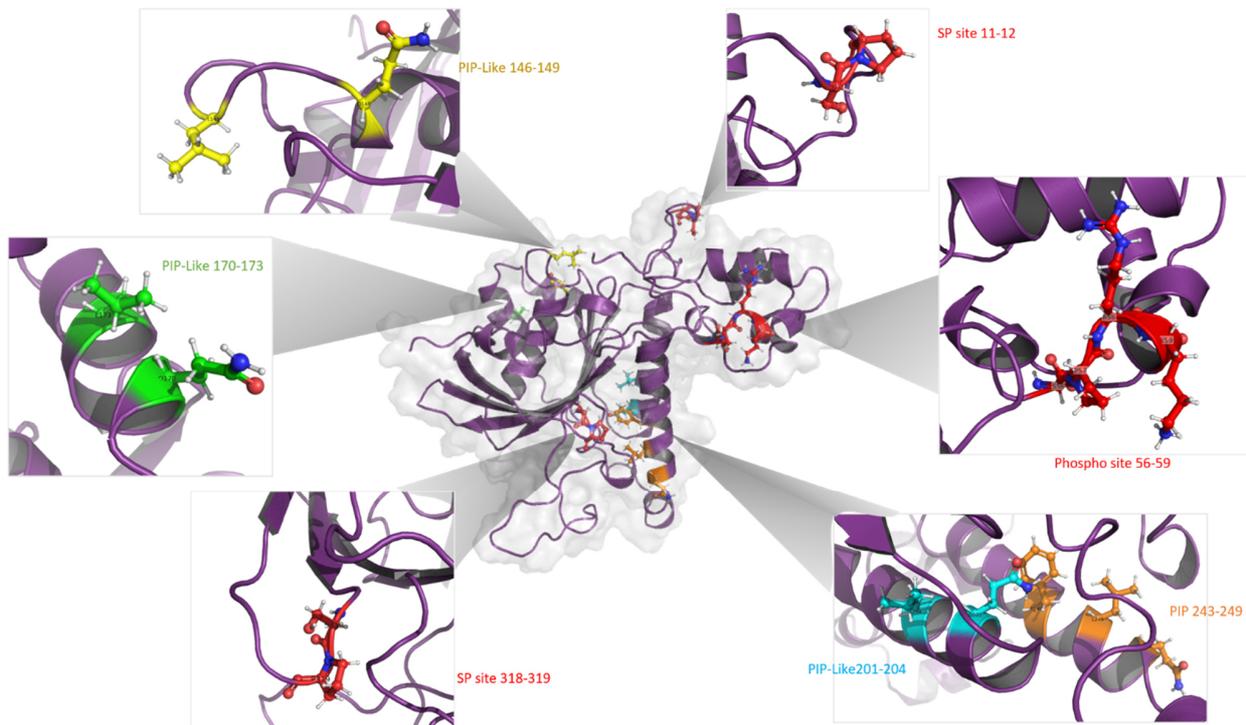


Figura 16. Localización de motivos PIP y posibles sitios de fosforilación de RAD51A2. En amarillo se muestran los residuos PIP-Like 146-149, en verde los correspondientes a 170-173, en azul 201-204, en anaranjado el motivo PIP 243-249, en rojo se muestran los sitios putativos de fosforilación por CDKs 11-12, 56-59 y 318-319.

Los mismos análisis se realizaron para ZmCDKB1;1. Los modelos iniciales se muestran en la Figura 17, y sus estadísticos en la figura S6. Se puede observar que ambos modelados por homología muestran estadísticos poco confiables pues no son capaces de predecir la estructura de la región N-terminal. Por otro lado, el mejor modelo obtenido fue mediante el servidor I-TASSER, sin embargo, sigue presentando un RMSD alto (Figura 17).

Tras realizar la dinámica molecular y su análisis (Figura 18), se observó una gran variación en los niveles de RMSD (Figura 18B) y RMSF (Figura 18C), debido a la gran movilidad de la región N-terminal, donde parece no haber terminado de plegarse por completo. El análisis de cluster muestra la estructura más abundante durante la dinámica (Figura 18D).

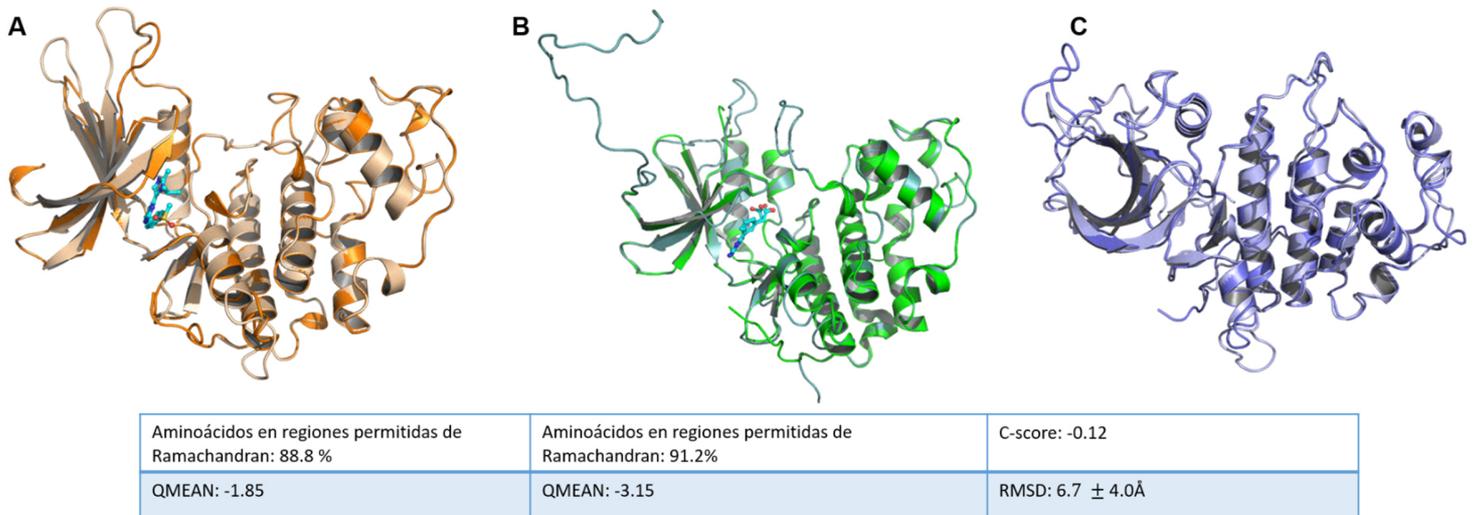


Figura 17. Estructuras tridimensionales predichas para CDKB1;1 de maíz. (A) Modelo obtenido mediante SWISS-Model. La estructura naranja representa el cristal 6GUE y la estructura color crema el modelo de ZmCDKB1;1. En azul se muestra un análogo de ATP unido al cristal. (B) Modelo obtenido por Modeller. La estructura verde representa el cristal 6Q4G y la estructura color azul el modelo de ZmCDKB1;1. En azul se muestra un análogo de ATP unido al cristal. (C) Modelo obtenido por I-TASSER. La estructura morada representa el cristal 4CJY y la estructura lila el modelo de ZmCDKB1;1. En la tabla se muestran los estadísticos de cada modelo.

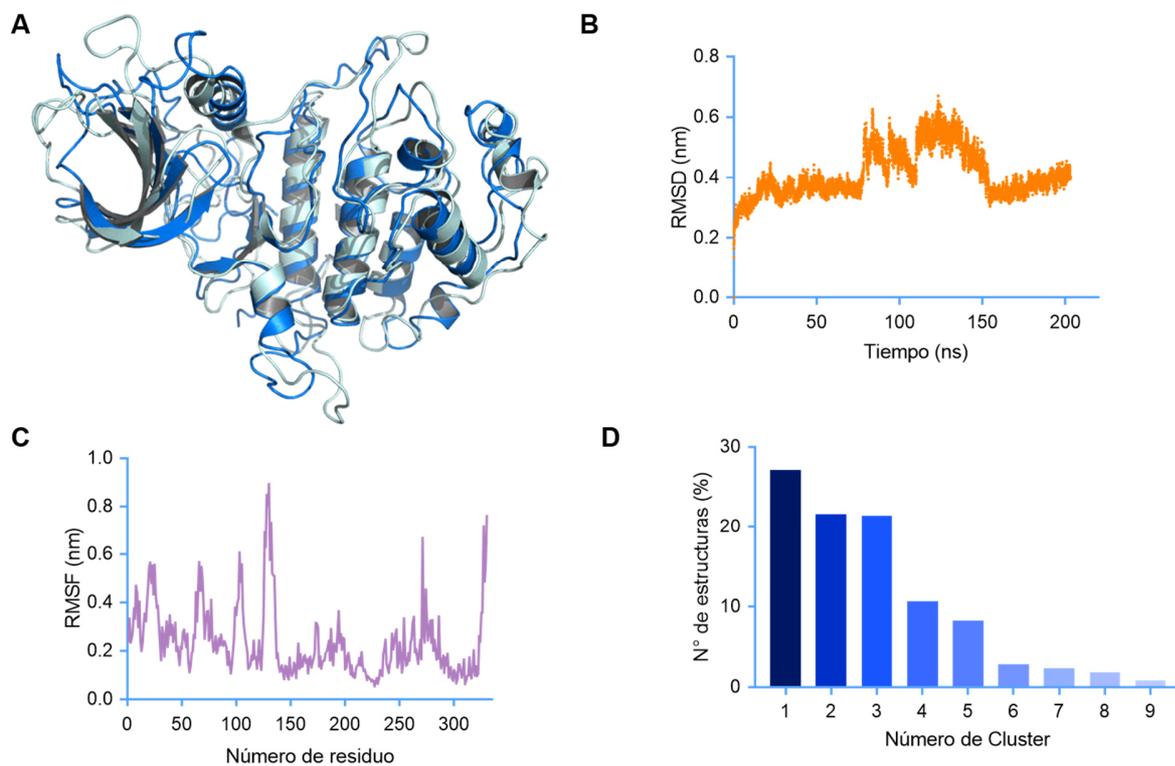


Figura 18. Análisis de dinámica molecular de CDKB1;1. (A) Modelo generado por I-TASSER de CDKB1;1 en azul, estructura más estable durante la dinámica en azul claro. (B) Análisis de RMSD de la proteína a lo largo del tiempo. (C) Análisis de RMSF de las cadenas laterales. (D) Análisis de cluster de las estructuras proteicas en la dinámica.

Se realizó la búsqueda de los motivos PIPs, encontrando que el motivo PIP se encuentra cerca de la superficie de la proteína, por el cual podría interactuar con PCNA, mientras que el motivo PIP-Like se encuentra embebido en el centro de CDKB1;1 por lo que es probable que no se encuentre disponible para la interacción, además, la glutamina 167 forma parte del sitio activo (Figura 19).

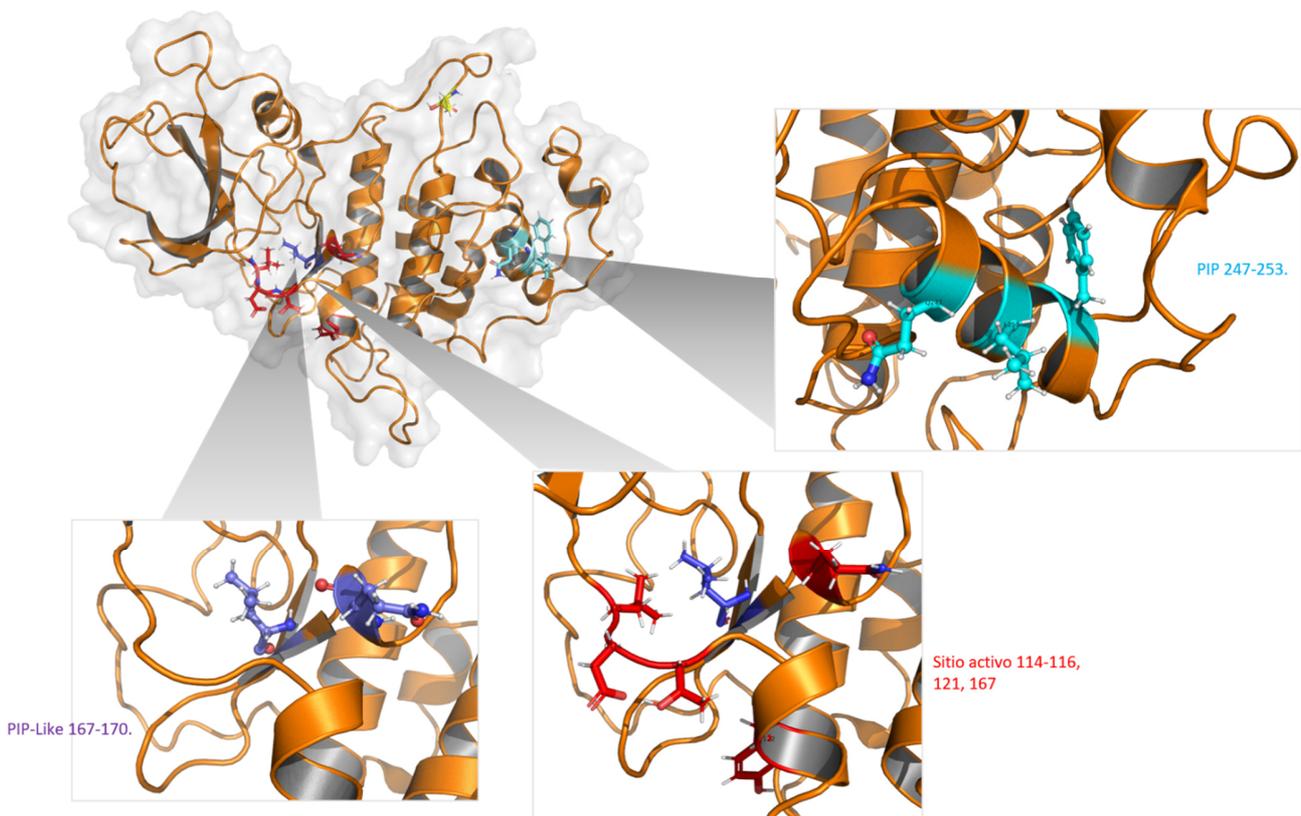


Figura 19. Localización de motivos en CDKB1;1. En azul se muestran los residuos PIP 247-253, en morado el motivo PIP-Like 167-170 y en rojo los aminoácidos del sitio activo 121-167.

Por otro lado, CycB1;1 es la proteína con menor porcentaje de identidad con su cristal, pues únicamente comparte 34.5% de identidad con HsCycA2, por lo que los modelos por homología resultan de baja calidad pues no son capaces de predecir el N-terminal (Figura 20A y B). A pesar de que se trata de una región grande (184 aminoácidos), el servidor I-TASSER fue capaz de predecir una estructura desordenada más plegada que el resto de los servidores (Figura 20C). Cabe destacar que debido a que se trata de una región grande, la cual es omitida en SWISS-Model no resulta de utilidad obtener el diagrama de Ramachandran. Por su parte, en el modelo generado por Modeller, al tener una región sin

estructura, no se pueden obtener los estadísticos de validación. En la Figura S7 se muestran los estadísticos que tienen relevancia.

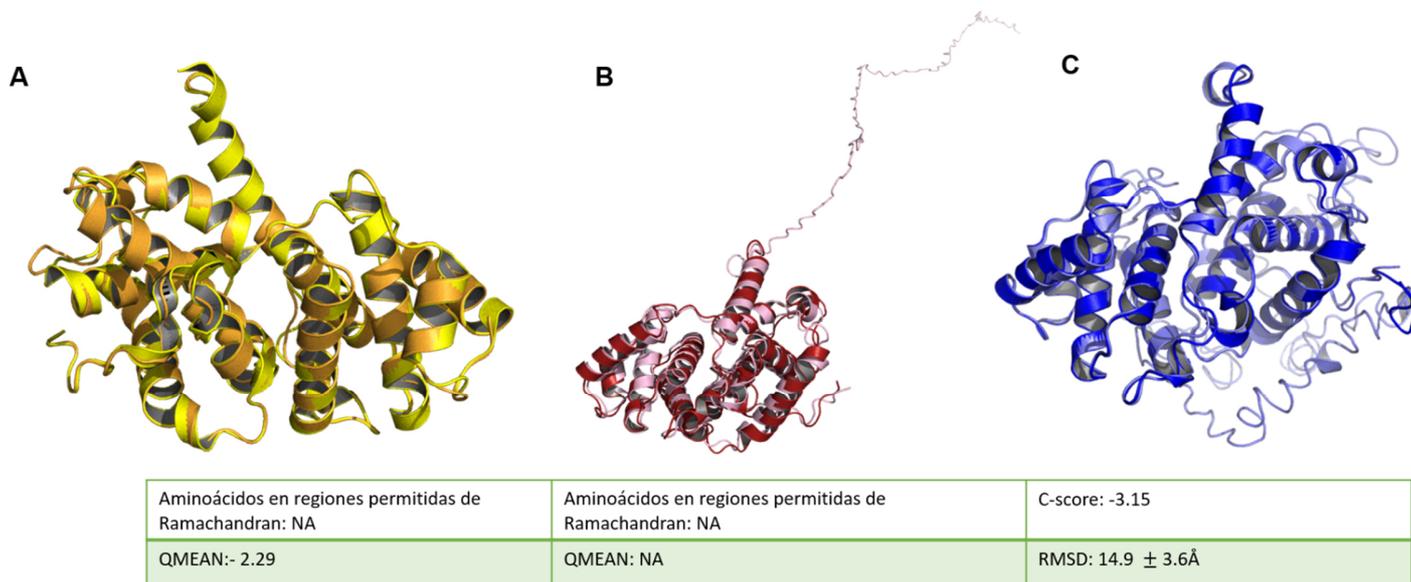


Figura 20. Estructuras tridimensionales predichas para CycB1;1 de maíz. (A) Modelo obtenido mediante SWISS-Model. La estructura amarilla representa el cristal 4CFU y la estructura anaranjada el modelo de ZmCycB1;1. (B) Modelo obtenido por Modeller. La estructura roja representa el cristal 7B5L y la estructura rosa el modelo de ZmCycB1;1. (C) Modelo obtenido por I-TASSER. La estructura azul representa el cristal 3DDQ y la estructura lila el modelo de ZmCycB1;1. En la tabla se muestran los estadísticos que se lograron obtener de cada modelo.

A diferencia de CDKB1;1, el N-terminal de CycB1;1 obtuvo una conformación relativamente estable, formando pequeñas alfa-hélices (figura 21A), lo cual se ve reflejado en el RMSD (Figura 21B), mientras que el RMSF confirma que la región con mayor movilidad de la proteína se trata de los aminoácidos 1-185 (Figura 21C).

Finalmente, se analizaron las posiciones de los cuatro motivos PIP-Like, encontrando que, principalmente, el que se localiza entre los aminoácidos 257-260, es el más expuesto para una posible interacción, mientras que los otros tres se encuentran más embebidos en el core de la proteína (Figura 22).

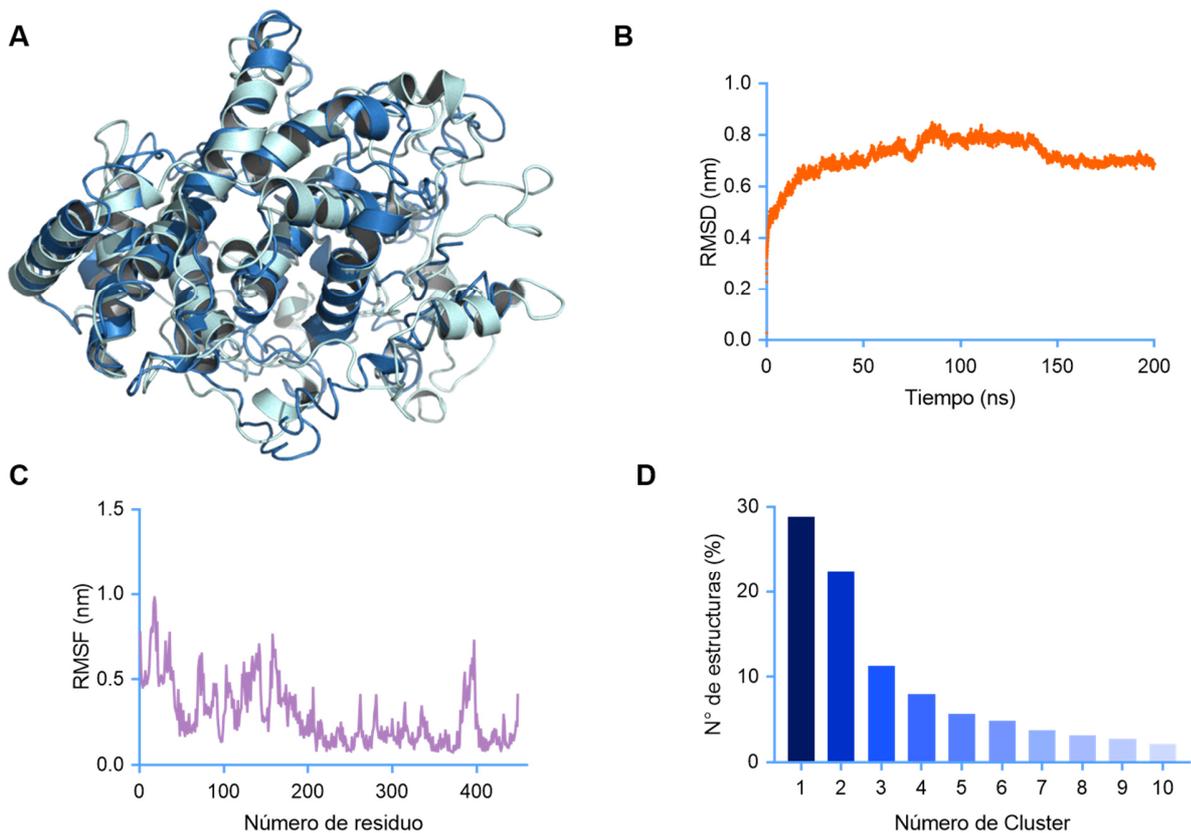


Figura 21. Análisis de dinámica molecular de CycB1;1. (A) Modelo generado por I-TASSER de CycB1;1 en azul, estructura más estable durante la dinámica en azul claro. (B) Análisis de RMSD de la proteína a lo largo del tiempo. (C) Análisis de RMSF de las cadenas laterales. (D) Análisis de cluster de las estructuras proteicas en la dinámica.

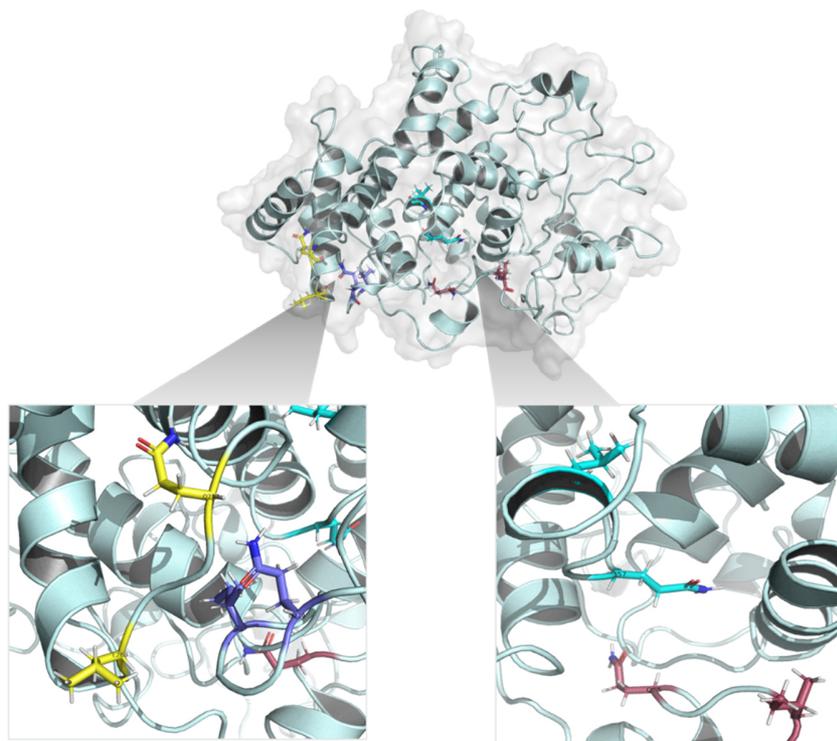


Figura 22. Localización de motivos PIP en CycB1;1. En rojo se muestran los residuos PIP-Like 65-68, en morado 214-217, en amarillo el motivo PIP-Like contenido entre 257-260 y en azul el PIP-Like de 357-360.

Por otro lado se realizó el modelado por homología (SWISS-MODEL) y por plegado (I-TASSER) de otro miembro de la familia de las ciclinas tipo B, CycB1;2. Esta proteína tiene dos motivos canónicos de unión a PCNA y de forma similar a lo obtenido en CycB1;1, el modelado por homología no resulta de utilidad pues se trata de una proteína con baja identidad, mientras que el modelado por plegado obtiene una estructura completamente plegada (Figura 23).

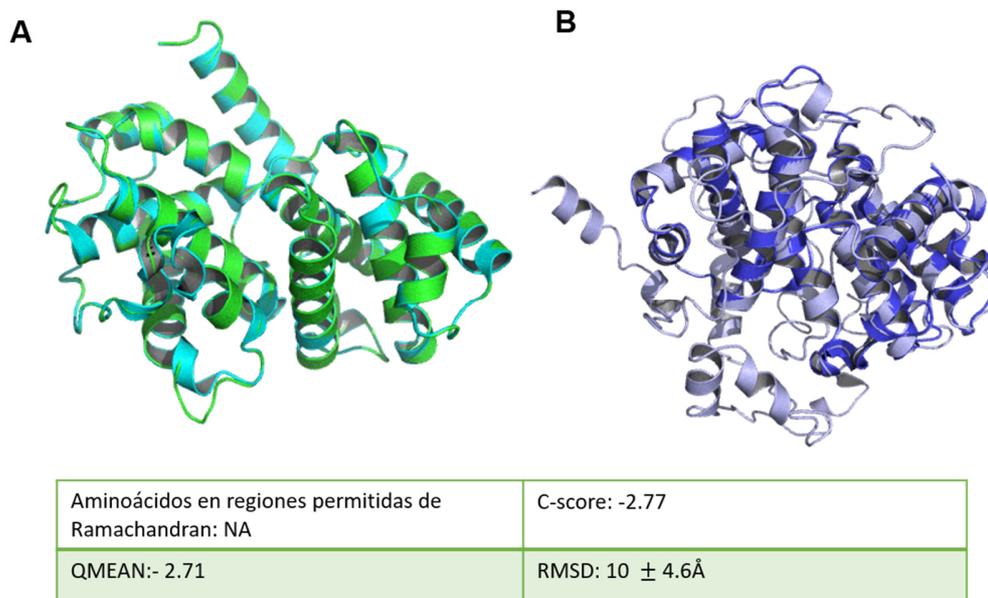


Figura 23. Estructuras tridimensionales predichas para CycB1;2 de maíz. (A) Modelo obtenido mediante SWISS-Model. La estructura azul representa el cristal 4BCO y la estructura verde el modelo de ZmCycB1;2. (B) Modelo obtenido por I-TASSER. La estructura azul representa el cristal 2JGZy la estructura lila el modelo de ZmCycB1;2. En la tabla se muestran los estadísticos que se lograron obtener de cada modelo.

Tras el análisis por dinámica molecular se obtuvo un comportamiento similar al de CycB1;1, tanto en plegamiento estable (Figura 24B), como en la movilidad de las cadenas lateral de los aminoácidos del N-terminal, por lo que el valor de RMSF fluctúa en esta región (Figura 24C).

Por último, se determinó la posición de los motivos PIP dentro de la estructura terciaria, encontrando que el motivo que comprende los aminoácidos 180-186, se encuentra en la superficie de la proteína, quizás disponible para la interacción con PCNA (Figura 25). Por el contrario, el motivo PIP (338-344) se encuentra embebido dentro del core de la proteína. Además, a diferencia de CycB1;1, CycB1;2 contiene un motivo canónico de fosforilación por CDKs (TPXR) que se encuentra expuesto (Figura 25).

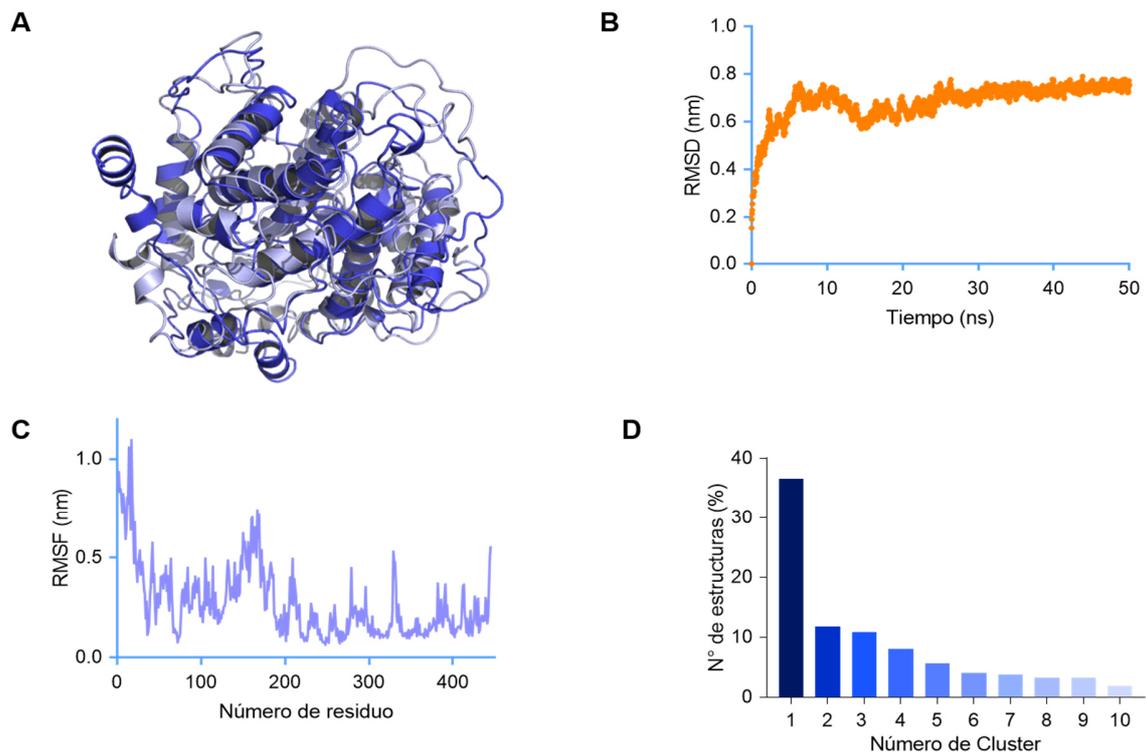


Figura 24. Análisis de dinámica molecular de CycB1;2. (A) Modelo generado por I-TASSER de CycB1;2 en morado, estructura más estable durante la dinámica en lila. (B) Análisis de RMSD de la proteína a lo largo del tiempo. (C) Análisis de RMSF de las cadenas laterales. (D) Análisis de cluster de las estructuras proteicas en la dinámica.

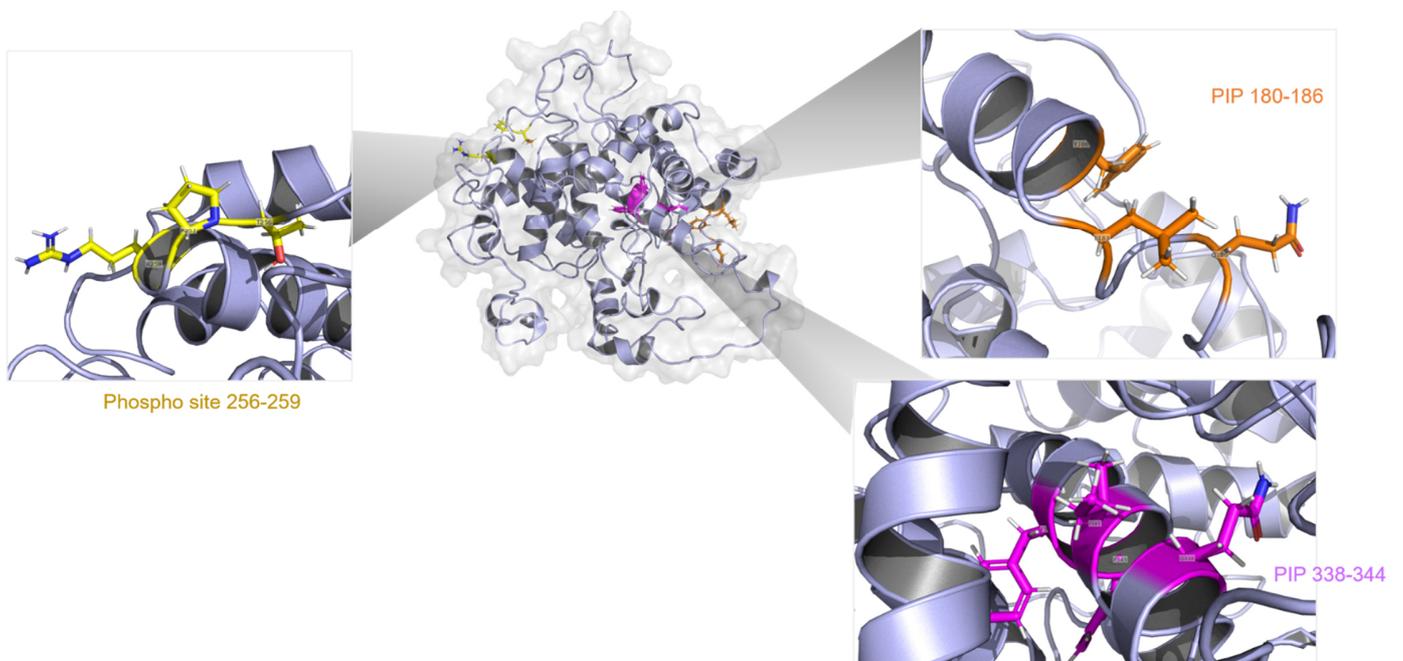


Figura 25. Localización de motivos en CycB1;2. En naranja se muestran los residuos PIP 180-186 y en magenta el motivo PIP 338-344. En amarillo el motivo canónico de fosforilación por CDKs TPXR 356-359.

Tabla 8. Motivos PIP expuestos en la superficie de las proteínas.		
Proteína	Tipo de motivo	Región
RAD51A2	PIP-Like	146-149
	PIP-Like	170-173
	PIP	243-249
CDKB1;1	PIP	247-253
CycB1;1	PIP-Like	257-260
CycB1;2	PIP	180-186

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los motivos PIP/PIP-Like que se encuentran expuestos de las proteínas de interés de estudio.

Por último, se generaron dos modelos por homología para PCNA (Figura 26), encontrando buenos estadísticos para ambos (Figura S8), ya que se trata de una proteína con alto porcentaje de identidad 85.55% con respecto al cristal de AtPCNA 6O09.

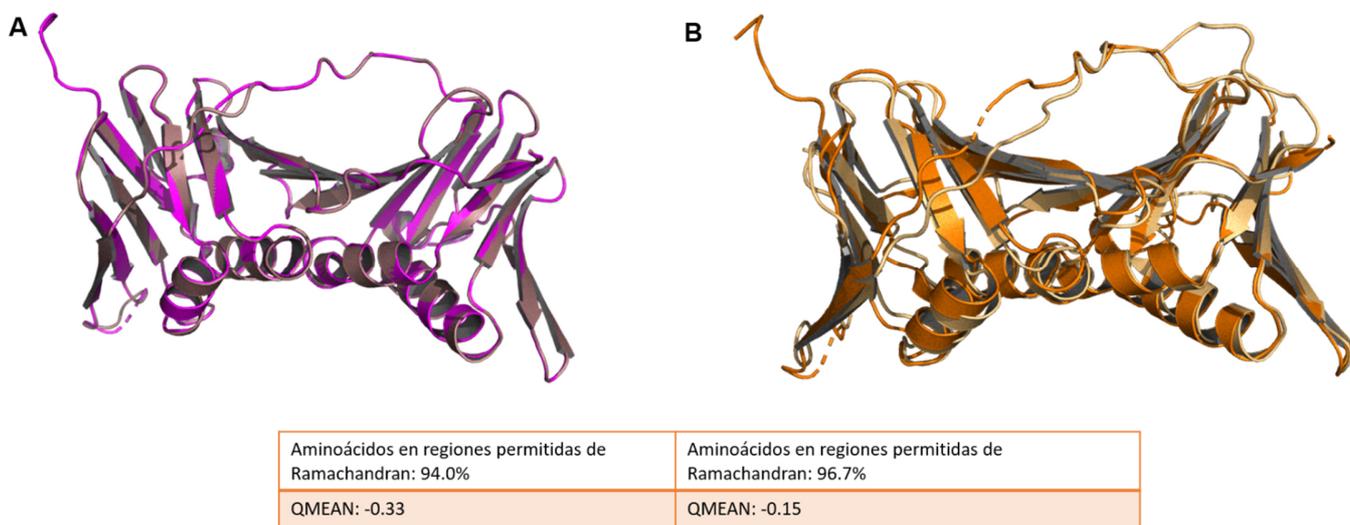


Figura 26. Estructuras tridimensionales predichas para PCNA de maíz. (A) Modelo obtenido mediante SWISS-Model. La estructura magenta representa el cristal 6O09 y la estructura café el modelo de ZmPCNA. (B) Modelo obtenido por Modeller. La estructura naranja representa el cristal 6O09 y la estructura color crema el modelo de ZmPCNA. En la tabla se muestran los estadísticos de cada modelo.

Tras realizar la dinámica molecular y su análisis (Figura 27), se observa una variación en los niveles de RMSD y RMSF muy baja (Figura 27B y C), encontrando únicamente movilidad de la región C-terminal, en los últimos 10 aminoácidos de la proteína, mostrando que el homotrímero de PCNA es estable a lo largo del tiempo. El análisis de cluster muestra la estructura más abundante durante la dinámica (Figura 27D).

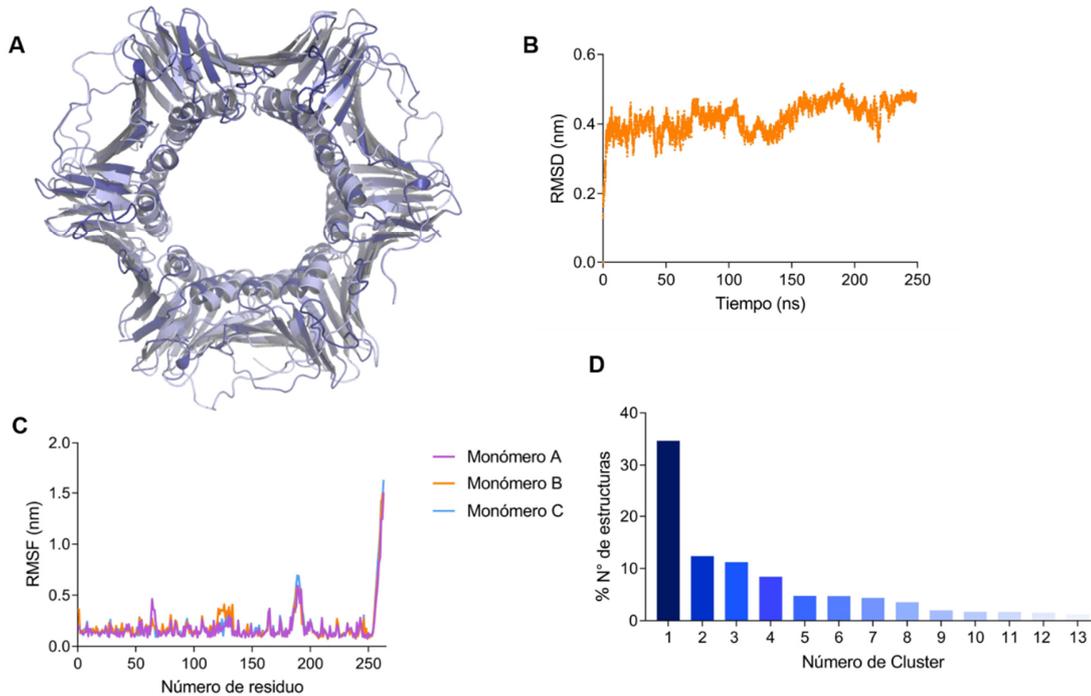


Figura 27. Análisis de dinámica molecular de PCNA. (A) Modelo generado por MODELLER de PCNA en azul, estructura más estable durante la dinámica en azul claro. (B) Análisis de RMSD de la proteína a lo largo del tiempo. (C) Análisis de RMSF de las cadenas laterales. (D) Análisis de cluster de las estructuras proteicas en la dinámica.

Se ha reportado la región estructural de PCNA en la cual diferentes proteínas con motivos PIP y PIP-Like se unen, siendo esta el dominio IDCL que comprende los aminoácidos Leu118 a Tyr133 (Figura 28A) (Punchihewa et al., 2012; Hara et al., 2018; Strzalka and Ziemienowicz 2010). Además, en la figura 28A en un acercamiento donde la proteína ha sido rotada 90° en un plano transversal, se observa la superficie electrónica que generan los residuos de aminoácidos presentes, formando una cavidad, donde se ha demostrado que interaccionan diversas proteínas (Punchihewa et al., 2012; Hara et al., 2018). En la figura 28B se muestra el acoplamiento de AtPCNA y un fragmento de la proteína Hsp21 cristalizado (PDB: 2ZVV), donde se observa la unión del motivo PIP presente en p21 sobre

el surco IDCL. De la misma forma en la figura 28C y D se muestra el acoplamiento de AtPCNA y ATXR6 (PDB: 6O09) en la misma región.

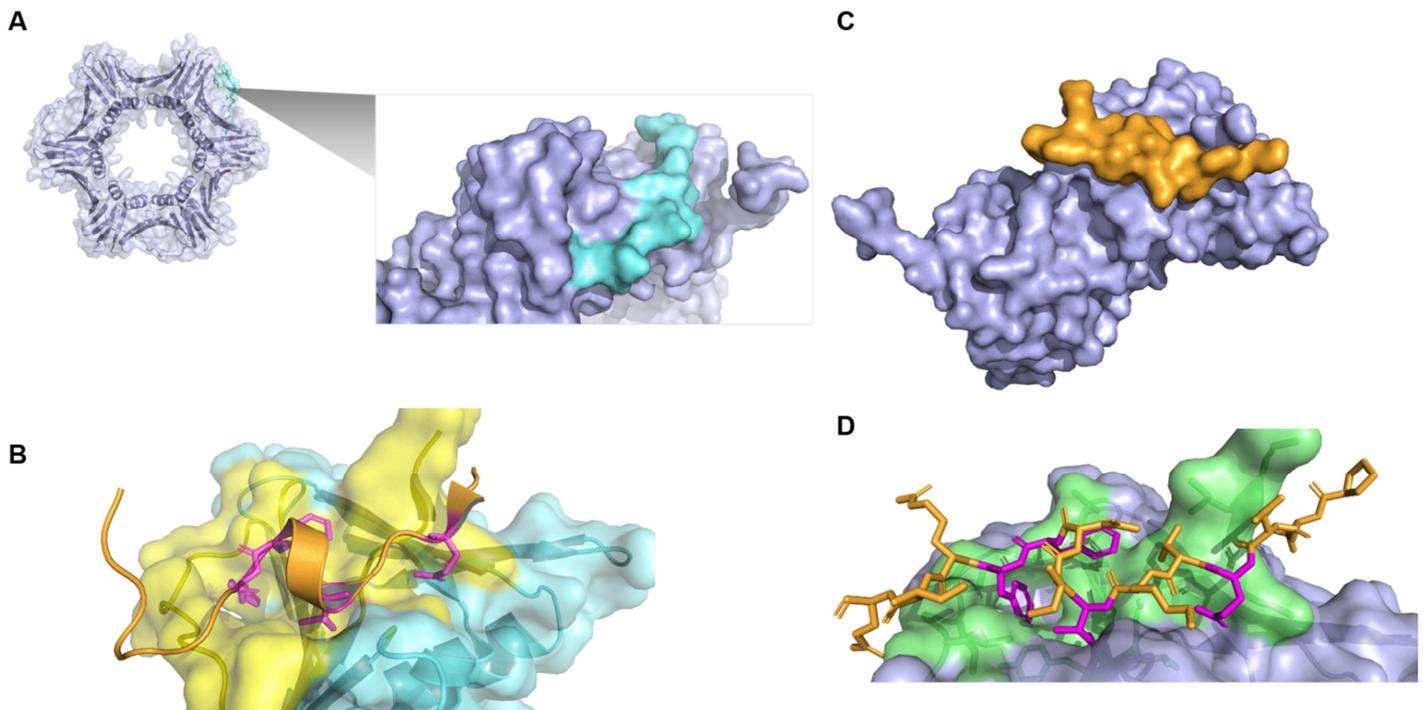


Figura 28. Estructura tridimensional de PCNA y acoplamientos. (A) Estructura homotrimerica de ZmPCNA en representación de listones y superficie. La región marcada en azul muestra el dominio IDCL de un monómero. Representación de superficie rotada 90° de forma transversal. (B) Acoplamiento de AtPCNA (representación de superficie) y un fragmento de p21 (ilustración) (PDB: 2ZVV). (C) Acoplamiento de AtPCNA y ATXR6 en representación de superficie. (D) Acoplamiento de AtPCNA (representación de superficie) y un fragmento de ATXR6 (ilustración) (PDB: 6O09).

4. Acoplamiento molecular

Tras la obtención de los modelos de estructura terciaria de las proteínas de interés, se minimizó la energía de estas y se realizaron 150 acoplamientos proteína-proteína semi-flexible entre ZmRAD51A2 y ZmPCNA empleando el servidor ClusPro. Posteriormente, se determinaron los posibles acoplamientos que interaccionan por las regiones esperadas, es decir, por alguno de los motivos PIP de RAD51A2 y el IDCL de PCNA. En la figura 29A se muestra la interacción candidata entre estas dos proteínas, la cual está mediada por el motivo PIP 243-249 de RAD51A2. Este complejo fue sometido a dinámica molecular encontrando que se trata de un complejo estable, pues el RMSD no varía a lo largo del tiempo (Figura 29B). De la misma forma, el movimiento de las cadenas laterales (RMSF) no cambia considerablemente (Figura 29C). Finalmente, tras el análisis de cluster (Figura

29D) se determinó la posición más estable de los residuos involucrados en la interacción (Figura 29E). Además, se observa que la glutamina 243 y la leucina 246 no cambian de posición tras la dinámica, mientras que la fenilalanina 249 si es desplazada de su posición original (Figura 29E).

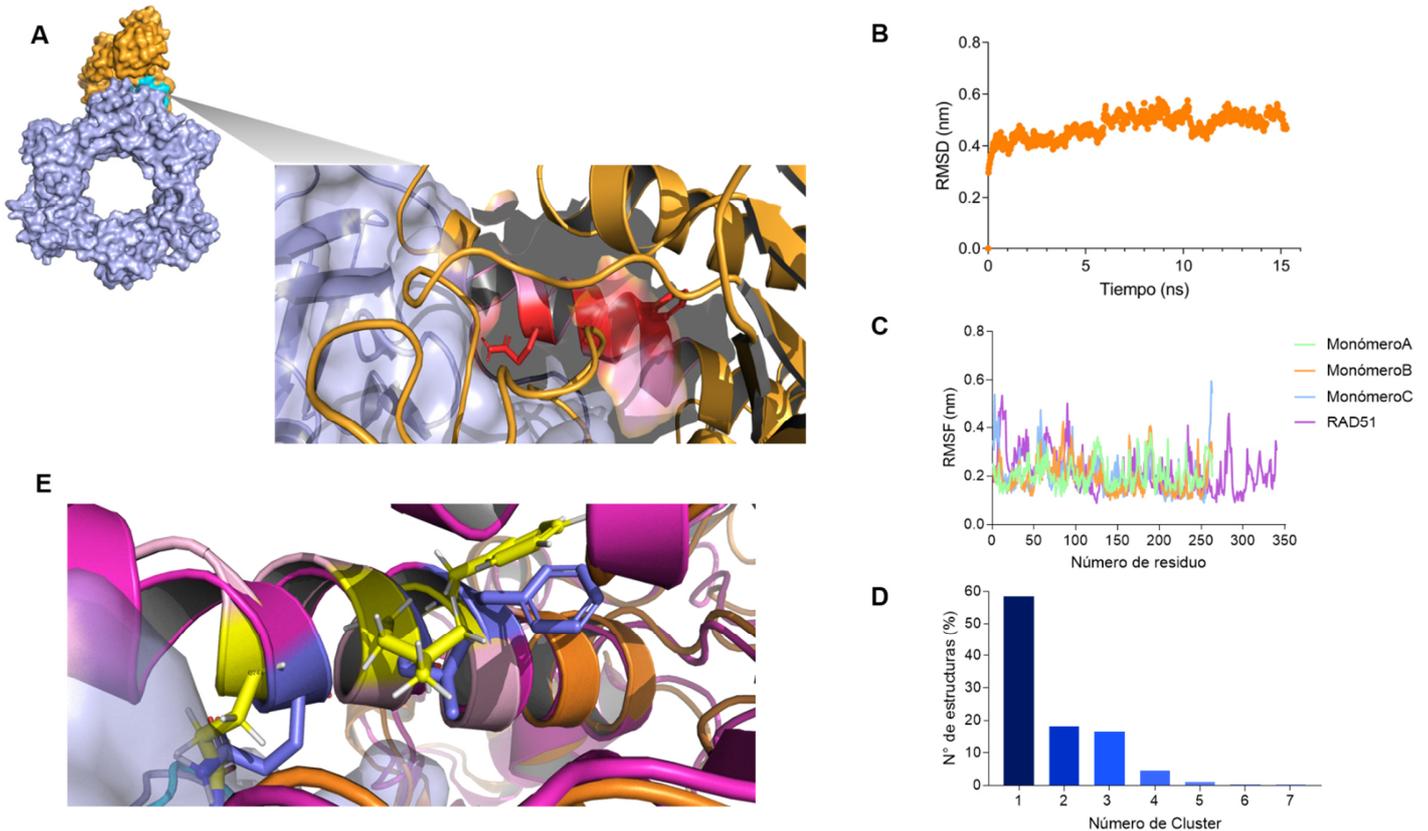


Figura 29. Acoplamiento molecular PCNA-RAD51A2. (A) Acoplamiento molecular entre ZmPCNA y ZmRAD51A2. (B) Análisis de RMSD del complejo PCNA-RAD51A2 a lo largo del tiempo. (C) Análisis de RMSF de las cadenas laterales. (D) Análisis de cluster de las estructuras proteicas en la dinámica. (E) Comparación del posicionamiento de los aminoácidos involucrados en la interacción antes (morados) y después (amarillos) de la dinámica molecular.

5. Modelo experimental.

Una vez determinada la posible interacción PCNA-RAD51A2 por métodos computacionales, se decidió probar de forma experimental, para ello se partió de la clonación de *Rad51A2*.

5.1 Clonación e inducción de *Rad51A2*.

En maíz se identificaron dos genes de *rad51*, *Rad51A1* (Zm00001d021898) y *Rad51A2* (Zm00001d041757) que tienen una identidad del 90% (Li et al., 2007). Se realizó la búsqueda *in silico* de las secuencias de DNA, se alinearon (Figura 30) y se eligió trabajar

con el gen *Rad51A2*, puesto que este gen no presenta transcritos generados por splicing alternativo (Figura S9) (obtenido de http://plants.ensembl.org/Zea_mays).

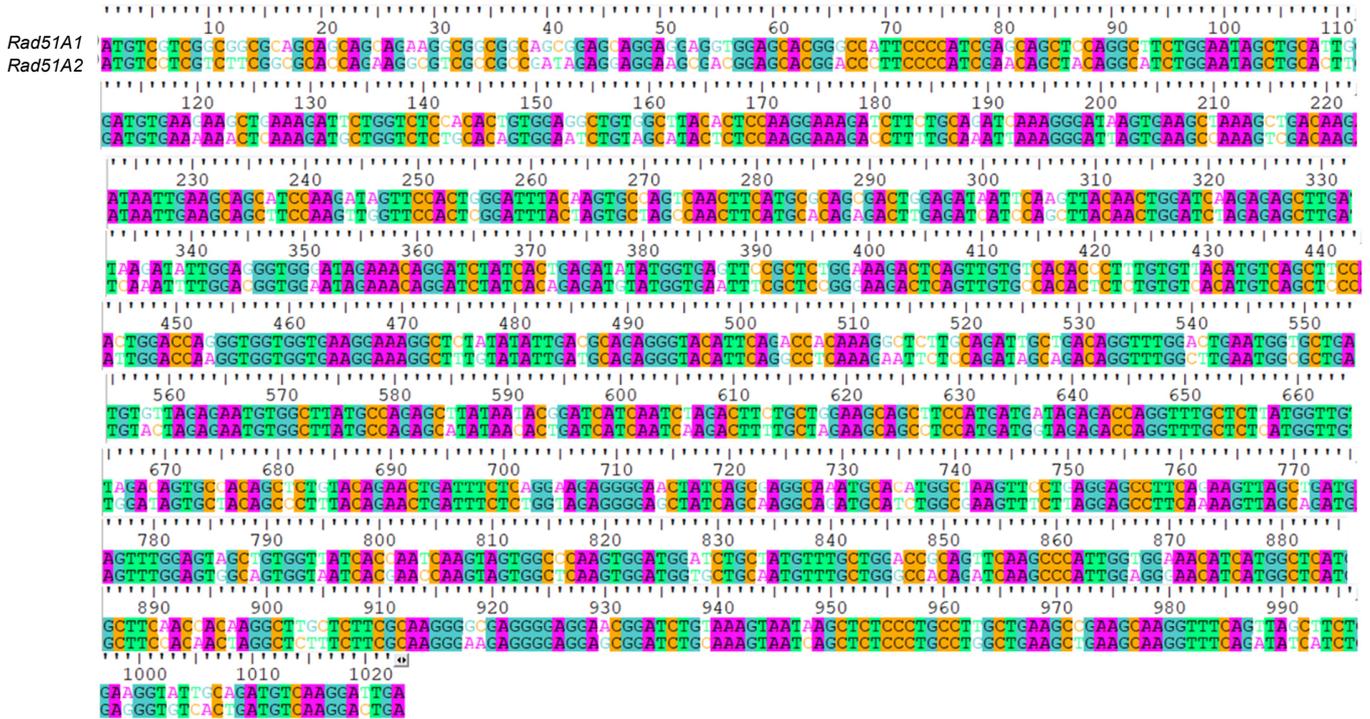


Figura 30. Alinamiento del cdsDNA de *Rad51A1* y *Rad51A2*. Los nucleótidos sombreados corresponden a nucleótidos idénticos en ambas secuencias.

Se realizó el diseño de primers de clonación, específicos para *Rad51A2* (Figura S10), agregando los sitios de restricción *NcoI* y *NotI*, pues estas enzimas no cortan el inserto y tienen secuencia de reconocimiento del sitio de clonación múltiple del vector pPAL7 (Figura 31). El vector permite producir proteínas recombinantes fusionadas a profinity exact tag (PEX), en el amino terminal de la proteína de interés. Los primers diseñados se muestran en la tabla 12.

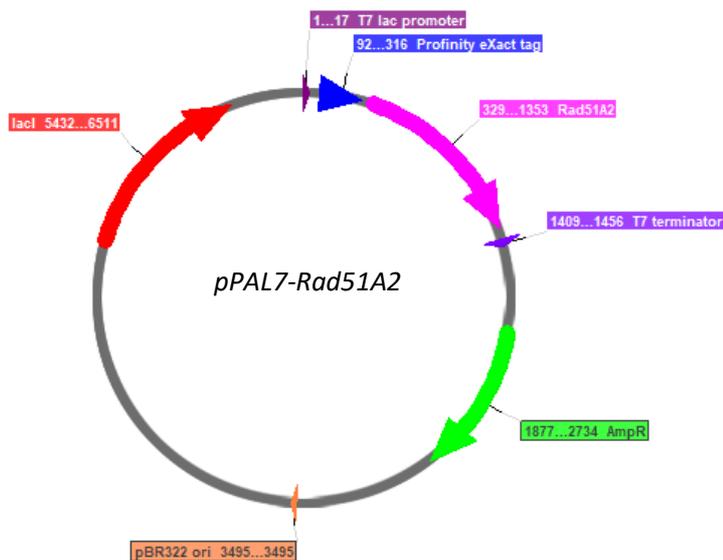


Figura 31. Construcción *pPAL7-Rad51A2*. En morado se muestra la región del promotor lac inducible, en azul el proafinity eXact tag, en rosa el inserto del gen *Rad51A2*, en violeta la región terminadora, en verde el gen de resistencia a ampicilina, en naranja el origen de replicación y en rojo el gen constitutivo de *lacI*.

Tabla 9. Primers para *Rad51A2*

Fwd/Rev	Primer	Tm (°C)	GC (%)	Enzima de restricción
Forward (5'→3')	ATAC CCATGG TGTCCTCGTCTTCGGCGCACCA	69	58	NcoI
Reverse (5'→3')	TAT GCGGCCGC TCAGTCCTTGACATCAGTGA	68	54	NotI

En naranja se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción.

Partiendo de distintas muestras de cDNA obtenido de raíces de maíz que fueron crecidas en medio Agar más 40 µM de zeocina (ver metodología), se realizó una amplificación por PCR y se observó una banda en el tamaño esperado (1042 nt), en la muestra proveniente de 24 h de exposición a zeocina (Figura 32A). Se realizó un gradiente de temperatura en la amplificación para determinar la temperatura de alineamiento óptima, encontrando que a 59 °C se obtiene una banda bien representada (Figura 32B).

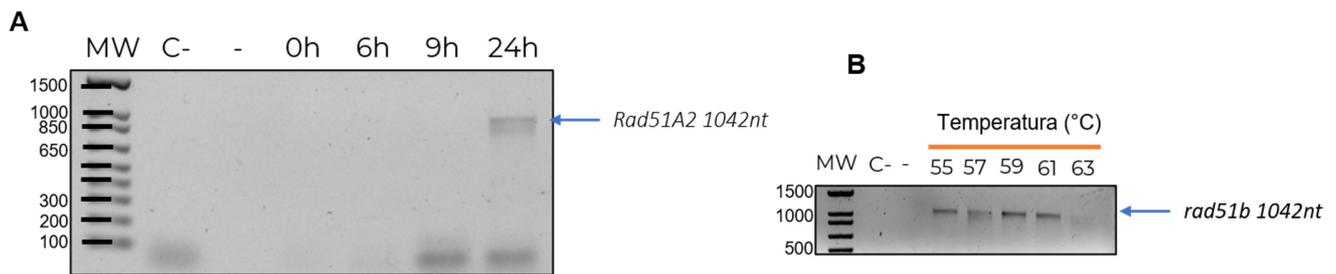


Figura 32. Condiciones de amplificación para *Rad51A2*. (A) PCR de cDNA de raíces tratadas con zeocina. MW: Marcador de masa molecular. C- se realizó sin templado. - carril vacío. 0, 6, 9 y 24 h: muestras de raíces expuestas a zeocina por determinado tiempo. (B) Gradiente de temperatura de alineamiento con cDNA de raíces expuestas por 24 h a zeocina 40 μ M.

Una vez obtenidas las condiciones ideales, se realizó la amplificación con una DNA polimerasa de alta fidelidad. El fragmento fue purificado y digerido con las enzimas de restricción NcoI y NotI. Se purificó el DNA y se ligó con el vector pPAL7 previamente digerido con las mismas enzimas. Dos volúmenes distintos del producto de ligación (5 y 10 μ L) fueron transformados en bacterias *E. coli* XL10-gold. Se realizó PCR en colonia, empleando los primers de clonación, de 6 colonias independientes de cada volumen de transformación, obteniendo 5 y 4 colonias positivas respectivamente (Figura 33A).

Posteriormente, a 4 colonias independientes, se les realizó PCR en colonia empleando el primer forward T7 que se ancla al promotor del vector y el primer reverse de clonación que se une a la parte final del inserto. Se obtuvieron 2 colonias positivas de cada volumen en el tamaño esperado de 1272 nt (Figura 33B), con lo cual se comprueba que el inserto se encuentra posicionado en la orientación correcta dentro del vector. Por último, dos colonias de ambos volúmenes (2.5, 3.5, 2.10 y 3.10) se crecieron de forma independiente en medio LB más ampicilina y se realizó una extracción para obtener los plásmidos, a los cuales se les realizó PCR con los primers de clonación, obteniendo un único fragmento de 1042 nt (Figura 33C). Finalmente se realizó un ensayo de doble restricción con 500 ng del plásmido extraído, obteniendo una banda de 5.9 kb correspondiente al vector vacío y una de 1042 nt del inserto (Figura 33C).

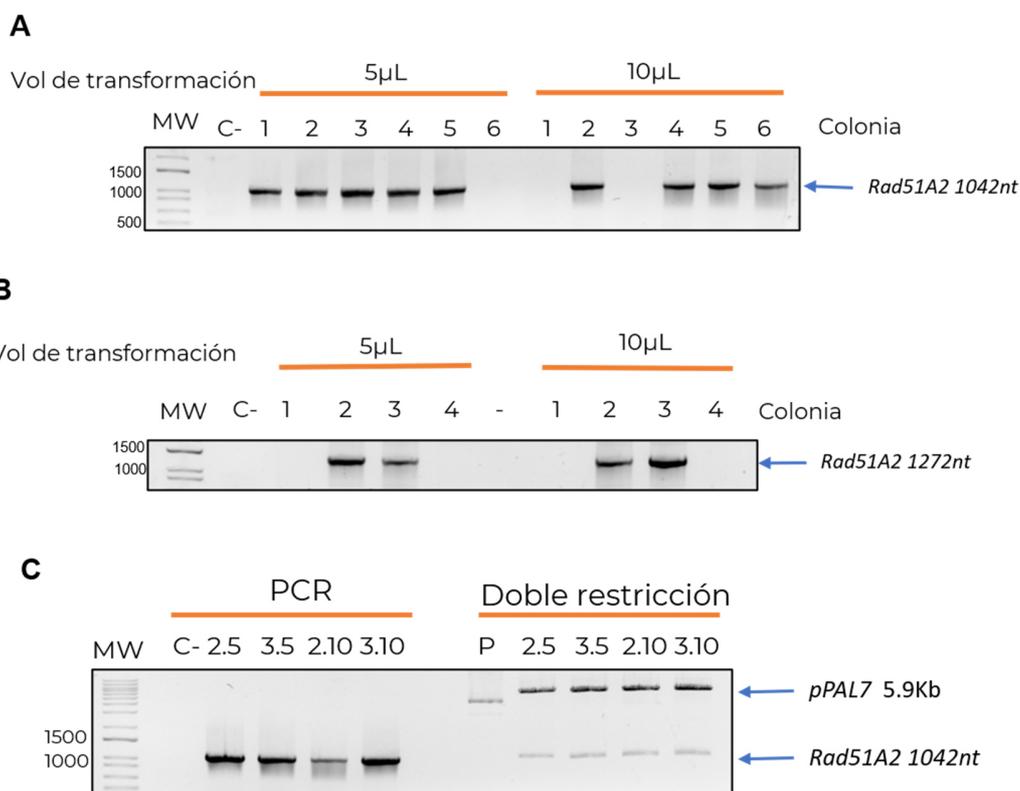


Figura 33. Verificación de clonación de *Rad51A2*. (A) PCR en colonia de bacterias transformadas con *pPAL7-Rad51A2* con primers de clonación. (B) PCR de colonias independientes a las empleadas en A con el primer forward T7 y reverse de clonación. (C) PCR con primers de clonación sobre plásmido extraído y doble restricción sobre plásmido. MW: Marcador de masa molecular. C- se realizó sin templado. - carril vacío. 1-6 representan el número de colonias, 2.5 corresponde al plásmido extraído de la colonia 2 del volumen de transformación 5 µL, el resto de los plásmidos están nombrados de forma respectiva, P plásmido sin digerir.

Los plásmidos 2.5 y 3.10 fueron verificados por secuenciación.

Bacterias de expresión *E. coli Rosetta2* fueron transformadas con la construcción *pPAL7-Rad51A2*. A dos colonias independientes se les realizó una prueba de inducción con una concentración de 0.5 mM de IPTG por 3 h a 37 °C en agitación. Se cargaron lo equivalente a 0.15 unidades de densidad óptica en cada carril, y se realizó una electroforesis en gel de acrilamida 12%. En la figura 34A se observa que ambas colonias sobreexpresan la proteína en el tamaño esperado de 46 KDa.

Posteriormente se realizó la purificación de la proteína a través de una columna de afinidad (Profinity eXact system) que cuenta con una proteasa inactiva unida a la matriz (perlas de agarosa). Esta proteasa es altamente afín por el Profinity eXact tag (PEX). Como se observa

en la figura 34B, se logró purificar a la proteína PEX-RAD51A2, sin embargo, una gran cantidad de esta queda retenida en la fracción no soluble, por lo que se utilizó la estrategia de solubilización con sarkosyl reportada por Tao y colaboradores (2010) con lo que se obtuvo una mayor cantidad de proteína soluble (Figura 34C).

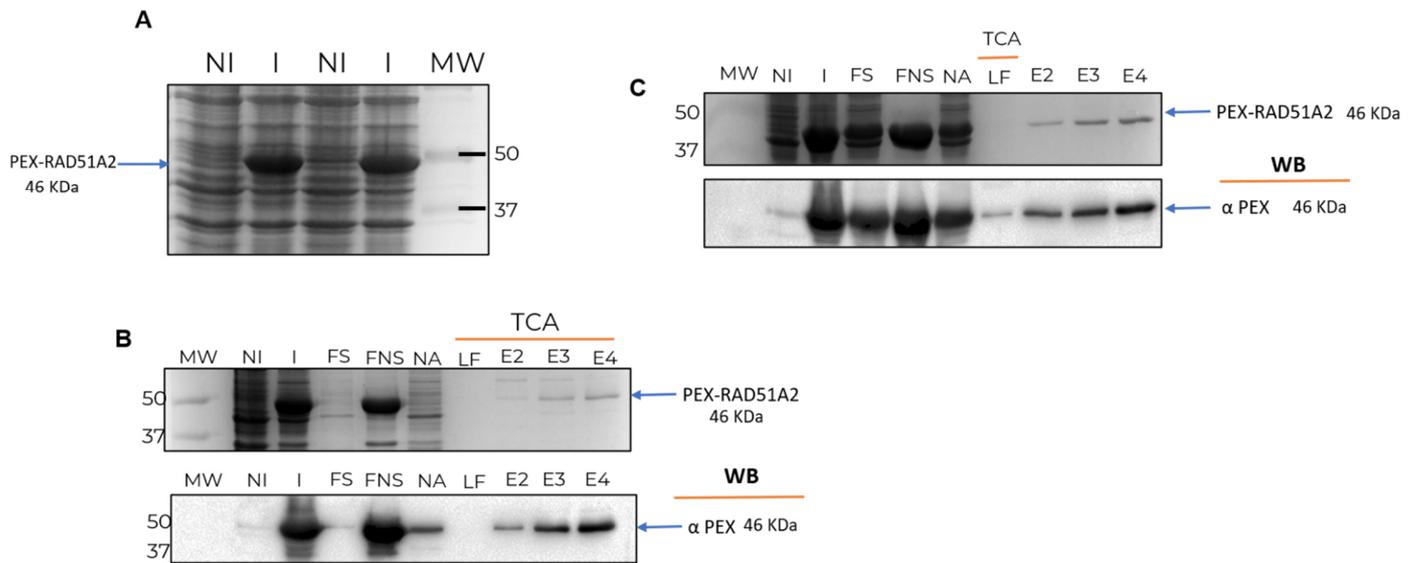


Figura 34. Purificación e interacción de proteínas recombinantes. (A) Prueba de inducción de PEX-RAD51A2. Tinción con azul coomasie. (B) Purificación de PEX-RAD51A2 por unión a Profinity eXact system, panel superior muestra el gel teñido con azul coomasie y el panel inferior muestra el Western Blot inmunodetectando al tag PEX. (C) Purificación de PEX-RAD51A2 por unión a Profinity eXact system solubilizando con sarkosyl. NI: No inducido, I: Inducido, FS: Fracción soluble, FNS: Fracción no soluble, NA: Fracción no absorbida a la columna, LF: Lavado final, Ei: Eluciones.

Por otro lado, se decidió subclonar el gen *Rad51A2* (Figura 35A) dentro del vector de expresión pMAL, con la finalidad de obtener a la proteína con un tag distinto que además aumenta la solubilidad de la proteína. Se amplificó el gen a partir de la construcción *pPAL7-Rad51A2* y se purificó el inserto, se digirió y se ligó dentro del vector *pMAL-c5x*. Se verificó la transformación mediante PCR en colonia (Figura 35B). Se realizó la extracción de plásmido de las colonias positivas y se verificó por PCR (Figura 35C). Posteriormente se transformaron dos cepas de *E. coli* con dos de los plásmidos obtenidos y se realizó una prueba de inducción, encontrando que el plásmido proveniente de la colonia 4 sobreexpresaba la proteína MBP-RAD51A2 (Figura 35D). La construcción fue verificada por secuenciación. Por último, se realizó la purificación de la proteína MPB-RAD51A2

mediante la resina MBP-Amintra, obteniendo una gran cantidad de proteína en la fracción soluble y en los eluatos (Figura 35E).

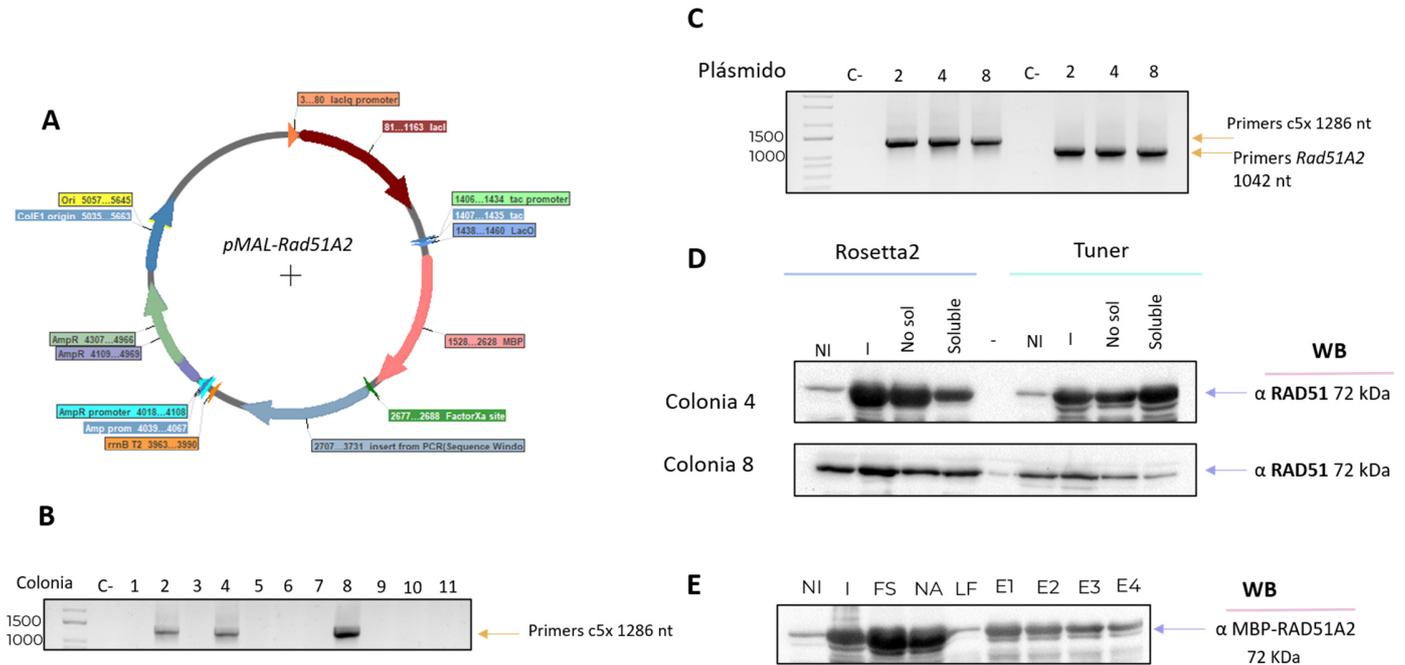


Figura 35. Subclonación de *Rad51A2*. (A) Subclonación del gel *Rad51A2* en pMAL-csx. (B) PCR en colonia con primers pMAL-c5x, (C) PCR sobre plásmidos provenientes de colonias positivas con primers pMAL-c5x y de clonación. (D) Western Blot de la sobreexpresión de MBP-RAD51A2 en bacterias *E. coli rosetta2* y *tuner*. (E) Purificación de MPB-RAD51A2 por unión a resina Amintra, NI: No inducido, I: Inducido, FS: Fracción soluble, NA: Fracción no absorbida a la columna, LF: Lavado final, Ei: Eluciones.

5.2 Clonación, expresión y purificación de CycB1;2

En maíz existen 7 proteínas de la familia de ciclinas tipo B, cuatro de la subfamilia de CycB1 y tres de CycB2 (Figura 13C). Se trata de una familia con baja identidad entre los miembros de la misma (Figura S3), sin embargo, se ha reportado en *A. thaliana* que todos los miembros de la familia de ciclinas B1 son esenciales para la respuesta ante daño al DNA (Weimer, et al., 2016).

Para el análisis de esta familia se seleccionaron a dos miembros, CycB1;1 y CycB1;2. Se realizó el diseño de primers específicos para cada uno utilizando sitios de restricción para el vector pMAL-c5x (Tabla 10). Partiendo de cDNA de ejes de maíz embebidos por 0, 12 y 24 h, se probaron diferentes condiciones de temperatura y disolventes para la amplificación por PCR. Mediante la metodología de TouchDown se obtuvo una banda en el tamaño

esperado para *cycb1;2* (Figura 36B), mientras que *cycb1;1* no se logró amplificar por lo que los análisis posteriores solo se realizaron con *cycb1;2* (Figura 36A). Se purificó el amplicón de *cycb1;2* y se digirió con las enzimas NcoI y EcoRI, se ligó en una proporción 3:1 con el vector *pMAL-c5x* previamente digerido. Finalmente, se transformó la construcción *pMAL-c5x-cycb1;2* (Figura 36B) en bacteria *E. coli XLgold* y se monitorearon las colonias por PCR empleando los primers de clonación obteniendo una colonia positiva (Figura 36C). Se propagó la colonia positiva y se extrajo el plásmido el cual se verificó por PCR con primers que se unen al vector, con primers de clonación y por ensayo de doble restricción (Figura 36D). Finalmente fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación, IBT, UNAM.

Tabla 10. Primers de clonación *cycb1;1* y *cycb1;2*

gen	Fwd/Rev	Primer	Tm (°C)	GC (%)	Enzima de restricción
<i>Cycb1;1</i> 1367nt	Forward (5'→3')	AATCCATGGTGCCCACGCGCAACCACAA	58	57	NcoI
	Reverse (5'→3')	TATGGATCCTTACTTGATCTCCACTGCG		46	BamHI
<i>Cycb1;2</i> 1353 nt	Forward (5'→3')	TATCCATGGCGACGAGGAACCACC	60	56	NcoI
	Reverse (5'→3')	TATGAATTCGACAAGGTGCGGAAGAGCAG		48	EcoRI

En naranja se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción.

Posteriormente se transformaron dos cepas de *E. coli* con el plásmido obtenido y se realizó una prueba de inducción, encontrando que la proteína MBP-CycB1;2 es producida por la cepa de *E. coli Rosetta2*, la cual contiene plásmidos que codifican para tRNAs de codones raros, mientras que la cepa *E. coli Tuner DE3* no sobreexpresa la proteína (Figura 36E). Por otro lado, se purificó la proteína mediante el anclaje de MBP a la resina Amintra-agarosa y se observó que se obtiene una gran cantidad de MBP-CycB1;2 en la fracción soluble y que se puede purificar sin contaminantes (Figura 36F).

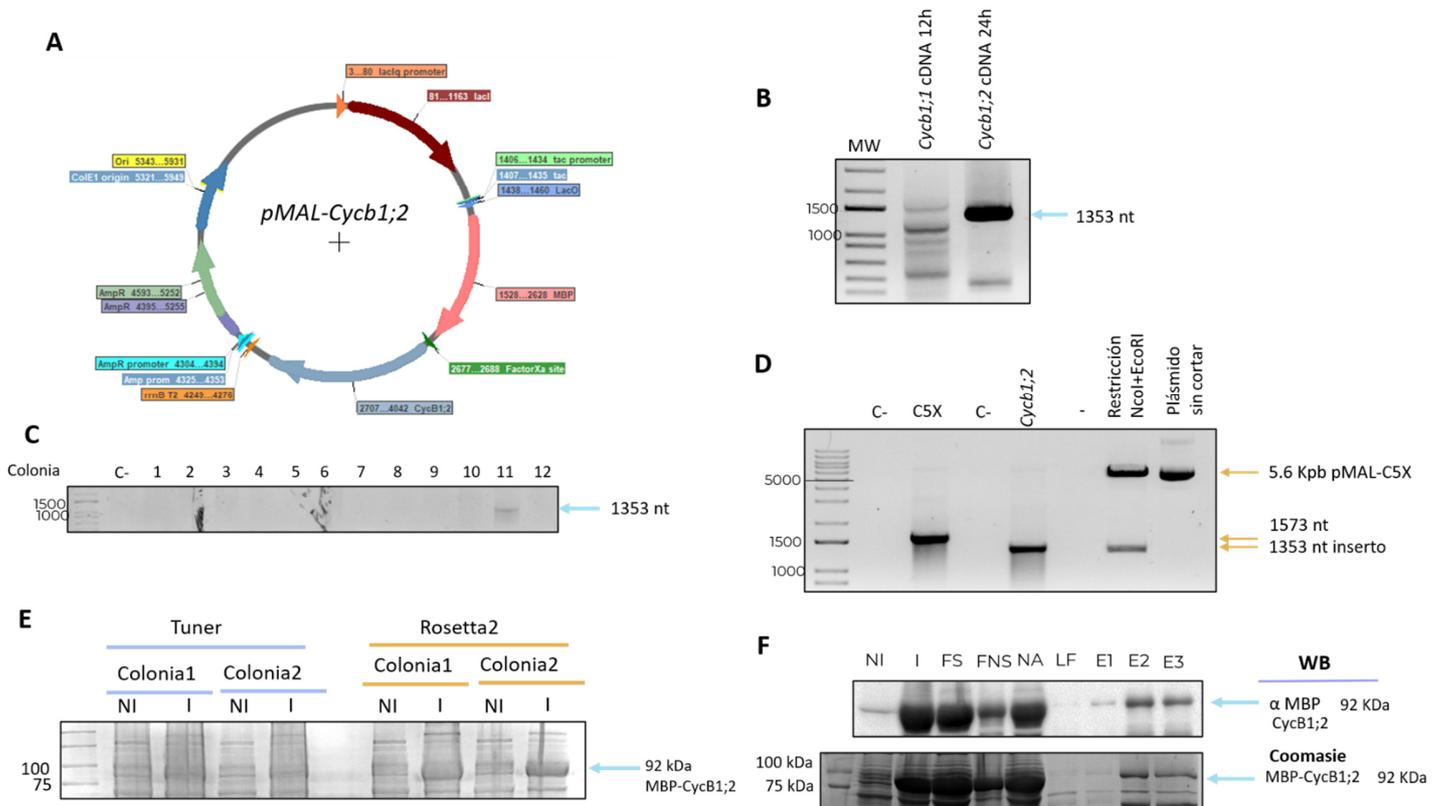


Figura 36. Clonación de *cycb1;2*. (A) Construcción *pMAL-cycb1;2*. (B) TouchDown para amplificación de *cycb1;1* y *cycb1;2*. (C) PCR en colonia de bacterias *E. coli* transformadas con *pMAL-cycb1;2*. (D) Verificación del plásmido por PCR con primers del vector (C5X), de clonación (*Cycb1;2*) y ensayo de doble restricción. (E) Sobreexpresión de MBP-CycB1;2 en bacterias *E. coli rosetta2* y *tuner*. (F) Purificación de MPB-CycB1;2 por unión a resina Amintra. Ensayo de western blot en el panel superior y tinción azul coomassie en el panel inferior. NI: No inducido, I: Inducido, FS: Fracción soluble, FNS: Fracción no soluble, NA: Fracción no absorbida a la columna, LF: Lavado final, Ei: Eluciones.

Finalmente, se purificó a la proteína His-PCNA, cuya clonación fue reportada por Herrera y colaboradores (2000) (Figura 37A). Se empleó una columna de NTA-Co a pH= 8.0. Como se observa en la figura 37B, se recupera una gran cantidad de His-PCNA mediante esta purificación.

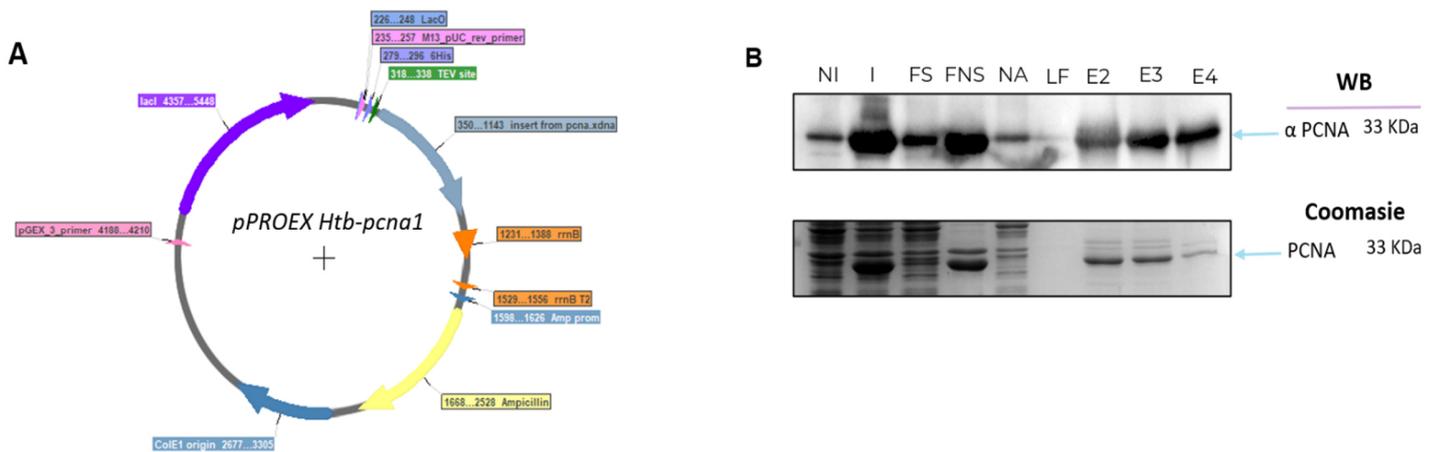


Figura 37. Purificación de PCNA. (A) Construcción *pPROEX Htb-pcna1*. (B) Purificación de His-PCNA por unión a resina NTA-Co. Ensayo de western blot en el panel superior y tinción azul coomasie en el panel inferior. NI: No inducido, I: Inducido, FS: Fracción soluble, FNS: Fracción no soluble, NA: Fracción no absorbida a la columna, LF: Lavado final, Ei: Eluciones.

5.3 Ensayos de interacción *in vitro*

Previo a los estudios de interacción se verificó que no existieran interacciones inespecíficas de las proteínas con las resinas de purificación, así como con los tags bajo las condiciones a utilizar. Para ello, se realizó la sobreexpresión de las proteínas a utilizar incluyendo los tags individuales. Las bacterias se lisaron por sonicación y la fracción soluble se puso en contacto con la resina a la cual no es afín. Se realizaron los lavados pertinentes y se eluyó para determinar que no existieran interacciones inespecíficas (Figura S11).

Una vez determinado lo anterior, se realizó el ensayo de interacción entre His-PCNA y MBP-RAD51A2 mediante la unión de los cultivos bacterianos y se purificaron los complejos a través de la columna NTA-Co. El ensayo se realizó con lavados astringentes (buffer wash +20 mM imidazol + 5 mM β-mercaptoetanol + glicerol 5% + tritón 1%) y se observó la presencia de ambas proteínas en los eluatos (Figura 38A), sin embargo, la abundancia de RAD51A2 es baja, lo cual podría deberse a una interacción relativamente débil. Para probar lo anterior, se realizó un ensayo de interacción donde se lavó en condiciones astringentes y otro a la par en condiciones no astringentes, encontrando que en condiciones no astringentes la interacción es más fuerte con respecto a los lavados con detergentes (Figura 38 A y B). Además, se realizó la interacción RAD51A2-PCNA empleando resina Amintra que une a MBP-RAD51A2, y se observó que PCNA se encuentra en una cantidad baja, lo

cual concuerda con la interacción antes mencionada (Figura 38C). De la misma forma, se encontró interacción entre PEX-RAD51A2 y His-PCNA purificado por NTA-Co (Figura 38D). Todos estos experimentos indican la interacción directa entre PCNA y RAD51A2 de maíz.

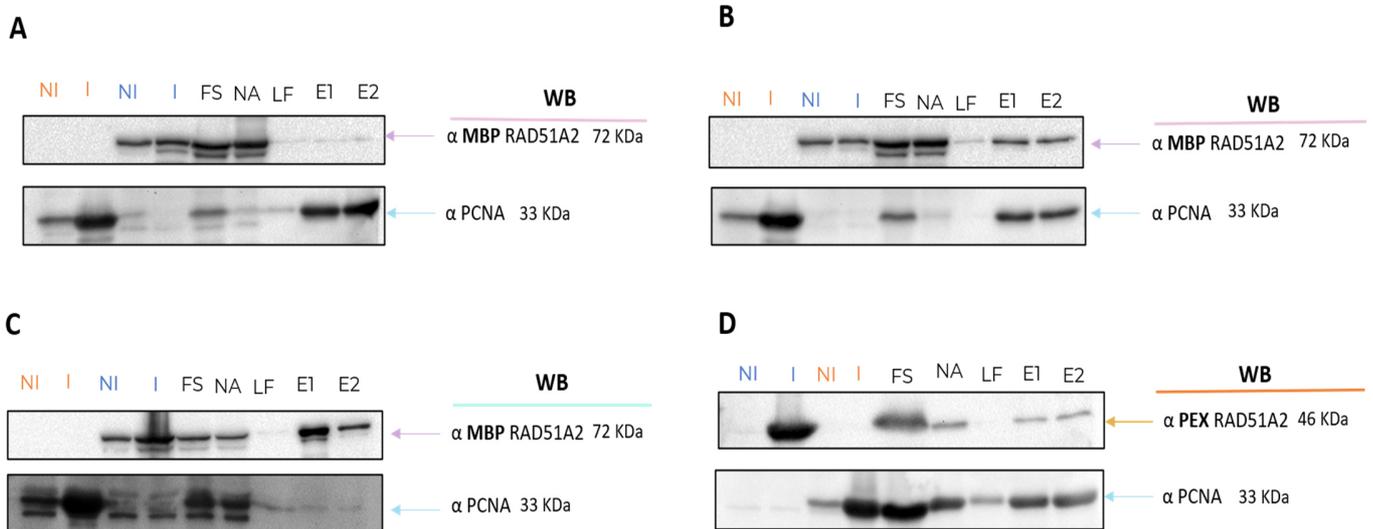


Figura 38. Interacción RAD51A2-PCNA. (A) Interacción His-PCNA/MBP-RAD51A2 por NTA-Co en condiciones astringentes. (B) Interacción His-PCNA/MBP-RAD51A2 por NTA-Co en condiciones no astringentes. (C) Interacción His-PCNA/MBP-RAD51A2 por Amintra agarosa. (D) Interacción His-PCNA/PEX-RAD51A2 por NTA-Co. NI: No inducido (azul representa las muestras de RAD51A2 y naranja las de PCNA), I: Inducido, FS: Fracción soluble, NA: Fracción no absorbida a la columna, LF: Lavado final, Ei: Eluciones.

Por otro lado, se analizó la interacción MBP-CycB1;2 con PEX-RAD51A2 uniendo a columna de Profinity, encontrando a ambas proteínas en los eluatos (Figura 39A) lo que indica su posible interacción. Por último, se realizó el ensayo de interacción entre MBP-CycB1;2 y His-PCNA encontrando interacción directa entre estas proteínas (Figura 39B). Estas interacciones sugieren que podrían formarse diversos complejos que contengan proteínas relacionadas al ciclo celular y a la reparación del daño al DNA.

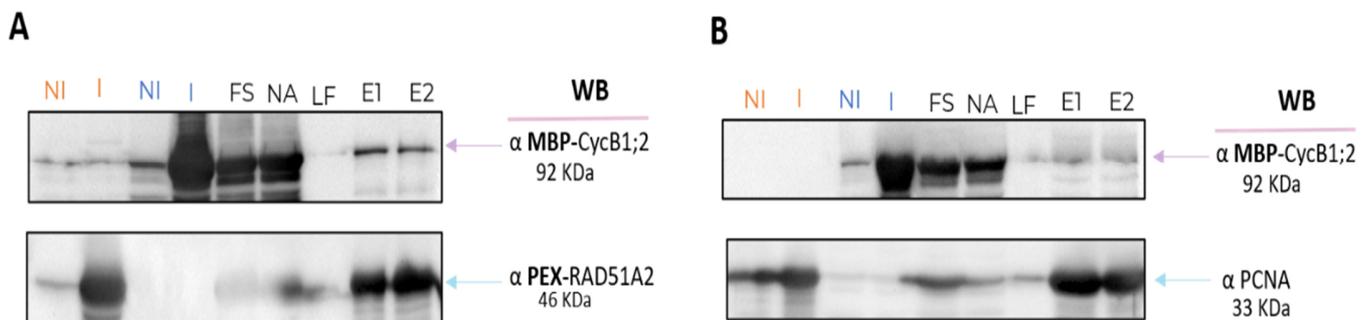


Figura 39. Interacción RAD51A2-CycB1;2. (A) Interacción MBP-CycB1;2/PEX-RAD51A2 por Profinity. (B) Interacción His-PCNA/MBP-CycB1;2 por NTA-Co. NI: No inducido (azul representa las muestras de CycB1;2 y naranja las de PCNA y RAD51A2), I: Inducido, FS: Fracción soluble, NA: Fracción no absorbida a la columna, LF: Lavado final, Ei: Eluciones.

5.4 Actividad de cinasa

Previamente se reportó la interacción directa entre PCNA y la cinasa dependiente de ciclina CDKB1;1 (Garza-Aguilar et al., 2019), así como la formación de complejos CDKB1;1-CycB1;2 en extractos proteicos de maíz (Lara-Nuñez et al., 2021). Para determinar si los complejos CDKB1;1-CycB1;2 son activos sobre RAD51A2 se realizaron ensayos de actividad de cinasa con complejos recombinantes formados por la interacción entre CDKB1;1, fosforilada por la cinasa activadora de CDKs (Cak1), y CycB1;2, utilizando como blanco de fosforilación a MBP-RAD51A2, encontrando que el complejo CDKB1;1-CycB1;2 reconoce al sustrato RAD51A2 y lo fosforila. Interesantemente, los complejos formados por CDKB1;1 y CycB2;1 también tienen actividad cinasa sobre RAD51A2, pero no así los complejos de estas dos ciclinas B con CDKA, sugiriendo un mecanismo de fosforilación específico para RAD51A2. Además, se observó la fosforilación sobre CycB1;2 por CDKA y CDKB1;1, mientras que CycB2;1 es fosforilada únicamente por CDKB1;1 y a un nivel menor que la fosforilación sobre CycB1;2 (Figura 40A).

Por otro lado, se puede observar la fosforilación sobre MBP-RAD51A2 por complejos de CDKB1;1 o CycB1;2 provenientes de extractos totales de maíz sugiriendo que esta fosforilación podría ocurrir *in vivo* (Figura 40B).

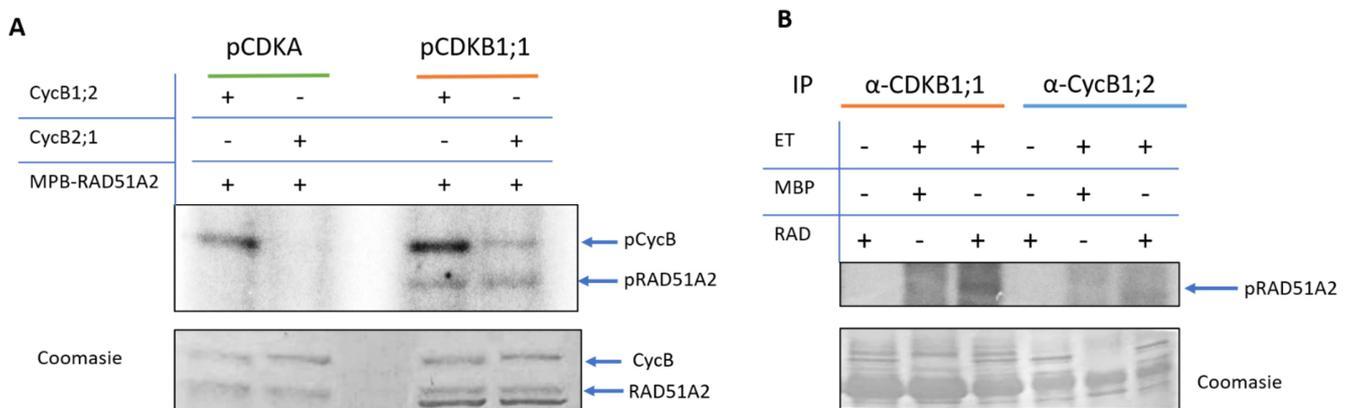


Figura 40. Actividad de cinasa sobre RAD51A2. (A) Actividad cinasa de complejos los recombinantes pCDKA-CycB1;2, pCDKA-CycB2;1, pCDKB1;1-CycB1;2 y pCDKB1;1-CycB2;1 sobre MPB-RAD51A2 n=1. (B) Actividad de cinasa asociada a CDKB1;1 y CycB1;2 en extractos totales de maíz sobre RAD51A2 n=2.

Finalmente se requiere realizar réplicas para confirmar este comportamiento, así como determinar si la presencia de PCNA puede modificar este patrón de fosforilación sobre RAD51A2.



Tiempo después de la imbibición (semanas)	Semillas protruidas (%)	Semillas con pelos radiculares (%)	Semillas con raíces seminales (%)	Nº de hojas promedio	Longitud promedio de la 2ª hoja (cm)
2	95	95	90	2.8 ±0.6	13.9±4.3

Figura 42. Planta de maíz de 2 semanas, lote 2, se embebieron 75 semillas repartidas en 3 rollos por 72 h en oscuridad a 25 °C y posteriormente fueron incubadas en cámara de fotoperiodo 12 h luz/ 12 h oscuridad, hasta que cumplieron 2 semanas. Tamaño de la segunda hoja. Cuantificación de parámetros fisiológicos.

Como siguiente parámetro fisiológico, se midió la viabilidad del lote de semillas. Esta se determinó mediante la tinción de las semillas con azul de tetrazolio, siguiendo la metodología reportada para especies vegetales (Govender, Aveling, and Kritzing 2008; Santos, Novembre, and Marcos-Filho 2007). En la figura 43A se muestra un ejemplo de semillas viables que son capaces de reducir el tetrazolio y generar un derivado colorido. Como se puede observar en la figura 43C, el 96.6% de las semillas son viables, por lo que se comprueba que se trata de un lote adecuado para los análisis.

Como control negativo de tinción, se hirvió un lote de semillas en agua por 4 h, para obtener semillas muertas, posteriormente se realizó la tinción y se obtuvo el 100% de semillas incapaces de reducir el compuesto químico, por lo que no presentan una coloración púrpura (Figura 43B).

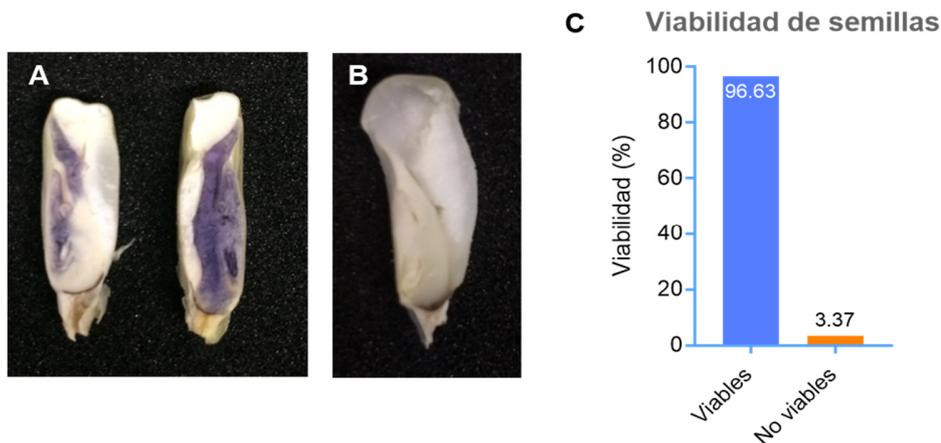


Figura 43. Viabilidad medida por ensayo de azul de tetrazolio. (A) Ejemplo de semillas viables. (B) Ejemplo de semilla no viable por tratamiento al calor. (C) Cuantificación de un lote de 90 semillas.

De acuerdo a lo reportado por Santos (2007) las semillas teñidas pueden subdividirse de acuerdo al grado de tinción en el eje embrionario y el endospermo suave en:

- **Viable-vigoroso**, cuando el color de la tinción es morado en todo el embrión y el endospermo, ambos con tejidos turgentes y sanos, sin lesiones visibles.
- **Viable-no vigoroso**, cuando el endospermo y / o cotiledones tienen menos del 50% de áreas sin teñir, sin lesiones visibles; punta de la radícula sin teñir y que muestra tejido turgente.
- **No viable**, cuando no existe tinción del endospermo y cotiledones.

Siguiendo esta clasificación (Figura 44A), se observó que el 87.6 % del lote de semillas son viables vigorosas, el 8.99% son no vigorosas y únicamente el 3.37% no son viables (Figura 44B).

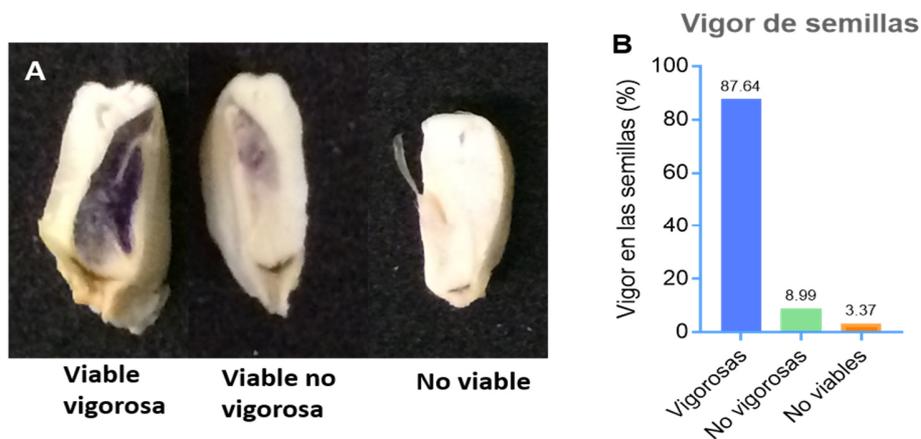


Figura 44. Vigor medido por ensayo de azul de tetrazolio. (A) Ejemplo de semillas vigorosas, no vigorosas y no viables. (B) Cuantificación de un lote de 90 semillas.

Ya que el modelo de estudio a emplear son ejes embrionarios de maíz, se analizó la viabilidad y vigor de los ejes extraídos. Como se observa en la figura 45, los valores de los parámetros medidos no cambian sustancialmente entre semillas completas y ejes embrionarios, mostrando que en el proceso de extracción, las células presentes en los ejes embrionarios se mantienen con vida.

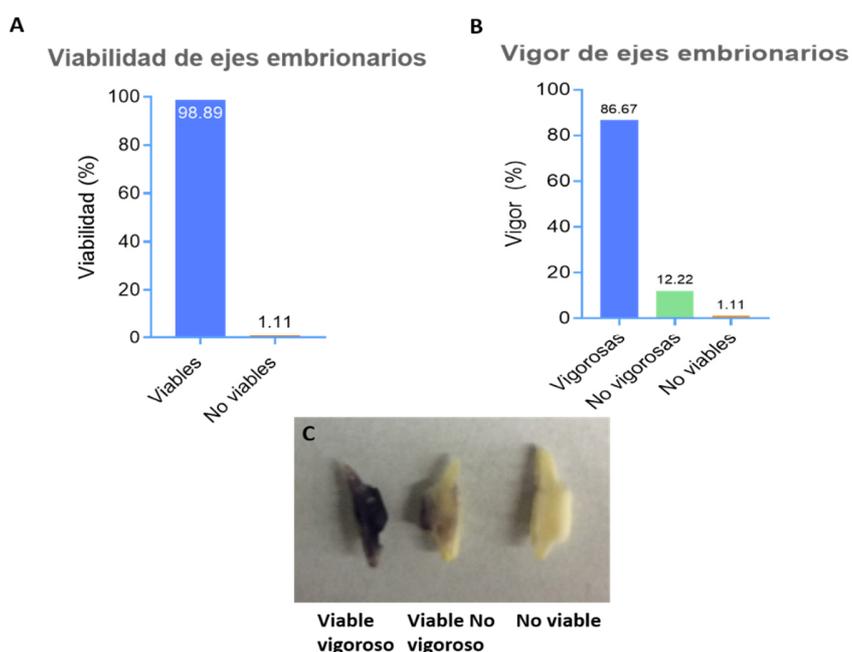


Figura 45. Viabilidad y vigor de ejes embrionarios de maíz. (A) Cuantificación de viabilidad en un lote de 90 ejes embrionarios. (B) Cuantificación de vigor en un lote de 90 ejes embrionarios. (C) Ejemplo de ejes: vigoroso, no vigoroso y no viable.

7. Modelo de inducción de daño al DNA

Se realizó el ensayo de viabilidad en ejes tratados con zeocina 10 y 200 μM , así como sus respectivos controles, tras 3, 12 y 24 h de recuperación después de la exposición. Como se observa en la figura 46, no existen cambios significativos entre los grupos control y los tratados con zeocina en los tiempos de estudio. Esto podría deberse a dos razones, por un lado, la sensibilidad de la técnica es baja y permite evidenciar únicamente una gran cantidad

de daño, lo cual no se está generando con el tratamiento, o bien, la zeocina no está siendo introducida en las células.

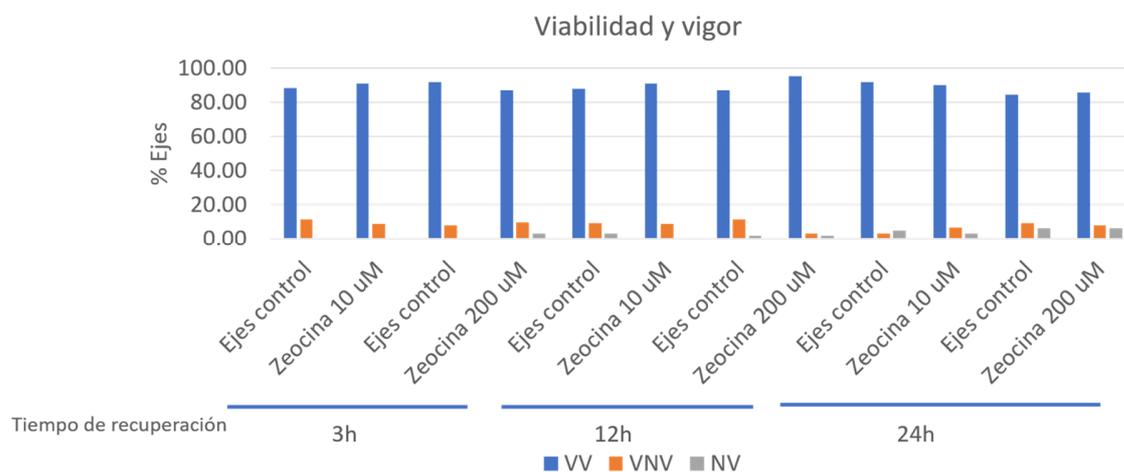


Figura 46. Viabilidad y vigor de ejes embrionarios de maíz tratados con zeocina o control. VV: Viable-vigorous, VNV: Viables-No vigorosos, NV: No viables. Para cada grupo control o tratado se emplearon 60 ejes embrionarios, repartidos en dos réplicas de 30 cada una.

Para determinar si la zeocina es introducida a los ejes embrionarios y causa daño al DNA, se realizó una extracción de DNA genómico (gDNA) tanto de ejes control que no fueron sometidos a vacío, ejes control que se trataron en vacío con buffer de imbibición y tratados con 200 µM de zeocina. Las muestras se cuantificaron y a 1.5 µg de DNA se les agregó NaOH 0.1 N y se desnaturalizaron a 95 °C por 15 min. Como se observa en la figura 47A, tras 24 h después de la exposición a zeocina, el DNA de ejes tratados con 200 µM genera un corrimiento de fragmentos de distintos tamaños, indicando que el DNA se fragmentó, a diferencia de lo observado en los controles. Además, se cargaron 300 ng de gDNA si tratar con NaOH mostrando que la extracción del DNA se realizó de forma correcta, evitando fragmentarlo (Figura 47A). Por otro lado, se observó que el crecimiento de los ejes tratados con 2000 µM de zeocina se reduce, mientras que a concentraciones de 20 y 200 µM los ejes crecen similar al control (Figura 47B y C). Ahora bien, se requerirá realizar una curva dosis-respuesta entre concentraciones de 20 a 200 µM para determinar la concentración óptima, así como un ensayo de recuperación que demuestre que el daño generado puede ser reparado.

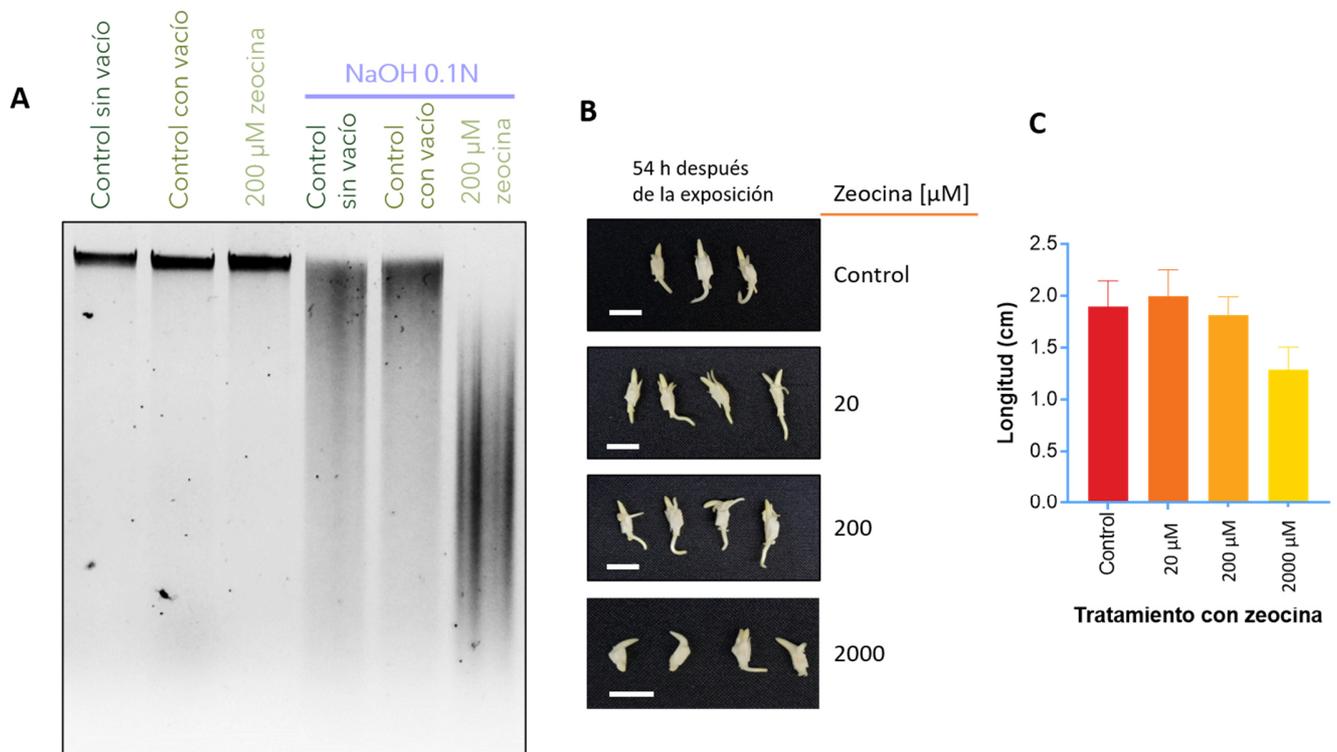


Figura 47. Modelo de daño al DNA. (A) gDNA de Gel de agarosa 1.5%. (B) Fenotipo de ejes embrionarios tras 54 h de imbibición después de exposición a zeocina. Barra blanca = 1 cm. (C) Cuantificación de la longitud de los ejes embrionarios en B n=10.

Discusión de resultados

El estudio de las plantas y sus mecanismos de reparación ante daño al DNA ha cobrado gran importancia, entre otras razones, por el hecho de que la integridad del genoma está directamente relacionada con la viabilidad de las células en los diferentes tejidos de las semillas, lo cual se ve reflejado durante la germinación y que impacta en el rendimiento de las cosechas. Por ello, la interconexión entre los procesos de germinación y reparación del daño al DNA son de interés. Algunos marcadores claves de estos procesos son las proteínas relacionadas al ciclo celular: PCNA, Ciclinas tipo B (CycB) y Cinasas

dependientes de ciclinas tipo B (CDKB) así como la proteína RAD51, fundamental para la reparación, específicamente vía recombinación homóloga.

El genoma del maíz, al igual que el de otras plantas, ha tenido duplicaciones génicas completas por lo que usualmente las superfamilias de proteínas contienen mayor número de miembros comparado con otros organismos eucariontes, por ejemplo, mientras que en humanos solo existen tres ciclinas tipo B, en maíz existen 7 (Figura 13C), lo que ha sugerido que esto les permite a las plantas, dada su naturaleza sésil, responder ante diversos estímulos medioambientales (Hughes et al., 2014). En este estudio se analizaron las secuencias proteicas de las familias de RAD51, Cyc tipo B, CDKsB y PCNA, encontrado que PCNA y RAD51A son proteínas conservadas entre los diferentes organismos, mientras que las CDKsB y CycsB son menos conservadas, además se observa una clara separación entre los miembros de las familias 1 de las familias 2 de CycsB y CDKsB, habiendo también separación entre plantas monocotiledóneas (maíz, arroz, trigo) y dicotiledóneas (*A. thaliana*, tomate, tabaco) (Figura 13), no solo en estructura sino también en función (Chen et al., 2019; Weimer et al., 2016; Endo et al., 2012).

Por otro lado, desprendido de las evidencias mostradas sobre la relevancia de los motivos de interacción con PCNA, se decidió analizar la presencia de estos motivos dentro de las proteínas de interés. Debido a que no se cuenta con las estructuras cristalizadas se realizaron modelos *in silico* de las estructuras terciarias de las proteínas de interés.

El modelado *in silico*, así como la dinámica molecular, son herramientas poderosas que permiten determinar con precisión la disposición tridimensional de los aminoácidos, ya sea basándose en estructuras semejantes que ya hayan sido cristalizadas previamente, o en el cálculo de velocidad, energía y posición de cada átomo dentro de un sistema.

En este sentido, las proteínas mejor conservadas, como RAD51A2 y PCNA, generan estructuras más confiables y completas, cuando son modeladas por homología, mientras que, para las menos conservadas, como es el caso de CycB1;1, CycB1;2 y CKDB1;1 resulta complicado obtener un modelo completo por homología. Sin embargo, otros métodos como el modelado por plegado, donde se analizan fracciones de la proteína en busca de secuencias homólogas, permiten una reconstrucción más probable. Finalmente, la validación más rigurosa y aceptada para modelos de proteínas es someter los sistemas obtenidos a dinámica molecular, donde el cálculo de posición y velocidad de cada átomo

en el tiempo, tomando en cuenta su energía y las posibles interacciones con el resto de los átomos en la molécula, permite obtener un modelo certero.

Los modelos obtenidos mediante homología deben ser analizados a partir de pruebas estadísticas, y una de las más empleadas es el análisis QMEAN, el cual es una función de puntuación que consiste en la combinación lineal de al menos 4 descriptores estructurales: primero, el potencial de interacción dependiendo de la distancia y fuerza entre cada residuo, el segundo se realiza entre todos los átomos para evaluar las interacciones de largo alcance, también se determinan los ángulos de torsión donde cada uno se calcula sobre tres aminoácidos consecutivos para analizar la geometría de la cadena principal y finalmente un potencial de solvatación para describir el estado conformacional de los residuos. El mejor modelo obtenido tendrá un valor numérico de QMEAN más grande (Benkert et al., 2011). Además, resulta de gran utilidad obtener los diagramas de Ramachandran, que permiten observar si los aminoácidos que se encuentran en una estructura secundaria en específico mantienen ángulos de torsión válidos. Dentro de los modelos obtenidos en este trabajo, los mejores valores de QMEAN y diagramas de Ramachandran, corresponden a los modelos de PCNA y RAD51A2 debido a la alta identidad con sus homólogos cristalizados.

Por otro lado, los modelos por plegado se validan mediante el C-score; se trata de una puntuación de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER (Yang et al., 2015). Se calcula sobre los alineamientos de los moldes y los parámetros de unión de las simulaciones del ensamblaje en la estructura. La puntuación C se encuentra típicamente en el rango de -5 a 2, donde una puntuación C de valor más alto significa un modelo con una confianza alta (Yang et al., 2015). Dentro de los modelos analizados, RAD51A2 y CDKB1;1 tienen los mejores C-score. Sin embargo, los cálculos de RMSD (Root-mean-square deviation), que determinan la desviación en posición de un modelo, con respecto a una referencia, son altos indicando que no son los modelos óptimos.

A su vez, los ensayos de dinámica molecular deben ser analizados mediante métodos estadísticos, que permitan determinar la calidad de las estructuras a lo largo del tiempo. El cálculo de RMSD es esencial, pues permite precisar si el sistema ha llegado al equilibrio, pues todas las interacciones permanecen estables y por ello la estructura deja de tener grandes movimientos. En los casos de estudio, se observa que tanto RAD51A2 como CycB1;1 y PCNA logran llegar al equilibrio, a pesar de que CycB1;1 mantenía su N-terminal no estructurado. Por el contrario, para CDKB1;1 y CycB1;2 parecieran no alcanzar el

equilibrio por completo pues se observa una tendencia a incrementar hacia el final de la dinámica, esto debido a que sus N-terminal se pliegan en una conformación poco estable, por ello debería alargarse el tiempo de simulación para permitir el equilibrio o bien realizar una dinámica molecular únicamente del N-terminal.

Otro parámetro clave es la medición de root-mean-square fluctuation (RMSF) que permite determinar cuáles cadenas laterales dentro de la proteína son aquellas que se mantienen en constante movimiento, en este caso se observan las mayores fluctuaciones en los residuos de los N-terminales pues se trata de regiones intrínsecamente móviles, además en el caso de CycB1;1, CycB1;2 y CDKB1;1 se debe tomar en cuenta que, desde los modelos, estos extremos no mantenían una conformación específica.

Finalmente, el análisis de cluster permite determinar cuántas estructuras son lo suficientemente parecidas (± 0.2 nm de RMSD) a lo largo del tiempo, mostrando la estructura que más veces se repite, es decir la más estable, las cuales serán de utilidad para el estudio de interacción con PCNA.

El estudio de motivos de unión a PCNA muestra que las proteínas de interés, RAD51A2, CycBs y CDKBs, contienen PIPs conservados en plantas, mientras que esta conservación se mantiene en plantas, mamíferos y levadura para RAD51 (Tabla 7).

Al analizar la localización de los motivos PIP en las estructuras tridimensionales, obtenidas por dinámica molecular, se puede notar que aquellos que se encuentran en la superficie de las proteínas (Tabla 8), podrían interactuar con PCNA con mayor facilidad, esto, con respecto a los motivos que se encuentran internalizados en el core de las proteínas, pues el impedimento estérico causado por las nubes electrónicas de los residuos de aminoácidos contiguas al motivo, podrían impedir que la interacción ocurra.

Existen múltiples estudios que demuestran la funcionalidad de los motivos PIP y PIP-Like indicando que son suficientes y necesarios para las interacciones proteína-proteína con PCNA (Warbrick 1998; Acharya et al., 2011; Prestel et al., 2019; Lowran et al., 2020; Andrs et al., 2020), resaltando el hecho de que las proteínas con motivos PIP parecieran unirse con mayor afinidad, comparando con las que se unen por un PIP-Like. Esto permite sugerir que CycB1;1, CycB1;2, CDKB1;1 y RAD51A2 podrán unirse a PCNA *in vivo*. El determinar las regiones putativas de interacción entre CycB1;1, CycB1;2, CDKB1;1 y RAD51A2 con PCNA permitirá realizar un modelo *in silico* para la formación de este complejo que podría estar implicado en la reparación del daño al DNA.

El análisis de acoplamiento molecular entre RAD51A2 y PCNA muestra que la interacción podría llevarse a cabo mediada por el motivo PIP 243-249, además, la dinámica molecular revela que este complejo es estable (Figura 29). Así mismo, se determinó que RAD51A2 presenta dos sitios subóptimos y uno óptimo para la fosforilación por CDKs, sugiriendo que los complejos de CDKs podrían ser activos sobre este sustrato, tal como fue reportado en *A. thaliana* (Weimer et al., 2016).

Existen diversos reportes en plantas y mamíferos que muestran la conservación en función y estructura de la proteína reparativa RAD51, siendo esta una proteína esencial para la recombinación homóloga al funcionar como recombinasa dependiente de ATP (Dray et al., 2010; Boyko et al., 2006; Hirakawa et al., 2017; Li et al., 2007); por esta razón se ha empleado como proteína marcadora de la reparación ante daño al DNA. En maíz existen dos genes para RAD51, *Rad51A1* y *Rad51A2* que mantienen un 90% de identidad y cuya expresión es muy similar (Maize GDB). Debido a que *ZmRad51A2* es transcrito como mensajero único fue el gen candidato para realizar la clonación.

Una proteína implicada en el ciclo celular y la reparación de daño al DNA es el Antígeno Nuclear de Proliferación celular (PCNA) (Strzalka et al., 2013; Strzalka et al., 2012). PCNA es una proteína plataforma que permite la interacción de diversas proteínas. Dentro de los mecanismos de reparación, se ha observado su participación al asociarse a proteínas clave, por ejemplo glicosilasas, MutIα y DNA polimerasas reparativas (Spampinato, 2017; Leung et al., 2018). Además, durante la tolerancia al daño se ha observado que la poliubiquitinación en la K164 de PCNA favorece la recombinación homóloga (Sakamoto et al., 2018). En este estudio se mostró la interacción directa entre PCNA y RAD51A2 de maíz (Figura 38), lo cual sugiere que esta interacción podría llevarse a cabo durante la reparación del daño al DNA mediante recombinación homóloga. Además, esta interacción puede estar mediada por los motivos PIP de RAD51A2, tal como lo mostró el modelo de acoplamiento molecular (Figura 29).

Otro grupo de proteínas relacionadas al ciclo celular que se han asociado a la reparación de daño al DNA es la familia de CycB1 en *A. thaliana*, donde se ha mostrado que son necesarias para la formación de foci reparativos, además en complejo con CDKB pueden fosforilar a RAD51 (Biedermann et al., 2017; Weimer et al., 2016). En maíz existen pocos estudios sobre la función de ciclinas tipo B fuera de su papel en ciclo celular, y únicamente se ha sugerido que CycB1;1 podría estar implicada en procesos diferentes, pues permanece presente aún después de la fase M, en diversas secciones del eje embrionario,

mientras que CycB1;2 se ha relacionado como marcador de ciclo celular pues desaparece tras la anafase (Mews et al., 1997). Sin embargo, resulta de interés un estudio con técnicas más directas que permitan dilucidar con claridad la posible participación de cada una de estas proteínas en diversos procesos.

En este sentido, la producción de proteína recombinante derivada de la clonación del gen *cycb1;2* permitió mostrar sus interacciones con otras proteínas, entre ellas PCNA (Figura 39B), interacción que podría estar mediada por los motivos PIP presentes en CycB1;2 (Tabla 8). Además, permitió el análisis de interacción directa con RAD51A2 (Figura 39A), lo cual sugiere que CycB1;2 podría reconocer a RAD51A2 como posible sustrato de fosforilación por una CDK.

En plantas se ha reportado que las cinasas dependientes de ciclina tipos A y B pueden interaccionar y formar complejos activos con diversas ciclinas, las cuales provén especificidad hacia el sustrato a fosforilar (John et al., 2001; Kitsios et al., 2011; Godínez-Palma et al., 2013). En este estudio se mostró que los complejos recombinantes CDKB1;1-CycB1;2 son activos sobre RAD51A2 y, como previamente se mostró, CycB1;2 podría estar dirigiendo este proceso. Previamente se había reportado que RAD51 es blanco de fosforilación por complejos CDKB-CycB1;1 en *A. thaliana* (Weimer et al., 2016), similar a lo encontrado en este trabajo usando maíz. Interesantemente los complejos formados por CDKB1;1-CycB2;1 también son activos sobre RAD51A2.

En *A. thaliana* se mostró que los complejos CDKA-CycB son activos sobre RAD51 (Weimer et al., 2016), esto parece ser distinto en maíz pues complejos activos de CDKA-CycB1;2 y CDKA-CycB2;1 no son capaces de fosforilar a RAD51A2, demostrando que se requiere la actividad de CDKB, pero no la de CDKA. De forma similar, en maíz se ha observado la formación de complejos CDKA/CycB2;2 los cuales no son activos sobre histona H1, indicando que la actividad de complejos CDKB/CycB es específica sobre ciertos sustratos (Sabelli et al., 2014). Del mismo modo, se observó que CycB1;2 y CycB2;1 son sustratos de fosforilación de CDKB mientras que para CDKA solo se observa fosforilación sobre CycB1;2; esta fosforilación podría ocurrir sobre el sitio óptimo que se encuentra en la superficie de la proteína como lo mostró el modelo en la figura 25.

Por otro lado, se observó también que complejos obtenidos de extractos proteicos de maíz, conteniendo CDKB1;1 o CycB1;2, son capaces de fosforilar a RAD51A2, indicativo de que podría tratarse de un sustrato fisiológico y que su fosforilación es importante para la

regulación de su actividad. Sería interesante determinar si la adición de PCNA modifica la actividad de cinasa de los complejos CDKB1;1-CycB1;2 sobre RAD51A2.

Una vez determinadas las posibles asociaciones entre reguladores del ciclo celular y la proteína reparativa RAD51A2, será interesante determinar si estas asociaciones pueden ocurrir de forma fisiológica en maíz, y si estas interacciones son favorecidas ante estímulos externos que enciendan la respuesta de daño al DNA, por ejemplo, agentes químicos con la zeocina. Para ello se inició la construcción de un modelo de inducción de daño al DNA.

Estos modelos de inducción de daño al DNA en plantas se han empleado para dilucidar las proteínas y mecanismos involucrados en los procesos de reparación, ya que son vitales para las células. (Balestrazzi et al., 2011; Hirakawa et al., 2017; Endo et al., 2012). Resulta de gran importancia para un modelo de inducción de daño al DNA, mostrar que el material biológico a utilizar no se encuentre dañado por sí mismo, por ello se debe validar el lote de semillas a emplear.

El lote 2 utilizado en estos estudios muestra parámetros fisiológicos correctos, es decir, su temporalidad en germinación es la adecuada y el ensayo con azul de tetrazolio indica que tiene alta viabilidad y vigor, comprobando que se trata de un lote óptimo para realizar la inducción de daño al DNA (Figuras 41, 42, 43 y 44).

La estructura de una semilla de maíz está compuesta por diversas capas (Figura 2), algunas de las cuales son duras, cerosas y resistentes a la penetración de compuestos exógenos, logrando así la preservación de las células encargadas de generar una nueva planta. Debido a esta resistencia, resulta poco factible la inducción de daño a DNA por zeocina en la semilla completa, por lo que se decidió emplear como modelo de estudio ejes embrionarios de maíz. Al analizar la viabilidad y vigor de los ejes no se halló diferencia en estos parámetros entre semillas y ejes embrionarios (Figura 45), indicando que el método de extracción de ejes no modifica su viabilidad y vigor.

La zeocina (PubChem 159333) es un glicopéptido de la familia de las bleomicinas, la cual originalmente se aisló de la bacteria *Streptomyces verticillus* que se intercala en el DNA causando rupturas, principalmente, de doble cadena (Gatignol et al., 1988). Se trata de una molécula relativamente grande (1427.5 g/mol), por lo que introducirlo dentro de una estructura rígida, como lo son los ejes embrionarios de maíz, podría resultar complicado, por ello se decidió favorecer la introducción de esta molécula mediante vacío, aun así, no se observaron diferencias significativas en viabilidad entre los grupos control y tratados

(Figura 46). Interesantemente, cuando los ejes se incuban por 24 h a 25 °C tras el vacío, el número de ejes viables no vigorosos disminuye, mientras que los ejes no viables se incrementan ligeramente, indicando que los ejes no vigorosos son más susceptibles. Además, este efecto se observa únicamente a las 24 h, momento en el cual el metabolismo celular de los ejes embrionarios se encuentra más activo (Figura 4), donde el ambiente químico y metabólico determina si la célula podrá contender contra el daño o se desencadena la muerte celular.

Para determinar si el tratamiento con zeocina genera rupturas en el DNA se realizó extracción de DNA genómico de ejes embrionarios, y se observó que a una concentración de 200 μM el DNA se daña de forma muy evidente, El crecimiento de los ejes después de la exposición al agente genotóxico, no parece estar comprometido hasta una concentración de 200 μM a pesar del daño al DNA generado, esto podría deberse a un efecto de reparación donde las células son capaces de contender contra el daño. Sin embargo, a una concentración de 2000 μM el daño es tan severo que las células son incapaces de hacer frente a dicho estrés, posiblemente desencadenando la muerte celular programada. Será muy importante estandarizar este modelo para que pueda ser utilizado en el estudio de la respuesta de los marcadores de ciclo celular y reparación del DNA utilizados en esta tesis, ante daño al DNA, y la posible función de cada uno de ellos.

Conclusiones

- ✓ Se generaron modelos de estructura terciaria de CycB1;1, CycB1;2, CDKB1;1, RAD51A2 y PCNA.
- ✓ Los modelos obtenidos tras dinámica molecular de RAD51A2, CycB1;1, CycB1;2, PCNA y CDKB1;1 se pueden utilizar para modelar sus interacciones.
- ✓ Las proteínas de interés CycB1;1, CycB1;2, CDKB1;1 y RAD51A2 contienen motivos PIP y PIP-Like en la superficie de estas, sugiriendo su posible interacción con PCNA.
- ✓ El modelo computacional sugiere una interacción estable entre RAD51A2 y PCNA.
- ✓ Existe una interacción directa entre RAD51A2 y PCNA, CycB1;2 con PCNA y CycB1;2 con RAD51A2.

- ✓ Los complejos recombinantes de CDKB1;1-CycB1;2 y CDKB1;1-CycB2;1 son activos sobre RAD51A2, mientras que los complejos CDKA-CycB1;2 y CDKA-CycB2;1 no lo son.
- ✓ En extractos proteicos de maíz se encontró actividad asociada a CDKB1;1 y CycB1;2 sobre RAD51A2.
- ✓ El lote de semillas a emplear tiene parámetros de viabilidad y vigor correctos para el estudio.
- ✓ Se construyó un modelo de inducción de daño al DNA por zeocina que genera ruptura del DNA.

Perspectivas

- Generar un modelo computacional del macro-complejo CycB1;2-CDKB1;1-PCNA-RAD51A2.
- Determinar si PCNA modifica la actividad de cinasa de CDKB1;1 sobre RAD51A2.
- Concluir la estandarización del modelo de daño al DNA tanto por zeocina como por radiación gamma.
- Evaluar el efecto de daño al DNA en ejes embrionarios de maíz sobre la expresión y abundancia proteica.
- Determinar la formación de complejos binarios PCNA con CycB1;2, CDKB1;1 y RAD51A respectivamente en la cromatina ante daño al DNA.
- Identificar la co-localización de PCNA con CycB1;2, CDKB1;1 y RAD51 respectivamente en sitios con daño al DNA, mostrando su posible participación en la respuesta ante daño al DNA.

Referencias

- Acharya, Narottam, Roland Klassen, Robert E. Johnson, Louise Prakash, and Satya Prakash. 2011. 'PCNA binding domains in all three subunits of yeast DNA polymerase δ modulate its function in DNA replication', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 17927-32.
- Andrs, Martin, Zdenka Hasanova, Anna Oravetzova, Jana Dobrovolna, and Pavel Janscak. 2020. 'RECQ5: A Mysterious Helicase at the Interface of DNA Replication and Transcription', *Genes*, 11: 232.
- Balajee, Adayabalam S, and Charles R Geard. 2001. 'Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells', *Nucleic acids research*, 29: 1341-51.
- Balestrazzi, Alma, Massimo Confalonieri, Anca Macovei, Mattia Donà, and Daniela Carbonera. 2011. 'Genotoxic stress and DNA repair in plants: emerging functions and tools for improving crop productivity', *Plant Cell Reports*, 30: 287-95.
- Banerjee, Aditya, and Aryadeep Roychoudhury. 2016. 'Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins: structural and functional aspects in plant abiotic stress', *Plant Growth Regulation*, 79: 1-17.
- Becerril, Nazul, Miguel Ángel Martínez, Elpidio García, and Jorge Manuel Vázquez Ramos. 2012. 'Chromatin Bound PCNA is Complexed with Cell Cycle Protein Regulators as Determined by Chromatin Immunoprecipitation', *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56: 10-14.
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
- Bewley, J Derek, Kent Bradford, and Henk Hilhorst. 2012. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy* (Springer Science & Business Media).
- Biedermann, Sascha, Hirofumi Harashima, Poyu Chen, Maren Heese, Daniel Bouyer, Kostika Sofroni, and Arp Schnittger. 2017. 'The retinoblastoma homolog RBR1 mediates localization of the repair protein RAD51 to DNA lesions in Arabidopsis', *The EMBO Journal*, 36: 1279-97.
- Billon, Pierre, Jian Li, Jean-Philippe Lambert, Yizhang Chen, Véronique Tremblay, Joseph S. Brunzelle, Anne-Claude Gingras, Alain Verreault, Tomohiko Sugiyama, Jean-Francois Couture, and Jacques Côté. 2017. 'Acetylation of PCNA Sliding Surface by Eco1 Promotes Genome Stability through Homologous Recombination', *Molecular Cell*, 65: 78-90.
- Bourbousse, C., Vegesna, N., & Law, J. A. (2018). SOG1 activator and MYB3R repressors regulate a complex DNA damage network in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(52), E12453-E12462.
- Boyko, A., Zemp, F., Filkowski, J., & Kovalchuk, I. (2006). Double-strand break repair in plants is developmentally regulated. *Plant physiology*, 141(2), 488-497.
- Brandsma, Inger, and Dik C van Gent. 2012. 'Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act', *Genome integrity*, 3: 9.
- Buendía-Monreal, Manuel, Ilenia Rentería-Canett, Octavio Guerrero-Andrade, Carlos E. Bravo-Alberto, León P. Martínez-Castilla, Elpidio García, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2011. 'The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns', *Physiologia Plantarum*, 143: 297-308.
- Chen, Poyu, Caroline A Sjogren, Paul B Larsen, and Arp Schnittger. 2019. 'A multi-level response to DNA damage induced by aluminium', *The Plant Journal*, 98: 479-91.

- Da Ines, Olivier, Fabienne Degroote, Chantal Goubely, Simon Amiard, Maria E Gallego, and Charles I White. 2013. 'Meiotic recombination in Arabidopsis is catalysed by DMC1, with RAD51 playing a supporting role', *PLoS genetics*, 9.
- Dante, Ricardo A, Brian A Larkins, and Paolo A Sabelli. 2014. 'Cell cycle control and seed development', *Frontiers in Plant Science*, 5: 493.
- Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G. J., Hammel, M., ... & Sung, P. (2010). Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nature structural & molecular biology*, 17(10), 1255-1259.
- Dewitte, Walter, and James A.H. Murray. 2003. 'The Plant Cell Cycle', *Annual Review of Plant Biology*, 54: 235-64.
- Elder, Rhoderick H, and Daphne J Osborne. 1993. 'Function of DNA synthesis and DNA repair in the survival of embryos during early germination and in dormancy', *Seed Science Research*, 3: 43-53.
- Endo, Masaki, Shigeki Nakayama, Chikage Umeda-Hara, Namie Ohtsuki, Hiroaki Saika, Masaaki Umeda, and Seiichi Toki. 2012. 'CDKB2 is involved in mitosis and DNA damage response in rice', *The Plant Journal*, 69: 967-77.
- Evans, Tom, Eric T. Rosenthal, Jim Youngblom, Dan Distel, and Tim Hunt. 1983. 'Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division', *Cell*, 33: 389-96.
- Furukawa, T, MJ Curtis, CM Tominey, YH Duong, BWL Wilcox, D Aggoune, JB Hays, and AB Britt. 2010. 'A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation', *DNA repair*, 9: 940-48.
- Gamper, Armin M., Serah Choi, Yoshihiro Matsumoto, Dibyendu Banerjee, Alan E. Tomkinson, and Christopher J. Bakkenist. 2012. 'ATM Protein Physically and Functionally Interacts with Proliferating Cell Nuclear Antigen to Regulate DNA Synthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 287: 12445-54.
- García, Felipe Cruz, Luis F Jiménez, and Jorge M Vázquez-Ramos. 1995. 'Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds', *Seed Science Research*, 5: 15-23.
- Garza-Aguilar, Sara Margarita, Sánchez Camargo Victor Allan, Godínez Palma Silvia Karina, and Lara Núñez Aurora. 2014. 'Avances recientes en el estudio del ciclo celular en plantas. ', *Revista de Educación bioquímica*, 32: 39-47.
- Garza-Aguilar, S. M., Lara-Núñez, A., García-Ramírez, E., & Vázquez-Ramos, J. M. (2017). Modulation of CycD3; 1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physiologia plantarum*, 160(1), 84-97.
- Garza-Aguilar, Sara Margarita, Javier Axosco-Marín, Aurora Lara-Núñez, Estefany Damaris Guerrero-Molina, Aldo Tonatiuh Lemus-Enciso, Elpidio García-Ramírez, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2019. 'Proliferating cell nuclear antigen associates to protein complexes containing cyclins/cyclin dependent kinases susceptible of inhibition by KRPs during maize germination', *Plant Science*, 280: 297-304.
- Gatignol, A., Durand, H., & Tiraby, G. (1988). Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS letters*, 230(1-2), 171-175.
- Godínez-Palma, S. K., García, E., Sánchez, M. D. L. P., Rosas, F., & Vázquez-Ramos, J. M. (2013). Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *Journal of experimental botany*, 64(18), 5661-5671.
- Godínez-Palma, Silvia K., Fernando R. Rosas-Bringas, Omar G. Rosas-Bringas, Elpidio García-Ramírez, Jorge Zamora-Zaragoza, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2017. 'Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D-cyclin-dependent kinase complexes', *Journal of experimental botany*, 68: 1585-97.

- Govender, V., T. A. S. Aveling, and Q. Kritzing. 2008. 'The effect of traditional storage methods on germination and vigour of maize (*Zea mays* L.) from northern KwaZulu-Natal and southern Mozambique', *South African Journal of Botany*, 74: 190-96.
- Gutiérrez, Ruth, Francisco Quiroz-Figueroa, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2005. 'Maize Cyclin D2 Expression, Associated Kinase Activity and Effect of Phytohormones During Germination', *Plant and Cell Physiology*, 46: 166-73.
- Hara, Kodai, Masayuki Uchida, Risa Tagata, Hideshi Yokoyama, Yoshinobu Ishikawa, Asami Hishiki, and Hiroshi Hashimoto. 2018. 'Structure of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bound to an APIM peptide reveals the universality of PCNA interaction', *Acta Crystallographica Section F*, 74: 214-21.
- Herrera, I., De La Paz Sánchez¹, M., Molina, J., Plasencia, J., & Vázquez-Ramos, J. M. (2000). Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum*, 110(1), 127-134.
- Hirakawa, Takeshi, Junko Hasegawa, Charles I White, and Sachihito Matsunaga. 2017. 'RAD 54 forms DNA repair foci in response to DNA damage in living plant cells', *The Plant Journal*, 90: 372-82.
- Hishiki, Asami, Hiroshi Hashimoto, Tomo Hanafusa, Keijiro Kamei, Eiji Ohashi, Toshiyuki Shimizu, Haruo Ohmori, and Mamoru Sato. 2009. 'Structural Basis for Novel Interactions between Human Translesion Synthesis Polymerases and Proliferating Cell Nuclear Antigen', *Journal of Biological Chemistry*, 284: 10552-60.
- Horvath, Beatrix M, Hana Kourova, Szilvia Nagy, Edit Nemeth, Zoltan Magyar, Csaba Papdi, Zaki Ahmad, Gabino F Sanchez-Perez, Serena Perilli, Ikram Blilou, Aladár Pettkó-Szandtner, Zsuzsanna Darula, Tamas Meszaros, Pavla Binarova, Laszlo Bogre, and Ben Scheres. 2017. 'Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control', *The EMBO Journal*, 36: 1261-78.
- Hu, X, X Cheng, H Jiang, S Zhu, B Cheng, and Y Xiang. 2010. 'Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*)', *Genet Mol Res*, 9: 1490-503.
- Hughes, T. E., Langdale, J. A., & Kelly, S. (2014). The impact of widespread regulatory neofunctionalization on homeolog gene evolution following whole-genome duplication in maize. *Genome research*, 24(8), 1348-1355.
- Inzé, Dirk, and Lieven De Veylder. 2006. 'Cell Cycle Regulation in Plant Development', *Annual Review of Genetics*, 40: 77-105.
- Iwai, T., Kurosawa, N., Itoh, Y. H., & Horiuchi, T. (2000). Phylogenetic analysis of archaeal PCNA homologues. *Extremophiles*, 4(6), 357-364.
- Jager, Sarah M. de, Spencer Maughan, Walter Dewitte, Simon Scofield, and James A. H. Murray. 2005. 'The developmental context of cell-cycle control in plants', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16: 385-96.
- Jing, J., Zhang, T., Wang, Y., Cui, Z., & He, Y. (2019). ZmRAD51C is essential for double-strand break repair and homologous recombination in maize meiosis. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5513.
- John, P. C., Mews, M., & Moore, R. (2001). Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma*, 216(3), 119-142.
- Kitsios, G., & Doonan, J. H. (2011). Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 204-209.
- Klug, W. S., M. R. Cummings, and C. A. Spencer. 2006. *Genética* (Madrid, España).

- Krishna, Talluru S. R., Xiang-Peng Kong, Sonja Gary, Peter M. Burgers, and John Kuriyan. 1994. 'Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA', *Cell*, 79: 1233-43.
- Lara-Núñez, Aurora, Natividad De Jesús, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2008. 'Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones', *Physiologia Plantarum*, 132: 79-88.
- Lara-Núñez, A., Romero-Sánchez, D. I., Axosco-Marín, J., Garza-Aguilar, S. M., Gómez-Martínez, A. E., Ayub-Miranda, M. F., ... & Vázquez-Ramos, J. M. (2021). Two cyclin Bs are differentially modulated by glucose and sucrose during maize germination. *Biochimie*, 182, 108-119.
- Leung, Wendy, Ryan M. Baxley, George-Lucian Moldovan, and Anja-Katrin Bielinsky. 2018. 'Mechanisms of DNA Damage Tolerance: Post-Translational Regulation of PCNA', *Genes*, 10: 10.
- Li, Jin, Lisa C Harper, Inna Golubovskaya, C Rachel Wang, David Weber, Robert B Meeley, John McElver, Ben Bowen, W Zacheus Cande, and Patrick S Schnable. 2007. 'Functional analysis of maize RAD51 in meiosis and double-strand break repair', *Genetics*, 176: 1469-82.
- Li, Min, Xiaohua Xu, Chou-Wei Chang, Li Zheng, Binghui Shen, and Yilun Liu. 2018. 'SUMO2 conjugation of PCNA facilitates chromatin remodeling to resolve transcription-replication conflicts', *Nature Communications*, 9: 2706.
- Lowran, Kaitlin, Laura Campbell, Phillip Popp, and Colin G Wu. 2020. 'Assembly of a G-Quadruplex Repair Complex by the FANCD1 DNA Helicase and the REV1 Polymerase', *Genes*, 11: 5.
- López, Imelda, Safina Khan, Jorge Vázquez, and Patrick J. Hussey. 1997. 'The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in Zea mays is composed of two members that have similar expression programmes1The sequence reported in this paper has been deposited into the GenBank database (accession no. U87949).1', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1353: 1-6.
- Mahapatra, Kalyan, and Sujit Roy. 2020. 'An insight into the mechanism of DNA damage response in plants- role of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1: An overview', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 819-820: 111689.
- Mews, M., Sek, F. J., Moore, R., Volkmann, D., Gunning, B. E., & John, P. C. (1997). Mitotic cyclin distribution during maize cell division: implications for the sequence diversity and function of cyclins in plants. *Protoplasma*, 200(3), 128-145.
- Milsted, C., Dai, B., Garcia, N., Yin, L., He, Y., Kianian, S., ... & Chen, C. (2022). Genome-wide investigation of maize RAD51 binding affinity through phage display. *BMC genomics*, 23(1), 1-13.
- Moldovan, George-Lucian, Boris Pfander, and Stefan Jentsch. 2007. 'PCNA, the Maestro of the Replication Fork', *Cell*, 129: 665-79.
- Morgan, David Owen. 2007. *The cell cycle: principles of control* (New science press).
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., & Sekine, M. (2006). Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS letters*, 580(1), 336-340.
- Nannas, Natalie J., and R. Kelly Dawe. 2015. 'Genetic and Genomic Toolbox of Zea mays', *Genetics*, 199: 655-69.
- Nisa, Maher-Un, Ying Huang, Moussa Benhamed, and Cécile Raynaud. 2019. 'The Plant DNA Damage Response: Signaling Pathways Leading to Growth Inhibition and Putative Role in Response to Stress Conditions', *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Nonogaki, Hiroyuki, George W. Bassel, and J. Derek Bewley. 2010. 'Germination—Still a mystery', *Plant Science*, 179: 574-81.

- Paterson, Andrew H., Michael Freeling, and Takuji Sasaki. 2005. 'Grains of knowledge: Genomics of model cereals', *Genome Research*, 15: 1643-50.
- Pedroza-Garcia, J. A., Eekhout, T., Achon, I., Nisa, M. U., Coussens, G., Vercauteren, I., ... & De Veylder, L. (2021). Maize ATR safeguards genome stability during kernel development to prevent early endosperm endocycle onset and cell death. *The Plant Cell*, 33(8), 2662-2684.
- Pfander, Boris, George-Lucian Moldovan, Meik Sacher, Carsten Hoege, and Stefan Jentsch. 2005. 'SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase', *Nature*, 436: 428-33.
- Prestel, Andreas, Nanna Wichmann, Joao M Martins, Riccardo Marabini, Noah Kassem, Sebastian S Broendum, Marit Otterlei, Olaf Nielsen, Martin Willemoës, and Michael Ploug. 2019. 'The PCNA interaction motifs revisited: thinking outside the PIP-box', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76: 4923-43.
- Punatar, Rajvee Shah, Maria Jose Martin, Haley DM Wyatt, Ying Wai Chan, and Stephen C West. 2017. 'Resolution of single and double Holliday junction recombination intermediates by GEN1', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 443-50.
- Punchihewa, Chandanamali, Akira Inoue, Asami Hishiki, Yoshihiro Fujikawa, Michele Connelly, Benjamin Evison, Youming Shao, Richard Heath, Isao Kuraoka, and Patrick Rodrigues. 2012. 'Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication', *Journal of Biological Chemistry*, 287: 14289-300.
- Renaudin, Jean-Pierre, John H. Doonan, Donna Freeman, Junji Hashimoto, Heribert Hirt, Dirk Inzé, Thomas Jacobs, Hiroshi Kouchi, Pierre Rouzé, Margret Sauter, Arnould Savouré, David A. Sorrell, Venkatesan Sundaresan, and James A. H. Murray. 1996. 'Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization', *Plant Molecular Biology*, 32: 1003-18.
- Ricaud, Lilian, Caroline Proux, Jean-Pierre Renou, Olivier Pichon, Sylvain Fochesato, Philippe Ortet, and Marie-Hélène Montané. 2007. 'ATM-mediated transcriptional and developmental responses to γ -rays in Arabidopsis', *PLoS one*, 2.
- Sabelli, P. A., Dante, R. A., Nguyen, H. N., Gordon-Kamm, W. J., & Larkins, B. A. (2014). Expression, regulation and activity of a B2-type cyclin in mitotic and endoreduplicating maize endosperm. *Frontiers in Plant Science*, 5, 561.
- Sakamoto, AN, H Kaya, and M Endo. 2018. 'Deletion of TLS polymerases promotes homologous recombination in Arabidopsis', *Plant Signaling & Behavior*, 13: e1483673.
- Santos, MAO, ADLC Novembre, and J Marcos-Filho. 2007. 'Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds', *Seed Science and Technology*, 35: 213-23.
- Schnittger, Arp, and Lieven De Veylder. 2018. 'The Dual Face of Cyclin B1', *Trends in Plant Science*, 23: 475-78.
- Shan, Bin, Jin Xu, Ying Zhuo, Cindy A. Morris, and Gilbert F. Morris. 2003. 'Induction of p53-dependent Activation of the Human Proliferating Cell Nuclear Antigen Gene in Chromatin by Ionizing Radiation', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 44009-17.
- Sidhu, G. K., Warzecha, T., & Pawlowski, W. P. (2017). Evolution of meiotic recombination genes in maize and teosinte. *BMC genomics*, 18(1), 1-17.
- Sidler, Corinne, Dongping Li, Olga Kovalchuk, and Igor Kovalchuk. 2015. 'Development-dependent expression of DNA repair genes and epigenetic regulators in Arabidopsis plants exposed to ionizing radiation', *Radiation research*, 183: 219-32.
- Smolikova, Galina, Tatiana Leonova, Natalia Vashurina, Andrej Frolov, and Sergei Medvedev. 2021. 'Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability', *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 101.

- Spampinato, Claudia P. 2017. 'Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74: 1693-709.
- Stoimenov, Ivaylo, and Thomas Helleday. 2009. 'PCNA on the crossroad of cancer', *Biochemical Society Transactions*, 37: 605-13.
- Strzalka, Wojciech, Filip Bartnicki, Katarzyna Pels, Agata Jakubowska, Toshiki Tsurimoto, and Katsunori Tanaka. 2013. 'RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen', *Journal of experimental botany*, 64: 859-69.
- Strzalka, Wojciech, Piotr Labecki, Filip Bartnicki, Chhavi Aggarwal, Maria Rapala-Kozik, Chiharu Tani, Katsunori Tanaka, and Halina Gabrys. 2012. 'Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen has several potential sumoylation sites', *Journal of experimental botany*, 63: 2971-83.
- Strzalka, Wojciech, and Alicja Ziemienowicz. 2010. 'Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation', *Annals of Botany*, 107: 1127-40.
- Sánchez, María de la Paz, Alma Torres, Maria Beatrice Boniotti, Crisanto Gutierrez, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2002. 'PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize', *Plant Molecular Biology*, 50: 167-75.
- Sánchez-Camargo, Víctor A, Cassandra Suárez-Espinoza, Samantha Romero-Rodríguez, Sara M Garza-Aguilar, Maïke Stam, Elpidio García-Ramírez, Aurora Lara-Núñez, and Jorge M Vázquez-Ramos. 2020. 'Maize E2F transcription factors. Expression, association to promoters of S-phase genes and interaction with the RBR1 protein in chromatin during seed germination', *Plant Science*, 296: 110491.
- Świątek, Agnieszka, Marc Lenjou, Dirk Van Bockstaele, Dirk Inzé, and Harry Van Onckelen. 2002. 'Differential Effect of Jasmonic Acid and Abscisic Acid on Cell Cycle Progression in Tobacco BY-2 Cells', *Plant Physiology*, 128: 201-11.
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B. N., Harris, H. K., Cox, T. C., & Massiah, M. A. (2010). Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques*, 48(1), 61-64.
- Thornton, Brenda, and Chhandak Basu. 2011. 'Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software', *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39: 145-54.
- Tin Su, Tin. 2001. 'Cell cycle: How, when and why cells get rid of cyclin A', *Current Biology*, 11: R467-R69.
- Umeda, Masaaki, Shiori S. Aki, and Naoki Takahashi. 2019. 'Gap 2 phase: making the fundamental decision to divide or not', *Current Opinion in Plant Biology*, 51: 1-6.
- Vivona, Jonathan B., and Zvi Kelman. 2003. 'The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins', *FEBS Letters*, 546: 167-72.
- Vázquez-Ramos, Jorge M., and María de la Paz Sánchez. 2003. 'The cell cycle and seed germination', *Seed Science Research*, 13: 113-30.
- Wang, Guanfang, Hongzhi Kong, Yujin Sun, Xiaohong Zhang, Wei Zhang, Naomi Altman, Claude W. dePamphilis, and Hong Ma. 2004. 'Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins', *Plant Physiology*, 135: 1084-99.
- Warbrick, Emma. 1998. 'PCNA binding through a conserved motif', *Bioessays*, 20: 195-99.
- Waterworth, Wanda M., Clifford M. Bray, and Christopher E. West. 2019. 'Seeds and the Art of Genome Maintenance', *Frontiers in Plant Science*, 10.

- Waterworth, Wanda M., Steven Footitt, Clifford M. Bray, William E. Finch-Savage, and Christopher E. West. 2016. 'DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 9647-52.
- Waterworth, W. M., Bray, C. M., & West, C. E. (2015). The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3549-3558.
- Weimer, Annika K, Sascha Biedermann, Hirofumi Harashima, Farshad Roodbarkelari, Naoki Takahashi, Julia Foreman, Yonsheng Guan, Gaëtan Pochon, Maren Heese, Daniël Van Damme, Keiko Sugimoto, Csaba Koncz, Peter Doerner, Masaaki Umeda, and Arp Schnittger. 2016. 'The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis', *The EMBO Journal*, 35: 2068-86.
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). Protein structure and function prediction using I-TASSER. *Current protocols in bioinformatics*, 52(1), 5-8.
- Yi, Dalong, Claire Lessa Alvim Kamei, Toon Cools, Sandy Vanderauwera, Naoki Takahashi, Yoko Okushima, Thomas Eekhout, Kaoru Okamoto Yoshiyama, John Larkin, and Hilde Van den Daele. 2014. 'The Arabidopsis SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species', *The Plant Cell*, 26: 296-309.
- Yilmaz, D., Furst, A., Meaburn, K., Lezaja, A., Wen, Y., Altmeyer, M., ... & Soutoglou, E. (2021). Activation of homologous recombination in G1 preserves centromeric integrity. *Nature*, 600(7890), 748-753.
- Yoshiyama, Kaoru Okamoto, Kengo Sakaguchi, and Seisuke Kimura. 2013. 'DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals', *Biology*, 2: 1338-56.
- Yurieva, Olga, and Mike O'Donnell. 2016. 'Reconstitution of a eukaryotic replisome reveals the mechanism of asymmetric distribution of DNA polymerases', *Nucleus (Austin, Tex.)*, 7: 360-68.
- Zlatanova, Jordanka S, Plamen V Ivanov, Lubomir M Stoilov, Kristelmira V Chimshirova, and Borislav S Stanchev. 1987. 'DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize', *Plant Molecular Biology*, 10: 139-44.

100																		
	100																	
32.308	29.73	100																
34.444	26.217	27.515	100															
	28.139	28.313	26.542	100														
	29.839	26.066	26.205	24.906	100													
	28.346	53.988	25.664	30.147	23.932	100												
27.419		28.125	33.043	25.294	24.167	27.097	100											
24.064	34.028	24.773	29.137	25.956	26.877	25.882	25.203	100										
23.81	32.432	66.569	27.434	29.003	30.556	50	27.211	27.114	100									
	28.016	50.633	30.205	30.268	25.649	55.66	26.22	26.888	47.003	100								
	42.5	25.806	48.837	40.541	24.713	24.615		25.405	22.951	23.77	100							
	25	27.798	31.557	32.308	22.951	26.948	23.116	29.707	33.333	32.796	26.8	100						
30.769	31.016	74.074	32.174	30.964	30.899	48.855	28.125	28.137	71.378	49.02	22.951	32.778	100					
	26.877	50.16	27.914	31.136	25.738	59.877	25.974	26.074	46.835	62.883	26.56	27.67	48.571	100				
	26.351		27.132	20.392	31.967	21.739	27.966	32.353			32.2	24.68		25.64	100			
	27.972	30.732	52.632	27.829	23.718	24.768	24.254	26.257	25.806	28.07	41.46	36.79	29.167	25.09	36.36	100		
37.255	47.5	25.197	24.623	40	27.835	27.149	33.333	46.809	29.032	26.168	34.09	27.07	27.273	28.57	32.63	22.84	100	
ZmXRCC2	ZmXRCC3	HsRAD51A	HsRA51B	HsRAD51C	HsRAD51D	HsDMC1	HsXRCC2	HsXRCC3	ScRAD51	ScDMC1	ScRad55	ScRAD57	SpRad51	SpDMC1	SpRAD55	SpRAD57	EcRecA	

Figura S1. Porcentaje de identidad entre los miembros de la familia RAD51 de *A. thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Physcomitrium patens* (Pp), *Zea mays* (Zm), humanos (Hs), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y *Schizosaccharomyces pombe* (Sp).

AtCDKB1;1	100															
AtCDKB1;2	88.75	100														
AtCDKB2;1	65.79	63.07	100													
AtCDKB2;2	65.81	65.06	88.93	100												
SlCDKB1;1	83.17	82.32	66.89	67.21	100											
SlCDKB2;1	65.15	65.05	83.06	83.71	67.55	100										
NtCDKB1;1	84.14	83.28	67.56	68.3	95.05	68.54	100									
NtCDKB1;2	84.14	83.28	67.56	68.3	95.38	68.54	99.67	100								
OsCDKB1;1	77.99	77.17	68.9	69.61	83.5	68.98	85.48	85.48	100							
OsCDKB1;2	62.78	63.02	76.77	78.45	64.14	76.25	64.47	64.47	65.13	100						
TaCDKB1;1	61.66	63.14	78.01	78.84	63.31	78.28	64.52	64.52	64.52	88.21	100					
TaCDKB1;2	76.05	75.24	65.69	66.88	84.16	65.4	84.16	84.49	88.12	64.8	62.9	100				
ZmCDKB1;1	76.05	75.24	65.69	66.88	84.16	65.4	84.16	84.49	88.12	64.8	62.9	100	100			
ZmCDKB1;2	63.43	63.34	76.74	77.08	64.47	77.05	64.8	64.8	65.46	88.08	86.16	63.17	63.17	100		
ZmCDKB2	63.73	63.64	77.36	77.7	64.78	77.85	65.12	65.12	65.78	88.04	86.16	64.69	64.69	99.69	100	
	AtCDKB1;1	AtCDKB1;2	AtCDKB2;1	AtCDKB2;2	SlCDKB1;1	SlCDKB2;1	NtCDKB1;1	NtCDKB1;2	OsCDKB1;1	OsCDKB1;2	TaCDKB1;1	TaCDKB1;2	ZmCDKB1;1	ZmCDKB1;2	ZmCDKB2	

Figura S2. Porcentaje de identidad entre los miembros de la familia CDKB de *A. thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Oryza sativa* (Os), *Triticum aestivum* (Ta) y *Zea mays* (Zm).

SpPCNA	100%									
HsPCNA	51.96%	100%								
AtPCNA2	53.54%	65.74%	100%							
AtPCNA1	53.93%	65.35%	96.85%	100%						
SIPCA	53.54%	66.14%	91.33%	91.73%	100%					
NtPCNA	54.72%	66.14%	91.73%	92.12%	97.63%	100%				
ZmPCNA	53.14%	62.99%	87.40%	87%	89.37%	89.37%	100%			
TaPCNA	54.72%	61.81%	88.58%	88.97%	89.37%	89.76%	92.91%	100%		
OsPCNA	54.33%	62.59%	89.76%	89.37%	90.15%	90.55%	95.27%	96.85%	100%	
ScPCNA	45.27%	35.43%	39.76%	40.55%	40.15%	40.55%	40.15%	40.94%	39.76%	100%
	SpPCNA	HsPCNA	AtPCNA2	AtPCNA1	SIPCA	NtPCNA	ZmPCNA	TaPCNA	OsPCNA	ScPCNA

Figura S4. Porcentaje de identidad entre PCNA de *A. thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Oryza sativa* (Os), *Zea mays* (Zm), *Triticum aestivum* (Ta), humanos (Hs), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y *Schizosaccharomyces pombe* (Sp).

Tabla suplementaria 1. ID proteínas empleadas para la construcción de filogenias.

Proteína	ID	Proteína	ID	Proteína	ID	Proteína	ID
AtRAD51A	P94102	AtCycB1;1	NP_195465.1	AtCDKB1;1	BAA01624.1	AtPCNA1	AAM63900.1
AtRA51B	Q9SK02	AtCycB1;2	Q39067.2	AtCDKB1;2	NP_001031507.1	AtPCNA2	NP_180517.1
AtRA51C	Q8GXF0	AtCycB1;3	NP_187759.2	AtCDKB2;1	NP_177780.1	SIPCA	NP_001234844.1
AtRA51D	Q9LQ2	AtCycB1;4	AT2G26760.1	AtCDKB2;2	NP_173517.1	NtPCNA	AAC34126.1
AtDMC1	Q39009	AtCycB2;1	AT2G17620.1	SICDKB1;1	CAC15503.1	OsPCNA	AAK98707.1
AtXRCC2	F4KDQ6	AtCycB2;2	AT4G35620.1	SICDKB2;1	CAC15504.1	TaPCNA	AIF35058.1
AtXRCC3	Q9FKM5	AtCycB2;3	AT1G20610.1	NtCDKB1;1	AAG01532.1	ZmPCNA	NP_001105461.1
OsRAD51A	Q8SBB8	AtCycB2;4	AT1G76310.1	NtCDKB1;2	AAG01533.1	HsPCNA	NP_872590.1
OsRAD51B	AAS88797.1	AtCycB2;5	AT1G20590.1	OsCDKB1;1	BAD82176.1	ScPCNA	QDQ36644.1
OsRad51C	NP_918529.1	AtCycB3;1	AT1G16330.1	OsCDKB1;2	BAA19553.1	SpPCNA	CAB38513.1
OsRAD51D	A0A075DNI2	OsCycB1;1	LOC_Os01g59120.1.1	TaCDKB1;1	BT009641		
OsDmc1A	AAM76791.1	OsCycB1;2	LOC_Os05g41390.1.1	TaCDKB1;2	BT009182		
OsDMC1B	BAB85214.1	OsCycB1;3	LOC_Os01g17402.1.1	ZmCDKB1;1	AY106440		
OsXRCC2	NP_915678.1	OsCycB2;1	LOC_Os04g47580.1.1	ZmCDKB1;2	AY106029		
OsXRCC3	XP_466261.1	OsCycB2;2	LOC_Os06g51110.1.1	ZmCDKB2	GRMZM2G416791_P01		
PpRad51A	CAC82996.1	ZmCycB1;1	GRMZM2G310115_T04				
PpRad51B	CAC86604.1	ZmCycB1;2	GRMZM2G034647_T01				
ZmRAD51A1	Q67EU8	ZmCycB1;3	GRMZM2G005619_T01.1				
ZmRAD51A2	Q9XED7	ZmCycB1;5	GRMZM2G073003_T01.1				
ZmDMC1	G5CCL9	ZmCycB2;1	GRMZM2G073671_T01.1				
ZmRAD51B	DT947589.1	ZmCycB2;2	GRMZM2G138886_T01.1				
ZmRAD51C	BD270520.1	ZmCycB2;3	GRMZM2G061287				
ZmRAD51D	A0A1D6IL54	HsCycB1	EAW51306.1				
ZmXRCC2	COPEK6	HsCycB2	BAA78387.1				
ZmXRCC3	A0A3L6ES87	HsCycB3	CAC94915.1				
HsRAD51A	NP_002866.2	ScClb1	NP_011622.1				
HsRA51B	O15315.2	ScClb2	NP_015444.1				
HsRAD51C	NP_478123.1	ScClb3	NP_010126.1				
HsRAD51D	NP_002869.2	ScClb4	NP_013311.1				
HsDMC1	Q14565.2						
HsXRCC2	NP_005422.1						
HsXRCC3	O43542.1						
ScRAD51	CAA45563.1						
ScDMC1	P25453.1						
ScRad55	NP_010361.1						
ScRAD57	NP_010287.1						
SpRad51	BAA02963.1						
SpDMC1	BAA28671.1						
SpRAD55	NP_593604.1						
SpRAD57	NP_593627.1						
EcRecA	CAA23618.1						

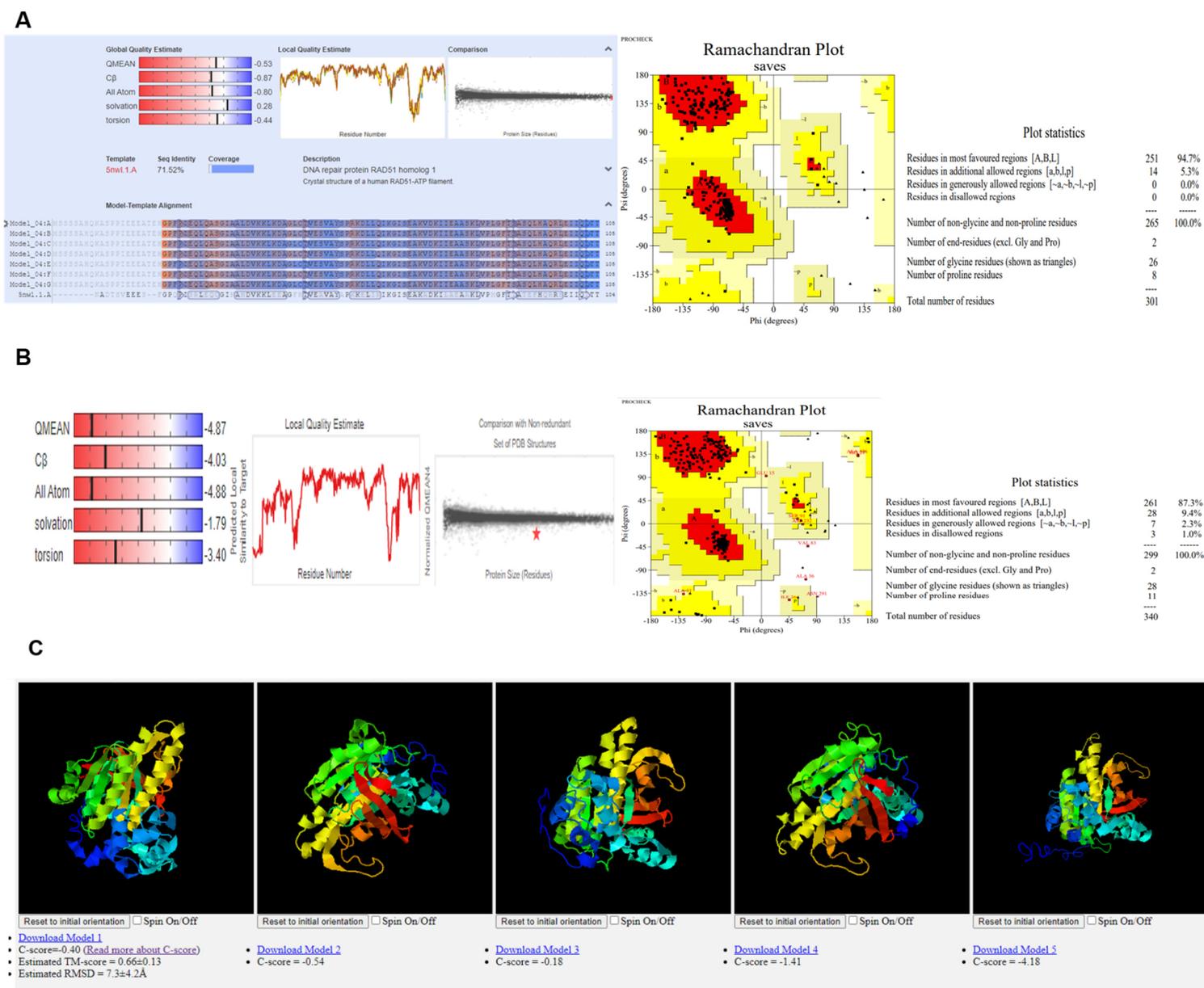


Figura S5. Estadísticos de validación de modelos de RAD51A2. (A) QMEAN y diagrama de Ramachandran del modelo generado por SWISS-Model. (B) QMEAN y diagrama de Ramachandran del modelo generado por Modeller. (C) C-score y RMSD de los modelos generados por I-TASSER.

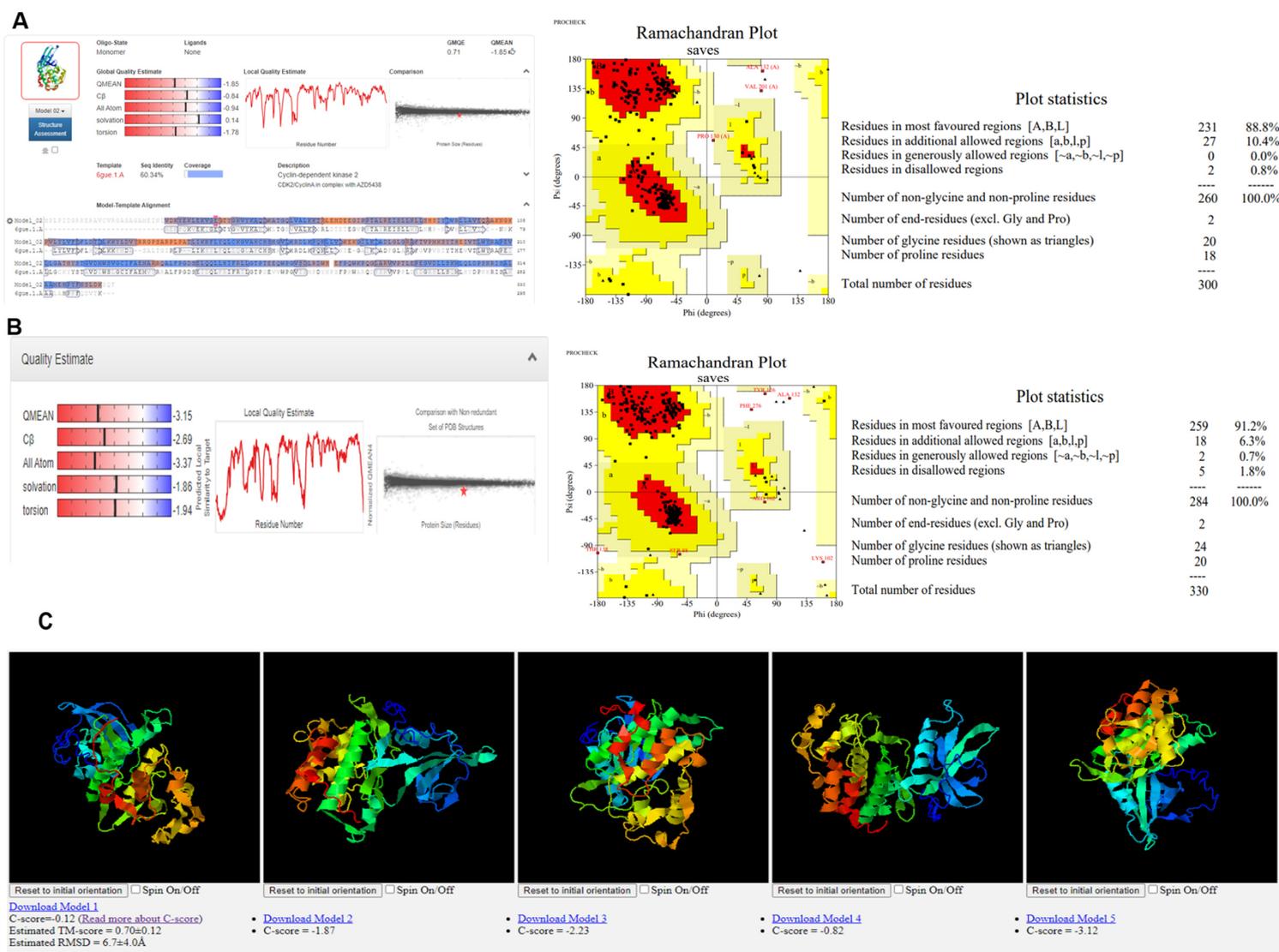


Figure S6. Estadísticos de validación de modelos de CDKB1;1. (A) QMEAN y diagrama de Ramachandran del modelo generado por SWISS-Model. (B) QMEAN y diagrama de Ramachandran del modelo generado por Modeller. (C) C-score y RMSD de los modelos generados por I-TASSER.

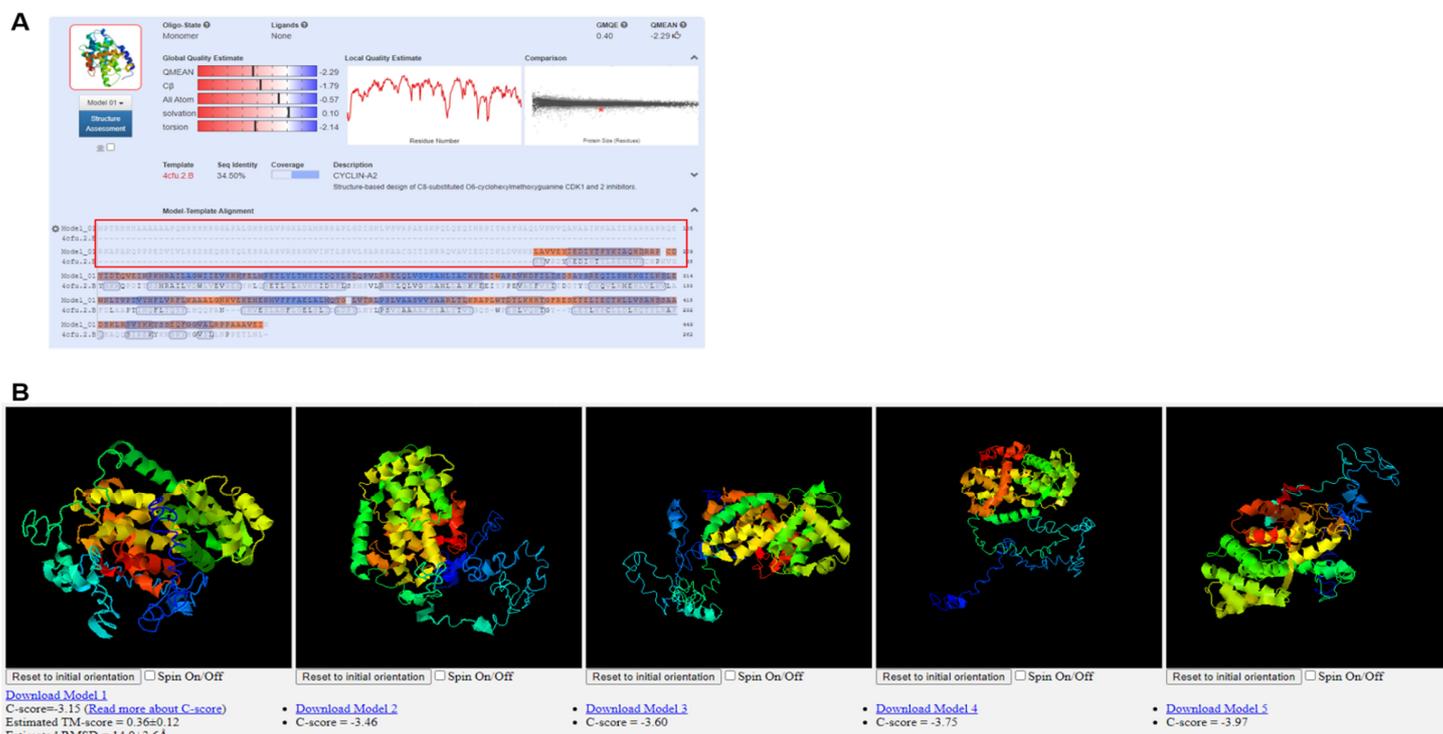


Figura S7. Estadísticos de validación de modelos de CycB1;1. (A) QMEAN del modelo generado por SWISS-Model. (B) C-score y RMSD de los modelos generados por I-TASSER.

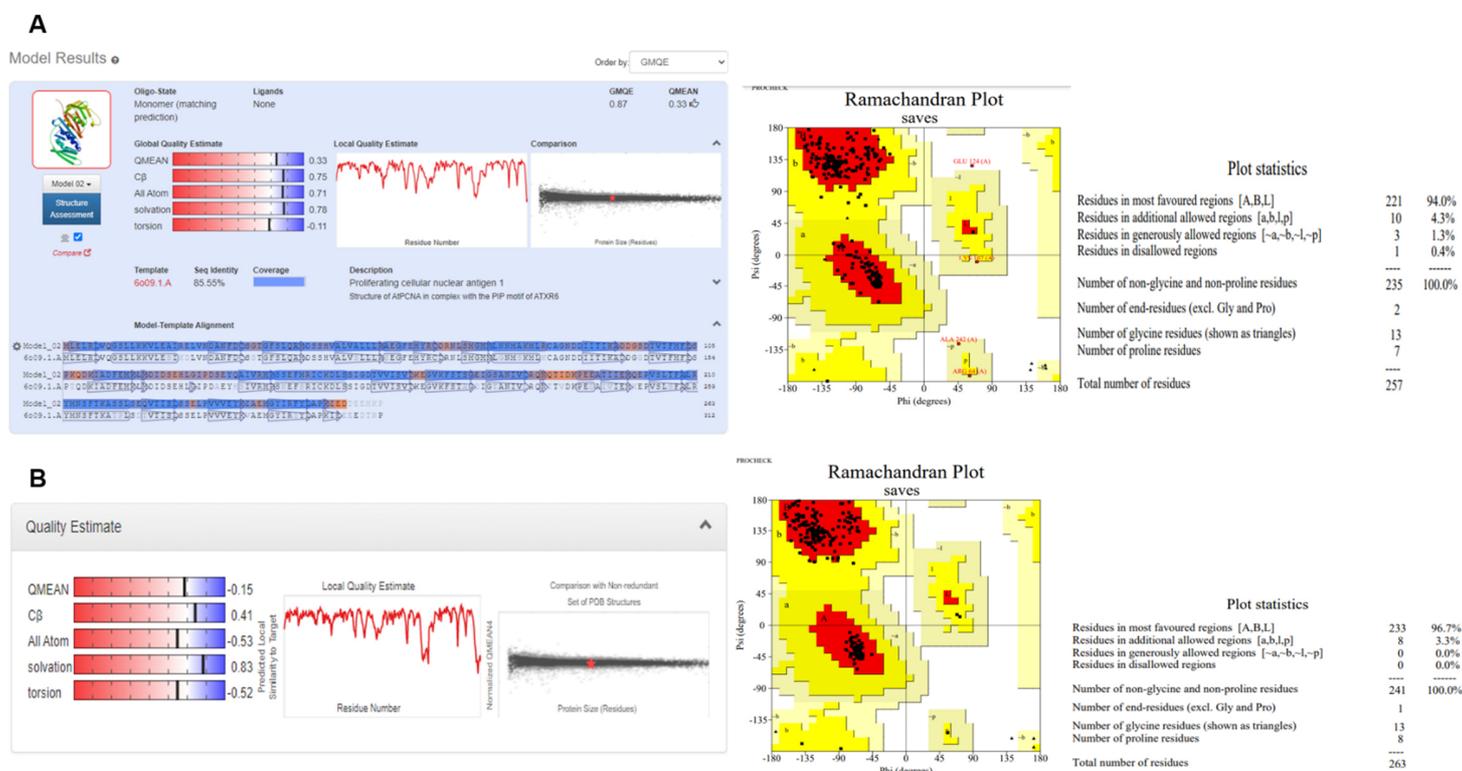


Figura S8. Estadísticos de validación de modelos de PCNA. (A) QMEAN y diagrama de Ramachandran del modelo generado por SWISS-Model. (B) QMEAN y diagrama de Ramachandran del modelo generado por Modeller.

A

Gene: recombination protein51 gene a Zm00001d021898

Description recombination protein51 gene a
 Synonyms GRMZM2G121543, rad51a, Rad51a1, ZmRad51a
 Location [Chromosome 7: 165,620,035-165,624,084](#) reverse strand.
 About this gene This gene has 3 transcripts ([splice variants](#)), [41 orthologues](#) and [16 paralogues](#).
 Transcripts [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	UniProt	RefSeq	Flags
-	Zm00001d021898_T001	1473	340aa	Protein coding	B4FBZ5 Q67EU8	NM_001111448.1 NP_001104918.1 NP_001104918.2	
-	Zm00001d021898_T002	1336	291aa	Protein coding	A0A1D6IHQ7	-	
-	Zm00001d021898_T003	1066	303aa	Protein coding	A0A1D6IHQ8	-	

B

Gene: recombination protein51 gene b Zm00001d041757

Description recombination protein51 gene b
 Synonyms GRMZM2G084762, Rad51a2, rad51b
 Location [Chromosome 3: 136,133,287-136,136,626](#) forward strand.
 About this gene This gene has 1 transcript ([splice variant](#)), [46 orthologues](#) and [16 paralogues](#).
 Transcripts [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	UniProt	RefSeq	Flags
-	Zm00001d041757_T001	1548	340aa	Protein coding	A0A1P8W0S0 A0A1P8W0V1 C0HI02 Q9XED7	NM_001111449.2 NP_001104919.1	

Figura S9. Transcritos de *Zmrad51A*. (A) Tres transcritos producidos por splicing alternativos de *Rad51A1* reportados en Ensembl Plants (B) Único transcrito de *Rad51A2* reportado en Ensembl Plants.

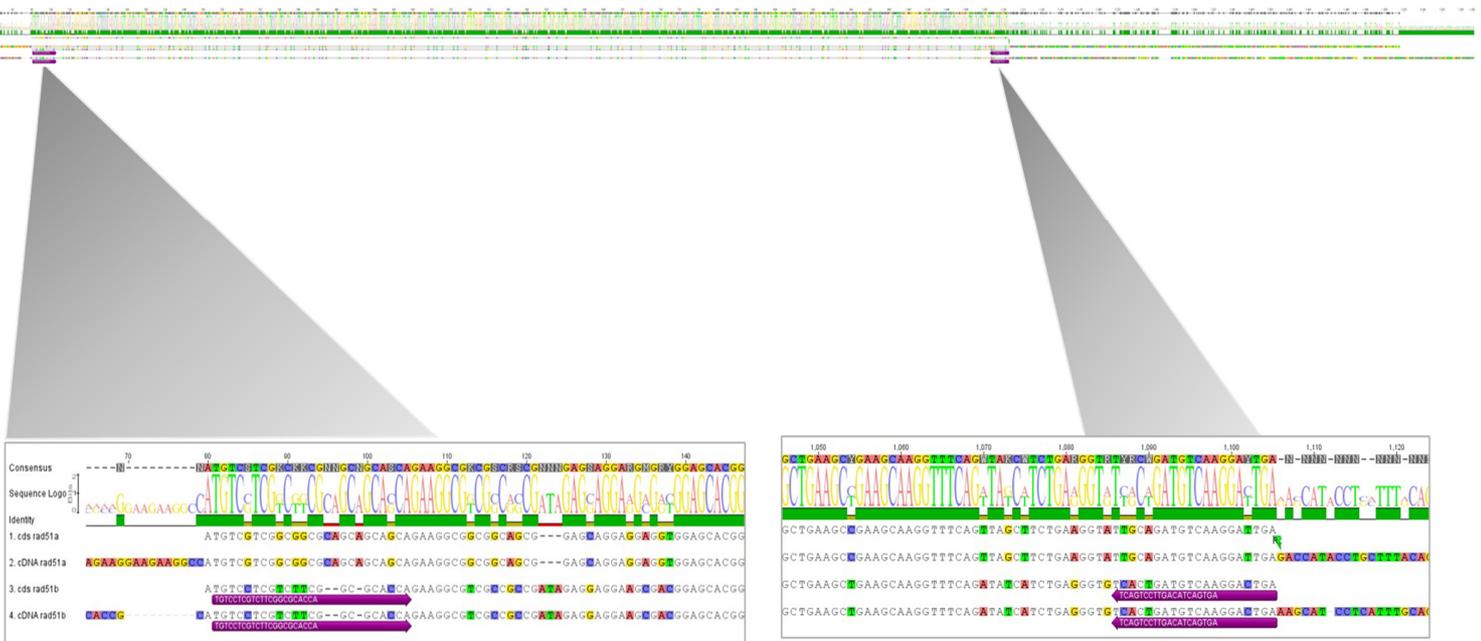


Figura S10. Alineamiento de las secuencias cdsc y cDNA de *Rad51A1* y *Rad51A2* (panel de arriba). Las flechas moradas indican los sitios de unión de los primers de clonación diseñados. Los paneles inferiores muestran un acercamiento de las regiones de unión de los primers.

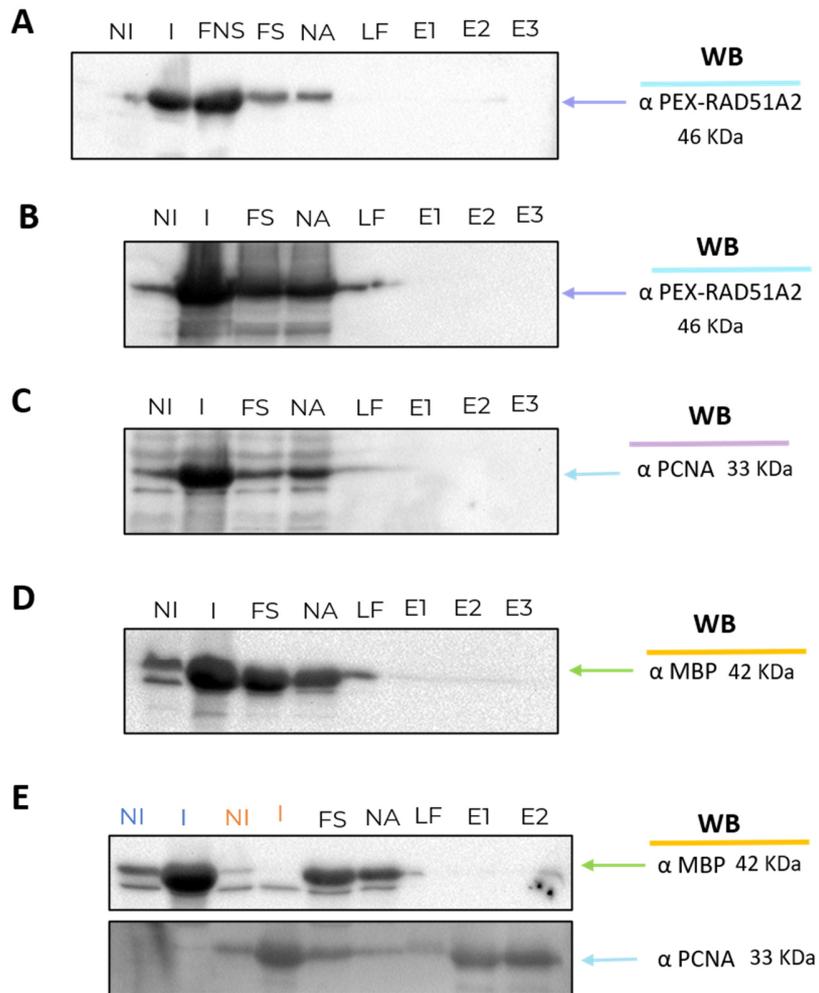


Figura S11. Controles de no unión. (A) Purificación de PEX-RAD51A2 por columna de NTA-Co. (B) Purificación de PEX-RAD51A2 por columna de amintra. (C) Purificación de His-PCNA por columna de amintra. (D) Purificación de MBP por columna de NTA-Co. (E) Co-purificación de MBP y His-PCNA por NTA-Co. NI: No inducido, I: Inducido, FS: Fracción soluble, FNS: Fracción no soluble, NA: Fracción no absorbida a la columna, LF: Lavado final concentrado con TCA, Ei: Eluatos.

Tiempo después de la imbibición (h)

41

54

72



Tiempo después de la imbibición (h)	Semillas protruidas (%)	Semillas con pelos radiculares (%)	Semillas con raíces seminales (%)
0	0	0	0
41	50.7	5.3	0
54	70.7	41.3	2
72	88	74.7	72

Figura S12. Medición de parámetros fisiológicos de semillas embebidas por 41, 54 y 72 h. Los recuadros amarillos señalan las semillas no protruidas. La tabla muestra el porcentaje de las semillas totales con cada parámetro.



Tiempo después de la imbibición (semanas)	Semillas protruidas (%)	Semillas con pelos radiculares (%)	Semillas con raíces seminales (%)	Nº de hojas promedio	Longitud promedio de la 2ª hoja (cm)
2	96	96	96	3.3±0.5	17.84±3.2

Figura S13. Planta de maíz de 2 semanas, se embebieron 75 semillas repartidas en 3 rollos por 72 h en oscuridad a 25 °C y posteriormente fueron incubadas en cámara de fotoperiodo 12 h luz/ 12 h oscuridad, hasta que cumplieron 2 semanas de. Tamaño de la segunda hoja. Cuantificación de parámetros fisiológicos.