



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**ENSAYOS DE ESTABILIDAD *IN VITRO* DE LAS CICLINAS ZMCYCB1;2, ZMCYCD2;2 Y LAS  
CINASAS ZMCDKA/B DURANTE LA GERMINACIÓN DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ.**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA**

*María Fernanda Ayub Miranda*

**TUTORA**

*Dra. Aurora Lara Núñez*

**Laboratorio 114, Conjunto E. Facultad de Química, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**SUSANA CASTRO OBREGÓN. INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO. CONJUNTO E, UNAM**

**AURORA LARA NÚÑEZ. CONJUNTO E, UNAM**



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.

## **Agradecimientos**

Se agradece a las fuentes de financiamiento para el desarrollo de este proyecto:

CONAHCyT: **A1-S-9076**

PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica): **IN211423, IN201322**

Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado: **5000-9130**

## Abreviaturas

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APC</b>	Complejo promotor de anafase
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato
<b>BR</b>	Brasinoesteroides
<b>CAK</b>	Cinasa activadora de CDK
<b>CDK</b>	Cinasa dependiente de Ciclina
<b>Cyc</b>	Ciclina
<b>DAP</b>	Días después de la polinización
<b>DUBs</b>	Enzimas deubiquitinasas
<b>ET</b>	Extracto proteico total
<b>FNA</b>	Fracción no absorbida
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina tipo G
<b>IPTG</b>	Isopropil-D-β-tiogalactopiranósido
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KRP</b>	Kip Related Proteins
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>O/N</b>	Overnight / Toda la noche
<b>PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PYR-41</b>	Inhibidor de enzimas E1 y DUBs
<b>MG132</b>	Inhibidor del proteasoma 26S
<b>MPT</b>	Modificación post-traducciona
<b>SI</b>	Suero Inmune
<b>SPI</b>	Suero preinmune
<b>TAE</b>	Tris Acetato-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N,N, tetrametiloetilendiamina
<b>μ-inyección</b>	Micro inyección

# Índice de contenido

ABREVIATURAS.....	2
I. RESUMEN.....	6
II. INTRODUCCIÓN.....	7
A. El maíz.....	7
Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.....	7
B. La semilla.....	8
C. Estructura de la semilla.....	9
D. Imbibición.....	10
E. Germinación.....	10
F. Ciclo celular.....	12
G. Regulación del ciclo celular.....	15
H. Ciclinas.....	18
I. Fosforilación.....	20
J. Ubiquitinación.....	21
K. Enzimas activadoras E1.....	22
L. Enzimas conjugadoras E2.....	24
M. Enzimas E3 ligasas.....	25
N. Enzimas deubiquitinasas (DUBs).....	26
O. Inhibición de la proteólisis mediada por ubiquitinación.....	27
I. ANTECEDENTES.....	27
A. Dominios de las ciclinas.....	28
B. Ciclinas D y su importancia en la transición G1/S.....	29
C. Ciclinas B y su importancia en la transición G2/M.....	32
D. Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).....	35
E. CDKs y su función en la fase G2, la transcripción y la fase M.....	36
II. JUSTIFICACIÓN.....	38
III. HIPÓTESIS.....	38
IV. OBJETIVOS.....	39
<b>Objetivos Particulares.....</b>	<b>39</b>
V. METODOLOGÍA.....	40
<b>Material biológico.....</b>	<b>40</b>
A. Semillas de maíz.....	40
<b>Métodos.....</b>	<b>40</b>
B. Extracción de proteínas de eje embrionario o de tejido de maíz.....	40
C. Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	41
D. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	41
E. Extracción de plásmidos.....	43
F. Western Blot.....	44
G. Extracción de plásmidos.....	45
H. Transformación de bacterias.....	45
I. Sobre expresión de proteína recombinante.....	45

J.	Purificación de proteína, condiciones nativas.....	46
K.	Purificación de anticuerpos por afinidad con proteína recombinante .....	46
M.	Análisis <i>in silico</i> .....	48
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>A.</b>	<b>Análisis <i>in silico</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>B.</b>	<b>Estandarización de la metodología. ....</b>	<b>50</b>
<b>C.</b>	<b>Ensayos de estabilidad <i>in vitro</i>. ....</b>	<b>51</b>
<b>D.</b>	<b>Conclusión de Estandarización de la metodología .....</b>	<b>53</b>
<b>E.</b>	<b>Modificaciones post-traduccionales de ZmCycD2;2a .....</b>	<b>54</b>
<b>F.</b>	<b>Detección de ubiquitinaciones en ZmCycD2;2a. ....</b>	<b>57</b>
<b>G.</b>	<b>Modificaciones post-traduccionales de ZmCycB1;2 .....</b>	<b>59</b>
<b>H.</b>	<b>Análisis de ubiquitinación en ZmCycB1;2 .....</b>	<b>63</b>
<b>I.</b>	<b>Modificaciones post-traduccionales de ZmCDKB .....</b>	<b>66</b>
<b>J.</b>	<b>Modificaciones post-traduccionales de ZmCDKA.....</b>	<b>71</b>
<b>K.</b>	<b>Detección de ubiquitinaciones en ZmCDKA1. ....</b>	<b>73</b>
<b>L.</b>	<b>Detección de fosforilación en la treonina 160 de la ZmCDKA1 .....</b>	<b>74</b>
<b>VII.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>X.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>.....</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 2.</b>	<b>.....</b>	<b>101</b>
<b>Anexo 3.</b>	<b>.....</b>	<b>102</b>
<b>Anexo 4</b>	<b>.....</b>	<b>103</b>
<b>Anexo 5</b>	<b>.....</b>	<b>104</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.	Anatomía de la semilla madura de maíz vista de frente.....	9
Figura 2.	Procesos celulares asociados a la germinación .....	12
Figura 3.	Fases del ciclo celular. Existen tres puntos de control .....	14
Figura 4.	Patrón de abundancia de proteínas del ciclo celular en la germinación de maíz .....	18
Figura 5.	Activación de cdk's. Representación esquemática de varios estados de actividad.....	19
Figura 6.	Reacciones canónicas de las enzimas E1.....	23
Figura 7.	Formación de acil adenilato .....	23
Figura 8.	Reacciones químicas de las enzimas E2.....	25
Figura 9.	Organización y estructura de E3 ligasas.....	26
Figura 10.	Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas.....	29
Figura 11.	Análisis curso-temporal de la degradación de CycD2;1.....	30
Figura 12.	Análisis curso-temporal de la degradación de la Cyc2;1 .....	31
Figura 13.	Representación esquemática de la regulación de la transición G2-M en plantas...	36

Figura 14. Identificación de motivos PEST y KEN.....	50
Figura 15. Ensayo de ubiquitinación de BSA.....	53
Figura 16. Ensayo de estabilidad de ZmCycD2;2a-MBP .....	56
Figura 17. Ensayo de ubiquitinación de ZmcycD2;2a-MBP .....	58
Figura 18. Representación gráfica de los motivos conservados en la CiclinaB1;2 de maíz .....	60
Figura 19. Ensayo de estabilidad diferencial de la ciclina ZmcycB1;2-his .....	62
Figura 20. Ubiquitinaciones en la proteína ZmCycB1;2-his .....	64
Figura 21. Ensayo de estabilidad de ZmCDKB1;1.....	67
Figura 22. Ensayo de ubiquitinación de ZmCDKB1;1 .....	69
Figura 23. Fosforilación en treonina 160 (activadora) de ZmCDKB1;1 .....	70
Figura 24. Ensayo de estabilidad de ZmCDKA1-his.....	72
Figura 25. Ensayo de ubiquitinación de ZmCDKA1 .....	73
Figura 26. Fosforilación en la treonina 160 .....	74
Figura 27. Degradación diferencial in vitro de la cinasa ZmCDKA1-his .....	76
Figura 28. La proteína CDK1, se desestabiliza después de la inhibición de HDAC3.....	85
Figura i) Análisis filogenético del dominio ciclina conservado en diferentes miembros de las ciclina de maíz. ....	97
Figura ii) Mapa del vector pCDFDuet1.....	98
Figura iii) Mapa del vector pET28a-c (pET-28b(+)).....	100
Figura iv) Abundancia proteica de ZmCycB1;2 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.....	101
Figura v) Purificación de la ciclina ZmCycD2;2a-MBP.....	102
Figura vi) purificación de ZmCycB1;2-his.....	103
Figura vii) purificación de ZmCDKA1-his .....	104

## Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.....	7
Tabla 2. Composición de las soluciones para la preparación del gel de poliacrilamida.....	42
Tabla 3. Vectores empleados para la obtención de proteína recombinante.....	44

## I. Resumen

El ciclo celular en eucariontes es controlado por un conjunto de proteínas, entre ellas cinasas y ciclinas; cuyas funciones, interacciones o estabilidad, son reguladas, entre otros, a través de modificaciones post-traduccionales entre las que destacan por su importancia y frecuencia: fosforilaciones y ubiquitinaciones.

Para comprender la regulación del ciclo celular, es imprescindible conocer los mecanismos por los que las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs por sus siglas en inglés) modulan su actividad, por ejemplo; al ser modificadas post traduccionalmente, al cambiar de localización o al unirse con diferentes ciclinas que las guían en el reconocimiento de blancos específicos.

Se ha demostrado que la degradación de ciclinas es un mecanismo efectivo en la regulación de la actividad de cinasas. En la actualidad se sabe que las fosforilaciones en motivos llamados fosfodegrones, favorecen la ubiquitinación de dichas proteínas permitiendo su reconocimiento y degradación por el proteasoma 26S, sin embargo, aún no se ha reportado si este mecanismo puede regular a la estabilidad de cinasas o si la maquinaria molecular en maíz es capaz de reconocer selectivamente a sus blancos según la fase del ciclo celular por la que atraviesan las células.

En el presente trabajo se estudiaron 4 proteínas clave en la regulación de ciclo celular durante la germinación en maíz: dos integrantes de la familia de CDKs reportadas en plantas; ZmCDKA1, ZmCDKB1;1, y a las ciclinas ZmCycD2;2a (transición G1-S) y ZmCycB1;2 (transición G2-M). Mediante ensayos *in vitro* se analizaron las ubiquitinaciones y fosforilaciones sobre proteínas recombinantes, utilizando la maquinaria molecular de extractos proteicos totales obtenidos de ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Los estudios *in vitro* indican que, tanto ciclinas como CDKs, son

susceptibles a modificarse post- traduccionalmente de manera diferencial y dependiente de la fase del ciclo celular en que se encuentren las células.

## II. Introducción

*“Toda la gloria del mundo cabe en un grano de maíz” José Martí.*

### A. El maíz

Hace miles de años el territorio mexicano fue habitado por grupos nómadas que subsistían gracias a la caza y recolección. Posteriormente estos grupos desarrollaron prácticas agrícolas y entre las plantas que domesticaron se encuentra el teosinte (*Zea mays spp. parviglumis*), el cual, por su cercanía filogenética, es considerado como el ancestro silvestre del maíz (*Zea mays*). La constante selección del teosinte con características deseadas produjo una especie, fenotípicamente muy diferente pero genéticamente muy similar, a su ancestro (Piperno et al., 2009; Vela, 2011)

**Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.**

(Departamento de Agricultura, USA)

(<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ZEMA>)

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Subclase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Poaceae
<b>Género</b>	<i>Zea</i>
<b>Especie</b>	<i>Zea mays</i>

Al igual que otros integrantes de la familia Poaceae, el maíz (Tabla 1) se compone principalmente de follaje. El tallo, similar al bambú, es delgado y segmentado por juntas llamadas nodos, de los cuales sale una hoja en dirección opuesta a la que sale en el nodo contiguo, y el espacio entre ellos se denomina inter-nodo.

En contraste con la mayoría de las gramíneas, posee flores unisexuales, es decir, la inflorescencia masculina está separada de la inflorescencia femenina.

Además de su impacto como alimento y combustible, el maíz ha sido ocupado como modelo para un sin fin de estudios, que van desde desarrollo hasta epigenética. Por ejemplo, se han identificado mutaciones sobre genes que controlan la síntesis de almidón, la composición de proteínas de reserva y la biosíntesis de carotenoides, (Candela & Hake, 2008).

El hecho de que las inflorescencias femeninas y masculinas estén separadas facilita el control de las cruces, además una sola planta puede proveer gran cantidad de progenie. Hay diversas colecciones de germoplasma fácilmente accesibles alrededor del mundo, los más notables se encuentran en México (CIMMYT) con 28,000 muestras de maíz y teosintle (CIMMYT, <http://www.cimmyt.org/es/banco-de-germoplasma>), Estados Unidos (USDA-ARS) y Francia (INRA), (Wallace et al., 2014).

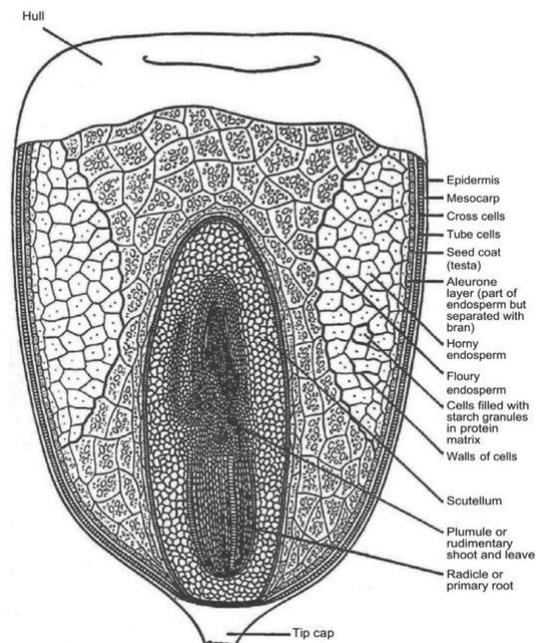
## B. La semilla

Las semillas del maíz son muy diversas en forma y tamaño. Son el medio por el cual el nuevo individuo es dispersado y provienen de la reproducción sexual. En el estado maduro contienen al embrión, el cual está rodeado por una estructura protectora que a su vez brinda nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) en la germinación y post-germinación.

La importancia de las semillas no es sólo biológica, puesto que ahí se encuentra toda la maquinaria para desarrollar una nueva planta, si no también económica y social. Se estima que en el mundo casi tres cuartas partes de alimento provienen directamente de semillas, y muchos componentes importantes de la dieta son elaborados a partir de las mismas.

### C. Estructura de la semilla

El grano de maíz posee tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión, (Figura 1).



**Figura 1. Anatomía de la semilla madura de maíz vista de frente. (Hoseney, R. Carl; González Alonso, 1992).**

Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química FAO, <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s03.htm>; (Bewley et al., 2013).

El pericarpio, es la parte más externa del grano, consiste en la pared transformada del ovario que cubre a la semilla y actúa como protección del embrión y el endospermo, contiene 86.7% de fibra, 3.7% proteína y 7.3%

almidón

FAO,

[http://www.fagro.edu.uy/~nutrical/ensenanza/AVI%20WEB/cursoema/grano\\_sprocesos.pdf](http://www.fagro.edu.uy/~nutrical/ensenanza/AVI%20WEB/cursoema/grano_sprocesos.pdf).

El endospermo provee energía al embrión y contiene un nivel elevado de almidón, 87% aproximadamente, 8% de proteínas y un contenido de lípidos relativamente bajo.

El embrión, representa genéticamente a la siguiente generación, posee información genética de las líneas paterna y materna y se caracteriza por un elevado contenido de lípidos, 33%, aproximadamente 20% de proteínas y minerales.

*Germinación de las semillas*

#### D. Imbibición

La absorción de agua por las semillas es un paso esencial para el inicio de la germinación y es denominado imbibición. La cantidad de agua absorbida durante la imbibición puede llegar a ser de dos a tres veces el peso de la semilla seca, (Bewley et al., 2013).

#### E. Germinación

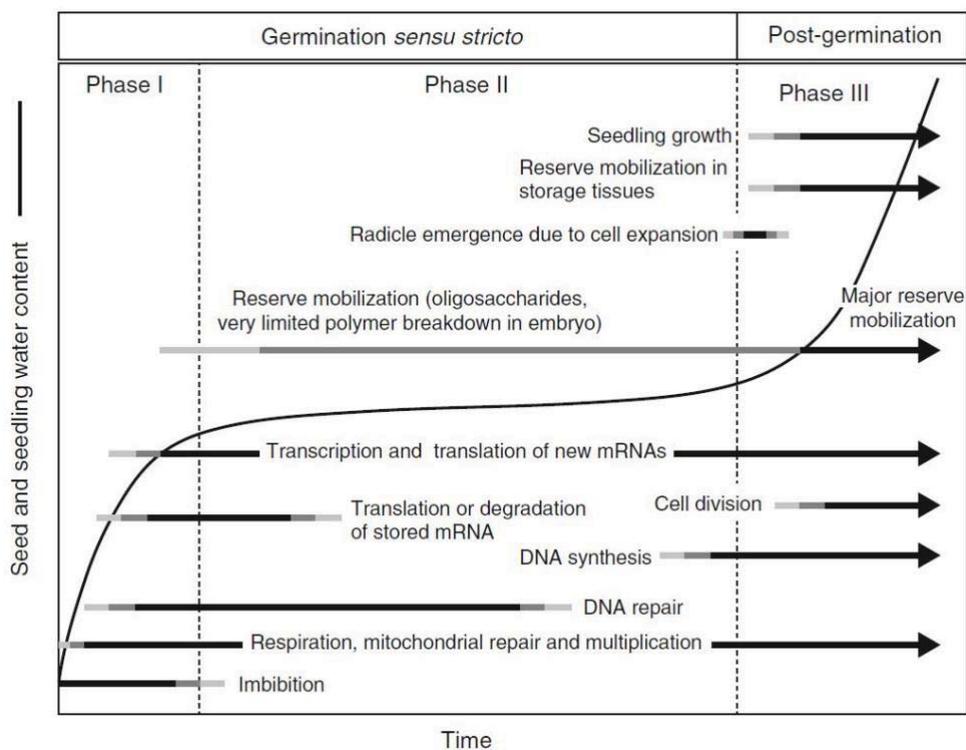
Es una secuencia de eventos que dan como resultado la transformación de un embrión en estado quiescente a una plántula. Es complicado dar una definición exacta de germinación debido a que el límite donde la misma termina y comienza el desarrollo posterior de la planta es poco claro. Generalmente comienza con la entrada de agua a la semilla seca. En el ámbito agronómico la germinación concluye en el momento en que la plántula emerge de la superficie del suelo, mientras que, desde el punto de vista de la fisiología vegetal, la germinación comprende únicamente hasta la elongación del eje embrionario, generalmente en el extremo radicular, lo cual

se hace visible cuando éste atraviesa la cubierta de la semilla, (Bewley et al., 2013).

En nuestro grupo de trabajo nos hemos enfocado a estudiar el ciclo celular durante la germinación del maíz. Por lo cual hemos definido a la germinación, basándonos en procesos bioquímicos, celulares y moleculares, como la serie de eventos que llevan a las células a completar la primera ronda del ciclo celular en las zonas meristemáticas, (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Dichos procesos incluyen la hidratación de membranas y demás estructuras celulares, reactivación de rutas metabólicas (la vía de las pentosas fosfato se reanuda y las enzimas del ciclo de Krebs se activan durante la fase I, Figura 2) y de los ribosomas, ya que a pesar de que los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas están presentes en la semilla madura no hay polisomas, sin embargo, minutos después de la rehidratación hay un decremento en la cantidad de ribosomas libres que ya han sido reclutados para la formación de nuevos polisomas; aumento de la actividad respiratoria, síntesis de macromoléculas, elongación celular. Es decir, aquellos procesos involucrados en el paso de una semilla quiescente, casi totalmente deshidratada y con metabolismo casi nulo, a una semilla con metabolismo muy activo que resulta en el crecimiento del embrión (Bewley et al., 2013; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). La hipótesis que surge de nuestra definición es que una vez que las células de una semilla reactivan el metabolismo celular y completan la primera ronda de división celular, la semilla puede continuar los procesos de proliferación y crecimiento durante el desarrollo según su propio programa morfogénético y así dar lugar a la planta.

En la Figura 2 se relacionan los procesos de la célula con el tiempo de imbibición y la entrada de agua, teniendo entonces que la absorción inicial de agua (imbibición) en la Fase I es un proceso principalmente físico; la actividad fisiológica comienza unos minutos después de que la célula se ha hidratado, una vez que todos los tejidos de la semilla son embebidos por completo. Sin

embargo, en esta fase también tienen lugar algunos eventos biológicos, por ejemplo, comienza la reparación del ADN dañado durante deshidratación e hidratación de la semilla, así como la síntesis de ADN mitocondrial. Durante la Fase II el contenido de agua se mantiene prácticamente constante y la actividad metabólica incrementa con la transcripción sustancial de nuevos genes, además de la síntesis, actividad y destrucción de proteínas. En la Fase III se incrementa la toma de agua y, en conjunto con una mayor utilización de reservas, se generan plántulas estables, (Bewley et al., 2013).



**Figura 2. Procesos celulares asociados a la germinación. El esquema relaciona procesos de la célula en función al tiempo y a la entrada de agua a la semilla, (modificado de (Nonogaki et al., 2010)).**

## F. Ciclo Celular

El ciclo celular, cuya finalidad es generar dos células con material genético idéntico a partir de una, engloba una serie de procesos en los que participan diversas proteínas que dirigen a la célula a través de eventos específicos,

entre los que destaca la duplicación del material genético (replicación) y que culmina con la mitosis.

Puesto que la replicación de ADN implica un elevado costo energético y debe ser lo más conservadora posible, la célula ha desarrollado puntos de control, buscando duplicar el ADN únicamente si el medio contiene los nutrientes necesarios, diseñando además elaborados mecanismos que permiten corroborar su correcta duplicación, así como complejos sistemas de reparación de daño. Una célula sana hará todo lo posible por no dividirse hasta que la copia de este material no contenga errores.

Como se puede observar en la Figura 3, el ciclo celular se divide en fases: Durante la primera (G1), la célula verifica que las condiciones intra y extracelulares (por ejemplo, disponibilidad de nutrientes, presencia de hormonas), sean óptimas para comenzar y finalizar la ronda. Si es así, el ciclo sigue adelante, de lo contrario se detiene o entra en apoptosis. Posterior a G1 se encuentra la fase de síntesis de ADN (S) en donde el material genético se duplica. Finalmente, el genoma recién sintetizado entra a una etapa de control (G2) en donde se asegura la integridad y duplicidad del genoma para que en la mitosis (M) pueda repartirse en dos núcleos. Cuando el material genético queda repartido en ambos núcleos, ocurre la separación del citoplasma y sus componentes mediante un proceso llamado citocinesis, que deriva en dos nuevas células, (Alberts et al., 2014; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

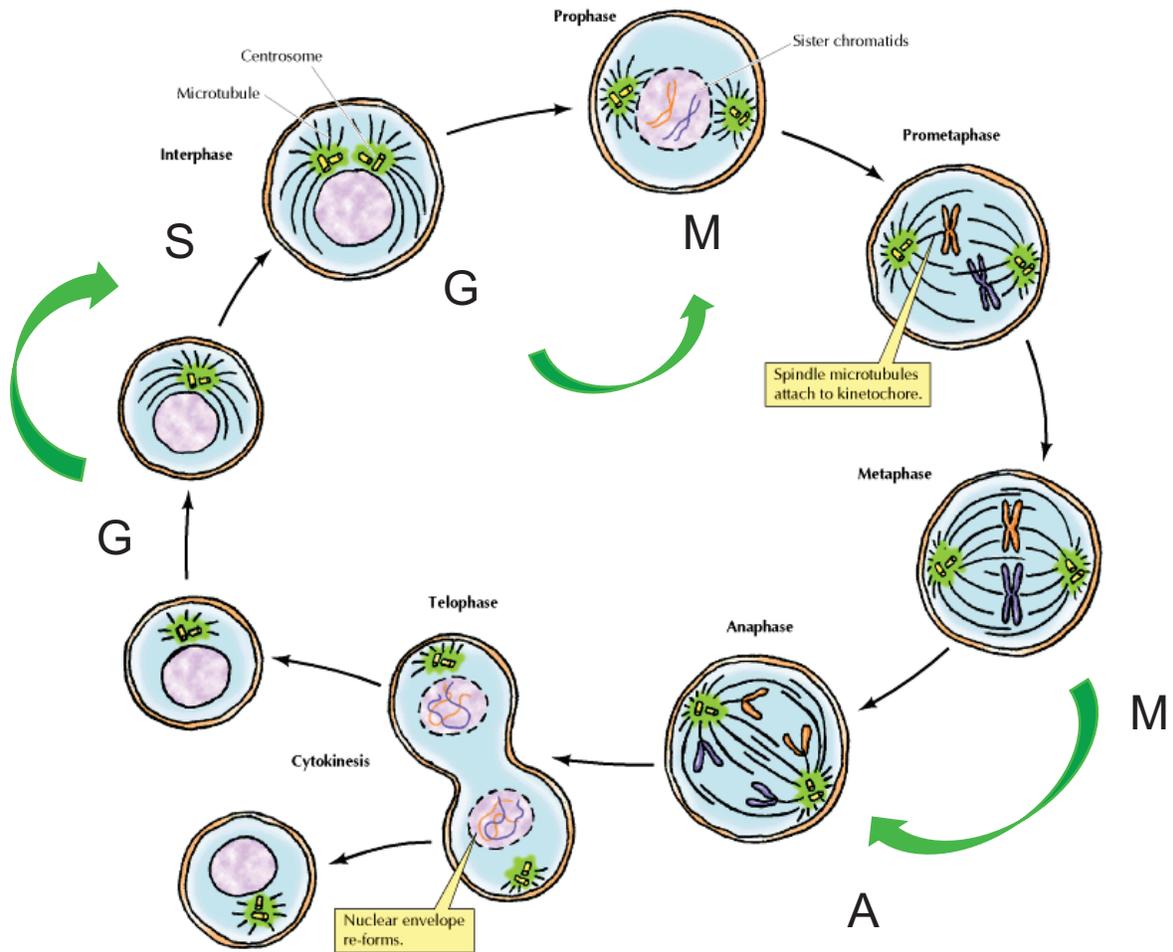


Figura 3. Fases del Ciclo celular. Existen tres puntos de control, 1. En G1 para evaluar las condiciones del entorno, 2. En G2: se verifica la integridad del ADN recién sintetizado. 3. Durante la metafase para verificar la alineación de los cromosomas en el plano metafásico antes de entrar en anafase. Las etapas previas a la mitosis (G1, S y G2) son conocidas como la interfase. (Modificada de [https://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT3140/I02/Cooper.Cell\\_Mol\\_Approach.ch14f23.gif](https://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT3140/I02/Cooper.Cell_Mol_Approach.ch14f23.gif), revisada el 12/09/17).

En semillas secas de *Arabidopsis thaliana*, las células del embrión quedan arrestadas en G1 (Bewley et al., 2013)(Bewley & Black, 1994). En semillas de jitomate sincronizadas, se estudió, mediante citometría de flujo, el

contenido de ADN en el núcleo y por inmunodetección la presencia de  $\beta$ -tubulina, los resultados mostraron que al comenzar el proceso de germinación la tubulina era baja y que comenzaba a ser detectable mientras avanzaba, acumulándose en G2, participando en la mitosis y finalmente desapareciendo para permitir la separación de las cromátidas hermanas. Los resultados indicaron que la mayoría de las células se encontraban arrestadas también en G1, (Castro, 1998). De igual manera la mayoría de las células embrionarias de maíz se quedan arrestadas en G1 en la semilla seca, (Georgieva et al., 1993).

En nuestro modelo de estudio (maíz chalqueño) se ha reportado que, durante la imbibición a 25°C en oscuridad, el ciclo celular se reactiva estando las células meristemáticas aún en G1 las primeras 6 horas y cerca de las 12 horas comienza la síntesis de ADN y entre 28 y 32 horas después de la imbibición se observan células en fase M, coincidiendo esto con la protrusión de la radícula en maíz, (Baíza et al., 1989; Herrera et al., 2000).

## G. Regulación del ciclo celular

La progresión del ciclo celular y su regulación están determinadas por distintas proteín-cinasas de serina y treonina que requieren la unión de una subunidad regulatoria llamada ciclina (Cyc) para poder activarse, y por lo tanto son denominadas cinasas dependientes de ciclinas, CDKs.

Las ciclinas y las CDKs forman un complejo heterodimérico que se encarga de regular la transición entre las diferentes fases del ciclo celular por medio de fosforilaciones activadoras o inhibitorias sobre otras proteínas, incluyendo algunas ciclinas y CDKs, y que el tipo y nivel de fosforilación varía de manera dependiente de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula. El principio básico de la progresión del ciclo es un equilibrio entre síntesis y destrucción de ciclinas que genera fluctuaciones en la actividad de las CDKs, dirigiendo así el ciclo a través de sus fases, (Nieuwland et al., 2007). La degradación de componentes necesarios ocurre en tiempos específicos de

la fase que concluyó, de manera que la célula no puede regresar a dicha fase y, por lo tanto, el ciclo es unidireccional, (De Veylder et al., 2007).

La dilucidación de algunos de los mecanismos, por ejemplo, a qué blancos fosforilan los diferentes complejos CDK-Cyc, qué proteínas inhiben a estos complejos, en qué momento se degradan las diferentes ciclinas, entre otros, ha contribuido a la comprensión general de cómo se llevan a cabo los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular en espacio y tiempo.

El estudio del ciclo celular y su regulación en el desarrollo de las plantas es de gran interés dado que existen enormes diferencias con los procesos de desarrollo entre estas y los mamíferos. Por ejemplo, en animales la morfología del organismo depende del desarrollo embrionario, y el desarrollo post-embrionario involucra proliferación de células prácticamente diferenciadas durante una etapa corta, en la cual el individuo crece. Posteriormente la proliferación cesa casi por completo en la mayoría de los tejidos. En cambio, la morfología de las plantas depende mucho más del desarrollo post-embrionario, y durante toda su vida, requieren continuamente de divisiones celulares en los meristemas seguidas de procesos de diferenciación para originar reiterativamente nuevos órganos (Nieuwland et al., 2007).

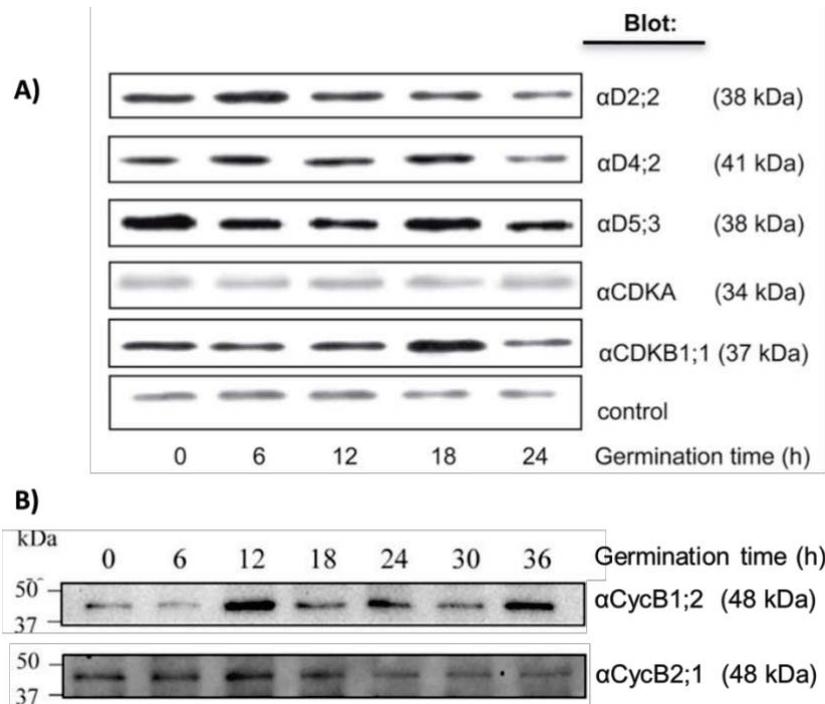
El descubrimiento de las ciclinas en huevos de erizo de mar por Tim Hunt y su grupo en 1983, permitió que se estudiaran de una manera más fina los mecanismos bioquímicos que regulan el ciclo celular de eucariontes (Evans et al., 1983; Novak et al., 1998). Las ciclinas se describieron como proteínas cuyos niveles de acumulación fluctuaban durante el ciclo celular, es a ello que deben su nombre, es decir, a su aparición transitoria y cíclica, (Evans et al., 1983).

En la actualidad se denominan ciclinas a aquellas proteínas que tienen regiones muy conservadas en el dominio N (región amino) y en el dominio C (región carboxilo), anexo 1, figura i. La secuencia conservada en el dominio

N es de aproximadamente de 100 aminoácidos y también se le conoce como caja de ciclina, ahí se encuentra en la región que une a CDKs. El dominio C es menos conservado que el dominio N, y hay ciclinas que carecen este dominio (Nieuwland et al., 2007). Aunque no necesariamente todas las proteínas con este dominio participan en la regulación del ciclo celular.

En el año 1998, sólo se conocían dos tipos de ciclinas, unas correspondientes a la regulación de la fase S (llamadas ciclinas A) y otras correspondientes a la fase M (denominadas ciclinas B), posteriormente se demostró que estas ciclinas se asociaban a una subunidad cinasa, conocida como *cdc2* o Cdk1, en levaduras y mamíferos (Lohka et al., 1988). En 1991, se aisló al homólogo de *cdc2* en maíz, *cdc2ZmA* (ZmCDKA). Utilizando un anticuerpo que reconoce a *cdc2* se identificó una proteína con una masa aproximada de 34 kDa en *Chlamydomonas*, alga verde, *Arabidopsis* y avena. Además, en ese trabajo se aisló un gen que mediante Southern blot se identificó a *cdc2ZmB*, un gen 96% idéntico a *cdcZmA*, indicando que existían múltiples genes de *cdc2* en maíz (Colasanti et al., 1991).

En maíz, utilizando ejes embrionarios como modelo, se han encontrado niveles detectables de todas las proteínas consideradas propias del ciclo celular, que han sido analizadas a lo largo de la germinación, como las ciclinas, CDKs, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), ADN polimerasas, entre otras, (Coello & Vazquez-Ramos, 1995; Lara-Núñez et al., 2008; Sánchez et al., 2002). Algunas proteínas presentan niveles constantes a lo largo del proceso germinativo, por ejemplo; las ADN polimerasas y las CDKs. Sin embargo, ha sido posible detectar cambios en su actividad, (Godínez-Palma et al., 2013; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Algunas ciclinas, aunque no todas, muestran un comportamiento fluctuante durante la germinación (Figura 4), que correlaciona parcialmente con la actividad de cinasa asociada a los complejos entre estas y la CDK a la que estén unidas, (Godínez-Palma et al., 2013; Lara-Núñez et al., 2008).

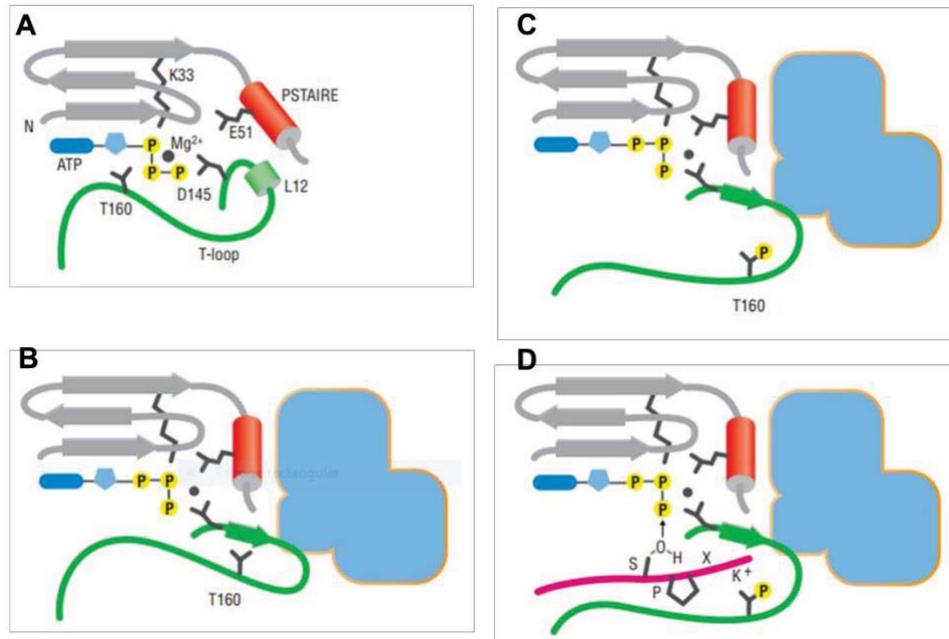


**Figura 4. Patrón de abundancia de proteínas del ciclo celular en la germinación de maíz. A) abundancia de proteínas participantes en las fases G1, S y G2/M (CDKB1;1). Modificado de (Godínez-Palma et al., 2013). B) Abundancia de dos ciclinas típicas de G2/M: CycB1;2 y B2;1. Modificado de (Lara-Núñez et al., 2021).**

## H. Ciclinas

Las ciclinas son las subunidades reguladoras de las CDK, quienes fosforilan diferentes sustratos, dependiendo de las necesidades celulares y la ciclina a la que se encuentre unida la CDK, es por eso que, regulando la síntesis, destrucción o localización de las ciclinas se puede regular la actividad de las CDKs.

La unión de la ciclina estabiliza al sitio catalítico de las CDKs, (Joubès et al., 2000) (Joubés *et al.* 2000). Sin embargo, a pesar de la unión de la ciclina, el sitio activo de la CDK permanece restringido por una estructura de asa llamada “loop T”, la cual al ser fosforilada en un residuo conservado de treonina (T160) cambia su conformación para permitir la correcta unión del sustrato y el acceso al grupo  $\gamma$ -fosfato del ATP al sitio activo (Figura 5). Esta fosforilación activadora en T160 está a cargo de una Kinasa Activadora de CDK, CAK, (Dudits et al., 2007).



**Figura 5. Activación de CDKs. Representación esquemática de varios estados de actividad.** ATP representado en azul rey, los fosfatos en amarillo. El asa con T160 (fosforilación activadora se representa en verde. La Ciclina es la estructura en azul claro. El cilindro rojo denota al motivo PSTAIRE en CDKs. El sustrato se representa en rosa oscuro. A) Monómero de CDKA inactivo. La hélice L12 se acerca al loop T bloqueando el sitio activo. B) Cuando se une la ciclina el motivo PSTAIRE se mueve y la hélice L12 cambia de estructura para formar una beta-plegado permiten el posicionamiento correcto del ATP en el sitio activo. C) La fosforilación de T160 causa que el Loop T se aplane e interaccione más con la ciclina. D) La entrada de sustrato con un motivo consenso (reconocido por la ciclina) permite la transferencia del fosfato gama del ATP. Modificado de (Morgan, 2007).

La unión de diferentes ciclinas con la misma CDK modifica los blancos de esta última. Se debe tener en cuenta que este tipo de regulación mediante ciclina-CDKs no es exclusiva del ciclo celular ya que este mecanismo también se encuentra involucrado en la transcripción y respuesta a la disponibilidad de fosfato, entre otros (Fisher & Nurse, 1996; Lenburg, 1996).

La síntesis de las ciclinas se rige por diversos factores. Las ciclinas que controlan la transición G1-S son capaces de reconocer señales externas

como hormonas y carbohidratos, o señales internas como tasa de crecimiento o tamaño celular, (ver Figura 9). Usualmente son proteínas inestables que rápidamente se degradan por vía del proteasoma 26S, esto combinado con la regulación negativa de su síntesis conduce a su rápida desaparición una vez que el estímulo es eliminado y la proteína ya no es requerida. Este comportamiento es típico de las ciclinas D, (Garza-Aguilar, 2018; Menges et al., 2006; Planchais et al., 2004).

Por otro lado, las ciclinas presentes durante la fase S (ciclinas A) y las ciclinas mitóticas (ciclinas B) muestran una síntesis y destrucción que es regulada dependiendo de la fase del ciclo celular, es decir, su abundancia depende del momento en que se encuentra la célula en el ciclo celular más que de señales extrínsecas (Nieuwland et al., 2007). En este tipo de regulación las modificaciones post-traduccionales juegan un papel fundamental para el control de la síntesis y destrucción proteica.

Las modificaciones post-traduccionales (MPTs) están involucradas en la regulación de diversos procesos biológicos, como la replicación, transcripción, crecimiento celular, división celular, autofagia, respuesta a estrés, entre otros. Pueden afectar la estructura de algunas proteínas, su localización, su actividad y/o estabilidad, además de regular la interacción con otras moléculas. Las fosforilaciones y ubiquitinaciones son modificaciones post-traduccionales comúnmente empleadas por las células para dirigir algunos procesos.

## I. Fosforilación

La fosforilación reversible de proteínas es uno de los principales mecanismos de regulación en plantas, y afecta procesos como el metabolismo, el ciclo celular, respuesta a estrés y a hormonas, el cierre de estomas y citocinesis, entre otros procesos (De La Fuente Van Bentem et al., 2008).

La cascada de señalización por fosforilaciones avanza rápidamente debido a la acción de un gran número de cinasas que fosforilan, a aminoácidos específicos en proteínas clave y fosfatasas que los defosforilan.

Se ha reportado a la serina, treonina y tirosina como los principales blancos de fosforilación en las proteínas. En *Arabidopsis*, la abundancia relativa de estos residuos fosforilados, oscila alrededor de 85.0%, 10.7% y 4.3%, respectivamente: Aunque las proteínas nucleares sólo comprenden aproximadamente el 20% de las proteínas codificadas por el genoma, alrededor del 40% de los eventos de fosforilación ocurren sobre dichas proteínas (Sugiyama et al., 2008).

## J. Ubiquitinación

La ubiquitinación ha emergido como una modificación post-traducciona clave para los procesos celulares. Puede regular cascadas de señalización, reparación de ADN, apoptosis y la degradación de ciertas proteínas en momentos específicos.

Uno de los sistemas proteolíticos centrales en células eucariontes es el proteasoma 26S (Schrader et al., 2009). Un complejo multifuncional cuya masa oscila alrededor de los 2.4 MDa, tiene alrededor de 33 subunidades proteicas y degrada proteínas en péptidos pequeños por un mecanismo dependiente de ATP (Kisselev & Goldberg, 2001). Está compuesto por el núcleo proteolítico, llamado proteasoma 20S (720 kDa), intercalado entre dos complejos reguladores 19S (890 kDa). Además (Gao et al., 2017) del trímero compuesto por las subunidades 19S-20S-19S, es posible que existan complejos 19S-20S sin embargo, no está claro cuál de estas formas es más importante en la digestión de proteínas (Tanahashi et al., 2000; Yang et al., 2007).

Además de degradar proteínas mal plegadas o dañadas, el proteasoma se ha involucrado en la regulación de procesos celulares degradando proteínas clave para el control de los mismos. Las proteínas son marcadas para su

destrucción por la adición de monómeros de ubiquitina que funcionan como una señal de reconocimiento por el proteasoma (Kisselev & Goldberg, 2001).

La ubiquitina, proteína de 78 aminoácidos ( $\approx 8.6$  kDa), fue aislada por primera vez, en la década de los 70s, conjugada a otras proteínas a través de un enlace peptídico entre el C-terminal de una glicina y una amina primaria del sustrato, generalmente en un residuo de lisina. Posteriormente se demostró que la conjugación de los monómeros de ubiquitina (ub) a sus sustratos depende de la actividad sucesiva de tres enzimas diferentes, llamadas E1, E2 y E3. Durante la siguiente década se dilucidaron, mediante estudios bioquímicos, las reacciones catalizadas por aquellas enzimas.

En la actualidad sabemos que no sólo la lisina puede ubiquitinarse, es posible encontrar a la ubiquitina conjugada en residuos de serina, treonina, cisteína e incluso la amina del N-terminal de algunas proteínas, (Cappadocia & Lima, 2018).

Existen aproximadamente diez mil sustratos que pueden ser ubiquitinados, además las interacciones no covalentes con proteínas Ubl's (por sus siglas en inglés ubiquitine-like proteins, que engloban a una familia de proteínas con estrecha relación estructural con la ubiquitina) median una gran variedad de funciones antes, durante y después de la conjugación.

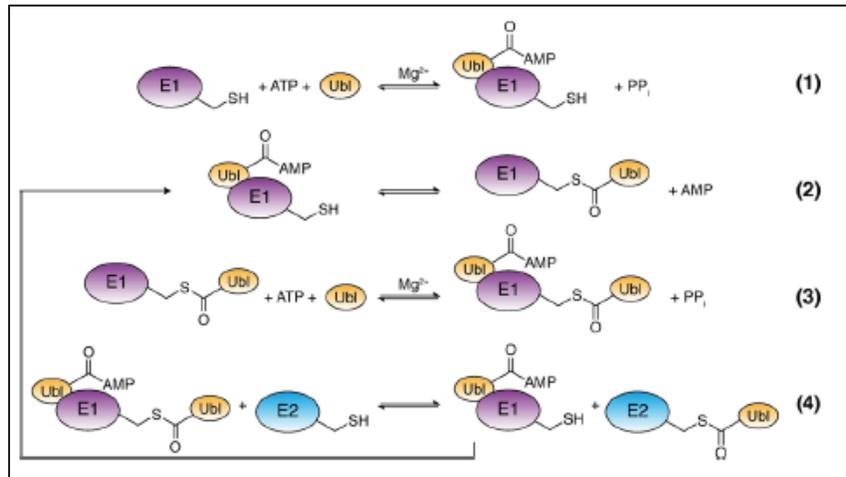
Las proteínas usan dominios y motivos de diferente tamaño y estructura para interactuar con la ubiquitina (Husnjak & Dikic, 2012). Sin embargo, la mayoría de las proteínas unen a la ubiquitina a través de un parche hidrófobo centrado alrededor de la isoleucina 44 de la misma.

## K. Enzimas activadoras E1

Son enzimas requeridas para la activación vía ATP tanto de la ubiquitina (Ub) como de las Ubl's, para prepararlas para los pasos subsecuentes de la cascada de conjugación.

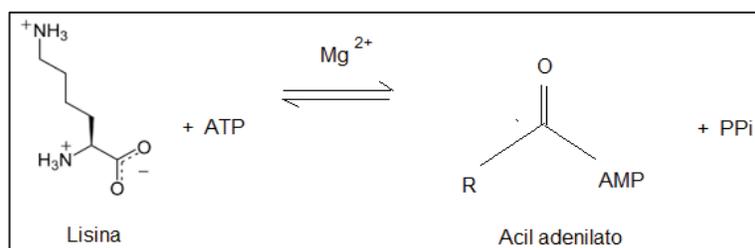
Las enzimas E1 han sido divididas históricamente en E1 canónicas y no canónicas (Schulman & Wade Harper, 2009).

Las enzimas E1 canónicas catalizan tres tipos de reacciones químicas, Figura 6.



**Figura 6. Reacciones canónicas de las enzimas E1. (1) La enzima E1 une a la Ubl y al ATP y cataliza la adenilación de la Ubl. (2) La enzima E1 cataliza el ataque de una cisteína al Ubl-AMP resultando en la formación de un enlace tio-éster entre E1- Ubl. (3) La enzima E1 adenila una segunda Ubl. (4) La Ubl es transferida a una enzima E2 a través de una reacción de transtioesterificación, (Cappadocia & Lima, 2018).**

En la primera reacción la enzima E1 une ATP,  $Mg^{2+}$  y una cisteína (dentro de una lisina) de la Ub o Ubl, catalizando la formación de un intermediario acil-adenilato de alta energía, con la subsecuente liberación de pirofosfato, Figura 7.



**Figura 7. Formación de acil adenilato. R: residuo de lisina.**

En la segunda reacción, una cisteína catalítica de la E1 ataca al intermediario Ubl ~ adenilato para mediar la formación de un enlace tioéster de alta energía entre la E1 y la Ubl, liberando AMP como producto.

Finalmente, el E1 ~ Ubl cataliza la transtioesterificación a una E2 para formar un producto unido por un enlace tioéster E2 ~ Ubl (Figura 6).

Las E1 canónicas activan a la familia de proteínas SUMO, NEDD8, ubiquitina, ISG15 y FAT10. Cada reacción química catalizada por la E1 es reversible, la direccionalidad se mantiene debido a la abundancia de ATP.

Las enzimas E1 pueden discernir entre las diferentes enzimas E2. Se sabe que la mayoría de las E1 canónicas incluyen el dominio de plegado de ubiquitina (UFD, por sus siglas en inglés) y este dominio parece ser determinante para la interacción E1:E2 (Cappadocia & Lima, 2018).

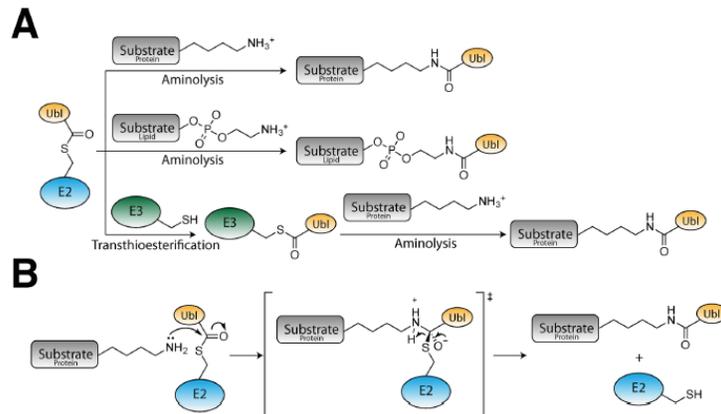
## L. Enzimas conjugadoras E2

Mediante análisis filogenéticos las E2s canónicas han sido clasificadas en 17 clases (Michelle et al., 2009).

La ubiquitina es transferida de la E1 a la E2 por una reacción de transtioesterificación, como ya se mencionó. Después de esta etapa, muchas E2 pueden transferir la ubiquitina a un residuo de lisina de otra proteína o lípido, a través de una reacción de aminólisis en la que la amina primaria de un residuo de lisina desprotonada dentro del sustrato, actúa como nucleófilo para atacar el enlace tioéster que une a la ubiquitina y a la E2, (Figura 8). Esta reacción probablemente implica la formación de un intermediario tetraédrico y culmina con la formación de un enlace isopeptídico (amida) entre el residuo de lisina y la glicina del C-terminal de la ubiquitina (Ichimura et al., 2000).

Otra vía por la que las E2 transfieren la ubiquitina que tienen conjugada a sus blancos, es a través de otras enzimas llamadas, E3 ligasas.

La mayoría de las E2 puede transferir a la ubiquitina, mediante una reacción de transesterificación. Una vez que ha sido transferida la ubiquitina hacia la E3, esta enzima puede modificar un residuo de lisina en el blanco a través de una reacción de aminólisis, Figura 7.



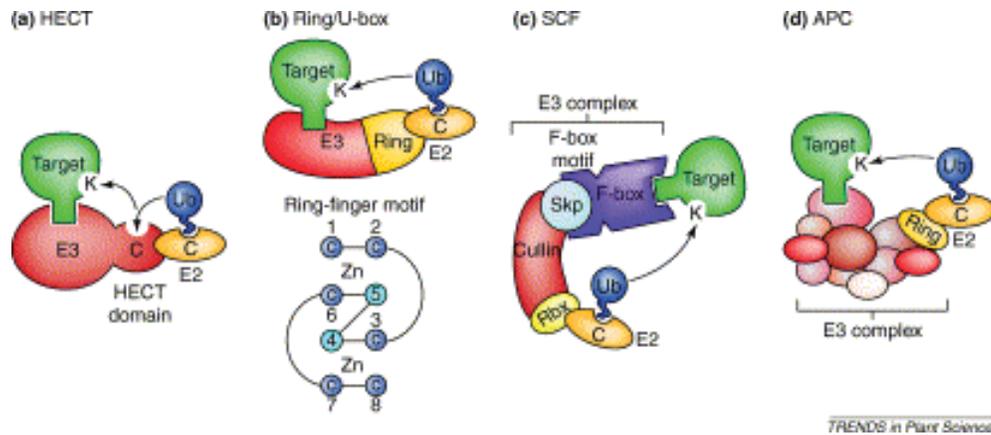
**Figura 8. Reacciones químicas de las enzimas E2. (A)** En el esquema se muestra como una fracción del enlace tioéster de la E2~Ubi es transferido a la amina primaria de un residuo de lisina dentro de una proteína (arriba), dentro de la amina primaria de una fosfatidiletanolamina (en medio), o a una enzima E3 y de ahí al sustrato (abajo), primero por una reacción de transesterificación, entre E2 y E3 y posteriormente por una reacción de aminólisis entre la enzima E3 y la amina primaria de un sustrato. **(B) Mecanismo de reacción para la aminólisis.** En este caso las aminas primarias están desprotonadas, Cappadocia & Lima, 2016.

### M. Enzimas E3 ligasas

Las proteínas E3 ligasas son consideradas generalmente, como factores que aumentan la tasa de ubiquitinación.

Esto a menudo se logra reclutando dentro de un complejo a la E2- Ubiquitina y al sustrato. Aunque la co-localización es crítica, la E3 también puede aumentar la tasa de formación de enlaces isopeptídicos ya que posiciona o alinea a la ubiquitina para favorecer el ataque nucleofílico (Cappadocia & Lima, 2018).

Se ha estimado que existen más de 1000 E3 ligasas que pueden clasificarse según su composición y mecanismo de acción (Vierstra, 2003) en:



**Figura 9. Organización y estructura de E3 Ligasas. a) HECT, b) Ring/U box, c) SCF, d) APC en asociación con el intermediario E2-UBQ la vía de transferencia de la ubiquitina desde E2 hacia las lisinas (K) accesibles en el blanco, se indican con flechas (Viestra, 2003).**

Las familias de E3 ligasas HECT y RING poseen diferentes mecanismos para la ubiquitinación de sustratos, Figura 9.

En el caso de las E3 ligasas HECT, la ubiquitina activada es transferida de una E2 a una E3 y finalmente al residuo de lisina de la proteína blanco. Mientras que las E3 ligasas con dominio RING actúan llevando el complejo E2 – UBQ y al sustrato a un compartimiento que les brinda proximidad, facilitando la transferencia de la ubiquitina activada de E2 directamente al sustrato.

## N. Enzimas deubiquitinadas (DUBs)

Las DUBs, son cisteín- o metaloproteasas que ayudan a regular la vía del proteasoma Ub/26S generando moléculas de ubiquitina libres al liberarse de la proteína que se va a hidrolizar proteínas y/o removiendo moléculas de ubiquitina de proteínas marcadas con la misma previniendo su destrucción por el proteasoma 26S (Borg & Dixit, 2017) , existen al menos 100 enzimas deubiquitinadas reportadas en el genoma humano (Lange et al., 2022) y 64 en Arabidopsis (Majumdar & Nath, 2020). Se sabe, además, que las DUBs pueden distinguir entre sustratos y tipos de unión de la ubiquitina.

## O. Inhibición de la proteólisis mediada por ubiquitinación

Debido a la importancia de la ubiquitinación en la regulación del ciclo celular, se han desarrollado diversos inhibidores farmacológicos de este mecanismo de señalización, entre los que se encuentran:

### MG132

También conocido como carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal, Z-LLL-CHO, es un péptido aldehído, capaz de inhibir de manera reversible al proteasoma 26S, además de proteasas de serina, calpaínas, entre otras. Inhibe de manera predominante la actividad tipo quimiotripsina, que facilita la ruptura de enlaces peptídicos por reacciones hidrolíticas (hidrolizando enlaces éster), un proceso que a pesar de ser energéticamente favorable ocurre de forma inusualmente lenta en ausencia de catalizadores.

### PYR-41

El ácido benzoico 4 [4- (5-nitro-furan-2-ilmetileno) - 3,5-dioxo-pirazolidin-1-il] etil éster, PYR-41, inhibe a las enzimas activadoras de ubiquitina 1, E1. Paradójicamente permite la acumulación de proteínas ubiquitinadas de alto peso molecular y tiene igual o mayor efecto inhibitorio sobre muchas deubiquitininas, DUBs (Kapuria et al., 2011).

## I. Antecedentes

Las plantas son organismos que necesitan adaptarse de una manera flexible debido a que no pueden moverse hacia condiciones ambientales más favorables, y han desarrollado elaborados mecanismos de respuesta a daños, condiciones adversas, frío, calor, etc. Uno de estos mecanismos involucra un control extremadamente regulado del ciclo celular y su progresión. En esta regulación las ciclinas y CDKs desempeñan papeles fundamentales.

En *Arabidopsis*, 50 homólogos de ciclinas han sido identificados y divididos en 9 clases con 23 subgrupos, así como dos ciclinas adicionales CYCQ1;1 y otra proteína tipo ciclina CYL;1 (Nieuwland et al., 2007).

En arroz se han encontrado 50 ciclinas que se dividen en las siguientes clases: A-, B-, C-, D-, H-, L-, SDS-, Q-, T-, P- y F-. Mientras que comparte con *Arabidopsis* las primeras 10 clases, la última (F-) no ha sido encontrada en *Arabidopsis* ni en otras especies (La et al., 2006).

## A. Dominios de las ciclinas

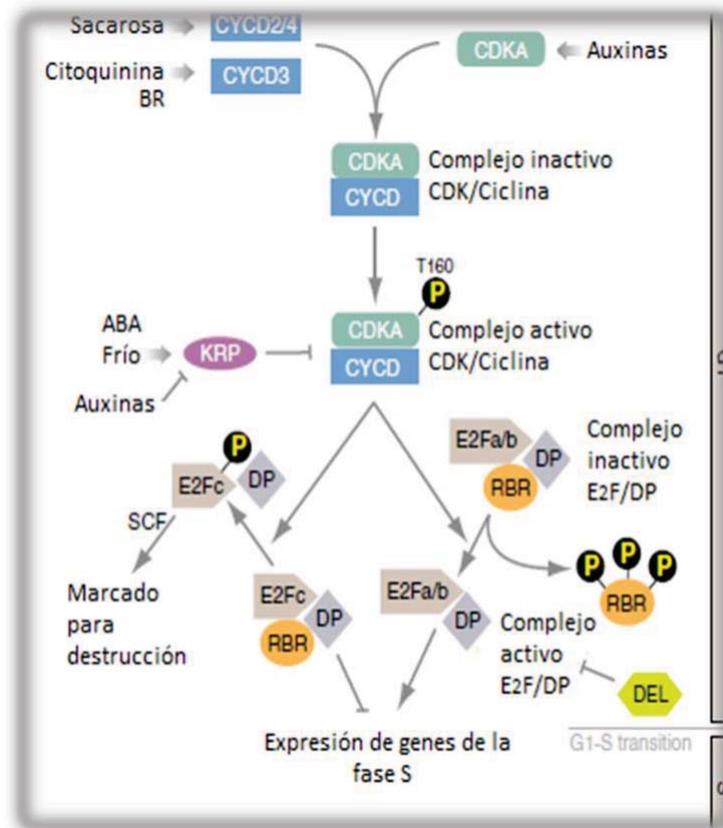
Las ciclinas tienen una región conservada de 250 aminoácidos que a su vez contiene dos dominios: N y C (Nugent et al., 1991). El dominio N abarca la región de unión a CDKs, tiene 100 aminoácidos y es conocido como la caja de ciclinas (cyclin box). El dominio C es menos conservado, lo que sugiere una actividad específica pero no crítica del mismo.

Algunas ciclinas también poseen una caja de destrucción (D-box), misma que está presente en todas las ciclinas A- y B- excepto CYCA3;3, CYCB2;5 y CYCB3;1, de *Arabidopsis* (Wang et al., 2004).

Por último, la mayoría de las ciclinas poseen un motivo PEST (una secuencia rica en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T) flanqueada por aminoácidos básicos) que parece conferir inestabilidad a las ciclinas. Estos residuos se han implicado en la degradación de numerosas proteínas ya que la mayoría de las proteínas con vida media menor de 2 horas son ricas en regiones de entre 12 y 60 residuos de longitud con dicha secuencia. Probablemente las regiones PEST forman parte de un sistema de reconocimiento, que actúa en conjunto con el sistema de ubiquitinación, conocido como fosfodegron, (Hunter, 2007; Rechsteiner & Rogers, 1996; Wang et al., 2004).

## B. Ciclinas D y su importancia en la transición G1/S

Las ciclinas D han sido descritas como las principales ciclinas reguladoras de la transición G1/S.



**Figura 10. Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas, (modificado de (Inzé & De Veylder, 2006)).**

Como se muestra en la Figura 10, en presencia de factores de crecimiento (como sacarosa y algunas hormonas) las ciclinas D se asocian con CDKA formando un complejo inactivo CDKA/CYCD. Este complejo es activado por Cak (Cinasa activadora de CDK) quien fosforila a la CDK en la treonina 160.

En respuesta a estímulos anti-mitóticos como ABA o frío, KRP (proteína perteneciente a la familia de los inhibidores de CDKs) puede inhibir los complejos activados de CDK/CYCD. Dichos complejos desencadenan la transición de la fase G1 a la fase S a través de dos vías paralelas.

En una de esas vías el complejo CDKA/CYCD fosforila a E2Fc, quien actúa como represor de la transcripción, para que sea reconocido por la E3 ligasa, SCF, y marcado para su destrucción por el proteasoma, inactivando de este modo al complejo represor (E2Fc/DP/RBR) Figura10.

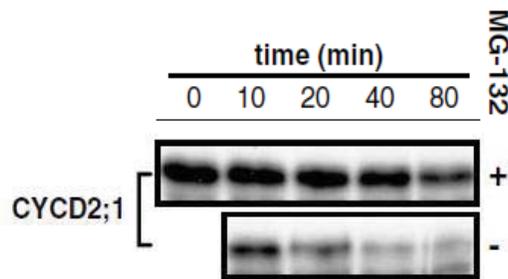
La otra vía, comienza con la fosforilación de RBR por parte del heterodímero CDKA/CYCD para liberar al complejo transcripcional E2Fa/b-DP, resultando en la activación de genes de la fase S, Figura 8, (Inzé & De Veylder, 2006).

Las ciclinas D desempeñan papeles fundamentales en la regulación del ciclo celular, al ser capaces de integrar las señales de proliferación y desarrollo, que provienen del interior de la célula, como nutrientes y hormonas, con los estímulos del ambiente exterior, tales como humedad y temperatura.

Dentro de la clase de las ciclinas D se encuentra la ciclina D2, presente en tejidos proliferativos y diferenciados. Durante la germinación de maíz se ha detectado un máximo de abundancia proteica a las seis horas que posteriormente disminuye.

En el 2014, Dante y colaboradores (Dante et al., 2014) reportaron la degradación de algunas ciclinas utilizando la maquinaria del proteasoma contenida en extractos proteicos de endospermo de maíz.

Los resultados mostraron que la estabilidad de algunas ciclinas, entre las que se encuentra la ciclina D2;1 (también referida como CycD2;2a), aumenta al inhibir el proteasoma 26S con MG132, Figura 11.

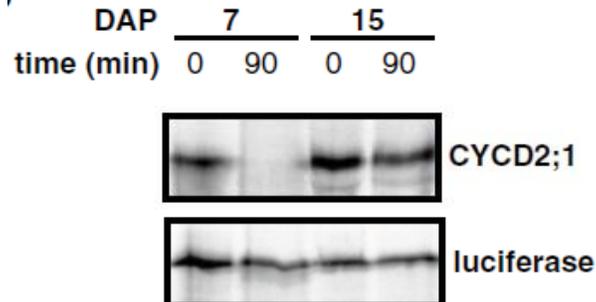


**Figura 11. Análisis curso-temporal de la degradación de la ciclina D2;1 (también referida como CycD2;2 a) en extractos de endospermo de maíz y de la estabilización de la ciclina al ser agregado el inhibidor del**

proteasoma MG132; los símbolos de (+) y (-) indican presencia o ausencia de MG132, respectivamente, (Dante *et al.*, 2014).

Como se observa en la Figura 9, al incubarse con el extracto de endospermo por ochenta minutos a 30°C el nivel de la proteína recombinante D2;1, disminuye en aquellos tratamientos donde la maquinaria del proteasoma se mantuvo activa y se estabiliza en las muestras que contienen al inhibidor del proteasoma 26S, MG132, los resultados sugieren fuertemente que dicha ciclina se degrada por un mecanismo dependiente de ubiquitina.

Adicionalmente, se reportó que la degradación de dicha ciclina es dependiente del estado celular de los extractos proteicos cuya maquinaria es empleada, pues al realizar el mismo experimento, empleando extractos proteicos de células en proliferación (7 DAP) y extractos proteicos de endospermo con células en estado endoreduplicativo (15 DAP), se observa una degradación diferencial de la ciclina D2;1, Figura 12.



**Figura 12. Análisis curso-temporal de la degradación de la ciclina D2;1 en extractos de endospermo con divisiones mitóticas activas 7 DAP y en estado endoreduplicativo 15 DAP. La CycD2;1 desaparece tras ser incubada por 90 minutos en extractos de endospermo con divisiones mitóticas activas y se mantiene tras ser incubado por 90 minutos en extractos de endospermo cuyas células se encontraban en estado endoreduplicativo, demostrando una degradación diferencial para la misma ciclina que dependerá del momento celular. (Dante *et al.*, 2014).**

## C. Ciclinas B y su importancia en la transición G2/M

A finales de los 80's Jeremy Minshull (Minshull et al., 1989), bajo la tutela de Tim Hunt, trató de explicar qué mecanismos permitían modular la actividad de las cinasas que dirigían a la célula hacia la mitosis, ya que, a pesar de que los niveles de las cinasas permanecían constantes a lo largo del ciclo celular, su actividad fluctuaba. El trabajo de Evans en 1983 (Evans et al., 1983) brindó a los candidatos perfectos para entender esta regulación, las ciclinas.

En su trabajo, Minshull (Minshull et al., 1989) aisló y secuenció dos ciclinas homólogas, pero no idénticas, de *Xenopus*, a las que nombró CycB1 (aprox 45 kDa) y CycB2 (aprox 44 kDa). Observó que estas proteínas desaparecían durante la mitosis en huevos que habían sido fertilizados y sincronizados. También sugirió que dichas proteínas podrían ser modificadas post-traduccionalmente, pues al analizar la síntesis de estas proteínas con [<sup>35</sup>S]-metionina en extractos celulares observó, además de la banda esperada, bandas correspondientes a la proteína recién sintetizada pero cuyo corrimiento se retardaba, estos resultados concordaban con resultados mostrados, en ciclinas de erizos y estrellas de mar (Pines & Hunt, 1987).

Las ciclinas B fueron las primeras en ser aisladas de plantas (Hata et al., 1991; Hemerly et al., 1993). La secuencia de aminoácidos típica de las ciclinas B (H/Qx(K/R/Q)(F/L) se ha identificado en todas las ciclinas de esta familia en *Arabidopsis*, (Nieuwland et al., 2007). Se han subdividido en 3 clases: CYCB1, CYCB2 y CYCB3, (Renaudin et al., 1996; Vandepoele et al., 2002). Las CYCB1 y CYCB2 se han encontrado en plantas mono y dicotiledóneas, mientras que las CYCB3 aún no han sido reportadas en monocotiledóneas (Nieuwland et al., 2007; Wang et al., 2004).

La expresión ectópica de CYCB1;1 en *Arabidopsis* estimula la división celular en raíz, resultando en una tasa de crecimiento más rápida, (Doerner et al., 1996). Por otro lado, la expresión ectópica de CYCB1;2 induce divisiones celulares en tricomas de *Arabidopsis*, células que normalmente entran a

endoreduplicación; en contraste, la expresión ectópica de CYCB1;1 no logra inducir divisiones celulares en tricomas, indicando que ambas CYCB1 de plantas son capaces de promover la transición de G2 a M, pero sugiriendo que existen funciones especializadas para cada ciclina B (Schnittger et al., 2005) (Schnittger & De Veylder, 2018).

Las CYCB2 parecen controlar la progresión hacia la mitosis, ya que la expresión ectópica de la CYCB2 de alfalfa en tabaco provoca la entrada prematura de las células a mitosis (Weingartner et al., 2003). Por otra parte, en arroz, la CYCB2 se asocia con la CDKB2;1, además de co-localizar con los cromosomas de células en metafase y desaparece una vez que las células atraviesan la misma (Lee et al., 2003). La asociación a los cromosomas y la destrucción después de la metafase fue previamente reportada para dos CYCB1 de tabaco (Criqui et al., 2000).

La función de las ciclinas B de plantas se conserva en animales. En 1996, se observó, por medio de micro inyección de ARNm, que la sobreexpresión de NtCYCB1;1 fue suficiente para revertir el arresto natural en G2/M en ovocitos de *Xenopus* (Qin et al., 1996).

En 1994, Pines & Hunter, reportaron que la localización diferencial de la CycA y la CycB1 de humanos, era resultado de una región, de 42 aminoácidos, conservada en el N-terminal de la ciclina B1. Empleando quimeras demostraron que ese péptido era suficiente para que la CycA, cuya localización en condiciones normales es nuclear, se retuviera en el citoplasma, (Pines & Hunter, 1991). Por otro lado, la ausencia de este péptido en la CycB1 la relocalizaba en el núcleo.

Considerando, entre otras cosas, lo anterior Mews y sus colaboradores (Mews et al., 2000) estudiaron la presencia y localización subcelular de cuatro ciclinas de maíz, ZmCycA1;1 ZmCycB1;1, ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1, y la proteína-cinasa Cdc2a (ZmCDKA), empleando raíces de maíz como modelo. Como se había observado en su homóloga de humanos, la ZmCycA1;1 de maíz fue localizada en la matriz nuclear hasta su liberación por la ruptura de

la envoltura nuclear. La ZmCycB1;2 fue localizada en el citoplasma hasta la profase, donde se observó asociada transitoriamente con la envoltura nuclear y la banda de pre-profase (PPB), justo antes de que estas estructuras se rompieran. Luego se asocia con los cromosomas condensados y el huso mitótico, antes de la entrada hacia anafase. La ciclina B1;1 se encontró unida a todos los arreglos de microtúbulos, durante el ciclo celular, especialmente en el fragmoplasto, y también en la PPB. Por su parte, la ciclina B2;1 se encontró asociada con el huso mitótico y posteriormente al fragmoplasto, en donde también se localizó a ZmCDKA (Mews et al., 1997).

De este trabajo se pudo concluir que, mientras las ciclinas ZmCycA1;1 y ZmCycB2;1 eran predominantemente nucleares hasta la mitosis, las ciclinas ZmCycB1;1 y ZmCycB1;2 eran predominantemente citoplasmáticas antes de la profase, momento en que entraban al núcleo. La retención de las ciclinas B1;1 y B1;2 en el citoplasma, correlacionaba con la presencia de una secuencia similar a la señal de retención citoplasmática (CRS) encontrada para CycB1 de animales por (Pines & Hunter, 1991). La CRS de plantas se localiza, como en animales, entre la caja de destrucción (caja D) y la caja ciclina, conservada en el extremo amino. Además las plantas conservan similitud en dos submotivos SP y AFS que son esenciales para la función de la CRS en ciclinas B de animales (Mews et al., 1997; Pines et al., 1998; Pines & Hunter, 1991).

En la reanudación de la división celular durante la formación de las raíces laterales y en respuesta a daño se observa un aumento en la concentración nuclear y una baja en la concentración citoplasmática de la ciclina ZmCycB2;1, sugiriendo un rol de ésta en la transición de la fase  $G_0 - G_1$ . La transición de la división a la diferenciación pareciera dispararse con el decremento de las proteínas del ciclo celular, especialmente con la disminución de las ciclinas B en el citoplasma (Mews et al., 2000).

## D. Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

Como se mencionó con anterioridad, las CDKs actúan diferencialmente en las etapas del ciclo celular de plantas, poseen sitios de unión a ATP y a su sustrato dentro de la región catalítica, la cual se encuentra entre los lóbulos formados por los extremos N-terminal y C-terminal. Se conocen dos tipos de CDK en plantas, que conducen a la célula a través de la mitosis: CDKA y CDKB.

En *Arabidopsis* CDKA1;1 se expresa desde la fase S hasta la mitosis y exhibe dos picos de actividad enzimática, durante G1/S y G2/M (Porceddu et al., 2001). Para la CDKB no se conocen con exactitud sus sustratos ni su función (Francis, 2011).

Las CDKs tipo A se caracterizan por poseer un dominio denominado PSTAIRE (por los aminoácidos que lo conforman) y este se encuentra conservado (Inagaki & Umeda, 2011). La clase B, que es única de plantas, fue descubierta poco después (Joubès et al., 2000). En *Arabidopsis* las CDKs tipo B comprenden a la *Arath;CDKB1;1, B1;2, B2;1* y *B2;2*. Las CDKs B1 y B2 se distinguen de las CDK tipo A debido a que muestran una divergencia evolutiva en el dominio PSTAIRE por PPTALRE or PPTTLRE (Joubès et al., 2000).

Con relación a las CDKs en maíz, se reportó recientemente en el grupo de trabajo que la abundancia de CDKA se mantiene constante durante la germinación, mientras que la CDKB muestra un pico a las 18 horas, Figura 4.

La asociación de las ciclinas con CDKA y CDKB también es característica y diferencial para cada ciclina (Godínez-Palma et al., 2013).

Ensayos de inmunoprecipitación, empleando anticuerpos diseñados para reconocer específicamente a las ciclinas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1, muestran que existe unión diferencial entre ambas ciclinas y las dos clases

de CDK, A y B, conforme avanza la germinación de ejes embrionarios de maíz (Ayub-Miranda, 2015).

Cabe mencionar que las CDKs pueden funcionar también fuera del ciclo celular y regular otros procesos. Por ejemplo, CDKA, además de su función reguladora de G1, S y G2, juega un papel importante en el control de la dinámica de los microtúbulos y por lo tanto, en la progresión de la mitosis (Steinborn et al., 2002).

### E. CDKs y su función en la fase G2, la transición G2/M y la fase M

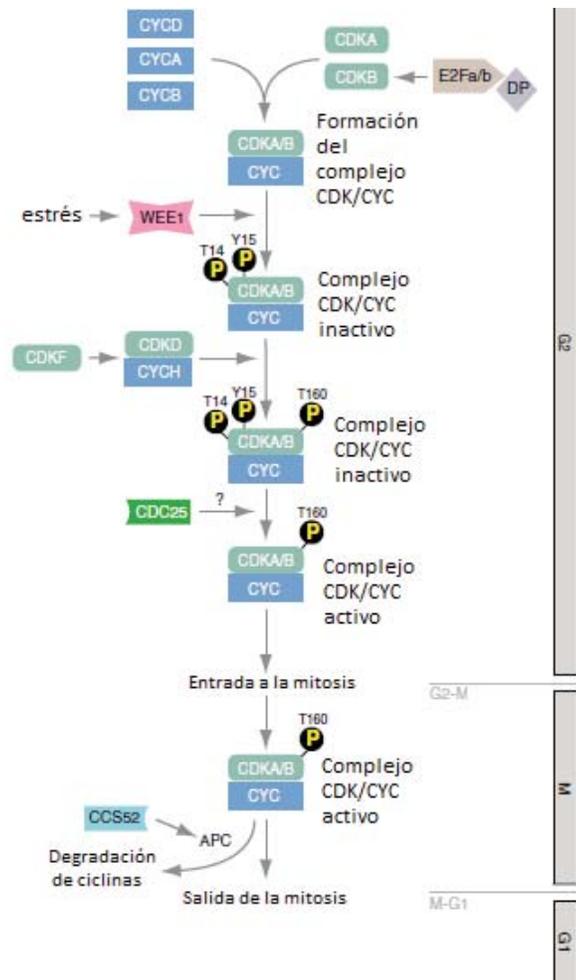


Figura 13. Representación esquemática de la regulación de la transición G2-M en plantas, (modificado de Inzé & de Veylder, 2006).

Como se muestra en la Figura 13, durante la fase G2 las ciclinas de tipo A, B y probablemente D se asocian con ambas CDKs. Algunas CDKBs (se conocen dos clases en maíz) se encuentran bajo el control transcripcional de la vía E2F.

La actividad de las CDKs puede ser regulada negativamente por la fosforilación de la cinasa WEE1 en la treonina 14 y tirosina 15 por la cinasa WEE112. Estas fosforilaciones inhibitorias parecen ser removidas por una fosfatasa relacionada con CDC25 de levaduras y algas, aunque esta proteína aún no ha sido descrita en plantas.

Una vez que los complejos CDK/CYC son activos, desencadenan la transición de G2 a M a través de la fosforilación de una plétora de sustratos.

La salida de la mitosis requiere de la proteólisis de algunas ciclinas, esta destrucción es iniciada por la activación del complejo promotor de anafase (APC) a través de su asociación con la proteína CCS52, la homóloga en plantas de CDH1, quien en humanos y levaduras actúa junto con el APC/C (Inzé, 2005; Inzé & De Veylder, 2006).

Como se ha mencionado, las modificaciones post-traduccionales sobre los reguladores del ciclo celular pueden tener un gran impacto en la progresión o velocidad de progresión. Estas modificaciones se han caracterizado pobremente en maíz.

## **II. Justificación**

Se ha reportado que la fosforilación de las CDKs en residuos clave puede modular positiva o negativamente su actividad. Además, se sabe que ciertas ciclinas pueden ser fosforiladas para regular su unión con otras proteínas, su actividad, su localización o para su posterior ubiquitinación y degradación vía proteasoma 26S y así regular su estabilidad. La identificación de modificaciones postraduccionales en las proteínas clave del ciclo celular ZmCDKA1, ZmCDKB1;1, ZmCycB1;2 y ZmCycD2;2a, y su relación con la estabilidad proteica en diferentes momentos de la germinación de maíz aporta información relevante, pues hasta el momento poco se ha reportado sobre las modificaciones post-traduccionales que regulan la degradación de estas proteínas y que por lo tanto podrían ser claves en el mecanismo de regulación del ciclo celular en maíz.

## **III. Hipótesis**

La estabilidad de las proteínas ZmCDKA1, ZmCDKB1;1, ZmCycB1;2 y ZmCycD2;2a, así como su susceptibilidad a ser modificadas post-traduccionalmente (ubiquitinación y fosforilación), presentará un patrón diferencial a lo largo de la germinación. La estabilidad de las proteínas será dependiente de las ubiquitinaciones detectadas.

## IV. Objetivos

### Objetivo General

Analizar la estabilidad de ZmCDKA1, ZmCDKB1;1, ZmCycB1;2 ó ZmCycD2;2a durante la germinación de maíz y determinar si estas proteínas de ciclo celular son modificadas post-traduccionalmente *in vitro*.

### Objetivos Particulares

- Producción y purificación de las proteínas recombinantes ZmCDKA1, ZmCDKB1;1, ZmCycB1;2, ZmCycD2;2a.
- Purificación de anticuerpos ZmCDKA1, ZmCDKB1;1
- Estandarización de los ensayos de estabilidad *in vitro* para las cuatro proteínas de interés.
- Determinar la estabilidad de ZmCDKA1, ZmCDKB1;1, ZmCycB1;2 y ZmCycD2;2a empleando anticuerpos diseñados para reconocer a cada proteína.
- Identificación del patrón de ubiquitinaciones para cada una de las proteínas estudiadas empleando un anticuerpo diseñado para reconocer a la ubiquitina.
- Análisis de la fosforilación activadora (T160) de ZmCDKA1 y ZmCDKB1;1 mediante anticuerpos específicos.

## V. Metodología

### Material biológico

#### A. Semillas de maíz

Para los ensayos se utilizan semillas de maíz (*Zea mays var. Chalqueño*, cosecha 2015) almacenadas a 4°C.

Los ejes embrionarios son extraídos cuidadosamente de semilla seca con el uso de bisturí, se desinfectan con una solución de hipoclorito de sodio al 5% que es diluida para que quede al 0.1% y se lavan tres veces con agua desionizada estéril. En condiciones de esterilidad, los ejes se secan por 10 min en papel absorbente y se colocan en cajas Petri con papel filtro Whatman y se agrega solución amortiguadora de imbibición que incluya sacarosa al 2%. Las cajas se incuban a 25°C a distintos tiempos de germinación.

### Métodos

#### B. Extracción de proteínas de eje embrionario o de tejido de maíz

Aproximadamente 0.25 g de ejes embrionarios se homogenizan en un mortero previamente enfriado a -20°C, con el amortiguador de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM ATP, 1 mM ditioneitol (DTT), 0.5% Tritón X-100 y una tableta de mini-cOmplete (Roche) por cada 10 mL de amortiguador de extracción. Las muestras se centrifugan a 500 g durante 15 minutos a 4°C. Con una espátula se retira la capa lipídica que por diferencia de densidades se concentra en la superficie y se alicuotea el sobrenadante que es utilizado inmediatamente o se congela con nitrógeno líquido y es almacenado a -70°C hasta su uso. La proteína se cuantifica por el método de Bradford.

### C. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

En una placa para ELISA, se realiza la curva patrón con concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina (BSA), se adicionan 10  $\mu$ L de amortiguador de extracción, el volumen apropiado de una solución de BSA de concentración conocida para generar concentraciones crecientes y agua suficiente para tener un volumen final de 72  $\mu$ L.

Para la muestra problema se hacen diluciones 1:4, 1:8 y 1:16 (o hasta que su absorbancia entre en el rango de la curva); se agregan 10  $\mu$ L de muestra y 62  $\mu$ L de agua. Finalmente se adicionan 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford tanto a la curva como a las muestras, tras incubar por cinco minutos a temperatura ambiente se lee a 595 nm en un lector de placas de Elisa (EPOCH, Bio Tek<sup>®</sup>).

### D. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

En un tubo Falcon de 50 mL se colocan los reactivos indicados en la tabla 2 para la preparación del gel separador, se mezclan y vierten entre dos vidrios para electroforesis (1 mm de grosor), se adiciona 1 mL de agua destilada, para facilitar la polimerización al evitar el contacto con el oxígeno del ambiente.

Al término, se retira el agua y se vierte la mezcla del gel apilador (composición en la Tabla 2). Se coloca el peine separador de carriles y se permite la polimerización a temperatura ambiente por 10 minutos. Se retira el peine y, en caso de existir residuos de acrilamida en pozos, se retiran con espátula.

**Tabla 2. Composición de las soluciones para la preparación del gel de poliacrilamida.\***

<b>Gel separador 12%</b>		<b>Gel apilador 5%</b>	
Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8)	4.0 mL	<b>Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8)</b>	0.81 mL
Tris-HCl 0.75 M pH 8.8	2.5 mL	<b>Tris-HCl 0.75 M pH 6.8</b>	1.7 mL
Agua destilada	3.44 mL	<b>Agua destilada</b>	2.5 mL
Persulfato de amonio 10%	50 µL	<b>Persulfato de amonio 10%</b>	50 µL
TEMED	7 µL	<b>TEMED</b>	10 µL

\*Cantidades calculadas para la preparación de 2 geles de 8 por 10 cm.

Una vez polimerizados, los geles se montan en una cámara de electroforesis de Bio Rad® y se agrega amortiguador de electrodos, tris-glicina-SDS 1x (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras se preparan añadiendo buffer de carga para obtener una concentración 1x (SDS 2%, glicerol 4%, Tris-HCl pH 6.8 40 mM, azul de bromofenol 0.01%, con o sin β-mercaptoetanol 2 mM, dependiendo la muestra) y se calientan a 90°C durante 5 minutos.

#### E. Purificación de anticuerpos por precipitación con sulfato de amonio

Los anticuerpos se purifican mediante precipitación con sulfato de amonio, para ello el suero inmune obtenido de conejos, se centrifugó a 10,000 g por 30 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se ajustó a un volumen de 96 mL con BBS (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 200 mM, NaCl 160 mM pH 8.0); posteriormente a este suero clarificado, se le adicionó lentamente una solución saturada de sulfato de amonio y se dejó reposar por 3 horas en hielo. Pasado este tiempo se centrifugó a 10,000 g por 30 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el pellet se disolvió en un volumen mínimo de BBS (aproximadamente 20 mL), este último se colocó en membranas de diálisis SnakeSkin Dialysis Tubing 3.5 K MWCO, 16 mm. Una vez cerradas las membranas se dializaron con al menos 1L de BBS frío, que fue renovado 2 veces al día, por 3 días.

## F. Western blot

Para los ensayos de Western blot se preparan geles SDS-PAGE al 12% como se indica en el apartado anterior y las proteínas se transfieren a membranas de PVDF Immobilon- PSQ Transfer Membrane (Millipore) previamente activadas sumergiéndolas 30 segundos en metanol 100%, posteriormente se sumergen 1 minuto en agua destilada para retirar el exceso de metanol, y finalmente se dejan equilibrar en amortiguador de transferencia 1x (Tris 25 mM-glicina 192 mM pH 8.3 y metanol 20%).

Mientras tanto en el casete de transferencia se acomoda una esponja, dos capas de papel filtro (Wathman, Cat: 3030917) húmedas, la membrana activada, el gel de poliacrilamida, dos capas de papel filtro y otra esponja, todo lo anterior humedecido previamente con amortiguador de transferencia 1x.

Se colocan los casetes en el porta-casetes y se transfieren bajo un campo eléctrico de 350 mA durante una hora. Al término de la transferencia las membranas se retiran y bloquean con una solución de PBS 1X-Tween 20 0.1% y 5% leche desengrasada durante mínimo media hora en agitación. Pasado el tiempo se retira la solución de bloqueo y se adiciona una solución con la misma composición de PBS 1X-Tween 20 0.1% y 5% leche con la alícuota del anticuerpo primario correspondiente, que se deja incubar O/N en agitación a 4°C.

Terminado el tiempo de incubación se hacen tres lavados. El primero con PBS 1X, seguido de un lavado de PBS 1X-Tween 20 0.1% con NaCl 2% y finalmente PBS 1X, cada uno de 15 minutos.

Las membranas lavadas se colocan en una disolución 5% de leche en PBS-Tween20 0.1% con una alícuota del anticuerpo secundario anti-conejo (ThermoScientific, Cat: 31460) y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y se realizan 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente se humedecen las membranas con 0.5 mL de la

solución de detección por quimioluminiscencia (ThermoScientific, Cat: 32106). El revelado se lleva a cabo en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad®).

## G. Extracción de plásmidos

La extracción de plásmido se realizó con el kit comercial Zymoprep™ Plasmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH, Cat: D4019). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

## H. Transformación de bacterias

Se agregó 1 µL de plásmido a 100 µL células competentes (*E. coli* BL21 CodonPlus-RIL) y se incubaron 30 minutos en hielo. Finalizada la incubación se dió un choque térmico por 30 segundos a 42°C, seguido de una incubación de cinco minutos en hielo tras la cual se adicionó 1mL de medio LB sin antibiótico y se dejó en agitación una hora a 37°C. Del cultivo, 300 µL se plaquearon en agar con el antibiótico de selección y se incubó O/N a 37°C. Los plásmidos empleados para llevar a cabo la transformación de las bacterias competentes se encontraban disponibles en el laboratorio antes del inicio de este trabajo. A continuación, se incluye la Tabla 3 con la información acerca de la naturaleza del vector, el TAG con que se obtiene la proteína recombinante y la masa molecular de ésta.

**Tabla 3. Vectores empleados para la obtención de proteína recombinante.**

Proteína recombinante	Vector de sobre-expresión	TAG (Tamaño kDa)	Tamaño de proteína sin TAG (kDa)	Tamaño de proteína +TAG (kDa)
CDKA;1	pCDFDuet1-CDKA;1	His (2)	34	34-36
CDKB1;1	pCDFDuet1-CDKB1;1	His (2)	37	37-39
CycB1;2	pET28b-CycB1;2	His (2)	48.2	50.2
CycD2;2	pCDFDuet1-CycD2;2	MBP (42)	38.9	80.9

## I. Sobre expresión de proteína recombinante

Una vez identificadas las colonias que crecen con el antibiótico de selección de cada construcción, la expresión de la proteína recombinante se indujo adicionando IPTG a una concentración final de 0.1 mM a un cultivo bacteriano de *E. coli* BL21CodonPlus-RIL con una densidad óptica de 0.6 -0.8 a 600 nm de longitud de onda. Después de la adición de IPTG se incubó 3 h a 37°C en agitación constante (250 g), se atemperaron en hielo 5 minutos y luego se centrifugaron las células a 3600 g durante 15 minutos a 4°C. La expresión de la proteína recombinante se verificó con un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. El pellet se guardó a -70°C hasta su uso.

## J. Purificación de proteína, condiciones nativas

El pellet obtenido se descongeló en hielo 15 minutos y se re-suspendió en amortiguador de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 10 mM pH 8.0; 2-5 mL por gramo de peso húmedo).

Al finalizar el tiempo de incubación la mezcla se sonicó en hielo 10 segundos por 1 minuto de reposo, mínimo 3 veces, a una amplitud de 25%, seguida de una centrifugación del lisado a 11,200 g por 30 minutos a 4°C.

El sobrenadante se mezcló con una matriz de Ni-NTA (Qiagen, Cat: 30210) al 50% (1 mL de Ni-NTA por cada 4 mL de lisado), durante 60 minutos a 200 rpm a 4°C.

Se utilizaron columnas de polipropileno (Thermo Scientific, Prod. # 29924) de 10 mL para retener las perlas de Ni-NTA que se adicionaron antes de la incubación de 60 minutos con el lisado. colectó el eluyente en tubos eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron a la columna 8 mL de amortiguador de lavado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, pH 8.0 2 veces), el eluyente se colectó en tubos eppendorf.

Finalizados los lavados se agregó 5 mL de amortiguador de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, pH 8) Se colectó el

eluyente en tubos eppendorf, la proteína purificada se recupera de las primeras fracciones.

\*Nota: Para la purificación de proteínas con MBP o GST como tag, se siguieron las instrucciones recomendadas en el manual de la columna de afinidad correspondiente.

## K. Purificación de anticuerpos por afinidad con proteína recombinante

La proteína recombinante se transfirió a una membrana de PVDF, como se indica en el apartado para Western blot. Nota: Si la proteína tiene una etiqueta como GST o MBP, se debe realizar un pre-aclaramiento del anticuerpo contra las proteínas correspondientes a esas etiquetas.

Una vez terminada la transferencia se tiñó la membrana con rojo de Ponceau y se cortó la tira que contenía la proteína de interés. Posteriormente se destiñe la tira con dos lavados de TBTS (10% de TBS 10X, 0.05% de Tween 20, 90% PBS 1X) y se pre-eluye con glicina 100 mM pH 2.5 por 15 minutos, transcurrido el tiempo se realizó un lavado de 10 minutos con TBTS. Inmediatamente después del lavado se bloqueó la tira con 5% de leche desgrasada en TBTs por una hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con TBTS de 10 minutos cada uno.

En suero inmune se incubó (aproximadamente 3 mL) toda la noche a 4°C y se realizaron tres lavados con TBTs de 10 minutos.

\*\*Elución del anticuerpo por incubación de la tira con 1 o 2 mL de glicina 100 mM pH 2.5 durante dos minutos y transferencia del eluato a un contenedor con Tris -HCl pH 8.5, suficiente para neutralizar el volumen de glicina final.

\*\*Se repitió este paso hasta tener cuatro eluciones.

Las fracciones se dializaron con PBS pH 7.4 en un volumen de 500 mL. Cambio de PBS tras 4 horas de agitación a 4°C y luego se dejó O/N en agitación.

Se comprobó por Western blot la efectividad de la purificación del anticuerpo.

#### L. Ensayos de estabilidad *in vitro*.

Los ensayos de estabilidad *in vitro* utilizan la maquinaria, molecular y enzimática, proveniente de 50 µg de extracto proteico obtenido a partir de ejes embrionarios de maíz, y como sustrato alrededor de 300 ng de la proteína recombinante a estudiar en un volumen final de 40 µL por reacción.

Para inactivar la maquinaria del proteasoma se incubó en hielo durante media hora al extracto con los inhibidores (100 µM de PYR-41 y 200 µM de MG132), ambos inhibidores se disuelven en DMSO, por lo que también se utilizó extracto total incubado con el mismo volumen de DMSO 300 µM para comparar el efecto sobre las proteínas estudiadas que fueron incubadas con o sin inhibidores. A la mezcla de ET más inhibidores o DMSO se le denominó mezcla 1.

Al finalizar la incubación de la mezcla 1, se separaron 15 µL de cada preparación (con inhibidores o DMSO) en 2 o 3 tubos eppendorff dependiendo de los tiempos de incubación analizados. Posteriormente se les agregó 15 µL de la mezcla 2 que contenía lo que se describe a continuación.

Mezcla 2: 2 µg de ubiquitina (#U6253, SIGMA), 0.1 unidades de fosfocreatina cinasa (#SLBK1472V SIGMA), ATP 3mM (#SLBL9206V SIGMA), 10mM fosfocreatina (#SLBL8184V SIGMA) y 0.3 µg de la proteína recombinante en estudio.

Una vez completadas las mezclas de reacciones (mezcla 1 + mezcla 2) se incubaron a 37°C en agitación suave. Al finalizar el tiempo de incubación la reacción se paró con 10 µL del amortiguador de carga con β-mercaptoetanol y se desnaturalizó la proteína a 95°C durante 10 minutos.

\*Para el tiempo cero la mezcla 1 + la mezcla 2 se reciben en amortiguador de carga con β-mercapto etanol, inmediatamente se calientan a 95°C durante 10 minutos y son almacenadas a -20°C hasta su uso. Las muestras se

cargaron en un gel de SDS-PAGE (3  $\mu$ L de cada reacción) y posteriormente fueron transferidas a una membrana de PVDF para ser almacenadas a -20°C.

#### M. Análisis *in silico*.

Las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas de interés se obtuvieron de la base de datos del NCBI y se analizaron para localizar motivos o residuos relacionados con la ubiquitinación y/o fosforilación de proteínas.

##### Cajas PEST

Las cajas PEST son secuencias hidrofílicas de al menos doce aminoácidos, ricas en prolina, glutámico, serinas y treoninas, que han sido reportadas en proteínas con vida media corta, ya que proporcionan un ambiente fisicoquímico propicio para las fosforilaciones que facilitan la ubiquitinación de las proteínas que las contienen, como se detalla en la introducción.

Es por ello que la presencia de una o más cajas PEST en las proteínas analizadas implica que existen regiones con características fisicoquímicas adecuadas para la fosforilación y, posiblemente, para la ubiquitinación.

Se determinó la presencia de cajas PEST utilizando el programa EPESTFIND, el cual considera que los motivos PEST contienen al menos una prolina (P), un aspartato (D) o un glutamato (E) y una serina (S) o treonina (T), flanqueados por aminoácidos con carga positiva (K, H y R).

Este criterio implica que algunas secuencias PEST podrían no ser identificadas, especialmente aquellas con alta concentración de aminoácidos críticos, pero con una gran distancia entre los aminoácidos con carga positiva, lo que podría resultar en puntajes de confianza más bajos, revisado en emboss-bug © emboss.open-bio.org.

Se realizó un alineamiento entre cada una de las proteínas analizadas y al menos 7 proteínas similares provenientes de monocotiledóneas,

dicotiledóneas y mamíferos, con la intención de encontrar los motivos PEST entre homólogas o análogas funcionales, que pudieran sugerir relevancia funcional al permanecer conservados.

En la mayoría de los casos estos motivos se conservaron. Además, se localizaron aminoácidos con carga positiva flanqueando a la mayoría de estas secuencias, reforzando la hipótesis de que estas proteínas son reguladas por fosforilaciones y/o ubiquitinaciones.

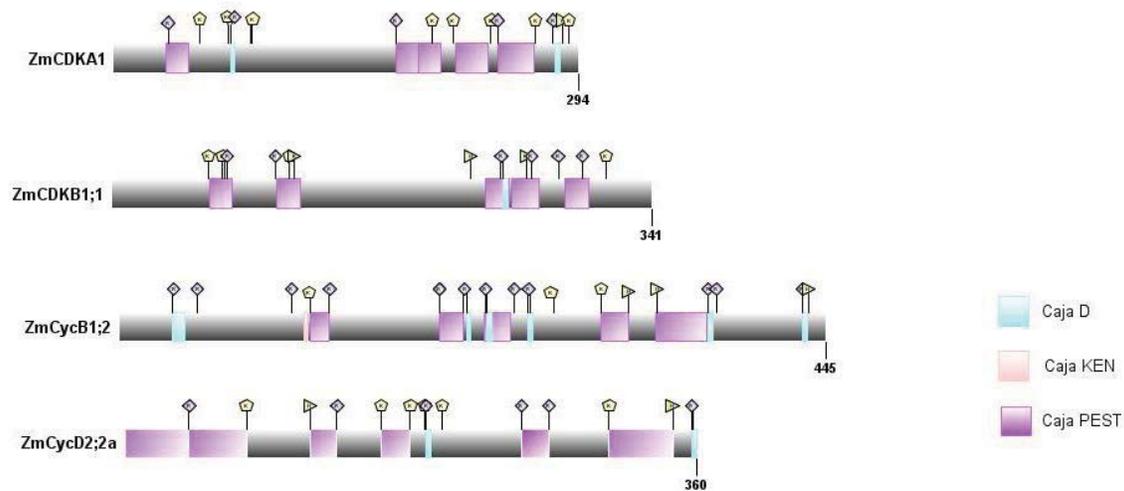
Cajas D y KEN

Otros motivos que se han relacionado con el mecanismo de degradación dependiente de ubiquitinación son las cajas KEN y D. La presencia de estos motivos en proteínas de *Xenopus*, levaduras, ratas y humanos se ha relacionado con la degradación mediada por el APC, con Cdh1 y Cdc20 respectivamente, como cofactores (Burton & Solomon, 2001; Pflieger & Kirschner, 2000; Yamano et al., 2004).

## VI. Resultados

### A. Análisis in silico

El análisis *in silico* permitió identificar los motivos PEST (en morado en Figura 14), caja D (RXXLXXXXN / RXXL, en cian) y la caja KEN (KENXXXXN/D / KEN en rosa), (Figura 14). Además, se esquematizan los residuos con carga +, conservados con otros homólogos y/o análogos funcionales. La caja KEN (rosa, Figura 14) se encontró únicamente en la ciclina B, más adelante se discutirá la relevancia de este motivo.



**Figura 14. Identificación de motivos PEST (morado), D (cian) y KEN (rosa), así como localización de residuos susceptibles de ubiquitinaciones. Emboss-bug © emboss.open-bio.org Bioinformatics (2015) 31(20):3359-3361. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. Bioinformatics (2015) 31(20):3359-3361.**

El análisis bioinformático y los antecedentes refuerzan la hipótesis de que estas proteínas pueden ser reguladas post-traduccionalmente por fosforilaciones y/o ubiquitinaciones. Para demostrarlo, se propuso aislar a las proteínas de interés en fases clave del ciclo celular. Y por medio de anticuerpos específicos detectar la presencia de la proteína y posibles ubiquitinaciones y fosforilaciones.

### ***B. Estandarización de la metodología.***

Al inicio de este proyecto se buscaba purificar a las proteínas nativas a partir de extractos proteicos con columnas de affigel Hz en las que previamente se inmovilizó el anticuerpo diseñado específicamente para el reconocimiento de cada una de estas (ZmCDKA, ZmCDKB1, ZmCycB1;2 y ZmCycD2;2a). Sin embargo, aunque fue posible inmunopurificar a la proteína nativa (datos no incluidos), resultó complicado el reconocimiento de dichas proteínas en sus estados modificados, posiblemente porque el anticuerpo no era capaz de reconocer la cantidad de proteína modificada (era baja) y/o debido a la rápida

degradación de estas, una vez que habían sido modificadas, principalmente en el caso de las ubiquitinaciones. Es por ello, que se buscó estandarizar un protocolo que permitiera estudiar la degradación de las proteínas de interés, así como a las ubiquitinaciones y fosforilaciones de las proteínas de interés, pero que además nos permitiera mantener un contexto lo más fisiológico posible.

### C. Ensayos de estabilidad in vitro.

Basándonos en el experimento planteado por Dante y colaboradores en 2014, Figuras 11 y 12, estandarizamos una metodología que nos permitiera usar la maquinaria enzimática y molecular de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz germinados por diferentes tiempos sobre la proteína recombinante de interés (como se detalla en la metodología).

Se determinó la cantidad de ET y el título de los anticuerpos a emplear para evitar el reconocimiento de la proteína endógena.

Para validar el anticuerpo anti-ubiquitina, además de descartar el reconocimiento de ubiquitinaciones inespecíficas, se utilizó BSA como control negativo. En 2001, Nathan W. Bays y colaboradores (Bays et al., 2001) mostraron que BSA es capaz de ubiquitinarse únicamente después de haber sido desnaturalizada por calor, Figura 15a.

El experimento planteado por Bays y colaboradores consistió en realizar un western blot en el que tres muestras fueron transferidas a una membrana incubada con anti-ubiquitina. La masa molecular de la proteína BSA sin modificar oscila alrededor de los 63.3 kDa, mientras que al ubiquitinarse, cada molécula de ubiquitina conjugada aumenta 8 kDa la masa de la proteína a la que se une. Por lo anterior, la proteína BSA más ubiquitina tendría una masa esperada alrededor de los 71 kDa.

En la Figura 15a se observa que únicamente cuando la proteína es desnaturalizada puede detectarse una banda alrededor de 71 kDa. Banda que corresponde al dímero BSA-UBQ.

Sabiendo lo anterior, esperaríamos que, en aquellas muestras en las que se incubó proteína BSA sin desnaturalizar junto con la maquinaria necesaria para ubiquitinar, no existiera reconocimiento por parte del anticuerpo  $\alpha$ -ubq. Mientras que, en aquellas muestras en las que se incubó BSA desnaturalizada, esperaríamos que la proteína BSA fuera ubiquitinada y posteriormente degradada en extractos sin inhibidores del proteasoma (aquellos en los que únicamente se adicionó DMSO).

Para descartar falsos positivos, debido a las condiciones del experimento, se incubó BSA sin desnaturalizar (no ubiquitable), con ET de 18 horas durante 0, 40 y 80 minutos en ausencia de inhibidores, Figura 15b, carriles 2, 3 y 4. Como se esperaba, no hubo reconocimiento del anticuerpo  $\alpha$ -ubq.

Además, se incubó BSA sin desnaturalizar durante 0, 40 y 80 minutos con ET de 18 horas cuyo proteasoma había sido previamente inhibido con una mezcla de PYR-41 y MG132, Figura 15b carriles 5, 6 y 7. Hay un ligero reconocimiento del dímero BSA-UBQ, sin embargo, es despreciable al compararse con la banda que se reconoce en el control de la Figura 15b BSA desnaturalizada 80 min / INH, carril 9. El carril 8 representa a BSA-UBQ degradado por la maquinaria del proteasoma en el extracto.

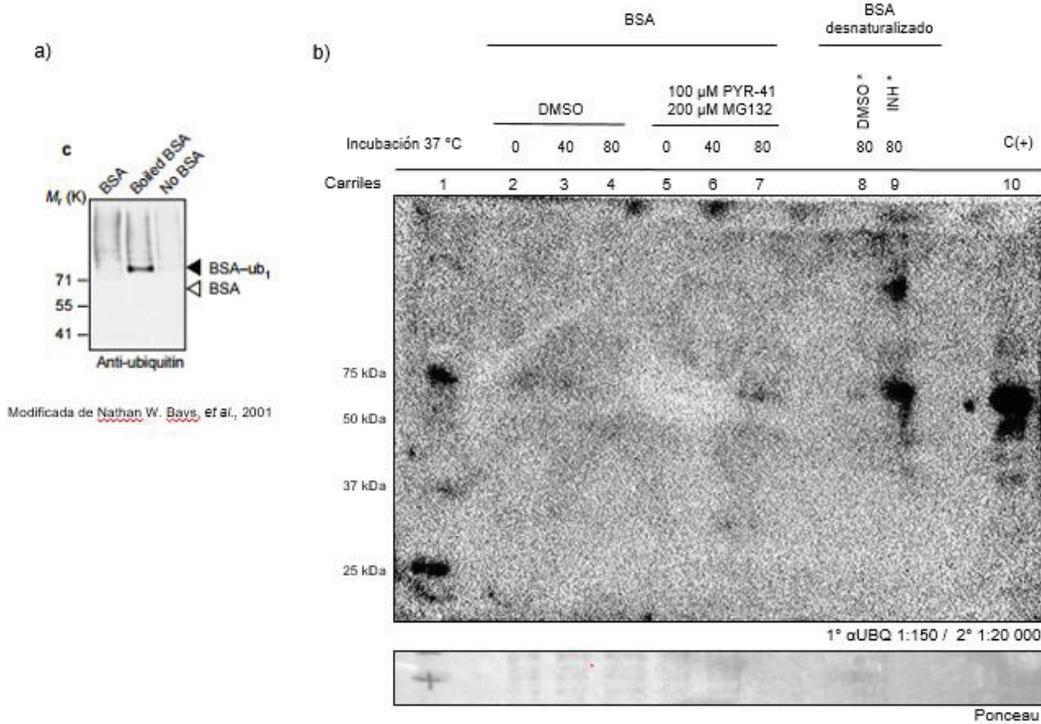


Figura 15. Ensayo de ubiquitinación de BSA. a) Estudio de la posible ubiquitinación de la proteína BSA, utilizando el carboxilo terminal de una proteína con actividad de E3 ligasa, como el APC y el complejo SCF. (Nathan W. Bays, et al., 2001) Se observó que únicamente el BSA desnaturalizado puede ubiquitinarse. (Bays et al., 2001). b) En los carriles que corresponden al ensayo de ubiquitinación *in vitro* de BSA sin desnaturalizar, no hay reconocimiento evidente del BSA ubiquitinado (carriles 2 a 7), mientras que en los carriles que corresponden al ensayo de ubiquitinación *in vitro* de BSA desnaturalizado (10 min a 90°C, carriles 8 y 9) se observa el reconocimiento de una banda por debajo de 75kDa (72 kDa aproximadamente) en presencia de inhibidores que concuerda con la masa del BSA ubiquitinado. La cantidad de proteína ubiquitinada disminuye al incubar el BSA desnaturalizado durante 80 minutos en presencia de DMSO (carril 8). C(+): 30 ng de ZmCDKA1 incubada 80 minutos con DMSO. Extracto proteico obtenido de ejes embrionarios embebidos por 18 horas.

#### D. Conclusión de Estandarización de la metodología

- La metodología propuesta permite estudiar ubiquitinaciones de proteínas, empleando la maquinaria enzimática de ET, de manera específica.

- La inhibición del proteasoma empleando PYR-41 y MG132 es efectiva. Esto lo podemos observar en la Figura 15b, carriles 8 y 9, en los que la misma concentración de BSA desnaturalizada fue incubada durante 80 minutos. En la muestra cuyo proteasoma no fue inhibido, carril 8, la señal reconocida es menos intensa debido a la degradación del dímero BSA-UBQ. Se sabe que la proteína BSA se ubiquitina para ser degradada cuando no se encuentra bien plegada. Sin embargo, cuando la maquinaria del proteasoma es inhibida antes de la adición de BSA desnaturalizada, carril 9, se observa el reconocimiento intenso de una banda alrededor de los 72 kDa correspondiente al dímero BSA-UBQ.

#### E. Modificaciones post-traduccionales de ZmCycD2;2a

Previamente se había establecido que la ciclina ZmCycD2;2a (antes conocida como ZmCycD2;1) es degradada en extractos totales de endospermo de maíz que aún mantenían divisiones celulares activas (Fig. 11 y 12). Además, se observa que la degradación es “selectiva” pues la ciclina no es degradada en aquellos extractos de endospermo que habían entrado en ciclos Endo reduplicativos. Asimismo, el nivel de la ciclina ZmCycD2;2 de maíz disminuye en extractos totales de ejes embrionarios de maíz, embebidos por más de 12 horas (Godínez-Palma et al., 2013; Gutiérrez et al., 2005).

Con esta información, se decidió comenzar los estudios empleando la maquinaria enzimática de extractos totales de ejes embrionarios de maíz embebidos 18 horas, con la ZmCycD2;2a. Esto nos permitiría optimizar la cantidad de proteína recombinante que emplearíamos en el experimento; con la precaución de no saturar el sistema para poder observar cambios en la cantidad de la proteína recombinante, tomando en cuenta la sensibilidad del anticuerpo.

Se purificó a la proteína recombinante unida a MBP, como se muestra en el Anexo 3, Figura v, se observa el enriquecimiento de la banda arriba de los 75

kDa después de inducir la sobreexpresión de la proteína con IPTG (masa de CycD2;2: 38.9 kDa; masa de MBP: 42 kDa; masa de la quimera: ~80.9 kDa).

Además, es posible apreciar una banda inmunoreactiva arriba del marcador de 37 kDa que podría deberse al MBP o un fragmento de la construcción que contiene MBP.

La degradación de la ciclina en ausencia de inhibidores fue evidente al cargar, 300 ng de proteína recombinante ZmCycD2;2a-MBP con 50 µg de ET de 18 h con y sin inhibidores (Figura 16).

Tras incubar a la ZmCycD2;2a-MBP, durante 40 minutos, la señal observada arriba de los 75 kDa comienza a disminuir. Después de 80 minutos de incubación se observa un decremento pronunciado de las bandas reconocidas en los tratamientos anteriores, debido a la degradación de la proteína.

Como ya se mencionó, para inactivar al proteasoma se utilizó, MG132 (200 µM) y PYR (100 µM), se observó que la mezcla de inhibidores estabilizó a ZmCycD2;2a-MBP tras 80 minutos de incubación a 37 °C, confirmando que la degradación de esta ciclina se relaciona con un mecanismo dependiente de ubiquitinación, Figura 16.

## ENSAYO DE ESTABILIDAD IN VITRO ZMCYCD2;2

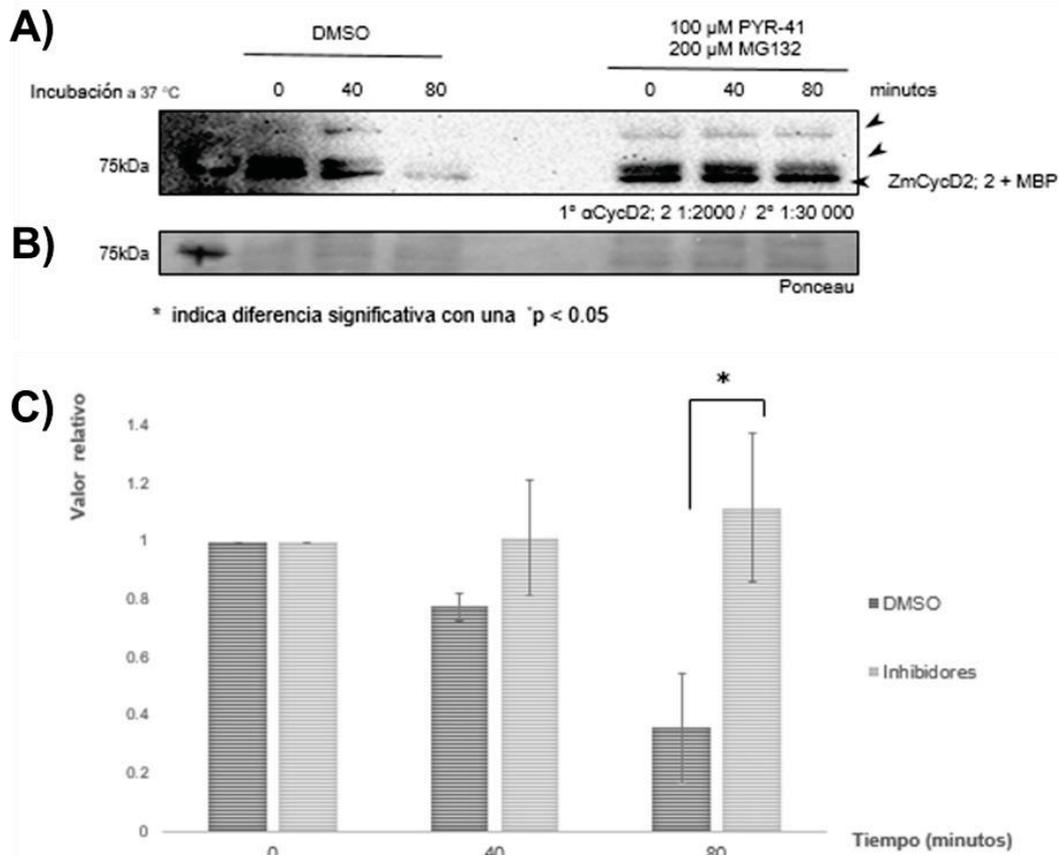


Figura 16. Ensayo de estabilidad de ZmCycD2;2a-MBP ( $\approx 80$ kDa). En A) Western blot realizado para monitorear la abundancia de ZmCycD2;2a-MBP. En los carriles que corresponden a ZmCycD2;2a-MBP incubada con los inhibidores, se observa que el nivel de proteína no muestra diferencias significativas entre los tiempos estudiados, la banda que se encuentra por debajo de los 75 kDa corresponde a la ZmCycD2;2 + MBP y las bandas de mayor peso molecular corresponden a la proteína modificada post-traduccionalmente. Mientras que la ZmCycD2;2a-MBP incubada con DMSO, mostró una disminución del 60% después de 80 minutos en incubación a 37°C. Dicha diferencia es significativa cuando se compara con el tratamiento con DMSO como se muestra en la gráfica c). Extracto proteico obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 18 horas. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau. C) Densitometría de las bandas correspondientes a ZmCycD2;2a del panel A.

\*Indica diferencia significativa con una  $p < 0.05$ .  $n=3$

Además de la disminución en la intensidad de la banda correspondiente a la ZmCycD2;2a-MBP se puede observar la presencia de dos bandas con una masa superior a la construcción antes mencionada. Dichas bandas podrían

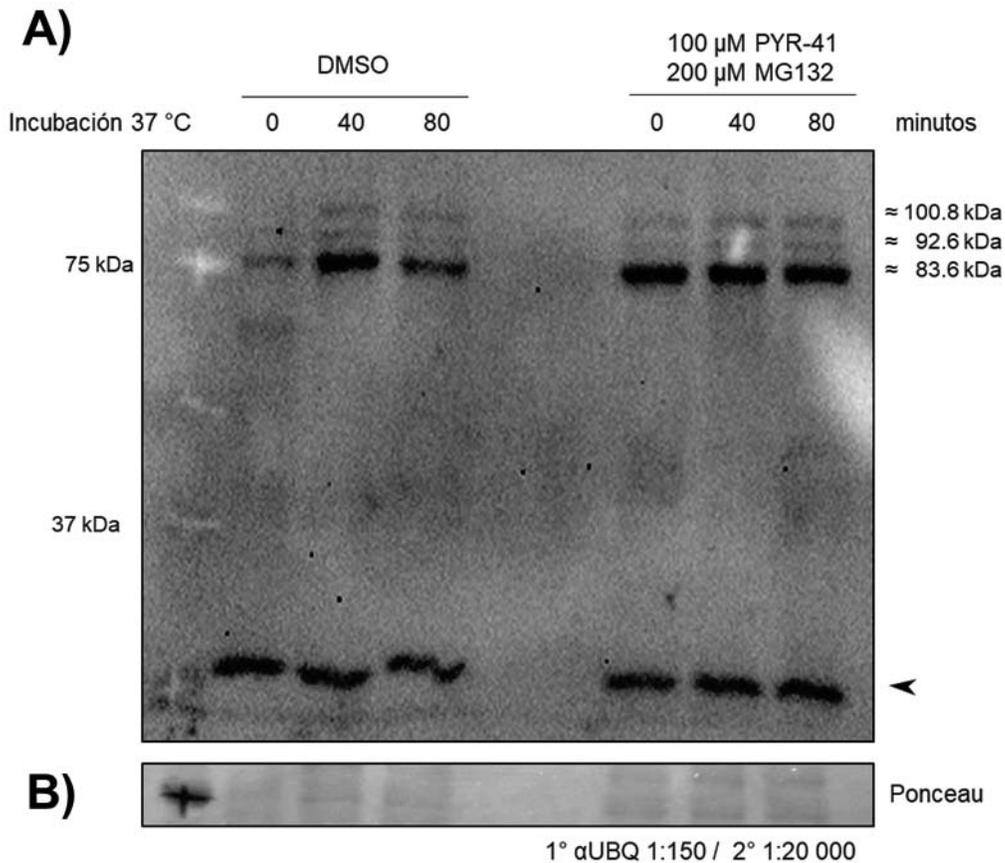
representar formas modificadas de la proteína recombinante. Si consideramos que en la reacción, además de la maquinaria enzimática y molecular presente en ejes embrionarios, se agregaron 2 µg de ubiquitina, 0.1 unidades de fosfocreatina cinasa, ATP 3 mM y 10 mM de fosfocreatina, es posible que las formas modificadas de la ZmCycD2;2a-MBP contengan al menos una molécula de ubiquitina.

Por otro lado, la banda arriba de la que reconoce mayoritariamente el anticuerpo α-CycD2;2 (80 kDa) se observa abajo del marcador de 100 kDa, lo que podría representar a la ZmCycD2;2 conjugada con al menos una molécula de UBQ y máximo dos (16 kDa extras).

Antes de este proyecto no se había reportado la ubiquitinación de la proteína recombinante ZmCycD2;2 empleando la maquinaria de extractos totales de ejes embrionarios de maíz, sin embargo los antecedentes y el experimento anterior sugieren una fuerte relación entre la degradación de esta ciclina con un mecanismo mediado por ubiquitinaciones, es por ello que empleando un anticuerpo específico para reconocer ubiquitina, se buscó determinar si las bandas detectadas en una masa mayor correspondían a la ciclina conjugada con una o varias moléculas de ubiquitina.

#### *F. Detección de ubiquitinaciones en ZmCycD2;2a.*

Para confirmar que ZmCycD2;2a-MBP fue modificada por ubiquitinación y que el sistema permite detectar dichas ubiquitinaciones, 300 ng de proteína recombinante ZmCycD2;2a-MBP con 50 µg de ET de 17 h con (100 µM PYR-41, 200 µM MG132) y sin inhibidores (DMSO 300 µM) se resolvieron en un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana, para posteriormente revelarla utilizando un anticuerpo específico anti- ubiquitina (Figura 17).



**Figura 17. Ensayo de ubiquitinación de ZmCycD2;2a-MBP ( $\approx$  80 kDa). A) En los carriles se aprecian cuatro bandas. Las tres bandas que se encuentran en la parte superior parecen corresponder a la ZmCycD2;2a-MBP en sus diferentes estados de ubiquitinación. Una cuarta banda en la parte inferior del gel corresponde a la ubiquitina libre, señalada con una flecha. Extracto proteico obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 18 horas. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau.**

Dos de las bandas detectadas con anti-ubiquitina concuerdan con la masa molecular de las bandas detectadas con el  $\alpha$ -ZmCycD2;2 y se puede observar una banda alrededor de 25 kDa que corresponde a las moléculas de ubiquitina o sus dímeros, que, si bien deberían encontrarse en 8 y 16 kDa respectivamente, no se pudieron separar correctamente debido a la capacidad de resolución del gel de acrilamida empleado.

Es necesario mencionar que en el tiempo cero no se esperaba el reconocimiento de bandas en masas superiores. Sin embargo, el tiempo que

toma la preparación de las muestras, en las que se ha favorecido la reacción enzimática, hace complicado impedir la modificación de las proteínas estudiadas en tiempo cero (30 segundos o menos).

- La ciclina ZmCycD2;2a recombinante es susceptible de ser ubiquitinada y es degradada por un mecanismo dependiente del proteasoma.
- A las 18 h de imbibición, los ejes embrionarios de maíz contienen presente la maquinaria molecular que permite la ubiquitinación y posterior degradación de la ciclina ZmCycD2;2a recombinante.

#### G. Modificaciones post-traduccionales de ZmCycB1;2

Sus descubrimientos, apoyados por los reportes de Pines & Hunt, 1987 y Standart *et al.*, 1967, en ciclinas de erizos y estrellas de mar, lo llevaron a concluir que las ciclinas B se degradan durante la mitosis y además pueden modificarse post-traduccionamente (Minshull *et al.*, 1989).

En el anexo 2 y Figura 4 se muestra el comportamiento de la ZmCycB1;2 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, en que se reconocieron (Ayub-Miranda, 2015) dos bandas de alta masa molecular, una, alrededor de los 48 kDa, masa teórica de la ciclina B1;2 y otra arriba de los 50 kDa, cuya presencia pudiese ser explicada por la presencia en ésta de modificaciones post-traduccionales.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la ZmCycB1;2 indica la presencia de una secuencia de retención citoplasmática, así como de otros motivos que sugieren una elaborada regulación post-traducciona para esta proteína (Figura 19).

Dentro de los motivos que se conservan entre proteínas homólogas encontramos:

- Cajas D, PEST y KEN, todas relacionadas con la destrucción vía ubiquitinación en diferentes momentos del ciclo celular, como se describió con anterioridad en *Análisis in silico*,

Para poder visualizar las posibilidades de regulación de la ciclina se realizó un esquema, Figura 18, en el que se compilan los motivos que se encuentran conservados entre proteínas homólogas y/o análogas funcionales.



**Figura 18. Representación gráfica de los motivos conservados en la ciclina B1;2 de maíz. Emboss-bug © emboss.open-bio.org Bioinformatics (2015) 31(20):3359-3361.IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. Bioinformatics (2015) 31(20):3359-3361.**

La información recopilada hasta el momento sugiere, que la ciclina podría ser degradada en dos momentos durante el ciclo celular: Al inicio de la germinación durante G1, con la participación adicional de la caja KEN y motivos PIP (motivos de unión a PCNA), además de las cajas PEST y D vía APC<sup>Cdc20/Cdh1</sup> o 2) durante la mitosis antes de la citocinesis, vía APC<sup>Cdc20</sup>.

Decidimos hacer un ensayo in vitro con proteína recombinante empleando extractos totales de ejes embrionarios de maíz germinados por 6, 18 y 24 horas. La hipótesis de este experimento, inspirado en el trabajo descrito por Dante y colaboradores en el 2014, (Figura 12), es que la proteína recombinante ZmCycB1;2 sería degradada a tiempos tempranos de la germinación (alrededor de las 6 horas), mientras que en presencia de ET de 18 y 24 h permanecería estable.

Con la purificación de la proteína recombinante ZmCycB1;2-His (Anexo 4, Figura vi), se ajustaron las condiciones para el experimento, es importante recordar que la cantidad de proteína recombinante empleada en el experimento es del orden de nano gramos. Y es posible, en algunos casos, que la baja cantidad de proteína, combinada con el sistema de degradación de los extractos totales diluyeran la cantidad de proteína reconocida tanto arriba como abajo de la masa esperada para la proteína recombinante, como se apreciará más adelante.

A)

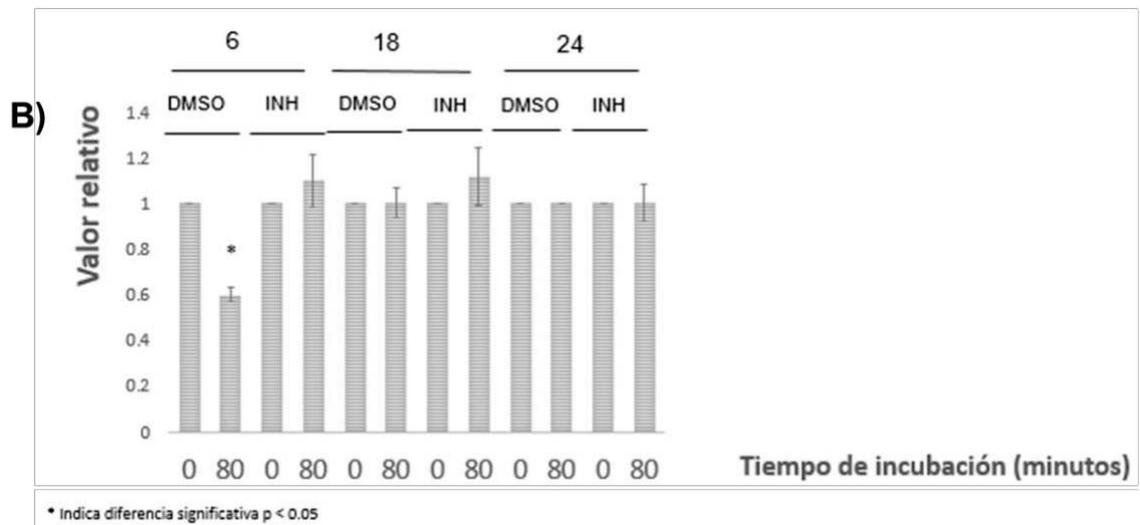
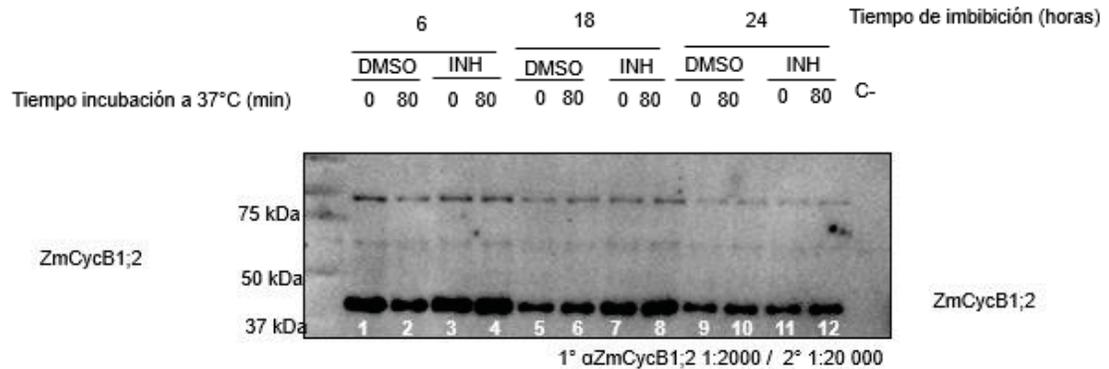


Figura 19. Ensayo de estabilidad diferencial de la ciclina ZmCycB1;2-His. B) Se muestra la gráfica que corresponde al análisis cuantitativo que se realizó A) Western blot para identificar a ZmCycB1;2. Se incubó la mezcla de ET - proteína recombinante durante 0 (control) y 80 minutos a 37°C en agitación suave. El tiempo cero corresponde a la cantidad de proteína recombinante inicial, el tiempo ochenta corresponde a la cantidad de proteína recombinante remanente tras 80 minutos de incubación sin y con inhibidores del proteasoma. B) Densitometría de las bandas correspondientes a ZmCycB1;2 del panel A. \*Indica diferencia significativa con una  $p < 0.05$ .  $n=3$ .

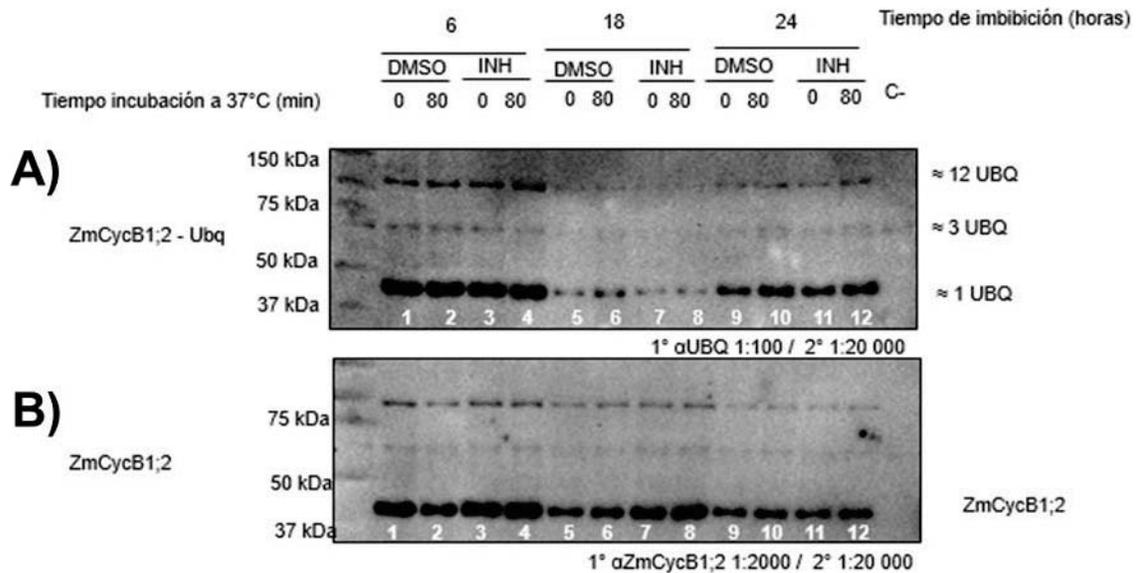
El resultado de la Figura 19 permitió corroborar que la degradación vía proteasoma de la CycB1;2 es dependiente del momento del ciclo celular. Lo que concuerda con una vía de regulación post-traducciona, como sugiere el análisis *in silico*, Figura 18.

El análisis estadístico confirmó que a las seis horas de germinación (tiempo que corresponde con la fase G1) la maquinaria enzimática presente en los extractos celulares reconoce y degrada con avidez a la proteína recombinante, disminuyendo en un 40% la proteína presente tras ochenta minutos, carril 2, al ser incubada en extracto total sin inhibidores del proteasoma (Figura 19B). Por otro lado, el resultado de los carriles 3 y 4 en los que la proteína recombinante se mantuvo constante tras ochenta minutos de incubación en extracto total con inhibidores del proteasoma, confirman que la ciclina B1;2 de maíz puede ser degradada por un mecanismo dependiente de ubiquitinación particularmente a las 6 h de germinación (Figura 19A).

En la transición de S a G2, carriles 5 a 8 y de G2 a las primeras etapas de M, carriles 9 al 12 la cantidad de proteína permanece constante tanto en las muestras que tienen inhibidores, carriles 7, 8, 11 y 12, como en los tratamientos en los que se adicionó DMSO, carriles 5, 6, 9 y 10, lo que sugiere que a esos tiempos no está activa la vía de degradación para esta ciclina.

#### *H. Análisis de ubiquitinación en ZmCycB1;2*

El experimento descrito en la Figura 20, no sólo mostró la degradación diferencial de esta ciclina, al analizar las bandas detectadas por el anticuerpo generado para reconocer a la ciclina B1;2 de maíz, encontramos una banda alrededor de los 50 kDa que corresponde a la proteína posiblemente conjugada a una única molécula de ubiquitina ya que se observa en ambos WB, también encontramos dos bandas cuyas masas concuerdan con la masa teórica de la ZmCycB1;2 conjugada con 3 (banda por debajo de los 75kDa) o 12 (banda arriba de los 150 kDa) moléculas de ubiquitina, respectivamente (Figura 20).



**Figura 20. Ubiquitinaciones en la proteína ZmCycB1;2-His. A) Western blot revelado con  $\alpha$ -UBQ; B) Western blot revelado con  $\alpha$ -ZmCycB1;2 para comparar el patrón de bandas detectado con cada anticuerpo. Para el control negativo C- se utilizó solamente el extracto total en la misma concentración de los experimentos.**

La Figura 20 muestra las imágenes obtenidas al realizar Westerns blots con los anticuerpos anti-UBQ y anti-CycB1;2 del mismo experimento.

Es importante recordar que el tiempo cero corresponde al “estado inicial” de la proteína recombinante agregada en el ensayo, por lo que el carril 1 sirve como el control del carril 2, el carril 3 del 4 y así sucesivamente.

En la Figura 20B, membrana revelada con  $\alpha$ -ZmCycB1;2, se observa un decremento en la señal a las seis horas, para el carril 2 (muestra incubada 80 minutos en ET de 6 horas y ausencia de inhibidores del proteasoma), en contraste, en la Figura 20A, membrana revelada con  $\alpha$ -UBQ, se observa la banda correspondiente al reconocimiento por el anticuerpo que detecta moléculas de ubiquitina para esta muestra.

Para los carriles 5, 6, 7 y 8, tratamientos que corresponden a la proteína incubada en ET de 18 horas sin y con inhibidores, se observa en la Figura 20B que la cantidad de proteína permanece constante. Notablemente para

los mismos carriles de la Figura 20A el reconocimiento de UBI es menor en comparación con los otros tratamientos. Este comportamiento es consistente con el momento del ciclo celular en el que se encuentran la mayoría de las células de los ejes embrionarios de maíz. Como se mencionó en la introducción la ciclina B1;2 de maíz comienza a aumentar a las 18 horas de germinación. Además, a las 18 horas la ciclina B1;2 probablemente se encuentra trabajando junto con diferentes cinasas y otras proteínas (como PCNA) revisando que el ADN se haya duplicado correctamente, lo que la hace necesaria en este tiempo y por lo cual es poco probable que se degrade.

Otro aspecto destacable de este experimento es que si comparamos la Figura 20A con la Figura 20B se observa que el reconocimiento de CycB1;2 y el reconocimiento de la proteína conjugada a la ubiquitina difiere según el extracto en que se haya incubado. En estos Westerns se contrasta el comportamiento de la proteína incubada con ET de 6, 18 y 24 h (carriles 1 a 4, 5 a 8 y 9 a 12, respectivamente) incubados en presencia de inhibidores (carriles 3 y 4, 7 y 8, 11 y 12, respectivamente) o sin ellos (carriles 1 y 2, 5 y 6, 9 y 11, respectivamente).

Resulta interesante que, aunque el nivel de proteína inicial es semejante entre algunos tratamientos, por ejemplo, en los carriles 5 y 9, ambos tiempos iniciales sin inhibidores, en Fig. 20B (ZmCycB1;2), la detección de ubiquitina entre estos mismos dos tratamientos no es similar (Fig. 20A), más evidente en el carril 9 en que se utilizó ET de 24 horas para incubar a la proteína recombinante.

Si consideramos que a las 18 horas la CycB1;2 pudiera estar unida a diferentes proteínas que le permiten corroborar que el ADN recién sintetizado no contenga errores, es poco probable que la CycB1;2 se encuentre conjugada a moléculas de ubiquitina, en primer lugar, porque es necesaria en este momento del ciclo celular y, en segundo lugar, tal vez porque está interaccionando con otras proteínas que podrían impedir o dificultar su ubiquitinación.

Mientras que a las 24 horas la célula se está preparando para la mitosis, y como se mencionó en la introducción, la ciclina permanece en el citoplasma hasta la profase, cuando se relocaliza en el núcleo, para participar en el correcto ensamblado del huso mitótico. Una vez que cumplió su función es necesario que la ciclina se degrade para poder salir de la mitosis, Por lo anterior no resulta ilógico pensar que, a pesar de que se registra un máximo de cantidad de proteína en extractos totales de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 horas, esta proteína pudiera comenzar a ser reconocida por el APC.

- El experimento permite estudiar la degradación de proteínas de manera diferencial empleando la maquinaria enzimática de extractos totales germinados durante 6, 18 y 24 horas.
- La proteína ZmCycB1;2-His es degradada de manera diferencial en extractos totales de ejes embrionarios de maíz germinados por 6, 18 y 24 horas. Siendo 6 horas de germinación el único tiempo en el que la proteína es degradada significativamente.
- La proteína ZmCycB1;2-His es ubiquitinada de manera diferencial a lo largo de la germinación, en un proceso que depende del momento celular y de la maquinaria del proteasoma presente.

#### *1. Modificaciones post-traduccionales de ZmCDKB*

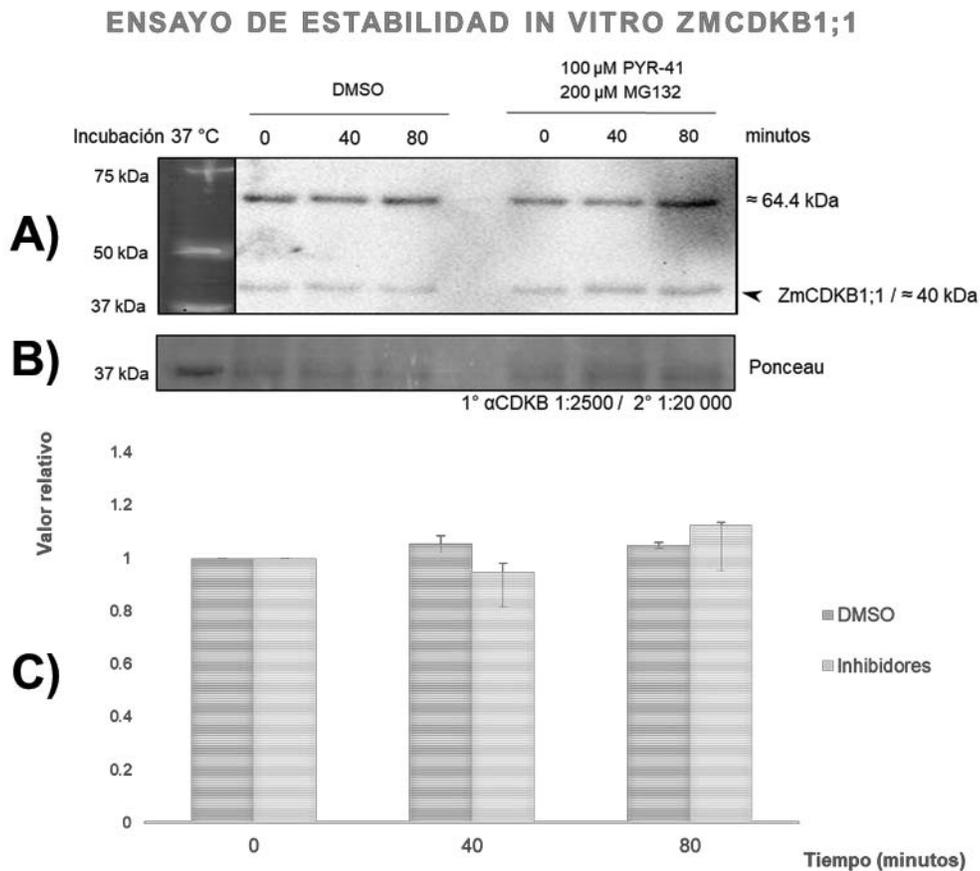
En plantas, se han reportado dos tipos de cinasas dependientes de ciclina: ZmCDKA y ZmCDKB. Las primeras, son homólogas a Cdk1 de mamíferos, sin embargo, CDKB es única de plantas.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de ZmCDKB1;1 de maíz sugiere que esta cinasa es una proteína con estabilidad alta, aunque posee secuencias que coinciden con los criterios mínimos de una caja PEST, por lo que también podría ser susceptible a ubiquitinarse.

En el 2013 Godínez-Palma reportó la presencia, a lo largo de la germinación en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz, de la cinasa ZmCDKB1;1 (Fig. 11).

La Figura 21 muestra que el nivel de la cinasa permanece constante en extractos proteicos totales de ejes embrionarios de 18 h de imbibición tratados con y sin inhibidores, tras una incubación por 80 minutos a 37°C.

Si consideramos que a las 18 horas de imbibición la mayoría de las células se encuentran en algún punto de la transición de la fase S a G2 y que ZmCDKB comienza a sintetizarse en este periodo, es de esperarse que la proteína permanezca constante puesto que su actividad es necesaria en este momento.

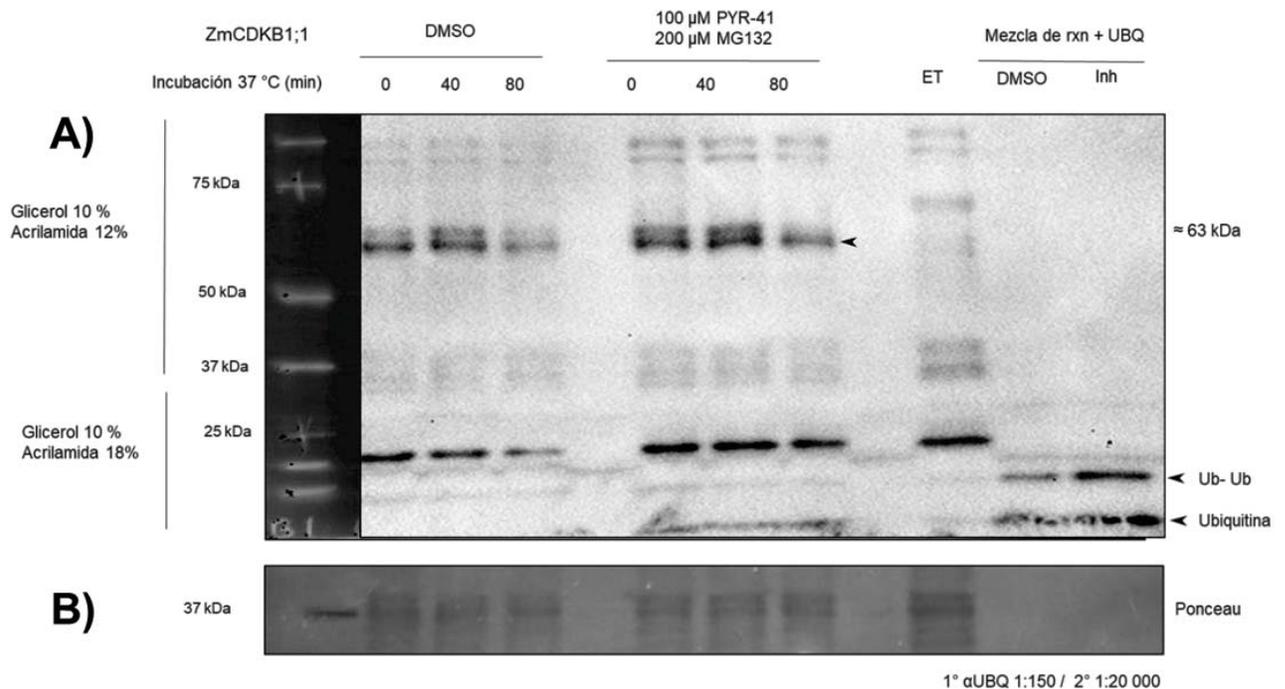


**Figura 21. Ensayo de estabilidad de ZmCDKB1;1 (≈36 kDa). A) Western blot revelado con α-CDKB. Se observa que la cantidad de ZmCDKB1;1 no cambió tras 80 minutos de incubación con o sin inhibidores, además, fue**

**posible detectar otra banda alrededor de los 60 kDa que sugiere la presencia de la cinasa modificada post-traduccionalmente. Extracto proteico obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 18 horas. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau. C) Cuantificación de la abundancia de ZmCDKB1;1. La proteína recombinante ZmCDKB1;1 fue donada por Mingyar Neftalí López Hernández.**

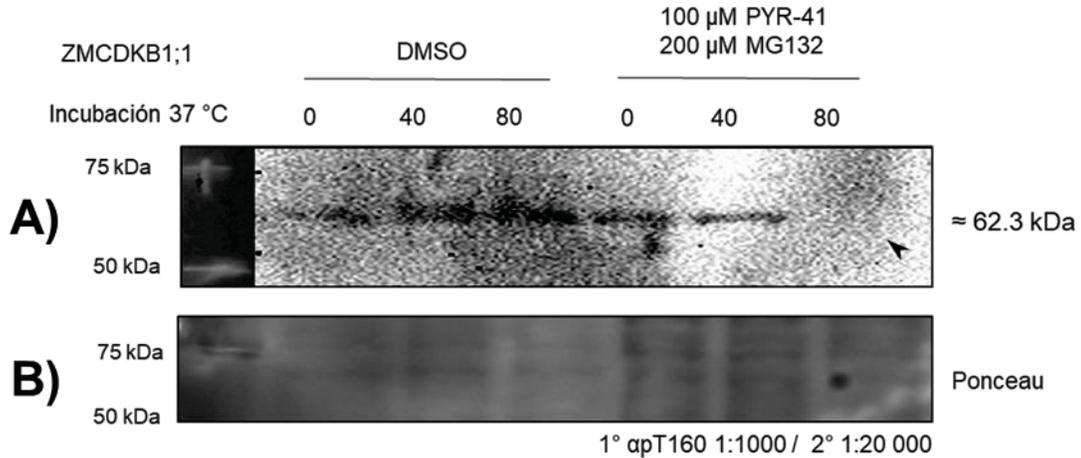
Para estudiar las ubiquitinaciones de la cinasa ZmCDKB1;1 y poder resolver los marcadores por debajo de 25 kDa se utilizaron geles con 10% de glicerol y gradiente discontinuo, en la parte inferior se polimerizó un gel de 18% de acrilamida mientras que en la parte superior se polimerizó el gel de 12% de acrilamida y se repitió el experimento mostrado en la Figura 21. Esta membrana fue revelada con el anticuerpo anti-UBQ. Como se observa en la Figura 22, los marcadores que están por debajo de 25 kDa se resolvieron bien y puede distinguirse la banda de 8 kDa que corresponde al monómero de ubiquitina.

Además, se agregaron como control ET de 18 horas dos veces más concentrado que el experimento para acentuar el reconocimiento de las proteínas nativas, así como la mezcla de reacción con y sin inhibidores, menos ET y la proteína recombinante, Figura 22.



**Figura 22. Ensayo de ubiquitinación de ZmCDKB1;1. A) En el Western blot revelado con  $\alpha$ -Ubiquitina se observa que ZmCDKB1;1 puede ubiquitinarse con o sin inhibidores en el medio, mostrando una banda alrededor de 60 kDa ausente en el extracto total y que concuerda con el tamaño de la segunda banda reconocida al revelar la membrana con anti-ZmCDKB1;1. Extracto proteico obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 18 horas. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau.**

Otras de las modificaciones post-traduccionales a la que es susceptible la CDKB es la fosforilación. Al realizar un Western blot con el anticuerpo que detecta la fosforilación en Thr-160 (Figura 23), se observa que esta modificación se mantuvo en la muestra tratada únicamente con DMSO, mientras que dicha fosforilación desaparece tras 80 minutos de incubación a 37°C en presencia de inhibidores, sugiriendo que existe un mecanismo independiente del proteasoma que parece ser incluso estimulado por este. Es posible que en condiciones control (DMSO) la fosfatasa y/o proteínas relacionadas con la desfosforilación son degradadas mientras que al inhibir el proteasoma las proteínas involucradas en la remoción del fosfato se estabilizan.



**Figura 23. Fosforilación en treonina 160 (activadora) de ZmCDKB1;1** A) Western blot revelado con  $\alpha$ -T160. Se utilizaron extractos totales de ejes embrionarios embebidos durante 18 horas y proteína recombinante ZmCDKB1;1: se trataron con DMSO (izquierda) o inhibidores (derecha) e incubados a 37°C durante 40 y 80 minutos. La pT160 de ZmCDKB1;1 disminuye únicamente al incubar la muestra con inhibidores durante 80 minutos. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau.

Estos resultados se obtuvieron al realizar los ensayos de estabilidad con la maquinaria proteica contenida en extractos totales de eje embrionario de maíz de 18 horas de imbibición, tiempo en el que se ha observado un aumento en el nivel de dicha cinasa (Figura 4, Godínez-Palma *et al.* 2013) y en el que se cree es importante la actividad de dicha cinasa. Por lo cual es congruente que dicha cinasa no sea degradada en este tiempo y que su fosforilación activadora tampoco sea removida.

Una de las preguntas que aún no se ha podido contestar en plantas, está relacionada con la fosfatasa responsable de remover las fosforilaciones en la T14 y Y15, cuya análoga funcional en mamíferos se ha identificado como CDC25. El ensayo aquí estandarizado podría adecuarse para caracterizar dicha fosfatasa.

- La cinasa ZmCDKB1;1-His permanece constante en ET de ejes embebidos por 18 horas, confirmando que la degradación de las proteínas estudiadas depende del momento del ciclo celular en que se

encuentren las células. Esta es ubiquitinada en ET de 18 horas. Su estabilidad no se ve afectada por esta ubiquitinación, sugiriendo nuevos niveles de regulación para esta cinasa. Finalmente, la fosforilación en la T160 pareciera estar regulada por un mecanismo inverso al proteasoma, posiblemente por la estabilización de las proteínas que participan en el proceso.

#### J. Modificaciones post-traduccionales de ZmCDKA

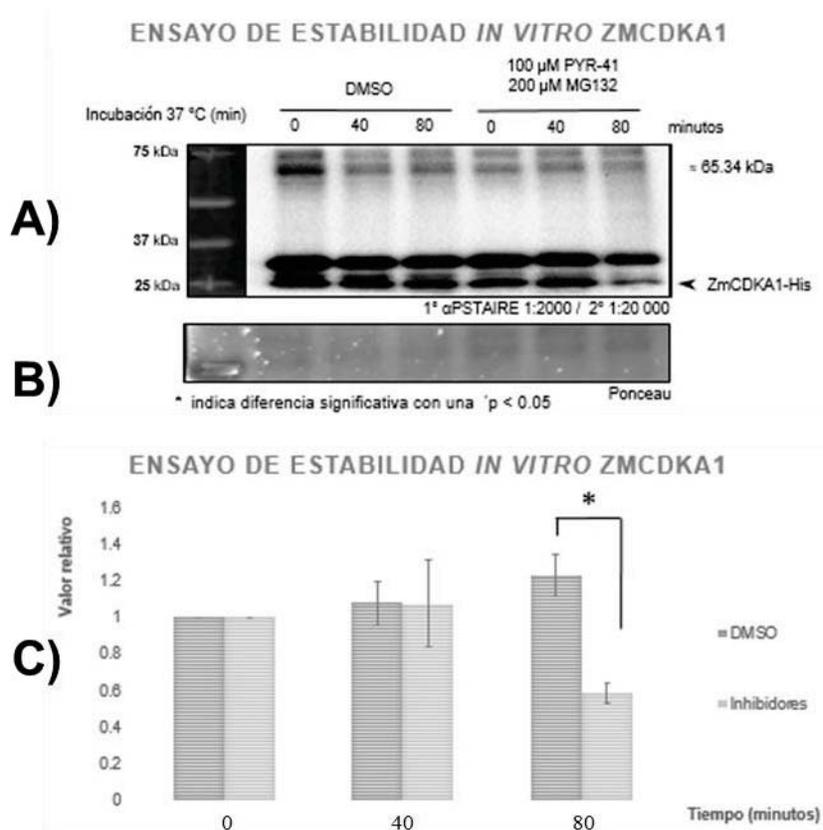
El análisis *in silico* en búsqueda de sitios putativos de ubiquitinación sobre la secuencia de aminoácidos de ZmCDKA1 no se encontraron cajas canónicas de ubiquitinación, de acuerdo con los criterios que se describen en la metodología. Además, no existen reportes de ubiquitinación y/o degradación de CDKA1 de plantas. Por ello, se planteó el utilizar a esta proteína como un control negativo de degradación vía proteasoma y ubiquitinación.

La sobreexpresión y purificación de la proteína fue monitoreada como se muestra en el Anexo 5, Figura vii.

Una vez purificada la proteína recombinante se llevó a cabo el ensayo de estabilidad *in vitro* con extractos totales de ejes embrionarios germinados por 18 horas. Reportes previos del grupo muestran que, en ejes embrionarios germinados por 18 horas, el nivel de proteína ZmCDKA1 permanece constante, y que además, está asociada a diferentes ciclinas D y es activa (Garza-Aguilar et al., 2017; Godínez-Palma et al., 2013).

Considerando lo anterior, se esperaría que la proteína ZmCDKA1-His fuera estable a las 18 horas de germinación y que no tuviera moléculas de ubiquitina conjugadas.

De manera inesperada, el nivel de la cinasa ZmCDKA1-His disminuyó al incubar la proteína recombinante con los inhibidores junto con el extracto proteico de ejes embrionarios de 18 horas de imbibición, como se muestra en la Figura 24.



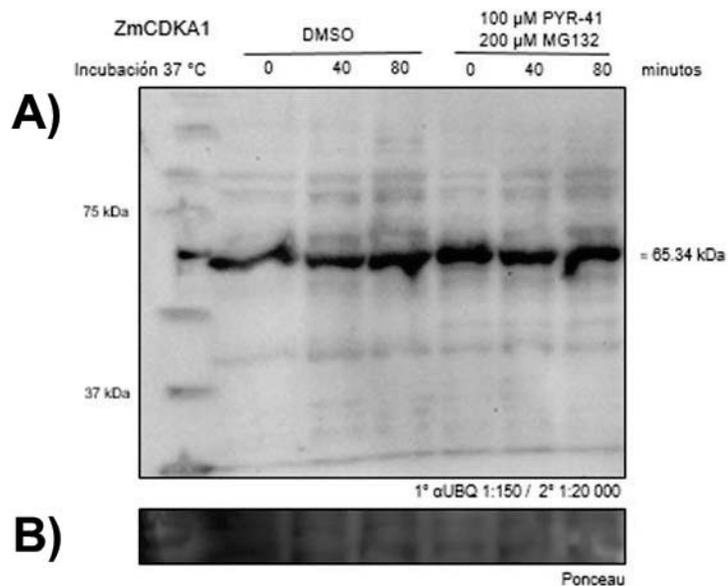
**Figura 24. Ensayo de estabilidad de ZmCDKA1-His ( $\approx$ 34 kDa). A) Western blot revelado con  $\alpha$ -CDKA para monitoreo de ZmCDKA1. En los carriles que corresponden a ZmCDKA1-His incubada con DMSO, el nivel de proteína no cambia. Al incubar ZmCDKA1-His durante 80 minutos con inhibidores se observa disminución (aproximadamente el 40% a los 80 min) de la proteína comparada con el control. Además, se observan dos bandas cuya masa molecular oscila entre los 65 y 75 kDa, que podrían corresponder a la cinasa modificada post- traduccionalmente. Extracto proteico obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 18 horas. B) Cuantificación de la abundancia de ZmCDKA1. \*Indica diferencia significativa con una  $*p < 0.05$ . n=3**

Con el ensayo de estabilidad *in vitro* de la ZmCDKA1 se pudo vislumbrar un panorama que no había sido considerado en nuestro grupo de investigación. La ZmCDKA1 de maíz puede ser degradada, y además, dicha degradación ocurre por un mecanismo que se acentúa al inhibir el proteasoma 26S, quizá al estabilizar proteínas necesarias para la destrucción de esta cinasa cuyo mecanismo de proteólisis en plantas aún no ha sido explorado, Figura 25.

Además, se observó el reconocimiento de dos bandas de alta masa molecular, lo que hizo preguntarnos si sería posible que la cinasa estuviera ubiquitinada.

### K. Detección de ubiquitinaciones en ZmCDKA1.

Al realizar un Western blot con las muestras del ensayo de estabilidad de la ZmCDKA1 con el anticuerpo anti-ubiquitina, se encontró una banda inmunoreactiva (Figura 25).



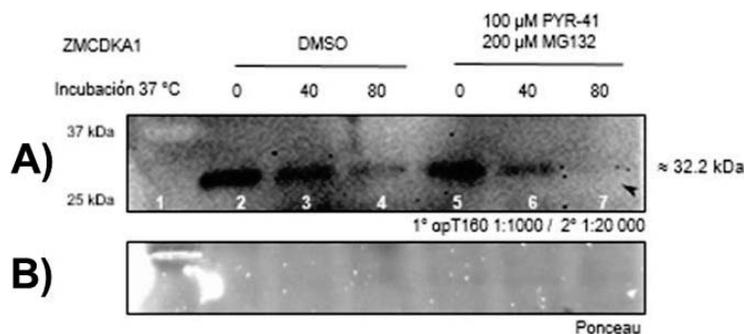
**Figura 25. Ensayo de ubiquitinación de ZmCDKA1. A) Western blot revelado con  $\alpha$ -Ubiquitina. Se observa que ZmCDKA1-His puede ubiquitinarse en presencia o no de inhibidores del proteasoma en el medio. Extracto proteico obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 18 horas. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau.**

Cabe resaltar que los programas computacionales para detectar ubiquitinaciones se basan en evidencia experimental combinada con análisis estadísticos, por lo que los resultados pueden generar falsos negativos, debido a la falta de información experimental disponible sobre la ubiquitinación de CDKs. Sin embargo, la presencia de posibles secuencias PEST en la cinasa sugiere la existencia en la cinasa de un ambiente adecuado para que dicha modificación suceda, Figura 14.

L. Detección de fosforilación en la treonina 160 de la ZmCDKA1.

Para detectar algunas de las fosforilaciones presentes en ZmCDKA1, se cuenta con un anticuerpo que reconoce de manera específica la fosforilación en la treonina 160 (T160) de la cinasa. Dicha fosforilación es requerida para activar a ZmCDKA1.

En el 2013, Godínez-Palma reportó la fosforilación en la treonina 160 (T160) de la ZmCDKA1, cuando la cinasa es enriquecida por medio de inmunoprecipitados que purifican a la ZmCDKA1 a partir de extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 18 horas. Por lo anterior, decidimos analizar la fosforilación en T160 de ZmCDKA1-His en las mismas condiciones del ensayo de estabilidad con el anticuerpo que detecta la fosforilación en la T160. Dicho ensayo se muestra en la Figura 26. En él se observa que la fosforilación disminuye conforme aumenta el tiempo de incubación en los ensayos de estabilidad, sin embargo, la disminución es más drástica en la muestra tratada con inhibidores y desaparece por completo transcurridos 80 minutos de incubación, carril 7, posiblemente debido a la estabilización de la fosfatasa que remueve dicha modificación.



**Figura 26. Fosforilación en la treonina 160 (activadora). A) Western blot revelado con  $\alpha$ -pT160. ZmCDKA1 incubada con extractos totales de ejes embrionarios embebidos durante 18 h, tratados con DMSO, carriles 2, 3 y 4 o inhibidores, carriles 5, 6 y 7; Incubados a 37°C durante 40 y 80 minutos. La pT160 de ZmCDKA1-His disminuye en ambos casos. Desaparece al incubar la muestra con inhibidores durante 80 minutos, carril 7. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau.**

El resultado de la Figura 24 sugiere la posibilidad de que la cinasa sea degradada por algún mecanismo inverso al proteasoma en extractos de 18 h. Para ampliar el estudio se ensayó la estabilidad de ZmCDKA1 en diferentes fases del ciclo celular, Figura 27.

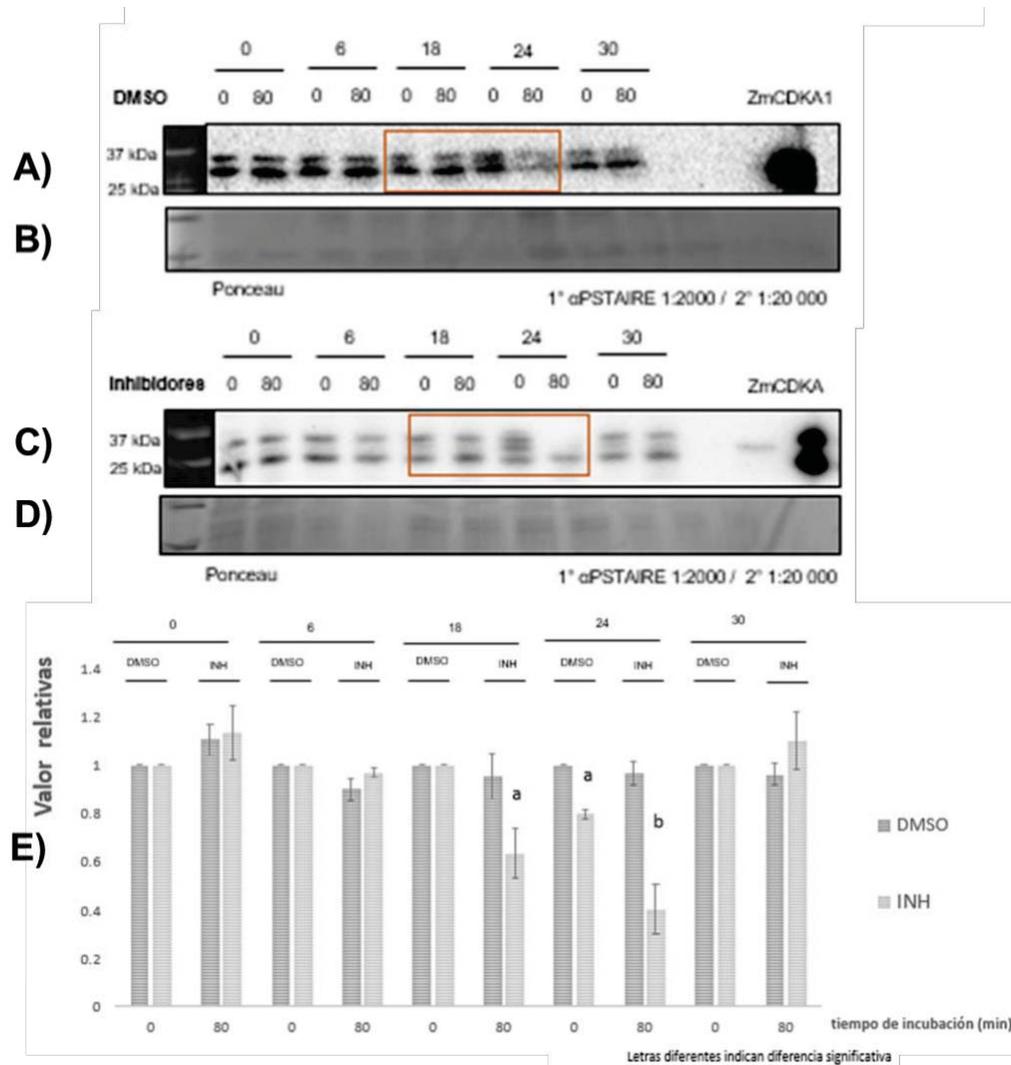
En la introducción se mencionó que, en maíz, la mayoría de las células se encuentran en G1 en la semilla seca, a las seis horas está sucediendo la transición entre G1 y S, a las 18 h se espera que la mayoría de las células hayan entrado en fase de síntesis (S), a las 24 h está sucediendo la transición de G2 a M y a las 30 h la mayoría de las células se encontrarían en algún momento de la mitosis (Baíza et al., 1989; Herrera et al., 2000).

#### M. Degradación diferencial in vitro de la cinasa ZmCDKA1.

En la Figura 27E se muestra la gráfica de estabilidad de la cinasa ZmCDKA-His, empleando extractos totales que representan a células en diferentes fases del ciclo celular. La cinasa se mantuvo constante en aquellas fases en las que se ha descrito una destacada participación de los complejos CKDA-CYC, figuras 4 y 10.

CDKA1 se desestabilizó en aquellos tiempos en que se ha sugerido una actividad preponderante de la cinasa tipo B, en el caso de maíz en germinación, 18 y 24 h (transición entre las fases S y G2).

La degradación observada fue significativa a las 18 y 24 h (recuadro en rojo) en aquellos tratamientos en los que el proteasoma fue inhibido (Figura 27C); a las 24 h, además, se observó disminución de ZmCDKA-His en ausencia de los inhibidores (DMSO, Figura 27A). Se requerirían más investigación para poder elucidar el mecanismo de degradación de esta cinasa.



**Figura 27. Degradación diferencial in vitro de la cinasa ZmCDKA1-His. A)** Western blot revelado con  $\alpha$ -PSTAIRE. Se realizó el ensayo de estabilidad *in vitro* en extractos obtenidos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 6, 18 24 y 30 horas, empleando extracto de ejes embrionarios de maíz de 24 horas como control positivo y un exceso de proteína recombinante con la mezcla de reacción sin y C) con inhibidores. B) y D) Membranas teñidas con Rojo de Ponceau. E) Cuantificación de CDKA.

Profundizando en este aspecto el Western blot de la Figura 27A se observó evidencia que sugiere la presencia de alguna modificación de esta proteína, en particular al añadir inhibidores del proteasoma en los extractos totales incubados.

En la Figura 27A y 27C se observa el comportamiento de la proteína recombinante ZmCDKA-His al mezclarse con ET de diferentes etapas de germinación: 0, 6, 18, 24 y 30h, carriles 2 al 11.

En el carril 12 de ambos experimentos (con y sin inhibidores) se cargó ET de 24 horas en la misma concentración que el experimento y en el carril 13 se agregó proteína recombinante en exceso (aproximadamente 1 ug), (ATP+ PKC+ PC+ UBQ), con y sin inhibidores.

En la introducción ya se había mencionado que estas reacciones son espontáneas, dado el caso de que se encuentren en las condiciones adecuadas para llevarse a cabo (Figuras 6, 7 y 8).

Para comprobar que la proteína recombinante puede ser ubiquitinada rápidamente, mediante mecanismos químicos, se incluyó una reacción en la que se incubó por un minuto ATP, PKC, PC, UBQ y la proteína recombinante en presencia (a) y ausencia (b) de inhibidores, carril 13, como ya se mencionó.

Se observa que los inhibidores, mismos que pueden estabilizar las ubiquitinaciones, parecen favorecer el estado modificado de la CDKA en uno o múltiples sitios, es probable que la banda alrededor de los 37 kDa se deba a algún estado de fosforilación de la proteína, mientras que la banda de tamaño superior detectada por el anticuerpo anti-PSTAIRE de manera más evidente corresponde con la banda que detecta el anticuerpo anti-ubiquitina (aproximadamente 66 kDa, Figura 27).

- La evidencia presentada sugiere la ubiquitinación de la cinasa ZmCDKA-His, lo que implicaría niveles de regulación adicionales de la cinasa no reportados anteriormente. Mecanismos de regulación mediados por ubiquitinas tienen el potencial de afectar la localización y la unión con ciertas proteínas.

- La fosforilación de la treonina 160 fue detectada en los tratamientos iniciales del ensayo de estabilidad. Sin embargo, el reconocimiento de la treonina fosforilada disminuye conforme aumenta el tiempo de incubación en ET, siendo más evidente la remoción de la fosforilación en la T160 cuando el proteasoma es inhibido, lo que podría significar estabilización de alguna fosfatasa involucrada, misma que aún no ha sido descrita en plantas.
- El nivel de la cinasa ZmCDKA-His, disminuye significativamente al ser incubada por 80 minutos en ET de 18 y 24 h, en presencia de inhibidores del proteasoma. Esto pudiera deberse a la estabilización de otra proteína que participa en el (aún no descrito) mecanismo de degradación de la cinasa.
- El nivel de ZmCDKA-His disminuye significativamente en ET de 24 horas, aún en ausencia de inhibidores.
- La ubiquitinación de las cinasas puede darse de manera espontánea en presencia de ubiquitina en exceso y suficiencia de ATP.

## VII. Análisis de resultados

El ciclo celular es un proceso altamente conservado que presenta múltiples mecanismos de control, los que van desde la expresión génica vía factores transcripcionales, transcripción y traducción de proteínas, estabilidad de éstas, interacción de diferentes actores, modificaciones post-traduccionales, etc.

A su vez, estos mecanismos de control responden a factores extrínsecos e intrínsecos tales como el medio ambiente (luz, disponibilidad de agua o temperatura) o factores nutricionales u hormonales.

El mismo progreso del ciclo celular genera señales que controlan, de manera ordenada y temporal, la acción de sus componentes.

La germinación es un proceso crucial en la vida de una planta. Una germinación exitosa depende de que el ciclo celular se logre completar, partiendo de células detenidas en la fase G1 en la semilla seca (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003) que activan mecanismos de reparación en los primeros tiempos de la imbibición, llevando a cabo de manera total y sin errores la replicación del material genético (fase S), reparando éste en caso de que se presenten errores, preparando a la célula para su división (Fase G2) y separando a las células hijas, repartiendo el material genético de manera equitativa (M).

Al inicio de la imbibición las células reparan las membranas dañadas en la desecación e inicia la síntesis de las proteínas en G1 que participarán en la fase S, para poder replicar el material genético. Entre las proteínas que regulan este proceso se encuentran la familia de las Ciclinas tipo D, con 17 representantes en maíz (Buendía-Monreal et al., 2011), y las CDKAs y Bs (con 3 y 2 miembros, respetivamente) (Xiao et al., 2021).

Como se mencionó arriba, son diferentes mecanismos de regulación los que dirigen la progresión y uni-direccionalidad del ciclo celular. Entre estos se encuentran las MPT, las que permiten a la célula un control inmediato sobre

la actividad de cinasa de los complejos Ciclina D/CDKs, por ejemplo, ya que las CDKs pueden ser fosforiladas positiva o negativamente, o pueden tener un efecto sobre la estabilidad de algunas proteínas, al producirse modificaciones covalentes mediante ubiquitinaciones que las puede marcar para su degradación.

En este trabajo se analizaron dos tipos de modificaciones postraduccionales: una fosforilación activadora sobre dos CDKs (A y B, T-160) y ubiquitinaciones sobre estas mismas proteínas, además de ubiquitinaciones sobre dos ciclinas, una participante de la fase G1 (Ciclina D2;2) y otra cuya función es preponderante en la fase G2 (Ciclina B1;2).

### CycD2;2

El trabajo con la Ciclina D2;2a (Dante et al., 2014) sirvió como modelo para establecer la metodología de análisis de MPT sobre proteína recombinante, empleando la maquinaria celular del eje embrionario de maíz. Para ello, se suplementó el extracto proteico con creatinina, fosfocreatina cinasa, ATP y ubiquitina, para proveer suficiencia de estos metabolitos y actividad enzimática y promover la libre ubiquitinación dado el caso que se encontrasen las E3 ligasas específicas para las proteínas de interés en dicho extracto. Esta metodología se adecuó del trabajo reportado por Dante y colaboradores (2014) en el que se analiza la estabilidad de diferentes ciclinas. Además, se utilizó MG132 y Pyr-41 como inhibidores de la maquinaria de ubiquitinación.

Anteriormente se reportó que la Ciclina D2;2 presenta un patrón de acumulación en ejes embrionarios de maíz hacia las 6 h post-imbibición, para caer su nivel hacia las 24 h (Gutiérrez et al., 2005), apoyando la idea de que la función de esta ciclina se centra en la fase G1 del ciclo celular. Dado que a las 24 h cae su nivel, se realizó el análisis unas horas previas a la caída, a las 18 h, encontrando que efectivamente, la estabilidad de la CycD2;2 recombinante se ve comprometida al incubarse en el extracto proteico pero que, al incluir a este los inhibidores del proteasoma se mantiene su nivel

(Figura 16) sugiriendo que la degradación de esta ciclina depende del proteasoma además de una E3 presente en eje embrionario de maíz a las 18 h de imbibición. Los resultados indican el potencial de ubiquitinación de esta proteína, ya que al analizar la presencia de proteína ubiquitinada se encontraron bandas superiores a la masa estimada de la proteína recombinante en tamaños discretos que pueden corresponder a mono y di-ubiquitinaciones, mismas que se observan con mayor intensidad en el tratamiento que incluye a los inhibidores (Figura 17). Estos resultados concuerdan con los reportados por Dante y colaboradores (2014), quienes sugiere que la estabilidad de la CycD2;2 es dependiente del proteasoma y del estadio de desarrollo celular por el que la célula atraviese, siendo que es susceptible de ser degradada en células en proliferación pero no en endoreduplicación.

Así, la contribución de la CycD2;2 en el ciclo celular es temprana, correspondiente a la fase G1/S (Gutiérrez et al., 2005) en maíz durante la germinación, y su degradación hacia la fase S (18 h) sería una condicionante para permitir que el ciclo celular progresara de S a G2/M (24 h), misma que probablemente depende del proteasoma.

### CycB1;2

La otra ciclina analizada en este trabajo fue la B1;2, cuyo papel principal se lleva a cabo en las fases G2 y M en maíz (Ayub-Miranda, 2015). El estudio de esta proteína se extendió desde las 6 h de imbibición y hasta las 24 h, ya que se contaba con menos información acerca de esta ciclina en nuestro modelo. En la germinación, esta proteína presenta un nivel bajo al inicio, para ir aumentando hacia las 18 - 24 h. El análisis de la estabilidad de proteína recombinante frente al extracto proteico suplementado mostró que sólo a las 6 hr se encontraría presente la E3 ligasa responsable de su reconocimiento específico para ser degradada por el proteasoma, ya que a este tiempo se observa desaparición de la banda correspondiente a CycB1;2 en ausencia de MG132 y Pyr-41, pero en presencia de los inhibidores se conserva el nivel

de la proteína (Figura 20). Por otro lado, al analizar la presencia de ubiquitinaciones se logran apreciar bandas nítidas de mayor tamaño molecular que sugieren la presencia de un alto número de unidades de ubiquitina añadidos a CycB1;2 cuya masa sugiere, pueden ser desde 3 hasta 12 unidades de ubiquitina, a diferencia de la CycD2;2 cuyo Western blot indica una o dos ubiquitinas añadidas. Las bandas de alta masa reveladas por el anticuerpo anti-ubiquitina en el ensayo de estabilidad de la proteína recombinante CycB1;2 son particularmente evidentes en extractos de 6 h y con menor intensidad en extractos de 24 h. Por otro lado, en aquellos tratamientos en los que se incluyen los inhibidores del proteasoma la intensidad de las bandas aumenta, sugiriendo estabilización de la proteína poli-ubiquitinada (Figura 221). Con este ensayo no se puede saber si la ubiquitina se liga a la CycB1;2 como monómero en múltiples sitios o en uno sólo en una cadena de poli-ubiquitinas.

Alrededor de los 80-90s se reportó que las Ciclinas mitóticas se degradan vía ubiquitina-proteasoma (APC), y que la degradación de estas proteínas era un requisito para que la célula pudiera salir de la mitosis (Glotzer et al., 1991), dando paso a una nueva ronda de ciclo celular. Posteriormente se nombró a estas ciclinas mitóticas como Ciclinas tipo B y se analizó a detalle el mecanismo de ubiquitinación-degradación, además del complejo de proteínas que participan en el proteasoma.

Durante la mitosis es necesario que Cdc20 se una al APC, para formar el complejo APC<sup>Cdc20</sup>, este complejo participa en la degradación de proteínas encargadas de verificar que el ensamble del huso mitótico se lleve a cabo sin errores, sin la degradación de esas proteínas los cromosomas no se separan y las células entran en ciclos endoreduplicativos (Cohen-Fix et al., 1996; Zur & Brandeis, 2001).

Por otro lado, durante la mitosis tardía y en G1 Cdh1 se une al APC formando el complejo APC<sup>Cdh1</sup>, responsable de la ubiquitinación de las proteínas que regulan esas fases (Pfleger & Kirschner, 2000).

La presencia de alguno de estos motivos en las proteínas hace factible su reconocimiento por el complejo APC<sup>Cdc20/Cdh1</sup> y por lo tanto su regulación mediada por ubiquitinación.

El análisis bio informático (Figura 14) mostró que la CycB1;2 presenta 5 cajas putativas PEST y una caja Ken, lo que sugiere una alta probabilidad de que la ubiquitinación de esta proteína sea sobre uno o más de estos estos sitios, lo que explicaría el hecho de que se observe el alto número de unidades de ubiquitina.

En conclusión, este trabajo sugiere de manera indirecta que las E3 ligasas que presentan a la Cyc B1;2 para su degradación en ejes embrionarios durante la germinación son abundantes a las 6 h de imbibición, momento en que las células transitan en G1 y probablemente S muy temprana, por lo que esta ciclina no es necesaria y debe ser eliminada, Por otra parte, esta E3 ligasa no estaría presente en momentos posteriores de imbibición ya que las células se empiezan a preparar para transitar por S tardía G2 y posteriormente M, por lo que sería importante que la CycB1;2 sintetizada *de novo* no sea degradada hasta que concluya esa ronda de ciclo celular. Sería interesante prolongar el estudio de estabilidad de esta ciclina hasta las 36 y 48 h. Es este último momento se estima que la mayoría de las células ya han concluido M, por lo que la CycB1;2 debería ser inestable en esos momentos de imbibición.

#### CDKB1;1

Uno de los ejemplos más representativos del efecto de las MPT, se encuentra en las diferentes CDKs, quienes requieren de la unión con ciclinas para llevar a cabo su actividad, además de modificaciones post-traduccionales, mismas que pueden ser activadoras o inhibidoras, como ya se mencionó.

Estudios previos en los que se analiza esta proteína en maíz durante la germinación han indicado que su nivel se mantiene constante (Godínez-Palma et al., 2013), sin embargo, estos estudios no son los suficientemente

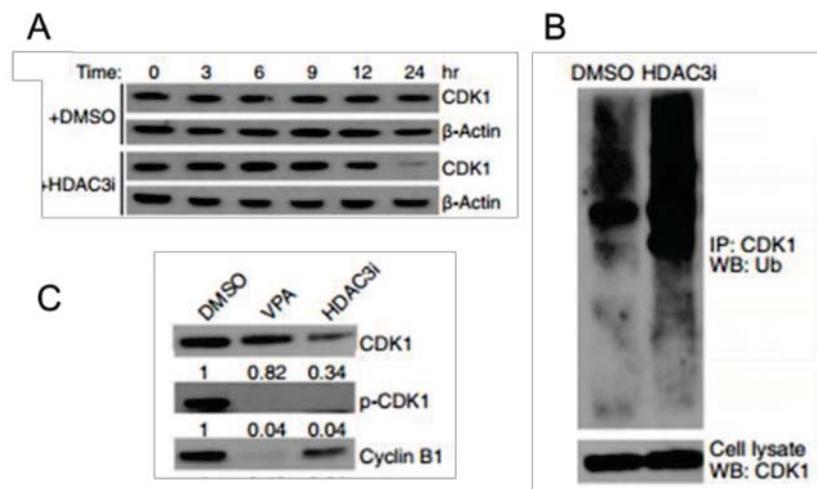
finos como para diferenciar entre las dos CDKBs en esta planta, ya que presentan una gran homología, y por lo tanto si una de las dos CDKB sufre alteraciones en sus niveles estos podrían ser compensados por la otra CDKB. Así, el estudio sobre la estabilidad y MPT de CDKB1;1 representa una descripción más fina y detallada con respecto a estudios anteriores.

El tiempo de imbibición inicial para el estudio de estabilidad de CDKB1;1 mediante el sistema descrito fue de 18 h ya que, como se mencionó, se esperaba que al ser una cinasa importante en el control de G2 y M su síntesis iniciara alrededor de ese tiempo y por lo tanto sería estable, como se confirmó al realizar el experimento (Figura 21). En la membrana en que se revela a la proteína recombinante CDKB1;1 (40 kDa) con el anticuerpo que la reconoce específicamente se logra apreciar además una banda con un tamaño aproximado de 64 kDa. Una banda similar se observa en una membrana paralela revelada con el anticuerpo que reconoce a ubiquitina (Figura 22). Dicha banda es ligeramente más evidente en el tratamiento con los inhibidores del proteasoma.

No existen reportes en plantas que relacionen ZmCDKs con ubiquitinaciones, sin embargo, en 2014, Jiang y Hsieh (Jiang & Hsieh, 2014) publicaron un artículo en el que remarcan la importancia de HDAC3 en el control de la progresión de la fase G2/M, en células HCN (células neuronales del córtex), principalmente a través de la estabilización post-traducciona l de CDK1 (homóloga a CDKA de plantas). En dicho estudio muestran que al inhibir HDAC3, utilizando HDAC3i o VPA (ácido valpróico, inhibidor de HDAC) la cantidad de CDK1 disminuye en aquellos tratamientos en que se utilizó VPA o HDAC3i; al inmunoprecipitar a CDK1 de lisados tratados con DMSO o HDAC3i y realizar un Western blot revelado con anti ubiquitina, la CDK1 es ubiquitinada en ambos casos pero la señal de ubiquitina es mayor en el tratamiento con HDAC3i. Además, estudiaron los niveles de p-CDK1 en los diferentes tratamientos, concluyendo que la fosforilación de p-CDK1 es

removida en las células que fueron tratadas con HDAC3i por un día, Figura 28.

Como ya se mencionó, no se ha descrito la ubiquitinación de CDKs en plantas. Es por ello, que se desconoce la función de esta MPT sobre CDKs, lo que abre la posibilidad de iniciar una nueva línea de análisis. Faltaría explorar si este fenómeno se mantiene a lo largo de la germinación. Un papel adicional de las ubiquitinaciones, además del que juegan en la degradación, es el marcar a las proteínas para la regulación de la localización celular y otros procesos, como se mencionó antes. Dada la naturaleza estable de esta CDKB, es posible que la ubiquitinación juegue un papel en su localización o aún más, en la interacción con otras proteínas.



**Figura 28.** La proteína CDK1, se desestabiliza después de la inhibición de HDAC3. (A) Western blot contra CDK1 en células HCN tratadas con DMSO o HDAC3i y cicloheximida para inhibir la síntesis *de novo* de la proteína, por diferentes intervalos de tiempo. (B) Inmunoprecipitación de CDK1 y Western blot contra ubiquitina en células HCN tratadas con DMSO o HDAC3i. (C) Niveles de CDK1 fosforilada en células tratadas con DMSO, VPA o HDAC3i. Modificada de Jiang & Hsieh, 2014.

En el sistema descrito antes también se analizó el potencial de fosforilación sobre la treonina 160 (T160) de CDKB1;1 recombinante por parte de la maquinaria celular del eje embrionario a las 18 h mediante la detección específica de esta MPT (Figura 23). El resultado fue inesperado, ya que se detectó con este anticuerpo, de manera evidente, una banda de alrededor de 63 kDa, correspondiente a la CDKB1;1 posiblemente poli-ubiquitinada, misma que se mantiene estable a lo largo del ensayo (hasta 80 min. de incubación) pero que desaparece en presencia de inhibidores del proteasoma al final del ensayo.

Este resultado lleva a la especulación de que es posible que exista en el eje embrionario en ese momento de imbibición una enzima tipo fosfatasa, capaz de remover la fosforilación T160 en CDKB1;1, cuya presencia es desestabilizada por el proteasoma, pero que, al ser inhibido este sistema de degradación, entonces se mantenga lo suficientemente estable como para de-fosforilar a CDKB1,1 en tan sólo 80 mins. de ensayo. Como se mencionó anteriormente, no se ha podido encontrar en plantas, por ensayos bioquímicos, moleculares o genéticos algún actor con esta actividad de fosfatasa sobre CDKs, por lo que este resultado es relevante. Faltaría analizar si este fenómeno se lleva a cabo en otros momentos de la germinación, y si es dependiente del avance del ciclo celular.

#### CDKA;1

De manera similar al análisis de la CDKB1;1, se ensayó la estabilidad de CDKA;1 recombinante en extractos de maíz embebidos por 18 h, en presencia o no de inhibidores del proteasoma. En un resultado totalmente inesperado, se encontró desaparición de la banda correspondiente a esta proteína al abatir la actividad del proteasoma tras 80 mins. de incubación (Figura 24). Este resultado contrasta con lo observado en otros estudios, pues se ha visto que esta proteína mantiene un nivel similar a lo largo de la germinación (Garza-Aguilar et al., 2017; Godínez-Palma et al., 2013), por lo que se asumía que CDKA;1 es una proteína estable. Con el fin de saber si

esta inestabilidad tenía relación con ubiquitinaciones, se analizó por Western blot la presencia de señal de ubiquitinación sobre la proteína recombinante (Figura 26). Este ensayo mostró una única banda, nítida, de alrededor de 65 kDa que se mantiene constante, aún en el tratamiento en que se ve que la CDKA disminuye, por lo tanto, si la proteína sin ubiquitinar es inestable la forma ubiquitinada sería estable. Dado que no hay información en la literatura que pueda sugerir la función de la ubiquitinación de esta proteína, lo que se infiere de este estudio es que: i) la degradación de CDKA;1 si ubiquitinación es inversamente dependiente del proteasoma, y ii) la especie ubiquitinada es estable e independiente de la acción del proteasoma.

Con respecto a la fosforilación activadora en T160 de esta proteína se observó, en un ensayo en las mismas condiciones mencionadas arriba, que CDKA;1 presenta esta fosforilación de manera importante al inicio del estudio, pero conforme pasa el tiempo de incubación cae para ser poco visible a los 80 mins. Este fenómeno fue más acentuado en presencia de MG132 y Pyr-41 (Figura 26), observado también para CDKB1;1.

Al extender es estudio a otras horas de germinación (Figura 27) se vuelve a observar este fenómeno, pero ahora más evidente a las 24 h de germinación, pero no así a las 0, 6 o 30 h, lo que sugiere que el control de la degradación de esta proteína es dependiente del avance del ciclo celular, siendo más susceptible a tiempos largos de imbibición hasta las 24 h. En la Figura 27 se observó la aparición de bandas a un mayor tamaño molecular, lo que sugiere la modificación post-traducciona l de esta proteína a lo largo de la germinación.

## VIII. Conclusiones

De manera general se encontró que las cuatro proteínas analizadas en este trabajo, CycD2;2, CycB1;2, CDKA1 y CDKB1;1 son susceptibles de modificarse postraduccionalmente en presencia de la maquinaria celular de ejes embrionarios de maíz en germinación. Las ciclinas presentaron mono o poli-ubiquitinaciones, mientras que las CDKs, además de ubiquitinaciones presentaron fosforilación positiva.

Las modificaciones post-traduccionales fueron dependientes del momento del ciclo celular en que se encontraban las células del eje embrionario, en correlación con el momento de la germinación de los ejes embrionarios.

## IX. Referencias

- Alberts, B., Dennis, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. (2014). *Molecular Biology of the cell* (G. Sciences (ed.); 6th ed.). Graland Sciences Inc. New York & London.
- Ayub-Miranda, M. F. (2015). *Caracterización de Ciclinas ZmCycB1;2 y ZmCycB2;1 en ejes embrionarios durante la germinación de maíz*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Baíza, A. M., Vázquez-Ramos, M., & Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *Journal of Plant Physiology*, 135(4), 416–421. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80097-5)
- Bays, N. W., Gardner, R. G., Seelig, L. P., Joazeiro, C. A., & Hampton, R. Y. (2001). Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nature Cell Biology*, 3(1), 24–29. <https://doi.org/10.1038/35050524>
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds Physiology of development, germination and dormancy* (3rd ed.).
- Borg, N. A., & Dixit, V. M. (2017). Ubiquitin in cell-cycle regulation and dysregulation in cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 59–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-040716-075607>
- Buendía-Monreal, M., Rentería-Canett, I., Guerrero-Andrade, O., Bravo-Alberto, C. E., Martínez-Castilla, L. P., García, E., & Vázquez-Ramos, J. M. (2011). The family of maize D-type cyclins: Genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiologia Plantarum*, 143(3), 297–308. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01498.x>
- Burton, J. L., & Solomon, M. J. (2001). D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes and Development*, 15(18), 2381–2395. <https://doi.org/10.1101/gad.917901>
- Candela, H., & Hake, S. (2008). The art and design of genetic screens: Maize. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 192–203. <https://doi.org/10.1038/nrg2291>
- Cappadocia, L., & Lima, C. D. (2018). Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chemical Reviews*, 118(3), 889–918. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00737>
- Castro, R. D. de (Renato D. de). (1998). *A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds*.
- Coello, P., & Vazquez-Ramos, J. M. (1995). *Studies on the Processivity of Maize DNA Polymerase 2 , an a-Type Enzyme ' . 109(2), 645–650.*
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W., & Koshland, D. (1996). Anaphase initiation

in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes and Development*, 10(24), 3081–3093. <https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3081>

Colasanti, J., Tyers, M., & Sundaresan, V. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cdc2 homologue from *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), 3377–3381. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.8.3377>

Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., Shen, W. H., Dong, A., & Genschik, P. (2000). Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *Plant Journal*, 24(6), 763–773. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2000.00920.x>

Dante, R. A., Sabelli, P. A., Nguyen, H. N., Leiva-Neto, J. T., Tao, Y., Lowe, K. S., Hoerster, G. J., Gordon-Kamm, W. J., Jung, R., & Larkins, B. A. (2014). Cyclin-dependent kinase complexes in developing maize endosperm: evidence for differential expression and functional specialization. *Planta*, 239(2), 493–509. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1990-1>

De La Fuente Van Bentem, S., Anrather, D., Dohnal, I., Roitinger, E., Csaszar, E., Joore, J., Buijnk, J., Carreri, A., Forzani, C., Lorkovic, Z. J., Barta, A., Lecourieux, D., Verhounig, A., Jonak, C., & Hirt, H. (2008). Site-specific phosphorylation profiling of Arabidopsis proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis. *Journal of Proteome Research*, 7(6), 2458–2470. <https://doi.org/10.1021/pr8000173>

De Veylder, L., Beeckman, T., & Inzé, D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 655–665. <https://doi.org/10.1038/nrm2227>

Dudits, D., Cserhádi, M., Miskolczi, P., & Horváth, G. V. (2007). The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation. In : Inzé D (Ed.), *Cell Cycle Control and Plant Development* (1st ed., pp. 1–30).

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), 389–396. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90420-8)

Fisher, D. L., & Nurse, P. (1996). A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO Journal*, 15(4), 850–860. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00420.x>

Francis, D. (2011). A commentary on the G2/M transition of the plant cell cycle. *Annals of Botany*, 107(7), 1065–1070. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr055>

Gao, S., Gao, Y., Xiong, C., Yu, G., Chang, J., Yang, Q., Yang, C., & Ye, Z. (2017). The tomato B-type cyclin gene, SlCycB2, plays key roles in reproductive organ development, trichome initiation, terpenoids biosynthesis and *Prodenia litura* defense. *Plant Science*, 262(December 2016), 103–114.

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.05.006>

- Garza-Aguilar, S. M. (2018). *Modulación de los complejos CtcD3;1/CDKs por fitohormonas y sacarosa durante la germinación de maíz* [Facultad de Química, UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2018/enero/0769604/Index.html>
- 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). <https://doi.org/10.1111/pl.12537>
- Georgieva, E. I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G., & Loidl, P. (1993). Maize embryo germination. *Planta*, 192(1), 118–124. <https://doi.org/10.1007/bf00198701>
- Glotzer, M., Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349(6305), 132–138. <https://doi.org/10.1038/349132a0>
- Godínez-Palma, S. K., García, E., De La Paz Sánchez, M., 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert340>
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., & Vázquez-Ramos, J. M. (2005). Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant and Cell Physiology*, 46(1), 166–173. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci007>
- Hata, S., Kouchi, H., Suzuka, I., & Ishii, T. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO Journal*, 10(9), 2681–2688. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07811.x>
- Hemerly, A. S., Ferreira, P., De Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., & Inzé, D. (1993). Cdc2a Expression in Arabidopsis Is Linked With Competence for Cell Division. *Plant Cell*, 5(12), 1711–1723. <https://doi.org/10.2307/3869688>
- Herrera, I., De La Paz Sánchez, M., Molinab, J., Plasenciaa, J., & Vázquez-Ramosa, 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. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110117.x>
- Hoseney, R. Carl; González Alonso, M. (1991). *Principios de Ciencia y Tecnología de Los Cereales* (1991 Acibia, Editorial, S.A. (ed.)).
- Hunter, T. (2007). The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Molecular Cell*, 28(5), 730–738. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.019>
- Husnjak, K., & Dikic, I. (2012). Ubiquitin-binding proteins: Decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 291–322. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051810-094654>

- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, *408*(6811), 488–492. <https://doi.org/10.1038/35044114>
- Inagaki, S., & Umeda, M. (2011). Cell-Cycle Control and Plant Development. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 291). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386035-4.00007-0>
- Inzé, D. (2005). Green light for the cell cycle. *EMBO Journal*, *24*(4), 657–662. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600561>
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Review of Genetics*, *40*(1), 77–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>
- Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., & Renaudin, J. P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology*, *43*(5–6), 607–620. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0936-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0936-2_6)
- Kapuria, V., Peterson, L. F., Showalter, H. D. H., Kirchhoff, P. D., Talpaz, M., & Donato, N. J. (2011). Protein cross-linking as a novel mechanism of action of a ubiquitin-activating enzyme inhibitor with anti-tumor activity. *Biochemical Pharmacology*, *82*(4), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.012>
- Kisselev, A. F., & Goldberg, A. L. (2001). Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates. *Chemistry and Biology*, *8*(8), 739–758. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00056-4)
- La, H., Li, J., Ji, Z., Cheng, Y., Li, X., Jiang, S., Venkatesh, P. N., & Ramachandran, S. (2006). Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, *275*(4), 374–386. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-0093-5>
- Lange, S. M., Armstrong, L. A., & Kulathu, Y. (2022). Deubiquitinases: From mechanisms to their inhibition by small molecules. *Molecular Cell*, *82*(1), 15–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.10.027>
- Lara-Núñez, A., De Jesús, N., & Vázquez-Ramos, J. M. (2008). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum*, *132*(1), 79–88. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00995.x>
- Lara-Núñez, A., Romero-Sánchez, D. I., Axosco-Marín, J., Garza-Aguilar, S. M., Gómez-Martínez, A. E., Ayub-Miranda, M. F., Bravo-Alberto, C. E., Vázquez-Santana, S., & Vázquez-Ramos, J. M. (2021). Two cyclin Bs are differentially modulated by glucose and sucrose during maize germination. *Biochimie*, *182*, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.12.013>
- Lee, J., Das, A., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., & Umeda, M.

- (2003). Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *Plant Journal*, 34(4), 417–425. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01736.x>
- Lenburg, M. (1996). Signaling phosphate starvation. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(10), 383–387. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(96\)90127-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(96)90127-9)
- Liu, Z., Yuan, F., Ren, J., Cao, J., Zhou, Y., Yang, Q., & Xue, Y. (2012). GPS-ARM: Computational analysis of the APC/C recognition motif by predicting D-boxes and KEN-boxes. *PLoS ONE*, 7(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034370>
- Lohka, M. J., Hayes, M. K., & Maller, J. L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(9), 3009–3013. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.9.3009>
- López Hernández, M. N. L. H. (2018). *Regulación de la actividad de la cinasa CDKA1 de maíz* [UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2018/junio/0775119/Index.html>
- Majumdar, P., & Nath, U. (2020). De-ubiquitinases on the move: an emerging field in plant biology. *Plant Biology*, 22(4), 563–572. <https://doi.org/10.1111/plb.13118>
- Menges, M., Samland, A. K., Planchais, S., & Murray, J. A. H. (2006). The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(4), 893–906. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039636>
- Mews, M., Sek, F. J., Moore, R., Volkmann, D., Gunning, B. E. S., & John, P. C. L. (1997). Mitotic cyclin distribution during maize cell division: Implications for the sequence diversity and function of cyclins in plants. *Protoplasma*, 200(3–4), 128–145. <https://doi.org/10.1007/BF01283289>
- Mews, M., Sek, F. J., Volkmann, D., & John, P. C. L. (2000). Immunodetection of four mitotic cyclins and the Cdc2a protein kinase in the maize root: Their distribution in cell development and dedifferentiation. *Protoplasma*, 212(3–4), 236–249. <https://doi.org/10.1007/BF01282924>
- Michelle, C., Vourc'H, P., Mignon, L., & Andres, C. R. (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *Journal of Molecular Evolution*, 68(6), 616–628. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9225-6>
- Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J. V., Wu, M., & Hunt, T. (1989). The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *Journal of Cell Science*, 94(SUPPL. 12), 77–97. [https://doi.org/10.1242/jcs.1989.supplement\\_12.8](https://doi.org/10.1242/jcs.1989.supplement_12.8)
- Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle Principles of Control* (O. U. Press (ed.)).
- Nieuwland, J., Menges, M. M., & Murray, J. A. H. (2007). The plant cyclins. In Inzé D (Ed.), *Cell Cycle Control and Plant Development* (1st ed., pp. 31–61).

- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- Novak, B., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Chen, K., & Tyson, J. J. (1998). Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophysical Chemistry*, 72(1–2), 185–200. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(98\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(98)00133-1)
- Nugent, J. H. A., Alfa, C. E., Young, T., & Hyams, J. S. (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *Journal of Cell Science*, 99(3), 669–674. <https://doi.org/10.1242/jcs.99.3.669>
- Peter Doerner, Jorgensen, J.-E., You, R., Steppuhn, J., & Lamb, C. (1996). *Control of root growth and development*.
- Pfleger, C. M., & Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes and Development*, 14(6), 655–665. <https://doi.org/10.1101/gad.14.6.655>
- Pines, J., & Hunt, T. (1987). Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *The EMBO Journal*, 6(10), 2987–2995. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02604.x>
- Pines, J., & Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *Journal of Cell Biology*, 115(1), 1–17. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.1.1>
- Pines, J., Jackman, M., & Simpson, K. (1998). Assays for CDK Activity and DNA Replication in the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology*, 00(1), 8.2.1-8.2.11. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0802s00>
- Piperno, D. R., Ranere, A. J., Holst, I., Iriarte, J., & Dickau, R. (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), 5019–5024. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812525106>
- Planchais, S., Samland, A. K., & Murray, J. A. H. (2004). Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant Journal*, 38(4), 616–625. <https://doi.org/10.1111/j.0960-7412.2004.02071.x>
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J. P., Segers, G., De Veylder, L., De Pinho Barrôco, R., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., & Mironov, V. (2001). A Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Is Involved in the Control of G2/M Progression in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36354–36360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011060200>
- Qin, L. X., Perennes, C., Richard, L., Bouvier-Durand, M., Tréhin, C., Inzé, D., & Bergounioux, C. (1996). G2-and early-M-specific expression of the NTCYC1 cyclin gene in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Molecular Biology*, 32(6), 1093–1101.

<https://doi.org/10.1007/bf00041393>

- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemistry Science*, 21(7), 267–271.
- Renaudin, J. P., Doonan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrell, D. A., Sundaresan, V., & Murray, J. A. H. (1996). Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology*, 32(6), 1003–1018. <https://doi.org/10.1007/BF00041384>
- Sánchez, M. D. L. P., Torres, A., Boniotti, M. B., Gutierrez, C., & Vázquez-Ramos, J. M. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biology*, 50(2), 167–175. <https://doi.org/10.1023/A:1016029001537>
- Schnittger, A., & De Veylder, L. (2018). The Dual Face of Cyclin B1. *Trends in Plant Science*, 23(6), 475–478. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.015>
- Schnittger, A., Schöbinger, U., Stierhof, Y. D., & Hülskamp, M. (2005). Erratum: Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes (Current Biology 12:5 (415-420)). *Current Biology*, 15(10), 980. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.019>
- Schrader, E. K., Harstad, K. G., & Matouschek, A. (2009). Targeting proteins for degradation. *Nature Chemical Biology*, 5(11), 815–822. <https://doi.org/10.1038/nchembio.250>
- Schulman, B. A., & Wade Harper, J. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: The apex for downstream signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 319–331. <https://doi.org/10.1038/nrm2673>
- Steinborn, K., Maulbetsch, C., Priester, B., Trautmann, S., Pacher, T., Geiges, B., Küttner, F., Lepiniec, L., Stierhof, Y. D., Schwarz, H., Jürgens, G., & Mayer, U. (2002). The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes and Development*, 16(8), 959–971. <https://doi.org/10.1101/gad.221702>
- Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K., & Ishihama, Y. (2008). Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Molecular Systems Biology*, 4(193). <https://doi.org/10.1038/msb.2008.32>
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K. B., & Tanaka, K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon- $\gamma$  and contribution to ATP-dependent proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14336–14345. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14336>
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., & Inzé, D. (2002). Genome-Wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14, 903–

- Vázquez-Ramos, J. M., & Sánchez, M. de la P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*, 13(2), 113–130. <https://doi.org/10.1079/ssr2003130>
- Vela, E. (2011). El maíz. *Arqueología Mexicana*, 38, 7–8.
- Vierstra, R. D. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science*, 8(3), 135–142. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00014-1)
- Wallace, J. G., Larsson, S. J., & Buckler, E. S. (2014). Entering the second century of maize quantitative genetics. *Heredity*, 112(1), 30–38. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.6>
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., DePamphilis, C. W., & Ma, H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology*, 135(2), 1084–1099. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040436>
- Weingartner, M., Pelayo, H. R., Binarova, P., Zwerger, K., Melikant, B., de la Torre, C., Heberle-Bors, E., & Bögre, L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *Journal of Cell Science*, 116(3), 487–498. <https://doi.org/10.1242/jcs.00250>
- Xiao, Q., Wei, B., Wang, Y., Li, H., Huang, H., Ajayo, B. S., Hu, Y., & Huang, Y. (2021). Core Cell Cycle-Related Gene Identification and Expression Analysis in Maize. *Plant Molecular Biology Reporter*, 39(1), 72–86. <https://doi.org/10.1007/s11105-020-01236-9>
- Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., & Hunt, T. (2004). Cell Cycle-Regulated Recognition of the Destruction Box of Cyclin B by the APC/C in *Xenopus* Egg Extracts. *Molecular Cell*, 13(1), 137–147. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00480-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00480-5)
- Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R. M., Yien, C. T., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., Pierre, S. A., Jensen, J. P., Davydov, I. V., Oberoi, P., Li, C. C. H., Kenten, J. H., Beutler, J. A., Vousden, K. H., & Weissman, A. M. (2007). Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Research*, 67(19), 9472–9481. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0568>
- Zur, A., & Brandeis, M. (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO Journal*, 20(4), 792–801. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.792>

## X. ANEXOS.

### Anexo 1

En este anexo se presenta a) el análisis filogenético del dominio ciclina en diferentes miembros de ciclinas de maíz (Xiao Q. et al, 2021), b) la secuencia de aminoácidos de las proteínas analizadas en el trabajo y c) el mapa correspondiente a los plásmidos empleados para su clonación y sobreexpresión.

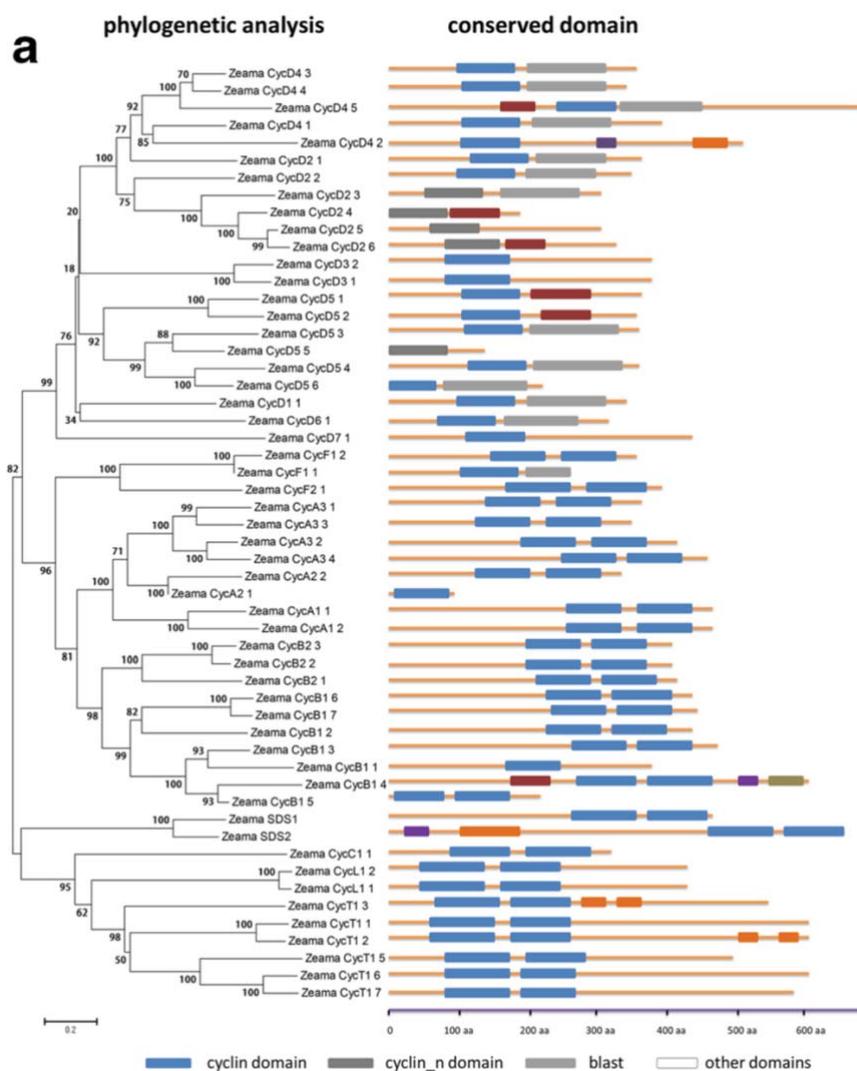


Figura i) Análisis filogenético del dominio ciclina conservado en diferentes miembros de las ciclinas de maíz. (Xiao Q. et al, 2021)

## b) Ciclina D2;2 ZmCycD2;2

>ZeamaCYCD2;2A

```

MVPGYDCAAS VLLCAEDNAA ILGLDDDDGEE SSWAAAATPP RDTVAAAAAA
ATGVAVDGIL TEFPLLSDDC VATLVEKEVE HMPAEGYLQK LQRRHGDLDL
AAVRKDAIDW IWKVIEHYNF APLTAVLSVN YLDRFLSTYE FPEGRAWMTQ
LLAVACLSLA SKIEETFVPL PLDLQVAEAK FVFEGRTIKR MELLVLSTLK
WRMHAVTACS FVEYFLHKLS DHGAPSLAR SRSSDLVLST AKGAEFVVFR
PSEIAASVAL AAIGECRSSV IERAASSCKY LDKERVLRCH EMIQEKITAG
SIVLKSAGSS ISSVPQSPIG VLDAACLQSQ QSDDATVGGSP AVCYHSSSTS
KRRRITRLL
  
```

Vector de expresión empleado para generar una proteína fusionada a MBP (Maltose Binding Protein): pCDFDuet1. El gen codificante para MBP se añadió mediante técnicas de biología molecular (López Hernández, 2018).

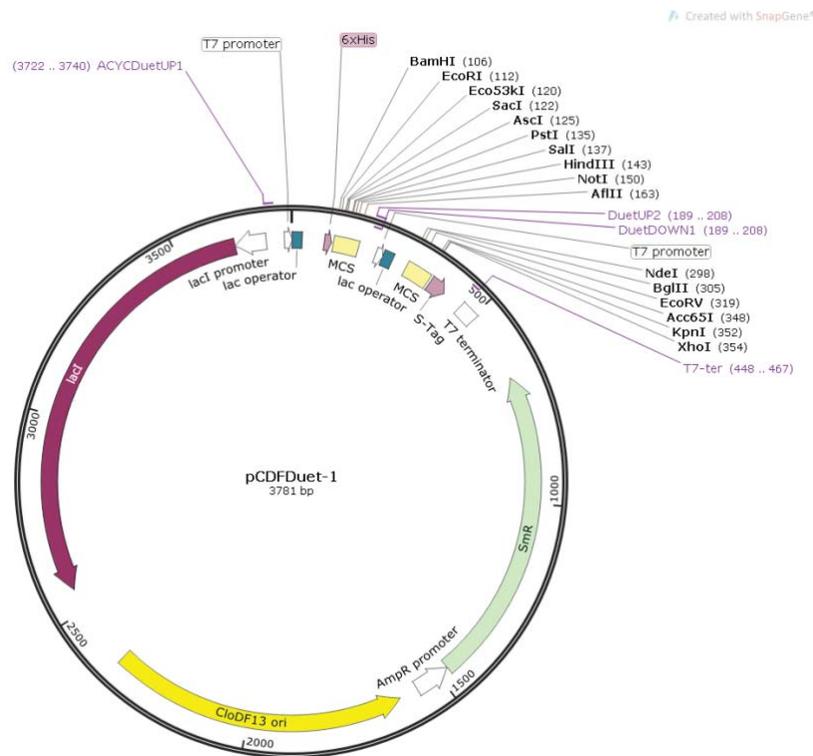


Figura ii) Mapa del vector pCDFDuet1 ([pCDFDuet-1 plasmid](https://www.lifescience-market.com/pCDFDuet-1_plasmid), [pCDFDuet-1 sequence](https://www.lifescience-market.com/pCDFDuet-1_sequence), [pCDFDuet-1 map](https://www.lifescience-market.com/pCDFDuet-1_map) (lifescience-market.com)).

### c) Cinasa dependiente de ciclina CDKA;1

>CDKA;1      ZmCDKA;1

```
MEQYEKVEKI GEGTYGVVYK ALDKATNETI ALKKIRLEQE DEGVPSTAIR
EISLLKEMNH GNIVRLHDVV HSEKRIYLVF EYLDLCLKKF MDSCPEFAKN
PTLIKSYLEYQ ILHGVAYCHS HRVLHRDLKP QNLLIDRRTN ALKLADFGLA
RAFGIPVRTF THEVVTLWYR APEILLGARQ YSTPVDVWSV GCIFAEMVNO
KPLFPDSEI DELFKIFRIL GTPNEQSWPG VSCLPDFKTA FPRWQAQDLA
TVVFNLDPAG LDLLSKMLRY EPSKRITARQ ALEHEYFKDL EVVQ
```

El vector en el que se clonó la secuencia de CDKA;1 fue pCDFDuet1 (Figura i) al que se le añadió los codones necesarios para la obtención de la proteína fusionada al TAG de cola de histidina (López Hernández, 2018).

- **Cinasa dependiente de ciclina CDKB1;1**

>CDKB1;1      ZeamaCDKB1;1

```
MPLPIDGRRE RAVCVRGAGA GAMEINIVDK YEKLEKVGEG TYGKVYKAQD
KATGQLVALK KTRLEMDEEG IPPTALREIS LLNLLSHSIY IVRLLAVEQA
AKNGKPVLYL VFEFLDIDLK KYLDVYRRGP SARPLPATLI KNFLYQLCKG
VAHCHSHGVL HRDLKPQNLL VDKEKGILKI ADLGLGRAFT VPMKSYTHEI
VTLWYRAPEV LLGATHYSTG VDMWSVGCIF AEMARRQALF PGDSELQQLL
HIFRLLGTPT EEQWPGVSDL RDWHEFPQWK PQGLARVVPT LEPEGVDLLS
KMLQLDPSNR ISALAAMEHP YFNSLDKSQF
```

El vector en el que se clonó la secuencia de CDKA;1 fue pCDFDuet1 (Figura ii) al que se le añadió los codones necesarios para la obtención de la proteína fusionada al TAG de cola de histidina (Datos no reportados, vector donado por Mingyar N. López-Hernández).

• **Ciclina B1;2      ZmCycB1;2**

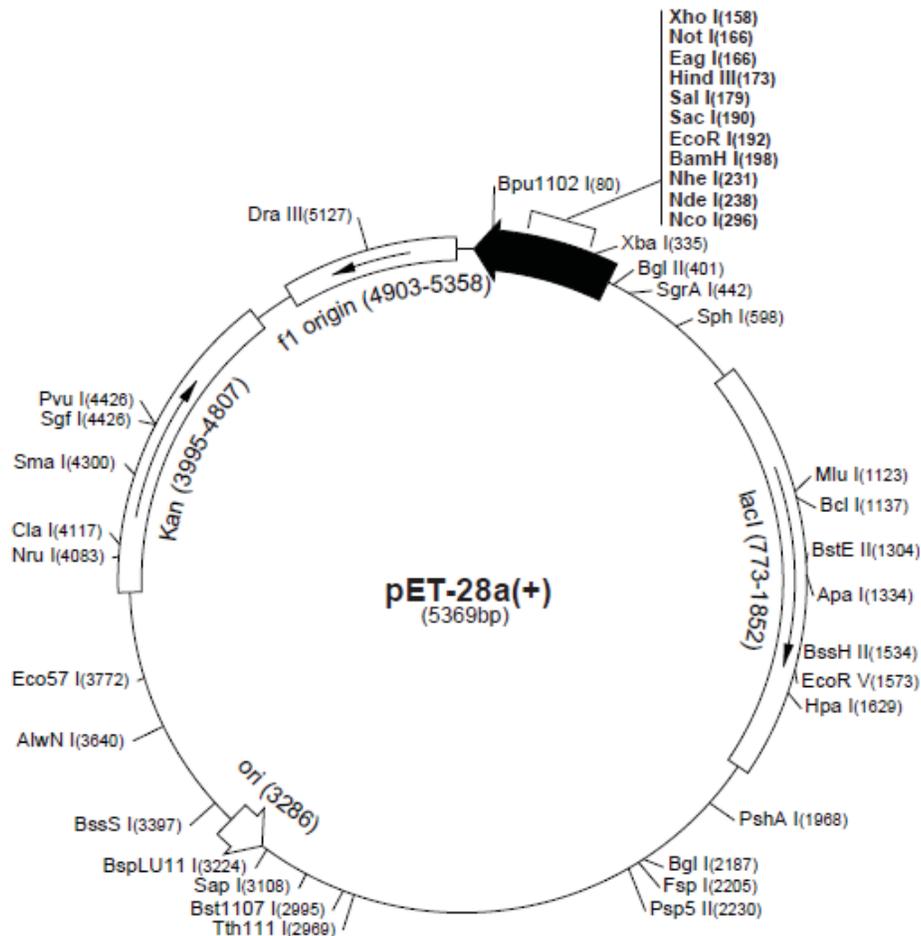
>CycB1;2

ZeamaCycB1;2

```

MATRNHRAAA  APQPANRGAA  RVAGKQKAAA  AGTRRALGDI  GNVVSDALDR
AIKLPEGIHR  DAAVAPAQPV  AARAVTKPAR  KVTTKNVPRP  GAGQAPKENK
KPSAEGAAAA  SGRSVQKNRR  KKPACTLSTV  LSARSKAACP  VTEKPKEPIE
DIDKFDGDNQ  LALVDYVEDI  YTFYRPPMHE  SRPIDYMGQT  SPELSPRMRS
ILADWLIESH  RRFQLMPETL  YLTIYIVDRY  LSLQPTPRRE  LQLVGVAALL
IACKYEEIWA  PEVNDLIHIA  DGAFNRSQIL  AAEKAILNSM  EWNLTVPTPY
HFLLRFAKAA  GSADEQLQHT  INFFGELALM  DYGMVMTNPS  TAAACAVYAA
RLTLGRSPLW  TETLKHHTGP  QRAADTGRAK  TLVGSHAASA  SPDARLKAVY
QKYATEQFGR  VALHPPAPAA  LPDLV
  
```

Vector de expresión empleado para generar proteína con tag de cola de histidina (Lara-Núñez et al., 2021): pET28b (Figura iii).



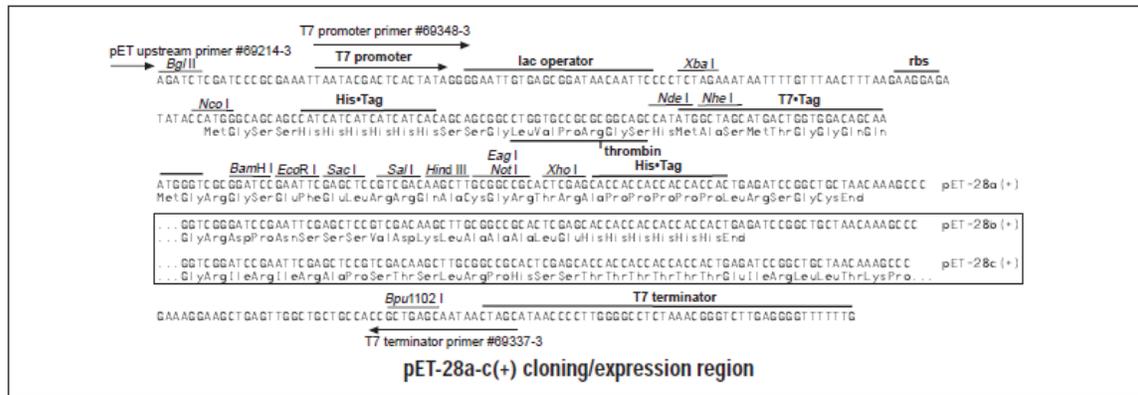


Figura iii) Mapa del vector pET28a-c (pET-28b(+)) DNA - Novagen | 69865 (merckmillipore.com).

Anexo 2.

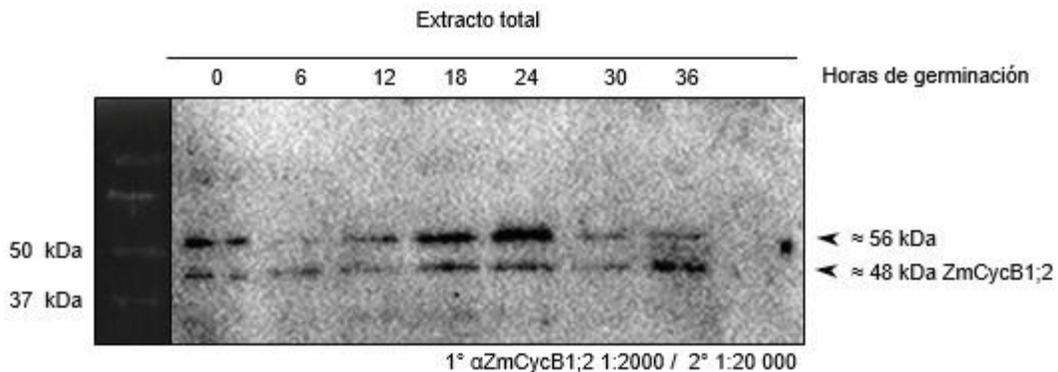
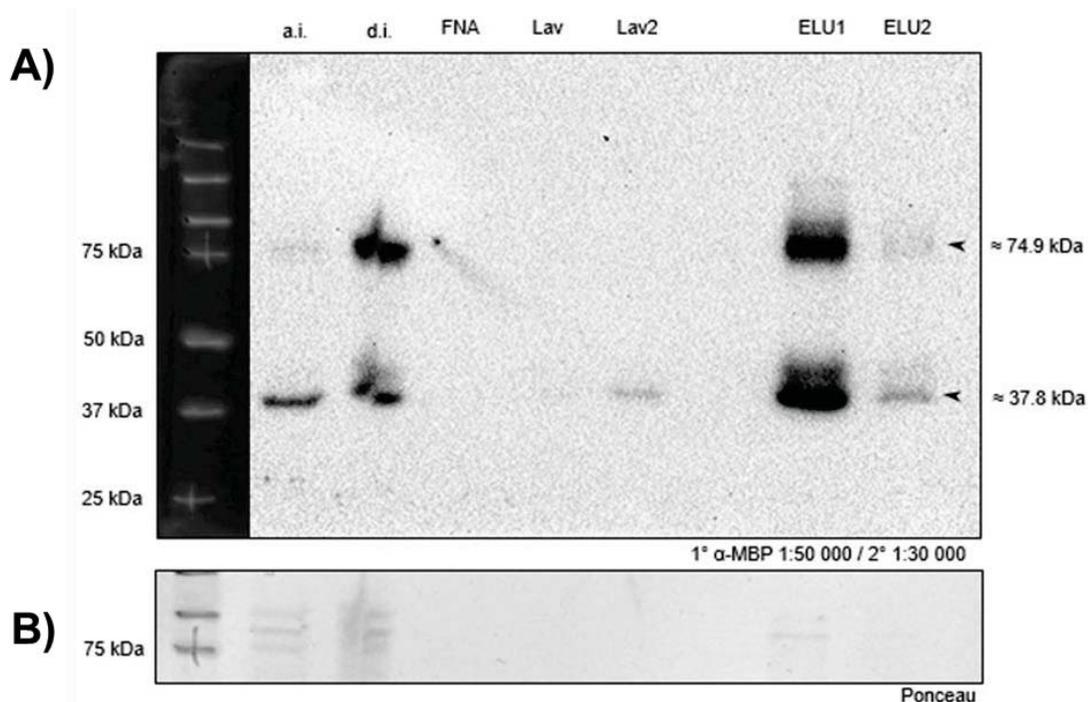


Figura iv) Abundancia proteica de ZmCycB1;2 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. En el panel superior se muestra un Western blot revelado con un anticuerpo que reconoce específicamente a la ciclina B1;2 de maíz. En un gel de acrilamida se separaron y posteriormente se transfirieron a una membrana, las proteínas presentes en extractos totales de ejes embrionarios germinados por 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas, empleando ejes secos (tiempo 0) como una referencia de la cantidad de proteína presente al inicio de la germinación (Ayub-Miranda, 2015).

### Anexo 3.

#### Purificación de la ZmCycD2;2-MBP

La proteína recombinante ZmCycD2;2-MBP se sobre expresó y purificó como se describe en la sección de metodología. El proceso se monitoreó por Western Blot como se presenta en la Figura v.

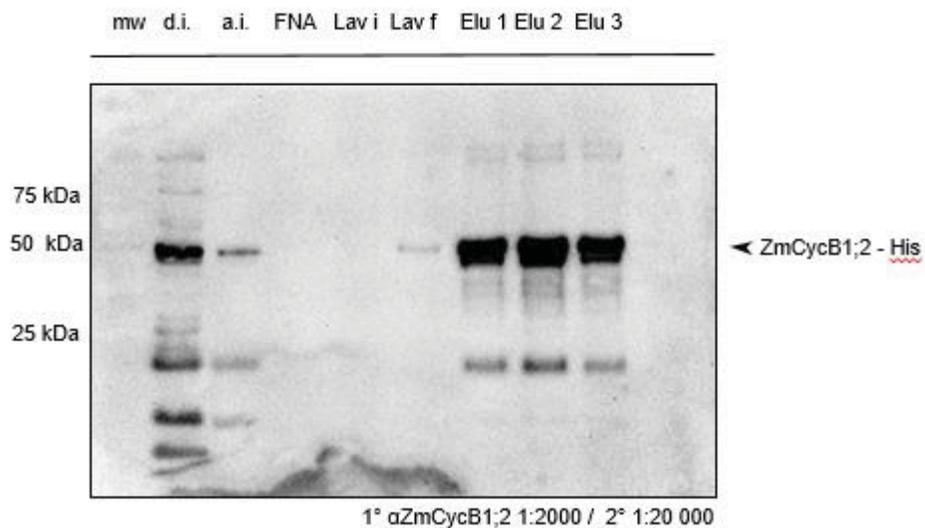


**Figura v. Purificación de la ciclina ZmCycD2;2a-MBP.**A): Se muestra la sobre expresión de la ciclina D2;2 (38.9 kDa) fusionada a MBP (42 kDa), lo que da la construcción ZmCycD2;2a-MBP esperada alrededor de los 75 kDa. El anticuerpo anti-MBP detecta dos bandas, una arriba de 75 kDa y otra arriba de 37kDa que podría ser MBP o un fragmento de la construcción CycD2;2-MBP. a.i = antes de inducir, FNA= fracción no absorbida d.i = después de inducir, Lav = lavado, ELU = eluciones. B) Membrana teñida con Rojo de Ponceau.

## Anexo 4

### Purificación de la ZmCycB1;2 - His

La proteína recombinante ZmCycB1;2-His se sobre-expresó y purificó como se describe en la sección de metodología. El proceso se monitoreó por Western Blot como se presenta en la Figura vi.

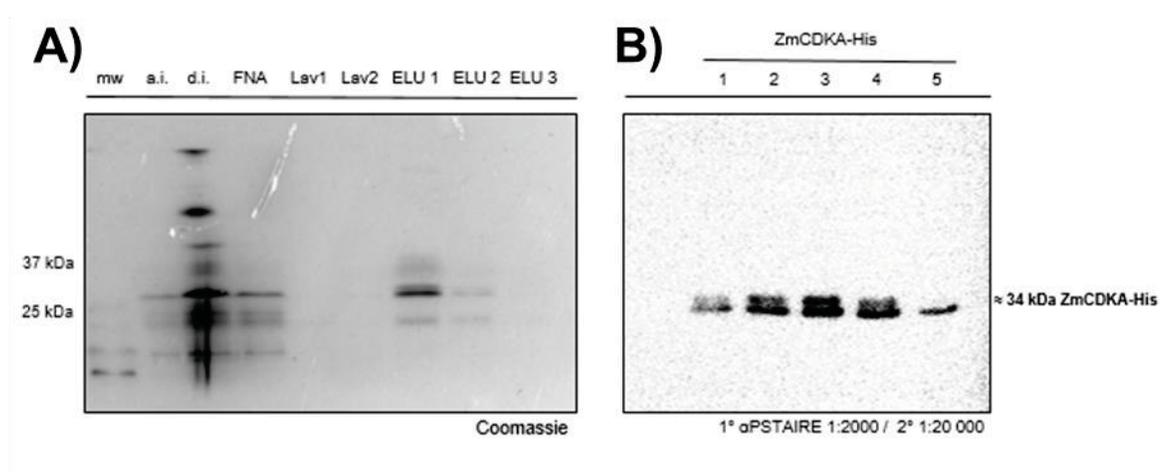


**Figura vi) Purificación de ZmCycB1;2-His. Se muestra en las fracciones de elución el reconocimiento de una proteína a la altura del marcador de 50 kDa. La masa esperada de la ZmCycB1;2 es alrededor de los 48 – 50 kDa. mw: marcadores de masa molecular, a.i: antes de inducir, FNA: fracción no absorbida d.i:después de inducir, Lav: lavado, ELU: eluciones.**

## Anexo 5

### Purificación de la ZmCDKA1-His

La proteína recombinante ZmCDKA1-His se sobre expresó y purificó como se describe en la sección de metodología. El proceso se monitoreó por tinción de Azul de Coomasie (Figura viiA) y por Western Blot como se presenta en la Figura viiB.



**Figura vii) Purificación de ZmCDKA1-His. A) Gel de acrilamida teñido con azul de Coomasie. Se observa una banda alrededor de 34 kDa (tamaño esperado para ZmCDKA1-His) que se enriquece después de inducir con IPTG, además, se aprecia en las eluciones la purificación de la banda previamente descrita. B) Western blot de las eluciones revelado con  $\alpha$ -PSTAIR. mw: marcadores de masa molecular, a.i: antes de inducir, d.i: después de inducir, Lav: lavado, ELU: eluciones.**