



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Interacción de las proteínas CycD6;1 y RBR1 de maíz”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

PABLO GONZÁLEZ OROZCO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos - Facultad de Química UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Patricia Coello Coutiño - Facultad de Química UNAM

Dr. Roberto Coria Ortega - Instituto de Fisiología Celular UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX.

Marzo de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

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

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

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química - UNAM
Dra. Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química - UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular - UNAM

Se reconoce:

La asesoría técnica del Dr. Roberto Coria y la Dra. Laura Kawasaki Watanabe del Instituto de Fisiología Celular - UNAM, para el desarrollo de los experimentos de doble híbrido en levaduras.

La asesoría técnica y discusión de resultados de primera mano en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, de la Dra. Aurora Lara Núñez y el Dr. Elpidio García Ramírez, así como a mis compañeros del laboratorio, en especial al M. en C. Mingyar Neftalí López Hernández y el C. a Dr. Victor A. Sánchez Camargo.

El financiamiento para el desarrollo de este proyecto experimental por parte de PAPIIT (215316) y CONACyT (220661).

Durante la duración del posgrado gocé de una Beca de Maestría Nacional otorgada por CONACyT. Posterior al término de la maestría gocé también de un estímulo económico de Ayudante de Investigador Nivel III otorgado por el SNI.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día: _____

El Jurado del examen estuvo conformado por:

Presidente	Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Álvarez	Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM
Vocal	Dr. Jacques Marcel Ronceret Arnaud	Instituto de Biotecnología - UNAM
Vocal	Dr. César Luis Cuevas Velázquez	Facultad de Química - UNAM
Vocal	Dra. Marina Macias Silva	Instituto de Fisiología Celular - UNAM
Secretario	Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra	Facultad de Química - UNAM

Contenido

1.0 Resumen	4
2.0 Introducción	5
2.1 Ciclo Celular.....	5
2.2 Regulación del ciclo celular.....	8
2.2.1 Ciclinas D.....	8
2.2.2 Proteínas <i>pocket</i> y transición G1/S	10
2.3 Motivo LXCXE.....	14
2.4 Antecedentes.....	17
3.0 Justificación	20
4.0 Hipótesis	20
5.0 Objetivos	
5.1 General	21
5.2 Particulares	21
6.0 Resultados	22
6.1 Búsqueda <i>in silico</i> de la región en <i>ZmRBR1</i> que interacciona con el motivo LXCXE	22
6.2 Interacción de <i>ZmRBR1</i> ^{PD} con la ciclina canónica <i>CycD2;2a</i>	23
6.3 Identificación y mutación del motivo LXCXE-Like de <i>CycD6;1</i>	27
6.4 Interacción comparativa de <i>RBR1</i> ^{PD} y las dos versiones de <i>CycD6;1</i>	29
6.5 Ensayos de doble de híbrido en levaduras.....	31
7.0 Discusión de resultados	37
8.0 Conclusiones	45
9.0. Perspectivas	46
10.0 Materiales y métodos	47
10.1 Interacción de proteínas recombinantes	47
10.2 Mutagénesis por PCR	50
10.3 Subclonación de <i>CycD6;1</i> y <i>MutD6;1</i> en pHMGWA	54
10.4 <i>Pull-down</i> de <i>RBR1</i> ^{PD} y las dos versiones de <i>CycD6;1</i>	54
10.5 Subclonación en vectores para levaduras	57
10.6 Transformación de levaduras y ensayos de doble híbrido.....	58
Referencias	61
Figuras Suplementarias	72

1.0 Resumen

Las ciclinas D son una familia de proteínas que regulan el ciclo celular en eucariontes. Una de las características más relevantes de las ciclinas tipo D (tanto en mamíferos como en plantas) es la conservación de un motivo, denominado LXCXE, en el amino terminal de su estructura proteica cuya función es mediar la interacción con los miembros de la familia de proteínas *pocket* (RB o RBR). Las ciclinas D y las proteínas *pocket* trabajan en conjunto en varios mecanismos para la correcta progresión del ciclo celular. En maíz, nuestro modelo de estudio, hay un único miembro de las ciclinas D (de 17 que conforman la familia) llamado CycD6;1, que no conserva el motivo de unión a RBR1, sin embargo, se había reportado que aun así puede asociarse a ésta. En este trabajo se inició la búsqueda de la región responsable de la interacción de CycD6;1 con RBR1 y se encontró que la ciclina posee un motivo LXCXE semi-conservado en la región carboxilo terminal. Mediante estudios de mutación dirigida y ensayos de interacción con proteínas recombinantes se observó que la asociación entre ellas se ve desfavorecida cuando se altera dicho motivo en la CycD6;1, confirmando que es parcialmente responsable de la interacción con RBR1. Por otro lado, al intentar corroborar dicho resultado con ensayos de doble híbrido, se encontró que CycD6:1 tiene la capacidad activar la expresión génica, una característica no estudiada en plantas, aunque sí ha sido reportado en las ciclinas D de mamíferos.

Interacción de las proteínas CycD6;1 y RBR1 de maíz

2.0 Introducción

2.1 Ciclo celular

Millones de años de evolución han dado como resultado una gran diversidad de organismos eucariontes en la Tierra; los organismos de este dominio de la vida pueden ser unicelulares (como las levaduras) o pluricelulares (como las plantas) pero independientemente de esto, todos se generan a partir de la división de una célula progenitora para dar lugar a dos células hijas. Por obvias razones, un organismo pluricelular no necesita sólo de una, sino de muchas series de divisiones celulares que están determinadas y reguladas por su programa morfogénico para alcanzar su desarrollo completo y ser un organismo funcional (Buchanan et al., 2015).

Al mecanismo que lleva a la división celular en organismos eucariontes también se le denomina ciclo celular y éste es un proceso complejo que involucra una serie de eventos bioquímicos y moleculares que culminan con la generación de dos células con la misma información genética. El ciclo celular requiere de una fina regulación, pues de su correcta progresión dependen procesos muy importantes en la naturaleza; gracias al ciclo celular se generan células nuevas y funcionales, de ello depende el desarrollo de un organismo y esto a su vez se traduce en la preservación de una especie en la naturaleza (Alberts et al., 2015)

El ciclo celular está dividido en cuatro fases secuenciales y unidireccionales: G1, S, G2 y M. La primera fase (G1) corresponde a la etapa donde la célula percibe e integra señales del medio intra y extracelular (luz, agua, disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento, etc) que le indicarán si es apta para comenzar un ciclo; la percepción de este microambiente se da a través de varias vías de transducción de señales hasta llegar a efectores que finalmente van a regular procesos celulares como el crecimiento, la duplicación de organelos y sólo si recibe las señales mitogénicas correctas y su estado energético es favorable, la célula avanza hacia la siguiente fase del ciclo celular. Por otro lado, cuando en una célula se activa el programa para ya no dividirse más (regularmente porque alcanzó su máxima diferenciación), se dice que entra en fase G0, que significa que la célula no está realizando el ciclo celular (Campbell et al., 2001) (**Figura 1**).

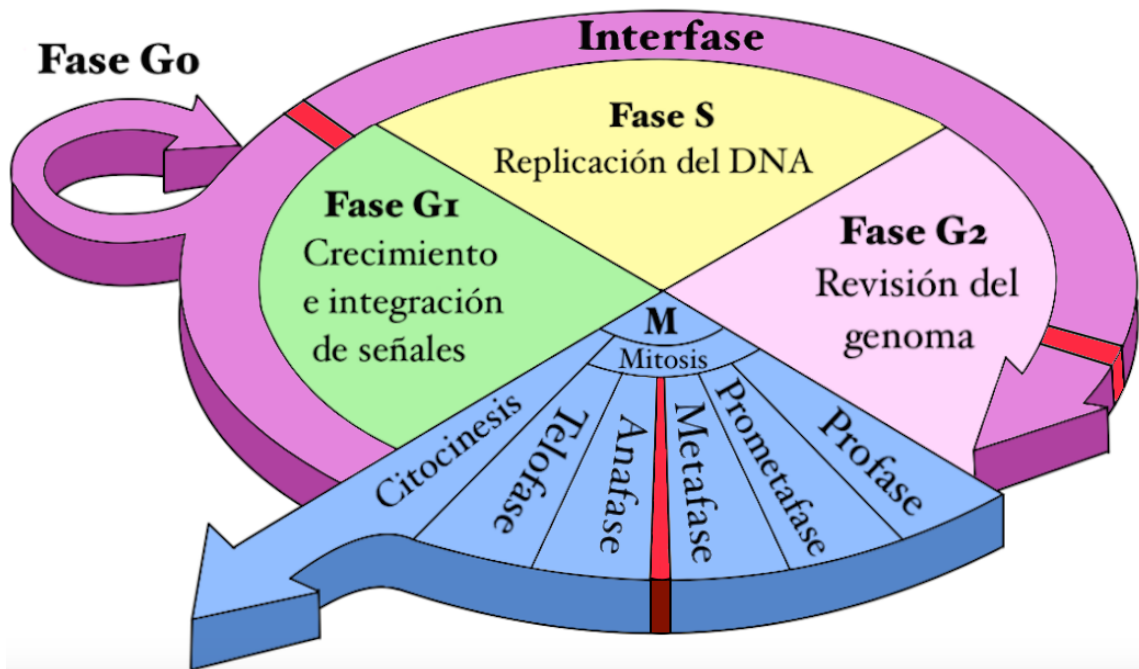


Figura 1. Modelo del ciclo celular en eucariontes. Se muestran las fases y los eventos que las caracterizan; en rojo se señalan los puntos de control del ciclo. Modificado de Mader & Windelspecht, 2016.

En la fase S (denominada así porque ocurre la **S**íntesis de DNA), la célula se encarga de duplicar su material genético, es un proceso complejo que está regulado por decenas de proteínas y requiere de mucha energía química (de ahí la importancia de evaluar el estado metabólico de la célula en G1). En la transición de la fase G1 a S existe un punto de control muy importante que se analizará con detalle más adelante ya que este trabajo de investigación se realizó en el contexto de esta etapa del ciclo celular.

Una vez duplicado el genoma, en la fase G2 la célula puede seguir creciendo y duplicar sus organelos (como en G1), sin embargo, lo más importante de esta etapa es que la célula verifica que la síntesis de DNA haya ocurrido sin errores; si los hay, se activan mecanismos de reparación que no permiten el avance a la siguiente fase hasta que se hayan corregido, o bien, la célula puede entrar en apoptosis cuando los daños son irreparables. Este mecanismo constituye el segundo punto de control del ciclo celular.

Al periodo que comprende a las fases G1, S y G2 también se le conoce como interfase y se le puede describir de forma muy general como la etapa en la que la célula se prepara para la división celular. Cuando todo está listo entonces la célula entra a la fase de mitosis (M) donde, a través de las diferentes sub-fases de este proceso (profase, metafase, anafase y telofase) y bajo la regulación del último punto de control del ciclo, el DNA se organiza para poder segregarse y finalmente dar origen a dos células hijas genéticamente idénticas entre sí (Alberts et al., 2015).

2.2 Regulación del ciclo celular

El ciclo celular es orquestado principalmente por la acción de complejos proteicos heterodiméricos conformados por una ciclina (Cyc) y una proteína cinasa dependiente de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés). Las ciclinas funcionan como subunidades regulatorias y las CDKs constituyen las subunidades catalíticas; estas proteínas se combinan para formar diferentes complejos, los cuales adquieren especificidad para fosforilar blancos moleculares en momentos particulares del ciclo celular y así regular la progresión de éste. (Harashima et al., 2013).

En mamíferos, las CDKs se han clasificado en familias desde CDK1 hasta CDAK13, mientras que en plantas se les ha dado un sufijo alfabético desde la CDKA hasta la CDKG, lo cual deja ver el gran número de miembros de este tipo de proteínas. Es relativamente común encontrar homólogos y análogos entre las CDKs de animales y plantas, sin embargo, se debe destacar que la familia CDKB es específica de plantas y se les ha asociado a funciones muy específicas en la mitosis y en la reparación del daño a DNA (Joubès et al., 2000; Menges et al., 2005; Weimer et al., 2016).

2.2.1 Ciclinas D

Por otro lado, las ciclinas también constituyen una gran familia de proteínas conservadas en eucariontes; estas proteínas están conformadas por dos grandes dominios llamados "Ciclina N" y "Ciclina C" y dentro del primero se encuentra una región muy importante llamada "caja ciclina". Esta región (que comprende alrededor de 100 residuos de

aminoácidos), le da identidad a la familia porque es la responsable de la interacción con las CDKs (**Figura 2**) (Wang et al., 2004).

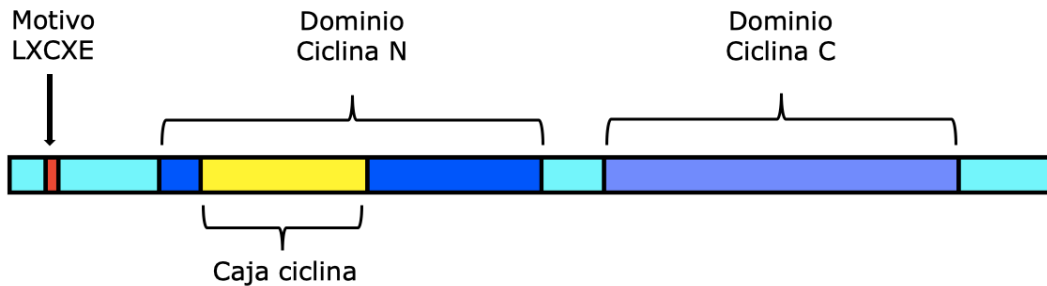


Figura 2. Esquema de una ciclina D. Se ilustra la distribución de los dominios que conforman a las ciclinas, así como la localización de la "caja ciclina" y el motivo LXCXE que caracteriza a las ciclinas tipo D.

Hay diferentes clases de ciclinas, las cuales cumplen funciones específicas en diferentes etapas del ciclo celular. Las ciclinas tipo A están asociadas a la fase S y las tipo B a la fase G2 y M, mientras que las ciclinas D participan en la fase G1 y la transición G1/S. Nuestro trabajo involucra a éstas últimas, por lo cual nos centraremos en ellas y en el papel específico que cumplen en la regulación del ciclo celular (Pines, 1995; Malumbres & Barbacid, 2005).

Las ciclinas tipo D son proteínas capaces de integrar (directa o indirectamente) señales bioquímicas del medio intracelular para después, en complejo con una CDK, ejercer un efecto directo sobre la progresión del ciclo celular. Estas señales pueden ser hormonas, azúcares y factores mitegénicos en general, que provienen de otras vías de señalización. Los mecanismos de integración estas señales no son claros para todos los casos, aunque para las hormonas se ha visto que

estas moléculas se unen a proteínas que regulan la transcripción de las ciclinas (Garay-Arroyo et al., 2012).

Las ciclinas D son muy importantes para el reconocimiento de los blancos moleculares de los complejos CycD/CDKs, lo hacen a través de varias regiones de su secuencia/estructura proteica y poseen una marca de aminoácidos muy específica en el amino terminal que le da identidad a esta familia de proteínas; se trata de un motivo denominado LXCXE del cual se abundará más adelante (**Figura 2**) (Sherr, 1994; Gutiérrez et al., 2002).

Gran parte de la maquinaria de regulación del ciclo celular se encuentra conservada tanto en plantas como en mamíferos, aunque en el caso de las ciclinas D el número de miembros implicados es muy distinto. Mientras que en humanos hay solo 3 genes que codifican para ciclinas tipo D, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han reportado 10 genes y en el maíz son 17 miembros los que conforman a esta familia. (Buendía-Monreal et al., 2011; Buchanan et al., 2015; Strzalka et al., 2015). Es por esto que el estudio de los mecanismos donde participan estas proteínas se vuelve más complejo y, por lo tanto, hay muchas incógnitas en el engranaje con el que se regula de manera tan fina el ciclo celular de las plantas.

2.2.2 Proteínas *pocket* y transición G1/S

Ya se mencionaba que durante la fase G1 la célula se prepara y evalúa su estado energético y contexto ambiental para comprometerse (o no) a comenzar la replicación de su material genético (en la fase S). Esta “decisión” es muy importante porque si la célula avanza en el ciclo

celular cuando las condiciones no son las óptimas, puede poner en riesgo su viabilidad. Por ello es que con la evolución se desarrolló un mecanismo de control muy estricto (que está conservado en eucariontes) para regular la transición entre las fases G1 y S (Sherr, 2004).

En esta vía se encuentran involucradas varias proteínas que, junto con los complejos formados por las ciclinas tipo D y CDKs, forman parte de la maquinaria de regulación del ciclo celular. La primera y más importante de ellas es la proteína de retinoblastoma (pRB o RB), que fue descrita por primera vez en humanos como un supresor de tumores debido a que se encuentra regulada negativamente en células de cáncer de retina. Se encontró que esta anomalía contribuye a la proliferación celular y posteriormente se observó que no sólo era una proteína asociada con el retinoblastoma, sino también con otros tipos de cáncer (Murphree & Benedict, 1984; Horowitz et al., 1990).

En mamíferos, RB junto con p107 y p130 conforman la familia de proteínas *pocket*, llamadas así debido a que los miembros conservan un dominio muy particular que forma una cavidad en su estructura proteica (y de ahí su nombre), la cual es importante para la función de esos reguladores. Esta familia de proteínas también está conservada en plantas y se les denominó pRBR o RBR (por sus siglas en inglés "RB-related protein"); *Arabidopsis thaliana* sólo tiene un miembro, pero en maíz existen cuatro genes (*ZmRBR1*, *ZmRBR2*, *ZmRBR3* y *ZmRBR4*). *ZmRBR1* es el más estudiado al ser el primero en identificarse, además de ser el más cercano a su ortólogo RB en humanos (Desvoyes et al., 2013; Sabelli et al., 2013).

Las proteínas de la familia *pocket* tienen tres dominios: el dominio N-terminal, el dominio *pocket* y el C-terminal (**Figura 3**). El dominio N-terminal es el menos conservado entre los miembros de la familia (de la misma y de diferentes especies) y su función se ha relacionado con la capacidad de estas proteínas para inhibir la replicación del DNA (Borysov et al., 2015). Por otro lado, el dominio *pocket* es el más conservado y característico de la familia y está conformado a su vez por dos subdominios denominados *pocket A* y *pocket B*; a través de esta región es por la que RB establece interacción con una gran variedad de proteínas, incluidas las ciclinas D, que específicamente se asocian al subdominio *pocket B* a través de su motivo LXCXE (Chow et al., 1996).

Finalmente, el dominio C-terminal se caracteriza por ser una región intrínsecamente desordenada y por la presencia de varios sitios de fosforilación para complejos Cyc/CDKs; la dinámica de fosforilación/desfosforilación de esta región provoca cambios conformacionales en la proteína completa y determina la mayoría de las funciones de este regulador (Rubin, 2013).

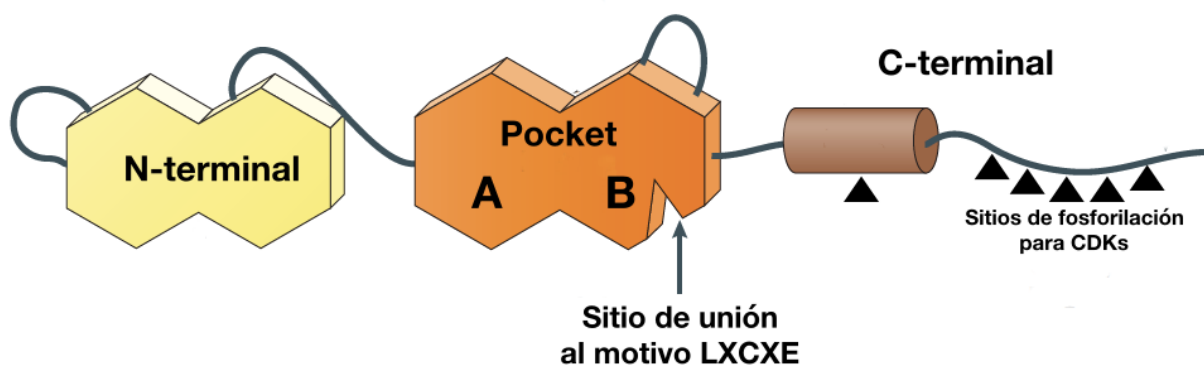
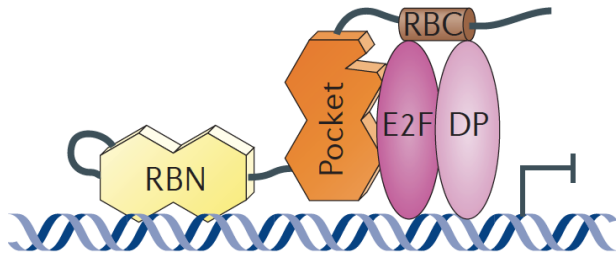


Figura 3. Modelo de RB. Se muestran los dominios y sitios importantes de la proteína. Modificado de Dick y Rubin, 2013.

La proteína RB cumple un papel muy importante en la transición G1/S, pues funciona como represor de un factor transcripcional clave en este punto de control; este factor transcripcional es el heterodímero llamado E2F-DP, cuyos genes blanco regulan varios mecanismos importantes para la progresión del ciclo celular, entre ellos los genes *MCM*, *ORC* y *PCNA* (tanto en mamíferos como en plantas) cuyos productos son imprescindibles para la replicación del genoma durante la fase S (Chellappan et al., 1991; Vandepoele et al., 2005; Sanchez-Camargo et al. 2020).

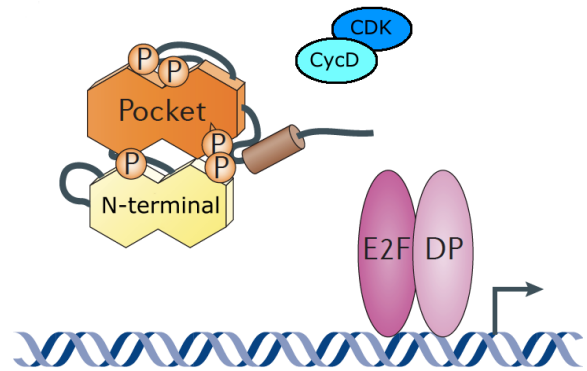
Fisiológicamente hablando, ya se mencionaba que mientras la célula se encuentra en la fase G1, pero sin tener las condiciones apropiadas, no avanza hacia la fase S; este mecanismo de restricción está dado por la interacción del dominio *pocket* de RB con el dominio de transactivación de E2F-DP, pues esta asociación anula la capacidad de E2F-DP para activar sus genes blanco, funcionando como un freno que impide el establecimiento de la fase S. Sin embargo, una vez que las células reciben las señales mitogénicas y bioquímicas adecuadas en la fase G1 tardía, a través de los complejos CycD/CDKs se promueve la hiperfosforilación de RB provocando que pierda afinidad por E2F-DP (**Figura 4**). De esta forma se da paso a la transcripción de los genes de fase S y de otros tantos que le darán consecución al ciclo celular (Hagemeier et al., 1993; Kato et al., 1993; Weinberg et al., 1995; Rubin et al., 2005).

a) Fase G1



Represión de genes de ciclo celular

b) Fase S



Activación de genes de ciclo celular

Figura 4. Mecanismo de la transición G1/S. a) La interacción de RB con E2F-DP impide la transcripción de los genes para el avance del ciclo celular, b) pero cuando RB es hiperfosforilado por complejos CycD/CDKs, el factor transcripcional es liberado y activa sus genes blanco. Modificado de Dick y Rubin, 2013.

Debido a que se demostró la importancia de la interacción de estas proteínas, se comenzaron a hacer estudios para encontrar las regiones implicadas en la asociación entre los complejos CycD/CDKs, RB y E2F.

2.3 Motivo LXCXE

Muchos de los trabajos antes citados se realizaron en el contexto de los estudios del cáncer y en esos mismos años (90s) se descubrió que algunas oncoproteínas virales (como E7 del papiloma humano) eran capaces de unirse al subdominio *pocket* B de RB, interfiriendo con su acción represora sobre E2F y provocando un aumento en la proliferación celular (Dyson et al., 1989). Posteriormente se encontró que estas proteínas eran capaces de asociarse a RB a través de una marca de aminoácidos muy específica.

Con el tiempo se determinó que la interacción de las proteínas virales con el dominio *pocket* de RB dependía de un motivo al que se le denominó LXCXE. Sin embargo, este descubrimiento fue aún más relevante después de que se observara que varias proteínas endógenas de las células de humano también poseían este motivo, entre ellas las ciclinas tipo D (Dowdy et al., 1993).

El motivo LXCXE se encuentra conservado en el amino terminal de las ciclinas D de humano y, mediante estudios de mutación dirigida a dicho motivo, se comprobó que es importante para la interacción (y fosforilación) de RB, pues si se altera se ve considerablemente disminuida su asociación (Dowdy et al., 1993).

Fue así como se determinó que en la transición G1/S del ciclo celular las ciclinas D a través de su motivo LXCXE, interaccionan con el motivo *pocket* de RB para favorecer su hiperfosforilación, lo cual finalmente conduce a la liberación de E2F (que se encontraba inhibido por la forma no fosforilada de RB) y a la activación de los genes de la fase S.

Posteriormente se describió que existen otras proteínas que presentan motivos LXCXE semi-conservados (a los cuales nos referiremos también como motivos LXCXE-like), como la proteína CycE de humanos, que realiza una función importante en la transición G1/S con un mecanismo similar a las CycsD. Esta proteína posee el motivo VXCXE y al estudiarse se determinó que este motivo semi-conservado es funcional y es importante para la interacción entre la ciclina E y RB (Kelly et al., 1998).

También algunos remodeladores de la cromatina como las desacetilasas de histonas 1 y 2 (que contribuyen a la represión transcripcional), se asocian a RB a través del motivo IXCXE, que también es muy similar al canónico (Magnaghi-Jaulin et al., 1998). Con estos y otros trabajos se demostró la importancia del motivo LXCXE (o LXCXE-like) en la interacción de las proteínas que lo poseen, con RB.

El motivo LXCXE también está conservado en varias proteínas de las plantas; inicialmente se encontró que la mayoría de las ciclinas tipo D de *Arabidopsis* (7 de los 10 miembros) lo poseen en el amino terminal de su secuencia proteica (Strzalka et al., 2015) y se demostró que las asociaciones de las proteínas de la vía CycD/RBR/E2F en plantas funcionan de manera muy similar a las descritas en humano, pues demostraron que Ciclina D2 de *Arabidopsis thaliana* tiene la capacidad de unirse con RBR1 de maíz a través del motivo LXCXE (Huntley et al., 1998).

Por otro lado, de forma análoga a lo encontrado en mamíferos, también hay otras proteínas en plantas (que no son ciclinas D) que dependen de esta marca de aminoácidos para asociarse con miembros de la familia *pocket*, por ejemplo, el factor transcripcional SCARECROW (SCR) descrito en *Arabidopsis* (Cruz-Ramírez et al., 2012), demostrando así la importancia del motivo LXCXE en la asociación de varios tipos de proteínas y, por lo tanto, en varios mecanismos.

2.4 Antecedentes

El estudio de las ciclinas D en distintos organismos modelo ha permitido conocer varias características de esta familia de proteínas. En *Arabidopsis thaliana* se ha determinado que su expresión responde de forma diferencial a la presencia de azúcares como glucosa y sacarosa, así como a hormonas vegetales como citocininas, auxinas, brasinoesteroides, entre otras. Por otro lado, en la planta de tabaco se encontró que esta familia de ciclinas tiene una vida media relativamente corta que está relacionada directamente con la presencia de cajas PEST, que son secuencias que las llevan a ser degradadas vía proteasoma (Gutiérrez et al., 2002; Sorell et al., 1999).

Otros trabajos sobre algunas ciclinas han logrado determinar funciones muy específicas de estos reguladores; un ejemplo que concierne directamente a este proyecto, por la cercanía filogenética de estas proteínas, es el estudio de CycD6;1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta ciclina se ha visto involucrada en un proceso denominado división asimétrica, en donde permite la diferenciación de ciertos tipos celulares en el desarrollo de la raíz de esta planta. Esta función la realiza a través de la fosforilación de AtRBR1, sin embargo, no se explica a detalle cómo es posible esta interacción, dado que AtCycD6;1 (así como otras 3 ciclinas D de *Arabidopsis*) no tiene conservado el motivo LXCXE (Cruz-Ramírez et al., 2012).

Por otro lado, la regulación del ciclo celular en la germinación de semillas de maíz ha sido el tema de investigación de nuestro grupo por décadas, dada la importancia que tiene la primera ronda de división

celular en este proceso fisiológico, que en conjunto con el despertar metabólico de las semillas, permiten el establecimiento de la germinación y el comienzo del desarrollo de una plántula de maíz (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003). Por la importancia que ya se ha mencionado que tienen las ciclinas D en la regulación del ciclo celular, han sido de las proteínas que más se han abordado.

La familia de ciclinas tipo D de maíz está conformada por 17 miembros y todos ellos a excepción de uno conservan el motivo canónico de unión a RBR1, LXCXE, en su amino terminal (**Figura 5**). La excepción se trata de *ZmCycD6;1* y por ser la única que carece del motivo fue que despertó el interés de nuestro grupo de investigación.

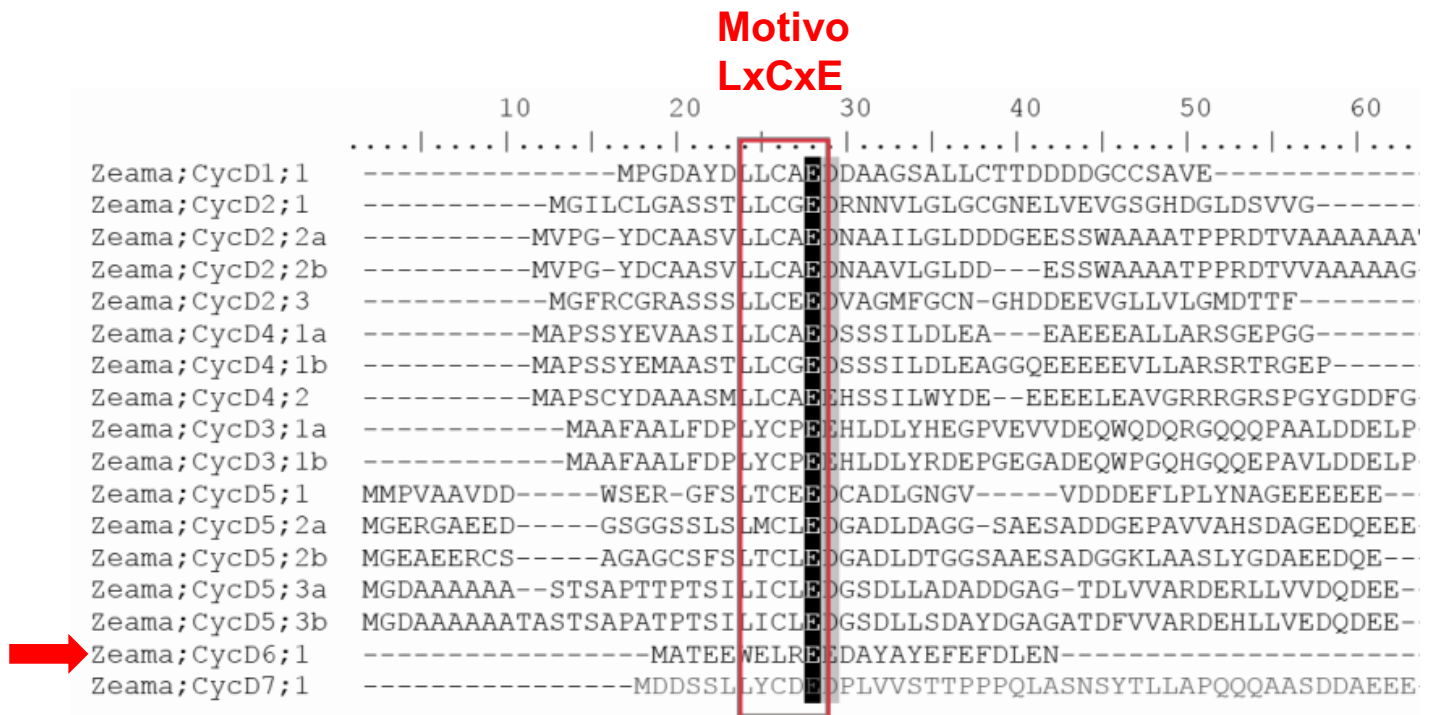


Figura 5. Ciclinas tipo D de maíz. Alineamiento de la región amino terminal de las 17 ciclinas D de maíz donde se puede observar que 16 de ellas conservan el motivo LXCXE, pero *ZmCycD6;1* no (señalada con la flecha roja). Modificado de Buendía et al., 2011.

La proteína *ZmCycD6;1* ha sido detectada en ejes embrionarios durante la germinación y se ha determinado que sus niveles proteicos responden diferencialmente a hormonas como ácido indol-3-acético, ácido abscísico y también a sacarosa. Además, mediante estudios *in vitro* se observó que *ZmCycD6;1*, aún careciendo del motivo LXCXE, es capaz de asociarse y fosforilar (en compañía de una CDK) el dominio *pocket* (RBR^{PD}) y el carboxilo terminal (RBR^{CT}) de *ZmRBR1*. Esto se confirmó al realizar estudios con inmunoprecipitados de *ZmCycD6;1* y utilizando a RBR^{PD} como sustrato de fosforilación (Tesis de licenciatura Zamora-Zaragoza 2012; Tesis de maestría Zamora-Zaragoza 2015; Tesis de licenciatura González-Orozco, 2017).

Estos hechos dieron pauta para pensar que *ZmCycD6;1*, a diferencia de las otras 16 ciclinas tipo D de maíz que sí conservan el motivo LXCXE, interacciona con *ZmRBR1* a través de una región distinta y que esto podría significar la existencia de un mecanismo nuevo en la dinámica de interacción de estos reguladores del ciclo celular en maíz.

3.0 Justificación

Varios estudios en plantas han determinado que las familias que componen la maquinaria de regulación del ciclo celular son multigénicas y con ello se ha inferido que hay cierta redundancia funcional. Sin embargo, estudios de ciclinas D de maíz (familia con 17 genes reportados) sugieren que podrían tener papeles específicos, pues se ha demostrado que tienen expresión, respuestas a estímulos e interacciones diferenciales. *ZmCycD6;1* es un miembro de la familia con una característica atípica ya que es la única que carece del motivo LXCXE. Por ello resulta importante su estudio, especialmente en la interacción con la proteína *ZmRBR1*, pues esta diferencia podría sugerir que dicha ciclina tiene una dinámica de asociación diferente y podría dar lugar a un mecanismo específico en regulación del ciclo celular.

4.0 Hipótesis

Dado que *ZmCycD6;1* carece del motivo canónico LXCXE en la región N-terminal, pero aun así es capaz de interaccionar con *ZmRBR1*, entonces *ZmCycD6;1* tiene otra región en su secuencia proteica para su asociación con *ZmRBR1*.

5.1 Objetivo general

Determinar la región de *ZmCycD6;1* que interacciona con *ZmRBR1*.

5.2 Objetivos particulares

- Verificar *in silico* que *ZmRBR1* conserve la región de interacción que se asocia con el motivo LXCXE de las ciclinas tipo D
- Demostrar la interacción *in vitro* de *ZmRBR^{PD}* con *ZmCycD2;2a*, una ciclina canónica de maíz que sí conserva el motivo LXCXE.
- Fragmentar a *ZmCycD6;1* o realizar alguna mutación estratégica para probar la interacción con *ZmRBR1^{PD}* mediante ensayos de *pull-down* con proteínas recombinantes.
- Realizar ensayos de interacción mediante doble híbrido en levaduras para determinar la interacción de *ZmCycD6;1* y *ZmRBR^{PD}*

6.0 Resultados

6.1 Búsqueda *in silico* de la región en *ZmRBR1* que interacciona con el motivo LXCXE

Las ciclinas tipo D de maíz han sido objeto de estudio en nuestro grupo de investigación y desde que se observó que los 17 miembros de la familia (a excepción de CycD6;1) poseían el motivo de interacción LXCXE, se propuso que la asociación de estas proteínas con RBR se conservaba también en este sistema de estudio. Sin embargo, hasta ahora no se había analizado a detalle si la proteína *ZmRBR1* conservaba en su secuencia de aminoácidos, las regiones responsables de interaccionar con tal marca de las ciclinas.

Gracias a estudios de cristalografía realizados por Dahiya y colaboradores (2000) con el dominio *pocket* RB de humano y un péptido que contenía la secuencia LXCXE, se determinó cuáles eran los residuos de aminoácidos de *HsRB* que participaban en la interacción, encontrándose que Tyr 709, Lys 713, Tyr 756 y Asn 757 son los más importantes. Al realizar un alineamiento de las secuencias proteicas de RB de humano, RBR de *Arabidopsis thaliana* y RBR1 de maíz, se encontró que estos aminoácidos están conservados (en posiciones equivalentes) en sus homólogos de plantas, y no sólo estos residuos, sino otros aledaños también (**Figura 6**).

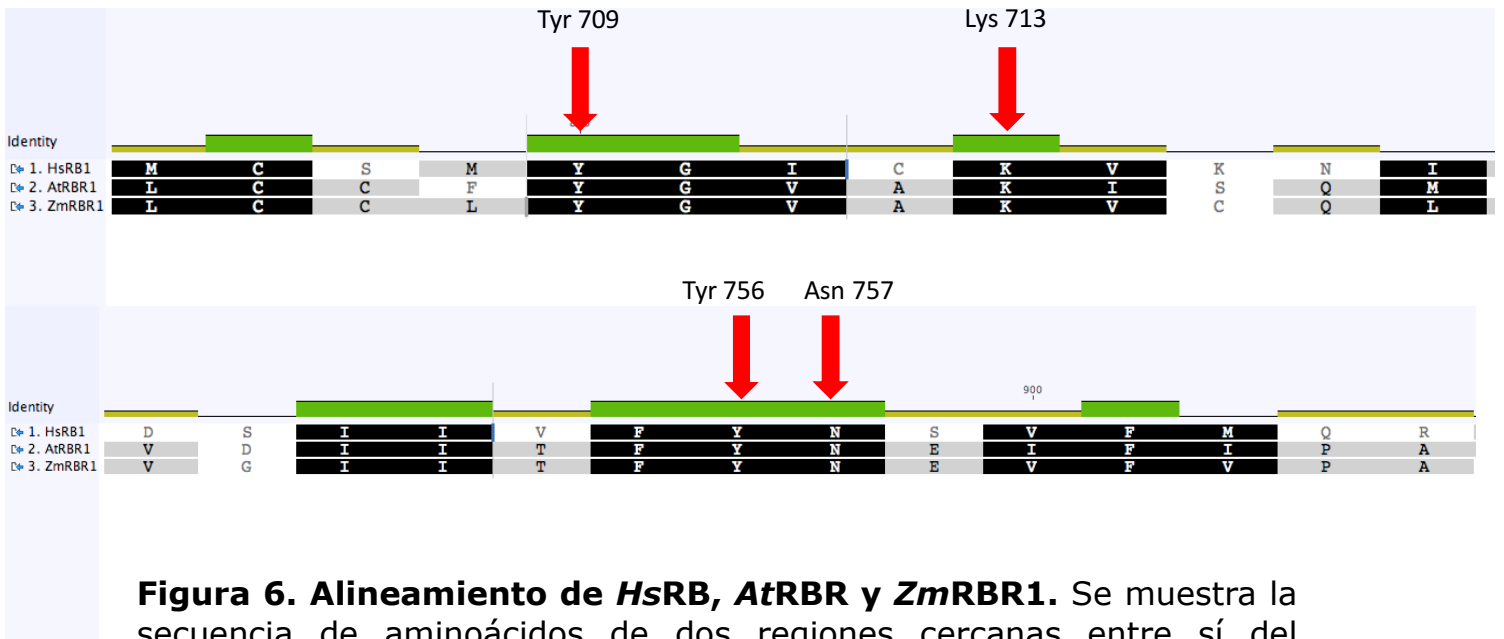


Figura 6. Alineamiento de HsRB, AtRBR y ZmRBR1. Se muestra la secuencia de aminoácidos de dos regiones cercanas entre sí del dominio *pocket* de estas proteínas; las flechas señalan a los aminoácidos importantes en la interacción con el motivo LXCXE, los cuales se conservan en las tres especies.

Cabe señalar que aunque no se muestran en el alineamiento, los otros miembros de la familia *pocket* de maíz *ZmRBR2*, *ZmRBR3* y *ZmRBR4*, también conservan estos aminoácidos. Este hecho aporta evidencia de que, así como en mamíferos, las ciclinas tipo D de maíz (y otras proteínas que poseen el motivo LXCXE) podrían interactuar con cualquiera de las proteínas *ZmRBR* a través de esta región y a su vez nos da una idea de la conservación de secuencias y de la vía en plantas y animales.

6.2 Interacción del motivo *pocket* de RBR1 de maíz con la ciclina canónica CycD2;2a

A finales de los años 90, se demostró que varias ciclinas tipo D de *Arabidopsis* eran capaces de interactuar con el dominio *pocket* de

RBR1 de maíz por el motivo LXCXE que conservan en su región N-terminal (Ach et al., 1997; Huntley et al., 1998); los trabajos que lo comprobaron se realizaron con las proteínas de estas dos especies porque aún no se había clonado ninguna ciclina de maíz (ni a RBR1 de *Arabidopsis*). Sin embargo, debido a que se observó una clara conservación de las proteínas y las interacciones de la vía CycD/RBR/E2F, se obvió que las ciclinas tipo D de maíz también interaccionaban con RBR1 de maíz.

Nuestro grupo de investigación ha caracterizado varias ciclinas de este sistema y una de las propiedades que se ha descrito de ellas es su capacidad de formar complejos con *ZmCDKA1;1* y fosforilar a *ZmRBR1* (Gutiérrez et al., 2005; Lara-Núñez et al., 2008; Godínez-Palma et al., 2013). Sin embargo, no se había demostrado que la unión de los complejos CycD/CDKs con *ZmRBR1* (para fosforilarla) fuera a través de las ciclinas, por lo que nuestro primer interés en este proyecto fue determinar la interacción proteína-proteína entre RBR1 y una ciclina que conserva el motivo LXCXE canónico en el amino terminal, como *ZmCycD2;2a*.

Es importante mencionar en este punto que, en los trabajos previos mencionados, no se ha empleado a la proteína *ZmRBR1* completa dado que es de gran tamaño e inestable; en su lugar se ha utilizado sólo el dominio *pocket*, el dominio de carboxilo terminal o la fusión de éstos. Para este trabajo se propuso emplear sólo el dominio *pocket* de *ZmRBR1* (denominado RBR1^{PD}) dado que, como se explicó en la introducción, es el dominio más conservado y con el que interaccionan las ciclinas D.

Para determinar la interacción de RBR1^{PD} y CycD2;2a de maíz se emplearon proteínas recombinantes obtenidas de *E. coli* para realizar ensayos de *pull-down* con una resina de afinidad. La proteína recombinante CycD2;2-MBP fungiría como la proteína de anclaje y, por lo tanto, con ésta se comenzó a estandarizar la técnica; en la **Figura 7** se puede observar (tanto en el gel con tinción de azul de Coomassie como en el Western blot) la sobreexpresión de la proteína (en los carriles T₀ y T_f), su presencia en la fracción soluble (FS) que se obtiene después de lisar las células que la sobreexpresaron, así como en la fracción no adsorbida (FNA), la cual contiene a la proteína que no se unió a la resina. Finalmente se puede observar que en las fracciones E1-E6 (correspondientes a las eluciones) la proteína CycD2;2-MBP es detectada y se encuentra purificada, lo cual nos indica que la resina es efectiva para el anclaje de ésta. Para ensayos posteriores sólo se usaron las fracciones E2 y E3 debido a que en éstas se detecta la mayor cantidad de proteína.

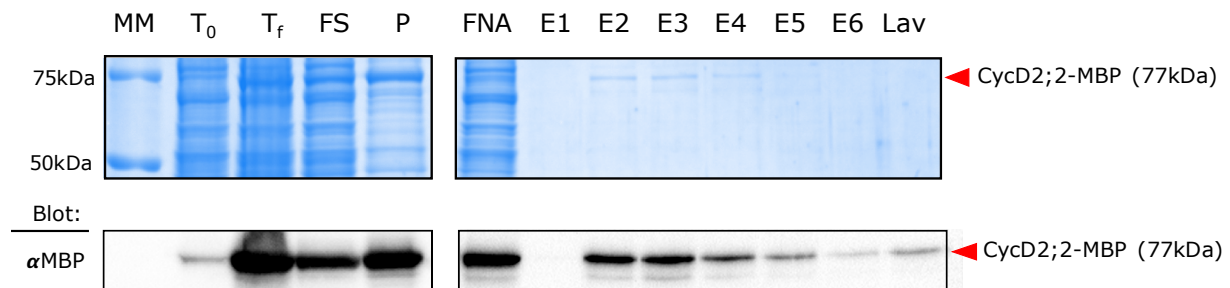


Figura 7. Estandarización y purificación de CycD2;2-MBP. Los paneles superiores corresponden a los geles con tinción de azul de Coomassie y los de abajo a los Western blots donde se observa el proceso de purificación de CycD2;2-MBP. Abreviaciones: MM=Marcador de masa molecular; T₀=Fracción no inducida; T_f=Fracción inducida; FS=Fracción soluble; P=Pellet celular; FNA=Fracción no adsorbida; E1-6=Eluciones; Lav= Lavado final de la resina.

Paralelo a lo anterior, se realizaron dos experimentos control, el primero fue para demostrar que la proteína GST-RBR^{PD} no interacciona directamente con la resina de amilosa y, por lo tanto, su presencia en las eluciones estaría dada por la interacción específica y co-elución con la proteína CycD2;2-MBP (**Figura S4**). En el segundo control se demostró que la proteína de fusión, GST, no participa en la asociación de las proteínas de estudio (**Figura S5**).

Después de esta estandarización se procedió a determinar si la otra proteína de interés, GST-RBR^{PD}, es capaz de interaccionar directamente y co-eluir con CycD2;2-MBP. La **Figura 8** muestra los resultados del ensayo de interacción de estas proteínas recombinantes a través de un Western blot; en los primeros dos carriles del panel superior (T₀ y T_f) se puede observar la inducción de la proteína CycD2;2a-MBP y también su presencia en la fracción soluble (FS). Algo importante de mencionar es que, en los carriles T₀ y T_f que corresponden a las muestras de inducción de GST-RBR^{PD}, el anticuerpo anti-MBP no reconoce ninguna banda, lo que significa que no presenta detección cruzada o inespecífica.

En el Western blot del panel inferior (donde se usaron exactamente las mismas muestras del primero pero ahora reveladas con el anticuerpo anti-GST), se puede observar la sobreexpresión de GST-RBR^{PD} (T₀ y T_f) y su presencia en la fracción soluble (FS). Así mismo, la proteína pudo ser detectada en las fracciones de elución E2 y E3 lo que nos indicó que GST-RBR^{PD} fue capaz de interaccionar con CycD2;2a (que estaba anclada a la resina) y después las proteínas co-eluyeron.

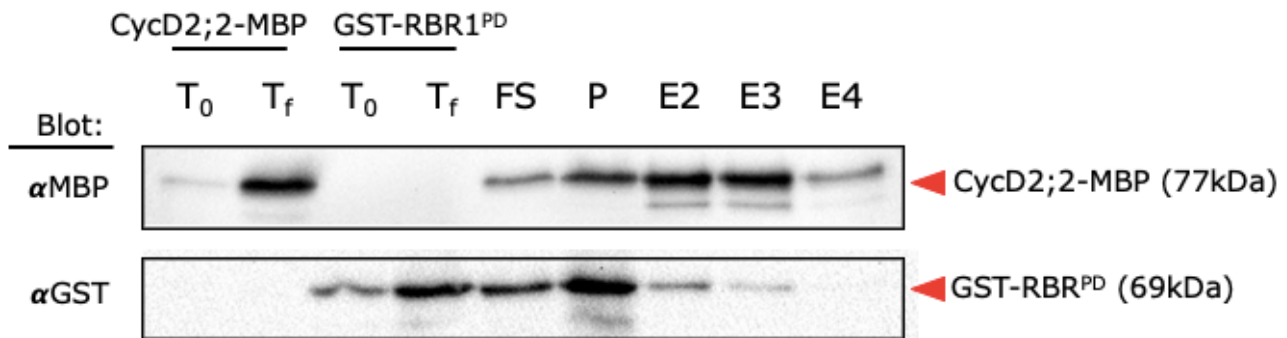


Figura 8. Ensayo de interacción entre CycD2;2 y RBR1^{PD}. El panel superior corresponde al western blot con el anticuerpo que revela la presencia de CycD2;2-MBP y el inferior donde se revela a GST-RBR1^{PD}. La presencia de ambas proteínas en las eluciones confirma su interacción. Abreviaciones: MM=Marcador de masa molecular; T₀=Fracción no inducida; T_f=Fracción inducida; FS=Fracción soluble; P=Pellet celular; E1-4=Eluciones.

Con esto se demostró que una ciclina tipo D que conserva su motivo LXCXE, es capaz de unirse directamente al dominio *pocket* de RBR1 de maíz y, por lo tanto, aporta evidencia de que los complejos CycD/CDKs utilizan a la ciclina como la subunidad de reconocimiento para interactuar con *ZmRBR1* y en conjunto con una CDKA pueda fosforilar a este regulador.

6.3 Identificación y mutación del motivo LXCXE-Like de *ZmCycD6;1*

Se había reportado que *ZmCycD6;1* también es capaz de interactuar con *ZmRBR1* a pesar de que carece del motivo LXCXE (Tesis de maestría Zamora-Zaragoza, 2015). Esto quiere decir que *ZmCycD6;1* podría tener una región o motivo distinto que medie la asociación con *ZmRBR1*. Para explicar esto, primero se había planteado la posibilidad de fragmentar a la ciclina con base en sus dominios y realizar ensayos con las proteínas

recombinantes resultantes para así identificar la región por la que se da esta unión. Sin embargo, un análisis *in silico* minucioso de las secuencias de las ciclinas D de maíz evidenció algo que cambió el rumbo de la estrategia.

Al analizar la secuencia proteica de *ZmCycD6;1* se encontró que, en su región cercana al carboxilo terminal (del aminoácido 246 al 251), presenta un motivo LXCXE-like (LRECGE) (**Figura 9**). Esto llevó directamente a la pregunta de si es mediante este motivo semi-conservado que *ZmCycD6;1* podría interactuar con *ZmRBR1*.

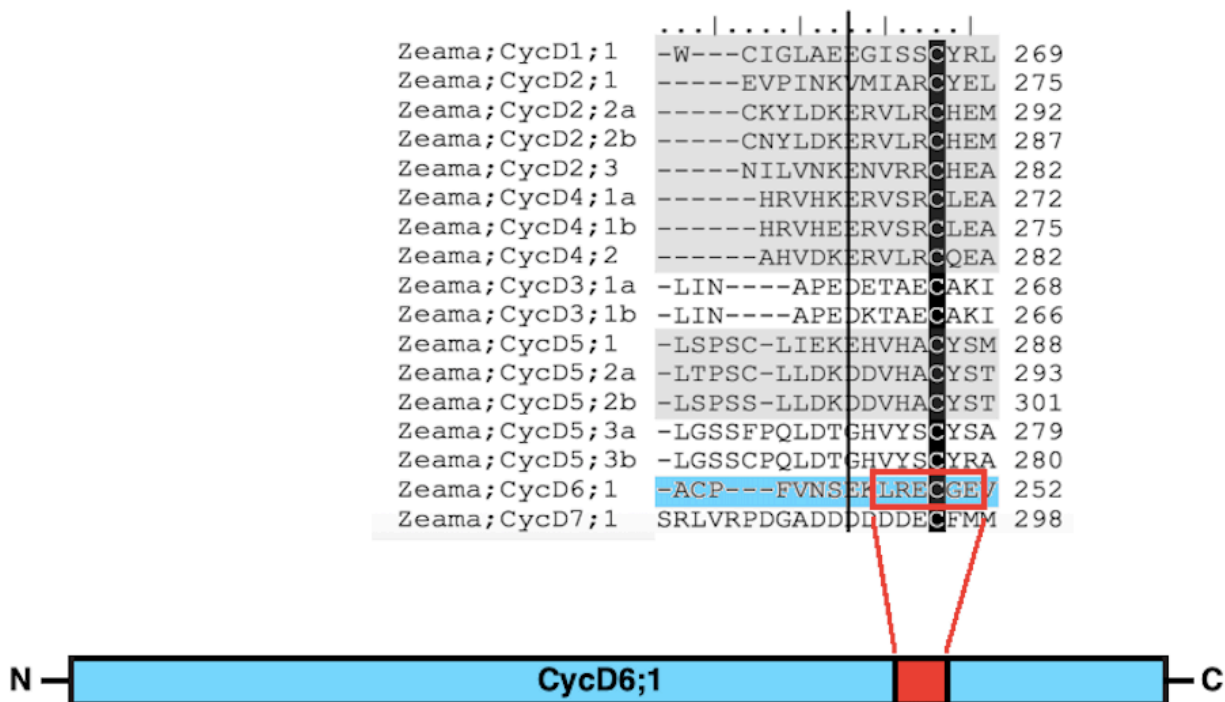


Figura 9. Carboxilo terminal de las ciclinas D de maíz. En este alineamiento se observa un grado de conservación importante en esta región de las ciclinas, sobre todo del aminoácido Cisteína (C) que está presente en los 17 miembros de la familia (modificado de Buendía et al., 2011).

Este hallazgo se volvió aún más interesante al encontrar que otras ciclinas D de maíz, además de su motivo conservado en el amino terminal, también tienen un LXCXE canónico (CycD2;2a, CycD2;2b y CycD4;2) o un LXCXE-like (CycD2;1, CycD2;3, CycD4;1a y CycD4;1b) en esta zona cercana al carboxilo terminal de sus secuencias proteicas, sustentando la posibilidad de que esta región pudiera tener una función importante en esta familia de proteínas (**Figura 9**).

Para contestar de manera concreta si este motivo LXCXE-like de *ZmCycD6;1* que se encontró en el C-terminal es el responsable de la interacción con *ZmRBR1*, se propuso llevar a cabo mutagénesis sitio-dirigida mediante PCR para modificar el motivo y ver si se afectaba la asociación de las proteínas. Una vez realizada la mutación y confirmada mediante secuenciación se obtuvo una construcción a la que se denominó MutD6;1.

6.4 Interacción comparativa entre RBR1^{PD} y las dos versiones de CycD6;1

Para realizar un ensayo de interacción donde se pudiera comparar la interacción de RBR1^{PD} con las dos versiones de la ciclina y así analizar el efecto de la modificación del motivo LXCXE-like, se necesitaba que ambas proteínas recombinantes tuvieran el mismo TAG, así que se subclonaron en el vector de expresión pHMGWA, el cual provee del tag MBP a las proteínas (**Figura S3**).

Una vez teniendo a CycD6;1 WT y MutD6;1 con el mismo tag (MBP) y a RBR^{PD} (con GST) se procedió a realizar las interacciones *in vitro* de forma simultánea para determinar si la mutación en CycD6;1 afectaba la

asociación con RBR^{PD}; esta vez RBR1^{PD} fungió como proteína de anclaje a través de su tag GST. En la **Figura 10** se muestra el perfil de elución de CycD6;1 y MutD6;1 de su respectivo ensayo de *pull-down* y se puede observar que en el experimento con MutD6;1 hay una clara disminución en la cantidad de proteína que co-eluye con RBR1^{PD}.

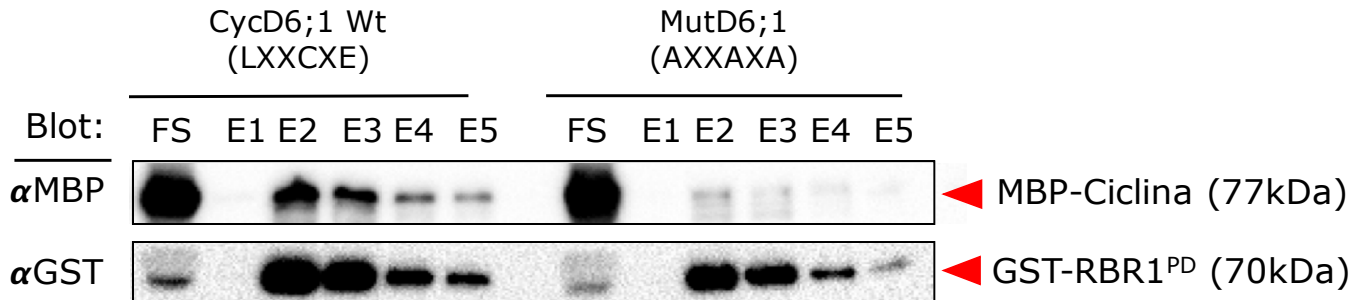


Figura 10. Ensayo de interacción comparativa entre RBR1^{PD} y las dos versiones de CycD6;1. Western blot del perfil de elución de las proteínas de estudio; la proteína de anclaje, GST-RBR1^{PD}, eluye de forma muy similar en ambos experimentos (panel inferior) pero las dos versiones de CycD6;1 no, pues la mutante eluye en menor cantidad que la versión wild-type. Abreviaciones: FS=Fracción soluble; E1-5=Eluciones.

Por otro lado, se realizó un experimento control donde se demostró que ninguna de las dos versiones de la ciclina interacciona directamente con la resina de glutatión (**Figura S6**), validando así su asociación específica con la proteína GST-RBR1^{PD} presente en el experimento.

Esto en conjunto indica que el motivo LXXCXE-like que tiene *ZmCycD6;1* en su región cercana al carboxilo es importante para que la proteína pueda interaccionar con el dominio *pocket* RBR1 de maíz.

6.5 Ensayos de doble de híbrido en levaduras

Con el propósito de confirmar la interacción diferencial de las dos versiones de la ciclina, se realizaron ensayos de doble híbrido en levaduras con la intención de emplear un sistema diferente (*in vivo* eucariote) para reforzar nuestro resultado obtenido *in vitro*.

Los ensayos de doble híbrido tienen su fundamento en la reconstitución de la actividad de un factor transcripcional que es capaz de promover la expresión de genes reporteros en la levadura, en función de la interacción de las proteínas de interés. Para estos experimentos se ocupó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 con su sistema reportero LexA y β -galactosidasa.

En la siguiente serie de figuras se muestra el crecimiento de las levaduras en presencia de leucina (paneles izquierdos), que demuestra que las levaduras fueron transformadas correctamente, y por otro lado, cuando se cultivan en medio sin leucina (paneles derechos) sólo se verán crecer si las proteínas problema están interactuando entre sí.

Primero, se realizaron controles generales y específicos para validar y estandarizar el sistema; para ello se utilizó como referencia positiva de interacción a las subunidades α y β de una proteína G de humano y como control negativo a los vectores vacíos. Cuando las proteínas α y β son ensayadas se puede observar el crecimiento de las levaduras en medio sin leucina (en todas las diluciones), lo que significa que son capaces de interactuar; por otro lado, cuando se transforma con los vectores vacíos sólo hay un crecimiento marginal indicando que no hay

nada en el sistema que active de manera significativa los genes reporteros (**Figura 11**).

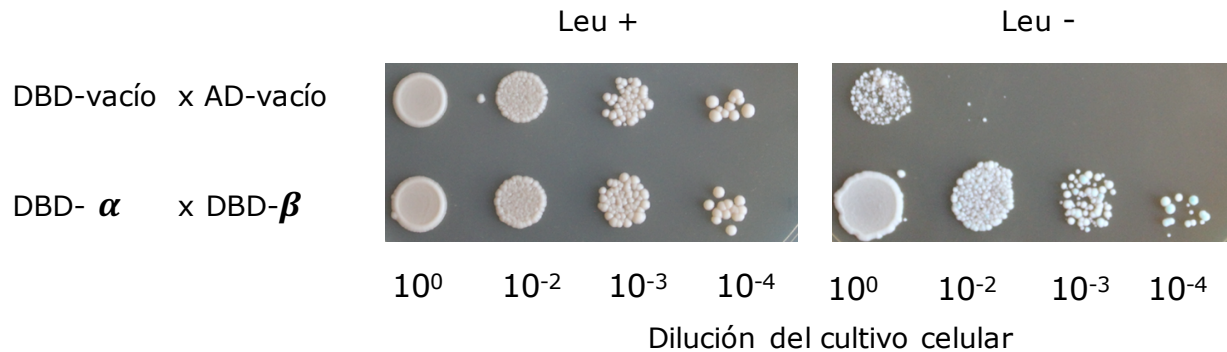


Figura 11. Controles generales para estandarización del doble híbrido. Las proteínas α y β interactúan y hacen posible el crecimiento de las levaduras en todas las diluciones, mientras que cuando se usan los vectores vacíos el crecimiento es muy pobre. Abreviaciones: DBD=Dominio de unión a DNA; AD=Dominio de activación.

Posteriormente, se usó como otro control positivo a las proteínas *ZmRBR1^{PD}* y *ZmE2FA/B1;1* (ésta última generada y proporcionada por QFB. Samantha Romero Rodríguez) con el objetivo de tener como referencia una interacción de proteínas de nuestro modelo de estudio (maíz) y de las cuales se tiene más evidencia de su asociación. Como puede observarse en la primera línea de la **Figura 12**, en el panel derecho, las levaduras crecen abundantemente donde no hay dilución (10^0) y pobremente en la dilución 10^{-2} , sin embargo, la coloración azul de las colonias evidencia la activación del gen reportero β -galactosidasa, lo cual confirma la interacción de *RBR1^{PD}* y *E2FA/B1;1*.

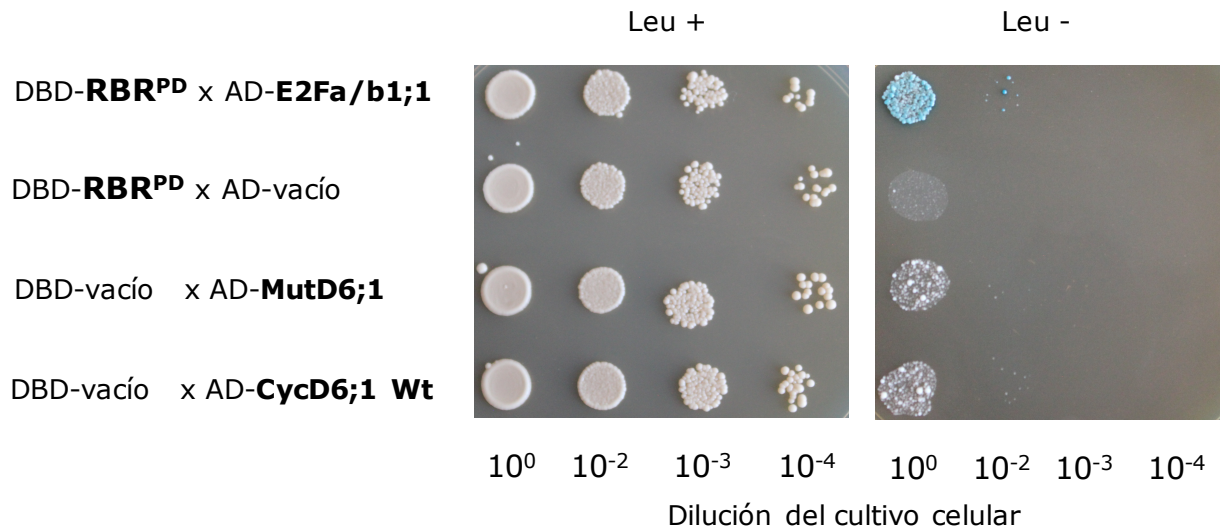


Figura 12. Controles específicos del doble híbrido. Se observa crecimiento y pigmentación azul en el ensayo con RBR1^{PD} y E2Fa/b1;1, lo que indica que hay interacción entre estas proteínas; por otro lado al utilizar combinaciones con uno de los vectores vacíos, no hay crecimiento de las levaduras. Abreviaciones: DBD=Dominio de unión a DNA; AD=Dominio de activación.

Así mismo se realizaron otros controles negativos donde se utilizaron combinaciones de los vectores vacíos y los vectores que tienen codificadas las proteínas de interés; con ello se verificó que CycD6;1, MutD6;1 y RBR1^{PD} no son capaces de activar la expresión de los genes reporteros por si solas, pues el crecimiento de las levaduras fue marginal o prácticamente nulo (**Figura 12**).

Finalmente, al realizar los ensayos con las proteínas de estudio, no se pudo observar la interacción de RBR1^{PD} con CycD6;1 Wt ni con su versión que fue modificada en el motivo LXCXE-like (MutD6;1), ya que no hubo crecimiento de las levaduras cuando fueron transformadas con los vectores correspondientes (**Figura 13**).

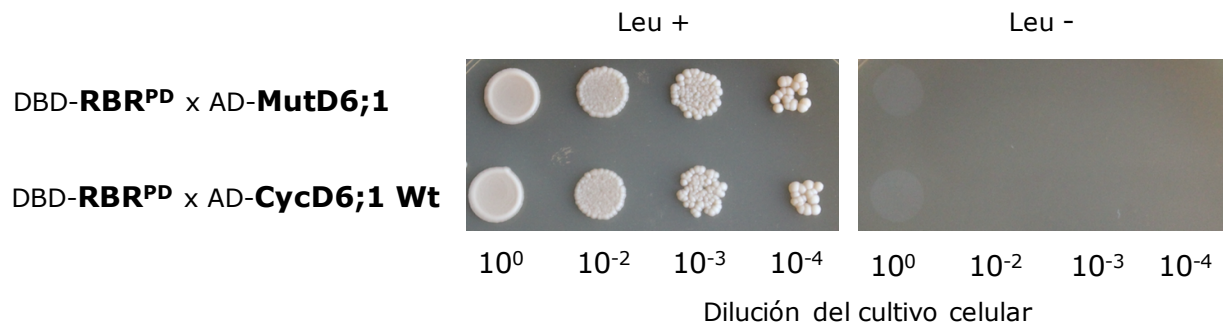


Figura 13. Ensayo de interacción por doble híbrido entre RBR1^{PD} y las dos versiones de CycD6;1. No se observó crecimiento de las levaduras, por lo que no se pudo comprobar la interacción de nuestras proteínas de estudio. Abreviaciones: DBD=Dominio de unión a DNA; AD=Dominio de activación.

Para considerar todas las posibilidades de nuestro sistema se decidió clonar los CDS de CycD6;1, MutD;1 y RBR1^{PD} en los vectores opuestos. De esta forma, ahora se obtuvieron a las ciclinas en el vector que codifica para el dominio de unión a DNA (DBD) y a RBR1^{PD} con el dominio de transactivación (AD).

Al realizar los ensayos de interacción se pudo observar el crecimiento de las levaduras en medio sin leucina en todas las diluciones, lo que sugiere que había interacción de las proteínas, sin embargo, en los controles negativos donde se encuentran las ciclinas y se usa el otro vector vacío (sin RBR1^{PD}) también presentaron crecimiento, por lo que se concluyó que no se trataba de una interacción específica entre CycD6;1, MutD6;1 y RBR1^{PD} sino de un falso positivo.

Este resultado indicó que tanto CycD6;1 como MutD6;1 de alguna forma estaban activando la expresión de los genes reporteros. Para comprobar esto se propuso realizar ensayos de transactivación, los cuales se emplean para determinar si una proteína es capaz de reclutar la maquinaria de transcripción y activar la expresión de genes de un sistema. Ese tipo de prueba es común que se realice a proteínas de las cuales se tiene sospecha y/o evidencia que son factores de transcripción; por ello se utilizó como control positivo al factor transcripcional *ZmE2Fa/b;1*, pues en la tesis de licenciatura de Romero-Rodríguez (2019) ya se había reportado que esta proteína era capaz de activar la transcripción en este sistema de levaduras.

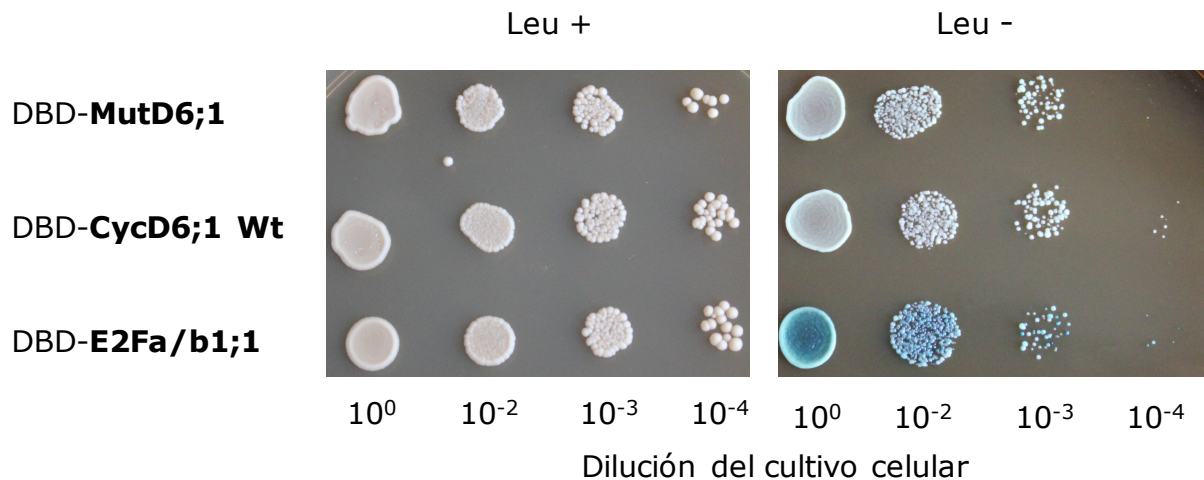


Figura 14. Ensayos de transactivación de CycD6;1 Wt y MutD6;1. Ambas versiones de la ciclina son capaces de activar la transcripción en este sistema de levaduras de forma similar a como lo hace el factor transcripcional E2Fa/b1;1. Abreviaciones: DBD=Dominio de unión a DNA.

Al realizar los ensayos de transactivación con CycD6;1 y MutD6;1 se observó el crecimiento de las levaduras en medios sin leucina de forma similar a como crecen las levaduras que expresan E2Fa/b1;1; con esto se confirmó la capacidad de ambas versiones de la ciclina para activar la transcripción (**Figura 14**).

Algo a destacar es que las colonias del ensayo con E2Fa/b1;1 presentan pigmentación azul (es decir, que se está activando el gen reportero de B-galactosidasa), lo que significa que la capacidad de E2Fa/b1;1 para activar la transcripción es más eficiente que las ciclinas, lo cual es lógico, ya que es un factor transcripcional como tal (**Figura 14**).

Las razones por las que no se pudo observar la interacción CycD6;1 y MutD6;1 con RBR1^{PD} podrían ser varias, podría estar implicado el plegamiento de las proteínas o la participación de proteínas de la levadura que podrían ingerir en la interacción. Por otro lado, la capacidad de las ciclinas para activar la transcripción cuando están fusionadas al dominio de unión de DNA fue un resultado no esperado que se abordará en la discusión de resultados.

7.0 Discusión

La proteína RB ha sido ampliamente estudiada en humanos ya que está relacionada con muchos tipos de cáncer. Se han dilucidado muchos detalles de la función de este regulador en el ciclo celular y otros procesos moleculares, pero algo muy interesante de resaltar es que con los años se ha descubierto que RB y la vía principal en la que participa, además de estar conservada en los mamíferos también se encuentra en plantas.

El primer homólogo de RB de plantas en clonarse y comenzarse a estudiar fue RBR1 de maíz; en esos primeros estudios se observó que *ZmRBR1* era capaz de unirse a ciclinas tipo D de *Arabidopsis* (Huntley et al., 1998) y años más tarde se determinó que complejos CycD/CDKs de tabaco, pueden fosforilar tanto a la proteína RBR de su sistema (*NtRBR1*) como a RB de humanos (Nakagami et al., 2002). Esto evidenció que RBR y las ciclinas D de plantas son proteínas conservadas y, por lo tanto, importantes para la regulación del ciclo celular así como lo hacen en animales.

Por otro lado, además de la "caja ciclina", la existencia de las ciclinas D en plantas se determinó por la conservación del motivo LXCXE en el amino terminal de su secuencia proteica, que de mamíferos se sabía que participa para mediar la interacción con miembros de la familia *pocket* (Wang et al., 2004). Además, se demostró que también en las plantas existen proteínas distintas a las ciclinas D que poseen el motivo LXCXE y les permite interaccionar con RBR, como es el caso del factor transcripcional SCR (implicado en la regulación de la división asimétrica de células troncales en la raíz de *Arabidopsis*) o XND1 (relacionado con

la diferenciación de células troncales del xilema)(Cruz-Ramírez et al., 2012; Zhao et al, 2017).

En maíz, distintos fragmentos de RBR1 se han utilizado como sustrato de fosforilación para el estudio de la actividad de cinasa de complejos CycD/CDKs (Gutiérrez et al., 2005; Lara-Núñez et al., 2008; Godínez-Palma et al., 2013), sin embargo, no se había estudiado a fondo la asociación de las ciclinas con RBR1 en este sistema. Si bien se sabe que todos los miembros que conforman la familia de ciclinas tipo D de maíz poseen el motivo canónico de unión a RB, a excepción del miembro CycD6;1, no se conocía si la proteína *ZmRBR1* conservaba la región homóloga (respecto a RB de humanos) responsable de interaccionar con el motivo LXCXE de las ciclinas D u otras proteínas.

El alineamiento en la **Figura 6** muestra que tanto RBR1 de *Arabidopsis* como RBR1 de maíz, conservan los aminoácidos de *HsRB* que antes habían sido identificados como los importantes en la interacción con el motivo LXCXE (Dahiya et al., 2000). Estas regiones de *AtRBR1* y *ZmRBR1* pertenecen al dominio *pocket*, y su conservación es sustentada por lo reportado por Sabelli y colaboradores (2005), quienes encontraron que en el dominio *pocket* de esta familia de proteínas en plantas, es el más conservado respecto al de mamíferos. Lo anterior sugiere que dicha región y aminoácidos de *ZmRBR1* son los implicados en la interacción con el motivo LXCXE de las ciclinas D (u otras proteínas que poseen esta marca) en este sistema vegetal.

Por otro lado, un estudio más reciente en mamíferos determinó que además de estas regiones conservadas del dominio *pocket*, RB tiene otra secuencia y una estructura particular que es crucial para la

interacción con las ciclinas D. Se trata de una hélice situada en el carboxilo terminal de la proteína, sin embargo, no está conservada en plantas (Topacio et al., 2019).

Cuando se observó que CycD6;1 de maíz era el único miembro de su familia que no tenía el motivo LXCXE, se planteó que esta ciclina no podría asociarse a RBR1 pero no fue así, ya que ensayos *in vitro* demostraron que estas proteínas son capaces de interactuar (Buendía et al., 2011; Tesis de maestría de Zamora-Zaragoza, 2015). Entonces ¿cuál era el motivo o región de CycD6;1 que estaba mediando la interacción con RBR1?

Al revisar a detalle la secuencia proteica de CycD6;1 al inicio de este proyecto, se encontró que hacia su región carboxilo terminal existe un motivo LXCXE semi-conservado (LRXCXE) y, al alinear esta región con las demás ciclinas de maíz, se descubrió que tienen un considerable grado de conservación en dicha región. Se encontró que las ciclinas CycD2;2a, CycD2;2b y CycD4;2 poseen un motivo LXCXE canónico y las ciclinas CycD2;1, CycD2;3, CycD4;1a, CycD4;1b y CycD6;1 tienen modificado sólo el primer aminoácido del motivo (L) pero conservan los otros dos (C y E). Esto nos llevó a pensar que dicha región del carboxilo terminal podría ser importante para la interacción de estas proteínas, especialmente con RBR1.

Fue así como la mutación de este motivo semi-conservado de CycD6;1 pasó a ser el experimento candidato para resolver nuestra pregunta de investigación. Los ensayos con las proteínas recombinantes demostraron que, al ser modificada esta marca de aminoácidos de la ciclina, la interacción con RBR^{PD} se ve considerablemente afectada, confirmando

parcialmente que este motivo LXCXE-like es importante para la asociación de CycD6;1 con RBR1 de maíz.

Lo anterior nos lleva a considerar que esta marca de aminoácidos en el carboxilo terminal de CycD6;1 podría tener aún más trascendencia en la familia de ciclinas D de maíz o incluso en las plantas en general, porque además de las varias ciclinas D de maíz que conservan un motivo canónico o uno semi-conservado en dicha región, se encontró que las ciclinas CycD3;2 y CycD3;3 de *Arabidopsis* también poseen un LXCXE-like, mientras que en arroz (una planta filogenéticamente más cercana al maíz) las ciclinas CycD2;2, y CycD4;2 conservan el motivo canónico y las ciclinas CycD2;1 y CycD4;1 un LXCXE-like, en la región análoga.

Con estos datos ahora sabemos que varias ciclinas tipo D de maíz, arroz y de *Arabidopsis* tienen dos motivos LXCXE, uno en el amino y otro en el carboxilo. Esta característica parece ser particular de estas proteínas en plantas comparada con los mamíferos ya que, al revisar las secuencias de ciclinas tipo D de humanos y de ratón, se observó que no conservan estos aminoácidos en la región carboxilo correspondiente. Se sabe que *HsCycE* sí tiene un motivo semi-conservado de unión a RB hacia su carboxilo terminal, sin embargo, la relación de *HsCycE* con las Ciclinas D de plantas no es muy cercana filogenéticamente y, por lo tanto, no nos permite especular sobre una relación del motivo entre estas proteínas (Menges et al., 2005).

Por lo ya mencionado, ahora sería muy interesante determinar si en las ciclinas D de plantas que poseen los dos motivos LXCXE, ambos son funcionales en la interacción con RBR; si fuera así se podría especular sobre un mecanismo aún más complejo del que se tenía pensado y

reportado sobre la interacción de proteínas con esta marca y RBR: ¿los dos motivos LXCXE están expuestos en la superficie estructural de las ciclinas? ¿Uno de ellos podría quedar oculto por la interacción con alguna otra proteína (CDK, KRP, etc) pero el otro estar expuesto y disponible para mediar la asociación de la ciclina con RBR? ¿Esto dependería de un momento celular específico? ¿Podría regular un paso de algún mecanismo molecular en particular?.

Respecto a las dos últimas interrogantes, existe evidencia de mecanismos muy específicos en la fisiología de las plantas; por ejemplo, se reportó que *CycD6;1* de *Arabidopsis* se expresa en un tipo celular muy específico del meristemo radicular (llamado células iniciales de Corteza/Endodermis) y que esta ciclina, en conjunto con el factor transcripcional SCR, participan en la división asimétrica de dichas células troncales para hacer perdurar su identidad totipotencial y, al mismo tiempo, generar una célula tejido-específica (de corteza o endodermis). Cabe resaltar que en el mecanismo de este proceso está involucrada la interacción con *AtRBR* a través del motivo LXCXE de SCR (Cruz-Ramírez et al., 2012).

De igual forma, en un estudio más reciente, *CycD6;1* de *Arabidopsis* se ha visto involucrada en la regeneración celular que necesita la raíz cuando existe daño en las células de la corteza contiguas a la endodermis, esto mediante la reactivación de funciones totipotenciales promovidas por *AtCycD6;1* y los factores transcripcionales SHR y SCR (Marhava et al., 2019).

En el maíz, se ha reportado que la localización tisular de *ZmCycD6;1* no es tan específica como su homólogo en *Arabidopsis*, pues se ha observado distribuida a lo largo de la punta de la raíz. Sin embargo, se tiene que considerar que el meristemo radicular del maíz es mucho más complejo, pues mientras el centro quiescente de *Arabidopsis* (que está inmerso en el meristemo) es de tan solo cuatro células, el de maíz es de alrededor de 1000 células. Es por ello que, hasta la fecha, ha sido difícil determinar con exactitud las fronteras de los tipos celulares en el meristemo radicular de nuestro modelo de estudio (Tesis de Zamora-Zaragoza, 2015; Jiang et al, 2003).

Sin embargo, estudios con proteínas recombinantes e inmunoprecipitados de extractos de maíz han revelado que *ZmCycD6;1* tiene comportamientos diferenciales respecto a otras ciclinas D de maíz, por ejemplo, en la interacción con KRPs y en la actividad de cinasa en complejo con CDKs (Godinez-Palma et al., 2017). Lo anterior, de alguna forma nos sugiere que *ZmCycD6;1* sí podría tener un papel específico en algún mecanismo y/o momento celular en la germinación o desarrollo del maíz.

Por otro lado, los resultados obtenidos de los ensayos de doble híbrido en este trabajo no fueron concluyentes. En primer lugar, porque no se pudo determinar la interacción de las proteínas de estudio ya que, a pesar de que el sistema fue validado correctamente utilizando controles positivos y negativos de interacción, no se logró observar la asociación de *ZmCycD6;1* Wt ni de *ZmMutD6;1* con *ZmRBR1*^{PD}.

Existen varios factores que pudieron haber limitado o afectado nuestro experimento. No sabemos si al expresarse las proteínas heterólogas en

el sistema, éstas adquieren un plegamiento particular en conjunto con los dominios de unión a DNA o transactivación (con los que van fusionadas) y pudiera generarse algún impedimento estérico para su asociación. Otra posibilidad es que alguna o algunas proteínas endógenas de *S. cerevisiae*, tuvieran afinidad por cualquiera de nuestras proteínas de estudio, generando de igual forma un impedimento físico para su interacción.

Esta última idea toma fuerza al observar los ensayos de transactivación (**Figura 14**), en donde se concluye que tanto CycD6;1 como MutD6;1 son capaces de reclutar a proteínas de la levadura que forman parte de la maquinaria de transcripción y permiten activar los genes reporteros del sistema.

Respecto a la capacidad de *ZmCycD6;1* (y su versión mutada) para activar la transcripción se hizo una búsqueda en la literatura para saber si se había reportado algo parecido en algún otro sistema. Por un lado se encontró evidencia de que a las ciclinas D de humanos se les han determinado funciones no canónicas e independientes de una CDK, y entre esas funciones se encuentra la regulación de la transcripción génica. Se ha visto que las ciclinas D3, D2, pero principalmente ciclina D1, son capaces de regular positiva o negativamente la expresión de genes a través de la interacción con factores de transcripción, coactivadores y correpresores. Por ejemplo, se ha determinado que ciclina D1 modula la expresión del receptor de estrógenos (ER) y ciclina D3 del receptor de andrógenos (AR); también participan en la regulación de genes involucrados en la diferenciación de células neuronales y epiteliales, además de otros procesos celulares (Coqueret, 2002; Fu et al., 2004; Hybring et al., 2016). En plantas, sin embargo, no se

encontraron trabajos que hagan referencia a esta capacidad de las ciclinas de regular la expresión génica de forma independiente de una CDK, ni siquiera en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Como acercamiento a una posible explicación de lo ocurrido en los ensayos de doble híbrido y de transactivación en levaduras, se realizó un BLAST con la secuencia de aminoácidos de *ZmCycD6;1* para buscar alguna proteína endógena de *S. cerevisiae* con la que nuestra proteína de estudio tuviera similitud. La base de datos de NCBI nos mostró que CLB2, una ciclina que participa principalmente en la transición G2/M del ciclo celular de esta levadura, es la proteína más cercana a *ZmCycD6;1* con un 27% de identidad. Posteriormente se realizó la búsqueda del interactoma de CLB2 en la base de datos *Saccharomyces* Genome Database (SGD) y se encontró evidencia de que esta ciclina es capaz de interactuar con algunos factores de transcripción (como FKH1, FKHA2) y coactivadores (como NDD1 y SWI4), por lo que podría jugar un papel en la regulación de la transcripción (referencia anotada como CLB2 interactome).

Con dicha información se puede considerar la posibilidad de que, por esta similitud entre las proteínas, *ZmCycD6;1* pudo haberse asociado con algunos factores endógenos de la levadura y activar la transcripción de los genes reporteros. Lo interesante sería probar si en un sistema vegetal se sigue observando dicha capacidad de esta ciclina (y otras) para regular la expresión de genes de forma independiente de una CDK.

8.0 Conclusiones

La proteína RBR1 de maíz conserva en su dominio *pocket* los aminoácidos que son importantes para la interacción con el motivo LXCXE, como su homólogo de humanos; esto sugiere que es a través de esta región que se da la asociación de RBR1 con las ciclinas D u otras proteínas de maíz que poseen dicho motivo.

Las ciclinas tipo D de maíz además de conservar el motivo LXCXE canónico en el amino terminal como se había reportado, ahora se sabe que también presentan motivos LXCXE canónicos o semi-conservados en la región carboxilo. En el caso particular de la proteína de estudio de este trabajo, *ZmCycD6;1*, se observó que no conserva el motivo en el amino como las otras 16 ciclinas de su familia, pero se encontró que posee un LXCXE-like en el carboxilo terminal. Mediante mutación sitio-dirigida y el uso de proteínas recombinantes se determinó que dicha marca de aminoácidos es importante para la asociación de la proteína con el dominio *pocket* de RBR1 de maíz. Estos resultados aportan evidencia de que las ciclinas D de maíz participan en el reconocimiento de RBR para que en conjunto con una CDK pueda ser fosforilada, se libere al factor de transcripción E2F-DP y se permita el avance el ciclo de celular.

En los ensayos de doble híbrido no se logró ver la interacción de nuestras proteínas de estudio, sin embargo, la naturaleza de estos experimentos permitieron observar una característica inesperada de *CycD6;1*, ya que fue capaz de promover la transcripción por sí misma en el sistema reportero de las levaduras. Esto podría ser un indicio de que las ciclinas tipo D de plantas pueden participar en la regulación de

expresión génica de forma independiente de una CDK, como ya se ha demostrado en otros sistemas.

9.0 Perspectivas

- Dado que no se pudo corroborar la interacción de *ZmCycD6;1* y *ZmRBR1^{PD}* con el doble híbrido, sería muy oportuno realizar otro tipo de ensayos como BiFC para reforzar los resultados obtenidos de los experimentos de *pull-down* con las proteínas recombinantes.

En este trabajo se logró identificar un motivo (del tipo LXCXE-like) en la región carboxilo de la proteína *ZmCycD6;1* que participa en la asociación con *ZmRBR1^{PD}*, sin embargo, fue localizado en una región no canónica, dado que dicha marca de aminoácidos suele estar en el amino terminal de las ciclinas D. Al analizar dicha región carboxilo en toda la familia, se observó que varias ciclinas presentan ahí mismo un motivo LXCXE y que, junto con el que tienen conservado en el amino, entonces poseen dos motivos de este tipo. Estos hechos abren nuevas interrogantes en cuanto al mecanismo de interacción entre las ciclinas D y las proteínas *pocket*.

-Sería interesante determinar si en las ciclinas que tienen los dos motivos LXCXE, ambos son funcionales, es decir, que participen en la interacción con RBR. Esto mediante mutación dirigida y ensayos con proteínas recombinantes, mutando uno de los motivos, luego el otro y finalmente, alterando ambos.

-Se podrían hacer ensayos de competencia para determinar si algún regulador del ciclo celular (que sepamos que interaccionan con las

ciclinas D, como CDKs o KRPs), afectan la asociación de las ciclinas con RBR y además la fosforilación de ésta última, usando también las mutantes en sus motivos LXCXE.

- Por otro lado, a partir de los resultados no esperados que se obtuvieron de los ensayos de doble híbrido, en donde se observó la capacidad de *ZmCycD6;1* para activar la transcripción, sería interesante estudiar esta capacidad que tienen las ciclinas D para regular la expresión génica de forma independiente de una CDK.

10.0 Materiales y métodos

10.1 Interacción con proteínas recombinantes

Para la interacción de las proteínas RBR1^{PD} y CycD2;2a de maíz se utilizaron las construcciones generadas en las tesis de maestría de Zamora-Zaragoza (2015) y de López-Hernández (2018) respectivamente, que a continuación se describen. La proteína RBR1 fue clonada en el vector pDEST15, el cual es un vector que al expresarse fusiona la proteína Glutación S-Transferasa (GST) con en el amino terminal de la proteína de interés y obtener así la proteína GST-RBR1^{PD}. Cabe señalar que en esta construcción sólo se incluye el dominio *pocket* de RBR1 debido a que, como se explica más a detalle en la introducción de este trabajo, es la región más conservada de esta familia de proteínas; también porque se ha reportado que por este dominio RBR1 interacciona con proteínas que poseen motivos LXCXE y además por la dificultad de trabajar con la proteína completa, pues es de gran tamaño e inestable. Por otro lado, la CycD2;2a se encuentra codificada y fusionada a la Proteína de Unión a Maltosa (MBP, por sus siglas en

inglés) en el vector de expresión pCDFDuet-1, pero a diferencia de la construcción de RBR1, la de CycD2;2a tiene el tag en el carboxilo terminal (CycD2;2a-MBP).

La sobreexpresión de las proteínas recombinantes se llevó a cabo de la siguiente forma. Para el caso de la construcción pDEST15-RBR1^{PD} se transformaron células competentes *E. coli* BL21 Codon Plus RIL, se realizó un precultivo para después inocular 200mL de medio LB y se dejaron creciendo las células aproximadamente 3h con agitación constante y a 37°C hasta llegar a 0.5-0.6 unidades de densidad óptica (600nm). Posteriormente se agregó IPTG (conc. final 0.3mM) para inducir la expresión de la proteína recombinante y se incubó por 3h más con las mismas condiciones. De manera análoga, CycD2;2a-MBP se sobreexpresó en células *E. coli* (DE3) Tuner incubando 200mL de cultivo durante 6h para después agregar IPTG (conc. final 0.05mM) e incubar 3h más.

Para el ensayo de interacción, las células que sobreexpresaron a las proteínas recombinantes se resuspendieron en 5mL de buffer para columna de amilosa (20mM Tris-HCl, 200mM NaCl 1mM EDTA), se mezclaron y lisaron juntas con la adición de 10mg de lisozima (Sigma-Aldrich L6876) incubando durante 20min a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente, para completar la lisis se sonicó la muestra con cuatro ciclos activo-reposo de 20-20seg empleando un sonicador (SONICS Vibra-Cell VC505). Después de este punto la muestra se incubó a 4°C por 1h con agitación constante para permitir la interacción de las proteínas de interés y finalmente se centrifugó a 12,000rpm a 4°C durante 30min para obtener la fracción soluble.

Para la purificación de los complejos de proteínas recombinantes se utilizó una resina de amilosa (NEB E8021S) que funciona como anclaje para la proteína CycD2;2-MBP (porque el tag es afín a ella) y así mismo a RBR1^{PD} por la interacción específica con la ciclina que se deseaba comprobar. Entonces, después de centrifugar la muestra se preclaró, se filtró y se hizo pasar varias veces a través de una columna con 1mL de resina (previamente equilibrada con el buffer correspondiente) y después se lavó con 10 repeticiones de 5mL del mismo buffer. Finalmente, se eluyeron las proteínas adicionando buffer con 10mM de maltosa en 5 fracciones de 0.75mL.

La presencia y la interacción de las proteínas se monitoreó mediante Western blot utilizando como anticuerpos primarios un anti-MBP policlonal (Abcam ab21144, dilución 1:50,000) y un anti-GST policlonal desarrollado en el laboratorio (dilución 1:30,000) y como anticuerpo secundario anti-conejo.

10.2 Mutagénesis por PCR

Para probar la hipótesis de este trabajo se requería mutar el motivo LXXCXE de *CycD6;1* por lo que se procedió a realizar los cambios necesarios en la secuencia codificante de esta proteína para sustituir la leucina (L), la cisteína (C) y el ácido glutámico (E), por alaninas (A). Para ello se necesitó diseñar un par de oligos dirigidos al motivo LXXCXE-like, pero introduciéndoles los nucleótidos necesarios para generar las mutaciones deseadas; los oligos debían tener además 15 nucleótidos de cada lado para lograr un correcto anclaje sobre el templado (**Figura 15**). Con la ayuda del programa AmplifX se buscaron los mejores parámetros para finalmente obtener un par de oligos de 48pb complementarios entre sí.

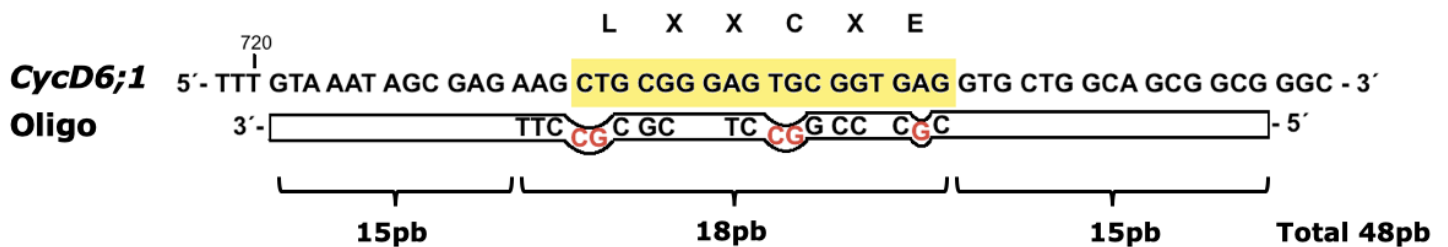


Figura 15. Diseño de oligos para realizar la mutación del motivo LXXCXE. En rojo se señalan los nucleótidos que se introdujeron en el oligo para generar codones que codifican alaninas (A), en vez de L, C y E.

Los oligos fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología y se les denominó MutD6-Fw y MutD6-Rv (ver la secuencia en la **Tabla 1** de las figuras suplementarias); con ellos y en combinación con un par de oligos M13, como se representa en la **Figura 16**, se realizaron dos PCRs usando como templado la construcción pENTR/D-TOPO-CycD6;1. De esta forma se obtuvieron dos fragmentos independientes de la secuencia codificante de CycD6;1 pero ya con los cambios de nucleótidos en la región correspondiente al motivo LXXCXE.

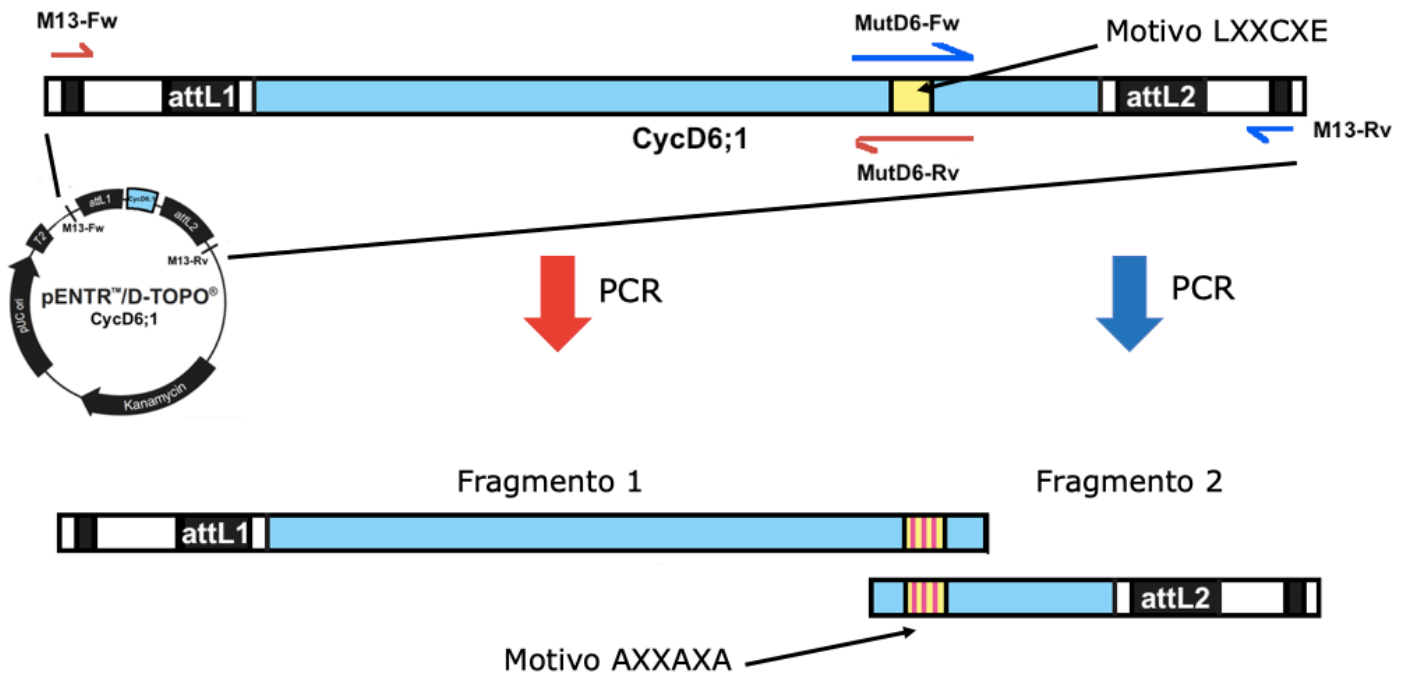


Figura 16. Generación de las mutaciones por PCR.

Después de purificar ambos fragmentos se realizó la fusión de estos aprovechando que eran parcialmente complementarios en la región donde se introdujeron los cambios de nucleótidos. Entonces, se colocaron ambos fragmentos en un tubo en iguales proporciones y se desnaturalizaron para que se alinearan entre sí. Posteriormente se agregaron dNTPs y DNA polimerasa de alta fidelidad para elongar y completar el CDS. Finalmente se agregaron los oligos M13, que debido a que flanquean la secuencia codificante completa, permitirían sólo la amplificación de los fragmentos que se fusionaron exitosamente (**Figura 17**).

- 1) Desnaturalización de los fragmentos (98°C por 2 min)
- 2) dNTPs y DNA Pol (72°C por 15 min)



- 3) Adición de primers M13 para realizar PCR normal



Figura 17. Fusión de los fragmentos y amplificación del producto completo

El producto de PCR obtenido se purificó y adeniló para realizar una reacción de ligación en el vector pGEM-T easy. Posteriormente se transformaron células *E. coli* XL1-Blue, se seleccionaron colonias putativamente positivas y para corroborar la inserción del producto de

PCR en el vector, se purificó el plásmido de las colonias y se realizaron ensayos de restricción (**Figura S1**). Al mismo tiempo se hizo un screening por PCR, obteniendo una clona positiva para ambas metodologías (**Figura S2**).

El plásmido de la clona positiva se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología para corroborar que la mutación deseada había ocurrido y los resultados mostraron que fue exitosa: el motivo LXXCXE, fue cambiado por AXXAXA (**Figura 18**). A esta construcción se le denominó MutD6;1.

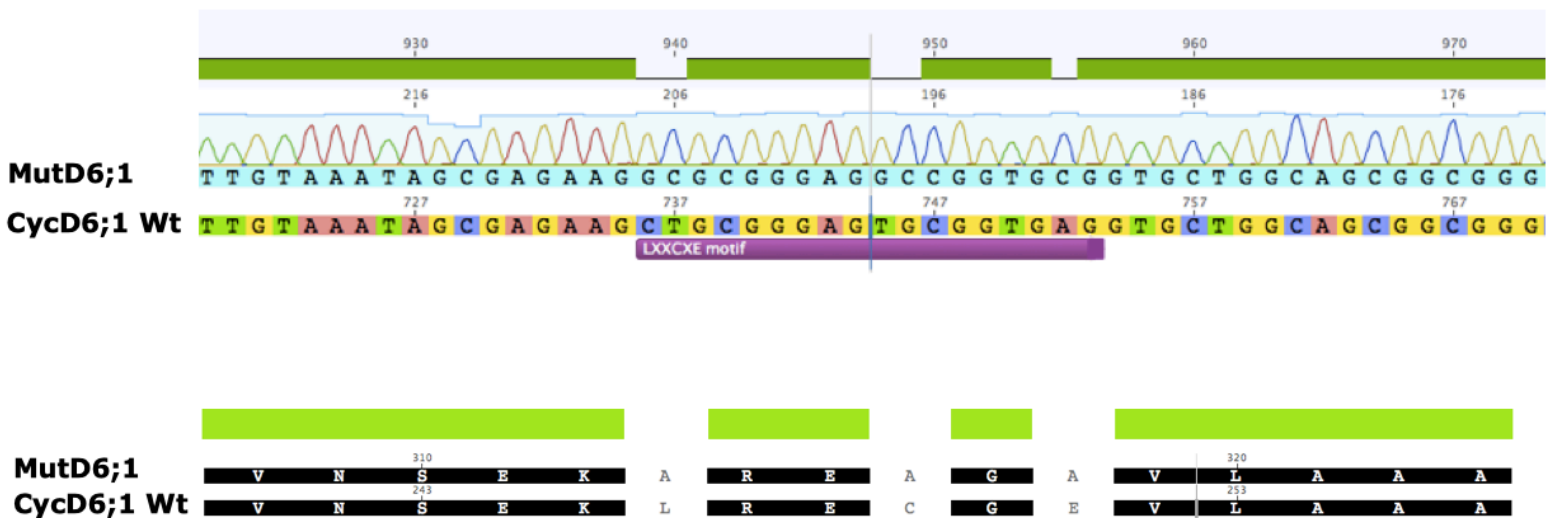


Figura 18. Secuenciación de la clona positiva MutD6;1. Se muestra la traducción *in silico* y alineamiento con la región de *ZmCycD6;1* Wt donde se localiza el motivo LXXCXE y se puede observar la mutación esperada.

10.3 Subclonación de CycD6;1 y MutD6;1 en el plásmido pHMGWA

Se deseaba tener la secuencia codificante de CycD6;1 y de MutD6;1 en el vector de expresión pHMGWA para que ambas proteínas recombinantes tuvieran a MBP como proteína de fusión. Para el caso de la CycD6;1 que se encontraba clonada en el vector pENTR-D/TOPO, se utilizó el kit Gateway LR Clonase II, con el cual se lleva a cabo una recombinación entre los vectores (el vacío y el que contiene el inserto), para finalmente obtener la construcción pHMGWA-CycD6;1. Esto se verificó por PCR (**Figura S3**).

Por otro lado, la secuencia codificante de MutD6;1 se encontraba clonada en el vector pGEM-T easy y a pesar de que dicha construcción se generó con los sitios de recombinación attL para el sistema Gateway (como se muestra en la **Figura 17** y **Figura S1**), no fue compatible para este experimento porque es requisito que los vectores tengan una resistencia a antibióticos diferente (y tanto pGEM-T Easy como pHMGWA tenían resistencia a ampicilina). Por esta razón la estrategia fue amplificar el inserto desde los sitios M13, pues este fragmento incluye a los sitios de recombinación attL y su vez flanquean el CDS de MutD6;1; posteriormente se realizó la recombinación del producto de PCR con el vector pHMGWA y así finalmente obtener la construcción pHMGWA-MutD6;1.

10.4 *Pull-down* de RBR1^{PD} y las dos versiones de CycD6;1

Una vez obtenidas las construcciones pHMGWA-CycD6;1 y pHMGWA-MutD6;1, se transformaron células *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIPL y se sobreexpresaron las proteínas recombinantes en

cultivos de 75mL. Por otro lado, en el mismo tipo de células se sobreexpresó RBR1^{PD} en dos cultivos de 180 mL cada uno; después se obtuvieron los pellets de los cuatro cultivos y se resuspendieron en 4 mL de PBS adicionado con PMSF (1mM) y DTT (1mM) como inhibidores de proteasas; para la lisis se agregaron 10mg de lisozima, se dejaron en agitación por 20min a temperatura ambiente y posteriormente se sonicaron las muestras.

Para obtener las fracciones solubles se centrifugaron las muestras a 4°C por 30min a 12,000rpm. Se tomó sólo la mitad de la fracción soluble correspondiente a CycD6;1 Wt y se llevó al mismo volumen que las otras fracciones con PBS (esto para equilibrar la cantidad de proteína que se observaba en Western blot en experimentos de estandarización). Posteriormente se juntaron las fracciones solubles de las proteínas a evaluar (CycD6;1 vs RBR1^{PD} o MutD6;1 vs RBR1^{PD}) y se dejaron incubar durante 1.5h en hielo, en el cuarto frío (4°C) con agitación constante para que se llevara a cabo la interacción de las proteínas.

Después de la incubación se procedió a la purificación simultánea de los complejos Cyc/RBR^{PD} mediante la técnica de *pull-down* empleando una resina de glutatión (**Figura 19**). Una vez empacada la resina en dos columnas de purificación, se hicieron pasar 6 veces las fracciones solubles para promover una buena adsorción, después se realizaron 10 lavados de 10mL cada uno con PBS/0.1% Triton y 5 lavados más con PBS (un muy alto volumen para asegurar la máxima limpieza posible). Finalmente se eluyeron las proteínas con una disolución fresca de glutatión 10mM en 5 alícuotas de 0.75mL cada una.

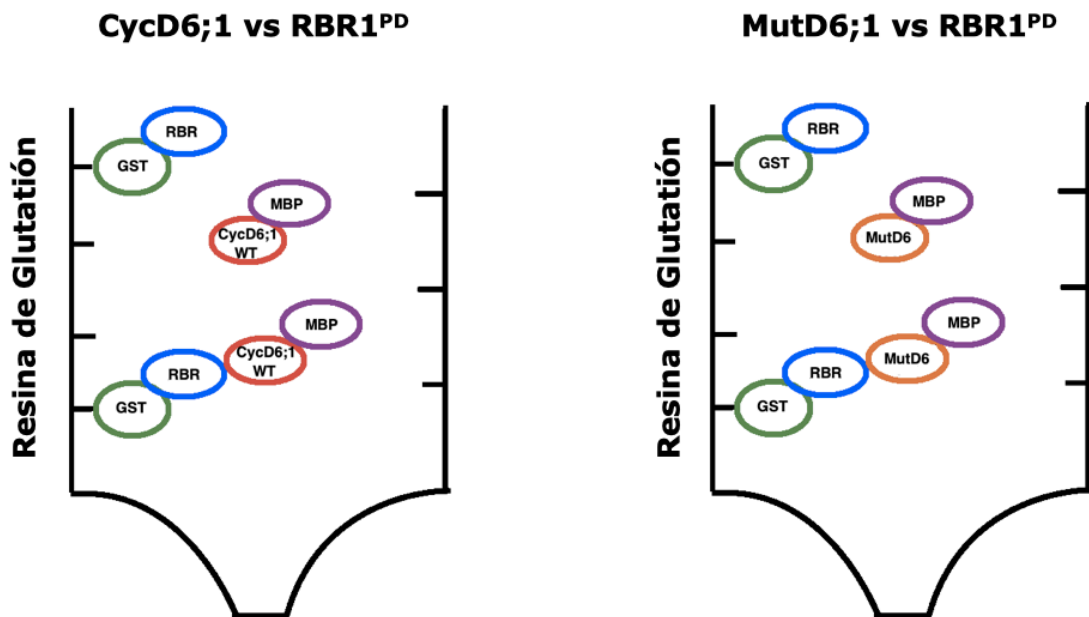


Figura 19. Purificación simultánea de los complejos mediante pull-down. La proteína recombinante GST-RBR1^{PD} funcionó como la proteína de anclaje; se emplearon las mismas condiciones de lavado y elución para ambos experimentos.

Las muestras se prepararon para hacer electroforesis y se realizaron los Western blot correspondientes para identificar a las proteínas con los anticuerpos primarios anti-MBP (1:50,000) y anti-GST (1:30,000) disueltos en leche al 5% (Svelty en polvo 0% grasas) e incubados toda una noche a 4°C. Cabe destacar que los lavados de la membrana se hicieron con PBS adicionado con 400mM de NaCl y 1% Tween 20, es decir, una disolución astringente, con la finalidad de quitar en la mayor medida de lo posible el reconocimiento no específico de los anticuerpos. Finalmente, como anticuerpo secundario se empleó un anti-conejo comercial en una dilución 1:25,000 al cual se le realizaron dos lavados con PBS y dos más con PBS astringente.

10.5 Subclonación en plásmidos para levaduras

Para los ensayos de doble híbrido en levadura se necesitaba subclonar los CDS de las proteínas de interés en los vectores pEG202 y pJG45, los cuales contienen la información genética para complementar auxotrofías de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* EGY48, así como para activar los genes reporteros de este sistema.

Primero se clonó a CycD6;1 y MutD6;1 en el vector pEG202 y a RBR1^{PD} en pJG4-5; para las ciclinas se diseñaron oligonucleótidos que incluyeran los sitios de restricción para las enzimas EcoRI en el forward y BamHI en el oligo reverse; por otro lado para RBR1^{PD} se emplearon oligos con los sitios de restricción de las enzimas EcoRI en el forward y XhoI en el oligo reverse. Con estos juegos de oligonucleótidos se realizaron PCRs sobre sus respectivos templados y se purificaron los productos. Con las enzimas de restricción ya mencionadas se realizó la digestión de los productos de PCR y los vectores vacíos para posteriormente hacer las respectivas ligaciones. De esta forma se obtuvieron las construcciones pEG202-CycD6;1, pEG202-MutD6;1 y pJG45-RBR1^{PD} las cuales se verificaron por PCR (**Figura S7 y S8**) y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología.

Debido a que para el uso del doble híbrido se recomienda también generar las construcciones opuestas, se tuvieron que diseñar oligos para subclonar a las ciclinas ahora en el plásmido pJG45 y a RBR1^{PD} en pEG202. Sin embargo, se presentó el problema de que el vector pJG45 sólo poseía dos únicos sitios de restricción (EcoRI y XhoI) y uno de ellos (XhoI) también se encontraba en el CDS de las ciclinas, por lo que al

digerir los productos de PCR se cortarían y sería imposible la generación de la construcción completa.

Para resolver este problema, se diseñó un oligo reverse con dos sitios de restricción consecutivos, uno para la enzima Esp3I e inmediatamente aledaño el otro para la enzima XhoI; como oligo forward se utilizó uno con el sitio de restricción EcoRI. La enzima Esp3I tiene la particularidad de reconocer su sitio y cortar un nucleótido adelante de éste, de esta forma, al digerir el producto de PCR de CycD6;1 y MutD;1 con esta enzima permitiría dejar intacto el CDS, generar el sitio cohesivo de XhoI en la posición 3' y posteriormente poder hacer la ligación con el vector (digerido previamente con EcoRI y XhoI). Por otro lado, para la subclonación de RBR1^{PD} en el vector pEG202 se pudieron emplear los mismos oligos con los que se generó la construcción en pJG4-5.

10.6 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 y ensayos de doble híbrido

Con la invaluable ayuda técnica de la Dra. Laura Kawasaki y el Dr. Roberto Coria del Instituto de Fisiología Celular, se realizó el siguiente protocolo de transformación de levaduras para subsecuentemente realizar el ensayo de doble híbrido.

Con colonias frescas de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 (*ura3*, *his3*, *trp1*, LexA::LEU), se inocularon 4mL de medio líquido YPD en tubos de ensayo y se dejaron agitando a 250rpm y 30°C toda la noche. De este cultivo se tomaron aproximadamente 2mL para inocular ahora un volumen de 20mL de YPD fresco en un matraz Erlenmeyer estéril; se debía asegurar que la densidad óptica inicial fuera muy cercana a 0.2 y

se incubaba (nuevamente a 30°C y 250rpm) por alrededor de 3h hasta que el cultivo alcanzara 0.4-0.5 unidades de densidad óptica.

El cultivo se centrifugó en tubos Falcon estériles de 50mL (2500rpm durante 5min) para obtener el pellet celular, desechar el sobrenadante y después resuspender las células en 1mL de H₂O destilada y estéril. La suspensión celular se transfirió a un tubo Eppendorf y se volvió a centrifugar (20seg) para obtener nuevamente el pellet. Posteriormente, con 1mL de una disolución de Tris-EDTA/LiOAc pH=7.5 (10mM, 1mM y 100mM respectivamente) se lavaron las células, se volvieron a centrifugar y a resuspender en 200µL de Tris-EDTA/LiOAc fresco.

La suspensión celular se dividió en alícuotas de 50µL cada una en tubos Eppendorf de 1.5mL; individualmente se les agregaron 50ng de DNA de esperma de salmón (recién desnaturalizado), 300ng de los plásmidos que codifican para las proteínas a ensayar (CycD6;1, MutD6;1, RBR^{PD} u otros) y finalmente 300µL de una disolución fresca de PEG 4000 (al 40%)/LiOAc/Tris-EDTA.

Las alícuotas se agitaron vigorosamente con la ayuda de un vortex y se incubaron a 30°C durante 30min a 250rpm. Al término de este tiempo, se les agregaron 40µL de DMSO, se volvió a agitar en el vortex para homogeneizar y después se les dió un choque térmico de 42°C por 15min a las muestras. Posteriormente se centrifugaron las levaduras y se resuspendieron en 50µL de agua para ser sembradas en cajas Petri con medio sólido SD con diferentes combinaciones de aminoácidos y bases nitrogenadas específicas para cada experimento; finalmente las placas se incubaron de 3 a 4 días a 30°C hasta la aparición de colonias transformantes.

A manera de ejemplo general, las levaduras se transformaban con tres plásmidos: pEG202, donde estaba codificada una de las proteínas de estudio; pJG4-5, donde estaba la otra proteína para evaluar la interacción, y pSH18, el cual contenía un gen reportero. Los tres plásmidos además contenían la información genética para complementar auxotrofías de esta cepa de levaduras (His, Trp y Ura respectivamente), así que los medios donde se sembraban al final del procedimiento debían carecer de estos aminoácidos y la base nitrogenada para que sólo crecieran aquellas levaduras que poseyeran los tres plásmidos y fueran capaces de sobrevivir a las condiciones del medio de cultivo.

Para los ensayos de interacción por doble híbrido se utilizaron colonias transformantes frescas; se realizaron cultivos líquidos (en YPD) de las colonias a evaluar y, usando tubos Eppendorf y una balanza analítica, se prepararon suspensiones celulares con una concentración de 10mg/mL; a partir de éstas se realizaron diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 para finalmente sembrar las levaduras en forma de gotas en medios sólidos (SD) selectivos. Siguiendo el ejemplo del párrafo anterior, las colonias transformantes elegidas (crecidas en medio líquido y realizando sus diluciones como ya se explicó) se sembraron en medio sólido SD sin los nutrimentos mencionados y además sin el aminoácido Leu, pues en el sistema existe un gen reportero que complementa dicha auxotrofia y se activará, si y sólo si, las proteínas de estudio interaccionan, lo que conducirá al crecimiento de colonias en la placa.

11.0 Referencias

- Ach, R. A., Durfee, T., Miller, A. B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P. C., & Gruissem, W. (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5077–5086. doi:10.1128/mcb.17.9.5077
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 6th edition, USA.
- Borysov, S. I., Nepon-Sixt, B. S., & Alexandrow, M. G. (2015). The N Terminus of the Retinoblastoma Protein Inhibits DNA Replication via a Bipartite Mechanism Disrupted in Partially Penetrant Retinoblastomas. *Molecular and Cellular Biology*, 36(5), 832–845. doi:10.1128/mcb.00636-15
- Buchanan, B., Gruissem W. and Jones, R. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. WILEY Blackwell, 2th edition. UK.
- 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. doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01498.x

- Campbell, N., Mitchel, L. and Reece, J. (2001) *Biología. Relaciones y conceptos*. Pearson Education.
- Casimiro, M. C.; Crosariol, M.; Loro, E.; Li, Z.; Pestell, R. G. (2012). Cyclins and Cell Cycle Control in Cancer and Disease. *Genes & Cancer*, 3(11-12), 649–657. doi:10.1177/1947601913479022
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., & Nevins, J. R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65(6), 1053–1061. doi:10.1016/0092-8674(91)90557-f
- Chow, K. N., & Dean, D. C. (1996). Domains A and B in the Rb *pocket* interact to form a transcriptional repressor motif. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4862–4868. doi:10.1128/mcb.16.9.4862
- Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, 299(1-2), 35–55. doi:10.1016/s0378-1119(02)01055-7
- Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Blilou, I., Grieneisen, V. A., Sozzani, R., Zamioudis, C., ... Scheres, B. (2012). A Bistable Circuit Involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA Integrates Cues to Inform Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*, 150(5), 1002–1015. doi:10.1016/j.cell.2012.07.017
- Desvoyes, B., de Mendoza, A., Ruiz-Trillo, I., & Gutiérrez, C. (2013). Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2657–2666. doi:10.1093/jxb/ert411

- Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 297–306. doi:10.1038/nrm3567
- Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., & Weinberg, R. A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, 73(3), 499–511. doi:10.1016/0092-8674(93)90137-f
- Dyson, N., Howley, P., Munger, K., & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243(4893), 934–937. doi:10.1126/science.2537532
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T., & Pestell, R. G. (2004). Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology*, 145(12), 5439–5447. doi:10.1210/en.2004-0959
- Garay-Arroyo, A., De La Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Azpeitia, E., & Álvarez-Buylla, E. R. (2012). Hormone symphony during root growth and development. *Developmental Dynamics*, 241(12), 1867–1885. doi:10.1002/dvdy.23878
- Godínez-Palma, S. K., García, E., Sánchez, M. de la P., Rosas, F., & Vázquez-Ramos, J. M. (2013). Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5661–5671. doi:10.1093/jxb/ert340

- González-Orozco, P. (2017). Efecto de fitohormonas sobre los niveles de la proteína *ZmCycD6;1* y la actividad cinasa asociada, en la germinación. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gutiérrez C., Doonan J. and Murray J. (1998). The maize retinoblastoma protein homologue *ZmRb-1* is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (*CycD*) proteins. *Plant Molecular Biology*, 37(1), 155–169. doi:10.1023/a:1005902226256
- Gutiérrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M., & del Pozo, J. C. (2002). G1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), 480–486. doi:10.1016/s1369-5266(02)00301-1
- 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. doi:10.1093/pcp/pci007
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, 23(7), 345–356. doi:10.1016/j.tcb.2013.03.002
- Hagemeyer, C., Cook, A., & Kouzarides, T. (1993). The retinoblastoma protein binds E2F residues required for activation in vivo and TBP binding in vitro. *Nucleic Acids Research*, 21(22), 4998–5004. doi:10.1093/nar/21.22.4998

- Horowitz, J. M., Park, S. H., Bogenmann, E., Cheng, J. C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., ... Weinberg, R. A. (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 87(7), 2775–2779. doi:10.1073/pnas.87.7.2775
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker J., Walker E., Jackman M., Xie Q., Bannister A., Kouzarides T., Gutiérrez, C., Doonan, J.H. & Murray, J. A. H. (1998). *Plant Molecular Biology*, 37(1), 155–169. doi:10.1023/a:1005902226256
- Hydbring, P., Malumbres, M., & Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(5), 280–292. doi:10.1038/nrm.2016.27
- Jiang, K., Meng, Y. L. and Feldman, L. J. (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development*, 130(7), 1429–1438. doi:10.1242/dev.00359
- Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., and Renaudin, J.-P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43, 607–620.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S., Ewen, M. and Sherr, C. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes & Development*, 7(3), 331–342. doi:10.1101/gad.7.3.331

- Kelly, B. L., Wolfe, K. G., & Roberts, J. M. (1998). Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 95(5), 2535–2540. doi:10.1073/pnas.95.5.2535
- Lara-Núñez, A., de Jesús, N., & Vázquez-Ramos, J. M. (2007). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum*, 132:79–88 doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00995.x
- López-Hernández, M. N. (2013). Regulación de la actividad de la cinasa CDKA1 de maíz. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mader, S. y Windelspecht, M. (2016). *Biology*. McGraw-Hill. 12th edition. USA.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., ... Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*, 391(6667), 601–605. doi:10.1038/35410
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630–641. doi:10.1016/j.tibs.2005.09.005
- Marhava, P., Hoermayer, L., Yoshida, S., Marhavý, P., Benková, E., & Friml, J. (2019). Re-activation of Stem Cell Pathways for Pattern Restoration in

Plant Wound Healing. *Cell*, 177(4), 957–969.e13. doi:10.1016/j.cell.2019.04.015

- Menges, M., De Jager S., Gruissem, W., Murray, J. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*, 41(4), 546–566. doi:10.1111/j.1365-313x.2004.02319.x
- Murphree, A. and Benedict, W. (1984). Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science*, 223(4640), 1028–1033. doi:10.1126/science.6320372
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., Shinmyo, A. (2002). Phosphorylation of Retinoblastoma-Related Protein by the Cyclin D/Cyclin-Dependent Kinase Complex Is Activated at the G1/S-Phase Transition in Tobacco. *The Plant Cell*, 14(8), 1847–1857. doi:10.1105/tpc.002550
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal*, 308(3), 697–711. doi:10.1042/bj3080697
- Romero-Rodríguez, S., (2019). Función transcripcional de las proteínas E2FA/B1;1 y E2FC de maíz. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rubin, S. M., Gall, A.-L., Zheng, N., & Pavletich, N. P. (2005). Structure of the Rb C-Terminal Domain Bound to E2F1-DP1: A Mechanism for

- Phosphorylation-Induced E2F Release. *Cell*, 123(6), 1093–1106. doi:10.1016/j.cell.2005.09.044
- Rubin, S. M. (2013). Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(1), 12–19. doi:10.1016/j.tibs.2012.10.007
 - Sabelli, P. A., Dante, R. A., Leiva-Neto, J. T., Jung, R., Gordon-Kamm, W. J., & Larkins, B. A. (2005). RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 102(37), 13005–13012. doi:10.1073/pnas.0506160102
 - Sabelli, P. A., & Larkins, B. A. (2006). Grasses Like Mammals? Redundancy and Compensatory Regulation within the Retinoblastoma Protein Family. *Cell Cycle*, 5(4), 352–355. doi:10.4161/cc.5.4.2428
 - Sabelli, P. A., Liu, Y., Dante, R. A., Lizarraga, L. E., Nguyen, H. N., Brown, S. W., ... Larkins, B. A. (2013). Control of cell proliferation, endoreduplication, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 110(19), E1827–E1836. doi:10.1073/pnas.1304903110
 - Sánchez-Camargo, V. A., Suárez-Espinoza, C., Romero-Rodríguez, S., Garza-Aguilar, S. M., Stam, M., García-Ramírez, E., Lara-Núñez, A. & Vázquez-Ramos, J. M. (2020). Maize E2F transcription factors. Expression, association to promoters of S-phase genes and interaction with the RBR1 protein in chromatin during seed germination. *Plant Science*, 296, 110491. doi:10.1016/j.plantsci.2020.110491

- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell*, 79(4), 551–555. doi:10.1016/0092-8674(94)90540-1
- Sorrell, D.A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, N., Gigot, C. and Murray, J.A.H. (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* 119, 343–351
- Strzalka, W. K., Aggarwal, C., Krzeszowiec, W., Jakubowska, A., Sztatelman, O., & Banas, A. K. (2015). *Arabidopsis* PCNAs form complexes with selected D-type cyclins. *Frontiers in Plant Science*, 6. doi:10.3389/fpls.2015.00516
- Tchakarska, G., & Sola, B. (2019). The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle*, 1–16. doi:10.1080/15384101.2019.1706903
- Topacio, B. R., Zatulovskiy, E., Cristea, S., Xie, S., Tambo, C. S., Rubin, S. M., ... Skotheim, J. M. (2019). Cyclin D-Cdk4,6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix. *Molecular Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2019.03.020
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inze, D. and De Veylder, L.(2005). Genome-Wide Identification of Potential Plant E2F Target Genes. *PLANT PHYSIOLOGY*, 139(1), 316–328. doi:10.1104/pp.105.066290

- Vázquez-Ramos, J.M.; Sánchez, M.d.l.P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*, 13(2), 113–130. doi:10.1079/ssr2003130
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., W. dePamphilis, C. and Hong Ma (2004). Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins. *PLANT PHYSIOLOGY*, 135(2), 1084–1099. doi:10.1104/pp.104.040436
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330. doi:10.1016/0092-8674(95)90385-2
- Weimer, A. K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Hesse, M., Van Damme, D., Sugimoto, K., Koncz, C., Doerner, P., Umeda, M. & Schnittger, A. (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 35(19), 2068–2086. doi:10.15252/embj.201593083
- Zamora-Zaragoza, J. (2012). Estudio de la expresión a nivel de proteína de la ciclina Zeama;CycD6;1 durante la germinación de maíz (*Zea mays*). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zamora-Zaragoza, J. (2015). Caracterización de la ciclina CycD6;1 de maíz y sus interacciones con otros reguladores del ciclo celular. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Zhao, C., Lasses, T., Bako, L., Kong, D., Zhao, B., Chanda, B., Bombarely, A., Cruz-Ramírez, A., Scheres, B., Brunner, A. M. and Beers, E. P. (2017). XYLEM NAC DOMAIN1, an angiosperm NAC transcription factor, inhibits xylem differentiation through conserved motifs that interact with RETINOBLASTOMA-RELATED. *New Phytologist*, 216(1), 76–89. doi:10.1111/nph.14704

Bases de datos y/o páginas web

- National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Maize Sequence. Gramene (https://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Info/Index?db=core)
- CL2 interactome. *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/analyze#tools>).

12.0 Figuras suplementarias

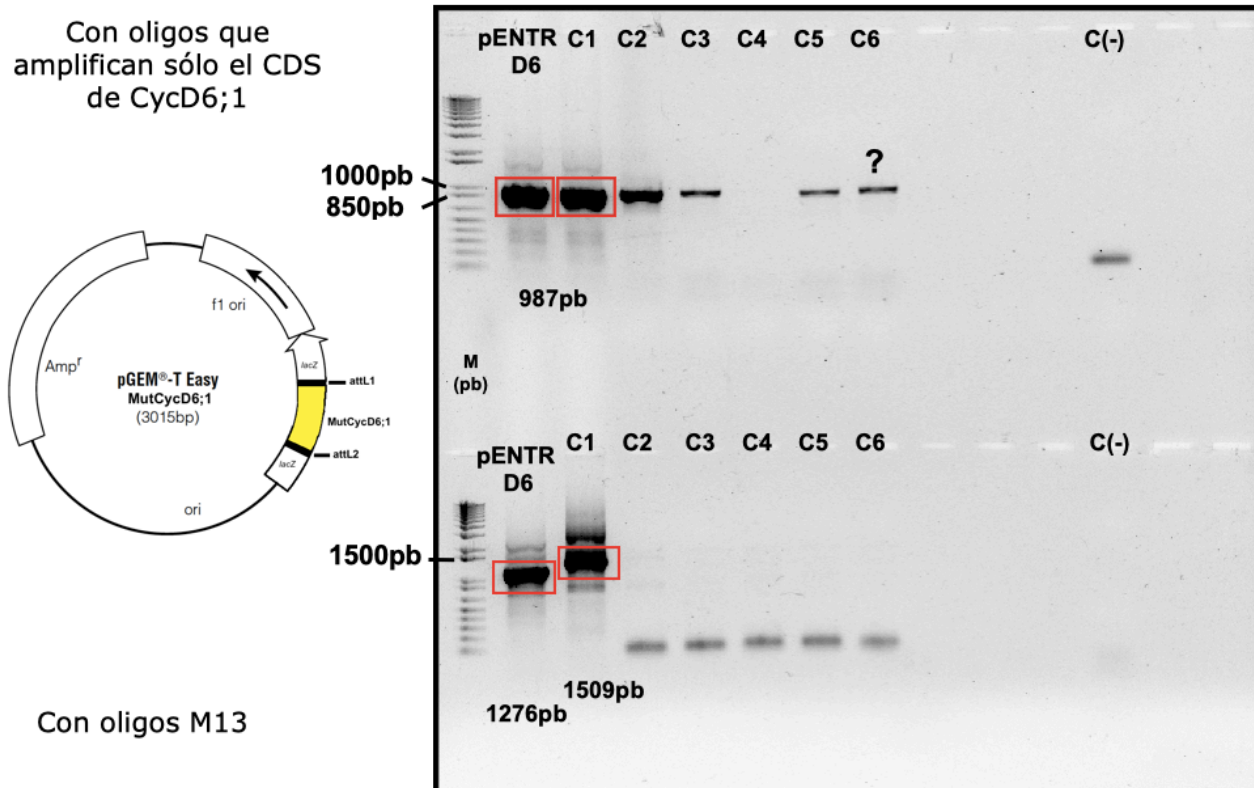


Figura S1. Screening por PCR de colonias putativamente positivas MutD6;1. En la colonia 1 (C1) se observa la amplificación de los fragmentos esperados (señalados en rojo) con ambos juegos de oligos sobre pGEM T-easy, teniendo como referencia el control positivo (pENTR D6). Abreviaturas: M=Marcador; C1-6=Colonia 1-6; C(-)=Control negativo.

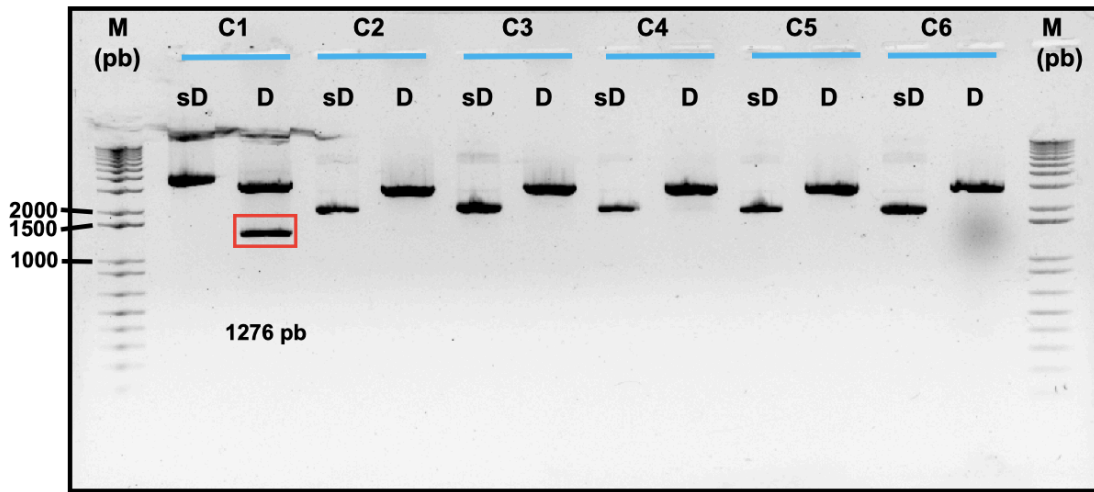


Figura S2. Screening por restricción para verificar la inserción del CDS de MutD6;1. Se digirió el plásmido con la enzima EcoRI y sólo en la colonia 1 (C1) se observó el fragmento escindido esperado de 1276pb (señalado en rojo) que corresponde al inserto clonado en pGEM T-easy. Abreviaturas: M=Marcador; C1-6=Colonia 1-6; sD=Sin digerir; D=Digerido

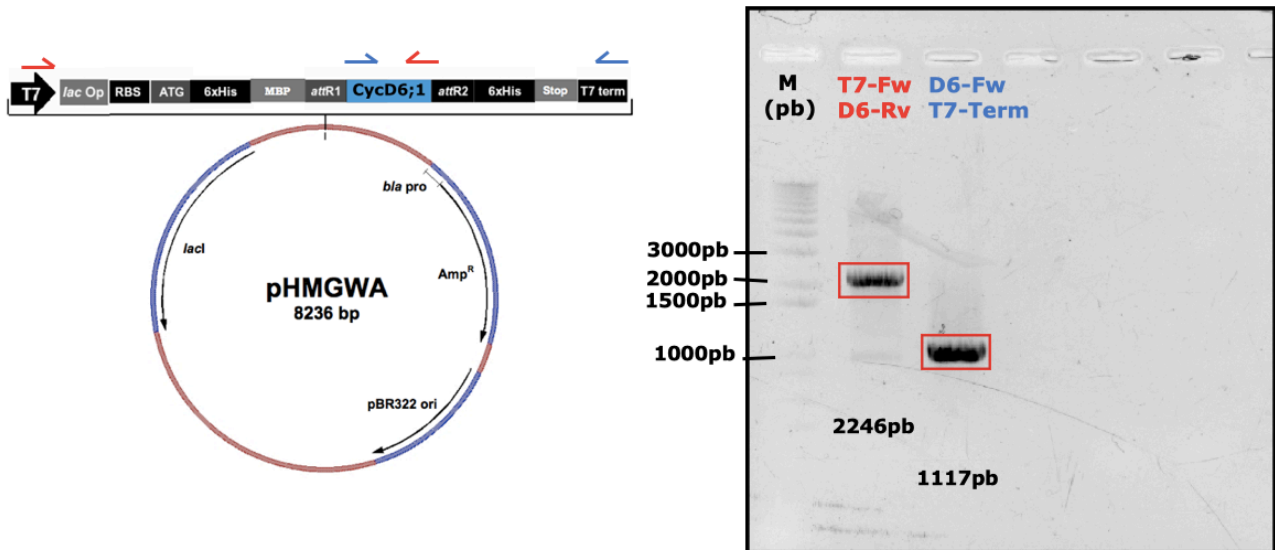


Figura S3. Subclonación de CycD6;1 en el vector pHMGWA. En el gel se observan (señalados en rojo) los productos de PCR obtenidos con juegos de oligos que se anclaron desde los sitios T7 del vector y el inserto para corroborar que éste estuviera presente y en la posición correcta.

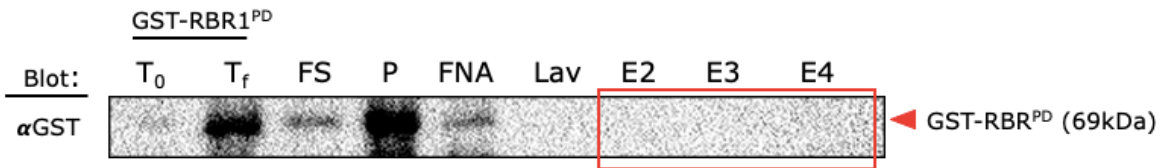


Figura S4. Control negativo de la resina de amilosa vs GST-RBR1^{PD}. La proteína de estudio GST-RBR^{PD} no interacciona con la resina de amilosa usada para los experimentos de interacción, pues no se observa en las eluciones del ensayo (rectángulo rojo). Abreviaturas: MM=Marcador de masa molecular; T₀=Fracción no inducida; T_f=Fracción inducida; FS=Fracción soluble; P=Pellet celular; FNA= Fracción adsorbida; Lav=Último lavado de la columna E2-4=Eluciones 2-4.

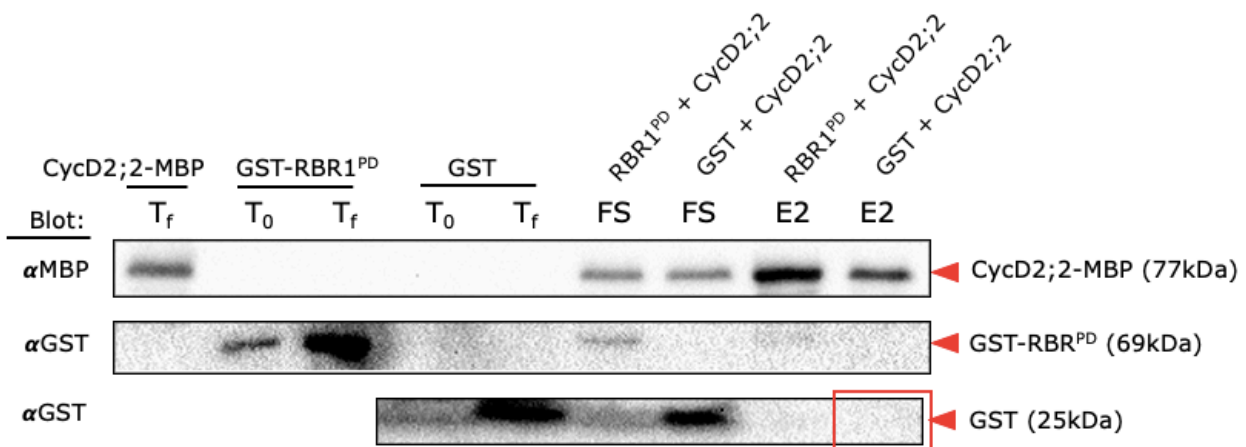


Figura S5. Control negativo CycD2;2a vs GST. La proteína de fusión GST no interacciona con CycD2;2a, pues no está presente en la elución del experimento (rectángulo rojo). Abreviaturas: MM=Marcador de masa molecular; T₀=Fracción no inducida; T_f=Fracción inducida; FS=Fracción soluble; E2=Elución 2.

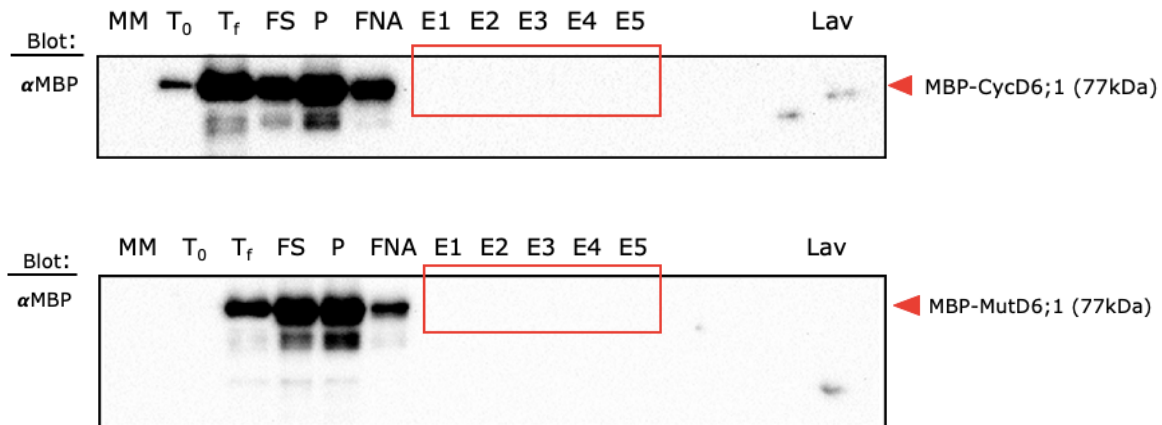


Figura S6. Control negativo resina de glutatión vs MBP-CycD6;1 y MBP-MutD6;1. Ninguna de las dos versiones de CycD6;1 interacciona con la resina de glutatión usada para los experimentos comparativos de asociación con RBR1^{PD}, pues no se observan en las eluciones del ensayo (rectángulos rojos). Abreviaturas: MM=Marcador de masa molecular; T₀=Fracción no inducida; T_f=Fracción inducida; FS=Fracción soluble; P=Pellet celular; FNA=Fracción no adsorbida; Lav=Último lavado de la columna E2-4=Eluciones 2-4.

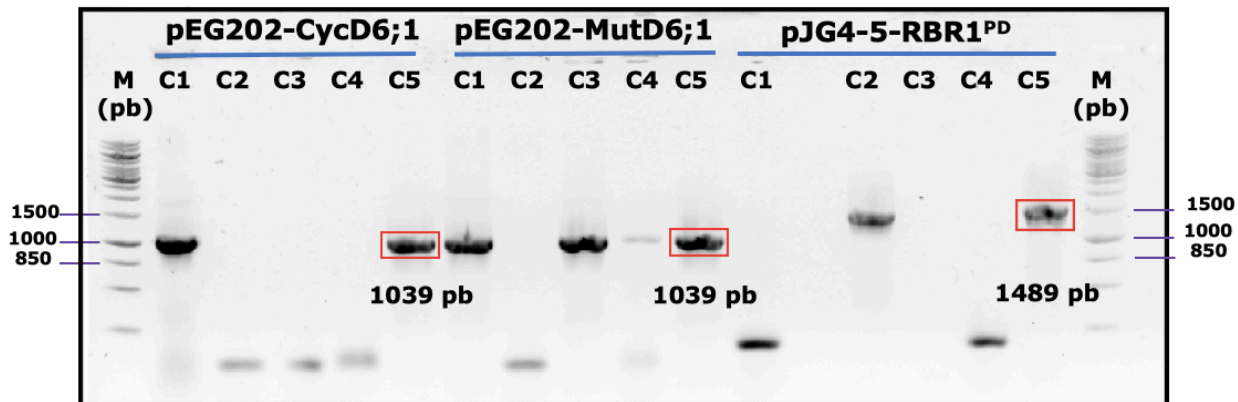


Figura S7. Subclonación de CycD6;1, MutD6;1 y RBR1^{PD} en los vectores para doble híbrido en levaduras. Se realizaron PCRs en colonia con oligos de los plásmidos y los insertos para verificar su correcta inserción. La colonia número 5 (C5) resultó ser positiva para las tres construcciones y se verificaron mediante secuenciación.

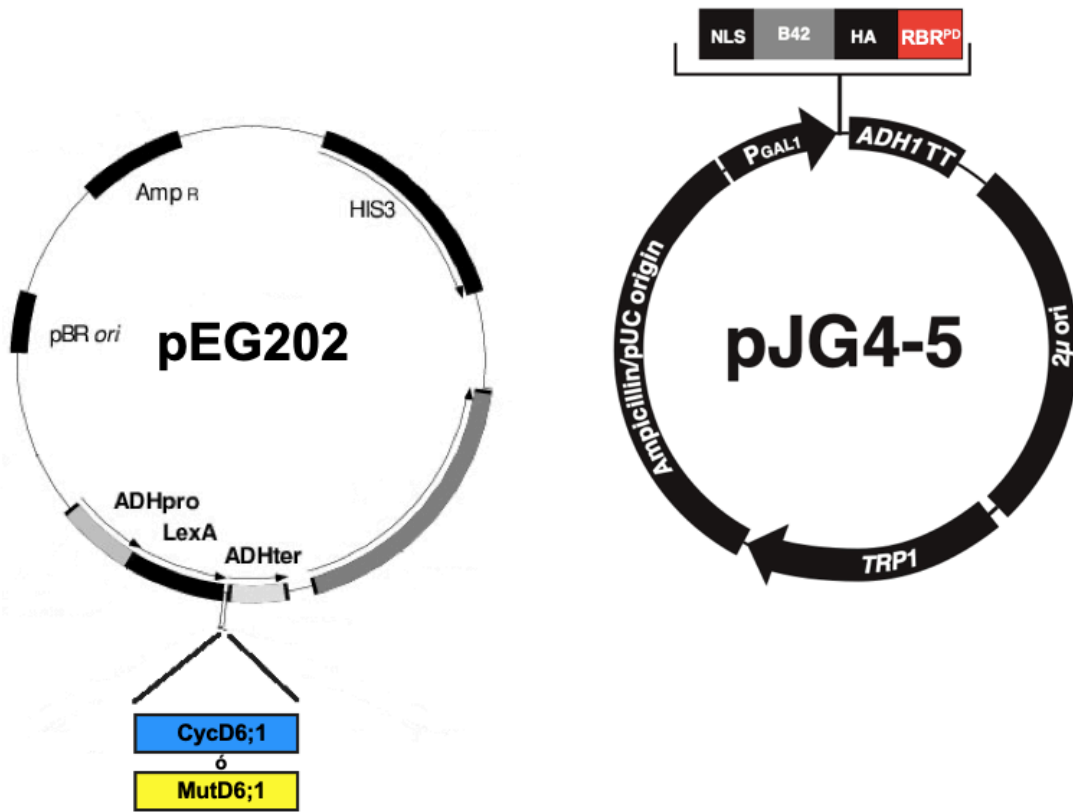


Figura S8. Diagrama de los plásmidos generados para los ensayos de doble híbrido. Las secuencias que codifican para las proteínas de interés (CycD6;1, Mutd6;1 y RBR^{PD}) se insertaron hacia la región 3' de las proteínas de fusión (LexA y B42), que activarán los genes reporteros en caso de haber interacción de las primeras.

Tabla 1. Oligos diseñados para los diferentes experimentos de este proyecto.

Nombre	Secuencia 5' –3'	Clave IBT
	Para generar la mutación del motivo LXCXE-like	
MutD6-Fw	GTA AAT AGC GAG AAG GCG CGG GAG GCC GGT GCG GTG CTG GCA GCG GCG	
MutD6-Rv	CGC CGC TGC CAG CAC CGC ACC GGC CTC CCG CGC CTT CTC GCT ATT TAC	
	Para subclonar los CDS en vectores de levaduras	
FwD6-EcoRI	TCT ATG AAT TCA TGG CGA CGG AGG AGT G	
RvD6-BamHI	TTT GGA TCC GAC AAT ACC CGC TTG ACT C	
FwRBR-EcoRI	GCA GCG AAT TCA TGA CAC CAG TAA CTT	
RvRBR-XhoI	AAT ACT CGA GTT ACA GGA AAG GCT TCG CTG CTG GA	
D6Rv-Esp3I-XhoI	TTT CGT CTC CTC GAG GAC AAT ACC CGC TTG ACT	