



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de los niveles proteicos de ciclina CYCD2;1
durante la germinación de ejes embrionarios de
maíz (*Zea mays*).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MINGYAR NEFTALÍ LÓPEZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2012



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Jorge Manuel Vázquez Ramos
VOCAL: **Profesor:** Bertha Resendiz Vázquez
SECRETARIO: **Profesor:** Jesús Fernando Montiel Aguirre
1er. SUPLENTE: **Profesor:** Marta Alicia Menjivar Iraheta
2° SUPLENTE: **Profesor:** Elpidio García Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 114, Departamento de Bioquímica, Conjunto E.
Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Jorge Manuel Vázquez Ramos _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Elpidio García Ramírez _____

SUSTENTANTE:

Mingyar Neftalí López Hernández _____

Agradecimientos:

Quiero dedicar estas primeras líneas a mis padres: Pedro y Teresita, con quienes estoy profundamente agradecido, ya que gracias a sus consejos y apoyo incondicional, he podido culminar mis estudios de licenciatura; no lo hubiera logrado sin ustedes, siempre estarán en mi corazón. A mi hermana Denise, muchas gracias por compartir parte de tu vida conmigo.

Agradezco al Dr. Jorge Vázquez por abrirme las puertas de su laboratorio, por la paciencia y sus invaluable consejos a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Elpidio García por sus consejos y por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, en el encontré a un estupendo amigo.

A Sara Margarita, por el apoyo que me brindo, en el manejo de las técnicas de biología molecular, al inicio de este proyecto. A Víctor, gran amigo, quien contribuyo con gran parte de las imágenes mostradas en la introducción, a mis compañeros del laboratorio 114: Jorge, Carlos, Manuel, Miguel, Fernando, Verónica, Yanerithe y la Dra. Guadalupe de Dios, con quienes he compartido muy gratos momentos dentro y fuera del laboratorio.

De manera muy especial agradezco a Silvia Karina, quien se ha convertido en mi mejor amiga, gran compañera, que me apoyo en diversos experimentos, y en quien he descubierto a una gran persona e investigadora.

A profesores y amigos que conocí durante mi estancia en la Facultad de Química, quienes influyeron importantemente en mi formación académica y personal.

Al Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química, quien a través del subprograma 127, me apoyo con una beca.

Al Conacyt por la beca otorgada para la conclusión de esta tesis.

GRACIAS

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El Maíz	5
1.1.2 Morfología y fisiología	6
1.1.3 Semilla	7
1.2. Germinación	9
1.3. Ciclo Celular	13
1.3.1 Control del ciclo celular	14
1.3.2. Ciclinas	17
1.3.3. Ciclinas D y la transición G ₁ /S	19
2. ANTECEDENTES	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos particulares	24
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA	25
6.1 Material biológico	25
6.1.1. Semillas de maíz	25
6.1.2. Cepas	25
6.1.3. Plásmidos	25
6.1.4. Conejos	27
6.1.5. Cultivos bacterianos	26
6.2. Técnicas generales	26
6.2.1. Electroforesis de DNA	26
6.2.2. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa	27
6.2.3. Purificación de DNA plasmídico	27
6.2.4. Preparación de células competentes	27
6.2.5. Transformación de células competentes	27
6.2.6. Purificación de anticuerpo	28
6.2.7. Extracción de proteína de ejes embrionarios	28
6.2.8. Cuantificación de proteína por el método de Bradford	29
6.2.9. Electroforesis de proteínas	29
6.2.10. Western blot	30

6.2.11. Inmunoprecipitación	30
6.2.12. Ensayo de pull down	31
6.3. Obtención de Anticuerpos α-CycD2;1	31
6.3.1. Análisis in silico de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZmCycD2;1	31
6.3.2. Amplificación de cDNA	32
6.3.3. Ligación en el vector de clonación	32
6.3.4. Clonación en el vector de expresión	32
6.3.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante	33
6.3.6. Inmunización de conejos y obtención del suero inmune	34
7. RESULTADOS	35
7.1. Producción de anticuerpo	35
7.1.1. Elección del péptido para la inmunización de conejos	35
7.2. Clonación del péptido inmunogénico	37
7.2.1. Clonación del cDNA en el plásmido pGEM-T Easy	38
7.2.2. Clonación en el vector de expresión pPAL7	38
7.2.3. Sobreexpresión de la proteína recombinante	39
7.2.4. Monitoreo de otras clonas con el inserto de interés	40
7.2.5. Clonación en el vector de expresión pGEX4T-2	40
7.2.6. Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante	42
7.2.7. Obtención y validación de anticuerpos anti CycD2;1 (α -CycD2;1)	44
7.3. Coimmunoprecipitación de CDKA	45
7.4 Expresión de CycD2;1 durante la germinación	47
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
8.1. Elección del péptido inmunogénico	49
8.2. Clonación del péptido de interés	50
8.3. Validación de anticuerpos anti CycD2;1 (α -CycD2;1)	51
8.4. Asociación con CDKs	51
8.5 Expresión de CycD2;1 durante la germinación.	52
9. CONCLUSIONES	55
10. PERSPECTIVAS	55
11. REFERENCIAS	56
Apéndice 1	62
Apéndice 2	71
Apéndice 3	73
Apéndice 4	74

RESUMEN

Para que una semilla se transforme en una planta; es necesario que se establezca el proceso de germinación, que implica la reactivación metabólica y culmina con una primera ronda exitosa de divisiones celulares, enmarcadas dentro de lo que se define como ciclo celular. En este ciclo se reconocen cuatro fases; G₁, S, G₂, M. Durante la fase G₁, se perciben las condiciones medio ambientales, las que deberán ser adecuadas para que ocurra el ciclo celular, y se verifica la integridad del DNA. En el control de la transición G₁/S intervienen las ciclinas D, que asociadas a unidades de CDK (Cinasas dependientes de ciclina), se encargan de la fosforilación de la proteína RB (retinoblastoma), la cual en su estado hipofosforilado forma un complejo que inactiva al factor de transcripción E2F-DP1; una vez fosforilada RB, se libera del complejo E2F-DP1 y se permite la transcripción de los genes que se encuentran bajo la regulación de este factor de transcripción. Este proceso de regulación se encuentra bastante conservado entre mamíferos y plantas. Sin embargo, la familia de ciclinas D en plantas es mucho mayor que su contraparte en mamíferos. Por ejemplo, en humano 3 genes codifican para ciclinas D, mientras que en nuestro modelo de estudio; maíz, al menos 17 genes han sido reportados.

Surge la interrogante de si pudiera existir redundancia funcional entre las ciclinas D, por lo que nuestro grupo de investigación se ha avocado al estudio de las diferentes ciclinas. Para este proyecto, se generaron anticuerpos que nos permitieron caracterizar los niveles de la ciclina CYCD2;1, durante la germinación de ejes embrionarios.

De manera similar a lo reportado para CYCD2;2 y CYCD5;3, los niveles proteicos de CYCD2;1 permanecen constantes durante la germinación; sin embargo, estudios preliminares de asociación con CDKA, mostraron un máximo a las 24 horas de germinación, que no es parecido al patrón de asociación que forma CDKA con las otras ciclinas D de maíz que se han estudiado en nuestro grupo.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
Admin	Administración
AI	Adyuvante incompleto de Freund
ATP	Adenosín trifosfato
A.P.	Antes del presente
BA	Benziladenina
CAK	Cinasa activadora de CDK
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
CTD	Dominio carboxilo terminal
CKS	Subunidad reguladora de la CDK
Cyc	Ciclina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ET	Extracto proteico total
Fig.	Figura
GST	Glutación S-transferasa
h	hora
IAA	Ácido Indolacético
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
kDa	Kilodalton
KRP	Kip Related Protein
LB	Luria-Bertani
Loop-T	Loop de treonina
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
O/N	Over night
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SS	Solución salina isotónica
TAE	Tris-acetato-EDTA
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
V	Volt
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
Zm	<i>Zea mays</i>

1. Introducción:

1.1. El maíz

El maíz es el cereal de los pueblos y las culturas en el continente americano. Las más antiguas civilizaciones, desde los Olmecas y Teotihuacanos en México, hasta los Incas y Quechuas en la región andina del continente, florecieron acompañados con esta planta.

Estudios arqueológicos y más recientemente genéticos, muestran evidencia que permite establecer que el maíz (*Zea mays*), tiene como ancestro al teocintle, planta rústica y silvestre que aún se encuentran en México, que tras un proceso de domesticación, donde los nativos mesoamericanos tuvieron un papel determinante, dieron origen a la planta de maíz que conocemos en la actualidad.

Muy probablemente el maíz fue domesticado en la cuenca del río Balsas, al oeste de México, lugar de donde es originario *Z. mays ssp. parviglumis*, y aunque cabe destacar que existen otras especies de teocintle alrededor del mundo, la subespecie *parviglumis*, es con la que genéticamente el maíz está más relacionado (Matsuoka *et al.*, 2002). Para su diversificación pudieron ayudar otras especies de teocintle, tal es el caso de *Z. mays ssp. mexicana*, que intervino en la diversificación del maíz en la Mesa Central mexicana (Matsuoka *et al.* 2002).

Estudios moleculares aportaron datos importantes sobre el tiempo de su domesticación; éstos sitúan el inicio de la misma hace 9000 años A.P. (antes del presente), tiempo que es consistente con los últimos análisis de fitolitos y granos de almidón de maíz, encontrados en el valle del balsas y cuya datación se estimó en 8700 años A.P (Piperno *et al.*, 2009).

El maíz es el cereal que ha cobrado mayor importancia en el sector económico mundial durante todo el siglo veinte y principios del siglo veintiuno. En los países industrializados, el maíz es ampliamente utilizado como forraje, materia prima para la producción de alimentos procesados, y recientemente, para la producción de etanol. Por otra parte, en algunos países de América Latina y cada vez más en

África, un gran porcentaje del maíz producido ó importado es usado para consumo humano (Serratos-Hernández, 2009).

1.1.2. Morfología y fisiología

El maíz es una planta anual que pertenece a la familia de las gramíneas o poáceas, que en general son plantas herbáceas u ocasionalmente leñosas, es de inflorescencia monoica (con inflorescencias masculina y femenina separadas dentro de la misma planta) y se trata de una especie que se reproduce por polinización abierta. Como la mayoría de los miembros de la familia poácea, la planta de maíz está compuesta mayormente por tejido foliar; además de las hojas, está constituida por el tallo principal a lo largo del cual se pueden reconocer estructuras conocidas como nodos, cada nodo lleva una sola hoja en posición opuesta a la próxima hoja del siguiente nodo (disposición conocida como filotaxia).

De acuerdo al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en ingles) el maíz se clasifica de la siguiente forma:

Reino	Plantae (Plantas)
Subreino	Tracheobionta (Plantas Vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (Plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (Plantas con flores)
Clase	Liliopsida (Monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Genero	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz. (Departamento de Agricultura, USA) (<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ZEMA>).

1.1.3 Semilla

En botánica, el grano maduro de maíz (**Fig. 1**) se denomina cariósipide o cariopsis; cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal. En el grano se pueden distinguir tres estructuras físicas fundamentales: el pericarpio, el endospermo y el embrión.

El pericarpio consiste en la pared trasformada del ovario que cubre a la semilla, y actúa como una protección para el embrión y el endospermo. Este toma el lugar de la cubierta de la semilla o integumento en las semillas ordinarias. El endospermo y el embrión se encuentran unidos por el pericarpio.

El endospermo contribuye aproximadamente con un 85% del peso del grano, este puede ser dividido en tres partes: endospermo amiláceo, capa de aleurona y la capa basal de transferencia. El endospermo amiláceo ocupa casi la totalidad del endospermo, está compuesto por células con una gran reserva de nutrientes, principalmente gránulos de almidón y en menor proporción cuerpos proteicos; células que tras la acumulación de nutrientes, pasaron por un programa de muerte celular programada al final del desarrollo de la semilla, durante la desecación. En consecuencia, el endospermo amiláceo en una semilla madura está compuesto por células muertas. La capa de aleurona está compuesta por una capa unicelular de células en contacto con el pericarpio, que permanecen activas hasta la maduración, y acumulan básicamente lípidos y almacenan proteínas que juegan un papel importante durante la germinación. Las células en contacto con el pedúnculo (células conductoras basales del endospermo) en la base del endospermo, sirven para transportar los nutrientes de la planta madre a la región circundante al embrión (<http://masish.uab.cat/masish/images/maizeseedanatomy2.pdf>).

El embrión está formado por un eje central, el cual en su extremo basal tiene a la radícula, a partir de la cual se formará la raíz primaria, y en su extremo apical esta la plúmula que dará origen al tallo. En la plúmula se reconocen de 5 a 6 internodos, con una hoja en cada nodo. El escutelo se encuentra unido al primer

nodo ó nodo escutelar, que funciona como un órgano para almacenamiento de nutrientes, y además sirve para digerir y transportar nutrientes del endospermo al eje embrionario durante la germinación. En el segundo nodo ó nodo coleoptilar encontramos el coleoptilo, el cual funciona como una cubierta que protege a la plúmula. La plúmula está formada por la parte del tallo arriba del nodo coleoptilar, y este incluye el meristemo apical del tallo y cuatro o cinco primordios foliares. Al espacio comprendido entre los nodos coleoptilar y escutelar se le denomina mesocotilo; éste crece rápidamente durante la germinación y sirve para elevar al coleoptilo de la superficie del suelo. La raíz primaria se encuentra protegida por la coleorriza. Además de la radícula, generalmente dos o más raíces adventicias están presentes en la base del primer internodo del tallo (Vincent, 2002).

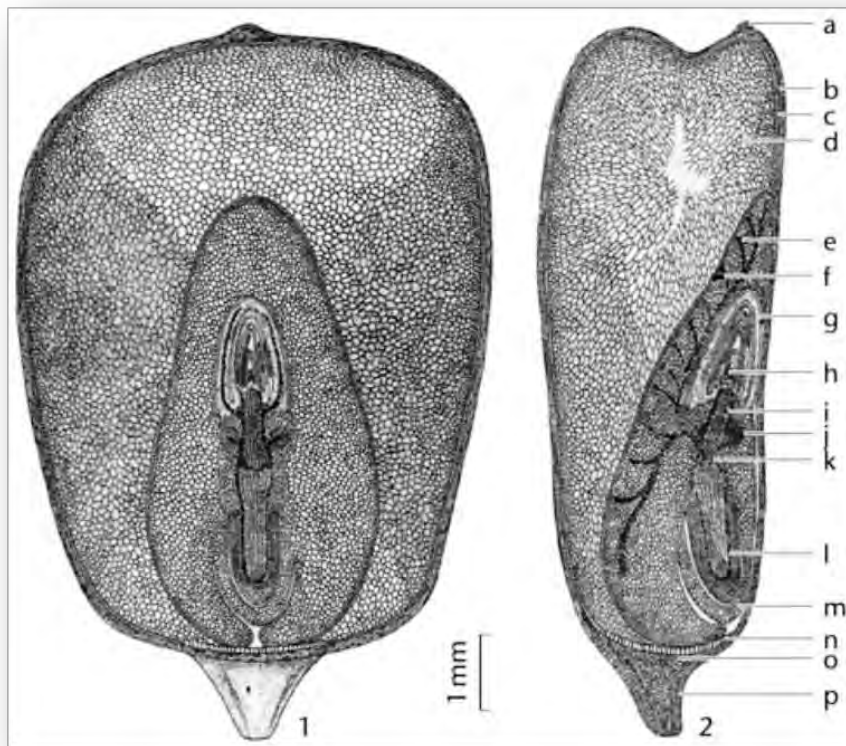


Fig. 1. Secciones verticales del grano maduro de maíz visto de **1)** frente y de **2)** perfil. **a.** cubierta del estilo **b.** pericarpio **c.** capa de aleurona **d.** endospermo **e.** escutelo **f.** capa granular del escutelo **g.** coleoptilo **h.** plúmula **i.** primer internodo **j.** primordio de la raíz lateral adventicia **k.** nodo escutelar **l.** radícula **m.** coleorriza **n.** células conductoras basales del endospermo **o.** capa de abscisión **p.** pedúnculo. Tomado de Kiesselbach, 1999

1.2. Germinación

Una semilla contiene o adquirirá durante la germinación la maquinaria bioquímica que será capaz de convertir un embrión en una planta. Por definición, la germinación de una semilla empieza con la toma de agua y termina con la aparición de la radícula a través de la envoltura de la semilla (Nonogaki *et al.*, 2010). Tradicionalmente se ha descrito a la germinación, desde el punto de vista del curso del tiempo con respecto a la absorción de agua por la semilla (**Fig. 2**). En la fase I este proceso es rápido hasta que todas las matrices (p. ej. paredes celulares y reservas de polímeros dentro de la célula) y contenidos celulares son totalmente hidratados, posteriormente en la fase II existe una toma limitada de agua, la cual permanece sin cambios en semillas que no completan la germinación, como es el caso de semillas dormantes o muertas, y finalmente en la fase III, existe un nuevo incremento en la toma de agua, que está relacionado con el término de la germinación.

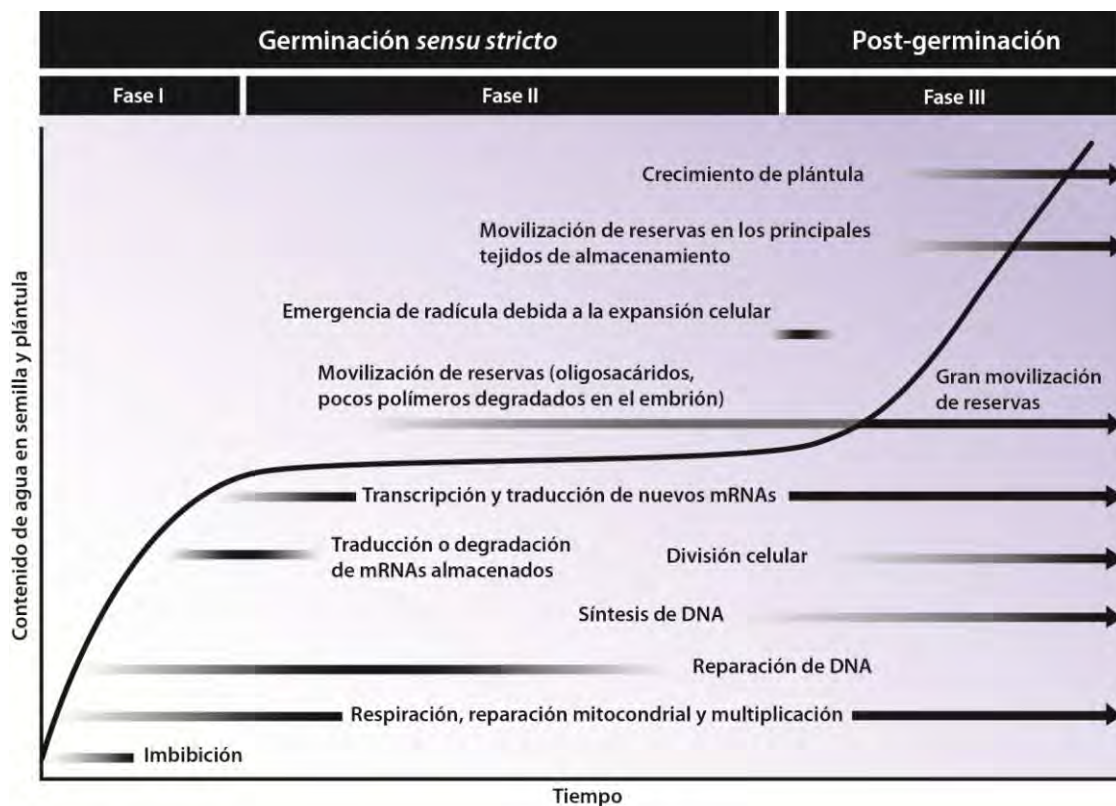


Fig. 2. Curso temporal de los eventos físicos y metabólicos que ocurren durante la germinación (Fases I y II) y el crecimiento temprano de la plántula (Fase III). Modificado de Nonogaki *et al.*, 2010.

Un evento temprano durante la fase I de imbibición, es el restablecimiento del metabolismo energético. Enzimas funcionales necesarias para la respiración como son las del ciclo de Krebs y oxidasas terminales, están presentes y probablemente proveen suficiente ATP a partir de la fosforilación oxidativa, hasta por varias horas después de la imbibición (Hourmant y Pradet, 1981). La vía glicolítica y de las pentosas también es activada tras la imbibición, la vía glicolítica predomina cuando la producción de ATP proveniente de la mitocondria es restringido por la baja disponibilidad de oxígeno; en contraste, cuando las mitocondrias están activas predomina la vía de las pentosas (Roberts, 1964).

Aunque las proteínas y membranas son protegidas en la semilla seca madura, pueden ocurrir daños durante la desecación y la imbibición. El daño a las proteínas, puede ocurrir debido a la formación de aminoácidos defectuosos durante la desecación y/o el envejecimiento, durante el periodo de almacenamiento; esto puede resultar en un plegamiento incorrecto de las proteínas, causando una reducción o pérdida en la función de las mismas. Existen enzimas, que desempeñan una función importante en la reparación de proteínas en semillas, como es el caso de la L-isoaspartil metiltransferasa, que cataliza la conversión de un residuo L-isoaspartil defectuoso, a su forma normal (Oge *et al.*, 2008).

Por otra parte, la deshidratación y rehidratación de la semilla durante su desarrollo y germinación, están asociados con altos niveles de estrés oxidativo, que resulta en un importante daño al DNA (Donday *et al.*, 1987); por lo tanto, este debe ser reparado durante la germinación. Un paso esencial en este proceso, es mediado por la DNA ligasa, que repara rupturas de cadena sencilla y doble (Vázquez *et al.*, 1991). Existen otras enzimas que están asociadas a la reparación del DNA por daño oxidativo (p. ej. DNA-formamidopirimidina glicosilasa y 8-oxoguanina DNA-glicosilasa), las cuales son sobreexpresadas en etapas tempranas de la germinación (Macovei *et al.*, 2011).

El restablecimiento de la síntesis de proteínas durante las fases I y II es de suma importancia para la germinación. Se desconoce si una semilla seca es capaz o no

de transcribir DNA y posteriormente sintetizar proteína en ese estado, aunque bajos niveles de transcripción y traducción transitorios pueden ocurrir en semillas con poca hidratación (Leubner-Metzger, 2005). En *Arabidopsis*, más de doce mil especies de mRNAs están presentes en la semilla seca (Nakabayashi *et al.*, 2005); estos mRNAs son llamados mensajeros almacenados o residuales, y sobreviven la desecación celular. Es posible que estos mensajeros ayuden a la síntesis proteica *de novo*, antes de que la actividad transcripcional se restablezca, y nuevos mensajeros sean sintetizados durante las etapas tempranas de la imbibición. En semillas secas (p. ej. embriones de trigo), todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis proteica están presentes (Marcus *et al.*, 1966).

Es muy claro cuándo inicia la germinación de una semilla ortodoxa (semillas que sobreviven a los periodos de desecación y congelación durante su conservación *ex situ*), ya que la condición única para que esto ocurra, es la toma de agua por parte de la misma (Mayer y Poljakoff, 1975); sin embargo, algo que es más ambiguo definir, es su término, ya que esto dependerá del enfoque que se dé a su estudio; para la agronomía, la germinación termina cuando la plántula emerge de la superficie del suelo, para la fisiología vegetal, esta culmina cuando protruye la radícula, aun cuando los procesos de proliferación celular pudieran no haber comenzado.

Dado que el enfoque de nuestro estudio está comprendido a un nivel más molecular, es preciso acuñar una definición propia de germinación. Así que desde nuestra perspectiva de investigación, la germinación inicia con la entrada de agua, desencadenando una serie de procesos bioquímicos y moleculares, que culminarán con el término de la primera ronda de divisiones celulares exitosas (Vázquez Ramos, 1990).

La decisión de las células del embrión para restablecer el ciclo celular o continuar arrestadas, es determinante para el establecimiento de la plántula. La arquitectura de la planta y su funcionamiento, dependerá de la habilidad de las células del embrión para reanudar su proliferación y diferenciarse. En consecuencia, entender

la proliferación celular (puntos de control, respuesta a señales externas, etc.), nos ayudara a entender los importantes procesos que permitirán a un embrión quiescente, convertirse en una planta metabólicamente activa.

Existen reportes de que en semilla seca de la mayoría de las especies, la mayor parte de las células del embrión quedan arrestadas en fase G_1 , esto en base a su contenido de DNA (Deltour and Jacquard, 1975; Conger and Carabia, 1976; Bewley and Black, 1994); el concepto no es absoluto, ya que tras el proceso de desarrollo de la semilla, algunas células pudieron haber detenido su ciclo celular en fase G_2 .

Por otra parte, la imbibición de la semilla no provoca una entrada inmediata al ciclo celular, existe un periodo de varias horas antes de que sea evidente la duplicidad del DNA; el tiempo que las células pasan en la transición G_0/G_1 es prolongando, debido a que las células deben reparar el daño sufrido durante la maduración, desecación y almacenamiento de la semilla.

Estudios de citometría de flujo, en núcleos aislados de embriones de maíz sin germinar, han mostrado un contenido 2C de DNA en la mayoría de las células que lo conforman (75%), el número de células con un contenido 4C, aumenta a partir de las 12 horas posteriores a la imbibición, claro indicio de la entrada de las células a fase S; esto ha sido corroborado por ensayos de actividad de la proteína timidina cinasa y la biosíntesis de histonas (Georgieva *et al.*, 1994). La actividad enzimática de la proteína timidina cinasa, actividad que se encuentra fuertemente asociada a la fase S (Gröbner 1979; Gröbner and Loidl 1982; Dou *et al.* 1992), muestra un pico importante de actividad a las 12 horas posteriores a la imbibición; por otro lado, la incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente a la biosíntesis *de novo* de histonas, restringido al periodo de replicación del DNA (Maxson *et al.*, 1983), comienza a ser evidente también a partir de las 12 horas.

En nuestro grupo de trabajo, se han realizado ensayos de incorporación de timidina tritiada a ejes embrionarios de maíz, cuya posterior disección, muestra la aparición de figuras mitóticas entre 28 y 36 horas posteriores a la imbibición, existiendo un máximo en la actividad mitótica a las 36 horas. De manera

interesante, este pico en la actividad mitótica es posterior a la protrusión de la radícula, que inicia a partir de las 20 horas (Baíza *et al.*, 1989), lo que implica que la protrusión de la radícula en maíz, ocurre primariamente debido a la elongación celular y no por un proceso proliferativo.

1.3. Ciclo celular

El ciclo celular no es un proceso exclusivo de plantas, involucra a todos los eucariontes, y los eventos básicos que ocurren en él están conservados (**Fig. 3**). En el caso de organismos pluricelulares, se requieren múltiples rondas de división celular y diferenciación de los diferentes tipos celulares que conforman al mismo, para que este crezca y pueda mantenerse vivo.

La finalidad del ciclo celular es dar origen a una nueva célula, idéntica en su información genética a su progenitora; este proceso es sumamente ordenado y tiene un flujo irreversible, lo que implica, que cuando la célula ha tomado la decisión de iniciar una ronda de proliferación y avanzada en el ciclo, las fases deben ocurrir en el orden correcto, y que una fase debe ser completada antes de que la siguiente fase pueda comenzar. Así que de principio, la célula debe percibir que cuenta con las condiciones adecuadas que le permitirán culminar su división celular, y es de esperarse que este proceso se encuentre fuertemente regulado.

El ciclo celular se divide en cuatro fases (**Fig.3**), en la fase G_1 , en donde la célula puede permanecer arrestada bajo ciertas circunstancias, se debe verificar que se cuenta con un entorno favorable para iniciar el ciclo, la célula debe aumentar su tamaño, y verificar que el DNA se encuentra íntegro, para que pueda ser correctamente duplicado. Una vez que el DNA se ha replicado durante la fase S (síntesis), en la fase G_2 , la célula se asegura de que la replicación del DNA se ha completado correctamente, y solo entonces la célula estará preparada para dividirse. Durante la fase M (mitosis) los cromosomas son separados y la célula se divide. Posterior a la división, la célula avanza nuevamente a G_1 y puede estar en condición de iniciar una nueva ronda de división celular (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

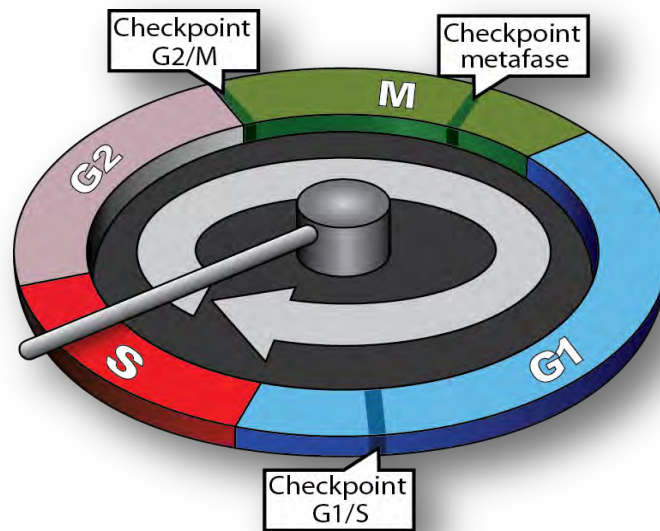


Fig.3 Representación del ciclo celular, indicando sus más importantes puntos de control.

Se ha progresado en el entendimiento de los mecanismos moleculares de la proliferación celular, revelando la existencia de mecanismos conservados en el funcionamiento del núcleo de proteínas, que permiten la división celular de todos los eucariotes. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que los mecanismos que controlan el ciclo celular son diferentes entre plantas y otros eucariotes, no solo en cosas particulares, p. ej. el número de proteínas involucradas en este proceso, sino también, la forma en que la regulación es influenciada por las condiciones ambientales (Dewitte y Murray, 2003).

1.3.1. Control del ciclo celular

Durante el ciclo celular, se han identificado varios puntos de regulación ó “checkpoints” importantes. El primero de ellos se encuentra en la transición G_1/S , otro en G_2/M , y un tercero en la transición de metafase a anafase, durante la mitosis. Estos puntos de regulación son muy importantes, ya que aseguran una división celular exitosa. En cada “checheckpoint” están involucradas proteínas conocidas como ciclinas, las que deben su nombre a sus fluctuaciones durante el ciclo celular, y a que asociadas a una unidad catalítica conocida como CDK

(quinasas dependientes de ciclina), se encargan de regular las transiciones durante el ciclo celular. Diferentes complejos ciclina-CDK fosforilan un gran número de sustratos en los puntos de control G₁/S y G₂/M, permitiendo con ello la replicación del DNA y la mitosis respectivamente. La subunidad catalítica CDK es la responsable del reconocimiento del motivo blanco de fosforilación (una serina o treonina seguida por una prolina), presente en la proteína sustrato; por otra parte, la ciclina discrimina entre distintas proteínas sustrato (Inzé y De Veylder, 2006).

Todos los organismos eucariotes estudiados a la fecha poseen al menos una CDK, con el motivo (secuencia de aminoácidos) PSTAIRE en su dominio de unión a ciclina (Dewitte y Murray, 2003). En levaduras una sola CDK es responsable del control del ciclo celular; en contraste, en eucariotes superiores, existen múltiples CDKs que actúan en diferentes puntos del ciclo celular. Estas CDKs no están totalmente conservadas entre plantas y animales, y existen secuencias que varían en su dominio de unión a la ciclina. Respecto a su clasificación, en animales se ha adoptado la nomenclatura CDK, seguida de números que van del 1 al 7 (Pines, 1995a); por otra parte en plantas, la ausencia de equivalentes directas (excepto entre CDK1 y CDKA), ha llevado a la adopción de un sufijo alfabético (CDKA a CDKE) (Joubès *et al.*, 2000).

Hasta el momento, no ha sido reportada ninguna estructura cristalográfica de alguna CDK de plantas, sin embargo, todas las CDKs comparten similitudes en su estructura. El sitio catalítico posee sitios de unión al ATP, y la unión de la ciclina estabiliza el sitio catalítico (Joubès *et al.*, 2000). El acceso al sitio activo permanece limitado por un loop en la CDK, conocido como el loop-T (loop de treonina). La fosforilación de un residuo de treonina, conservada dentro del loop-T, induce un cambio conformacional que permite la unión del ATP. La fosforilación de la treonina-160, o el residuo equivalente, es esencial para la actividad de la CDK y la responsable de dicha fosforilación es una proteína cinasa activadora de CDK o CAK (por sus siglas en inglés). Por otra parte, las fosforilaciones en la treonina-14 y la tirosina-15, inhiben la actividad de la CDK; éstas son catalizadas por la cinasa WEE1, por consiguiente para que la CDK pueda ser activa, estas fosforilaciones

han de ser removidas. En levaduras y mamíferos esta función es realizada por la fosfatasa CDC25. Aunque hasta la fecha no se ha encontrado una proteína homologa a CDC25 en plantas que realice esta función, es probable que una equivalente funcional este presente.

La actividad de la CDK resulta en la adición covalente de un grupo fosfato a la proteína sustrato, la cual modifica las propiedades del sustrato. Ejemplo de ello es la fosforilación de la histona H1 en cromosomas mitóticos, otros blancos conocidos de CDKs, incluyen componentes del citoesqueleto y la proteína de retinoblastoma (Rb), cuya fosforilación controla la transición G₁/S. En otros casos, la fosforilación por CDK resulta en la destrucción de componentes específicos del ciclo celular, ya que generalmente el reconocimiento de blancos para la proteólisis mediada por ubiquitina a través de proteínas F-box, requiere una fosforilación previa.

Además de la regulación mediada por la unión de la ciclina a la CDK, y de las fosforilaciones inhibitorias y activadoras, se reconocen proteínas que asociadas a la CDK o al complejo ciclina-CDK, pueden modificar su actividad, y por lo tanto la progresión del ciclo celular (**Fig. 4**).

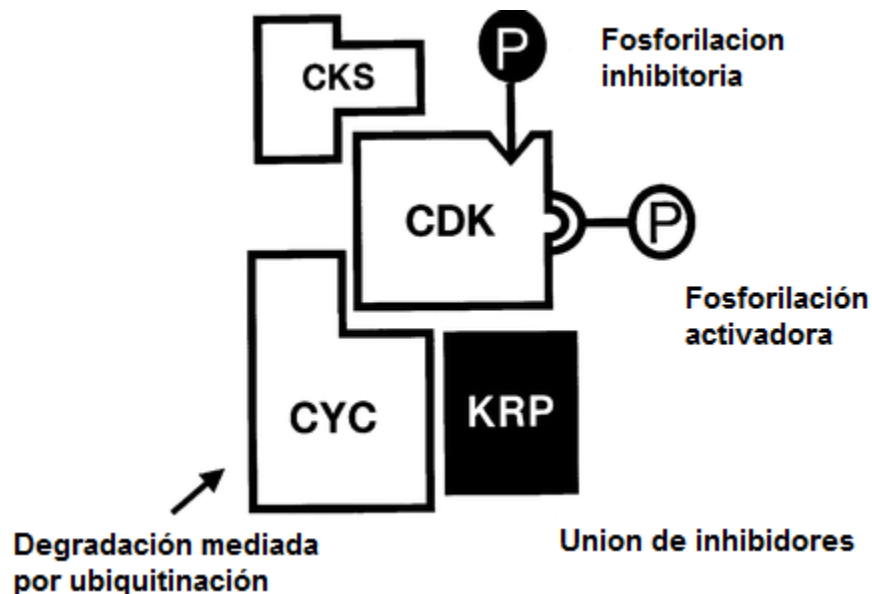


Fig. 4. Regulación de la actividad de CDK. Modificado de Dewitte y Murray, 2003.

En plantas, estas proteínas son conocidas como inhibidores de CDK (ICK) o KRP (Kip related protein; por su relación con las proteínas Kip/Cip, que cumple la función inhibitoria en mamíferos), estas proteínas suelen tener sitios de unión tanto para la ciclina como para la CDK (Wang *et al.*, 1999). Por otra parte, proteínas conocidas como la subunidad reguladora de la CDK (CKS), relacionada en levaduras a la proteína p16^{SUC1}, actúan inhibiendo o activando la función catalítica de la CDK; al parecer su función es importante para favorecer la interacción del complejo ciclina-CDK con sus sustratos (Binarova *et al.*, 1998).

1.3.2. Ciclinas

El descubrimiento de las ciclinas en huevos de erizo de mar, por Timothy Hunt y sus colegas en 1983, sentó las bases bioquímicas que llevaron al entendimiento de los osciladores que conducen el ciclo celular; además, reveló que la maquinaria básica encargada del ciclo celular, esta conservada en todos los eucariontes (Evans *et al.*, 1983; Novak *et al.*, 1998). Actualmente se conoce un gran grupo de ciclinas en animales, levaduras y plantas, que se asocian con un número de diferentes CDKs. Estas asociaciones son reconocidas como clave en la regulación de proteínas cinasas de serinas y treoninas. La unión de la ciclina es determinante en la regulación de la actividad de CDK, ya que esta solo es activa al asociarse con la ciclina, además la destrucción o localización de la ciclina, provee múltiples niveles de control para la activación de la subunidad CDK.

En animales, al menos 13 clases de ciclinas han sido identificadas (nombradas como ciclina A a la L y T); por otra parte, en plantas más de 100 ciclinas han sido aisladas de diferentes plantas. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, a pesar del reducido tamaño en su genoma, se han identificado 50 ciclinas, las cuales pueden ser agrupadas en nueve clases y 23 subgrupos (Wang *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2005), de las cuales cinco clases no han sido encontradas en animales, aunque solo existe evidencia clara de que las ciclinas A, B, D y H tienen un papel en el ciclo celular. En arroz al menos 50 ciclinas han sido encontradas, y aunque comparte diez clases de ciclinas con *Arabidopsis* (A, B, C, D, K, L, SDS, Q, T y P),

las ciclinas tipo F reportadas en arroz, parecen ser particulares de esta planta (La *et al.*, 2006). Es interesante señalar que en todas las plantas, el grupo formado por las ciclinas D, es el que mayor número de miembros comprende.

Las ciclinas contienen una región conservada de 250 aminoácidos, llamada caja de ciclina, que a su vez esta formada por los dominios ciclina amino (N) y ciclina carboxilo (C) (Nugent *et al.*, 1991). El dominio ciclina N, abarca la región de interacción con CDK, y consiste de aproximadamente 100 aminoácidos; este dominio también es conocido como caja de ciclina, y es el que define a una ciclina. El dominio ciclina C es menos conservado, y esta presente en la mayoría de las ciclinas, mas no en todas, lo cual sugiere una función específica, sin embargo, su ausencia no es crítica para la correcta función de la ciclina. Además, algunas ciclinas tienen cajas de destrucción (Dbox) y motivos PEST, este último les confiere inestabilidad, ya que este motivo permite su degradación mediada por ubiquitinación (Rechsteiner and Rogers, 1996; Wang *et al.*, 2004).

Las ciclinas tipo A y B son conocidas por su participación en la transición G₂/M (Burssens *et al.*, 2000), y ambas se encuentran filogenéticamente relacionadas. Las ciclinas tipo A están subdivididas en tres diferentes subclases (A1, A2 y A3) (Renaudin *et al.*, 1996; Chaubet-Gigot, 2000), y es probable que las tres subclases participen de forma particular en el ciclo celular, dado que su regulación es diferencial (Menges *et al.*, 2005; Reichheld *et al.*, 1996). Por otra parte, las ciclinas B también han sido subdivididas en tres subclases (B1, B2 y B3) (Renaudin *et al.*, 1996; Vandepoele *et al.*, 2002). En células sincronizadas de *Arabidopsis*, se ha observado que los perfiles de expresión de las ciclinas B no se distinguen, de lo observado para las ciclinas CYCA1 y CYCA2 (Menges *et al.*, 2005), mostrando un máximo de expresión en tiempos tempranos de mitosis. También se ha demostrado que la función de las ciclinas B en plantas, es semejante a la de ciclinas B de animales (Qin *et al.*, 1996).

Los datos publicados sobre las ciclinas tipo C, H, L, P, Q, T y SDS encontradas en *Arabidopsis*, son limitados, y no se ha mostrado de manera clara que estén

implicadas en la regulación del ciclo celular, en contraste con lo publicado para las ciclinas tipo A, B y D (Menges *et al.*, 2005).

El gran número de ciclinas, tanto en plantas como en animales, refleja el hecho de que el desarrollo de organismos multicelulares complejos, requiere de un control espacial y temporal muy fino de la división celular, con la finalidad de lograr su plan de desarrollo, y regular su crecimiento primario para adaptarse a su cambiante medio ambiente. Es de llamar la atención que la familia de ciclinas en plantas, sea más grande que la de otros eucariontes. Este mayor número de ciclinas, podría reflejar la necesidad de las plantas, de adaptar su patrón de crecimiento de una forma más flexible, dado que son incapaces de trasladarse a un lugar con mejores condiciones, cuando el sitio donde se encuentran no es favorable para su desarrollo.

1.3.3. Ciclinas D y la transición G₁/S

En la fase G₁, antes de que la célula se comprometa a la duplicación de su DNA, las ciclinas tipo D actúan como los sensores primarios, encargados de percibir que las condiciones externas sean óptimas para el inicio de la proliferación celular, y en complejo con CDKs, mediar el control de la transición G₁/S, por fosforilación directa de la proteína relacionada a RB (RBR), presente en plantas y homóloga a la proteína RB presente en animales, la cual en su estado hiperfosforilado permite el avance del ciclo celular (Bonioti and Gutiérrez, 2001; Dewitte and Murray, 2003; de Jager *et al.*, 2005; Uemukai *et al.*, 2005).

Las ciclinas tipo D fueron identificadas funcionalmente por primera vez, debido a su habilidad para rescatar un fenotipo en levaduras que carecían de una ciclina de G₁ endógena (CLN) (Dahl *et al.*, 1995). Las ciclinas D están conservadas en plantas (Oakenfull *et al.*, 2002), su expresión esta asociada a la proliferación celular, y responde fuertemente a señales mitogénicas, como sacarosa o citocininas (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Menges *et al.*, 2002; Oakenfull *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2005). Existe muy baja homología entre las ciclinas D en plantas y las presentes en animales, así que una relación entre ortólogos no

puede ser establecida (Wang *et al.*, 2004), sin embargo, el dominio responsable de la unión a Rb se encuentra conservado entre estas especies. Este dominio consiste de un motivo LXCXE (donde X puede ser cualquier aminoácido), y experimentos *in vitro* utilizando a las CYCD2;1 y CYCD3;1 de *Arabidopsis*, han mostrado que este motivo es necesario para la interacción con RBR (Ach *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 1998).

En humanos, la actividad más importante del complejo ciclina D/CDK4/6, es la de fosforilar a la proteína RB (Brehm and Kouzarides, 1999), que en su estado hipofosforilado forma un complejo que inactiva al factor de transcripción E2F-DP1 (**Fig. 5**); una vez fosforilada RB, se libera del complejo E2F-DP1, y se permite la transcripción de los genes que se encuentran bajo la regulación de este factor de transcripción. En plantas, varios aspectos de la vía pRB/E2F se encuentran conservados, a pesar de no existir ortólogos de CDK4 y CDK6 (Inzé, 2005); CDKA y CDKB podrían potencialmente fosforilar a RBR.

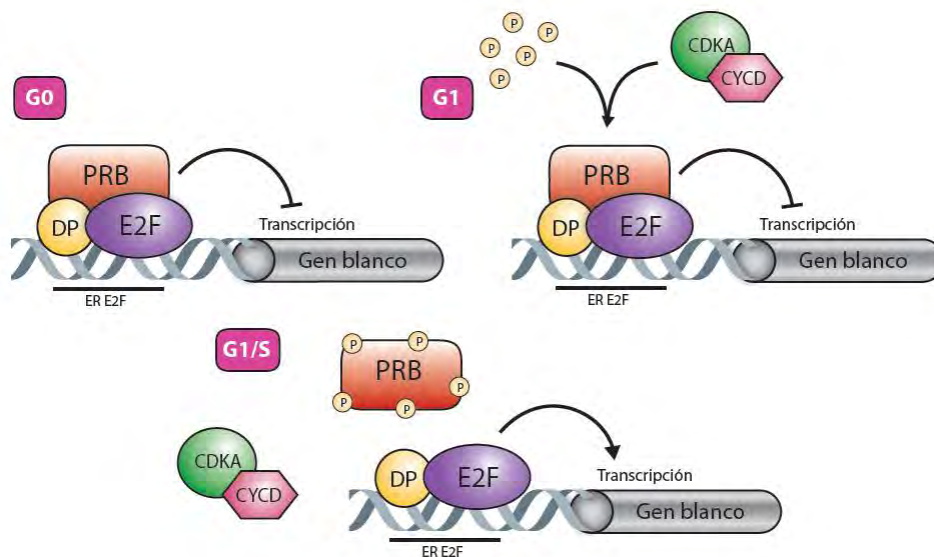


Fig. 5. Representación esquemática de la transición G1/S. Modificado de Oakenfull *et al.*, 2002.

Durante la germinación de semillas de *Arabidopsis*, elevados niveles de CYCD preceden a la emergencia de la raíz, y mutantes con pérdida de función en ciclinas

tipo D que son expresadas tempranamente, muestran un retraso importante en el inicio de la proliferación celular (Masubelele *et al.*, 2005). Estos experimentos ubican a las ciclinas tipo D río arriba de la vía RBR/E2F, y sugiere que las CYCDs en plantas, como en animales, tienen un papel clave en la percepción y transmisión de las señales mitogénicas en el punto de control G₁/S.

En *Arabidopsis* se ha mostrado que tanto la ciclina CYCD2;1 y CYCD3;1 forman complejos con CDKA, pero no se han visto niveles detectables de formación de complejos con CDKB1;1 (Healy *et al.*, 2001), en contraste, la CYCD4;1 es capaz de unirse a CDKB *in vitro*, aunque esta interacción no ha sido confirmada por inmunoprecipitación en extractos celulares (Kono *et al.*, 2003). CDKA se encuentra presente durante todo el ciclo celular, mientras que la actividad de CDKB esta principalmente en la fase S y M (Sorrell *et al.*, 2001; de Jager *et al.*, 2005), por este motivo se ha propuesto que el control de la transición G₁/S por las ciclinas tipo D se debe principalmente a su asociación con CDKA.

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento sobre la regulación de la transición G₁/S, incluyendo el papel de las ciclinas D, se han realizado en *Arabidopsis*, y este modelo ha servido de manera importante para entender las particularidades de esta regulación en plantas; sin embargo, solo parte de la información generada en *Arabidopsis* pueden ser extrapolada a otras plantas. En principio, *Arabidopsis* es una planta dicotiledónea, y algunos cereales de importancia económica que han comenzado a ser estudiados (p. ej. maíz y arroz) son monocotiledóneas; ambos grupos de plantas evolucionaron de forma separada, y por consiguiente sus mecanismos de regulación podrían ser diferentes. Lo anterior aunado al hecho de que tanto maíz como arroz sufrieron procesos de domesticación, que pudieron modificar de manera importante sus procesos regulatorios, en comparación con los que poseen sus ancestros. Así pues, debido a la importancia del maíz no solo histórica y culturalmente, sino como alimento básico en todo el mundo, para nuestro grupo es importante el estudio de las ciclinas que intervienen en la fase G₁ y su relevancia durante la germinación.

2. ANTECEDENTES

En nuestro grupo se ha caracterizado la expresión de varias ciclinas, CycD2;2, CycD4;2, Cyc5;3 (a y b) y CycD6;1. El transcrito de la CycD2;2 es visible a partir de las 6 horas posteriores a la imbibición, y sus niveles fluctúan hasta las 24 h. La proteína está presente en semilla seca y sus niveles aumentan hasta las 6 horas de germinación, para disminuir gradualmente hacia las 24 horas. La adición de citocininas o ácido abscísico (ABA), no modificó de manera importante el patrón descrito anteriormente. Esta proteína mostró asociación con dos CDKs tipo A que contenían el motivo PSTAIRE, y este complejo mostró actividad sobre la proteína RBR (Gutiérrez *et al.*, 2005).

Los transcritos de las ciclinas D4;2 y D5;3 (a y b), se expresan de manera diferencial dentro de las primeras 24 horas de germinación, y responden de forma particular a la adición de fitohormonas, (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). A nivel de proteína, estas ciclinas aumentan sus niveles a medida que transcurre la germinación, y la adición de BA e IAA, no parece influir sobre su acumulación. Estudios de actividad cinasa sobre la proteína RBR durante la germinación (0-24 h), utilizando los complejos formados por las ciclinas y CDKA, muestran un incremento importante en su actividad; cuando los ejes fueron germinados en presencia de BA o IAA (Lara-Núñez *et al.*, 2008). Un estudio fino de estas ciclinas, con anticuerpos más específicos, reveló un comportamiento diferente al inicialmente reportado. Los niveles de estas proteínas se mantienen constantes a lo largo de la germinación (0-24 h), y no son afectados por la adición de hormonas (IAA y ABA). Ambas proteínas se asocian a CDKA y CDKB de forma diferencial, y dicha asociación no se afecta por la presencia de hormonas (Godínez-Palma, 2010).

El mensajero de la ciclina CycD6;1 se acumula hacia las 24 horas de germinación (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), los niveles de proteína disminuyen conforme avanza la germinación, y este patrón de acumulación se ve modificado por la inanición de sacarosa (Zamora-Zaragoza, 2012).

Recientemente el genoma de maíz fue secuenciado (Schnable et al. 2009), y esto permitió distinguir los genes de ciclinas D. Como resultado del análisis, se encontraron al menos 17 genes, y éstos caen dentro de los diferentes subgrupos ya reportados para *Arabidopsis* y arroz: CycD1, CycD2/CycD4, CycD3, CycD5, CycD6 and CycD7. Existen transcritos para la mayoría de las ciclinas en semilla seca, y en general tienen patrones de acumulación durante la germinación, siendo máxima a las 24 horas (Buendía-Monreal *et al.*, 2011). Fue interesante observar variaciones en la expresión de las 17 ciclinas, a nivel de mensajero, en diferentes tejidos estudiados, como meristemas de raíz, tallo y en hoja joven, sugiriendo que su función no necesariamente es redundante.

3. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, a nivel de proteína solo se han caracterizado 4 ciclinas D de las 17 encontradas en el genoma de maíz; como se mostró en los antecedentes, estas parecen no ser redundantes, por lo que se hace necesario aumentar el número de ciclinas caracterizadas, estudiando aquellos subgrupos aun no bien caracterizados. Uno de los subgrupos con mayor número de ciclinas es el CycD2, de éste, en nuestro grupo solo se ha caracterizado a la ciclina CycD2;2, por lo que el generar anticuerpos que nos permitan estudiar los niveles proteicos de otra ciclina del subgrupo CycD2, en principio, será útil para comparar los niveles de acumulación, y mediante estudios posteriores, dilucidar si, ciclinas aún dentro de un mismo subgrupo pudieran ser o no redundantes, considerando el hecho de que podrían tener funciones similares.

4. HIPÓTESIS

Si las ciclinas tipo CycD2 realizan la misma función, entonces, la expresión de CycD2;1, tanto a nivel de mensajero como de proteína, será muy semejante a la de las otras ciclinas D2, durante la germinación de ejes embrionarios.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Estudiar los niveles de la proteína ciclina CYCD2;1 de maíz (*Zea mays*) durante la germinación de ejes embrionarios y su interacción con CDKs.

5.2 Objetivos particulares

- ✓ Identificar secuencias únicas y antigénicas en la secuencia de aminoácidos de la ciclina D2;1 de maíz y clonar el correspondiente cDNA.
- ✓ Obtener el péptido recombinante e inducir anticuerpos.
- ✓ Evaluar la especificidad del anticuerpo producido.
- ✓ Estudiar los niveles de CycD2;1 en ejes embrionarios de maíz, embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 horas.
- ✓ Verificar la interacción de CycD2;1 con CDKs.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Semillas de maíz

En los ensayos de germinación, se utilizaron ejes embrionarios de semillas secas de maíz (variedad *chalqueño*) extraídos cuidadosamente con una navaja, y lavados posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y agua desionizada estéril.

6.1.2 Cepas

Para la clonación de los plásmidos de clonación y expresión, se utilizó la bacteria *E. coli* cepa DH5- α ; para la expresión de la proteína recombinante quimérica se usó *E. coli* cepa BL21.

6.1.3. Plásmidos

La clonación del segmento de DNA que codifica para el péptido inmunogénico, se llevó a cabo en el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega), este contiene como marcador de selección al gen de la β -galactosidasa, que facilita la identificación de colonias que contienen el vector con el inserto que se desea clonar. Para la expresión de la proteína recombinante, se utilizó el vector pGEX-4T2 (GE Healthcare), el cual cuenta con un promotor inducible por IPTG que permite controlar la expresión de una proteína de fusión con GST (Glutación S-transferasa) en el extremo amino, y el péptido de interés en el extremo carboxilo. Ambos tienen un gen de resistencia a ampicilina que permite la selección de colonias con el plásmido de interés (**apéndice 2**).

6.1.4. Conejos

Para el esquema de inmunización se utilizaron dos conejos macho cepa Nueva Zelanda.

6.1.5. Cultivos bacterianos

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) (Invitrogen) con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C, 150 rpm. Los cultivos de volúmenes pequeños (≤5mL) se desarrollaron en tubos de ensayo de 18 mm X 150 mm, mientras que para volúmenes grandes (≥50mL) se emplearon matraces Erlenmeyer de al menos el doble de capacidad que el volumen a cultivar. Los cultivos sólidos se hicieron en agar LB contenido en cajas petri de plástico. El medio LB y el agar LB se esterilizaron en autoclave (calor húmedo); cuando el agar LB se utilizó para monitorear la inserción del fragmento de interés en el vector de clonación, se adicionó X-gal (SIGMA-ALDRICH) (previamente disuelto en N,N-dimetilformamida) a una concentración final de 20 µg/mL y ampicilina (100µg/mL), previo descenso de la temperatura (≈40°C). Para el resto de cultivos que requerían agar LB, solo se adicionó ampicilina (100 µg/mL).

6.2. Técnicas generales

6.2.1. Electroforesis de DNA

Para verificar las transformaciones de células competentes, las reacciones de amplificación y las de digestión de DNA, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. El gel se preparó con solución amortiguadora TAE 1X (Tris 50mM, acetato de sodio 1mM, EDTA 2mM) pH 8.5, y agarosa (Invitrogen), esta mezcla se calentó en un horno de microondas, y se agitó hasta la total disolución de la agarosa; por cada 100 mL de disolución, se adicionaron 5 µL de bromuro de etidio (10mg/mL). Según el volumen a cargar en cada pozo, se adicionó amortiguador de carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen cianol FF, 30% de glicerol en agua) para una concentración final 1X. Se agregó solución amortiguadora TAE, hasta cubrir el gel y se corrió la electroforesis a 85 V. El gel se observó en un transiluminador (UV-Transilluminator, UVP inc). Las fotografías se obtuvieron con los equipos Fluor-S Multilmager (Bio-Rad) y Digital science Image Station 440CF (Kodak).

6.2.2. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

La purificación de productos de amplificación o digestión de DNA, se realizó con el Kit comercial GenElute Gel Extraction Kit (SIGMA-ALDRICH), siguiendo las instrucciones del proveedor (número de catálogo: NA1111).

6.2.3. Purificación de DNA plasmídico

La purificación de plásmidos (vectores de clonación y de expresión), se realizó con el kit comercial illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del proveedor (código de producto: 28-9042-69).

6.2.4. Preparación de células competentes

Las células competentes de las cepas utilizadas de *E. coli*, se prepararon inoculando 3 mL de medio LB con la cepa correspondiente, y se cultivaron toda la noche (O/N) a 37°C, 150 rpm. De este cultivo se tomaron 0.25 mL para inocular 250 mL de medio LB (estéril) contenido en un matraz Erlenmeyer, y este se incubó 3 h a 37°C en agitación constante. Transcurridas las 3 h, se vertió el cultivo a tubos Falcon estériles, y se colocaron en hielo durante 15 minutos, posteriormente las células se centrifugaron a 5000 rpm, durante 10 minutos. Las pastillas se resuspendieron cuidadosamente con 20 mL de cloruro de calcio 0.1 M, y se volvieron a incubar en hielo por 20 minutos. Nuevamente los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, y las pastillas se resuspendieron cuidadosamente en 1.5 mL de cloruro de calcio 0.1 M (Glicerol 15% v/v). Se repartió el volumen final en alícuotas de 100 µL, en tubos eppendorf de 1.5 mL. Las células fueron almacenadas a -70°C.

6.2.5. Transformación de células competentes

La transformación de células competentes con los productos de ligación, se realizó con 10 µL de la reacción. Cuando se transformó con el plásmido purificado por miniprep, se utilizó 0.2 µL del volumen eluido de la columna de purificación. Se agregó el volumen correspondiente de DNA (de ligación o plásmido purificado) a 100µL de células competentes, y se incubaron en hielo durante 20 minutos.

Posteriormente, se aplicó un choque térmico a 42°C por 2 minutos, y se regresó al hielo por 5 minutos más. Se añadió 1 mL de medio LB (sin ampicilina), y las bacterias se recuperaron durante 80 minutos a 37°C (150 rpm). Cuando se transformó con los productos de ligación, las bacterias se centrifugaron por 1 minuto a 4000 rpm, se desechó el exceso de medio LB, y las células se resuspendieron en el medio restante, para luego plaquear todo el volumen en cajas petri con agar LB (Ampicilina 100 µg/mL). Si la transformación se realizó con plásmido purificado, directamente se tomaron 100 µL del medio con bacterias, y se plaquearon en agar LB (Ampicilina 100 µg/mL). Las cajas Petri inoculadas se incubaron O/N a 37°C.

6.2.6 Purificación de anticuerpo

El suero fue purificado con ayuda del kit Montage Antibody Purification Kit with PROSEP-A media (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante (número de catálogo: LSK2ABA20).

6.2.7 Extracción de proteína de ejes embrionarios

En una campana de flujo laminar, los ejes embrionarios ya desinfectados, fueron colocados en cajas Petri de vidrio estériles que contenían un papel filtro (estéril) en el fondo, previamente humectado con 1 mL de solución amortiguadora (estéril) de imbibición (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, sacarosa 2% p/v, pH 7.4). Las cajas se cerraron e incubaron a 25°C en una estufa por 6, 12, 18 ó 24 h. Al término del tiempo de imbibición, los ejes se homogenizaron con nitrógeno líquido y 0.5 mL de amortiguador de extracción de proteínas (Tris-HCl 70 mM, 1 MgCl₂ mM, 25 mM KCl, sacarosa 0.25 mM, DTT 7.5 mM, Tritón X-100 al 0.1% v/v, pH 7.5). Inhibidores de proteasas y fosfatasa (SIGMA-ALDRICH) fueron agregados al buffer de extracción, según lo recomendado por el fabricante. El homogenizado fue traspasado a tubos eppendorf de 1.5 mL, y se centrifugó a 12 000 rpm durante 1 h a 4°C; la proteína soluble fue separada de la pastilla con ayuda de una jeringa de 3 mL (plastipak) y almacenada a -70°C. Se utilizaron 10 ejes embrionarios para cada réplica de tiempo de imbibición.

6.2.8 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Se realizó una curva patrón para determinar la concentración de proteína contenida en las diferentes muestras. Se hizo una curva patrón por duplicado, utilizando albúmina sérica bovina en concentraciones de 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0, 7.2, 8.4, 9.6, 10.8 y 12 $\mu\text{g/mL}$ a un volumen final de 100 μL ; se agregó a cada dilución 150 μL del reactivo de Bradford 1X (Dye Reagent Concentrate. Bio-Rad). Las muestras también se prepararon por duplicado; el volumen de las mismas se agregó de manera que el color producido estuviera dentro de la curva patrón, y se agregó agua desionizada para un volumen final de 100 μL , posteriormente se agregaron 150 μL del reactivo de Bradford 1X. La absorbancia de la curva patrón y de las muestras, se determinó en un espectrofotómetro Microplate Reader (Bio-Rad). El equipo de manera automática proporcionaba la cantidad de proteína en cada muestra.

6.2.9. Electroforesis de proteínas

Para verificar la presencia de proteínas y los ensayos de western blot, se realizaron electroforesis en gel Tris-glicina desnaturante de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). El gel se preparó como se indica en Sambrook *et al.*, 1989, y se corrió a 85 V hasta que el frente de corrida pasara el gel concentrador, luego el voltaje se aumentó a 107 V, hasta la finalización de la electroforesis. El amortiguador de electrodos utilizado fue de Tris-glicina-SDS 1X (Sambrook *et al.*, 1989).

Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga 2x, para una concentración final 1X (SDS 2%, β -mercaptoetanol 2mM, glicerol 4%, Tris-HCl pH 6.8 40mM, azul de bromofenol 0.01%); estas se desnaturalizaron a 87°C por 8 minutos. Para el ensayo de western blot donde se verificaron los niveles de la ciclina de interés durante la germinación; el gel separador se usó a una concentración de 9% de acrilamida, además se agregó glicerol a una concentración final de 10% v/v.

6.2.10. Western blot

Para los ensayos de western blot se realizaron SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-PSQ (0.2 μm) Transfer Membrane (Millipore) en el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) a 1.3 A y 25V por 10 minutos. Las membranas fueron bloqueadas con una disolución al 10% de leche en PBS (NaCl 137 mM, fosfatos 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) Tween-20 0.2% (v/v) por 1 h a 37°, y luego incubadas con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente, en una disolución al 10% de leche en PBS Tween-20 0.2% O/N a 4°C y en agitación. Concluido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 15 minutos con PBS Tween-20 0.2%, se incubaron con anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación, posteriormente los tres lavados de 15 minutos se repitieron. Las membranas se bañaron con 0.5 mL de la solución de detección por quimioluminiscencia Western Blotting Detection Reagent (Millipore) ó Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). El revelado se realizó en placas fotográficas Hiperfilm ECL 18x24 cm (Kodak), utilizando la disolución de revelado GBX developer (Kodak) y de fijación GBX fixer (Kodak); ambas preparadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.2.11. Inmunoprecipitación

En tubos eppendorf de 0.6 mL, se incubaron 15 μL de agarosa magnetizada-proteína A (Millipore), con 6 μL de suero inmune $\alpha\text{-ZmCDKA}$ ó el mismo volumen de anticuerpo purificado $\alpha\text{-ZmCycD2;1}$; según sea el caso, por 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Se adicionaron 150 μg de proteína extraída a ejes embrionarios embebidos durante los diferentes tiempos probados, y se incubaron O/N en agitación a 4°C. Terminada la incubación, los tubos se colocaron en una base imantada (Millipore) para retirar el sobrenadante y la agarosa se lavó 3 veces con 200 μL de buffer A (Tris-HCl 25 mM, EDTA 2.5mM, NaCl 125 mM, NaF 2.5 mM Triton X-100 1%; v/v, pH 7.5). Las muestras se desnaturalizaron en 20 μL de buffer de carga 2X, y se cargaron en un SDS-PAGE. Terminada la electroforesis, se realizó el ensayo de western blot.

6.2.12. Ensayo de pull down

En tubos Eppendorf de 0.6 mL, 200 μ L de resina Ni^{2+} (con la proteína p13^{SUC1} unida a esta) fueron incubados durante 2 h, con 500 μ g de extracto total de ejes embrionarios de maíz proveniente de semilla seca ó embebidos por 12 h; por otra parte, 200 μ L de resina Ni^{2+} fueron incubados con 50 μ g de las mismas muestras utilizadas para el ensayo de pull down con p13^{SUC1} y como control negativo, 200 μ L de resina Ni^{2+} con la proteína p13^{SUC1} unida fueron usados. Antes de iniciar la incubación, todas las muestras fueron llevadas a un volumen de 500 μ L con PBS 1X, terminado el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas dos veces con amortiguador de fosfatos 1X (PBS) y eluidas de la resina de Ni^{2+} con imidazol 250 mM. Eluidos los complejos de la resina de Ni^{2+} , las proteínas se precipitaron con 50 μ L de TCA (ácido tricloroacético), fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 5 minutos (4°C), y posteriormente lavadas con 300 μ L de acetona fría; nuevamente las muestras fueron centrifugadas y el exceso de acetona fue evaporado. Cada muestra fue desnaturalizada, previa adición de 20 μ L de buffer de carga 2X y 20 μ L de PBS 1X. Las muestras se corrieron por SDS-PAGE, junto con 50 μ g de extracto proteico, ya fuera de ejes embrionarios provenientes de semilla seca, o embebidos por 12 h, que fueron utilizados como control positivo para la identificación de la ciclina CYCD2;1. Finalmente se realizó un western blot para la identificación de la proteína de interés.

6.3. Obtención de Anticuerpos α -CycD2;1

Para la obtención de los anticuerpos policlonales específicos α -ZmCycD2;1, se eligió una secuencia de aminoácidos que fuera potencialmente inmunogénica; y que su secuencia de aminoácidos fuera diferente al resto de ciclinas D de maíz.

6.3.1. Análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZmCycD2;1

El alineamiento de la estructura primaria de las ciclinas D de maíz, que nos permitió visualizar las regiones menos conservadas entre ellas, se hizo con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.1.3.0 (Hall, 1999).

La predicción de inmunogenicidad de las regiones menos conservadas entre la CycD2;1 y el resto de las ciclinas de maíz, se realizó utilizando el programa EMBOSS: Antigenic (Kolaskar, 1990). La exposición de los aminoácidos a la superficie de la proteína, se analizó con el programa NetSurfP ver. 1.1 - Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions (Petersen, 2009. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>), mientras que la predicción de la estructura secundaria se realizó en el programa Hierarchical Neural Network-Secondary structure prediction (<http://expasy.org/tools/>).

6.3.2. Amplificación de cDNA

Para la amplificación del cDNA que codifica para el péptido que nos interesaba clonar, se diseñaron oligonucleótidos (**apéndice 3**) con ayuda del programa AmpliFX v.1.5.3 (<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX>). A los *primers* se les agregó secuencias que son reconocidas por las enzimas de restricción BamHI (en el forward) y EcoRI (en el reverse) para su corte, que facilitaron la clonación en el vector de expresión. Los oligos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM. La amplificación de cDNA se realizó a partir de RNA total de ejes embrionarios de maíz, embebidos por 18 horas, mediante una RT-PCR, utilizando el kit comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN), y siguiendo las instrucciones del proveedor. Las condiciones de reacción se especifican en el **apéndice 3**.

6.3.3. Ligación en el vector de clonación.

El cDNA de ZmCycD2;1 amplificado y purificado, se ligó en el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega), utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1. La reacción se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor (número de catálogo: A1360), y esta se incubó 16 h a 4°C.

6.3.4. Clonación en el vector de expresión

Después de verificar y purificar el plásmido pGEM-T Easy, con el inserto de cDNA codificante para el péptido potencialmente inmunogénico, se hizo una restricción

con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI (Invitrogen) a 37°C por 2 h. La reacción de restricción se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, y el fragmento escindido durante la restricción, se purificó a partir del gel de agarosa.

El fragmento purificado se ligó al vector de expresión: pGEX-4T2 ó pPAL7, previa digestión de este, con las mismas enzimas utilizadas para escindir el inserto del vector de clonación. Se utilizó DNA ligasa T4 (Invitrogen) para la ligación, y una relación molar 3:1; la reacción se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor, y se incubó durante 14 h a 4°C. Células competentes de *E. coli* cepa *DH5- α* , fueron transformadas con 10 μ L de la reacción de ligación, y éstas fueron plaqueadas en cajas de agar LB (Ampicilina 100 μ g/mL) e incubadas O/N a 37 °C.

Las colonias que crecieron fueron monitoreadas por doble restricción con las enzimas *Eco*R1 y *Bam*H1; se buscó el plásmido con el inserto de interés correctamente clonado. Una colonia positiva se utilizó para inocular 3 mL de medio LB (Ampicilina 100 μ g/mL), y se incubó O/N a 37°C, para la subsecuente purificación del plásmido. El plásmido fue cuantificado, y se envió a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM para su secuenciación, de acuerdo a las especificaciones solicitadas.

6.3.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante

Con el plásmido purificado, se transformaron células competentes de *E. coli* cepa *BL21*. La expresión de la proteína recombinante se indujo adicionando IPTG, a una concentración final de 0.2 mM, a un cultivo bacteriano de *E. coli* cepa *BL21*, que había crecido hasta una densidad óptica de 0.4, leída a 595 nm. Después de la adición de IPTG, se permitió la inducción de la proteína por 2 h a 37°C y 150 rpm. El cultivo bacteriano se traspasó a botes de 250 mL, y se centrifugó a 5000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Se desechó el medio LB, y la pastilla se resuspendió en 30 mL de PBS Tritón X-100 (1% v/v); las células se lisaron por sonicación (22 % de amplitud, 2 pulsos de 1 minuto). El lisado bacteriano se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y la fracción soluble se filtró en una membrana (Millipore) con tamaño de poro de 0.45 μ m. Para la purificación de

la proteína quimérica recombinante, el filtrado se pasó por una resina de glutatión-seferosa (SIGMA-ALDRICH), previamente equilibrada con PBS 1X. La resina se lavó con PBS Tritón X-100 1% (v/v) a 4°C, y posteriormente la proteína de interés se eluyó 3 veces con 1mL de una disolución de glutatión reducido; 10mM en 50mM de Tris-HCL pH 9.5 a 4°C. Tanto la inducción de la proteína, como las fracciones resultantes de la purificación, se monitorizaron en un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.

6.3.6. Inmunización de conejos y obtención del suero inmune

La inmunización de conejos se realizó en el bioterio de la Facultad de Química de la UNAM. El esquema seguido se muestra en el **apéndice 4**. Se realizó una punción cardíaca a cada conejo inmunizado, y la sangre se colectó en tubos Falcon de 50 mL. Se permitió la coagulación, y el suero fue separado del paquete celular. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos.

7. RESULTADOS

7.1. Producción de anticuerpo

7.1.1. Elección del péptido para la inmunización de conejos

Se realizó un alineamiento múltiple ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) a nivel de aminoácidos, de las 17 ciclinas D de maíz reportadas hasta el momento (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y se identificaron las regiones menos conservadas. Estas regiones se encontraron en el extremo carboxilo terminal de las ciclinas (Fig.6).

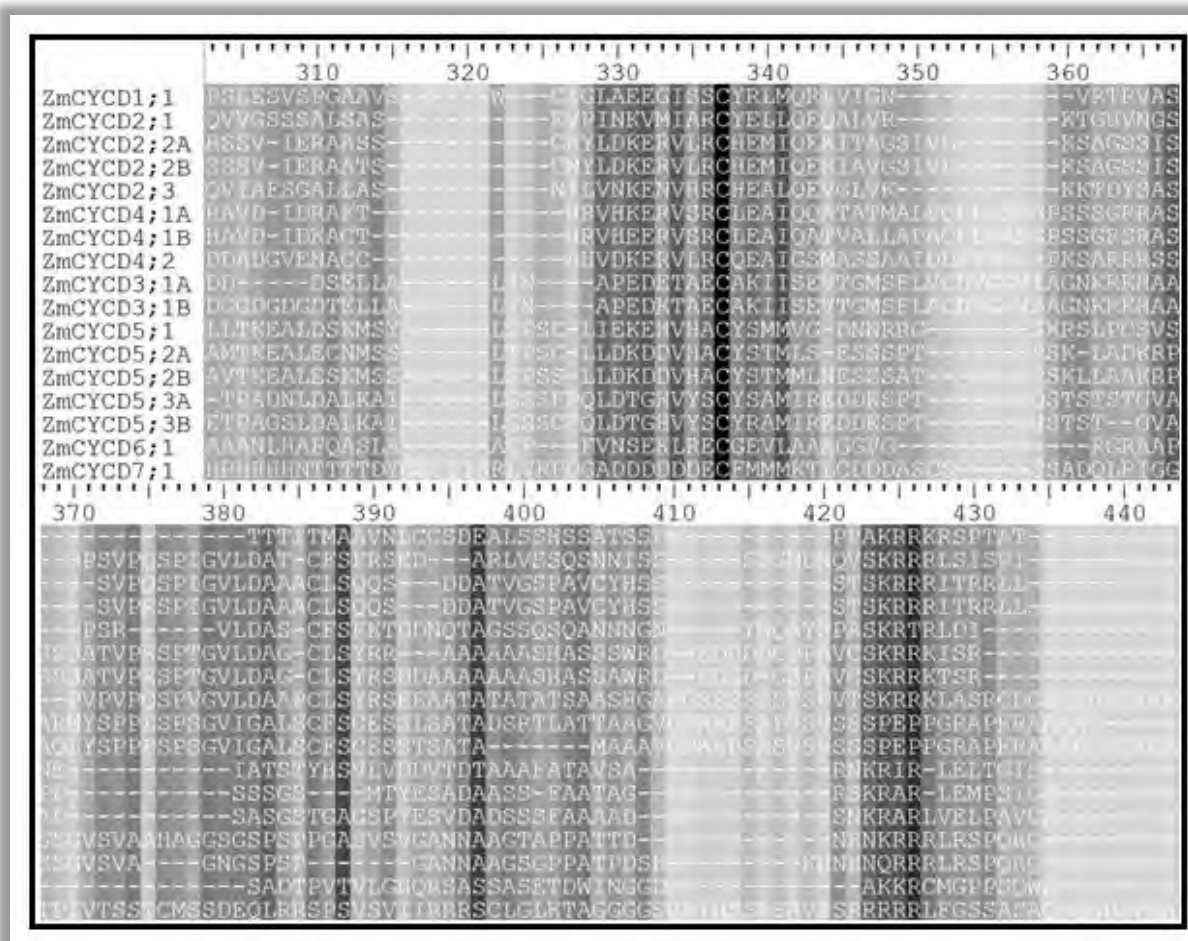


Fig.6. Alineamiento del extremo carboxilo terminal de las 17 ciclinas D de maíz. Los aminoácidos más conservados se denotan en una escala de grises, donde el negro corresponde a los aminoácidos totalmente conservados, y el gris más claro a los aminoácidos no conservados.

Para evaluar si el segmento poco conservado de la ciclina ZmCycD2;1 pudiera ser un buen inmunógeno, se consideraron los siguientes parámetros: Potencial inmunogénico, estructura secundaria y exposición a la superficie de los aminoácidos.

El programa EMBOSS: Antigenic, predijo las secuencias con potencial antigénico (**Tabla 2**), posteriormente se utilizó un programa para la predicción de estructura secundaria, y finalmente con el programa NetSurfp V1.1 se evaluó la exposición de los aminoácidos a la superficie de la proteína (**Fig. 6**). De esta manera, el péptido elegido quedó acotado a donde la mayoría de los aminoácidos estuvieran expuestos, y fueran potencialmente antigénicos.

Secuencia	Posición
STFLSFRPSEIAAASALAAVSENQVVGSSS	226-285
ALSASEVPINKVMIARCYELLQEALVRKT	
NGSPSPQSPIGVLDATCFSF	289-309
ARLVSS	314-319

Tabla 2. Fragmentos peptídicos en el extremo carboxilo de la CycD2;1 potencialmente antigénicos.

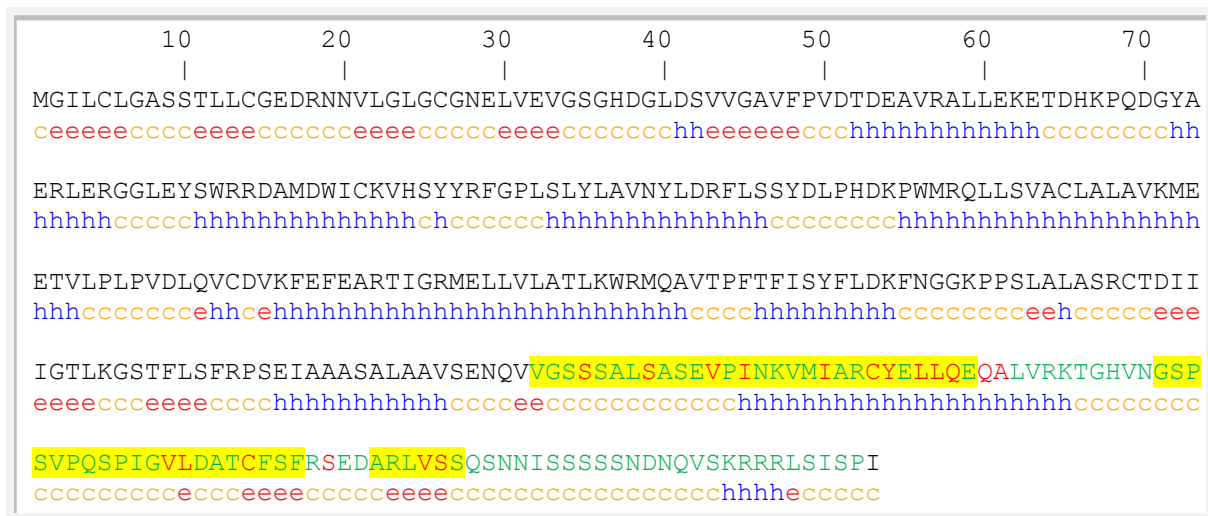


Fig. 6 Secuencia de aminoácidos de la CycD2;1. Mayúsculas en verde ó rojo, la secuencia de aminoácidos elegida para su clonación (en verde, residuo expuesto, en rojo, residuo oculto), el resto de la proteína en negro, resaltado en amarillo los aminoácidos potencialmente antigénicos. En minúsculas, debajo de la secuencia de aminoácidos, la estructura secundaria predicha por Hierarchical Neural Network; (h) hélice α (e) lamina β (c) "random coil".

7.2. Clonación del péptido inmunogénico

Se diseñaron cebadores para la obtención del cDNA que codifica para el péptido de interés; se realizó una reacción de RT-PCR, utilizando como molde, RNA extraído a ejes embrionarios embebidos por 12 horas. El péptido elegido está codificado por un fragmento de 282 pb (**Fig.7**); sin embargo, para verificar su correcta amplificación, se deben considerar los sitios de restricción (6 pares de bases) y 3 timinas (para el posicionamiento de la enzima de restricción) que fueron agregados a cada oligo, así que se espera un fragmento de 300 pb (**Fig. 8**).

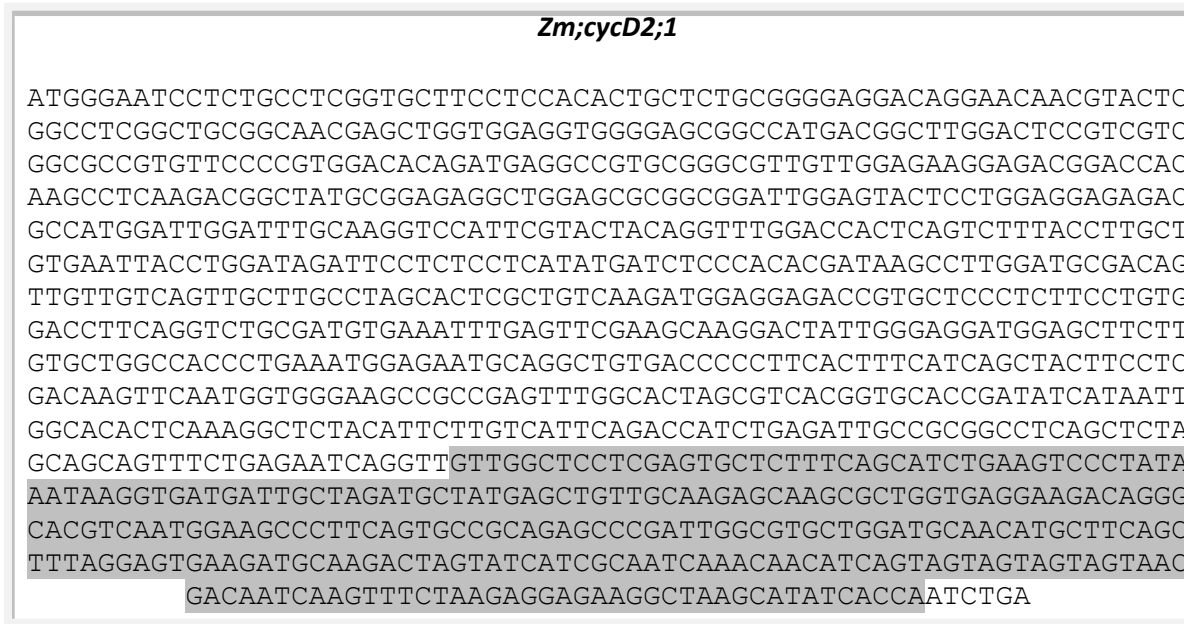


Fig.7. Secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína ZmCycD2;1. En gris, secuencia que codifica para el péptido inmunogénico.

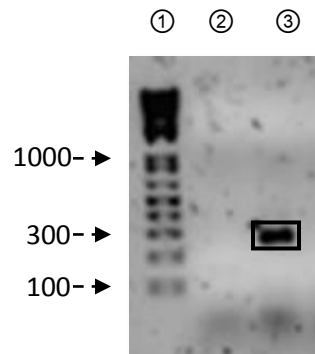


Fig.8 Amplificación del cDNA que codifica para el péptido de interés. En el carril 1, marcadores de tamaño de DNA, en el carril 2, control (-) y en el carril 3 el fragmento esperado de 300 pb.

7.2.1. Clonación del cDNA en el plásmido pGEM-T Easy

El fragmento amplificado a partir de la RT-PCR, fue purificado y ligado al vector de clonación pGEM-T Easy. Células de *E. coli* cepa *DH5 α* competentes, fueron transformadas con los productos de ligación; para verificar la ligación del inserto al vector, se probaron 5 colonias positivas, utilizando la enzima de restricción *EcoRI* (**Fig.9**). Solo se observan dos plásmidos que tienen el inserto (carriles 3 y 4).

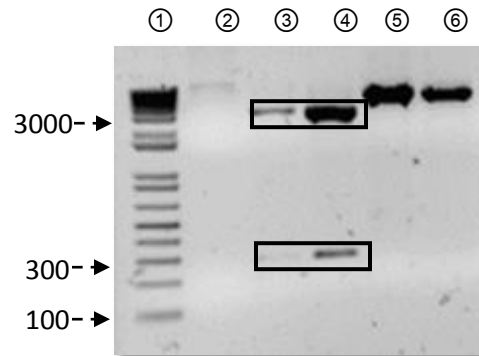


Fig.9 Ligación al vector de clonación: carril 1, marcador de tamaño de DNA, carriles 2-6, digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Señalados en un recuadro, el fragmento escindido del tamaño esperado y el vector linearizado.

7.2.2. Clonación en el vector de expresión pPAL7

Se obtuvo plásmido de la clona verificada en el carril 4 (**Fig.9**), éste fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, posteriormente el fragmento se purificó y ligó al vector pPAL7, previa restricción del mismo, con las mismas enzimas utilizadas para escindir el inserto del vector de clonación.

Tres colonias positivas fueron monitoreadas por doble restricción, se observa que dos de las colonias son positivas (**Fig.10**, carriles 2 y 3) y tanto el inserto, como el plásmido lineal, son del tamaño esperado.

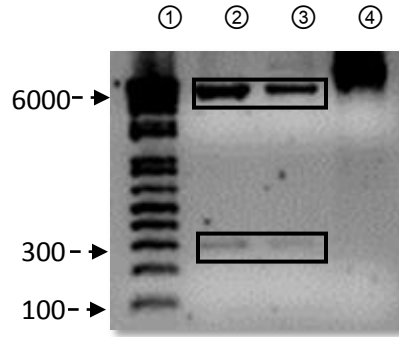


Fig.10 Ligación al vector de expresión. Carril 1, marcador de tamaño de DNA, carriles 2-4, digestión con las enzimas de restricción *EcoRI/Bam*HI. Señalados en un recuadro, el fragmento escindido del tamaño esperado y el vector linealizado.

7.2.3. Sobreexpresión de la proteína recombinante

Se obtuvo plásmido de la clona verificada en el carril 2 (**Fig. 10**), y se utilizó para transformar células de *E. coli* cepa *BL21*. La sobreexpresión de la proteína recombinante fue inducida con IPTG (0.5 mM); la proteína fue purificada y monitoreada en un gel de acrilamida, y el gel fue teñido con azul de Coomassie.

El peso teórico de la recombinante es de 18 kDa, sin embargo, en las eluciones de purificación, solo se observó una proteína a la altura del marcador de 10 kDa (**Fig. 11**).

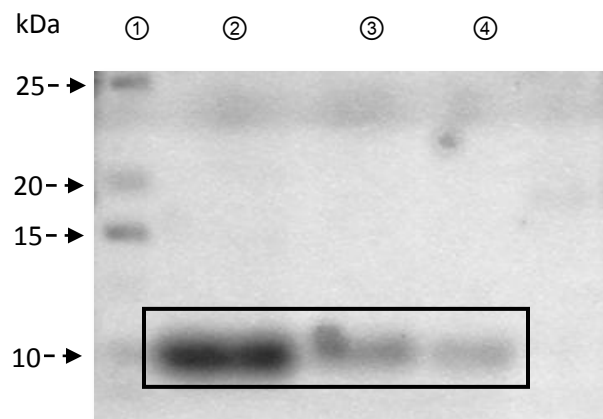


Fig. 11 Purificación de la proteína recombinante. Carril 1, marcadores de peso molecular; carriles 2-4, eluciones de la proteína recombinante purificada.

7.2.4 Monitoreo de otras clonas con el inserto de interés

Ante esto, la construcción que contenía el inserto en el vector de expresión, se mandó secuenciar, el resultado mostró 20 pares de bases más, a 48 nucleótidos de donde inicia la región que codifica para la ciclina en la recombinante (**apéndice A Fig. A1.1.**). Este inserto, corresponde a los últimos 20 nucleótidos del extremo 3' del último intrón, en el DNA codificante para CycD2;1 (**apéndice A Fig. A1.2.**). Utilizando el plásmido de varias clonas positivas a la ligación, en el vector de clonación, se realizaron reacciones de PCR, mismas que se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Con esto se intentó identificar algún fragmento, que no tuviera los nucleótidos del intrón. Se observa que el fragmento amplificado en el carril 3 (**Fig. 12**) corre ligeramente más abajo que el resto.

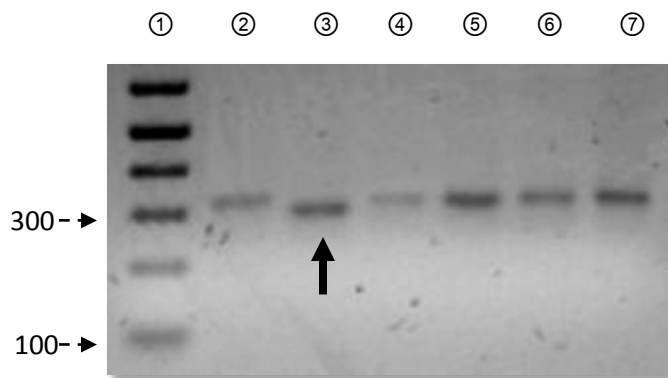


Fig.12 PCR de clonas que fueron positivas para la ligación en el vector de clonación (pGEM-T Easy). Carril 1, marcador de tamaño DNA, carriles 2 a 7, clonas positivas.

7.2.5 Clonación en el vector de expresión pGEX4T-2

Se aisló plásmido de la clona utilizada para la PCR del carril 3 (**Fig. 12**), este se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI/BamHI*, y posteriormente el fragmento escindido, fue ligado al vector de expresión pGEX-4T2, el cual previamente fue tratado con las mismas enzimas de restricción. Con los productos de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* cepa *DH5 α* . Se extrajo plásmido de 9 colonias positivas, y por doble restricción con las enzimas *BamHI/NotI*, se

verificó la clonación del inserto. Se observó que solo una de las colonias contiene el plásmido con el inserto de 300 pb (**Fig. 13 A**, carril 2).

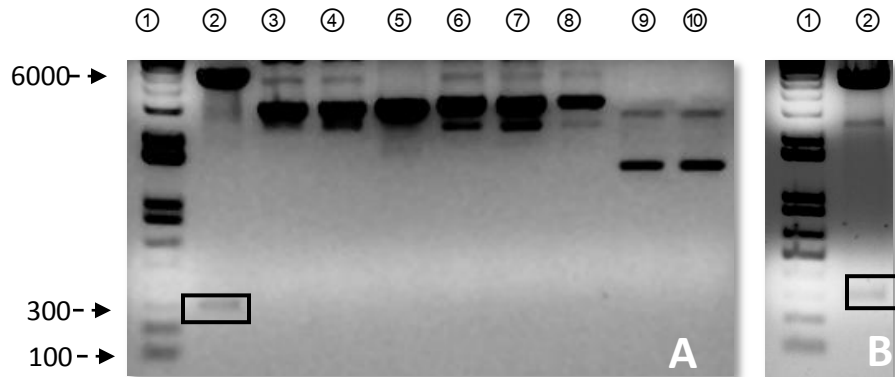


Fig.13 Clonación en el vector de expresión pGEX-4T2. A) Doble restricción con la enzimas BamHI/NotI. Carril 1, marcador de tamaño de DNA, carriles 2-10, los productos de digestión de las clonas a probar. B) Doble restricción con la enzimas *Xho*I/NotI. Carril 1, marcador de tamaño de DNA, carril 2, producto de digestión. En A y B se observa el vector linearizado en 6000 pb.

Ya que el inserto que se deseaba clonar tiene *per se* el sitio CTCGAG, que es reconocido por la enzima *Xho*I para su corte, el plásmido circular de la única colonia en la que se verificó la clonación, se utilizó para una segunda doble restricción con las enzimas *Xho*I/NotI, y se comprobó la escisión de un fragmento ligeramente debajo de 300 pb (**Fig. 13 B**).

Para verificar la correcta clonación del inserto de interés, el mismo ya clonado en el vector de expresión, fue enviado al Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación. El resultado muestra una identidad casi del cien por ciento, exceptuando un cambio en la posición 293, en donde una valina es sustituida por una glicina (mostrado en un recuadro negro en la **Fig. 14**).

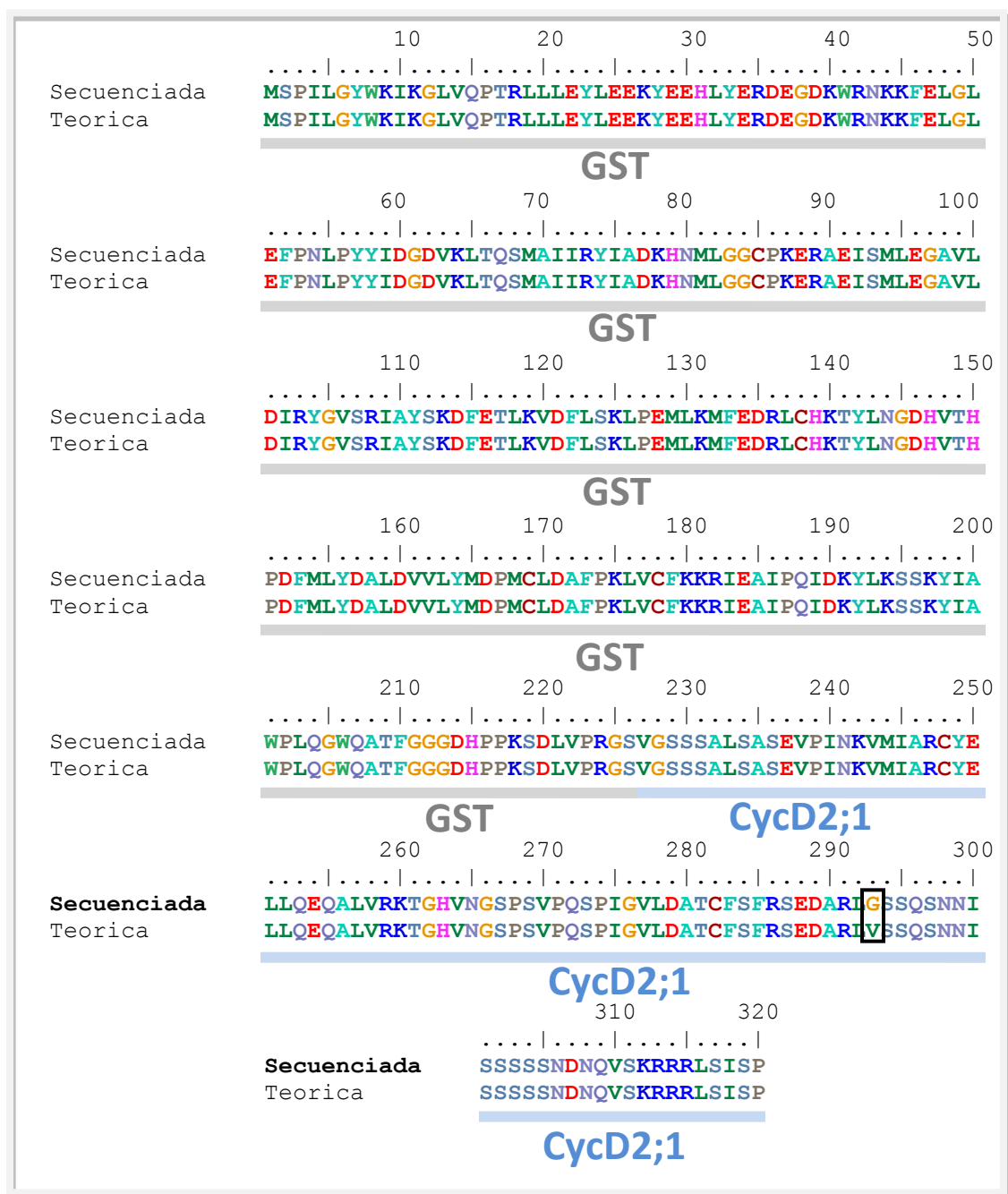


Fig. 14. Alineamiento de la secuencia teórica del péptido recombinante y la obtenida en la secuenciación. Subrayado en gris la secuencia de GST y en azul, el péptido de CycD2;1.

7.2.6 Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante

Una vez verificada la correcta clonación del inserto, el plásmido se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* cepa *BL21*. A partir de este cultivo bacteriano y utilizando IPTG 0.2 mM, se indujo la expresión de la proteína

recombinante. Antes de agregar el IPTG, se permitió que el cultivo alcanzara una densidad óptica de 0.4 a 595 nm, y la expresión de la proteína se monitoreó por SDS-PAGE a diferentes tiempos de inducción (**Fig.15**). El peso de la proteína recombinante, predicho por el programa Compute pI/Mw (Expasy) es de 36.9 kDa. Como control positivo de la inducción, se utilizó el vector de expresión vacío, que codifica para la proteína GST (26.5 kDa), y una construcción similar a la que se deseaba monitorear: una fusión de la proteína GST con parte del carboxilo terminal de CycD5;3 de maíz, cuya inducción produce una proteína de 36 kDa. A las 0.5 h, la inducción de la proteína es notoria, conforme transcurre el tiempo, ésta se acumula, por consiguiente, 1.5 h es suficiente para la inducción de la proteína y su ulterior purificación. Establecidas las condiciones de inducción (cepa bacteriana, concentración de IPTG y tiempo), se realizó la purificación de la proteína recombinante. El sistema en que esta clonada la proteína de interés, permite su purificación por cromatografía de afinidad, así que se utilizó una resina de glutatión-sefarosa para este fin. Por SDS-PAGE se monitorearon las distintas fracciones obtenidas durante la purificación (**Fig.16**).

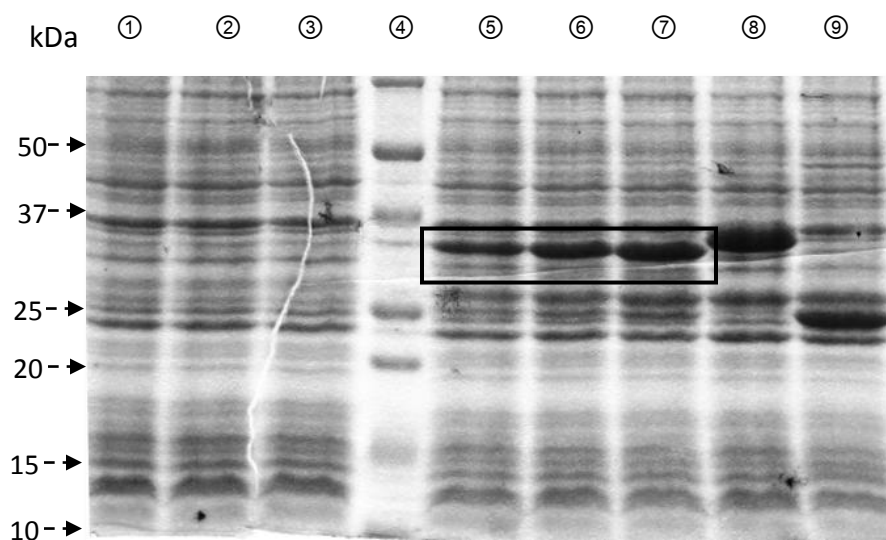


Fig. 15. Inducción de la proteína GST-CycD2;1. Carriles 1 a 3, alícuotas de las bacterias con los vectores pGEX4T2, pGEX4T2-CycD2;1 y pGEX4T2-CycD5;3 (0 horas de inducción, D.O. de 0.4). Carril 4, marcador de masa molecular. Carriles 5 y 6, alícuotas tomadas a 0.5 h, 1.0 h y 1.5 h de inducción (en un recuadro negro la proteína de interés). Carriles 8 y 9, inducción de las proteínas GST y GST-CycD5;3 respectivamente.

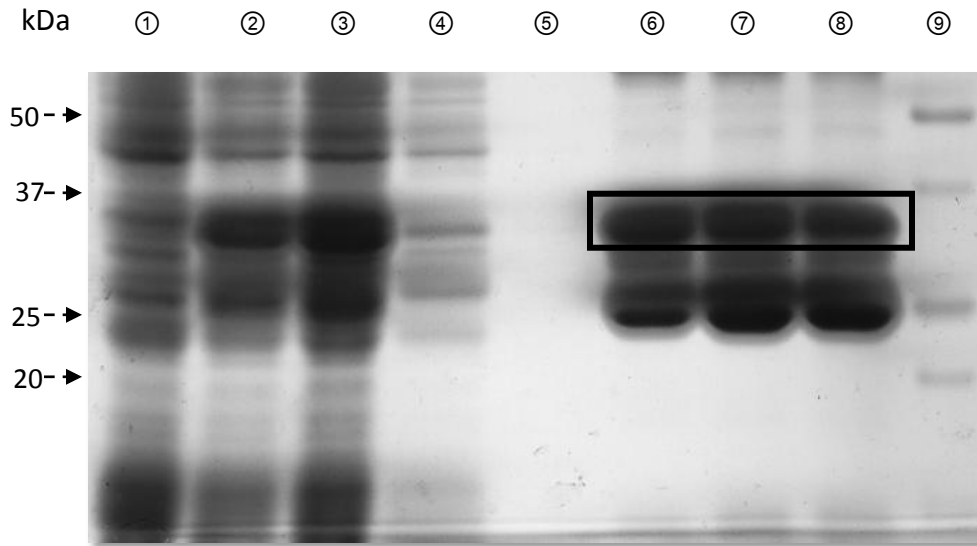


Fig. 16. Purificación de GST-ZmCycD2;1. Carril 1, lisado de células con la construcción pGEX-4T2-ZmCycD2;1 antes de la inducción; carril 2, lisado de células sobreexpresando GST-CycD2;1; carril 3, fracción insoluble (posterior a la lisis celular); carril 4, fracción no unida a la columna; carril 5, fracción de lavado; carriles 6 a 8; fracciones de elusión. En un recuadro la proteína GST-CycD2;1, carril 9, marcador de masa molecular.

En la **Fig. 16** se observa que parte de la proteína de interés permanece en el “pellet” en la fracción insoluble, sin embargo, una proporción importante de la misma logró ser purificada. Se observan algunas bandas por debajo de la proteína de interés, que pueden ser producto de mensajeros no traducidos completamente, o proteína que se ha degradado durante algún paso de la purificación.

7.2.7 Obtención y validación de anticuerpos anti CycD2;1 (α -CycD2;1)

Se purificó el suero de dos conejos a los que se aplicó un esquema de inmunización durante 80 días, y solo uno de ellos fue utilizado para el resto de los experimentos, debido a su mejor reconocimiento de la proteína de interés. Para verificar que el anticuerpo producido era capaz de reconocer al péptido contra el que fue producido, y a la proteína de interés en extractos de maíz, se realizó un ensayo de western blot, utilizando extracto proteico total (ET) de ejes embrionarios de maíz, embebidos por 18 horas. La proteína quimérica recombinante purificada y la digestión de la misma con trombina fueron utilizadas como control positivo.

Es evidente el reconocimiento de la proteína recombinante, así como de los productos truncos asociados a su purificación (**Fig. 17**). Una ventaja del sistema utilizado para la sobreexpresión de proteínas con el vector pGEX-4T2, es que cuando se obtiene la proteína quimérica recombinante, esta puede ser purificada en un solo paso con la resina de glutatión sefarosa; una vez purificada la proteína quimérica, ésta puede ser cortada por la proteasa trombina, dejando por una parte el “tag” (GST) y por otra el fragmento de CycD2;1. Así que en la **Fig.17** se puede observar el fuerte reconocimiento, por parte del anticuerpo producido, del péptido elegido. No se observó inmuno reconocimiento en el tamaño esperado de la proteína de interés en el ET, probablemente debido a la poca cantidad de proteína presente.

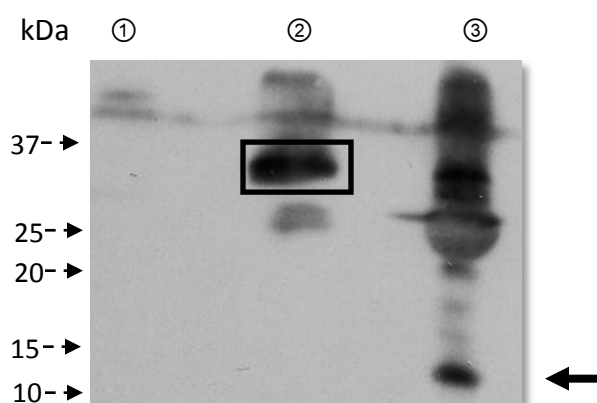


Fig. 17. Western blot para validar el anticuerpo producido. Carril 1, extracto proteico total de ejes embrionarios de maíz embebido durante 18 h, carril 2, GST-ZmCycD2;1 (en un recuadro) y carril 3, digestión con trombina de la recombinante GST-CycD2;1 (Señalado con una flecha a la izquierda, el péptido de ZmCycD2;1).

7.3 Coimmunoprecipitación de CDKA

Dado que la proteína estudiada es una ciclina D, se espera que esta sea capaz de asociarse a ZmCDKA, así que se realizaron ensayos cruzados de inmunoprecipitación a diferentes tiempos de germinación; por una parte se utilizó el anticuerpo contra la ciclina ZmCycD2;1 para inmunoprecipitar, y se reveló contra CDKA, y viceversa: se utilizó el anticuerpo anti-CDKA para inmunoprecipitar, y se reveló contra la ZmCycD2;1 (**Fig. 18**).

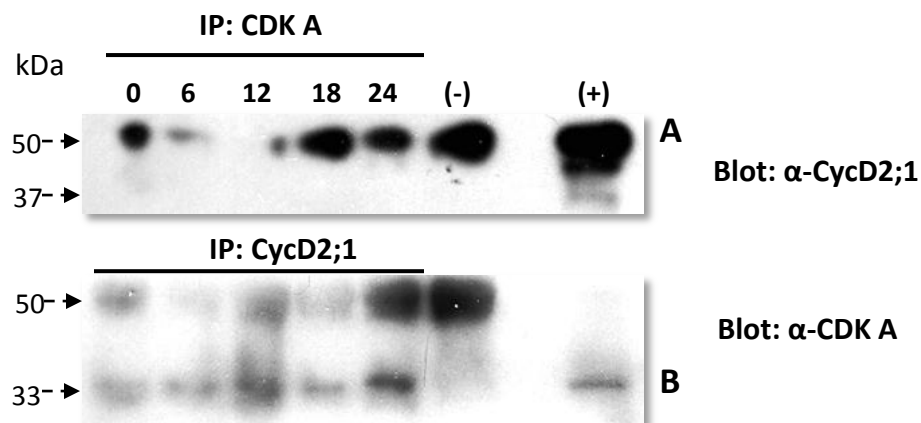


Fig. 18. Interacción de CycD2;1 con CDKA. **A)** inmunoprecipitación de CDKA a lo largo de la germinación y blot contra CycD2;1. Control negativo (-), anticuerpo α -CDKA sin incubar con ET. Control positivo (+), western blot contra 50 μ g de ET de ejes embrionarios embebidos por 18 h. **B)** inmunoprecipitación de CycD2;1 y blot contra CDKA. Control negativo (-), anticuerpo α -CycD2;1 sin incubar con ET. Control positivo (+), western blot contra 50 μ g de ET de ejes embrionarios embebidos por 18 h.

Cuando se busca la interacción a partir de CDKA, esta no se visualiza, ya que a ningún tiempo de germinación se observa la banda que corresponde a CycD2;1, como sí se observa en el control positivo, sin embargo, cuando se utiliza el anticuerpo producido contra la ciclina para inmunoprecipitar, se observa una asociación de CDKA-CycD2;1 que fluctúa durante la germinación y que parece ser mayor hacía las 24 horas.

La proteína p13^{Suc1} es una proteína de levaduras que se une fuertemente a algunas CDKs de plantas (Harashima et al. 2007), así que para corroborar la interacción CycD2;1-CDKA, se realizó un ensayo de “pull-down” utilizando la proteína mencionada al principio, inmovilizada a una resina de Ni²⁺. La resina con la proteína p13^{Suc1} se incubó con extracto total de ejes embrionarios provenientes de semilla seca, y ejes embebidos durante 12 horas. Se realizó un western blot contra la fracción que quedó retenida en la columna; el resultado del ensayo se muestra en la **Fig. 19**.

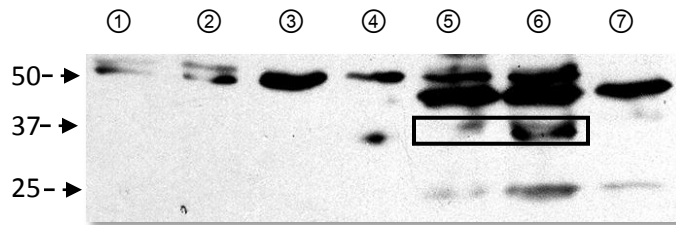


Fig. 19. Ensayo de pull-down utilizando p13^{SUC1}. Carril 1, ET₀, carril 2, ET₁₂, carril 3, resina Ni²⁺ + 50 µg ET₀, carril 4, resina Ni²⁺ + 50 µg ET₁₂, carril 5, resina p13^{SUC1} + 500 µg ET₀, carril 6, resina p13^{SUC1} + 500 µg ET₁₂, carril 7, resina p13^{SUC1}.

Se muestra que efectivamente la CycD2;1 se une a CDKA, se observa más de una banda, pero es evidente que estas no están relacionadas con la proteína de interés (señalada en un recuadro en la **Fig. 19**), por ejemplo, la banda observada en los carriles 5 y 6, cercana a 50 kDa, también se observa cuando solo se revela contra p13^{SUC1}, aun cuando esta no ha interactuado con extractos proteicos; algo similar ocurre cuando la resina de níquel (carril 3, sin p13^{SUC1}), es incubada con extractos proteicos: aparece una banda en 50 kDa, que también se observa en los carriles 5 y 6.

7.4 Expresión de CycD2;1 durante la germinación

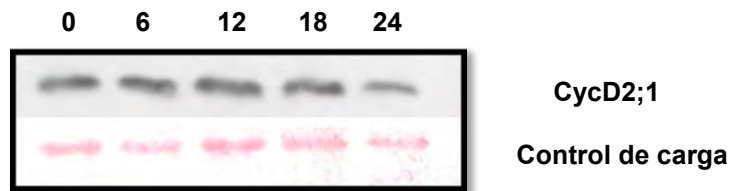


Fig. 20. Niveles de CycD2;1 durante germinación. Inmunodetección de la proteína de interés en ejes embrionarios de maíz, embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 horas. La membrana utilizada para el western blot fue teñida con rojo de Ponceau, y una proteína que se visualiza cerca de 50 kDa es utilizada como control de carga.

Dado que en ensayos previos no se logró observar la inmunodetección de la ciclina en el ET, se aumentó la cantidad de anticuerpo primario para la detección, se observó la aparición de bandas inespecíficas, y en general las placas se veían sucias (resultados no mostrados). Se optó por incrementar la cantidad de proteína cargada para realizar los ensayos, y utilizando ET de ejes embrionarios

embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 horas se estudio el comportamiento de la CycD2;1.

En la **Fig. 20** se muestra la mejor de tres réplicas independientes que se realizaron para visualizar la acumulación de la ciclina y se observa que los niveles de CycD2;1 permanecen constantes a medida que avanza la germinación.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 Elección del péptido inmunogénico.

La elección del péptido potencialmente antigénico fue crítica para cumplir con el objetivo de este trabajo. Existen al menos 17 genes que codifican para ciclinas D, y hasta el momento la caracterización proteica y otros estudios que se han realizado sobre ellas, sugiere que no son redundantes. Por lo tanto, generar un anticuerpo que solo reconozca a la ciclina de interés nos ayudará a evitar, en la medida de lo posible, el estudio de más de una ciclina a la vez.

Cuando se realizó el alineamiento de las 17 ciclinas de maíz reportadas hasta el momento, se visualizó claramente que las regiones menos conservadas están en los extremos amino y carboxilo terminal (**Fig. A1.4**), sin embargo, el análisis de antigenicidad del extremo amino terminal mostró pocas secuencias de aminoácidos como potencialmente antigénicas (**Tabla A1.1.**), motivo por el cual se descartó esta región para su clonación; en contraste, el extremo carboxilo arroja un número mayor de aminoácidos potencialmente antigénicos (**Tabla 2**). La ciclina fue analizada con el programa NetSurfp (**Tabla A2.2**), se puso especial atención en el extremo carboxilo menos conservado para conocer la disposición de los aminoácidos potencialmente antigénicos (**Tabla 2**) en la superficie de la proteína. Para el fragmento peptídico que va de la serina 226 a la treonina 285, se observa que los primeros 25 aminoácidos del mismo en su mayoría no se encontraban expuestos a la superficie de la proteína, lo que se contrapone a lo predicho por el programa EMBOSS: Antigenic, ya que éste considera que un aminoácido debe encontrarse en la superficie de la proteína para su predicción como antigénico. Para conocer cual era la posición espacial de estos aminoácidos en la ciclina, se decidió realizar un modelo tridimensional de la CycD2;1 mediante el programa phyre 2 (Kelley y Sternberg, 2009) y utilizando el modo intensivo. En la **Fig. A1.3** se observa claramente que los residuos que NetSurfp había predicho como no expuestos (que conforman una hélice α), efectivamente, no se encuentran sobre la superficie de la proteína, sino que se encuentran rodeados por 4 hélices α , que evitarían que los aminoácidos fueran reconocidos por un anticuerpo. En el modelo

tridimensional también se puede observar la secuencia que se decidió clonar, la cual no está impedida para su reconocimiento, y coincide con lo predicho por NetSurfp, que señala que el resto de los aminoácidos que se decidió clonar, se encuentran en la superficie de la proteína (**Tabla A2.2**). Así pues, los sitios antigénicos en el péptido que se eligió para su clonación, se encuentran expuestos y no debería existir algún impedimento de tipo estérico dentro de la misma proteína, para su reconocimiento por un anticuerpo. En el artículo donde se reporta el método utilizado para la predicción de los residuos antigénicos, se realiza una comparación del número de sitios antigénicos predichos correctamente para una proteína dada, y este número se compara con el número de determinantes obtenidos experimentalmente (Kolaskar y Tongaonkar, 1990). Lo anterior se hace para 34 proteínas y en general siempre se observa que el número de determinantes antigénicos obtenidos experimentales es mayor que el predicho, así que seguramente los sitios predichos como antigénicos por EMBOSS: Antigenic, no son la totalidad de los existentes.

8.2 Clonación del péptido de interés

Cuando se intentó obtener por primera vez el péptido recombinante, para realizar el esquema de inmunización, no se obtuvo la proteína de la masa esperada (**Fig. 11**). La secuenciación del inserto que codifica para la proteína de interés, mismo que ya se encontraba clonado en el vector pPAL7 (**Fig. A1.1**), muestra un inserto de 20 nucleótidos que no está en el cDNA que codifica para el péptido que se deseaba clonar. La consecuencia fue que el mensajero sufrió un corrimiento del marco de lectura, que ocasionó la aparición de un codón de paro prematuro; por consiguiente, solo los primeros 16 aminoácidos correspondientes al péptido de interés en la recombinante fueron traducidos. Se realizó un BLAST del inserto de 20 pares de bases contra el transcrito inmaduro que codifica para CycD2;1, y el resultado indicó que el inserto forma parte de los últimos 20 pb del extremo 3' del último intrón existente en el mensajero inmaduro de la CycD2;1 (**Fig. A1.2**). Es evidente que se trata de un mensajero que fue madurado, de lo contrario, todo el intrón se encontraría entre los dos exones. Muy probablemente se trata de un

producto de *splicing* (corte y empalme) alternativo; donde esto ocurrió (transcrito inmaduro), se reconocen los dos nucleótidos consenso (AG) requeridos en el extremo 3' del intrón para el corte, dado que este sitio consenso se encuentra antes que el sitio AG, que daría una proteína normal; probablemente el *spliceosoma* eligió al primer sitio que encontró (Simpson *et al.*, 1996), o debido a la cercanía entre ambos sitios, el sistema de corte y empalme, prefirió una secuencia sobre la otra, en base al contexto de nucleótidos que lo rodea (Brown y Simpson, 1998). Cabe señalar que en la base de datos <http://www.maizesequence.org> (Schnable *et al.* 2009), ninguna variante de *splicing* es reportada y las búsquedas realizadas en bases de datos de ESTs tampoco arrojan un resultado positivo. Por lo tanto, existe la posibilidad de que esta variante de *splicing* sea exclusiva de la raza de maíz (Chalqueño) que utilizamos como modelo de estudio, o bien que se trate de una reacción incompleta de un *splicing* normal.

8.3 Validación de anticuerpos anti CycD2;1 (α -CycD2;1)

En la **Fig. 17** se observa claramente el reconocimiento del péptido elegido para la clonación e inducción de la producción de anticuerpos; también es claro el reconocimiento de la proteína recombinante GST-CycD2;1, y es que con la finalidad de producir una mejor respuesta inmune, se administró la proteína recombinante completa. Sin embargo, en este gel no se pudo observar a la ciclina en extractos proteicos de maíz; una posible causa sería que esta ciclina estuviera presente en niveles muy bajos durante la germinación. Posteriores experimentos, agregando más extracto proteico, permitieron su visualización (**Fig. 20**).

8.4 Asociación con CDKs

La CycD2;1 posee un caja LXCXE (Buendía-Monreal *et al.*, 2011); este motivo es necesario para la interacción con la proteína RBR y está presente en la mayoría de las ciclinas D, así que buscar a una CDKA asociada a la ciclina de interés, que pudiera fosforilar a la proteína RBR, sería un primer paso para tratar de establecer una posible función de la CycD2;1 durante la germinación. Con este fin, se

realizaron ensayos cruzados de inmunoprecipitación (**Fig. 18**). Cuando se intentó ver a CycD2;1 a través de la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-CDKA, la asociación no fue evidente, ya que a ninguno de los tiempos de germinación probados, se observó una banda cercana a 37 kDa, que confirmara la asociación entre CycD2;1 y CDKA. Interesantemente, cuando se inmunoprecipitó a la ciclina con el anticuerpo homólogo y se reveló contra CDKA, se puso en evidencia la existencia de esta asociación. Fue interesante observar que existe un máximo de asociación hacia las 24 h de germinación, por lo que ahora habría que demostrar que existe relación entre asociación y actividad de cinasa, lo que supondría una acción de este complejo ciclina-cinasa hacia el final de la germinación, tiempo en el que las células están en la fase mitótica.

La incapacidad de observar la asociación CycD2;1-CDKA usando anticuerpos anti-CDKA, pudo deberse a que la cantidad de complejos presentes fuera muy baja, o bien a que la interacción del anticuerpo con su sustrato fuera pobre cuando esta ciclina en particular, se asocia a la CDK. Sin embargo, que dicha asociación existe se demostró usando a la proteína p13^{SUC1}; esta proteína une fuertemente a CDKA, pero débilmente a CDKB tanto en *Arabidopsis* (De Veylder et al., 1997), como en tabaco (Harashima et al. 2007). Por lo tanto, la asociación que se muestra en la **Fig. 19**, podría no ser exclusiva con la proteína CDKA. Las bandas inespecíficas que se observan en el gel podrían deberse al tipo de resina que se utilizó para inmovilizar a la proteína p13^{SUC1}, que pudiera estar adhiriendo proteínas tanto de *E. coli* (resultado de la purificación de p13^{SUC1}), como otras de maíz. Para evitar este tipo de uniones inespecíficas, se propone el uso de otro tipo de tags para inmovilizar a la proteína p13^{SUC1}, como podría ser profinity eXact tag, que es utilizado en el sistema de purificación por afinidad: Profinity eXact Protein Purification System, cuya resina se caracteriza por tener un baja afinidad por proteínas inespecíficas.

8.5 Expresión de CycD2;1 durante la germinación

Existen varios estudios sobre CycD2;1 en *Arabidopsis*, sin embargo, la CycD2;1 existente en maíz no es ortóloga de la CycD2;1 de *Arabidopsis*, ni de ninguna de

sus ciclinas tipo D. Existen ortólogos de CycD2;1 en *Oryza sativa* (arroz) y *Sorghum bicolor* (Sorgo), con los que la ciclina D de maíz comparte 63.4% y 82% de identidad, respectivamente; pero de estas proteínas aún no existen estudios al respecto.

Como se menciona en los resultados, para poder detectar a la proteína hubo que aumentar la cantidad de proteína total cargada, lo que sugiere que existen bajos niveles de la proteína durante las primeras 24 horas de germinación. Los niveles encontrados de esta proteína aparentemente no fluctúan, y dicho comportamiento se parece mucho a lo reportado para las ciclinas D4;2 y D5;3 (Godínez-Palma, 2010).

Recientemente se publicó un trabajo donde se analizó el papel que las ciclinas D pudieran tener durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*. Se observó la expresión y funcionalidad de algunas ciclinas D durante el desarrollo del embrión y del endospermo (Collins *et al.*, 2012). Los niveles observados de CycD2;1 en el embrión de maíz, presentes en semilla seca, se podrían atribuir a una posible participación de la proteína durante el desarrollo de la semilla, y que pudieron haber quedado como remanentes tras la desecación. Serán necesarios estudios de actividad de cinasa de los complejos CycD2;1-CDK para dilucidar una participación de esta proteína durante tiempos tempranos de la germinación por la vía E2F-RBR, al igual que como se sugiere en los ensayos de asociación con CDKA, confirmar su función en tiempos tardíos de germinación durante la transición hacia mitosis.

En maíz, una de las ciclinas con las que CycD2;1 tiene mayor identidad es la CycD2;2 (42% de identidad); esta ciclina ha sido estudiada previamente en nuestro grupo de trabajo (Gutiérrez *et al.*, 2005). En los antecedentes se mencionó que ésta proteína se encuentra en semilla seca y sus niveles aumentan hasta las 6 horas, para gradualmente disminuir hacia las 24 horas. Este comportamiento no es similar al observado para CycD2;1, lo cual sugeriría que desempeñan papeles distintos durante la germinación. Cabe señalar, que el patrón de acumulación del transcrito que codifica para la ciclina CYCD2;1 (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), no

refleja el comportamiento de la proteína, ya que el mensajero se acumula hacia las 24 h, y la proteína mantiene niveles constantes durante la germinación. Otros estudios, como la respuesta de CycD2;1 a hormonas durante la germinación, se hacen necesarios para tener más puntos de comparación que nos permitan establecer que no existe redundancia entre estas ciclinas, a pesar de pertenecer a un mismo subgrupo.

9. CONCLUSIONES

- ✓ La estrategia seguida para elegir el péptido inmunogénico fue adecuada.
- ✓ Se obtuvieron anticuerpos policlonales que reconocen específicamente a ZmCycD2;1.
- ✓ La CycD2;1 interacciona con CDKA y esta interacción es máxima a las 24 horas de germinación.
- ✓ Los niveles proteicos de CycD2;1 se mantienen constantes a lo largo de la germinación.

10. PERSPECTIVAS

- ✓ Evaluar la presencia de la ciclina CYCD2;1 en diferentes tejidos de la planta de maíz, durante los primeros días de su desarrollo.
- ✓ Verificar la asociación de ciclina CYCD2;1 con CDKB, durante la germinación.
- ✓ Evaluar la actividad de cinasa del complejo CYCD2;1-CDKA, sobre la proteína RBR de maíz.
- ✓ Estudiar la respuesta a fitohormonas de los niveles de CycD2;1, y también el efecto sobre la actividad de cinasa del complejo CYCD2;1-CDKA.

11. REFERENCIAS

- Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., et al. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastomarelated proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 5077–5086.
- Baiza, M.A., Vázquez-Ramos, 3.M., Jiménez, S.E. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135 (1989) 416-421.
- Bewley, J.D. and Black, M. *Seeds: Physiology of development and germination* (2nd edition). New York (1994) Plenum.
- Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J* 28 (2001) 341–350.
- Brown, J. W. S. and C. G. Simpson. Splice Site Selection in Plant Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 77-95.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plantarum* 143 (3) (2011) 297-308.
- Burssens S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inzé D, Verbruggen N. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211 (2000) 632-40.
- Brehm, A. and Kouzarides, T. Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends in Biochemical Sciences* 24 (1999) 142–145.
- Chaubet-Gigot, N. Plant A-type cyclins. *Plant Mol Biol* 43 (2000) 659–675.
- Collins C, Dewitte W, Murray JA. D-type cyclins control cell division and developmental rate during *Arabidopsis* seed development. *J Exp Bot* (2012)
- Conger, B.V. and Carabia, J.V. Microspectrophotometric determination of the 2C and 4C nuclear complement in the root and shoot of the dormant maize embryo. *Environmental and Experimental Botany* 16 (1976) 171–175.
- Dahl, M., Meskiene, I., Bögre, L., et al. The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell* 7 (1995) 1847– 1857.
- Dandoy E, Schyns R, Deltour L, Verly WG. Appearance and repair of apurinic/aprimidinic sites in DNA during early germination. *Mutat. Res.* (1987) 181:57–60.
- de Jager, S.M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S. and Murray, J.A. The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin Cell Dev Biol* 16 (2005) 385–396.
- De Veylder, L., Segers, G., Glab, N., Casteels, P., Van Montagu, M. and Inze, D. The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett.* 412 (1997) 446–452.
- Deltour, R. and Jacqmard, A. Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L. *Annals of Botany* 38 (1975) 529–534.

- Dewitte, W. and Murray, J.A. The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54 (2003) 235–264.
- Dou, P-Q., Markell, J.P., Pardee, B.A. Thymidine kinase transcription is regulated at G1/S phase by a complex that contains retinoblastoma-like protein and a cdc2 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 3256-3260.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33 (1983) 389–396.
- Georgieva, E.I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G. and Loidl, P. Maize embryo germination. I. Cell cycle analysis. *Planta* 129 (1994b) 118–124.
- Godínez Palma SK. Interacción de las ciclinas D con Cdks durante la germinación en maíz. Tesis de Maestría; 2010. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. México.
- Gröbner, P. Thymidine kinase enzyme variants in *Physarum polycephalum* ; in vitro interconversion of the enzyme variants. *J. Biochem.* 86 (1979) 1595-1605.
- Gröbner, P., Loidl, P. Thymidylate synthetase during synchronous nuclear division cycle and differentiation of *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Acta* 697 (1982) 83-88.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 41 (1999) 95-8.
- Harashima H, Shinmyo A, Sekine M. Phosphorylation of threonine 161 in plant cyclin-dependent kinase A is required for cell division by activation of its associated kinase. *Plant J.* 52 (2007) 435-448
- Healy, J.M., Menges, M., Doonan, J.H. and Murray, J.A. The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* 276 (2001) 7041–7047.
- Hourmant A, Pradet A. Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition, *Plant Physiol.* 68 (1981) 631–635.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., et al. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb- 1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* 37 (1998) 155–169.
- Inzé D and De Veylder L. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu. Rev. Genet* 40 (2006) 77-105.
- Joubès J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D. CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43 (2000) 607–20.
- Kelley LA and Sternberg MJE. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4 (2009) 363 – 371.
- Kono, A., Ohno, R., Umeda-Hara, C., Uchimiya, H. and Umeda, M. A distinct type of cyclin D, CYCD4;2, involved in the activation of cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 25 (2006) 540–545.
- Kolaskar,AS and Tongaonkar,PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 276 (1990) 172-174.

- La, H., Li, J., Ji, Z., et al. Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Genet Genomics* 275 (2006) 374–386.
- Lara-Núñez A, de Jesús N, Vázquez-Ramos J. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plantarum* 132 (2008) 79–88.
- Leubner-Metzger G., 1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening, *Plant J.* 41 (2005) 133–145.
- Macovei A, Balestrazzi A, Confalonieri M, Faé M, Carbonera D. New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. *Plant Physiol. Biochem.* 49 (2011)1040–50.
- Marcus A, Feeley J, Volcani T, Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetics of amino acid incorporation ribosome activation, and polysome formation, *Plant Physiol.* 41 (1966) 1167–1172.
- Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M, Sanchez J, Buckler E and Doebley J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 6080-6084.
- Maxson, R., Cohn, R., Kedes, L., Mohun, T. Expression and organization of histone genes. *Ann. Rev. Genet.* 17 (1983) 239-277.
- Mayer AM and Poljakoff A. The germination of seeds. 2nd ed. Oxford England: Pergamon Press; 1975.
- Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W. and Murray, J.A. Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41 (2005) 546–566.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W. and Murray, J.A.H. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277 (2002) 41987–42002.
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E., Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed, *Plant J.* 41 (2005) 697–709.
- Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y.F., Ayusawa, D., Oishi, M. and Mori, N. Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res* 221 (1995) 534–542.
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD. Germination—still a mystery. *Plant Sci.* 179 (2010) 574–81.
- Novak, B., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Chen, K. and Tyson, J.J. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophys Chem* 72 (1998) 185–200.
- Nugent, J.H., Alfa, C.E., Young, T. and Hyams, J.S. Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* 99 (1991) 669–674.

- Oge L, Bourdais G, Bove J, Collet B, Godin B, Granier F, Boutin J. P, Job D, Jullien M, Grappin P, Protein repair I-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20 (2008) 3022–3037.
- Petersen B, Petersen TN, Andersen P. Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Structural Biology* 9 (2009) 51.
- Pines, J. Cell cycle. Confirmational change. *Nature* 376 (1995b) 294–295.
- Pines J.. Cyclins and cyclindependent kinases: theme and variations. *Adv. Cancer Res.* 66 (1995a) 181–212.
- Piperno D, Ranere A, Holst I, Iriarte J, and Dickau R Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (2009) 5019–5024.
- Plowman, G.D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D. and Hunter, T. The protein kinase of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 13603–13610.
- Qin, L.X., Perennes, C., Richard, L., et al. G2-and early-M-specific expression of the NTCYC1 cyclin gene in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Mol Biol* 32 (1996) 1093–1101.
- Quiroz-Figueroa F and Vázquez-Ramos JM. Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant* 128 (2006) 556-68.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C. and Murray, J.A.H. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Phil Trans R Soc Lond B* 357 (2002) 749–760.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21 (1996) 267–271.
- Reichheld, J.P., Chaubet, N., Shen,W.H., Renaudin, J.P. and Gigot, C. Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 13819–13824.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., et al. Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* 32 (1996) 1003–1018.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M.S. and Murray, J.A.H. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 4513–4521.
- Roberts E.H., A survey of the effects of chemical treatments on dormancy in rice seed, *Physiol. Plant.* 17 (1964) 30–43.
- Roberts E.H., The distribution of oxidation–reduction enzymes and the effects of respiratory inhibitors and oxidising agents on dormancy in rice seed, *Physiol. Plant.* 17 (1964) 14–29.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

- Serratos Hernández JA . The origin and diversity of maize in the american continent. Universidad Autónoma de la Ciudad de México. 2009
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326 (2009) 1112–1115
- Simpson CG, Clark G, Davidson D, Smith P, Brown JW. Mutation of putative branchpoint consensus sequences in plant introns reduces splicing efficiency. *Plant J.* 9 (1996) 369-380.
- Smith, Christopher W. J. , Porro, Elena B. , Patton, James G. , Nadal-Ginard, Bernardo. Scanning from an independently specified branch point defines the 3' splice site of mammalian introns. *Nature* 342 (1989) 243 – 247.
- Sorrell, D.A., Menges, M., Healy, J.M., et al. Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* 126 (2001) 1214–1223.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-4680.
- Uemukai, K., Iwakawa, H., Kosugi, S., et al. Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* 57 (2005) 83–100.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S. and Inzé, D. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 (2002) 903–916.
- Vázquez-Ramos JM and Sánchez MP. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res.* 13 (2003) 113-30.
- Vázquez E, Montiel F, Vázquez Ramos JM. DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. *Seed Sci Res.* 1 (1991) 269-273.

- Vázquez Ramos JM. La bioquímica como herramienta para el estudio de la germinación. En: Molina Moreno J, Estrada Gómez JA, Livera Muñoz M, González Hernández VA, editores. Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México. 1ra ed. Chapingo, México: SOMEFI; 1990 p. 189-202.
- Wang G, Miskimins R, Miskimins WK.. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is localized to the cytosol in Swiss/3T3 cells. *Oncogene* 18 (1999) 5204–5210.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., et al. Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* 135 (2004) 1084–1099.
- Zamora Zaragoza J. Estudio de la expresión a nivel de proteína de la ciclina Zeama;CycD6;1 durante la germinación de maíz (*Zea mays*). Tesis de Licenciatura; 2012. Facultad de Química, UNAM

Apéndice 1

```
GGATCCGTTGGCTCCTCGAGTGCTCTTTCAGCATCTGAAGTCCCTATAAATAAGCTTGCGTCTTCC  
GAAACCAGGTGATGATTGCTAGATGCTATGAGCTGTTGCAAGAGCAAGCGCTGGTGAGGAAGACAG  
GGCACGTCAATGGAAGCCCTTCAGTGCCGCAGAGCCCGATTGGCGTGCTGGATGCAACATGCTTCA  
GCTTTAGGAGTGAAGATGCAAGACTAGTATCATCGCAATCAAACAACATCAGTAGTAGTAGTA  
ACGACAATCAAGTTTCTAAGAGGAGAAGGCTAAGCATATCACCAGAATTC
```

Fig. A1.1. Secuenciación de la construcción que tiene el inserto que codifica para el péptido de interés (solo se muestra la región que codifica para el péptido). En gris los nucleótidos que son parte del intrón.

```
GCTCTACATTCTTGTCAATTCAGACCATCTGAGATTGCCGCGGCCCTCAGCTCTAGCAGCAGTTTCTGAGAATCA  
GGTTGTTGGCTCCTCGAGTGCTCTTTCAGCATCTGAAGTCCCTATAAATAAGgtgaatgtcttttatcatgcy  
caaa.....cgaagcttgcgctcttccgttccagGTGATGATTGCTAGATGCTATGAGCTGTTGCAAG  
AGCAAGCGCTGGTGAGGAAGACAGGGCACGTCAATGGAAGCCCTTCAGTGCCGCAGAGCCCGATTGGCGTGCT  
GGATGCAACATGCTTCAGCTTTAGGAGTGAAGATGCAAGACTAGTATCATCGCAATCAAACAACATCAGTAGT  
AGTAGTAGTAACGACAATCAAGTTTCTAAGAGGAGAAGGCTAAGCATATCACCAATCTGA
```

Fig. A1.2. DNA que codifica para CycD2;1. Al inicio en mayúsculas el exón 5, en minúsculas y azul, el intrón 5, posterior a este en mayúsculas el exón 6. Resaltado en gris, nucleótidos encontrados en la región que codifica para el péptido de interés

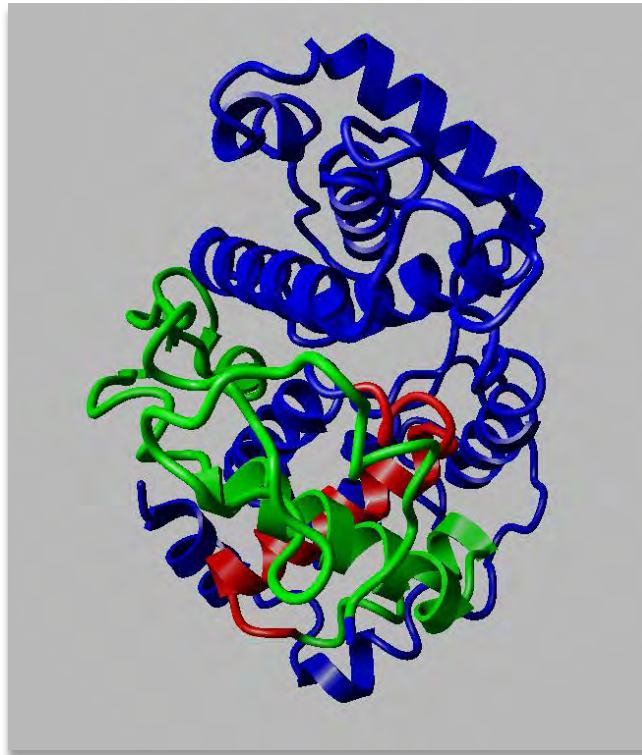


Fig. A1.3. Estructura tridimensional de CYCD2;1. En rojo, α hélice, predicha como inmunogénica, en verde los residuos elegidos para su clonación. El resto de la proteína en azul

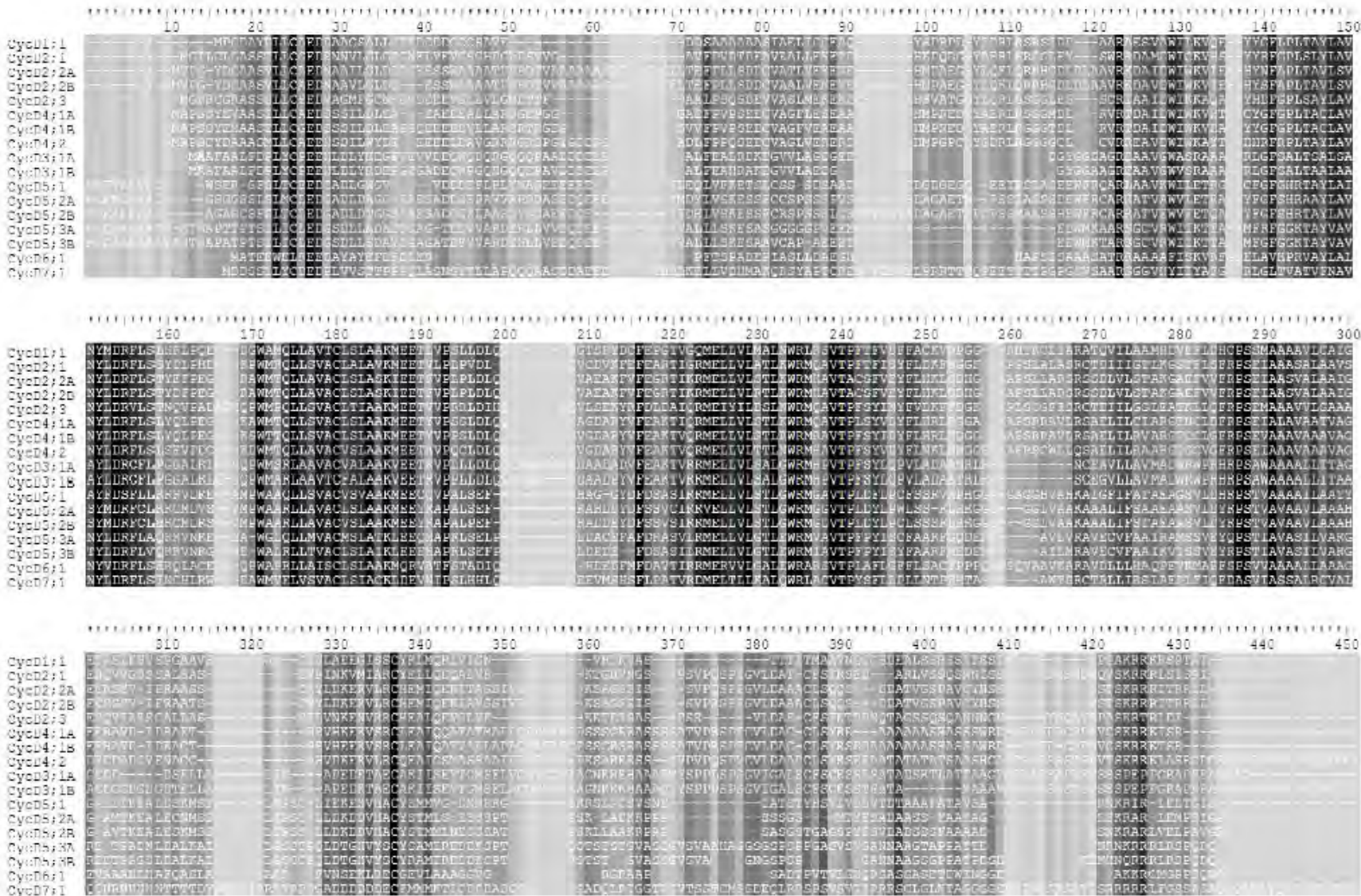


Figura A1.4. Alineamiento de las 17 Ciclinas D de maíz. Los aminoácidos más conservados se denotan en una escala de grises, donde el negro corresponde a los aminoácidos totalmente conservados, y el gris más claro a los aminoácidos no conservados.

Tabla A1.1. Fragmentos peptídicos en el extremo carboxilo de la CycD2;1 con potencial antigénico

Secuencia	Posición
LCLGASSTLLCG	4-15
GNELVEVG	27-34
LDSVVGAVFPVDTD	40-53
AVRALLE	55-61

Tabla A2.2 Predicción de accesibilidad de los aminoácidos en la superficie de la proteína (NetSurfP v. 1.1). En negro, el péptido potencialmente inmunogénico elegido para la clonación.

Columna	Parámetro
1	Expuesto (E) o Escondido (B)
2	Aminoácido
3	Proteína
4	Posición
5	Accesibilidad de superficie relativa
6	Accesibilidad de superficie absoluta
7	Valor Z
8	Probabilidad de α -hélice
9	Probabilidad de hoja β
10	Probabilidad de "coil"

E M	CycD2_1	1	0.643	128.624	-2.156	0.003	0.003	0.994
E G	CycD2_1	2	0.406	31.968	-2.022	0.018	0.047	0.935
E I	CycD2_1	3	0.374	69.283	-2.112	0.118	0.150	0.732
E L	CycD2_1	4	0.377	69.047	-1.124	0.118	0.150	0.732
B C	CycD2_1	5	0.243	34.047	-1.368	0.307	0.165	0.527
E L	CycD2_1	6	0.352	64.451	-0.421	0.386	0.097	0.517
E G	CycD2_1	7	0.448	35.289	-0.646	0.268	0.043	0.689
B A	CycD2_1	8	0.106	11.648	-0.399	0.522	0.016	0.462
E S	CycD2_1	9	0.341	39.930	-0.507	0.622	0.015	0.363
B S	CycD2_1	10	0.294	34.469	-1.232	0.622	0.015	0.363
E T	CycD2_1	11	0.413	57.352	-0.041	0.660	0.049	0.291
B L	CycD2_1	12	0.125	22.888	-0.589	0.605	0.105	0.290
B L	CycD2_1	13	0.225	41.143	0.501	0.386	0.097	0.517
B C	CycD2_1	14	0.097	13.675	0.168	0.278	0.093	0.628
E G	CycD2_1	15	0.546	42.954	0.213	0.191	0.086	0.723
E E	CycD2_1	16	0.448	78.266	-0.517	0.278	0.093	0.628
E D	CycD2_1	17	0.437	63.015	-0.402	0.354	0.048	0.598
E R	CycD2_1	18	0.412	94.394	-0.439	0.354	0.048	0.598
E N	CycD2_1	19	0.544	79.583	-0.800	0.339	0.016	0.645

E N	CycD2_1	20	0.511	74.840	-0.537	0.354	0.048	0.598
E V	CycD2_1	21	0.283	43.528	-0.954	0.354	0.048	0.598
B L	CycD2_1	22	0.284	52.000	-1.080	0.268	0.043	0.689
E G	CycD2_1	23	0.623	49.014	-1.449	0.181	0.016	0.803
E L	CycD2_1	24	0.417	76.298	-0.717	0.181	0.016	0.803
E G	CycD2_1	25	0.622	48.959	-1.601	0.115	0.016	0.868
E C	CycD2_1	26	0.571	80.182	-1.374	0.115	0.016	0.868
E G	CycD2_1	27	0.623	49.054	-0.802	0.115	0.016	0.868
E N	CycD2_1	28	0.711	104.046	-0.915	0.058	0.017	0.925
E E	CycD2_1	29	0.501	87.472	0.189	0.053	0.043	0.903
E L	CycD2_1	30	0.492	90.085	-0.242	0.052	0.084	0.864
E V	CycD2_1	31	0.292	44.850	-0.831	0.056	0.142	0.802
E E	CycD2_1	32	0.553	96.696	-1.266	0.066	0.296	0.638
E V	CycD2_1	33	0.365	56.070	-1.112	0.064	0.216	0.721
E G	CycD2_1	34	0.291	22.902	-1.227	0.056	0.142	0.802
E S	CycD2_1	35	0.510	59.749	-1.233	0.052	0.084	0.864
E G	CycD2_1	36	0.608	47.834	-1.250	0.113	0.043	0.844
E H	CycD2_1	37	0.457	83.201	-0.528	0.053	0.043	0.903
E D	CycD2_1	38	0.644	92.844	-0.661	0.113	0.043	0.844
E G	CycD2_1	39	0.485	38.201	-0.730	0.113	0.043	0.844
E L	CycD2_1	40	0.587	107.535	-1.836	0.058	0.017	0.925
E D	CycD2_1	41	0.383	55.219	-0.412	0.058	0.017	0.925
B S	CycD2_1	42	0.305	35.793	-2.002	0.115	0.016	0.868
E V	CycD2_1	43	0.425	65.338	-1.419	0.113	0.043	0.844
B V	CycD2_1	44	0.243	37.349	-0.636	0.113	0.087	0.800
B G	CycD2_1	45	0.196	15.402	-0.360	0.191	0.086	0.723
E A	CycD2_1	46	0.394	43.430	-1.277	0.118	0.150	0.732
E V	CycD2_1	47	0.383	58.898	-0.906	0.191	0.086	0.723
B F	CycD2_1	48	0.124	24.887	0.475	0.113	0.087	0.800
E P	CycD2_1	49	0.313	44.486	-0.119	0.268	0.043	0.689
E V	CycD2_1	50	0.529	81.338	-0.192	0.522	0.016	0.462
B D	CycD2_1	51	0.264	37.970	0.088	0.717	0.014	0.269
B T	CycD2_1	52	0.123	17.060	-0.542	0.923	0.002	0.076
E D	CycD2_1	53	0.434	62.583	0.207	0.970	0.001	0.030
E E	CycD2_1	54	0.419	73.269	0.844	0.988	0.000	0.012
B A	CycD2_1	55	0.050	5.477	1.243	0.988	0.000	0.012
B V	CycD2_1	56	0.056	8.561	1.042	0.970	0.001	0.030
E R	CycD2_1	57	0.446	102.042	2.016	0.970	0.001	0.030
E A	CycD2_1	58	0.313	34.515	0.993	0.970	0.001	0.030
B L	CycD2_1	59	0.042	7.654	0.290	0.970	0.001	0.030
B L	CycD2_1	60	0.242	44.255	1.123	0.970	0.001	0.030
E E	CycD2_1	61	0.626	109.397	1.382	0.970	0.001	0.030
E K	CycD2_1	62	0.308	63.356	1.244	0.970	0.001	0.030
B E	CycD2_1	63	0.083	14.465	-0.836	0.923	0.002	0.076
E T	CycD2_1	64	0.584	80.973	-0.177	0.858	0.002	0.139
E D	CycD2_1	65	0.701	101.000	0.502	0.782	0.003	0.216
E H	CycD2_1	66	0.370	67.230	-0.080	0.406	0.004	0.590
E K	CycD2_1	67	0.445	91.598	-0.045	0.053	0.005	0.942
B P	CycD2_1	68	0.301	42.754	-1.082	0.018	0.019	0.964
E Q	CycD2_1	69	0.455	81.227	-0.265	0.058	0.017	0.925
E D	CycD2_1	70	0.559	80.537	-1.081	0.246	0.004	0.750
E G	CycD2_1	71	0.573	45.103	-0.853	0.406	0.004	0.590
B Y	CycD2_1	72	0.133	28.401	-0.129	0.502	0.002	0.495
B A	CycD2_1	73	0.191	21.081	-1.001	0.600	0.003	0.397
E E	CycD2_1	74	0.642	112.105	0.107	0.600	0.003	0.397
E R	CycD2_1	75	0.376	86.081	-0.393	0.622	0.015	0.363
B L	CycD2_1	76	0.219	40.081	-1.219	0.522	0.016	0.462
E E	CycD2_1	77	0.626	109.310	-0.765	0.339	0.016	0.645
E R	CycD2_1	78	0.598	136.988	-0.052	0.257	0.016	0.727
E G	CycD2_1	79	0.543	42.750	-0.268	0.115	0.016	0.868
E G	CycD2_1	80	0.678	53.359	-0.568	0.058	0.017	0.925
B L	CycD2_1	81	0.097	17.852	-0.155	0.115	0.016	0.868
E E	CycD2_1	82	0.423	73.846	0.531	0.053	0.043	0.903

E Y	CycD2_1	83	0.347	74.175	-0.049	0.879	0.010	0.111
E S	CycD2_1	84	0.554	64.905	0.178	0.879	0.010	0.111
B W	CycD2_1	85	0.131	31.554	0.410	0.879	0.010	0.111
B R	CycD2_1	86	0.083	19.007	0.003	0.923	0.002	0.076
E R	CycD2_1	87	0.327	74.952	-0.232	0.988	0.000	0.012
B D	CycD2_1	88	0.259	37.365	0.906	0.988	0.000	0.012
B A	CycD2_1	89	0.032	3.504	0.007	0.988	0.000	0.012
B M	CycD2_1	90	0.049	9.865	0.554	0.988	0.000	0.012
E D	CycD2_1	91	0.330	47.625	0.661	0.988	0.000	0.012
B W	CycD2_1	92	0.097	23.280	0.743	0.988	0.000	0.012
B I	CycD2_1	93	0.018	3.237	0.742	0.988	0.000	0.012
B C	CycD2_1	94	0.218	30.537	0.825	0.988	0.000	0.012
E K	CycD2_1	95	0.385	79.174	1.466	0.988	0.000	0.012
B V	CycD2_1	96	0.034	5.180	-0.185	0.970	0.001	0.030
B H	CycD2_1	97	0.094	17.044	-0.201	0.970	0.001	0.030
E S	CycD2_1	98	0.549	64.355	0.494	0.923	0.002	0.076
E Y	CycD2_1	99	0.500	106.914	1.053	0.858	0.002	0.139
B Y	CycD2_1	100	0.156	33.359	0.912	0.406	0.004	0.590
E R	CycD2_1	101	0.698	159.934	0.476	0.016	0.005	0.979
B F	CycD2_1	102	0.065	13.025	0.187	0.016	0.005	0.979
E G	CycD2_1	103	0.410	32.298	0.643	0.016	0.005	0.979
E P	CycD2_1	104	0.450	63.841	-0.708	0.782	0.003	0.216
E L	CycD2_1	105	0.287	52.586	0.274	0.938	0.007	0.055
B S	CycD2_1	106	0.028	3.328	0.399	0.938	0.007	0.055
B L	CycD2_1	107	0.056	10.235	0.587	0.970	0.001	0.030
B Y	CycD2_1	108	0.111	23.828	0.274	0.988	0.000	0.012
B L	CycD2_1	109	0.080	14.593	1.200	0.988	0.000	0.012
B A	CycD2_1	110	0.022	2.446	0.597	0.988	0.000	0.012
B V	CycD2_1	111	0.050	7.685	0.354	0.988	0.000	0.012
B N	CycD2_1	112	0.119	17.378	0.836	0.988	0.000	0.012
B Y	CycD2_1	113	0.045	9.659	1.031	0.988	0.000	0.012
B L	CycD2_1	114	0.031	5.603	0.688	0.988	0.000	0.012
B D	CycD2_1	115	0.151	21.817	0.174	0.988	0.000	0.012
B R	CycD2_1	116	0.130	29.701	0.624	0.970	0.001	0.030
B F	CycD2_1	117	0.034	6.804	-0.016	0.970	0.001	0.030
B L	CycD2_1	118	0.058	10.638	0.469	0.923	0.002	0.076
B S	CycD2_1	119	0.174	20.428	-1.001	0.858	0.002	0.139
E S	CycD2_1	120	0.273	31.984	-0.181	0.600	0.003	0.397
B Y	CycD2_1	121	0.276	59.024	0.095	0.406	0.004	0.590
E D	CycD2_1	122	0.357	51.444	-0.827	0.321	0.003	0.675
B L	CycD2_1	123	0.234	42.827	-0.834	0.339	0.016	0.645
E P	CycD2_1	124	0.477	67.644	-1.169	0.184	0.043	0.773
E H	CycD2_1	125	0.593	107.830	-0.835	0.113	0.043	0.844
E D	CycD2_1	126	0.489	70.393	-1.371	0.058	0.017	0.925
E K	CycD2_1	127	0.461	94.807	-0.503	0.058	0.017	0.925
E P	CycD2_1	128	0.483	68.481	-1.253	0.321	0.003	0.675
E W	CycD2_1	129	0.350	84.151	-0.319	0.502	0.002	0.495
B M	CycD2_1	130	0.153	30.535	0.318	0.717	0.014	0.269
B R	CycD2_1	131	0.069	15.801	0.048	0.802	0.014	0.185
B Q	CycD2_1	132	0.172	30.666	0.073	0.938	0.007	0.055
B L	CycD2_1	133	0.056	10.180	0.037	0.938	0.007	0.055
B L	CycD2_1	134	0.030	5.585	0.186	0.975	0.003	0.022
B S	CycD2_1	135	0.032	3.715	-0.788	0.975	0.003	0.022
B V	CycD2_1	136	0.054	8.331	-0.274	0.975	0.003	0.022
B A	CycD2_1	137	0.033	3.593	-0.398	0.975	0.003	0.022
B C	CycD2_1	138	0.022	3.089	0.726	0.975	0.003	0.022
B L	CycD2_1	139	0.045	8.185	0.206	0.975	0.003	0.022
B A	CycD2_1	140	0.063	6.921	0.498	0.975	0.003	0.022
B L	CycD2_1	141	0.052	9.521	0.229	0.938	0.007	0.055
B A	CycD2_1	142	0.039	4.309	-1.830	0.879	0.010	0.111
B V	CycD2_1	143	0.172	26.483	-1.485	0.622	0.015	0.363
E K	CycD2_1	144	0.310	63.705	-0.439	0.430	0.016	0.555
B M	CycD2_1	145	0.197	39.380	-0.057	0.191	0.086	0.723

E E	CycD2_1	146	0.378	66.106	-0.586	0.199	0.152	0.649
E E	CycD2_1	147	0.580	101.291	-1.596	0.199	0.152	0.649
E T	CycD2_1	148	0.390	54.024	-1.112	0.118	0.150	0.732
E V	CycD2_1	149	0.509	78.187	-0.814	0.052	0.084	0.864
B L	CycD2_1	150	0.279	51.048	0.245	0.053	0.043	0.903
E P	CycD2_1	151	0.299	42.456	-0.750	0.184	0.043	0.773
E L	CycD2_1	152	0.412	75.346	-0.243	0.354	0.048	0.598
B P	CycD2_1	153	0.268	38.086	-0.200	0.660	0.049	0.291
E V	CycD2_1	154	0.461	70.825	-0.674	0.717	0.014	0.269
E D	CycD2_1	155	0.443	63.894	-0.031	0.831	0.044	0.125
B L	CycD2_1	156	0.205	37.572	-0.133	0.831	0.044	0.125
B Q	CycD2_1	157	0.212	37.935	0.283	0.831	0.044	0.125
B V	CycD2_1	158	0.265	40.777	-0.029	0.831	0.044	0.125
E C	CycD2_1	159	0.325	45.560	-0.132	0.831	0.044	0.125
E D	CycD2_1	160	0.326	47.020	-0.964	0.751	0.050	0.199
B V	CycD2_1	161	0.274	42.191	-1.047	0.339	0.016	0.645
E K	CycD2_1	162	0.674	138.601	-0.985	0.109	0.005	0.886
E F	CycD2_1	163	0.453	90.897	-0.459	0.115	0.016	0.868
E E	CycD2_1	164	0.461	80.537	0.188	0.339	0.016	0.645
B F	CycD2_1	165	0.184	36.969	0.114	0.354	0.048	0.598
E E	CycD2_1	166	0.286	49.929	0.339	0.430	0.016	0.555
E A	CycD2_1	167	0.343	37.788	0.399	0.923	0.002	0.076
E R	CycD2_1	168	0.611	139.988	0.882	0.970	0.001	0.030
B T	CycD2_1	169	0.187	25.951	1.401	0.970	0.001	0.030
B I	CycD2_1	170	0.016	2.997	1.289	0.988	0.000	0.012
B G	CycD2_1	171	0.210	16.527	1.446	0.988	0.000	0.012
E R	CycD2_1	172	0.497	113.882	1.220	0.988	0.000	0.012
B M	CycD2_1	173	0.084	16.848	0.437	0.970	0.001	0.030
B E	CycD2_1	174	0.037	6.481	-1.370	0.970	0.001	0.030
E L	CycD2_1	175	0.318	58.153	0.126	0.970	0.001	0.030
E L	CycD2_1	176	0.270	49.455	1.313	0.988	0.000	0.012
B V	CycD2_1	177	0.022	3.397	0.448	0.970	0.001	0.030
B L	CycD2_1	178	0.086	15.783	0.016	0.975	0.003	0.022
E A	CycD2_1	179	0.551	60.665	0.464	0.938	0.007	0.055
E T	CycD2_1	180	0.282	39.058	0.088	0.879	0.010	0.111
B L	CycD2_1	181	0.051	9.356	0.123	0.455	0.046	0.498
E K	CycD2_1	182	0.427	87.752	0.166	0.052	0.084	0.864
B W	CycD2_1	183	0.086	20.635	-0.765	0.004	0.138	0.858
E R	CycD2_1	184	0.403	92.402	-0.015	0.005	0.336	0.660
B M	CycD2_1	185	0.052	10.325	-0.228	0.004	0.616	0.381
E Q	CycD2_1	186	0.326	58.152	-0.634	0.004	0.514	0.481
B A	CycD2_1	187	0.121	13.301	0.145	0.004	0.420	0.576
B V	CycD2_1	188	0.163	25.038	-0.814	0.004	0.197	0.799
B T	CycD2_1	189	0.062	8.627	0.404	0.005	0.015	0.979
B P	CycD2_1	190	0.041	5.761	-1.130	0.176	0.004	0.820
B F	CycD2_1	191	0.152	30.446	-0.686	0.406	0.004	0.590
B T	CycD2_1	192	0.236	32.733	-0.160	0.694	0.003	0.303
B F	CycD2_1	193	0.043	8.690	-0.026	0.858	0.002	0.139
B I	CycD2_1	194	0.055	10.249	-0.409	0.923	0.002	0.076
E S	CycD2_1	195	0.280	32.804	-0.388	0.970	0.001	0.030
B Y	CycD2_1	196	0.237	50.754	0.393	0.970	0.001	0.030
B F	CycD2_1	197	0.037	7.406	-0.396	0.970	0.001	0.030
B L	CycD2_1	198	0.081	14.776	-0.664	0.970	0.001	0.030
E D	CycD2_1	199	0.502	72.381	0.332	0.923	0.002	0.076
E K	CycD2_1	200	0.324	66.544	0.709	0.858	0.002	0.139
B F	CycD2_1	201	0.074	14.792	-0.432	0.502	0.002	0.495
E N	CycD2_1	202	0.605	88.499	-0.248	0.176	0.004	0.820
E G	CycD2_1	203	0.358	28.159	-0.748	0.053	0.005	0.942
E G	CycD2_1	204	0.634	49.927	-1.231	0.016	0.005	0.979
E K	CycD2_1	205	0.683	140.473	-0.539	0.053	0.005	0.942
E P	CycD2_1	206	0.550	78.059	-0.668	0.246	0.004	0.750
E P	CycD2_1	207	0.411	58.278	-0.285	0.406	0.004	0.590
E S	CycD2_1	208	0.288	33.812	0.055	0.858	0.002	0.139

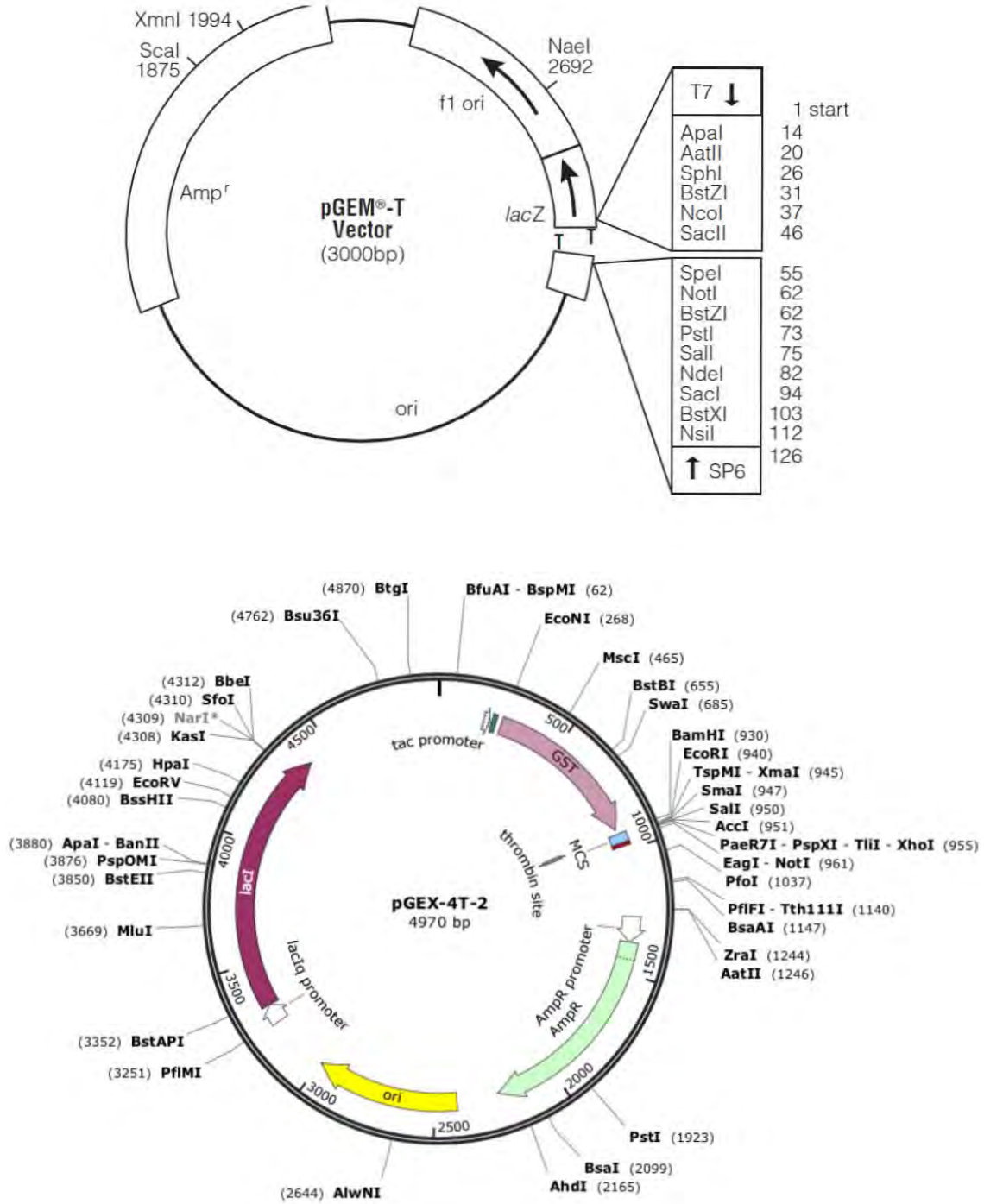
E L	CycD2_1	209	0.451	82.670	0.619	0.923	0.002	0.076
E A	CycD2_1	210	0.411	45.281	1.328	0.970	0.001	0.030
B L	CycD2_1	211	0.039	7.232	0.047	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	212	0.166	18.304	0.443	0.970	0.001	0.030
E S	CycD2_1	213	0.434	50.853	1.065	0.970	0.001	0.030
B R	CycD2_1	214	0.124	28.488	1.714	0.970	0.001	0.030
B C	CycD2_1	215	0.015	2.064	1.038	0.970	0.001	0.030
B T	CycD2_1	216	0.174	24.175	0.760	0.970	0.001	0.030
B D	CycD2_1	217	0.177	25.491	0.704	0.970	0.001	0.030
B I	CycD2_1	218	0.030	5.642	0.826	0.970	0.001	0.030
B I	CycD2_1	219	0.020	3.756	1.009	0.970	0.001	0.030
B I	CycD2_1	220	0.162	29.896	-0.254	0.970	0.001	0.030
B G	CycD2_1	221	0.102	8.059	0.313	0.970	0.001	0.030
B T	CycD2_1	222	0.025	3.454	0.674	0.923	0.002	0.076
B L	CycD2_1	223	0.059	10.766	0.121	0.694	0.003	0.303
B K	CycD2_1	224	0.185	38.013	0.892	0.406	0.004	0.590
B G	CycD2_1	225	0.252	19.848	-0.510	0.176	0.004	0.820
B S	CycD2_1	226	0.207	24.237	0.045	0.257	0.016	0.727
E T	CycD2_1	227	0.446	61.874	0.098	0.184	0.043	0.773
B F	CycD2_1	228	0.089	17.822	-0.137	0.184	0.043	0.773
B L	CycD2_1	229	0.091	16.644	-0.295	0.113	0.087	0.800
E S	CycD2_1	230	0.452	52.974	-0.407	0.018	0.047	0.935
B F	CycD2_1	231	0.091	18.244	0.644	0.005	0.015	0.979
E R	CycD2_1	232	0.386	88.463	0.472	0.003	0.003	0.994
B P	CycD2_1	233	0.115	16.347	-0.179	0.502	0.002	0.495
B S	CycD2_1	234	0.136	15.974	-0.497	0.858	0.002	0.139
B E	CycD2_1	235	0.094	16.474	0.760	0.970	0.001	0.030
B I	CycD2_1	236	0.027	5.013	0.953	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	237	0.018	2.017	1.093	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	238	0.041	4.551	-0.376	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	239	0.028	3.086	0.322	0.970	0.001	0.030
B S	CycD2_1	240	0.020	2.321	1.107	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	241	0.032	3.482	0.621	0.970	0.001	0.030
B L	CycD2_1	242	0.066	12.030	0.774	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	243	0.041	4.562	0.969	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	244	0.014	1.576	1.028	0.988	0.000	0.012
B V	CycD2_1	245	0.083	12.788	0.552	0.970	0.001	0.030
E S	CycD2_1	246	0.321	37.609	0.816	0.970	0.001	0.030
B E	CycD2_1	247	0.192	33.577	-0.234	0.923	0.002	0.076
B N	CycD2_1	248	0.170	24.961	-0.211	0.694	0.003	0.303
E Q	CycD2_1	249	0.694	123.913	0.116	0.176	0.004	0.820
E V	CycD2_1	250	0.384	59.036	-0.335	0.053	0.005	0.942
E V	CycD2_1	251	0.463	71.117	-1.231	0.016	0.005	0.979
E G	CycD2_1	252	0.607	47.802	-1.590	0.018	0.019	0.964
E S	CycD2_1	253	0.569	66.710	-0.682	0.115	0.016	0.868
B S	CycD2_1	254	0.198	23.206	-0.165	0.246	0.004	0.750
E S	CycD2_1	255	0.495	57.967	-0.514	0.502	0.002	0.495
E A	CycD2_1	256	0.576	63.508	0.247	0.802	0.014	0.185
E L	CycD2_1	257	0.273	49.931	0.599	0.802	0.014	0.185
B S	CycD2_1	258	0.083	9.739	0.168	0.802	0.014	0.185
E A	CycD2_1	259	0.364	40.102	0.452	0.831	0.044	0.125
E S	CycD2_1	260	0.546	64.050	0.159	0.802	0.014	0.185
E E	CycD2_1	261	0.253	44.182	0.557	0.622	0.015	0.363
B V	CycD2_1	262	0.211	32.400	-0.103	0.268	0.043	0.689
E P	CycD2_1	263	0.695	98.592	0.586	0.018	0.019	0.964
B I	CycD2_1	264	0.108	19.888	0.831	0.005	0.015	0.979
E N	CycD2_1	265	0.507	74.269	1.478	0.005	0.015	0.979
E K	CycD2_1	266	0.373	76.664	1.171	0.970	0.001	0.030
E V	CycD2_1	267	0.730	112.170	0.955	0.970	0.001	0.030
E M	CycD2_1	268	0.245	49.105	1.733	0.970	0.001	0.030
B I	CycD2_1	269	0.026	4.718	0.401	0.970	0.001	0.030
E A	CycD2_1	270	0.346	38.118	2.084	0.970	0.001	0.030
E R	CycD2_1	271	0.522	119.584	2.051	0.970	0.001	0.030

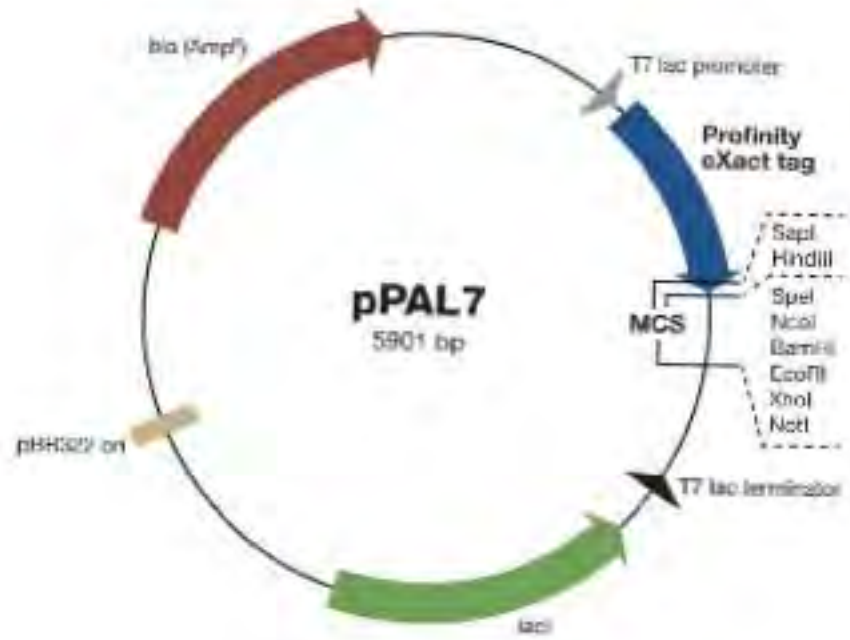
B C	CycD2_1	272	0.021	2.976	1.022	0.970	0.001	0.030
B Y	CycD2_1	273	0.054	11.497	0.826	0.988	0.000	0.012
E E	CycD2_1	274	0.473	82.720	2.025	0.988	0.000	0.012
B L	CycD2_1	275	0.208	38.012	1.861	0.988	0.000	0.012
B L	CycD2_1	276	0.016	2.948	1.435	0.988	0.000	0.012
B Q	CycD2_1	277	0.181	32.380	1.105	0.970	0.001	0.030
E E	CycD2_1	278	0.554	96.714	1.351	0.970	0.001	0.030
B Q	CycD2_1	279	0.114	20.378	1.125	0.970	0.001	0.030
B A	CycD2_1	280	0.111	12.188	-0.273	0.923	0.002	0.076
E L	CycD2_1	281	0.488	89.426	-0.057	0.858	0.002	0.139
E V	CycD2_1	282	0.598	91.851	-0.712	0.600	0.003	0.397
E R	CycD2_1	283	0.394	90.157	-0.224	0.246	0.004	0.750
E K	CycD2_1	284	0.613	126.012	-0.626	0.176	0.004	0.820
E T	CycD2_1	285	0.441	61.097	-0.517	0.181	0.016	0.803
E G	CycD2_1	286	0.544	42.836	-0.614	0.115	0.016	0.868
E H	CycD2_1	287	0.524	95.243	-0.633	0.113	0.043	0.844
E V	CycD2_1	288	0.270	41.499	-0.031	0.113	0.087	0.800
E N	CycD2_1	289	0.480	70.316	0.386	0.199	0.152	0.649
E G	CycD2_1	290	0.612	48.196	0.088	0.125	0.227	0.648
E S	CycD2_1	291	0.383	44.852	0.059	0.125	0.227	0.648
E P	CycD2_1	292	0.416	58.988	-0.658	0.064	0.216	0.721
E S	CycD2_1	293	0.501	58.752	-0.863	0.052	0.084	0.864
E V	CycD2_1	294	0.413	63.463	-0.019	0.053	0.043	0.903
E P	CycD2_1	295	0.473	67.133	-1.714	0.053	0.043	0.903
E Q	CycD2_1	296	0.560	99.980	-1.118	0.058	0.017	0.925
E S	CycD2_1	297	0.317	37.117	-0.716	0.018	0.019	0.964
E P	CycD2_1	298	0.455	64.536	-1.833	0.058	0.017	0.925
E I	CycD2_1	299	0.525	97.069	-1.592	0.113	0.043	0.844
E G	CycD2_1	300	0.387	30.481	-1.184	0.191	0.086	0.723
B V	CycD2_1	301	0.275	42.298	-0.710	0.278	0.093	0.628
B L	CycD2_1	302	0.216	39.623	0.082	0.278	0.093	0.628
E D	CycD2_1	303	0.501	72.223	-0.465	0.386	0.097	0.517
E A	CycD2_1	304	0.450	49.579	-1.293	0.354	0.048	0.598
E T	CycD2_1	305	0.341	47.241	-0.875	0.268	0.043	0.689
B C	CycD2_1	306	0.264	37.038	-1.024	0.191	0.086	0.723
E F	CycD2_1	307	0.470	94.249	-1.020	0.053	0.043	0.903
E S	CycD2_1	308	0.634	74.246	-1.455	0.018	0.047	0.935
E F	CycD2_1	309	0.327	65.669	-0.876	0.018	0.047	0.935
E R	CycD2_1	310	0.515	118.050	-1.399	0.018	0.047	0.935
B S	CycD2_1	311	0.198	23.206	-1.484	0.018	0.047	0.935
E E	CycD2_1	312	0.526	91.962	-1.221	0.053	0.043	0.903
E D	CycD2_1	313	0.590	84.990	-1.346	0.053	0.043	0.903
E A	CycD2_1	314	0.355	39.110	-1.884	0.052	0.084	0.864
E R	CycD2_1	315	0.418	95.768	-1.196	0.018	0.088	0.893
E L	CycD2_1	316	0.445	81.480	-1.930	0.019	0.141	0.840
B V	CycD2_1	317	0.266	40.838	-1.565	0.019	0.141	0.840
B S	CycD2_1	318	0.345	40.411	-2.303	0.019	0.141	0.840
E S	CycD2_1	319	0.392	45.989	-1.369	0.018	0.088	0.893
E Q	CycD2_1	320	0.416	74.369	-1.660	0.018	0.088	0.893
E S	CycD2_1	321	0.429	50.232	-1.615	0.018	0.088	0.893
E N	CycD2_1	322	0.578	84.575	-2.986	0.018	0.047	0.935
E N	CycD2_1	323	0.433	63.318	-1.824	0.018	0.047	0.935
E I	CycD2_1	324	0.465	86.043	-1.757	0.018	0.047	0.935
E S	CycD2_1	325	0.619	72.559	-2.905	0.018	0.019	0.964
E S	CycD2_1	326	0.436	51.041	-2.190	0.018	0.019	0.964
E S	CycD2_1	327	0.500	58.588	-1.978	0.018	0.019	0.964
E S	CycD2_1	328	0.483	56.619	-1.219	0.005	0.015	0.979
E S	CycD2_1	329	0.510	59.725	-1.797	0.005	0.015	0.979
E N	CycD2_1	330	0.578	84.678	-1.002	0.003	0.003	0.994
E D	CycD2_1	331	0.707	101.922	-0.728	0.016	0.005	0.979
E N	CycD2_1	332	0.574	84.034	-0.984	0.016	0.005	0.979
E Q	CycD2_1	333	0.507	90.568	-0.506	0.058	0.017	0.925
E V	CycD2_1	334	0.610	93.803	-0.469	0.115	0.016	0.868

E S	CycD2_1	335	0.457	53.572	-0.300	0.115	0.016	0.868
E K	CycD2_1	336	0.541	111.304	0.034	0.113	0.043	0.844
E R	CycD2_1	337	0.398	91.073	-0.299	0.064	0.216	0.721
E R	CycD2_1	338	0.420	96.203	-0.104	0.066	0.296	0.638
E R	CycD2_1	339	0.447	102.478	-0.304	0.066	0.296	0.638
E L	CycD2_1	340	0.312	57.127	-1.412	0.019	0.141	0.840
E S	CycD2_1	341	0.647	75.805	-1.607	0.018	0.047	0.935
E I	CycD2_1	342	0.494	91.446	-1.403	0.018	0.019	0.964
E S	CycD2_1	343	0.518	60.721	-1.219	0.005	0.015	0.979
E P	CycD2_1	344	0.579	82.103	-1.363	0.018	0.019	0.964
E I	CycD2_1	345	0.643	119.011	-1.961	0.003	0.003	0.994

Apéndice 2.

Vectores de clonación (pGEM-T Easy) y expresión (pGEX-4T2, pPAL7).





Apéndice 3. Cebadores diseñados para la amplificación de CycD2;1 y condiciones de amplificación.

Primer	Secuencia (5'-3')
Forward	TTTGGATCCGTTGGCTCCTCGAGTGCTCTTT
Reverse	TTTGAATTCTGGTGATATGCTTAGCCTTCTCCT

Tabla A3.1. Cebadores diseñados.

Reacción	Condiciones
OneStep RT-PCR (Quiagen)	30 min a 50°C, 15 min a 95 °C. 35 ciclos (30 s a 94°C, 15 s a 58 °C, 30 s a 72 °C) 10 min a 72 °C
PCR (JumpStart Taq Ready Mix. Invitrogen)	2 min a 94 °C. 35 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 58°C, 30 s a 72°C) 5 min

Tabla A3.2. Condiciones utilizadas para la RT-PCR y la PCR

Apéndice 4. Esquema de inmunización

Semana	Dosis	Vehículo	Vía de admin.
0	500 µg de GST-CYCD2;1 (Ambos conejos)	Acrilamida + SSI + AI	Subcutánea
1	250 µg de péptido CYCD2;1	Acrilamida + SSI + AI	Subcutánea
7	100 µg de péptido CYCD2;1 Ambos conejos	Acrilamida + SSI + AI	Subcutánea
10	74 µg de péptido CYCD2;1(Conejo 1) 10 µg de péptido CYCD2;1(Conejo 2)	SSI	Intravenosa
11	Sangría de cosecha	-	-