



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

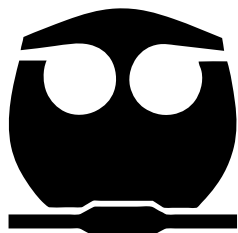
**Estudio de la proteína *E2FA/B1;1* durante la  
germinación de maíz**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Cassandra Suárez Espinoza**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:** Profesora: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

**SECRETARIO:** Profesor: Euclides Avila Chávez

**1er. SUPLENTE:** Profesora: Vanessa Rebeca Maya Ampudia

**2° SUPLENTE:** Profesor: Oscar Hernández Meléndez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

### **Asesor del tema:**

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

---

### **Supervisor técnico:**

Biól. Victor Allan Sánchez Camargo

---

### **SUSTENTANTE:**

Cassandra Suárez Espinoza

---

## **Agradecimientos**

A CONACyT (CB220661), CONACyT infraestructura (252001), PAPIIT (IN215316, 6290-11) y PAIP (5000-9124) por el financiamiento para la realización de los experimentos llevados a cabo.

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>8</b>
<b>Figuras.....</b>	<b>9</b>
<b>Tablas.....</b>	<b>10</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>11</b>
1.1. El maíz.....	11
1.1.1. Origen, evolución y domesticación del maíz.....	11
1.1.2. La semilla de maíz.....	13
1.1.3 Usos del maíz.....	15
1.2. La germinación.....	16
1.3. El ciclo celular.....	19
1.3.1. El ciclo celular en plantas.....	21
1.3.2. Regulación del ciclo celular en plantas.....	22
1.3.3. La vía E2F/RBR/DP.....	24
1.3.4. La familia de factores transcripcionales E2F.....	26
1.3.5. E2F en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
1.3.6. La vía E2F-DP-RBR y la transición G1-S en plantas.....	28
1.3.7. Influencia de los azúcares en el control del ciclo celular en plantas.....	30
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>36</b>
5.1. Objetivo general.....	36
5.2. Objetivos particulares.....	36
<b>6. Materiales y metodología.....</b>	<b>37</b>
6.1. Material biológico.....	37
6.1.1. Semillas de maíz.....	37
6.1.2. Cepas.....	37

6.1.3. Conejos.....	37
6.1.4. Plásmidos.....	38
6.1.5. Cultivos bacterianos.....	38
6.2. Obtención de anticuerpos anti E2FA/B1;1.....	38
6.2.1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína E2FA/B1;1 de maíz.....	38
6.2.2. Amplificación de la región inmunogénica de E2FA/B1;1 de maíz por PCR.....	39
6.2.3. Clonación del péptido inmunogénico de E2FA/B1;1 de maíz en el vector de expresión.....	40
6.2.4. Expresión y purificación del péptido inmunogénico recombinante de E2FA/B1;1 de maíz.....	42
6.2.5. Cuantificación del péptido inmunogénico purificado por el método de Bradford.....	43
6.2.6. Obtención de anticuerpos anti E2FA/B1;1 de maíz en conejos.....	43
6.3. Obtención de extractos proteicos totales de semillas de maíz a diferentes tiempos de germinación y en presencia y ausencia de sacarosa y glucosa.....	44
6.4. Caracterización de los anticuerpos obtenidos anti-E2FA/B1;1 de maíz mediante ensayos de competencia.....	44
6.5. Detección de la abundancia de ZmE2FA/B1;1 durante la germinación de semillas de maíz .....	45
6.6. Análisis estadístico.....	46
<b>7. Resultados.....</b>	<b>47</b>
7.1. Obtención de anticuerpos policlonales anti-E2FA/B1;1.....	47
7.1.1. Elección del péptido utilizado para la inmunización de los conejos.....	47
7.1.2. Amplificación de la secuencia del inserto correspondiente al péptido inmunogénico elegido.....	50
7.1.3. Ligación del fragmento obtenido y purificado en el vector pENTR™/D-TOPO® como clona de entrada.....	50
7.1.4. Clonación en el vector de expresión Gateway® pDEST™ 15.....	51

7.1.5. Expresión y purificación del péptido recombinante.....	52
7.1.6. Validación de los anticuerpos anti-ZmE2FA/B1;1 de maíz.....	53
7.2. Expresión de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz.....	54
7.3. Expresión de E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz en presencia de glucosa y sacarosa.....	55
<b>8. Discusión de resultados.....</b>	<b>57</b>
8.1. Elección del péptido inmunogénico.....	57
8.2. Obtención y validación del suero inmune.....	58
8.3. E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz tanto en presencia como en ausencia de azúcares.....	59
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>65</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>66</b>
<b>12. Apéndices.....</b>	<b>74</b>

## Resumen

La germinación de las semillas tiene como propósito principal el establecimiento de una nueva planta. El proceso de germinación involucra el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de sus procesos de desarrollo. Como consecuencia de la entrada de agua a la semilla (imbibición), las células en los tejidos se elongan y finalmente se dividen, un proceso seguido por la protrusión de la radícula, evento que define el final del proceso de germinación. Distintos acercamientos experimentales han indicado que, mientras que la división celular no es necesaria para que la germinación sea visible, el establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para el crecimiento posterior, por consiguiente, su estudio durante la germinación es fundamental.

El ciclo celular es uno de los procesos biológicos conservados más estudiados dada su importancia para el crecimiento y desarrollo de los organismos. A pesar de millones años de evolución que separan plantas de animales, ambos tipos de organismos utilizan la misma vía RBR-E2F-DP para el control de la transición G<sub>1</sub>-S. La formación de los complejos RBR-E2F-DP es regulada durante el ciclo celular y la disociación de RB al ser fosforilado por cinasas dependientes de ciclina (CDKs) permite la activación de los genes regulados por el heterodímero de factores transcripcionales E2F-DP y la entrada a la fase S.

En el laboratorio estamos interesados en analizar los mecanismos moleculares involucrados en la transición G<sub>1</sub>-S durante la germinación de maíz. En el presente trabajo se obtuvieron anticuerpos policlonales que reconocen a la proteína E2FA/B1;1 y por lo tanto fue posible detectar sus niveles durante la germinación de ejes embionarios de maíz tanto en presencia como en ausencia de azúcares, de esta manera se obtuvo un acercamiento al papel que desempeña uno de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F en la regulación de la transición G<sub>1</sub>-S durante la germinación y las posibles formas en las que son regulados tanto sus niveles como su actividad.



## Abreviaturas

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
a.C.	Antes de Cristo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
APC	Complejo promotor de anafase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
DP	Socio de dimerización (dimerization partner)
E2F	Factor de unión a promotor de adenovirus E2
GST	Glutación S-transferasa
h	Horas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
KRP	Kip related protein
LB	Luria-Bertani
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RBR	Retinoblastoma related protein
TOR	Target of rapamycin
Zm	<i>Zea mays</i>

## Figuras

1. Teocintle (*Zea mexicana*) y maíz (*Zea mays*).
2. Secciones verticales de la semilla de maíz madura.
3. Curso del tiempo de toma de agua y algunos cambios importantes asociados a la germinación de semillas.
4. Representación esquemática de los eventos más importantes en el ciclo celular eucariótico.
5. La transición G1-S.
6. La transición G2-M.
7. Estructura de los miembros de la familia E2F en mamíferos.
8. Organización estructural y propiedades de unión al DNA de la familia de factores transcripcionales E2F.
9. Modelo para la regulación transcripcional mediada por E2F durante la transición G1-S.
10. Modelo de la red de transcripción mediada por la vía TOR-Glucosa en *Arabidopsis*.
11. Expresión de RNAm de E2FA/B1;1 de maíz.
12. Secuencias y alineamiento del péptido inmunogénico.
13. Alineamiento de las secuencias de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F.
14. Amplificación por PCR del inserto correspondiente al péptido inmunogénico de ZmE2FA/B1;1.
15. Alineamiento de la construcción pENTR™/D-TOPO®-E2FA/B1;1 con la secuenciación con los cebadores *forward* y *reverse*.
16. Expresión y purificación del péptido de ZmE2FA/B1;1 recombinante.
17. Validación de los anticuerpos anti-ZmE2FA/B1;1 por ensayo de competencia.
18. Acumulación de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de semillas de maíz.
19. Acumulación de ZmE2FA/B1;1 en ausencia y presencia de azúcares.

## Tablas

1. Clasificación taxonómica del maíz.
2. Cebadores diseñados para amplificar y ligar al vector de expresión el fragmento de E2FA/B1;1 de maíz.
3. Condiciones de amplificación del péptido de E2FA/B1;1 de maíz por PCR.
4. Esquema de inmunización.

## Apéndices

1. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de ZmE2FA/B1;1.
  - Tabla A1.1. Epítotos predichos por el programa EMBOSS: Antigenic para la proteína ZmE2FA/B1;1.
  - Figura A1.1. Predicción de la estructura secundaria de la proteína ZmE2FA/B1;1.
  - Tabla A1.2. Predicción de la accesibilidad de los aminoácidos en la superficie de la proteína ZmE2FA/B1;1 y en la estructura secundaria (NetSurfP v.1.1).
  - Figura A1.2. Alineamiento de las secuencias de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F.
  - Figura A1.3. Alineamiento de la construcción pDEST15-E2FA/B1;1 con la secuenciación en *forward* y *reverse*.

## 1. Introducción

### 1.1. El maíz

El maíz es una planta de origen americano y de importancia fundamental en el desarrollo de las antiguas culturas de América ya que constituyó su alimento básico y quizá uno de los primeros en ser cultivados. El maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays*, es una planta herbácea, monocotiledónea, anual (Raven et al., 1992) y está clasificada como miembro de la familia de las gramíneas *poeceae* (tabla 1).

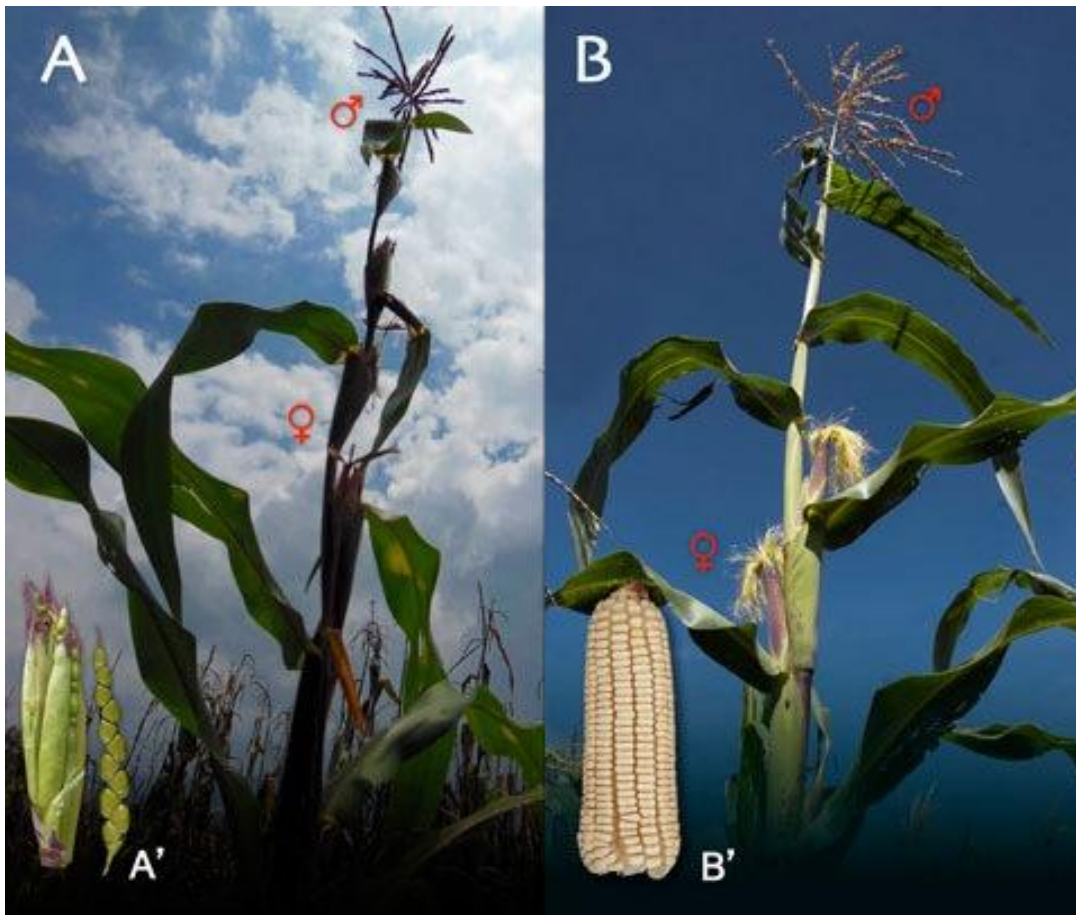
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Subclase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Poeceae
<b>Género</b>	<i>Zea</i>
<b>Especie</b>	<i>Zea mays</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.

#### 1.1.1. Origen, evolución y domesticación del maíz

El maíz, uno de los tres granos básicos que alimentan a la humanidad, tuvo su origen y diversificación inicial en las montañas y valles de México. Los estudios arqueológicos e históricos demuestran la dinámica del maíz utilizado en la historia humana. La historia de la presencia del maíz en México ha sido entendida por la gran cantidad de representaciones encontradas en esculturas, pinturas, mitos, festividades y ceremonias de la época prehispánica. Una de sus primeras representaciones fue la del dios olmeca del maíz

(Homshuk) cuya cultura estaba fundada en el cultivo del maíz y floreció entre los años 1500 y 3000 a.C. (Joralemon, 1971; Florescano, 2003). El hombre otorgó al maíz el papel de protagonista en un sin número de relatos míticos. Sobre el origen del hombre, el *Popol Vuh*, documento correspondiente a los Mayas Quiché de Guatemala y recopilado hacia finales del siglo XVI (Saravia, 1965), legó uno de los más bellos relatos registrados, en donde se relata que una vez que las divinidades creadoras poblaron el mundo con animales del cielo y de la tierra, crearon a partir de maíz al hombre.



**Figura 1. Teocintle (*Zea mexicana*) y maíz (*Zea mays*).** A y A". Planta de teocintle y su inflorescencia femenina; B y B". Planta de maíz y su inflorescencia femenina. Estructuras masculinas (♂) y femeninas (♀) (Imagen de Laura Rojas, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, 2012) .

Especímenes de mazorcas de maíz se han recuperado de cuevas en Oaxaca, México, que datan de más de 6,000 años a.C. Estudios en la variación de microsatélites del genoma de maíz indican que surgió de un sólo evento de domesticación hace alrededor de 9000 años

(Matsuoka *et al.*, 2001). Diversos factores se vieron involucrados en la diversificación del maíz, la existencia de especies primitivas adaptadas y domesticadas, la influencia de variedades exóticas de otras regiones, la hibridación con otras razas así como la presencia de condiciones geográficas favorables para el crecimiento de maíz por temporadas cortas. Durante el descubrimiento español del Nuevo Mundo, el maíz fue llevado a tierras europeas de donde se extendió rápidamente hacia Asia y África, primordialmente a través del establecimiento de colonias portuguesas en estos países. Hoy en día, el maíz constituye uno de los principales alimentos cultivados en el mundo y está entre los alimentos que poseen aplicaciones más diversas.

El origen del maíz ha sido debatido por largo tiempo, pero se cree que el progenitor más probable del maíz es el teocintle (*Zea mexicana*) (fig. 1) o el teocintle tipo „Balsas“ (*Zea mays parviglumis*), un miembro cubierto de maleza de género *Zea* (Beadle, 1939). Los teocintles tienen varios tallos ramificados, numerosas “mazorcas” en diferentes ramas con sólo dos hileras de granos envueltos en una estructura muy endurecida. Por su parte el maíz tiene un tallo robusto, con una a pocas mazorcas en la parte central de la planta, la mazorca es grande con granos expuestos y en numerosas hileras. Las diferencias entre el maíz y el teocintle, principalmente el alto desarrollo de la mazorca, son producto del proceso de domesticación (Iltis, 1983) (fig. 1). Sin embargo, cómo el teocintle evolucionó a la mazorca larga de maíz dentro de un periodo evolutivo de 10,000 años, es aún un reto para los investigadores del maíz. Existen otras teorías acerca de su origen que consideran que el maíz se originó de la especie *Tripsacum dactyloides* (Mangelsdorf, 1938), de *Zea diploperennis*, híbrido de *Tripsacum* y del teocintle (teoría tripartita), de la transmutación de la mazorca macho del teocintle a la mazorca hembra del maíz (Iltis, 1983) o de especies de maíz ancestrales a través de la duplicación cromosómica (Gaut y Doebley, 1997).

### **1.1.2. La semilla de maíz**

La semilla de maíz madura, conocida como cariopsis, está compuesta de tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión (fig. 2). El pericarpio es la capa externa del grano y se deriva de la pared del ovario, por lo que es genéticamente idéntica a la planta

madre. El endospermo y el embrión están rodeados y sujetos por el pericarpio y representan genéticamente a la siguiente generación ya que poseen material genético de las líneas paterna y materna. El endospermo representa aproximadamente el 85% del peso total del grano y sirve como fuente de energía (en forma de gránulos de almidón y cuerpos proteicos) para el embrión durante varios días posteriores a la germinación. La capa más externa del endospermo consiste de una capa de células especializadas llamada aleurona; durante la germinación, las giberelinas, hormonas producidas en el embrión, permiten que las células de la aleurona liberen amilasas para hidrolizar el almidón y proveer de azúcares necesarios para el inicio del crecimiento de una nueva planta, por lo tanto estimulan la germinación y la elongación celular.

El embrión posee un eje central (eje embrionario) el cual contiene en su extremo basal a la radícula, que dará origen a la raíz primaria, y en su extremo apical contiene una estructura que dará origen al tallo llamada plúmula. La plúmula está dividida en 5 o 6 nodos de los cuáles crecerá una hoja en cada uno durante el desarrollo de la planta. Del primer nodo (nodo escutelar) surge el escutelo y este da origen al cotiledón que digiere y absorbe el endospermo durante las primeras etapas del crecimiento. El escutelo no se convierte en tejido foliar, pero sirve para absorber y digerir al endospermo durante el crecimiento del embrión. Del siguiente nodo (nodo coleoptilar) surge el coleoptilo, el cual se convertirá en una cubierta que protege al primer brote (plúmula) que emerge de la semilla hacia la superficie del suelo. El espacio comprendido entre el nodo escutelar y el nodo coleoptilar se denomina mesocotilo. El mesocotilo se alarga rápidamente durante la germinación para permitir que el coleoptilo emerja del suelo y junto con él, las hojas. La radícula por su parte, se encuentra cubierta por la coleorriza, estructura que sirve de protección a la raíz primaria durante la germinación (Vincent, 2002).

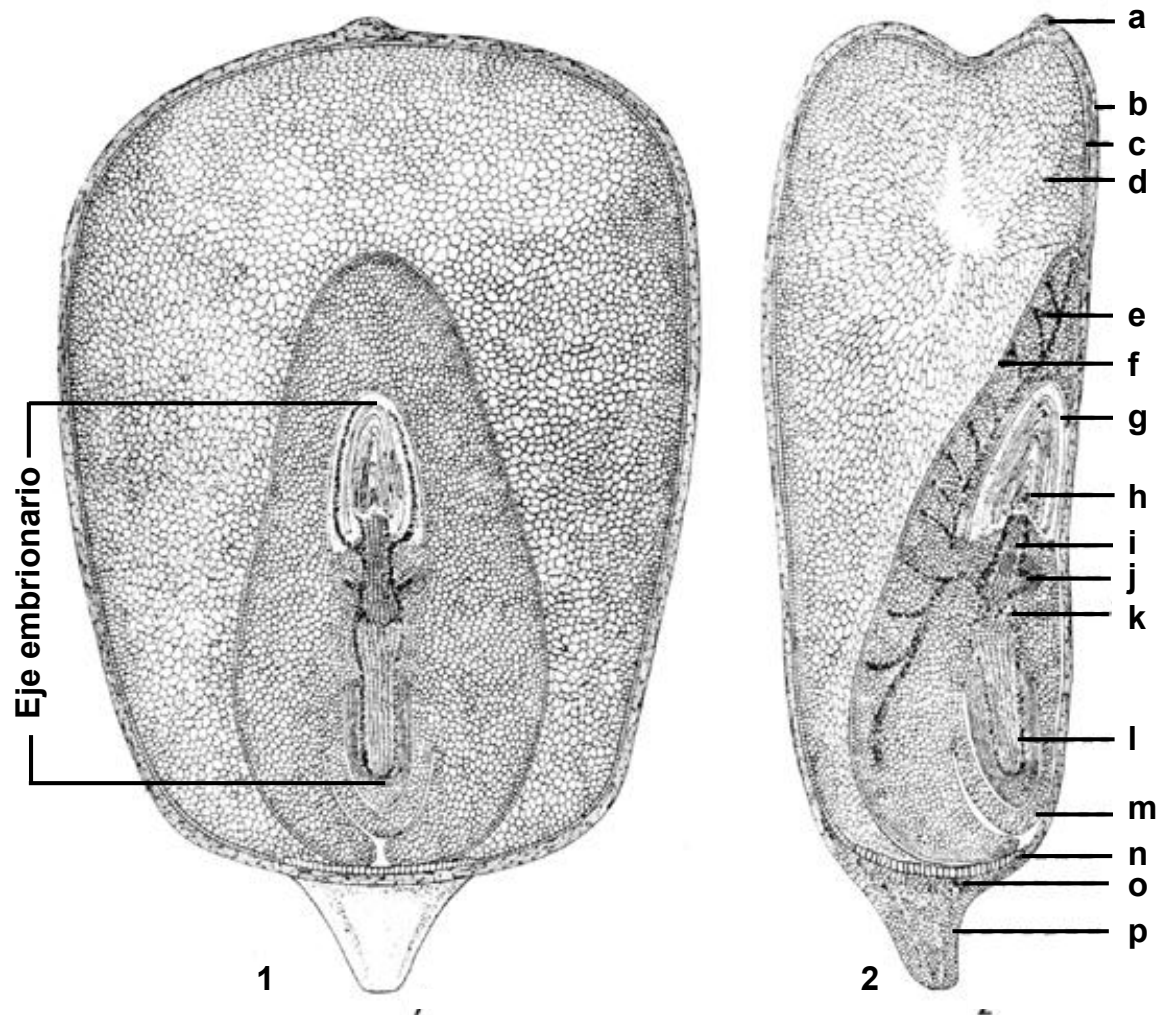


FIG. 3.—The mature kernel.  
 1 and 2, vertical sections in two planes of a mature kernel of dent corn, showing arrangement of organs and tissues. a, silk scar; b, pericarp; c, aleurone; d, endosperm; e, scutellum; f, glandular layer of scutellum; g, coleoptile; h, plumule with stem and leaves; i, first internode; j, lateral seminal root; k, scutellar node; l, primary root; m, coleorhiza; n, basal conducting cells of endosperm; o, brown abscission layer; p, pedicel or flower stalk. X 7.

Figura  
 estilo  
 plúmula  
 célula

### 1.1.3.

Nature Reviews | Genetics

El maíz constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo y está entre los alimentos que tienen aplicaciones más diversas. Su uso se centra no sólo en la alimentación humana, también forma parte de la alimentación animal por sí mismo o como ingrediente en la composición de piensos para aves, cerdos y vacas. Por otra parte, los tallos de maíz, una vez separada la mazorca, son utilizados como forraje. Desde el punto de vista industrial, esta planta también se utiliza para obtención de edulcorantes alimentarios, de almidón y de alcohol. De las partes no comestibles se obtiene



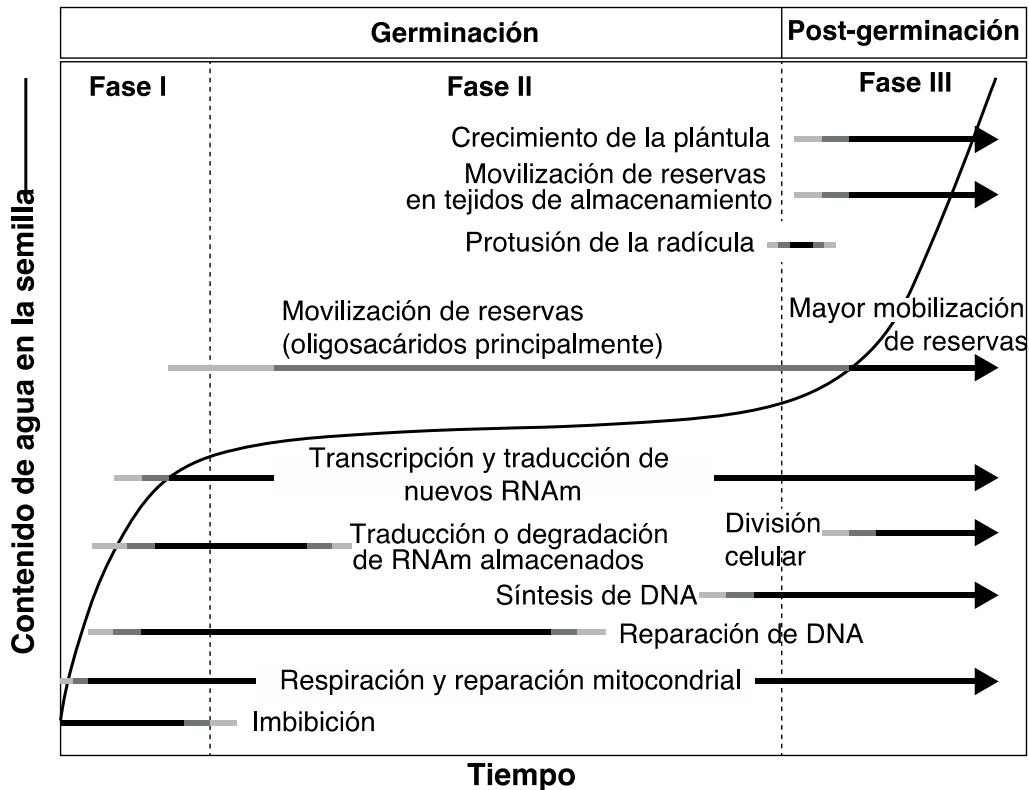
también furfural, un compuesto utilizado en la industria del caucho, resinas, plásticos e insecticidas (Paliwal *et al.*, 2001).

Por su importancia en diversos ámbitos de la sociedad mundial actual, el maíz representa una planta modelo para estudios biológicos, bioquímicos y genéticos, se ha utilizado para estudiar su silenciamiento epigenético, el desarrollo de la inflorescencia entre otros. En nuestro grupo adoptamos al maíz, particularmente durante la germinación de sus semillas, como modelo de estudio para el ciclo celular en plantas.

## **1.2. La germinación**

La germinación de las semillas tiene como propósito principal el establecimiento de una nueva planta. El proceso de germinación involucra el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de sus procesos de desarrollo. Esto implica que las semillas ya contienen, o adquirirán a la brevedad, la memoria bioquímica del programa morfogénico que crea una planta. Como consecuencia de la entrada de agua a la semilla (imbibición), las células en los tejidos de esta se elongan y finalmente se dividen, un proceso seguido por la protrusión de la radícula, evento que define el final del proceso de germinación. En general, las células en las puntas de las raíces son las primeras en ser activadas, para entrar a ciclo celular y proliferar (Vázquez-Ramos, 2003).

La toma de agua de una semilla madura es un proceso trifásico (fig. 3). La absorción inicial de agua, imbibición en la fase I, es un proceso principalmente físico; la actividad fisiológica puede comenzar después de minutos de que la célula se haya hidratado y antes de que todos los tejidos estén embebidos por completo. Durante la fase II el contenido de agua en la semilla es casi constante y la actividad metabólica incrementa con la transcripción de nuevos genes. La protrusión de la radícula a través de las estructuras circundantes al final de esta fase marca el fin de la germinación y, en la fase III, existe consumo de agua adicional durante el establecimiento de la nueva plántula y la utilización de las reservas almacenadas (Nonogaki *et al.*, 2010).



**Figura 3. Curso del tiempo de toma de agua y algunos cambios importantes asociados a la germinación de semillas.** El esquema representa los procesos celulares que se llevan a cabo durante la germinación en relación al tiempo y a la entrada de agua a la semilla. Se muestran flechas en escala de grises, siendo el gris claro un proceso menos representativo y negro más representativo en determinada fase (modificado de Black *et al.*, 2006).

Durante las horas tempranas de la germinación de semillas, durante la fase I, la semilla seca quiescente rápidamente reanuda la actividad respiratoria y las vías glucolítica, de las pentosas fosfato y las enzimas que participan en el ciclo de Krebs, se activan (Nicolás, 1979; Salon *et al.*, 1988). Las mitocondrias en las células de los tejidos de la semilla seca madura contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs para proveer cantidades adecuadas de ATP para mantener el metabolismo activo por varias horas después de la imbibición (Ehrenshaft y Brambl, 1990; Attucci *et al.*, 1991).

Todos los componentes necesarios para la síntesis de proteínas están presentes en la semilla seca, así como los RNAm residuales asociados a procesos de desarrollo previos (Comai y Harada, 1990) y que pueden ser utilizados durante las etapas tempranas de la

germinación (fig. 3), como por ejemplo, los que codifican proteínas ribosomales. Durante el proceso germinativo se transcriben también nuevos RNAm que codifican proteínas esenciales para el metabolismo celular y el mantenimiento del crecimiento y la proliferación (Bewley y Marcus, 1990).

Con la protrusión de la radícula, que permite su elongación, finaliza la germinación y marca el inicio del crecimiento de la nueva planta. En las células de la radícula durante la imbibición, se presentan dos fases de síntesis de DNA (fig. 3). La primera ocurre posterior a la imbibición e implica la reparación del DNA dañado durante la maduración de la semilla seca y la rehidratación de la misma, así como la síntesis de DNA mitocondrial. La segunda fase está asociada a la síntesis durante la división celular en células germinativas (Zlatanova, 1987) por lo que la imbibición no ocasiona una entrada inmediata al ciclo celular sino que existe un retraso de varias horas antes de que la fase S se vuelva evidente (Osborne, 1983).

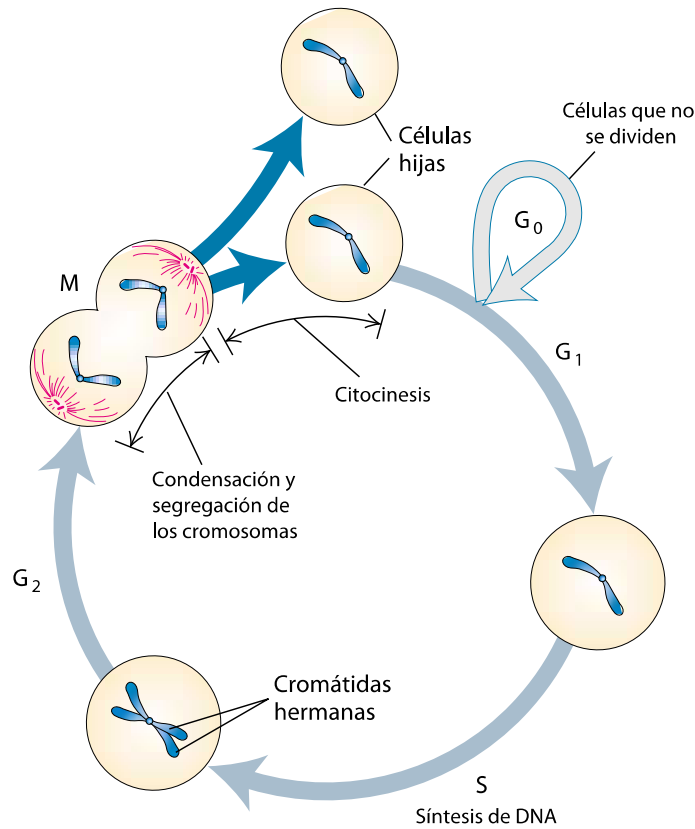
Desde décadas atrás, estudios en germinación de ejes embrionarios de maíz indican que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Deltour y Jaqmard, 1974; Conger y Carabia, 1976; Deltour, 1985), y durante las primeras horas de germinación, las células se sincronizan parcialmente y entran a la fase S entre 12-15 h post-imbibición (Baíza *et al.*, 1989) por lo que la germinación de semillas proporciona un modelo fisiológico para el estudio del ciclo celular. Durante las horas tempranas de la germinación de semillas, el patrón de las proteínas existentes puede no exhibir cambios cualitativos importantes, pero a tiempos de germinación más avanzados puede presentarse. Es muy probable que las proteínas reguladoras sean producidas a niveles por debajo de los niveles de detección electroforética (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981), sin embargo, las células de ejes embrionarios secos poseen niveles visibles de todas las proteínas analizadas que son consideradas propias del ciclo celular como son las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclina (Cdks), PCNA, DNA polimerasas, DNA ligasas, entre otras (Lara-Núñez *et al.*, 2008). Algunas de ellas no sufren modificaciones en sus niveles a lo largo de la germinación, como por ejemplo las DNA polimerasas y las Cdks, aunque si se observan cambios en su actividad (Vázquez-Ramos, 2003).

Distintos acercamientos experimentales han indicado que, mientras que la división celular no es necesaria para que la germinación sea visible, el establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para el crecimiento posterior, por consiguiente, su estudio durante la germinación es fundamental (Vázquez-Ramos, 2003).

### 1.3. El ciclo celular

Casi dos billones de años de evolución han generado una vasta variedad de organismos eucariotes con aproximadamente 8.7 millones de especies existentes (Mora, 2011). El crecimiento y reproducción de todos estos organismos depende de la fiel duplicación y distribución de sus cromosomas en las células hijas recién formadas en un proceso conocido como el ciclo celular.

El ciclo celular es uno de los procesos biológicos conservados más estudiados, particularmente dada la importancia para el crecimiento y desarrollo de muchos de los organismos. Es una progresión ordenada de eventos moleculares que culminan en la duplicación de los cromosomas y en la segregación de éstos en dos células hijas durante la mitosis y es regulado por cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas (Magyar *et al.*, 2013). El ciclo celular consiste de diversas fases (fig. 4). Las fases S y M son las fases activas y cada una es precedida por fases *gap* o interfases de preparación (conocidas como  $G_1$  y  $G_2$ ). Durante la primera fase ( $G_1$ ) la célula crece y se vuelve más grande, es la primera fase a la que la célula entra posterior a la citocinesis donde la célula ingresa a un nuevo ciclo de división celular y se prepara para la duplicación de su genoma. Al llegar a un tamaño determinado, la célula entra a la siguiente fase (S), en la cual se lleva a cabo la síntesis de DNA (replicación) para duplicar el material hereditario. Durante la siguiente fase ( $G_2$ ) la célula verifica la integridad del genoma duplicado, se prepara para la segregación de los cromosomas y, sólo entonces se lleva a cabo la división celular. Los cromosomas idénticos previamente duplicados son segregados durante la fase M (mitosis) en dos células hijas divididas por citocinesis. Posterior a la división, las células regresan a la fase  $G_1$  completando así el ciclo celular (Vázquez-Ramos, 2003).



**Figura 4. Representación esquemática de los eventos más importantes en el ciclo celular eucariótico**  
(Modificado de Lodish *et al.*, 2006).

Las fases deben llevarse a cabo de manera ordenada y cada una debe completarse antes de que la siguiente fase comience. Para esto, es esencial que las distintas fases del ciclo celular estén coordinadas con precisión (Vázquez-Ramos, 2003).

Además de las variantes en cuanto a cómo se regulan las distintas fases del ciclo celular entre distintas especies, existe también una variedad de programas de ciclo celular dentro de una misma especie, los cuáles son asociados a etapas específicas de desarrollo o con condiciones fisiológicas específicas como los ciclos durante la embriogénesis, los cuales son regularmente rápidos y con una o ambas interfases omitidas, o en tejidos maduros diferenciados, en los que las células entran a un ciclo de endoreduplicación (endociclo) donde la fase S no es seguida por la fase M (mitosis) sino por una fase S adicional de replicación del DNA, generando células poliploides o multinucleadas (Jakoby y Schnittger, 2004).

### 1.3.1. El ciclo celular en plantas

Desde hace algunas décadas, se ha progresado de manera importante en el entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan la proliferación celular, revelando que los mecanismos fundamentales del ciclo de división celular están conservados en todos los eucariotes. A su vez, el estudio de los procesos de desarrollo y la disponibilidad de secuencias de genomas completos, han permitido entender que los mecanismos de formación de patrones han evolucionado de manera independiente en plantas y animales (Meyerowitz, 2002), por lo que se esperaría que el control del ciclo celular difiera entre plantas y otros grupos, no sólo en sus detalles, sino también en los mecanismos por los cuáles la influencia de aspectos ambientales y del desarrollo interactúan con el control del ciclo celular.

En contraste con los animales, el desarrollo de las plantas es principalmente post-embriónico. Nuevos órganos como raíces, tallos, hojas, flores, se originan por divisiones iteradas a lo largo de la vida de la planta seguidas por el crecimiento celular y su diferenciación. Tales divisiones celulares ocurren en zonas especializadas conocidas como meristemos. Las hojas y flores se forman en los meristemos de brotes apicales y florales, respectivamente, mientras que los meristemos de raíz continuamente añaden nuevas células a la raíz en crecimiento. Las células del meristemo son pluripotentes de manera que su progenie puede ser encomendada a diversos fines durante el desarrollo. En principio, el meristemo apical de tallo produce hojas, pero bajo las condiciones ambientales y de desarrollo correctas, se puede convertir en un meristemo floral que producirá flores (Inzé, 2006).

En contraste con los animales, las células de plantas no migran debido a la rigidez de la pared celular que las rodea, por lo que su morfología se establece sólo con la velocidad y orientación de la división celular y la dirección de la elongación de sus células. La pared celular previene la citocinesis por constricción (como en el caso de los animales), por lo que las plantas han desarrollado además, un mecanismo elaborado para generar dos células hijas que involucra dos arreglos en el citoesqueleto únicos definidos como fragmoplasto y la banda de pre-profase (*PPB*, por sus siglas en inglés) (Smith, 2002). Las células de plantas, a

diferencia de las de animales, no desarrollan tumores, excepto en situaciones de respuesta a ciertos patógenos (Doonan y Hunt, 1996).

El estudio del ciclo celular en plantas se ha incrementado exponencialmente durante los últimos años y se ha demostrado que los principios básicos del ciclo celular están conservados. A pesar del hecho de haber diferencias claras entre plantas y animales en la forma en la cual las células están estructuradas y organizadas, el crecimiento, desarrollo y diferenciación, aspectos que pudieron haber producido diferencias importantes en la regulación del ciclo, son muy similares entre ellos así como las proteínas y procesos involucrados en él (Vázquez-Ramos, 2003).

Desde que la secuencia entera del genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentra disponible, se sabe que la totalidad de los genes de ciclo celular es aún más complejo en plantas que en mamíferos. El número de genes de las proteínas reguladoras participantes en el ciclo celular como CDKs, ciclinas, inhibidores de CDKs (KRPs) excede a los encontrados en humanos (Vandepoele *et al.*, 2002) debido a la vida sésil de las plantas. Las plantas no pueden escapar de las condiciones adversas a las cuáles están sujetas y por lo tanto, se adaptan al ajustar sus programas de desarrollo en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales que se presenten y así, el tener un mayor número de genes de ciclo celular permite un ajuste preciso en su desarrollo permitiendo a las plantas además, colonizar diferentes hábitats. Algunas ciclinas han demostrado ser afectadas diferencialmente por reguladores del crecimiento vegetal como las citoquininas, brasinosteroides y azúcares como la sacarosa (De Veylder *et al.*, 1999; Riou-Khamichi *et al.*, 2000). Una explicación alternativa del número reducido de genes de ciclo celular en mamíferos comparado con el de plantas es la frecuente ocurrencia de variantes de splicing en los genes de mamíferos, un proceso que ha sido raramente reportado en plantas.

### **1.3.2. Regulación del ciclo celular en plantas**

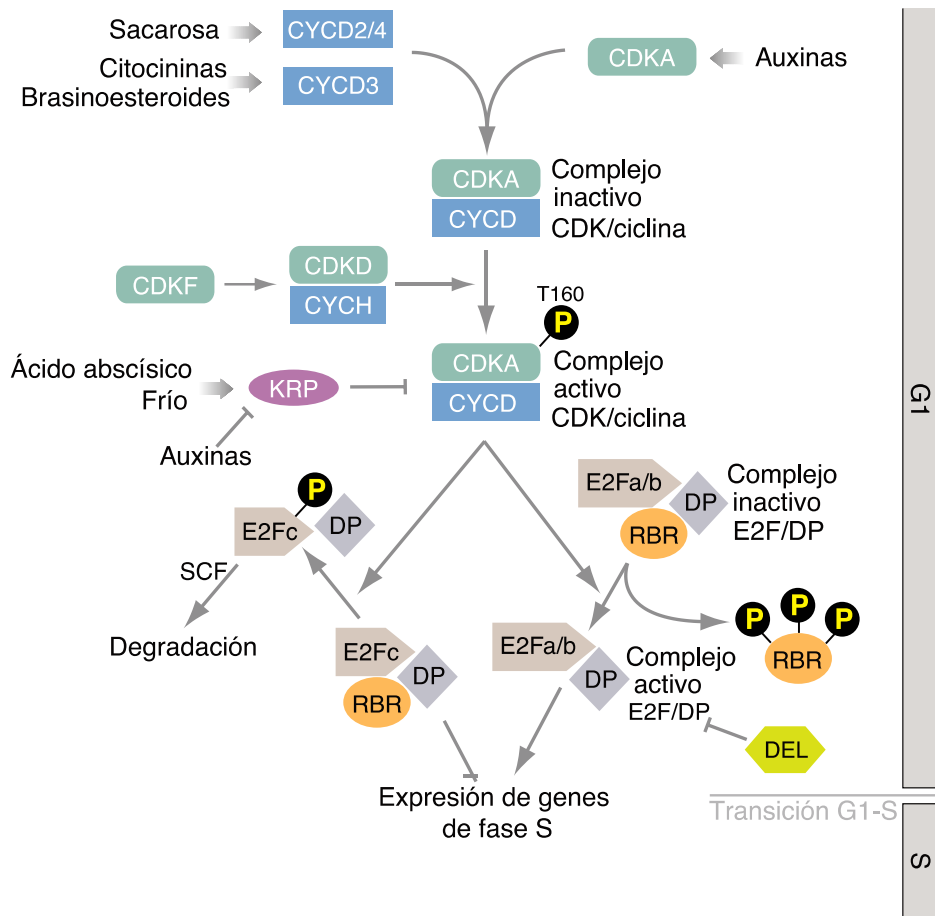
Los genes reguladores del ciclo celular codifican diversas proteínas con funciones en la fase subsecuente del ciclo celular y son regulados por cascadas de fosforilación y

desfosforilación de proteínas. Existen tres restricciones importantes durante el ciclo y ocurren durante las transiciones  $G_1$ -S,  $G_2$ -M y una más durante M (metafase).

En la transición  $G_1$ -S (fig. 5), la presencia de factores de crecimiento como sacarosa, auxinas, citoquininas y brasinosteroides promueve la asociación de las ciclinas D (CYCD) con cinasas dependientes de ciclina tipo A (CDKA) formando el complejo CDKA/CYCD activado mediante fosforilación en T160 por otro complejo ciclina/cdk (CDKD/CYCH). En respuesta a estímulos antimitogénicos como ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés) o bajas temperaturas, las proteínas KRPs (*Kip Related Proteins*) pueden inhibir al complejo CDKA/CYCD activado. El complejo activado CDKA/CYCD puede activar la transición  $G_1$ -S mediante dos vías, activando la destrucción del complejo represor de la transcripción E2F<sub>c</sub>/DP/RBR por la vía del proteasoma (mediante la SCF E3 ubiquitin-ligasa) y, por otro lado, mediante la fosforilación de RBR (*Retinoblastoma Related*) provocando pérdida de afinidad por el factor transcripcional E2F, lo cual desencadena la activación de genes blanco de E2F y permite el avance hacia la fase S (Inzé, 2006), donde ocurre la replicación del DNA (fig. 5).

Durante la fase  $G_2$  (fig. 6) se verifica la integridad del genoma recién duplicado, ciclinas de los tipos A, B y probablemente D (CYCA, CYCB y CYCD) se asocian con CDKs tipo A y B (CDKA y CDKB). Algunas CDKB se encuentran bajo el control transcripcional de la vía E2F enlazando así las transiciones  $G_1$ -S y  $G_2$ -M. Durante ésta última, la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas CDKs puede ser regulada negativamente por otra familia de cinasas llamada WEE, que son activadas por condiciones como la pérdida de integridad del DNA, evitando así la entrada a mitosis hasta que las condiciones sean las adecuadas. Se piensa que una fosfatasa tipo CDC25 remueve los grupos fosfato inhibidores presentes en las CDKs, pero tal tipo de fosfatasa no se ha identificado aún en plantas. Una vez que los complejos CDK/CYC están activos, la célula entra finalmente a la fase M (mitosis) para segregar el material genético en dos células hijas y dividirse. La salida de mitosis requiere la destrucción proteolítica de las subunidades de ciclina iniciada por el complejo promotor de anafase (APC) mediante su asociación con la proteína CCS52 (Inzé, 2006).



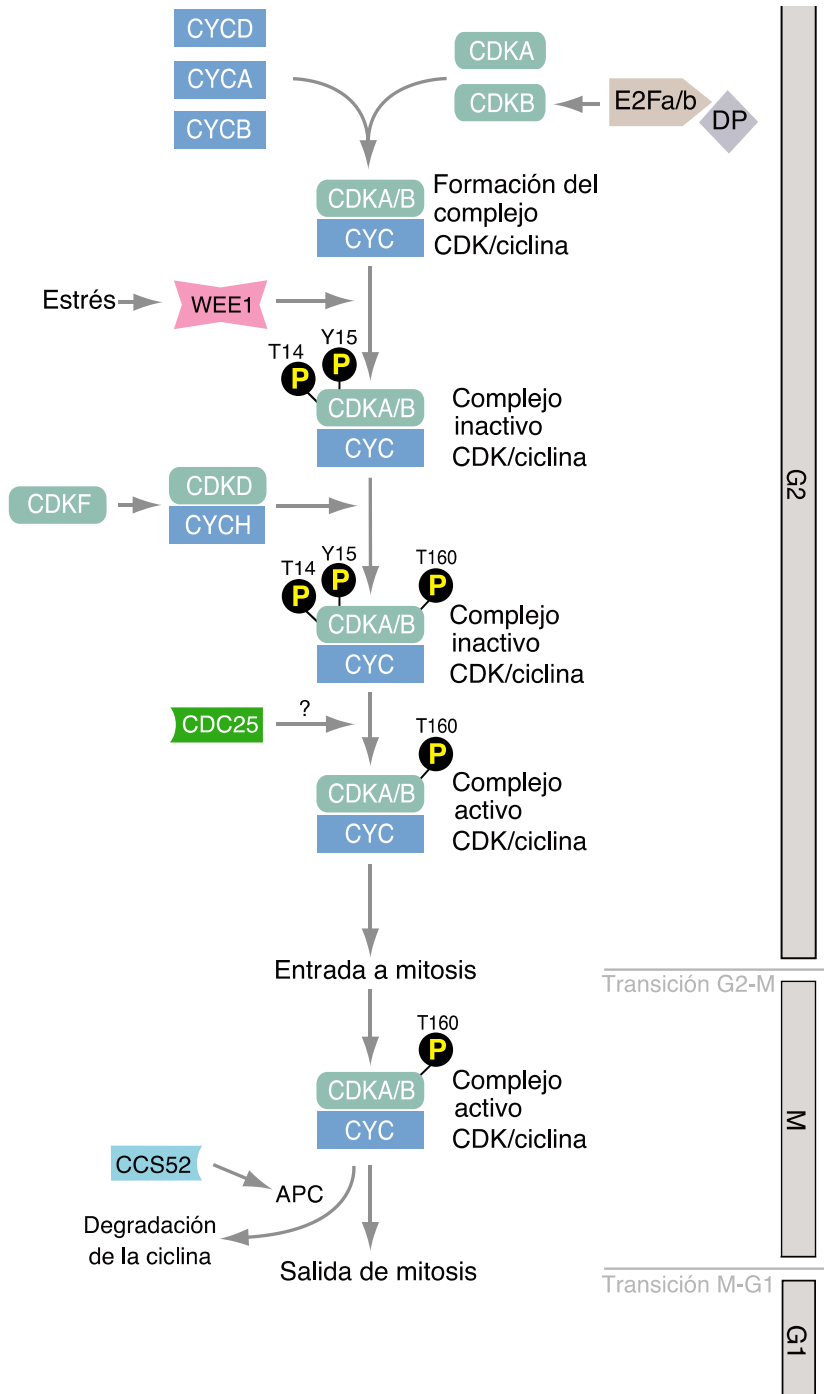


**Figura 5. La transición G<sub>1</sub>-S.** Representación esquemática de la regulación del ciclo celular durante la transición G<sub>1</sub>-S en plantas (Inzé, 2006).

### 1.3.3. La vía E2F/RBR/DP

La transcripción es uno de los niveles de regulación más importantes que controla la disponibilidad de factores celulares específicos cuya acción temporal y espacial coordinada es requerida para distintos procesos como la progresión del ciclo celular. La expresión génica de la transición G<sub>1</sub>-S en células animales está controlada en gran medida por la familia de factores transcripcionales E2F-DP, cuya actividad está regulada por la proteína (supresora de tumores) de retinoblastoma (RB) (Korenjak y Brehm, 2005). Estos factores de transcripción fueron identificados originalmente en estudios con adenovirus humano que reveló que uno de los promotores tempranos del virus es activado por una proteína celular, E2F (factor de unión a promotor de adenovirus E2) (Helin *et al.*, 1992). Más tarde su socio de dimerización, DP, fue identificado (Helin *et al.*, 1993). En plantas, E2F (Ramírez-Parra y Gutierrez, 2000) y DP

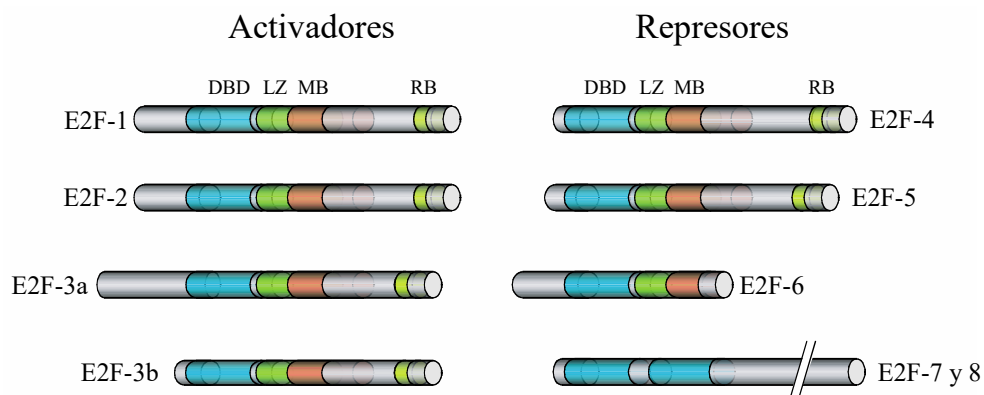
(Magyar *et al.*, 2000) fueron clonados. Además, se habían identificado anteriormente en *Arabidopsis thaliana* tres ciclinas tipo D, que poseen el motivo LxCxE que en humanos está involucrado en su interacción con la proteína RB (Soni *et al.*, 1995), así como en otras especies de plantas (Dahl *et al.*, 1995). También se identificó a otro componente de esta vía, la proteína de retinoblastoma RBR (RB-related) (Grafi *et al.*, 1996) por lo que se reveló que la vía RBR-E2F-DP se encontraba activa en células vegetales (Shen, 2002).



**Figura 6. La transición G<sub>2</sub>-M.**  
Representación esquemática de la regulación del ciclo celular durante la transición G<sub>2</sub>-M en plantas (Inzé, 2006).

### 1.3.4. La familia de factores transcripcionales E2F

Los sitios de unión al DNA de la proteína E2F contienen la secuencia consenso TTT(C/G)(C/G)CGC y está presente en los promotores de genes cuyas funciones son requeridas para la proliferación celular, o bien promueven la progresión ordenada de ciclo celular. Las formas mejor estudiadas de E2F son los complejos heterodiméricos E2F-DP. En mamíferos, la familia E2F se divide en subgrupos de acuerdo a su función (fig. 7). E2Fs 1-2, los E2F “activadores”, son requeridos para la transactivación de genes blanco involucrados en la transición G<sub>1</sub>-S y por lo tanto para la progresión del ciclo celular (Kosugi y Ohashi, 2002b). La pérdida de los E2Fs activadores resulta en un arresto en el avance del ciclo celular (Wu *et al.*, 2001). La sobreexpresión de E2F1, 2 ó 3 en fibroblastos quiescentes de roedores, es suficiente para promover la entrada a fase S (Johnson *et al.*, 1993). El locus *E2F3* codifica dos proteínas, E2F3a y E2F3b que difieren en su patrón de expresión; E2F3a es un activador transcripcional que se expresa durante la fase S, mientras que E2F3b es expresado de manera constante durante el ciclo celular. En contraste, E2Fs 4 y 5 poseen actividad represora, se encuentran en el núcleo durante las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> donde se unen a miembros de la familia de proteínas de retinoblastoma (pRB) (Müller *et al.*, 1997) y su sobreexpresión en fibroblastos privados de suero no induce la entrada a fase S (Lukas *et al.*, 1996), sino que inducen la salida de ciclo celular y la diferenciación (Lindeman *et al.*, 1998). E2F6, 7 y 8 también son considerados represores transcripcionales (Morkel *et al.*, 1997).



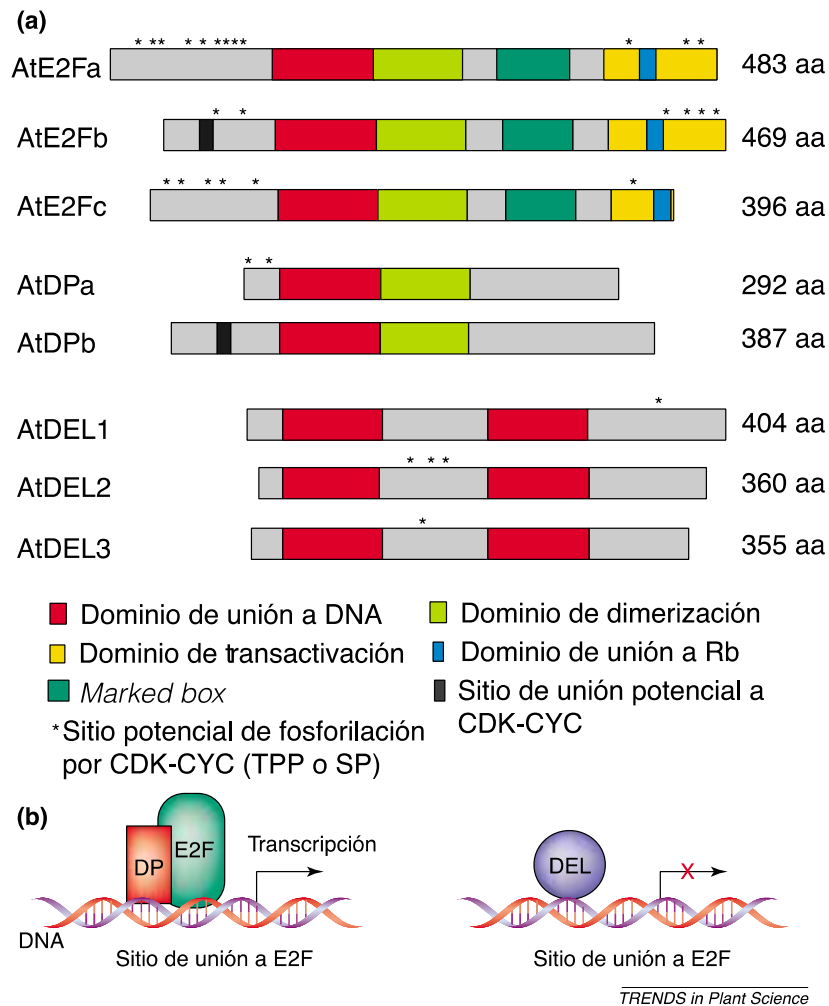
**Figura 7. Estructura de los miembros de la familia E2F en mamíferos.** E2F1-6 contienen un dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio de dimerización con DP que incluye dos motivos conservados, una secuencia repetida de leucinas (LZ) y el *marked box* (MB). E2F7 y E2F8 poseen dos DBD distintos (de Bruin *et al.*, 2003). E2F1-5 tienen un dominio conservado en el extremo carboxilo involucrado en la asociación con miembros de la familia pRB (Modificado de Frolov y Dyson, 2004).

### 1.3.5. E2F en *Arabidopsis thaliana*

Posterior a la identificación inicial en *Arabidopsis* de los genes de E2F (Ramírez-Parra y Gutierrez, 2000; de Jager *et al.*, 2001) y DP (Magyar *et al.*, 2000), se logró identificarlos en otras especies como tabaco (Chabouté *et al.*, 2000), arroz (Kosugi y Ohashi, 2002b) y maíz (Sabelli *et al.*, 2005). Estos estudios revelaron que las plantas contienen un grupo complejo de miembros de la familia E2F-DP, siendo los encontrados en *A. thaliana* (seis E2F y dos DP) los más estudiados. Tres de los factores transcripcionales E2F en *Arabidopsis*, nombrados AtE2Fa, b y c, comparten la misma organización en sus dominios incluyendo los dominios de unión al DNA, de dimerización con DP, de interacción con la proteína RBR y de regulación transcripcional (de Jager *et al.*, 2001) (fig. 8). Estos E2Fs están estructuralmente relacionados con la familia E2F1-5 de humanos. E2Fa y E2Fb poseen propiedades de activadores transcripcionales, mientras que E2Fc posee una naturaleza represora. Las otras tres proteínas E2F identificadas en *Arabidopsis*, E2Fd/DEL2, E2Fe/DEL1 y E2Ff/DEL3 (de Jager *et al.*, 2001) se consideran como E2Fs atípicos ya que contienen el dominio de unión a DNA duplicado y funcionan de manera independiente de la proteína DP. Estas propiedades están conservadas en E2F7 (Bracken *et al.*, 2004) y E2F8 (Christensen *et al.*, 2005), las cuáles fueron identificadas basadas en la información obtenida anteriormente de los genes *E2F* atípicos en *Arabidopsis*. *Arabidopsis* posee dos proteínas DP (DPa y DPb) que también están relacionadas estructuralmente a la proteína DP1 de humano, compartiendo los dominios de unión al DNA y de dimerización (fig. 8). Las proteínas E2F se unen al DNA como heterodímero con las proteínas DP, mientras que las proteínas DEL se unen como monómeros. Las secuencias de DNA reconocidas de manera específica por el dímero E2F-DP y por los monómeros DEL son similares y concuerdan con los sitios de unión a DNA en animales, con la secuencia consenso TTT(C/G)(C/G)CGC. Debido a que las proteínas DEL carecen de dominio de transactivación, son incapaces de activar la transcripción. Su producción inhibe la transcripción mediada por E2F-DP probablemente debido a su ocupación de los sitios de unión a E2F (Kosugi y Ohashi, 2002a).

Los complejos E2F-DP en plantas se unen, *in vitro*, a una secuencia específica de DNA, el sitio de unión a E2F consenso con mayor afinidad que E2F por sí solo (Ramírez-Parra

y Gutierrez, 2000). Además, la co-producción de E2F y DP en plantas incrementa la expresión de un gen reportero conteniendo en su promotor un sitio de unión a E2F (Kosugui y Ohashi, 2002c).



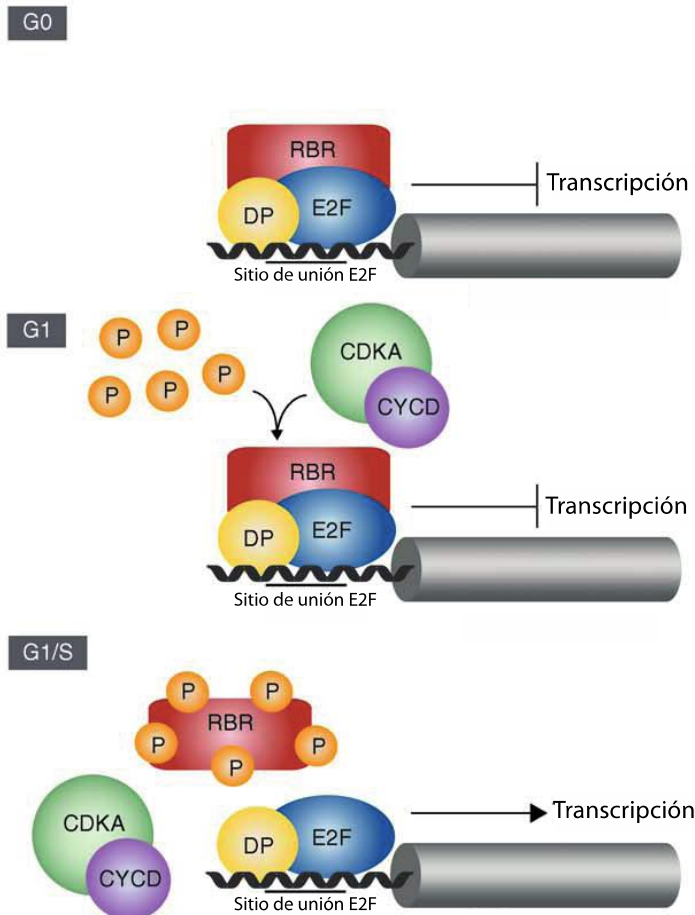
**Figura 8. Organización estructural y propiedades de unión al DNA de la familia de factores transcripcionales E2F.** a) Dominios presentes en la familia de factores transcripcionales E2F, b) Las proteínas E2F se unen al DNA como heterodímeros E2F-DP mientras que las proteínas DEL se unen como monómeros y ya que carecen del dominio de transactivación, son incapaces de activar la transcripción (Modificado de Shen, 2002).

### 1.3.6. La vía E2F-DP-RBR y la transición G1-S en plantas

Diversos aspectos de la regulación del ciclo celular por pRb/E2F en mamíferos están conservados en otros animales y en plantas también. Mientras que las plantas no poseen los

ortólogos de Cdk4 y Cdk6 de mamíferos (Inzé, 2006), poseen cinasas dependientes de ciclinas, CDKA, que pueden fosforilar a RBR. Las ciclinas D están conservadas en plantas (Oakenfull *et al.*, 2002) y su expresión está asociada con la proliferación celular y poseen respuesta a señales mitogénicas como sacarosa o citoquininas (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Se describieron en *Arabidopsis thaliana* ciclinas tipo D que poseen un motivo LxCxE similar al encontrado en humano, y que participa en la unión con la proteína de retinoblastoma RBR (Dahl *et al.*, 1995). Una vez identificados estos componentes en plantas, se pudo colocar a las CYCs D río arriba de la vía RBR/E2F/DP en el control de la transición G<sub>1</sub>-S.

Los programas de expresión génica específica son objetivos clave para la regulación del ciclo celular. A medida que las células avanzan a través de las fases G<sub>1</sub> y S, secuencialmente regulan positivamente genes involucrados en la activación de orígenes de replicación, síntesis de ciclinas específicas de la transición G<sub>1</sub>/S (CYCs), CDKs y síntesis de DNA (Sabelli, 2005).



**Figura 9. Modelo para la regulación transcripcional mediada por E2F durante la transición G<sub>1</sub>-S.** La formación de los complejos E2F-DP-RB es regulada durante el ciclo celular y la disociación de RB permite la activación de los genes regulados por el heterodímero de factores transcripcionales E2F-DP y la entrada a la fase S (Modificado de de Veylder, 2009). La flecha indica activación mientras que las flechas truncas inhibición.

Durante  $G_0$  en plantas, los genes de fase S, blancos de E2F, no son transcritos por el efecto inhibitorio de la proteína RBR sobre el complejo E2F/DP. Cuando las células entran al ciclo celular, las CYCD se transcriben y forman complejos con CDKA que fosforilan a RBR liberando al complejo E2F/DP activando entonces la transcripción de genes necesarios para la fase S de síntesis de DNA (fig. 9) (de Veylder y Berckmans, 2009). De esta manera, genes canónicos de inicio y avance de la replicación podrían ser inhibidos indirectamente por RBR a través de E2F/DP como la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa (RNR), la proteína de replicación A (RPA), componentes del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM), antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA1) que se sabe contienen sitios de unión de E2F en sus promotores y además se expresan en tejidos de plántula de maíz (Sánchez-Camargo, datos no publicados).

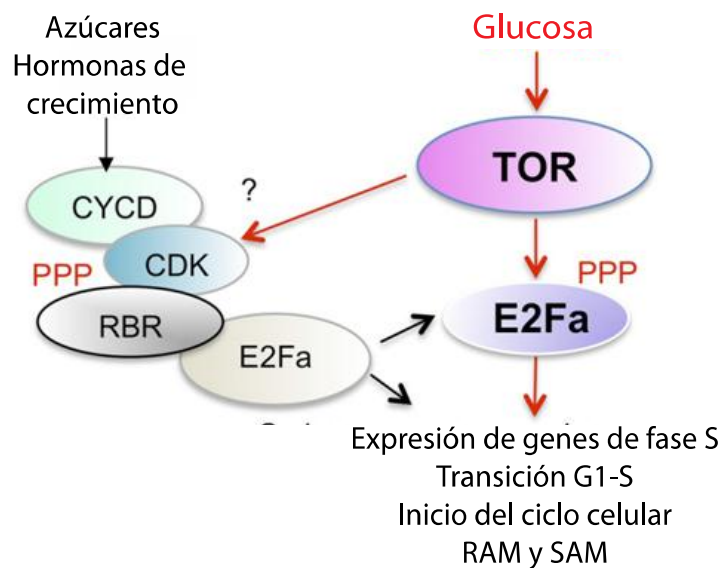
### **1.3.7. Influencia de los azúcares en el control del ciclo celular en plantas**

Como en todos los organismos, las plantas requieren de energía para su crecimiento. Los azúcares son utilizados como sustratos para el crecimiento o almacenados como reservas por lo que la regulación del metabolismo de carbohidratos puede tener efectos importantes en el desarrollo de las plantas, particularmente durante la división y la elongación celular.

Los efectos de los niveles de azúcares solubles en el crecimiento y desarrollo de las plantas son diversos. En cotiledones de *Vicia faba*, las regiones menos diferenciadas poseen niveles más altos de glucosa y su gradiente correlaciona espacialmente con la actividad mitótica (Borisjuk *et al.*, 1998); al adicionar sacarosa a los cotiledones en desarrollo en lugar de glucosa, se interrumpe la etapa meristemática e inicia la diferenciación y la maduración (Wang y Hedley, 1993; Weber *et al.*, 1996). Durante la embriogénesis en *Arabidopsis*, la glucosa promueve la división celular y la sacarosa la expansión de las células de reserva mientras que durante la germinación, la glucosa retarda la tasa de germinación de las semillas. El desarrollo de las plántulas también se ve afectado por azúcares, a altas concentraciones de glucosa y sacarosa, la elongación del hipocotilo es inhibida así como la formación de hojas. La sacarosa exógena además permite a *Arabidopsis* florecer en oscuridad (Gibson, 2005). Consistentemente, la expresión de ciclinas tipo D (CYCD2 y CYCD3),

involucradas en la transición G<sub>1</sub>-S del ciclo celular, son inducidas en plántulas de Arabidopsis por azúcares en cultivos celulares, promoviendo así el avance del ciclo celular (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000).

Se sabe que las CYCB1 promueven la transición G<sub>2</sub>-M del ciclo celular (Nieuwland *et al.*, 2007). Durante la germinación de maíz, se observó que los niveles de la proteína ZmCycB1;2 aumentan a tiempos tempranos en presencia de glucosa y sacarosa. En presencia de sacarosa incrementó a las 12 h y con glucosa se observó un pico a las 6 h post imbibición. Ante estos resultados y sabiendo que anteriormente se reportó que en ejes embrionarios de maíz la fase S comienza hacia las 15 h post imbibición (Sánchez *et al.*, 2005), sería poco probable que la presencia de glucosa acelere el ciclo celular de tal forma que se presente la transición G<sub>2</sub>-M cerca de las 6 h sin embargo, los resultados sugieren que la presencia de sacarosa y glucosa en el medio de imbibición afecta la abundancia de la proteína en otra fase del ciclo celular no característico de CYCB1 realizando posiblemente otra función (García-Ayala, tesis de licenciatura 2015).



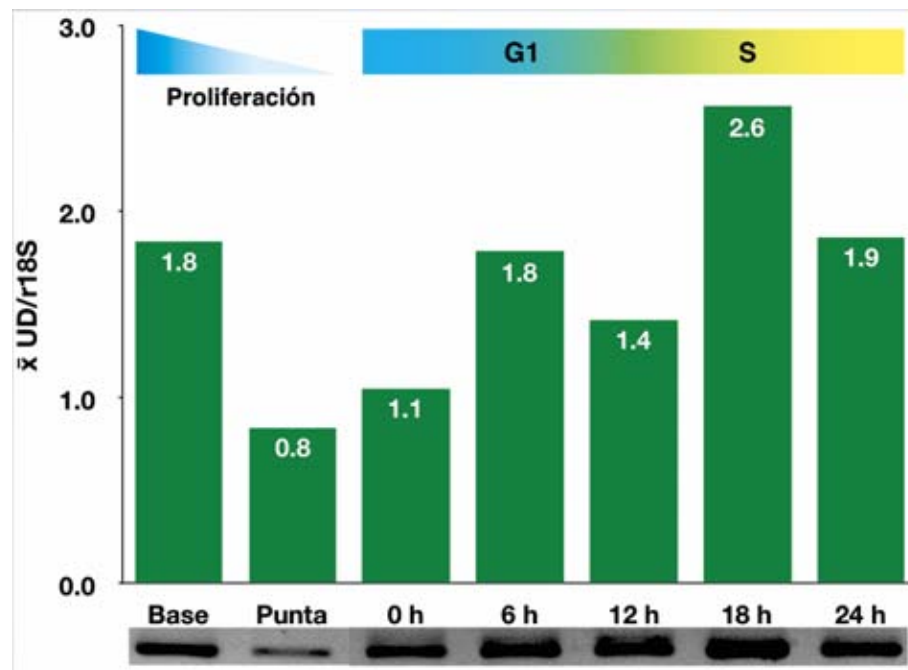
**Figura 10. Modelo de la red de transcripción mediada por la vía TOR-Glucosa en Arabidopsis.** La fosforilación de E2Fa por la vía de señalización TOR-Glucosa promueve la entrada a fase S del ciclo celular, en consecuencia, E2Fa es activado por una vía distinta o río debajo de la vía CYC-CDK-RBR convencional y activa la entrada al ciclo celular en la mayoría de las células en el meristemo de raíz excepto las localizadas en el centro quiescente (modificado de Xiong y Sheen, 2014).



Recientemente, se encontró que la proteína TOR1 (TARGET-OF-RAPAMYCIN1) funciona río arriba o en paralelo con la vía E2F-RBR1 en la estimulación de la entrada a ciclo celular (Xiong y Sheen, 2013). TOR1 es una cinasa altamente conservada que integra la disponibilidad de nutrimentos con la inducción transcripcional de genes involucrados en la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, biogénesis ribosomal y la síntesis de proteínas (Xiong *et al.*, 2013; Urban *et al.*, 2007; Laplante *et al.*, 2012; Robaglia *et al.*, 2012). En plantas, la presencia de glucosa desencadena la proliferación celular en los meristemas de raíz, lo cual depende de la energía producida en la mitocondria y de la actividad de la cinasa TOR1 ya que las plantas con mitocondrias bloqueadas o deficientes en *TOR1* son incapaces de llevar a cabo la entrada a ciclo celular. En respuesta a la producción de glucosa, TOR1 fosforila el extremo amino de E2FA, resultando en su activación y la entrada a la fase S en los meristemas quiescentes de raíz (fig. 10) (Xiong *et al.*, 2013).

## 2. Antecedentes

En nuestro laboratorio, dedicado al estudio del ciclo celular durante la germinación de maíz, se caracterizó previamente la familia de factores transcripcionales E2F, sus niveles de expresión a distintos tiempos durante de la germinación de semillas de maíz, así como en distintos tejidos proliferativos y diferenciados como base y punta de hoja, respectivamente. Sólo se lograron detectar 4 de los 5 genes correspondientes a los E2Fs de maíz expresados, cuyos niveles de expresión fueron diferenciales, sugiriendo que sus funciones no son redundantes durante la progresión del ciclo celular. El nivel del RNAm de *ZmE2FA/B1;1* fue más abundante en tejidos proliferativos, como base de hoja y punta de raíz y durante la germinación de semillas de maíz mostró un patrón de acumulación con un pico máximo a las 18 h post-imbibición (fig. 11; Sánchez-Camargo, datos no publicados). Este patrón es similar al observado para la actividad de la DNAPol- $\delta$  de maíz (García *et al.*, 2006), y coincide con el tiempo en que las células meristemáticas del eje embrionario han entrado a la fase S del ciclo celular (Baíza *et al.*, 1989).



**Figura 11. Expresión de RNA<sub>m</sub> de E2FA/B1;1 de maíz.** Se observa un incremento en la expresión en tejidos proliferativos (base de hoja) y un pico de expresión a las 18 h post-imbibición donde la mayoría de las células se encuentran en la fase S del ciclo celular (Sánchez-Camargo, datos no publicados).

También como antecedente de las investigaciones del ciclo celular durante la germinación de semillas de maíz que se realizan en nuestro laboratorio, se encontró que existe una disminución en el tamaño de las células meristemáticas (regiones de alta proliferación) y aumento en el número de las mismas por unidad de área en ejes embebidos desde 12 hasta 48 h en medio enriquecido con glucosa, de igual manera con sacarosa pero en menor grado comparado con el grupo control sugiriendo que la glucosa y la sacarosa promueven un aumento en la tasa de proliferación celular, pero las células no tienen suficiente tiempo para crecer antes de la siguiente división celular. Además, en presencia de estos azúcares en el medio de imbibición, incrementó la síntesis *de novo* de DNA hacia las 24 h (García-Ayala, tesis de licenciatura 2015).

### 3. Justificación

Durante la germinación, como consecuencia de la entrada de agua a la semilla, las células en sus tejidos se elongan y se dividen. La división celular es un proceso biológico conservado esencial para el desarrollo y crecimiento de los organismos por lo que es de importancia fundamental conocer su regulación y a las proteínas involucradas en los puntos de control que permiten o detienen su avance.

En nuestro laboratorio estamos interesados en dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la transición G<sub>1</sub>-S durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Se han descrito ya otros miembros de la transición G<sub>1</sub>-S como las CDKs (tipo A y B), las ciclinas tipo D y las proteínas inhibitorias KRP, sin embargo, se sabe poco de la vía E2F/DP/RBR de maíz. Se conocen los niveles de expresión diferenciales de los genes de la familia E2F, *ZmE2FA/B1;1* fue más abundante en tejidos proliferativos y como se mencionó anteriormente, mostró un patrón de acumulación con un pico máximo a las 18 h post-imbibición similar al observado para la actividad de la DNAPol- $\delta$  de maíz, y que además coincide con el tiempo en que la mayoría de las células meristemáticas del eje embrionario ha entrado a fase S del ciclo celular. Sin embargo, los patrones de expresión de un gen no necesariamente reflejan su comportamiento a nivel proteico, por lo que es importante conocer los niveles de la proteína *ZmE2FA/B1;1* como un acercamiento a la posible o posibles funciones que esta proteína tiene durante la germinación y el ciclo celular en maíz. Además, los carbohidratos solubles como la glucosa y la sacarosa aumentan la tasa de proliferación y la síntesis de DNA hacia las 24 h, por lo que la presencia de los mismos en el medio de imbibición, podría modificar los patrones de abundancia proteica de *ZmE2FA/B1;1* al acelerarse el ciclo celular y por lo tanto, la transición G<sub>1</sub>-S.

#### **4. Hipótesis**

La proteína E2FA/B1;1 estará presente durante la germinación de semillas de maíz y sus niveles serán variables en presencia y ausencia de sacarosa y glucosa.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar los patrones de acumulación de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación en presencia y ausencia de sacarosa y glucosa.

##### **5.2. Objetivos particulares**

a) Generar anticuerpos policlonales específicos que permitan identificar a la proteína E2FA/B1;1 de maíz.

b) Determinar el patrón de acumulación de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz y en presencia de sacarosa y glucosa.

## **6. Materiales y metodología**

### **6.1. Material Biológico**

#### **6.1.1. Semillas de maíz**

Para determinar los niveles de proteína durante la germinación de semillas de maíz variedad Chalqueño, se extrajeron los ejes embrionarios de diez semillas (cosecha febrero 2013) lo más homogéneas en apariencia posible para embeberlas por 0, 6, 12, 18 y 24 h en oscuridad a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , previa desinfección con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min en agitación manual constante y con agua desionizada. Una vez eliminado el olor a hipoclorito, se enjuagaron durante 5 min en una solución Sin-Bac® (bromoclorodimetil hidantoína) al 5% en agua desionizada durante 5 min en agitación manual constante. Posteriormente lotes de 10 semillas se colocaron en toallas de papel, se enrollaron y se humedecieron con la misma solución. Se colocaron en una vaso de precipitados de 1 L y se le añadieron 250 mL de agua desionizada manteniendo constante este nivel durante el periodo de incubación.

#### **6.1.2. Cepas**

Se utilizó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) para la obtención de plásmidos de mantenimiento que además de permitir el cribaje azul/blanco, posee las mutaciones *recA1* y *endA1* que aumentan la estabilidad de los insertos y mejoran la calidad del DNA plasmídico preparado a partir de minipreparaciones. Además, se utilizó a *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL (Stratagene) para la expresión de la proteína recombinante; esta cepa contiene copias adicionales de los genes *argU*, *ileY* y *leuW* que codifican los RNAt que reconocen los codones que corresponden a arginina (AGA y AGG). leucina (AUA) y leucina (CUA) que frecuentemente son limitantes para la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli*. Además,

#### **6.1.3. Conejos**

Para la generación de anticuerpos específicos anti-E2FA/B1;1 se inmunizaron conejos hembra cepa Nueva Zelanda.

#### **6.1.4. Plásmidos**

Los plásmidos utilizados para la clonación del fragmento de DNA que codifica el péptido inmunogénico fueron pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) para generar la clona de entrada para el Gateway® System (Invitrogen) y el vector Gateway® pDEST™ 15 (Invitrogen) como vector de expresión. Este último posee un promotor inducible por IPTG que permite expresar una proteína de fusión con GST (Glutación S-transferasa) en el extremo amino.

#### **6.1.5. Cultivos bacterianos**

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio de cultivo LB (Sigma-Aldrich) con antibióticos a 37°C en agitación constante, con excepción de los cultivos líquidos que se utilizaron para la preparación de células competentes donde se utilizó medio LB sin antibiótico. Los cultivos sólidos se realizaron en cajas Petri utilizando Agar LB (Sigma-Aldrich).

### **6.2. Obtención de anticuerpos anti-E2FA/B1;1**

#### **6.2.1. Análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína E2FA/B1;1 de maíz**

Se obtuvieron las secuencias de las proteínas completas de la familia de factores transcripcionales E2F de la base de datos del genoma de maíz (MaizeSequence Release 5b.60) y se tomaron en cuenta las variantes de *splicing* que tuvieran el transcrito más largo. La funcionalidad de los genes de las secuencias codificantes obtenidas fue revisada en la base de datos de ESTs (Expressed Sequence Tags) disponible en el sitio web de NCBI utilizando la herramienta BLASTN, obteniendo así secuencias de clonas provenientes de experimentos realizados por otros autores. Se predijeron las regiones inmunogénicas utilizando el programa EMBOSS: Antigenic (versión 6.6.0.0, Kolaskar y Tongaonkar, 1990) a

partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína completa E2FA/B1;1 previamente revisada. Posteriormente se analizó la secuencia de aminoácidos en el programa NetSurfP ver. 1.1 - Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions (Petersen, 2009) el cual predice la accesibilidad superficial relativa de los residuos de la proteína y su estructura secundaria con un valor de confiabilidad denominado *Z-score* relacionado a la predicción de la superficie. Para comparar la secuencia de todas las proteínas de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz y elegir un péptido inmunogénico que fuera único para E2FA/B1;1, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas y revisadas de la base de datos utilizando el programa Geneious Pro versión 4.8.4 (Drummond *et al.*, 2014).

### **6.2.2. Amplificación de la región inmunogénica de E2FA/B1;1 de maíz por PCR**

A partir de la región inmunogénica única elegida, se diseñaron cebadores específicos para PCR que permitieran amplificarla utilizando el *software* Amplifx (Versión 1.6.2) (tabla 2), además se adicionaron las bases CACC al extremo 5' del cebador FW necesarias para la clonación del péptido en el vector pENTR™/D-TOPO® (metodología descrita en 6.2.3.). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 100 ng de templado, cebadores 0.3 mM, 5 µL de la enzima iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad), se llevó a un volumen final de 15 µL y se utilizaron las temperaturas de alineamiento del par de cebadores predichas por el *software* Amplifx con 35 ciclos de amplificación (tabla 3). Como templado se utilizó una construcción en el vector de expresión Profinity eXact pPAL7 (Bio-Rad) que ya contenía a E2FA/B1;1 de maíz completa clonada previamente (Sánchez-Camargo, datos no publicados). Para la corroboración de los productos de PCR obtenidos, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TAE 1X (Tris 50 mM, acetato de sodio 1 mM, EDTA 2mM pH 8.5), teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Se cargaron 3 µL de los productos de PCR con 2 µL de buffer de carga 6x para DNA (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30%) y se separó durante 25 min a 80 V en buffer TAE 1X utilizando 6 µL de GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) como referencia. El gel fue observado bajo luz UV con ayuda de un transiluminador.



**Tabla 2. Cebadores diseñados para amplificar y ligar al vector de expresión el fragmento de E2FA/B1;1 de maíz.**

<b>Factor Transcripcional</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>		<b>Fragmento (pb)</b>
E2FA/B1;1	FW RW	CAC CAT GTC GGG GGT CGG CAG C TTA CCG TAT GAC CAG CCC CTC CT	232

**Tabla 3. Condiciones de amplificación del péptido de E2FA/B1;1 de maíz por PCR.**

<b>Reacción</b>	<b>Condiciones</b>
PCR (iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase Kit (Bio-Rad))	30 s a 98°C // 35 ciclos (5 s a 98°C, 20 s a 61 °C, 20 s a 72°C) // 5 min a 72 °C

### **6.2.3. Clonación del péptido inmunogénico de EFA/B1;1 de maíz en el vector de expresión**

Se prepararon células competentes inoculando células *E. coli* DH5α en 3.0 mL de medio Luria-Bertani y se incubaron por 12 h a 37°C con agitación constante. De este cultivo se tomaron 0.3 mL para inocular 50 mL de medio LB contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se incubó 3 h a 37°C. Pasadas las 3 h, el cultivo se trasvasó a tubos falcon y se colocaron en hielo durante 15 min para posteriormente sedimentar las células a 6,000 x g durante 10 min. Las células se lavaron con 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M mediante agitación muy suave y se volvieron a colocar en hielo durante 20 min. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 6,000 x g 10 min y las células obtenidas se resuspendieron en 1.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M / glicerol 15% para finalmente repartir el volumen final en alícuotas de 100 µL en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad y almacenarlas a -70°C.

El fragmento de DNA que codifica el péptido inmunogénico fue clonado en el vector pENTR™/D-TOPO® que genera la clona de entrada para el Gateway® System y en el vector Gateway® pDEST™ 15 como vector de expresión al llevar a cabo la reacción LR siguiendo las instrucciones del fabricante. En general, la tecnología Gateway® está basada en las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago lambda que facilita la integración de lambda en el cromosoma de *E. coli* y el cambio entre las vías lítica y lisogénica

(Ptashne, 1992). El vector pENTR™/D-TOPO® contiene sitios *attL1* y *attL2* y pDEST™ 15 *attR1* y *attR2* que permiten llevar a cabo la reacción de recombinación LR y así clonar el gen de interés en el vector destino para producir la clona de expresión. Se llevó a cabo la reacción que genera la clona de entrada utilizando 20 ng del vector pENTR™/D-TOPO®, 100 ng del producto de PCR obtenido en 6.2.2., 1 µL de solución salina (NaCl 1.2 M, MgCl<sub>2</sub> 0.06M) y se llevó a un volumen final de 6 µL. La reacción se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se agregó 1 µL del plásmido resultante a las células transformantes *E. coli* DH5α y se incubaron 30 min en hielo. Finalizada la incubación se dio un choque térmico de 30 s a 42°C, seguido de una incubación de 5 min en hielo tras la cual se adicionó 1 mL de medio LB sin antibióticos y se incubó en agitación una hora a 37°C; 300 µL fueron sembrados en una caja con antibióticos y se incubaron 12 h a 37°C. Las células transformadas con el vector pENTR™/D-TOPO® conteniendo al inserto fueron seleccionadas con kanamicina. De ellas se extrajo y se purificó plásmido utilizando el Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo reserach) para verificar por PCR que el plásmido contuviera el inserto en la longitud esperada siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se envió a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM para validar que el plásmido contuviera el péptido inmunogénico perteneciente a la proteína E2FA/B1;1 de maíz utilizando los cebadores M13 para su secuenciación ya que el vector pENTR™/D-TOPO® contiene estos sitios, permitiendo de esta manera la secuenciación del inserto. Los resultados de la secuenciación se tradujeron en marco de lectura y se alinearon con la secuencia de nucleótidos teórica utilizando el programa computacional Geneious Pro, versión 4.8.4. Para llevar a cabo la reacción de recombinación se agregaron 200 ng del plásmido pENTR™/D-TOPO® que contiene el péptido inmunogénico y 300 ng de pDEST™ 15 como vector de expresión destino en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se adicionó amortiguador de reacción LR Clonasa™ y se llevó a un volumen de 16 µL con amortiguador TE (Tris-HCl 10mM, pH 8.0, EDTA 1mM), se homogeneizó y se incubó a 25°C por una hora. Para detener la reacción, se incubó la reacción con 2 µL de proteinasa K durante 10 min a 37°C. Posteriormente se transformaron células *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL con el producto de reacción siguiendo la metodología mencionada anteriormente sólo que las células transformadas fueron seleccionadas con ampicilina y cloranfenicol.

#### **6.2.4. Expresión y purificación del péptido inmunogénico recombinante de E2FA/B1;1 de maíz**

Se inocularon células *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL con el vector Gateway® pDEST™ 15 que contenía el fragmento de DNA que codifica el péptido inmunogénico de la proteína ZmE2FA/B1;1 (sección 6.2.3.) en 5.0 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). El cultivo fue incubado durante 12 h a 37°C y en agitación constante. De él, se tomaron 2.5 mL y se inocularon 250.0 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL) en un matraz Erlenmeyer y se incubó a 37°C en agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 - 0.9 leída a 600 nm de longitud de onda. La expresión del péptido recombinante se indujo adicionando IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM incubando durante 3 h a 37°C en agitación. El cultivo inducido se centrifugó a 6,000 x g por 15 min a 4°C. Las células empastilladas se resuspendieron en 10.0 mL de PBS-Tritón 1% (pH 7.4) en hielo y se adicionaron 100 µL de cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete Mini libre de EDTA (Roche), DTT 1mM y PMSF 10mM. Las células se lisaron por sonicación a pulsos de 20 s encendido por 20 s apagado 5 veces. Los lisados se centrifugaron a 12,000 rpm por 20 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante obtenido a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45 µm. Ya que el péptido recombinante expresa en el extremo amino la proteína GST, el filtrado se hizo pasar por una resina de glutatión-agarosa (SIGMA-Aldrich) previamente equilibrada con PBS 1x para separar al péptido recombinante por cromatografía de afinidad. La resina unida al péptido inmunogénico se lavó con PBS-tritón 2% y PBS-tritón 1%. Posteriormente se eluyó al péptido con 3 mL de una disolución de glutatión reducido 10mM en Tris-HCl 50 mM pH 9.5 a 4°C y la resina fue regenerada y almacenada de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las fracciones resultantes en cada paso de la purificación se monitorearon por electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-glicina desnaturizante al 10% (SDS-PAGE), el gel se preparó como se indica en Sambrook y Fritsch, 1989 y se corrió a 85 volts hasta que el frente de corrida pasara por el gel concentrador, luego a 100 volts durante el corrimiento en el gel separador. El amortiguador de electrodos utilizado fue de Tris-glicina-SDS 1x (Sambrook y Fritsch 1989). Las muestras se cuantificaron por el método de Bradford, se tomaron 50 µg y se prepararon añadiendo buffer de carga 1x (SDS 2%, β-mercaptoetanol 2

mM, glicerol 4%, Tris-HCl 40 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.01%) y calentando a 92°C por 10 min.

#### 6.2.5. Cuantificación del péptido inmunogénico purificado por el método de Bradford

En una placa de ELISA, se realizó una curva patrón utilizando cantidades crecientes de albúmina sérica bovina (BSA) y adicionando 200 µL de reactivo de Bradford. De las eluciones que se obtuvieron del péptido inmunogénico purificado se utilizaron 3 µL, se llevaron a 10 µL con agua y se adicionaron 200 µL de reactivo de Bradford (Bradford, 1973). Las soluciones se cuantificaron por duplicado a 595 nm de longitud de onda en el lector de placas de Elisa Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System (Biotek) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 6.2.6. Obtención de anticuerpos anti-E2FA/B1;1 de maíz en conejos

La inmunización de conejos se realizó en el bioterio de la Facultad de Química de la UNAM. Se tomó una muestra de suero preinmune y, al finalizar el esquema de inmunización (tabla 4), se obtuvo la sangre de conejo por punción cardiaca en tubos Vacutainer® SST™ (BD) y se separó el suero del paquete celular para lo cual se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm en el rotor SL-50T (Sorvall) por 2 min.

**Tabla 4. Esquema de inmunización.**

<b>Día</b>	<b>µg de recombinante administrada</b>	<b>Vía de administración</b>
1	100	Poplítea
3	100	Poplítea
8	400	Subcutánea
10	100	Poplítea
15	100	Poplítea
17	800	Intraperitoneal
25	Sangría de cosecha	Punción cardiaca

### **6.3. Obtención de extractos proteicos totales de semillas de maíz a diferentes tiempos de germinación y en presencia y ausencia de sacarosa y glucosa**

Se germinaron 10 semillas de maíz durante 0, 6, 12, 18 y 24 h bajo las condiciones mencionadas en 6.1.1. por triplicado. De ellas se extrajeron los ejes embrionarios con ayuda de un escalpelo y se colocaron en un mortero donde se homogeneizaron con amortiguador de extracción de proteínas (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 25 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM pH 8.0, NaCl 250 mM, Tritón x-100 0.2% y en fresco DTT 1.0 mM, NaF 1mM, Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, glicerol 30%, 1 tableta de *cocktail* de inhibidores de proteasas cOmplete Mini libre de EDTA (Roche), β-glicerofosfato 60 mM). Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford. Para la obtención de extractos proteicos totales en presencia y ausencia de sacarosa y glucosa, se extrajeron por triplicado ejes embrionarios de semilla seca con el uso de bisturí, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% y se lavaron tres veces con agua desionizada estéril. Los ejes se secaron por 10 min en papel absorbente estéril y se colocaron en cajas Petri de vidrio, estériles o desechables, con papel filtro Whatman estéril y se agregó solución amortiguadora de imbibición con sacarosa o glucosa al 120 mM para embeber a los ejes embrionarios y sin azúcares para los ejes control. Las cajas se incubaron a 25°C en obscuridad durante 0, 6, 12, 18 o 24 h. Este material biológico fue utilizado para obtener extractos proteicos totales de igual manera que se describió anteriormente para los análisis subsecuentes.

### **6.4. Caracterización de los anticuerpos obtenidos anti-E2FA/B1;1 de maíz mediante ensayos de competencia**

Se incubaron durante 12 h cantidades crecientes del péptido inmunogénico (0, 5, 20, 40 y 60 µg) y 60 µg de BSA como control negativo con suero inmune 1:1000 en PBS 1x adicionado con NaCl 0.5mM y Tween 20 0.9%. Se corrieron 50 µg de extracto total de ejes embrionarios (sección, 6.3.) de semillas germinadas durante 18 h en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sección 6.2.4.) y se transfirieron por Western Blot a una membrana PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Milipore) mediante transferencia húmeda en una cámara

Mini-Trans-Blot® (Bio-rad) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La membrana se bloqueó posteriormente en suero bovino fetal (Biowest) al 30% durante 1.5 h en agitación y se cortó en 6 fragmentos para separar los carriles que contienen cantidades iguales de extracto total. Cada fragmento de membrana se incubó con el anticuerpo primario previamente incubado con cantidades crecientes del péptido recombinante o BSA diluido en PBS 1x (Sambrook y Fritsch, 1989) adicionado con NaCl 0.5 mM y Tween 20 (Thermo Scientific) 0.9% durante 12 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se hicieron tres lavados de 10 minutos con PBS1x-NaCl-Tween 20, y se incubaron con anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación diluido 1:35,000. Posteriormente, los fragmentos se lavaron 3 veces con PBS1x-NaCl-Tween 20 por 15 minutos para finalmente incubarlos con 0.5 mL de la solución de detección por quimioluminiscencia Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). El revelado se realizó en el equipo ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad).

#### **6.5. Detección de la abundancia de ZmE2FA/B1;1 durante la germinación de semillas de maíz**

Se separaron 50 µg de los extractos proteicos obtenidos en 6.3. por SDS-PAGE (descrito en la sección 6.2.4.) y se realizó Western Blot descrito en 6.3.2. pero sin cortar las membranas PVDF y utilizando como anticuerpo primario el anti E2FA/B1;1 diluido 1;1000. Se utilizó el equipo ChemiDoc™ MP System para el revelado de las membranas PVDF utilizando las soluciones Pierce™ ECL Western Blotting Substrate. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa computacional Image Lab™ (Bio-Rad) para determinar los niveles de la proteína ZmE2FA/B1;1 a los distintos tiempos de germinación y con los tratamientos con azúcares. Se utilizó 0 h como referencia y los datos obtenidos se ajustaron con el control de carga para cada muestra utilizando las imágenes de las mismas membranas PVDF reveladas anteriormente teñidas con rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0.1% en 5% ácido acético glacial) durante 5 min y lavadas por 2 min con ácido acético 5% para retirar el exceso de colorante.

## 6.6. Análisis estadístico

Para determinar si existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos de las densitometrías tanto en los cambios en el nivel de proteína a lo largo de los tiempos de germinación elegidos en presencia o ausencia de sacarosa y glucosa, se realizó ANOVA de una vía con ayuda del programa SigmaPlot 12.5. con alfa de 5% y se realizó la prueba de Tuckey post-hoc. Se consideró un valor de  $P < 0.01$  como estadísticamente significativo.

## **7. Resultados**

### **7.1. Obtención de anticuerpos policlonales anti-E2FA/B1;1**

Se eligió para esto una región de la proteína E2FA/B1;1 que fuera potencialmente inmunogénica y que además fuera una región diferencial (que no estuviera conservada) entre los demás miembros de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz, para después inducir su expresión como proteína fusionada a GST en el extremo amino y posterior a su purificación y cuantificación, inmunizar a los conejos siguiendo el esquema de inmunización establecido previamente (tabla 4).

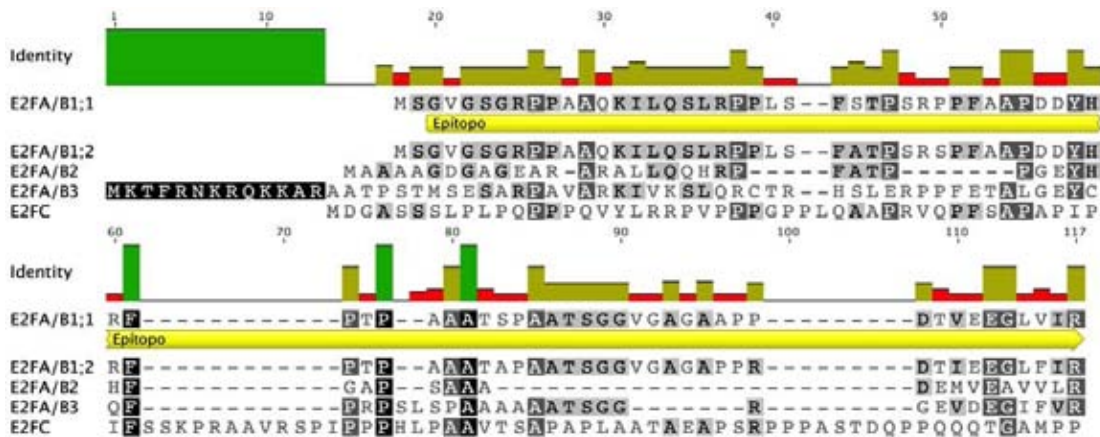
#### **7.1.1. Elección del péptido utilizado para la inmunización de los conejos**

Se utilizó el programa computacional EMBOSS: Antigenic y al analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína ZmE2FA/B1;1, se obtuvieron 20 epítomos candidatos (apéndice 1, tabla A1.1.). El análisis de la secuencia de la proteína E2FA/B1;1 con el programa NetSurfP proporcionó la estructura secundaria posible (basado en probabilidad), ya sea hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  o estructuras desordenadas, pero sobre todo, los residuos que pudieran encontrarse expuestos en la superficie de la proteína o hacia el interior de ella, que pudieran interferir en el reconocimiento por un anticuerpo (apéndice 1, tabla A.1.2). Se verificó además que la región elegida fuera la menos conservada dentro de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz (Sánchez-Camargo, datos no publicados), mediante un alineamiento múltiple de secuencias (fig. 12). De este modo, se eligió la región antigénica de la proteína predicha por el programa EMBOSS: Antigenic (que corresponde a 232 pb y un tamaño de 7 kDa), que no estuviera conservada entre los demás miembros de la familia de factores transcripcionales E2F (fig. 12), que no fuera un sitio cuya función pudiera interferir con la unión del anticuerpo como el dominio de unión a DNA o el de unión a RBR (proteína de 96 kDa que recluta otros complejos proteicos) (fig. 13) y que además, tuviera la mayor accesibilidad de acuerdo al programa NetSurf así como estructuras secundarias que no correspondieran ya sea hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  con el objetivo de obtener anticuerpos que pudieran reconocer tanto a la proteína nativa como a la desnaturalizada de acuerdo a los

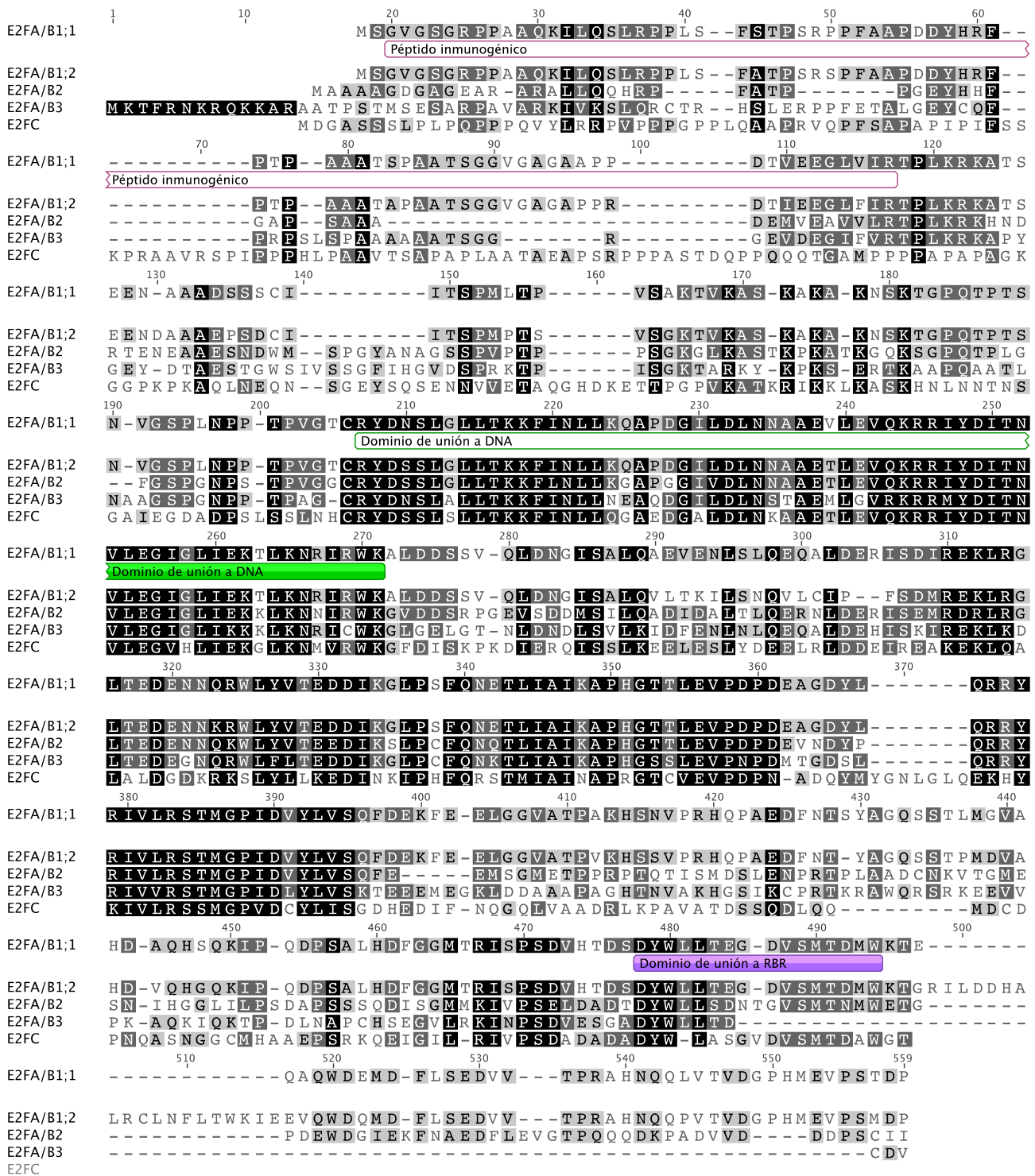


requerimientos de las técnicas utilizadas en este trabajo. Se utilizaron los valores predichos de accesibilidad superficial relativa (valores mayores corresponden a mayor accesibilidad) y se utilizó el Z-score para conocer la confiabilidad de dicha predicción, a valores mayores, el error en la predicción es menor (Petersen *et al.*, 2009).

<b>CDS</b>
<p>ATGTCCGGGGGTCGGCAGCGGCAGGCCGCCGGCAGCCAGAAAGATCCTGCAGTCCCTGCGACCGCCGCTGTCCTTCTCCACGCCGTCGCGGCCACCCTTCGCCCGCCCGCAGACTACCACCGCTTTCCAACGCCGGCTGCGGGCCAGTCCCCCGCCGCACCTCAGCGGGCGTTGGCCGGGGGCTGCTCCTCTGATACTGTCGAGGAGGGGCTGGTCATACGGACTCCGCTAAAAAGGAAAGCCACATCTGAAGAAAATGCTGCTGCTGACTCAAGCAGTTGTATCATTACCAGTCCAATGCTCACTCCGGTCTCTGCTAAAAGTGTAAAGCTTCTAAGGCAAAGGCTAAGAACAGTAAACTGGGCCTCAGACACCTACATCAAATGTTGGTTCACCACTCAATCCACCAACGCCTGTTGGCACATGCCGCTATGACAATCACTAGGACTTCTGACAAAAAAGTTCATTAACCTGCTTAAGCAAGCTCCAGATGGCATTCTAGATTTGAACAATGCTGCAGAAGTACTAGAGGTTCAAAGCGGC GCATATATGACATTACCAATGTCCTTGAAGGCATTGGACTAATAGAGAAGACACTTAAGAATAGAATCCGTTGGAAGGCCCTGGATGATTCAAGTGTTCAATTAGATAATGGTATCTCTGCTTTCAGGCAGAAAGTTGAAAATCTTAGTCTGCAGGAGCAAGCTCTAGATGAGCGTATAAGTGACATCGTAAAAAATTAAGGGGCTTAAGTGAAGTGAATAATCAAAGGTGGCTCTATGTGACTGAAGACGATATCAAGGATTACCCAGCTTTCAGATGAAACACTAATTGCAATTAAGCACCTCATGGTACTACTCTTGAAGTACCAGATCCTGATGAGGCAGGTGATTATCTCCAAGGAGATATAG AATTGTATTAAGAAGTACGATGGGACCAATAGATGTTTACTTAGTTAGTCAATTTGATGAAAAATTTGAGGAAGTGGTGGTGGTGGCACC GCCAAGCATCAAATGTGCCAGACATCAACCAGCTCAAGATTCAATACATCATATGCTGGACAAAGTAGCACACTAATGGGTGGCAGATGATGCACAGCACAGCCAGAAGATTCAGGATCCTAGTGTCTTGCATGACTTTGGAGGGATGACAAGGATTAGTCTTCAGACGTCATACG GATTCTGATTACTGGCTCCTAACAGAGGGGATGTTAGCATGACTGATATGTGAAAAACAGAACAAGCGCAGTGGGAGAGATGGATTCTTGT CAGAAGATGTTGTACCCCTCGAGCCATAATCAGCAGCTGGTCACAGTTGATGGGCCAATATGGAGGTTCCAAGCACAGATCCATAA</p>
<b>Proteína</b>
<p>MSGVGSGRPPAAQKILQSLRPPLSFSTPSRPPFAAPDDYHRFPTAAATSPAATSGVGAGAAPDVEEGLVIRTPLKPKATSEENAAADSSSCIITSPMLTPVSAKTVKASKAKAKNSKTGPQTPTSNVGSPLNPPTVPGTCRYDNSLGLLTKKFINLLKQAPDGLDLNNAAEVLEVQKRRYDITNVLEGILI EKTLKNRIRWKALDDSSVQLDNGISALQAEVENLSLQEQALDERISDIREKLRGLTEDENNQRWLYVTEDDIKGLPSFQNETLIAIKAPHGTTLEVPDP DEAGDYLQRRYRIVLRSTMGPIDVYLVSQFDEKFEELGGVATPAKHSNVPRHQPAEDFNYSYAGQSSTLMGVAHDAQHSQKIPQDPSALHDFGGM TRISPSDVHTDSDYWLLTEGDVSMTDMWKTEQAQWDEMDFLSEDVVTTRAHNQQLVTVDGPHEVPSTDP</p>



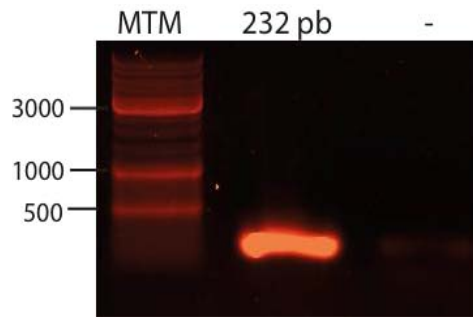
**Figura 12. Secuencias y alineamiento del péptido inmunogénico.** Secuencia codificante (CDS) y proteica de ZmE2FA/B1;1, se muestra resaltado y subrayado el péptido inmunogénico en ambas secuencias. Abajo, se muestra el alineamiento del péptido inmunogénico con las regiones homólogas de los otros miembros de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz con una escala de grises donde el negro indica a los aminoácidos totalmente conservados y en gris claro los menos conservados, un gráfico de barras muestra también el grado de identidad entre los aminoácidos de las secuencias alineadas.



**Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F.** Se muestran las secuencias de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz completas con una escala de grises donde el negro indica a los aminoácidos totalmente conservados y en gris claro los menos conservados. Se muestra indicado en rosa la secuencia correspondiente al péptido inmunogénico, en verde la que corresponde al dominio de unión a DNA y en morado el dominio de unión a RBR.

### 7.1.2. Amplificación de la secuencia del inserto correspondiente al péptido inmunogénico elegido

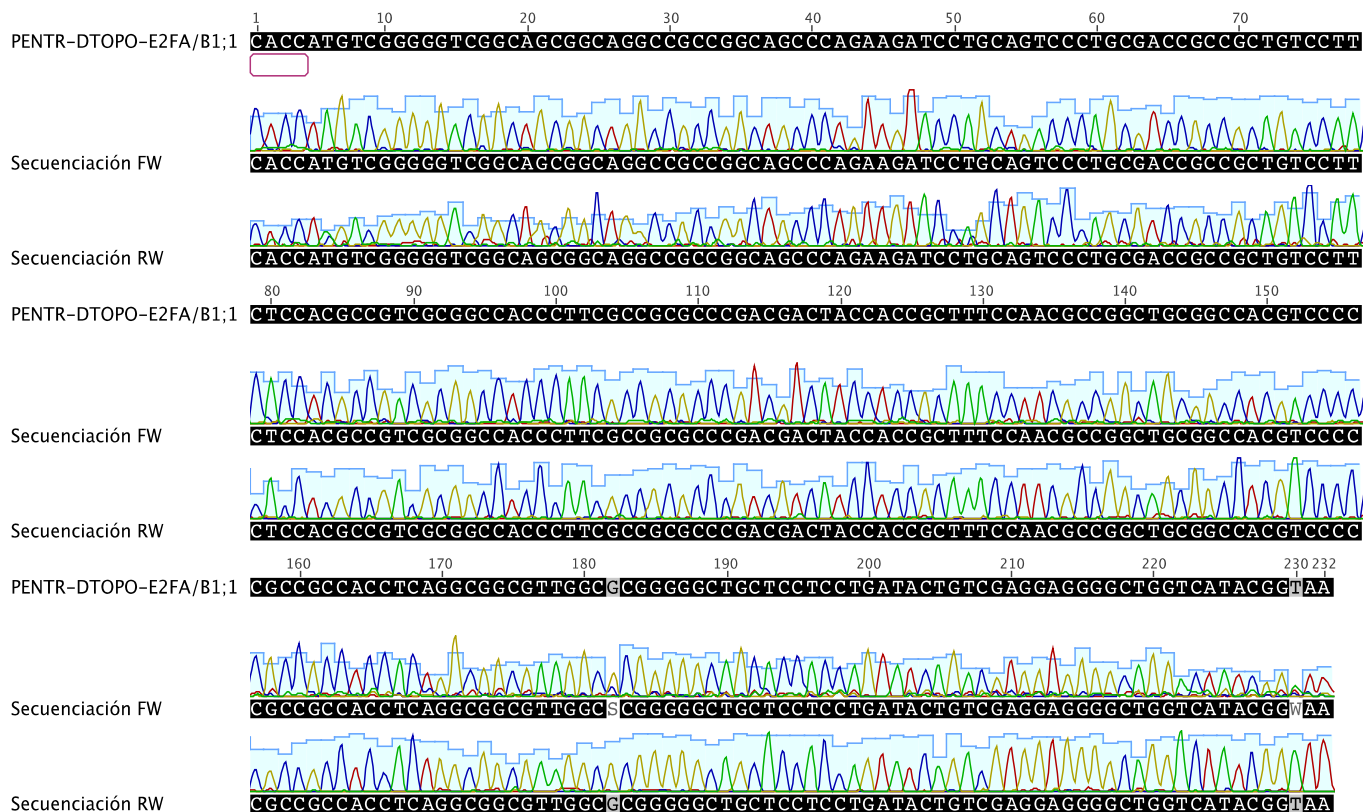
Para obtener la secuencia codificante del péptido inmunogénico elegido, se realizó PCR con los cebadores específicos diseñados, de manera que el cebador sentido tuviera la secuencia CACC en su extremo 5' para la posterior clonación dirigida al vector pENTR™/D-TOPO®. Se utilizó como templado una construcción que ya contenía a E2FA/B1;1 de maíz completa (pPAL7-ZmE2FA/B1;1). El amplicón se observó en 232 pares de bases (fig. 14), que era el tamaño esperado correspondiente al péptido inmunogénico más la secuencia CACC añadida, como control negativo se empleó la mezcla de reacción sin templado.



**Figura 14. Amplificación por PCR del inserto correspondiente al péptido inmunogénico de ZmE2FA/B1;1.** De izquierda a derecha se muestra el marcador de tamaño molecular (MTM), el amplicón en el tamaño esperado (232 pb) y el control negativo (-).

### 7.1.3. Ligación del fragmento obtenido y purificado en el vector pENTR™/D-TOPO® como clona de entrada

El amplicón obtenido y purificado se ligó en el vector pENTR™/D-TOPO® que genera la clona de entrada para la reacción de recombinación del sistema de clonación Gateway®, se transformaron células *E. coli* DH5α (Invitrogen) competentes como cepa de mantenimiento del plásmido, se seleccionaron por resistencia a antibióticos (kanamicina), se les extrajo y purificó plásmido que fue secuenciado para corroborar la obtención de la clona de entrada necesaria para la clonación en el vector de expresión. Los resultados de la secuenciación se tradujeron en marco de lectura y se alinearon con la secuencia de nucleótidos teórica. Para mayor confiabilidad, el plásmido fue secuenciado utilizando tanto el cebador *forward* como el *reverse* utilizados para generar la clona de entrada (fig. 15) conteniendo a la secuencia CACC en el extremo amino.



**Figura 15. Alineamiento de la construcción pENTR™/D-TOPO®-E2FA/B1;1 con la secuenciación con los cebadores *forward* y *reverse*.** La referencia es la construcción pENTR/D-TOPO-E2FA/B1;1 teórica y está alineada con los resultados de la secuenciación en *forward* (secuenciación FW) y *reverse* (secuenciación RW). La secuencias se muestran en escala de grises, siendo negro de mayor identidad y gris de menor. Se indica en rosa secuencia CACC seguido por la secuencia del péptido inmunogénico para la proteína E2FA/B1;1 en marco de lectura.

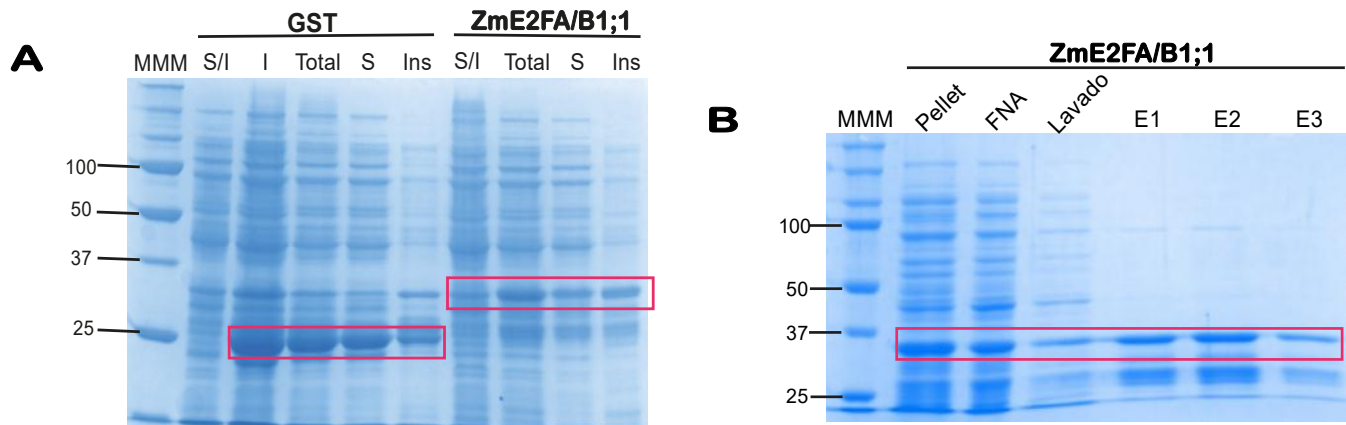
#### 7.1.4. Clonación en el vector de expresión Gateway® pDEST™ 15

Se llevó a cabo la clonación de la secuencia del péptido inmunogénico mediante una reacción de recombinación LR entre el vector pENTR™/D-TOPO® conteniendo el inserto y el vector de expresión pDEST™ 15, utilizando la tecnología Gateway® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transformaron a su vez con la misma construcción, células *E. coli* DH5α competentes, se les extrajo y purificó plásmido y se secuenció utilizando los cebadores T7 capaces de amplificar al inserto contenido en el vector Gateway® pDEST™ 15. Los resultados de la secuenciación se tradujeron en marco de lectura y se alinearon con la

secuencia de nucleótidos teórica utilizando el programa computacional Geneious Pro versión 4.8.4 (Drummond, 2014) (fig. A.1.3). En la figura se resalta en color verde la región de la proteína de fusión correspondiente a GST, y en morado, la región correspondiente al péptido de ZmE2FA/B1;1. Con este resultado se verifica que la clonación del inserto de *E2FA/B1;1* quedó en marco de lectura para sobreexpresar la proteína de fusión GST- ZmE2FA7B1;1 deseada para su posterior purificación.

### **7.1.5. Expresión y purificación del péptido recombinante**

La construcción obtenida se utilizó para transformar células *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL competentes las cuales se seleccionaron por resistencia a antibióticos (ampicilina y cloranfenicol). Una vez obtenida la cepa de expresión con el vector conteniendo al inserto ZmE2FA/B1;1, se indujo la expresión de la proteína de fusión que contiene a GST en el extremo amino y al inserto en el extremo carboxilo de acuerdo a la metodología descrita previamente. La expresión de la proteína se monitoreó por electroforesis (SDS-PAGE) y la proteína se purificó por cromatografía de afinidad en una columna empacada con resina de glutatión-agarosa (fig. 16). Se utilizó la expresión del vector vacío pGEX 4T2 que codifica para la proteína GST como control positivo. La masa molecular de la proteína codificada por el vector vacío predicha por el programa computacional ExPASy: PeptideMass (Wilkins, 1997; Gasteiger, 2005) es de 25.3 kDa y la masa molecular para la proteína recombinante teórica es de 32.5 kDa. Durante la purificación, se tomaron muestras de cada fracción resultante: las células lisadas inducidas con IPTG (fracción insoluble), la fracción no adsorbida por la resina, el último lavado a la columna previo a la elución y las fracciones eluidas. Se observan algunas bandas de tamaño inferior al esperado para la proteína recombinante en las eluciones obtenidas pertenecientes a la fracción soluble y se observa también una banda en el tamaño esperado en la fracción insoluble por lo que se obtuvo una purificación parcial (fig. 16). El péptido recombinante purificado se recolectó en tres eluciones distintas.

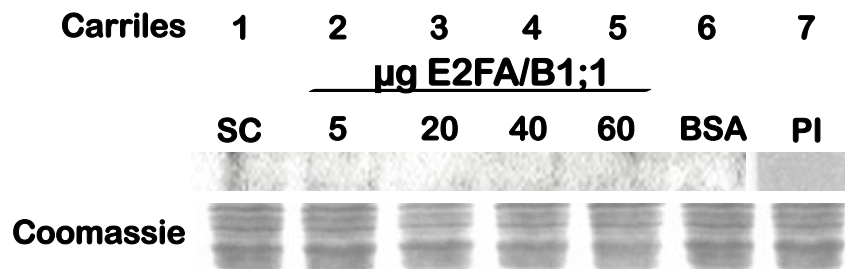


**Figura 16. Expresión y purificación del péptido de ZmE2FA/B1;1 recombinante.** A) Inducción de la expresión de la proteína ZmE2FA/B1;1 recombinante. El primer carril corresponde al marcador de masa molecular (MMM), hacia la derecha se encuentran los carriles correspondientes a las proteínas presentes en los extractos correspondientes a la inducción de GST como control positivo o el péptido de ZmE2FA/B1;1 indicándose: el cultivo bacteriano sin inducir (S/I), cultivo inducido (I), extracto total (Total), fracción soluble (S) y fracción insoluble (Ins). Se muestra enmarcado en rojo la banda correspondiente a GST (25 kDa) y el péptido ZmE2FA/B1;1 fusionado a GST (32.5 kDa). B) Purificación del péptido recombinante GST-ZmE2FA/B1;1, se indica en el primer carril el marcador de masa molecular (MMM) y hacia la derecha el perfil proteico contenido en el pellet (Pellet), FNA (fracción no adsorbida), el lavado de la columna (Lavado) y las eluciones del péptido (E1, E2, E3).

### 7.1.6. Validación de los anticuerpos anti-ZmE2FA/B1;1 de maíz

Se validó el anticuerpo anti-ZmE2FA/B1;1 mediante ensayos de competencia (fig. 16), se observó que al preincubarse la misma cantidad de anticuerpo con mayores cantidades de péptido recombinante, la intensidad de la banda reconocida por Western blot, proveniente de extractos de ejes embrionarios, correspondiente al peso molecular de la proteína ZmE2FA/B1;1 completa (50 kDa) disminuye. La mayor cantidad de proteína recombinante con que se incubó el suero inmune fue de 60  $\mu$ g (fig 17, carril 5 de izquierda a derecha) y como competidor negativo, se utilizó la misma cantidad de BSA para verificar que el causante de la disminución en el reconocimiento de la banda correspondiente a E2FA/B1;1 es la unión al antígeno contra el que se generaron los anticuerpos y no cualquier otro. Se realizó una inmunodetección adicional utilizando el suero preinmune para verificar que la banda de 50 kDa se debe a la generación de los anticuerpos mediante el suministro del péptido

recombinante inmunogénico de maíz. Utilizando el suero preinmune no se logró detectar a la banda de 50 kDa correspondiente a E2FA/B1;1 de maíz (fig. 16).

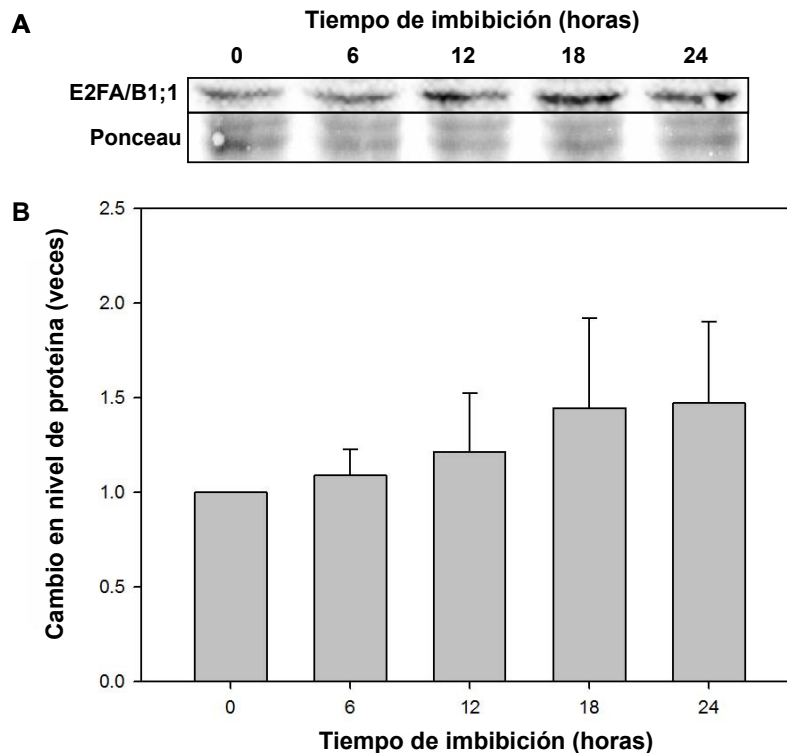


**Figura 17. Validación de los anticuerpos anti-ZmE2FA/B1;1 de maíz por ensayo de competencia.** Western blot utilizando 50 µg de extractos proteicos de ejes embrionarios germinados por 18 h. Carril 1: suero inmune sin competir (SC), carriles 2-5: suero inmune preincubado con 5, 20, 40 o 60 µg del péptido inmunogénico recombinante purificado, carril 6: suero inmune preincubado con 60 µg de BSA, carril 7: Western blot sobre la misma cantidad de extracto proteico utilizando el suero preinmune. Se muestra el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con Azul de Coomassie como control de carga.

## 7.2. Expresión de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz

Una vez validados los anticuerpos anti-E2FA/B1;1 se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína por triplicado en extractos proteicos de ejes embrionarios a 0, 6, 12, 18 y 24 h post imbibición para conocer el comportamiento de ZmE2FA/B1;1 durante la germinación. Se logró detectar a la banda correspondiente a la proteína ZmE2FA/B1;1 en 50 kDa y se utilizó como control de carga la misma membrana con las proteínas teñidas con rojo de Ponceau (fig. 18, panel A).

Se obtuvieron además por densitometría los cambios en el nivel de la proteína a lo largo de los tiempos de imbibición antes mencionados durante la germinación de maíz (fig. 18, panel B). Los resultados fueron normalizados utilizando el control de carga obtenido al teñir las mismas membranas con rojo de Ponceau y comparados con el tiempo cero (ejes embrionarios sin embeber) como referencia.



**Figura 18. Acumulación de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de semillas de maíz.** A) Inmunodetección de E2FA/B1;1 por western blot en extractos proteicos totales de ejes embrionarios extraídos de semillas embebidas por 0, 6, 12, 18 y 24 h en el tamaño esperado (50 kDa). Debajo, tinción de la membrana con rojo de Ponceau. B) Densitometría promedio expresada en cambio en el nivel de proteína respecto a 0 h (n=3), se muestran las barras correspondientes al error estándar promedio.

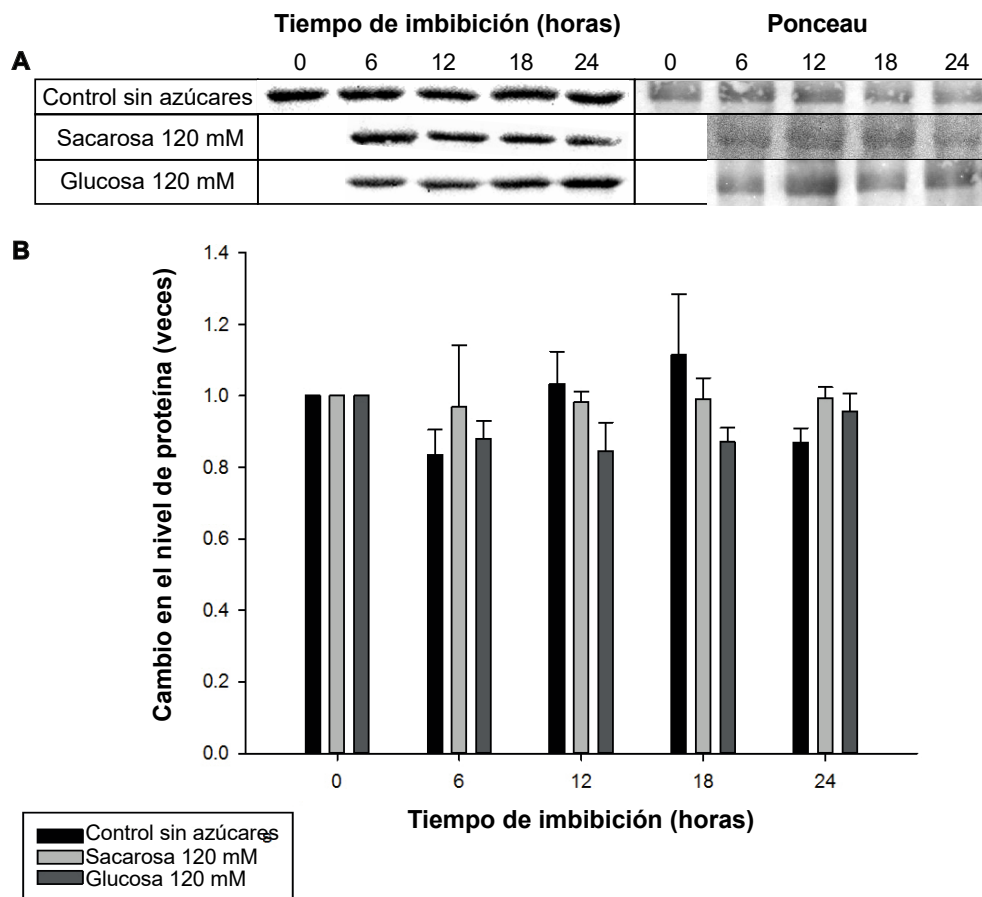
Se observó un aumento gradual en el nivel de la proteína hacia las 24 h post imbibición. La gráfica y el análisis estadístico representan el promedio de las densitometrías realizadas en las tres réplicas biológicas independientes y su error estándar, respectivamente. Para los distintos tiempos post imbibición, no se encontró diferencia significativa en el nivel de la proteína E2FAB1;1 durante la germinación de maíz, aunque la tendencia es a incrementar con el tiempo.

### 7.3. Expresión de E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz en presencia de glucosa y sacarosa.

Se estudiaron los niveles de la proteína ZmE2FA/B1;1 embebidos en presencia de sacarosa ó glucosa 120 mM (fig. 19). De igual manera los resultados fueron normalizados



utilizando el control de carga obtenido al teñir las mismas membranas con rojo de Ponceau y comparados con el tiempo cero (ejes embrionarios sin embeber) como referencia (fig. 19, panel A). En el gráfico se muestran los ejes embebidos sin azúcares a los diferentes tiempos (barras negras), los germinados en presencia de sacarosa (barras gris claro) y en presencia de glucosa (barras gris oscuro). Al realizar el análisis estadístico de la abundancia de la proteína en las muestras analizadas, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos comparados con el control.



**Figura 19. Acumulación de ZmE2FA/B1;1 en ausencia y presencia de azúcares.** A) Se muestra una inmunodetección representativa de ZmE2FA/B1;1 realizada por triplicado por western blot de extractos proteicos totales de ejes embrionarios embebidos por 6, 12, 18 y 24 h en ausencia y presencia de sacarosa y glucosa 120 mM. Como referencia se utilizó el valor obtenido en el tiempo cero. Se muestra como control de carga, la membrana teñida con rojo de Ponceau. B) Densitometría promedio expresada en cambio en el nivel de proteína respecto a 0 h (n=3), se muestran las barras correspondientes al error estándar promedio.

## 8. Discusión de resultados

### 8.1. Elección y obtención del péptido inmunogénico

La elección del péptido que sirvió como inmunógeno para la generación de los anticuerpos fue un paso crítico para este trabajo. Se obtuvieron anticuerpos para distinguir a E2FA/B1;1 de entre el resto de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz, caracterizados en nuestro laboratorio previamente y que comprende de 5 miembros (Sánchez-Camargo, datos no publicados). Es importante estudiar a estos miembros individualmente ya que los patrones de acumulación de sus RNAm durante la germinación sugieren que sus funciones no son redundantes y ya que la expresión de un gen no siempre corresponde a sus niveles proteicos, es necesario contar con anticuerpos que permitan reconocer a la proteína de interés para poder inferir su función o posibles funciones.

Al analizar la secuencia de la proteína ZmE2FA/B1;1 se encontraron posibles fragmentos potenciales para la generación de los anticuerpos. No fue posible generar anticuerpos que reconocieran únicamente a la proteína ZmE2FA/B1;1 ya que ésta posee el 90% de identidad en secuencia con su parólogo ZmE2FA/B1;2 y no fue posible encontrar una región que fuera diferencial entre todos los miembros de la familia incluyendo ZmE2FA/B1;1 y ZmE2FA/B1;2; sin embargo, el gen *E2FA/B1;2* no se encontró expresado en germinación de maíz ni en tejidos proliferativos como base de hoja y raíz, ni diferenciados como punta de hoja (Sánchez-Camargo, datos no publicados), por lo que el reconocimiento de la proteína ZmE2FA/B1;1 por el anticuerpo generado correspondería a esta última.

En la figura 12 se muestra el alineamiento de la secuencia del péptido inmunogénico elegido entre los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F con una escala de grises, a los aminoácidos totalmente conservados en negro y en gris claro los menos conservados. En la figura 13, se muestran las secuencias completas alineadas de los miembros de la familia mostrando los aminoácidos conservados, se observa un alto grado de conservación del residuo 206 al 396 (145 al 325 de la secuencia ZmE2FA/B1;1) que contienen al motivo de unión a DNA, la cremallera de leucinas y el *marked box*, y del 478 al 494 (405 al 420 de ZmE2FA/B1;1), el dominio de unión a la proteína RBR, lo cual representa la región de

máxima conservación entre los miembros de la familia, mismas que los caracterizan como miembros de ésta, por lo que dichas regiones, incluyendo al extremo carboxilo, fueron descartadas como blancos para el diseño de los anticuerpos. Se procuró entonces que la región elegida como péptido inmunogénico para la generación de los anticuerpos no fuera parte de algún motivo de unión a otras proteínas que pudiera interferir con el reconocimiento antígeno-anticuerpo, que no fuera parte de otros motivos conservados y que fuera una región potencialmente inmunogénica predicha por el programa EMBOSS: Antigenic, además que los residuos de estas regiones tuvieran la mayor accesibilidad de acuerdo a los valores obtenidos por programa NetSurf así como estructuras secundarias que no correspondieran ya sea hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  con el objetivo de obtener anticuerpos que pudieran reconocer tanto a la proteína nativa como a la desnaturalizada de acuerdo a los requerimientos de las técnicas utilizadas en este trabajo. Se utilizaron los valores predichos de accesibilidad superficial relativa (valores mayores corresponden a mayor accesibilidad) y se utilizó el *Z-score* para conocer la confiabilidad de dicha predicción, a mayores valores, es más confiable. Por lo tanto, la región elegida fue la menos conservada y no contiene motivos de unión a otras proteínas, además posee aminoácidos que forman estructura secundaria y otros que no, de manera que los anticuerpos puedan reconocer a la proteína de manera ya sea desnaturalizada o nativa, de acuerdo a la técnica que se desee emplear.

Para la obtención del péptido inmunogénico se diseñaron cebadores específicos que permitieran amplificarlo. El amplicón se observó en el tamaño esperado (fig. 13) y utilizando al péptido como anzuelo se hizo un BLAST en la base de datos del genoma de maíz (MaizeSequence Release 5b.60) y se obtuvo como resultado el número de acceso que corresponde a ZmE2FA/B1;1 y ZmE2FA/B1;2. Una vez corroborada la obtención del péptido inmunogénico específico por secuenciación, se llevó a cabo la clonación dirigida al vector Gateway® pDEST™ 15 lo cuál permitió la expresión del péptido de manera satisfactoria y en la masa esperada (fig. 16) para proceder a la obtención del suero inmune anti-ZmE2FA/B1;1.

## **8.2. Obtención y validación del suero inmune**

Para la obtención del suero inmune se administró al péptido inmunogénico de forma nativa en solución siguiendo el esquema de inmunización establecido previamente (apéndice 3). La validación se realizó mediante un ensayo de competencia por western blot donde a medida que los anticuerpos eran incubados con cantidades crecientes de proteína recombinante purificada, la banda correspondiente a E2FA/B1;1 disminuyó (figura 17) pero no cambió al preincubar con BSA indicando que el anticuerpo no reconoce otras proteínas y no se obtiene ninguna banda al utilizar el suero preinmune como anticuerpo primario para el ensayo de western blot por lo que los anticuerpos obtenidos para el reconocimiento de la proteína de interés quedaron validados.

### **8.3. E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz tanto en presencia como en ausencia de azúcares.**

La familia de factores transcripcionales E2F llevan a cabo un papel crítico en la regulación de la proliferación celular mediante el control transcripcional de sus genes blanco cuya expresión oportuna es necesaria para la progresión ordenada del ciclo celular, ya que conforme éste avanza se transcriben genes que son regulados durante el ciclo y que codifican para diversas proteínas con funciones en la fase subsecuente del ciclo celular (Sabelli, 2005). Estudios en germinación de ejes embrionarios de maíz indican que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Deltour y Jaqmard, 1974; Conger, 1976; Deltour, 1985), y durante las primeras horas de germinación, las células meristemáticas de ejes embrionarios de maíz se sincronizan parcialmente y entran a la fase S entre 12-15 h post-imbibición (Baiza et al., 1989). Los ensayos de western blot presentados en este trabajo (fig. 18) muestran que los niveles de acumulación de la proteína ZmE2FA/B1;1, una proteína de la familia de factores transcripcionales E2F representativa del control de la transición G<sub>1</sub>-S, no mostraron cambios estadísticamente significativos para los tiempos estudiados durante la germinación. En contraste, se encontró previamente que los niveles del transcrito *ZmE2FA/B1;1* fueron más abundantes en tejidos proliferativos como base de hoja y punta de raíz y mostraban además un pico de expresión a las 18 h (Sánchez-Camargo, datos no publicados) que coincide también con la actividad de la DNA Pol- $\delta$  y con el tiempo en que la mayoría de las células del

eje embrionario ha entrado a fase S del ciclo celular (García *et al*, 2006), por lo que se hubiera esperado que los niveles de transcrito correlacionaran con la abundancia proteica presente a los mismos tiempos de germinación. De igual manera, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ZmE2FA/B1;1 presentes en los ejes embrionarios germinados en presencia de sacarosa y glucosa a los diferentes tiempos, aunque previamente se había reportado que los azúcares solubles ya mencionados aumentan la tasa de proliferación, síntesis de DNA hacia las 24 h y el patrón de acumulación proteica de otros reguladores del ciclo celular en maíz como CYCB1 importantes para la transición G<sub>2</sub>-M. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren entonces la existencia de otros mecanismos de regulación complejos que controlan la presencia y activación de ZmE2FA/B1;1 durante la germinación.

Se conoce que la traducción de las proteínas está relacionada con la expresión de los mensajeros en distintos procesos celulares. Sin embargo, existen otros procesos de regulación balanceados que pueden modificar la abundancia proteica como la regulación post-transcripcional y el equilibrio síntesis-degradación proteica. Dentro de la regulación post-transcripcional, se encuentra la mediada por microRNAs (miRNAs), moléculas de 21-24 nucleótidos no codificantes que son altamente complementarios a sus RNAs blanco y que regulan la estabilidad o la eficiencia en la traducción de RNAs blanco tanto en animales como en plantas. Se han descrito familias conservadas de microRNAs en plantas que tienen como blanco factores transcripcionales en *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus thricocarpa* (Jones-Roades *et al*, 2006), así como en hojas de maíz en desarrollo (Liu *et al.*, 2014). Estudios en humanos revelaron que E2F1 (considerado un factor transcripcional activador) es blanco de c-Myc, un factor transcripcional importante para la expresión de genes involucrados en el ciclo celular y la apoptosis (Amati y Land, 1994; Marcu *et al.*, 1992; Lüscher y Elsenman *et al.*, 1990), además activa la expresión de un *cluster* de microRNAs. La traducción de HsE2F1 está regulada por dos microRNAs pertenecientes a este *cluster*, por lo que c-Myc activa simultáneamente la transcripción de *HsE2F1* y limita su traducción, permitiendo así una señal proliferativa finamente controlada (O'Donnell *et al.*, 2005). Se han descrito homólogos de c-Myc en desarrollo de semilla en *Arabidopsis* (Urao *et al.*, 1999) y maíz (Coe *et al.*, 1998; Dooner *et al.*, 1991). En humanos además, se han reportado distintos microRNAs que controlan la traducción de otros actores en el avance del ciclo celular durante la transición G1-

S como pRB, CDK2/4/6 y ciclinas tipo D (Chivukula, 2008; Bueno, 2011), además de otros en las demás fases del ciclo celular resaltando la importancia de estas moléculas en la regulación de los niveles de estas proteínas como un nivel más en la regulación del ciclo. A pesar de la alta conservación de la regulación del ciclo celular y sus actores en eucariontes, la regulación de los miembros de la familia E2F o de otras proteínas reguladoras del ciclo celular mediada por microRNAs en plantas no ha sido descrita aún.

Es sabido que en plantas, la vía de degradación por el proteasoma regula la división celular mediante la degradación de proteínas reguladoras específicas. En *Arabidopsis*, se demostró que en cultivos celulares en inanición de sacarosa por más de 12 h, los niveles de los reguladores de la transición G1-S como RBR1 y tres miembros de la familia E2F (E2Fa, E2Fb y E2Fc) se someten a degradación vía proteasoma (Hirano *et al.*, 2011) sugiriendo un arresto de las células en G<sub>1</sub>. Durante la germinación de maíz, la presencia de azúcares solubles aumenta la tasa de proliferación celular y la síntesis de DNA hacia las 24 h (García-Ayala, tesis de licenciatura 2015) más no ocasionó cambios en la abundancia de E2FA/B1;1 a pesar de su papel como regulador de la proliferación celular y la replicación de DNA (fig. 19). Podría existir entonces un balance entre la síntesis y la degradación de esta proteína durante el avance del ciclo que mantuviera sus niveles estables a lo largo de la germinación, es decir, que se lleve a cabo la síntesis de *ново* de la misma cuando la semilla retoma sus procesos de desarrollo y entra a ciclo celular y a su vez, durante su avance, sea degradada, como se ha demostrado para ciclinas tipo D en la germinación de maíz (Godínez Palma *et al.*, 2013). Para determinarlo, serían necesarios experimentos adicionales utilizando inhibidores específicos del proteasoma e inhibidores de la traducción como la cicloheximida que no son abordados en el presente trabajo, pero que a futuro podrían determinar si esta posibilidad ocurre.

Además de los procesos de estabilidad del RNAm y la proteína, el balance entre síntesis y degradación proteica, así como la tasa de traducción, existen otras formas de regular la actividad de E2F. La proteína relacionada a retinoblastoma (RBR), el homólogo de la familia de proteínas *pocket* en humanos, reprime la transcripción mediada por E2F/DP (Gutiérrez *et al.*, 2005; Ramírez-Parra y Gutierrez, 2007) mediante la inhibición directa de E2F y el reclutamiento de proteínas modificadoras de la estructura de la cromatina como histona

desacetilasas (HDAC) (Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998; Brehm *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001; Macaluso *et al.*, 2006). En células en proliferación, el complejo E2F/Rb se encuentra unido establemente a promotores blanco de E2F durante G<sub>1</sub> temprana y es liberado en la transición G<sub>1</sub>-S controlando así la progresión del ciclo celular (Ferreira *et al.*, 2001; Rayman *et al.*, 2002). Estas proteínas e interacciones se encuentran conservadas en plantas y han sido descritas en tomate y maíz (Ach *et al.*, 1997; Nicolas *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2001; Rossi, 2002).

En mamíferos, la fosforilación de E2F y DP por complejos CDK/Cyc es una forma conocida de regular la actividad de estas proteínas (Xu *et al.*, 1994; Fagan *et al.*, 1994; Kitagawa *et al.*, 1995; Peeper *et al.*, 1995, Dynlacht *et al.*, 1997). En plantas, todas las proteínas E2F y DP poseen varios sitios de fosforilación consenso por CDK (S/TP), donde S corresponde a serina, T a tirosina y P a prolina). Estudios de fosforilación *in vitro* en *Arabidopsis* mostraron que E2Fc puede fosforilarse, al menos por los complejos CDKA/CYCA2;2 o CDKA/CYCD2;2 (del Pozo *et al.*, 2002). A pesar de que estos resultados fueron obtenidos mediante ensayos *in vitro*, sugieren que la fosforilación también es una forma de regular la actividad de E2F en plantas ya que además, en híbridos de *Populus tremula* la fosforilación de E2F por CDK reduce la unión de E2F al DNA (Espinosa-Ruiz *et al.*, 2004).

En *Arabidopsis thaliana* se describió que la función de la proteína TOR1 se encuentra río arriba o en paralelo de la vía E2F-RBR1 en la estimulación del ciclo celular. En respuesta a glucosa, TOR1 fosforila el extremo amino de E2Fa, lo cual resulta en su activación y la entrada a la fase S en el meristemo de raíz quiescente. Además, mediante estudios computacionales, se encontró que el 95% de los genes blanco de E2Fa putativos en *Arabidopsis* coinciden con los genes activados por la vía TOR1-glucosa por lo que E2Fa es sustrato de la cinasa TOR1 y ésta controla la proliferación celular a través del factor transcripcional E2F (Xiong *et al.*, 2013) lo cual rompe el concepto de la regulación del ciclo celular basada en la cascada conservada CYC-CDK-RBR-E2F. La conexión directa TOR-E2F provee una entrada al ciclo celular alternativa a través de señalización por glucosa en los meristemos de otros órganos y en otros eucariotes.

Debido al alto grado de conservación de estas proteínas en eucariontes así como de otras proteínas reguladoras del ciclo celular como RBRs, CDKs, CYCs entre otras, sería de esperarse que la regulación de E2F fuera similar en maíz. Los niveles de la proteína E2FA/B1;1 no cambiaron durante la germinación de maíz ni en presencia de azúcares por lo que deben existir diversos mecanismos complejos mediante los cuales su actividad sea modulada, como la interacción con RBR, modificación de la estructura de la cromatina, localización subcelular, modificaciones post-traduccionales como la fosforilación por complejos CDK/CYC o por la proteína TOR por lo que serán necesarios más estudios que permitan dilucidar la manera en que se regula la actividad de E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz así como de otros miembros de la familia de factores transcripcionales E2F.



## 9. Conclusiones

- Se llevó a cabo una estrategia adecuada y efectiva para la elección del péptido inmunogénico para la generación de anticuerpos anti E2FA/B1;1 de maíz mediante análisis *in silico*.
- Se obtuvieron anticuerpos policlonales que son capaces de reconocer al factor transcripcional E2FA/B1;1 y E2FA/B1;2 en extractos proteicos de maíz.
- Se demostró que E2FA/B1;1 está presente en semilla seca, sus niveles proteicos no cambian durante la germinación y que la presencia de sacarosa o glucosa en la solución de imbibición para ejes embrionarios de maíz no afecta los niveles de la proteína E2FA/B1;1 a lo largo de la germinación.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen a un primer acercamiento hacia el entendimiento del papel de esta proteína en el ciclo celular durante la germinación de maíz y abren la posibilidad de abordar otros aspectos de su regulación o de su papel como regulador de la transición G1-S.

## 10. Perspectivas

- Es posible que ZmE2FA/B1;1 modifique su expresión en respuesta a otros factores como fitohormonas (citoquininas, auxinas, brasinosteroides, etc.) o bajo estrés (hídrico, osmótico, etc.), por lo que sería conveniente estudiar su influencia durante la germinación de maíz. A su vez podrían estudiarse los niveles de otros de los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F presentes en maíz bajo la mismas condiciones para estudiar si existe redundancia funcional.
- Como acercamiento hacia el control post-transcripcional de ZmE2FA/B1;1, se podrían realizar ensayos de vida media de la proteína y el efecto de la inhibición del proteasoma para estudiar si cambian los niveles de la proteína a los mismo tiempos que se estudiaron en este trabajo.
- Ya que ZmE2FA/B1;1 y otros miembros de la familia poseen una señal de localización nuclear, sería de interés conocer su localización subcelular ya que esta es un factor importante para el desempeño de su función, la cual se lleva a cabo en el núcleo al unirse a DNA y transactivar (o reprimir) genes blanco, por lo que se esperaría que estuviera localizada en el núcleo y que posiblemente sea translocada a citoplasma como otra manera de regular su función.
- Debido a que E2FA/B1;1 de maíz posee sitios de fosforilación consenso por complejos CDK/CYC, sería relevante estudiar si E2FA/B1;1 es fosforilado por estos complejos durante la germinación y si estas fosforilaciones modifican su afinidad por el DNA.
- El genoma de maíz posee cuatro diferentes genes RBR (Nguyen *et al.*, 2006); sería entonces de interés describir las interacciones entre RBRs y E2Fs de maíz, como acercamiento a la regulación de su actividad durante la germinación.

## 11. Referencias

- Ach RA, Taranto P, Gruissem W.** (1997) A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *Plant Cell*. 9:1595–1606.
- Amati B, Land H.** (1994) Myc-Mad-Max: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Current Opinion in Genetics & Development*. 4:102-108.
- Attucci, S., Carde, J.P., Raymond, P., Saint Gès, V., Spiteri, A., Pradet, A.** (1991) Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiology*. 95:390-398.
- Baíza, A. M., Vázquez-Ramos, J. M., Sánchez de Jiménez, E.** (1989) DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *Journal of Plant Physiology*, 135:416-421.
- Beadle, G.W.** (1939) Teosinte and the origin of maize. *Journal of Heredity* 30:245–247.
- Bewley, J.D., Marcus, A.** (1990) Gene expression in seed development and germination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 38: 165-193.
- Black, M., Bewley, J.D., Halmer, P.** (2006) The Encyclopedia of Seeds: Technology and Uses. UK: Cromwell Press.
- Borisjuk, L., Walenta, S., Weber, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U.** (1998) High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation with mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *The plant Journal* (1998) 15: 583-591.
- Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A. and Helin, K.** (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends in Biochemical Sciences*. 29: 409–417.
- Bradford, Marion M.** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.** (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 391:597–601.
- Bueno, M.J., Malumbres, M.** (2011) MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 5: Pages 592–601.
- Chabouté M.-E., Clement, B., Sekine, M., Philipps, G. and Chaubet-Gigot, N.** (2000) Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotidoreductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell*. 12, 1987–2000.
- Chivukula, R., Mendell, J.** (2008) Circular reasoning: microRNAs and cell-cycle control. *Trends in Biochemical Sciences*. 10:474–481.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., et al.** (2005) Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Research*. 33:5458–5470.

- Coe EH, Jr, Hoisington DA, Neuffer MG.** (1998) The genetics of corn. In: Sprague GF, Dudley JW (eds) *Corn and Corn improvements. American Society of Agronomy, Madison WI.* 81-258.
- Coe, E. H.** (2001) The origins of maize genetics. *Nature Reviews Genetics.* 2: 898-905,
- Comai, L., Harada, J.J.** (1990) Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of transition from embryogeny to germination. *PNAS.* 87:2671-2674.
- Conger, B.V., Carabia, J.V.** (1976) Microspectrophotometric determination of the 2c and 4c nuclear component in the root and shoot of the dormant maize embryo. *Environmental and Experimental Botany.* 16:171-175.
- Dahl, M., Meskiene, I., Bogre, L., et al.** (1995) 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: 1847–1857.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. and Leone, G.** (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *Journal of Biological Chemistry.* 278: 42041-42049.
- de Jager, S.M., Menges, M., Bauer, U.M. and Murray, J.A.H.** (2001) Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene *AtCDC6* and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Molecular Biology.* 47: 555–568.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C.** (2002) Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF<sub>AtSKP2</sub> pathway in response to light. *Plant Cell.* 14: 3057–3071.
- Deltour, R., Jaqmar, A.** (1974) Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays*. *Annals of Botany.* 38: 329-334.
- Deltour, R.** (1985) Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. *Journal of Cell Science.* 75: 43-83.
- De Veylder, L., De Almeida Engler, J., Burssens, S., Manevski, A., LESucre, B., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D.,** (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta.* 208: 453-462.
- De Veylder, L., Berckmans, B.** (2009) Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology.* 12:599-605.
- Doonan, J., Hunt, T.** (1996) Why don't plants get cancer? *Nature.* 380: 481-482
- Dooner HK, Robbins TP, Jorgensen RA.** (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review of Genetics.* 25:173-199..
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T., Wilson, A.** (2014) Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com>
- Dynlacht, B.D., Moberg, K., Lees, J.A., Harlow, E. and Zhu, L.** (1997) Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Molecular Cell Biology.* 17: 3867–3875.

- Ehrenshaft, M., Brambl, R.,** (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology*. 93: 295-304.
- Espinosa-Ruiz, A., Saxena, S., Schmidt, J., Mellerowicz, E., Miskolczi, P., Bakó, L., Bhalerao, R. P.** (2004) Differential stage-specific regulation of cyclin-dependent kinases during cambial dormancy in hybrid aspen. *The Plant Journal*. 38: 603-615.
- Fagan, R., Flint, K. J., Jones, N.** (1994) Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell*. 78, 799-811.
- Ferreira R, Naguibneva I, Mathieu M, Ait-Si-Ali S, Robin P, Pritchard LL, et al.** (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Reports*. 2:794–799.
- Florescano, E.** (2003) Imágenes y significados del dios del maíz. En: Esteva. G y C.Marielle (eds.) Sin maíz no hay país. CONACULTA. México, D.F. pp. 36-55.
- Frolov, M., Dyson, N.** (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *Journal of Cell Science*.117: 2173-2181.
- García-Ayala, B.** (2015) Influencia de los carbohidratos en el ciclo celular durante la germinación de maíz. Tesis de licenciatura. UNAM.
- García, E., Quiroz, F., Uchiyama, Y., Sakaguchi, K., Vázquez-Ramos, J. M.** (2006) Expression of a maize  $\delta$ -type polymerase during seed germination. *Physiologia Plantarum*. 2: 268-276.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.** (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press pp. 571-607
- Gaut, B. S., Doebley, J. F.** (1997) DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 6809–6814.
- Gibson, S. I.** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 93-102.
- Godínez-Palma, S., García, E., Sánchez, M.P., Rosas, F., Vázquez-Ramos, J.** (2013) Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *Journal of Experimental Botany*. 18:5661-5671.
- Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., et al.** (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *PNAS*. 93:8962–8967.
- Gutierrez, C.** (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. *Nature Cell Biology*. 7: 535-541.
- Helin, K., Lees, J.A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E. and Fattaey, A.** (1992) A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell*. 70: 337–350.
- Helin, K., Wu, C.L., Fattaey, A.R., et al.** (1993) Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes and Development*. 7: 1850–1861.

- Hirano, H., Shinmyo, A., Sekine, M.** (2011) Both negative and positive G1 cell cycle regulators undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*. 9: 1394-1396.
- Ilits, H. H.** (1983) From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science* 222, 886–894.
- Inzé, D., De Veylder, L.,** (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Reviews*. 40:77-105.
- Jakoby, M., Schnittger, A.** (2004) Cell cycle and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 661-669.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., Nevins, J.R.** (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*. 365: 349–352.
- Jones-Roades, M., Bartel, D., Bartel, B.** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Reviews in Plant Biology*. 57:19–53
- Joralemon, P.D.** (1971) A study of Olmec Iconography. Dumbarton Oaks, Trustees for Harvard University. Studies in Pre-Columbian Art and archeology, Num. 7. Washington, D.C.
- Kitagawa, M., Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Segawa, K., Hanks, S.K., Taya, Y., Nishimura, S., Okuyama, A.** (1995) Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene*. 2:229-236
- Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P. C.** (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters*. 276: 172-174.
- Korenjak, M., Brehm, A.** (2005) E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Current Opinion in Genetics and Development*. 15: 520–527.
- Kosugi, S., Ohashi, Y.** (2002a) E2Fs, E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 16553-16558.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y.** (2002b) E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant Journal*. 29: 45–59.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y.** (2002c) Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiology*. 28: 833-843.
- Lara-Núñez, A., de Jesús, N., Vázquez-Ramos, J.** (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum*, 132: 79-88.
- Laplane, M., Sabatini, D.M.** (2012) mTOR signalling in growth control and disease. *Cell*. 149:274-293.
- Lindeman, G.J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B., Livingston, D.M.**(1998) A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes and Development*. 12: 1092–1098

- Liu, H., Qin, C., Chen, Z., Zuo, T., Yang, X., Zhou, H., Xu, M., Cao, S., Shen, Y., Lin, H, He, X., Zhang, Y., Li, L., Ding, H., Lübberstedt, T., Zhang, Z., Pan, G.** (2014) Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics*. 15:25.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M., P., Zipursky, L., Darnell, J.** (2006) *Molecular Cell Biology*, 5th edition, WH Freeman, pp 854.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., Helin, K.** (1996) Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular Cell Biology*. 16: 1047–1057
- Lüscher B, Eisenman R.N:** (1990) New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes and Development*. 4:2025-2035
- Macaluso, M., Montanari, M., Giordano, A.** (2006) Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene*. 25: 5263-5267.
- Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, et al.** (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*. 391:601–5.
- Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S. and Inzé, D.** (2000) Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 486: 79–87.
- Magyar, Z., Ito, M., Binarová, P. Mohamed, B., Laszlo, B.,** (2013). Cell Cycle Modules in Plants for Entry into Proliferation and for Mitosis, *Plant Genome Diversity*. 2: 77-92.
- Mangelsdorf, P. C., Reeves, R.G.** (1938) The origin of maize. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 24: 303–312.
- Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ** (1992) myc function and regulation. *Annual Reviews in Biochemistry*. 61:809-860
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez-Gonzalez, J., Buckler, E., Doebley, J.** (2001) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *PNAS*. 99: 6080–6084.
- Meyerowitz, E. M.** (2002) Plants compared to animals: the broader comparative study of development. *Science*, 295: 1482-1485.
- Mora. C. et al.** (2011) How many species are on Earth and in the ocean? *PLoS Biology*. 8: e1001127.
- Morkel, M., Winkel, J., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Hagemeier, C.** (1997) An E2F-like repressor of transcription. *Nature*. 390:567–568

- Müller, H., Moroni, M.C., Vigo, E., Petersen, B.O., Bartek, J., Helin, K.** (1997) Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Molecular Cell Biology*. 17: 5508–5520
- Nicolás, G., Aldasoro, J.J.** (1979) Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental Botany*. 30:1163-1170.
- Nicolas E, Ait-Si-Ali S, Trouche D.** (2001) The histone deacetylase HDAC3 targets RbAp48 to the retinoblastoma protein. *Nucleic Acids Research*. 29:3131–6.
- Nieuwland, J., Menges, M., Murray, J. A.** (2007) The plant cyclins. *Cell Cycle Control and Plant Development*. Edited by Dirk Inzé. Blackwell Publishing Ltd.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W., Bewley, J.D.** (2010) Gene expression during germination. *Plant Science* 179: 574-581.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 357:749–760
- O'Donnell, K., Wentzel E., Zeller, K., Dang, C., Mendell, J.** (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 435:839-843.
- Osborne, D. J.,** (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Canadian Journal Botany*, 61: 3568-3577.
- Paliwal, R.L., Granados, G., Lafitte, H.R.** (2001) El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colecciónn FAO: Producción y protección vegetal. 28.
- Peeper, D.S., Keblusek, P., Helin, K., Toebes, M., van der Eb, A.J., Zantema, A.** (1995) Phosphorylation of a specific cdk site in E2F-1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRB-binding in vitro. *Oncogene*. 1:39-48.
- Petersen, B., Petersen, T. N., Andersen, P., Nielsen, M., Lundegaard, C.** (2009) A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Structural Biology*, 9:51.
- Ptashne, M.** (1992). *A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms* (Cambridge, MA: Cell Press).
- Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C.** (2000) Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F–DNA binding. *FEBS Lett*. 486, 73–78
- Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C.** (2007) E2F Regulates *FASCIATA1*, a Chromatin Assembly Gene Whose Loss Switches on the Endocycle and Activates Gene Expression by Changing the Epigenetic Status, *Plant Physiology*. 1:105-120.
- Raven, P. H., Evert, R.F., Eichhorn, S. E.** (1992) *Biology of plants*. Worth Publishers, Inc. N.Y, 545-562.



- Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ, et al.** (2002) E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes and Development*. 16:933–47.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M.S., Murray, J.H.A.** (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 20:4513-4521.
- Robaglia, C., Thomas, M., Meyer, C.** (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current Opinion in Plant Biology*. 15:301-307.
- Rossi V, Varotto S, Locatelli S, Lanzanova C, Lauria M, Zanotti E, et al.** (2001) The maize WD-repeat gene ZmRbAp1 encodes a member of the MSI/RbAp subfamily and is differentially expressed during endosperm development. *Molecular Genetics and Genomics*. 265:576–84.
- Rossi V, Varotto S.** (2002) Insights into the G1/S transition in plants. *Planta*. 215:345–56.
- Sabelli, P., Dante, R., Leiva-Neto, J., Jung,R., Gordon-Kamm, W., Larkins, B.,** (2005). RBR3, a Member of the Retinoblastoma-Related Family from Maize, is Regulated by the RBR1/E2F Pathway, *PNAS*. 37:13005-13012.
- Nguyen, H. N., Sabelli, P., Larkins, B. A.** (2007) Endoreduplication and Programmed Cell Death in the Cereal Endosperm. *Plant Cell Monographs*. pp. 21-43.
- Salon, C., Raymond, P., Pradet, A.** (1988) Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 12278-12287.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., López, S.,** (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 99: 445-450.
- Sánchez, M.P., Gurunshighe, S. H., Bradford, K. J., Vázquez-Ramos, J. M.B** (2005) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany*. 56: 515-523.
- Saravia, A.** (1965) *Popol Vuh: Antiguas historias de los indios Quiché de Guatemala*. Editorial Porrúa, México.
- Shen, W.H.** (2002) The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends in Plant Science*. 7: 505–511.
- Smith, L. G.** (2002) Plant cytokinesis: monitoring to the finish. *Current Biology*. 12: R206-R209.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H. and Murray, J.A.** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell*. 7: 85–103.

- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Reizman, H.** (2007) SCh9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*. 26: 663-674.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R. Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., Shinozaki, K.** (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell*. 9:1743-1754.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., Inzé, D.,** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 14: 903-916.
- Vázquez-Ramos, J., de la Paz, M., B** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*. 13: 113-130.
- Vincent, P. L. D.** (2002) Zea mays (Maize, Corn). Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. Encyclopedia of Life Sciences,; 1-7.
- Wang, T.L., Hedley, C.L.** (1993) Genetics, Molecular Biology and Biotechnology (Casey, R. and Davies, D.R., eds). Cambridge: CAB International, pp. 83-120.
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U.** (1996) Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed-coat associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal*. 10: 826-834.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., Greenberg, M.E., Orkin, S., Nevins, J.R., Robinson, M.L., Leone, G.** (2001) The E2F1–3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*. 414:457–462
- Xiong, Y., Sheen, J.** (2013) Moving beyond translation: glucose TOR signalling in the transcriptional control of the cell cycle. *Cell cycle*.12:1989-1990.
- Xiong, Y., Sheen, J.** (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiology*. 164:499-512.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., Sheen, J.** (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496: 181-186.
- Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., Piwnica-Worms, H.** (1994) Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Molecular Cell Biology*. 12:8420-8431.
- Zhang, S.X., Guo, Y., Boulianne, G.L.** (2001). Identification of a novel family of putative methyltransferases that interact with human and Drosophila presenilins. *Gene*. 2:135-144.
- Zlatanova, J.S., Ivanov, P.V., Stoilov, L.M., Chimshirova, K.V., Stanchev, B.S.** (1987) DNA repair precedes replicative synthesis during early germination of maize. *Plant Molecular Biology*, 10:139-144.

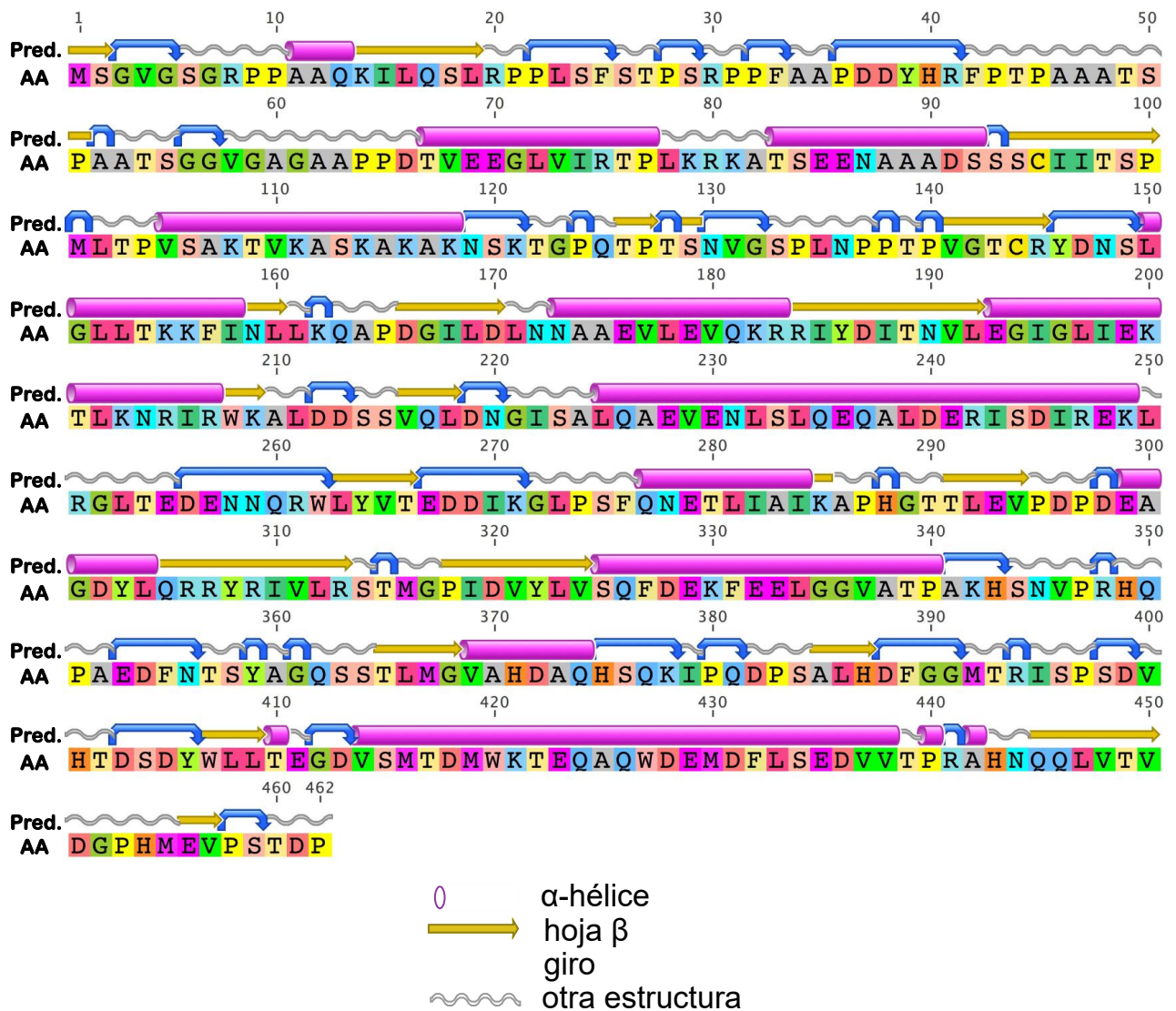
## 12. Apéndices

### Apéndice 1. Análisis in silico de la secuencia de aminoácidos de ZmE2FA/B1;1

**Tabla A1.1** Epítomos predichos por el programa EMBOSS: Antigenic para la proteína ZmE2FA/B1;1. El péptido inmunogénico contiene a los epítomos 1, 2, 3 y 4.

<b>Epítomo</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición</b>
1	PPAAQKILQSLRPPLSFS	9-26
2	RPPFAAPD	30-37
3	YHRFPTPAAATSPA	39-52
4	EGLVIRTP	70-77
5	DSSSCIITSPMLTPVSAKTVKAS	91-113
6	NVGSPLNPPTPVGTC	130-144
7	SLGLLTKKFINLLKQA	149-164
8	AAEVLEVQKR	174-183
9	ITNVLEGIGLIEK	188-200
10	DDSSVQLD	212-219
11	SALQAEVENLSLQEQ	223-237
12	ETLIAIKAP	279-287
13	QRRYRIVLRS	305-314
14	PIDVYLVVSQF	318-327
15	LGGVATPA	334-341
16	HSNVPRHQ	343-350
17	LMGVAHDAQHSQKIPQDPSALHD	366-388
18	PSDVHTD	397-403
19	SEDVVTTPR	434-441
20	NQQLVTVTDG	444-452

**Figura A1.1. Predicción de la estructura secundaria de la proteína ZmE2FA/B1;1.** Se muestra la simbología empleada para indicar las estructuras encontradas en la secuencia de aminoácidos de la proteína ZmE2FA/B1;1 ya sea  $\alpha$ -hélice, hoja  $\beta$ , giro u otro tipo de estructura desordenada de acuerdo a la predicción arrojada por el programa Geneious Pro versión 4.8.4 (Drummond, 2014) con una confiabilidad del 80%.



**Tabla A1.2.** Predicción de la accesibilidad de los aminoácidos en la superficie de la proteína ZmE2FA/B1;1 y en la estructura secundaria (NetSurfP v.1.1). El péptido inmunogénico se encuentra resaltado de la posición 3 a la 75.

Columna	Valor
1	Expuesto (E), Oculto (B)
2	Aminoácido
3	Posición
4	Accesibilidad superficial relativa
5	Accesibilidad superficial absoluta
6	Valor Z para la predicción de la accesibilidad superficial relativa
7	Probabilidad de $\alpha$ -hélice
8	Probabilidad de hoja $\beta$
9	Probabilidad de otra estructura

Columnas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E M E2Fa_b1_1	1	0.774	154.897	-1.100	0.016	0.005	0.979		
E S E2Fa_b1_1	2	0.463	54.205	-2.194	0.053	0.043	0.903		
<b>E G E2Fa_b1_1</b>	<b>3</b>	<b>0.513</b>	<b>40.397</b>	<b>-2.756</b>	<b>0.053</b>	<b>0.043</b>	<b>0.903</b>		
<b>E V E2Fa_b1_1</b>	<b>4</b>	<b>0.515</b>	<b>79.109</b>	<b>-2.376</b>	<b>0.053</b>	<b>0.043</b>	<b>0.903</b>		
E G E2Fa_b1_1	5	0.455	35.808	-2.651	0.018	0.047	0.935		
E S E2Fa_b1_1	6	0.582	68.199	-1.885	0.018	0.019	0.964		
E G E2Fa_b1_1	7	0.401	31.567	-2.169	0.018	0.019	0.964		
E R E2Fa_b1_1	8	0.438	100.325	-0.868	0.018	0.019	0.964		
E P E2Fa_b1_1	9	0.510	72.412	-0.926	0.058	0.017	0.925		
E P E2Fa_b1_1	10	0.455	64.579	-1.496	0.181	0.016	0.803		
B A E2Fa_b1_1	11	0.198	21.820	-0.808	0.181	0.016	0.803		
B A E2Fa_b1_1	12	0.288	31.705	-1.596	0.181	0.016	0.803		
E Q E2Fa_b1_1	13	0.489	87.407	-1.330	0.115	0.016	0.868		
E K E2Fa_b1_1	14	0.433	89.048	-0.597	0.113	0.043	0.844		
E I E2Fa_b1_1	15	0.279	51.541	-0.667	0.184	0.043	0.773		
B L E2Fa_b1_1	16	0.296	54.124	-0.695	0.184	0.043	0.773		
E Q E2Fa_b1_1	17	0.429	76.691	-0.516	0.113	0.043	0.844		
E S E2Fa_b1_1	18	0.458	53.631	-0.575	0.113	0.043	0.844		
E L E2Fa_b1_1	19	0.341	62.400	-1.298	0.115	0.016	0.868		
E R E2Fa_b1_1	20	0.522	119.469	-0.909	0.113	0.043	0.844		
E P E2Fa_b1_1	21	0.492	69.815	-1.698	0.053	0.043	0.903		
E P E2Fa_b1_1	22	0.428	60.676	-1.636	0.058	0.017	0.925		
B L E2Fa_b1_1	23	0.306	56.029	-2.098	0.018	0.047	0.935		
E S E2Fa_b1_1	24	0.282	33.086	-0.700	0.018	0.019	0.964		

Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B F	E2Fa_b1_1		25	0.278	55.835	-2.856	0.018	0.047	0.935
E S	E2Fa_b1_1		26	0.421	49.353	-1.773	0.018	0.019	0.964
E T	E2Fa_b1_1		27	0.416	57.713	-1.945	0.018	0.019	0.964
B P	E2Fa_b1_1		28	0.288	40.825	-1.228	0.018	0.019	0.964
E S	E2Fa_b1_1		29	0.384	44.981	-2.358	0.018	0.019	0.964
E R	E2Fa_b1_1		30	0.425	97.210	-0.769	0.016	0.005	0.979
B P	E2Fa_b1_1		31	0.265	37.575	-1.919	0.003	0.003	0.994
E P	E2Fa_b1_1		32	0.437	62.024	-1.566	0.018	0.019	0.964
B F	E2Fa_b1_1		33	0.305	61.153	-2.634	0.005	0.015	0.979
B A	E2Fa_b1_1		34	0.256	28.200	-1.454	0.005	0.015	0.979
E A	E2Fa_b1_1		35	0.311	34.305	-1.277	0.005	0.015	0.979
B P	E2Fa_b1_1		36	0.264	37.462	-1.436	0.018	0.019	0.964
E D	E2Fa_b1_1		37	0.465	66.992	-2.307	0.058	0.017	0.925
E D	E2Fa_b1_1		38	0.474	68.260	-0.272	0.181	0.016	0.803
B Y	E2Fa_b1_1		39	0.182	38.979	-1.095	0.257	0.016	0.727
E H	E2Fa_b1_1		40	0.333	60.518	0.001	0.184	0.043	0.773
E R	E2Fa_b1_1		41	0.365	83.631	-0.410	0.268	0.043	0.689
B F	E2Fa_b1_1		42	0.117	23.402	-1.357	0.184	0.043	0.773
E P	E2Fa_b1_1		43	0.383	54.305	-1.231	0.113	0.043	0.844
E T	E2Fa_b1_1		44	0.295	40.972	-0.931	0.115	0.016	0.868
E P	E2Fa_b1_1		45	0.536	76.058	-1.681	0.058	0.017	0.925
E A	E2Fa_b1_1		46	0.393	43.309	-1.436	0.058	0.017	0.925
E A	E2Fa_b1_1		47	0.366	40.377	-1.122	0.058	0.017	0.925
E A	E2Fa_b1_1		48	0.437	48.168	-1.363	0.053	0.043	0.903
B T	E2Fa_b1_1		49	0.247	34.287	-1.399	0.053	0.043	0.903
E S	E2Fa_b1_1		50	0.507	59.374	-0.312	0.115	0.016	0.868
E P	E2Fa_b1_1		51	0.502	71.220	-1.079	0.181	0.016	0.803
E A	E2Fa_b1_1		52	0.402	44.333	-1.386	0.181	0.016	0.803
E A	E2Fa_b1_1		53	0.451	49.733	-1.615	0.181	0.016	0.803
E T	E2Fa_b1_1		54	0.348	48.337	-1.577	0.115	0.016	0.868
E S	E2Fa_b1_1		55	0.493	57.733	-0.923	0.113	0.043	0.844
E G	E2Fa_b1_1		56	0.435	34.211	-1.271	0.053	0.043	0.903
E G	E2Fa_b1_1		57	0.459	36.123	-1.971	0.053	0.043	0.903
E V	E2Fa_b1_1		58	0.415	63.755	-1.982	0.053	0.043	0.903
B G	E2Fa_b1_1		59	0.287	22.579	-2.519	0.053	0.043	0.903
B A	E2Fa_b1_1		60	0.274	30.140	-1.396	0.053	0.043	0.903
E G	E2Fa_b1_1		61	0.524	41.223	-1.992	0.053	0.043	0.903
E A	E2Fa_b1_1		62	0.416	45.799	-2.143	0.053	0.043	0.903
E A	E2Fa_b1_1		63	0.406	44.697	-1.579	0.058	0.017	0.925
E P	E2Fa_b1_1		64	0.393	55.781	-1.436	0.058	0.017	0.925
E P	E2Fa_b1_1		65	0.589	83.636	-2.453	0.018	0.019	0.964
E D	E2Fa_b1_1		66	0.449	64.629	-1.523	0.018	0.019	0.964
E T	E2Fa_b1_1		67	0.550	76.327	-1.436	0.058	0.017	0.925
E V	E2Fa_b1_1		68	0.327	50.337	-0.420	0.053	0.043	0.903
E E	E2Fa_b1_1		69	0.520	90.914	-0.975	0.053	0.043	0.903
E E	E2Fa_b1_1		70	0.623	108.751	-0.141	0.113	0.087	0.800
E G	E2Fa_b1_1		71	0.300	23.579	-1.072	0.118	0.150	0.732
B L	E2Fa_b1_1		72	0.201	36.730	0.422	0.125	0.227	0.648
E V	E2Fa_b1_1		73	0.328	50.414	-0.351	0.069	0.386	0.545
E I	E2Fa_b1_1		74	0.312	57.739	-0.441	0.069	0.386	0.545
E R	E2Fa_b1_1		75	0.354	81.020	-0.241	0.069	0.386	0.545
E T	E2Fa_b1_1		76	0.451	62.512	0.145	0.064	0.216	0.721
E P	E2Fa_b1_1		77	0.476	67.502	-0.813	0.056	0.142	0.802

Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E L	E2Fa_b1_1		78	0.324	59.324	-0.762	0.056	0.142	0.802
E K	E2Fa_b1_1		79	0.533	109.679	-0.207	0.118	0.150	0.732
E R	E2Fa_b1_1		80	0.459	105.157	-1.261	0.113	0.087	0.800
E K	E2Fa_b1_1		81	0.491	100.978	-1.189	0.053	0.043	0.903
E A	E2Fa_b1_1		82	0.407	44.840	-1.631	0.053	0.043	0.903
E T	E2Fa_b1_1		83	0.411	56.978	-1.788	0.053	0.043	0.903
E S	E2Fa_b1_1		84	0.447	52.424	-1.478	0.053	0.043	0.903
E E	E2Fa_b1_1		85	0.531	92.836	-1.577	0.053	0.043	0.903
E E	E2Fa_b1_1		86	0.477	83.262	-1.682	0.113	0.043	0.844
E N	E2Fa_b1_1		87	0.485	70.975	-2.024	0.053	0.043	0.903
E A	E2Fa_b1_1		88	0.486	53.535	-1.477	0.058	0.017	0.925
B A	E2Fa_b1_1		89	0.231	25.478	-1.422	0.058	0.017	0.925
E A	E2Fa_b1_1		90	0.369	40.686	-1.219	0.053	0.043	0.903
E D	E2Fa_b1_1		91	0.524	75.537	-0.967	0.053	0.043	0.903
E S	E2Fa_b1_1		92	0.340	39.848	-2.015	0.018	0.019	0.964
E S	E2Fa_b1_1		93	0.472	55.283	-1.904	0.018	0.019	0.964
E S	E2Fa_b1_1		94	0.539	63.171	-1.774	0.058	0.017	0.925
E C	E2Fa_b1_1		95	0.399	55.992	-2.155	0.058	0.017	0.925
E I	E2Fa_b1_1		96	0.332	61.420	-1.481	0.058	0.017	0.925
E I	E2Fa_b1_1		97	0.411	75.979	-1.356	0.113	0.043	0.844
E T	E2Fa_b1_1		98	0.381	52.803	-1.957	0.113	0.043	0.844
E S	E2Fa_b1_1		99	0.389	45.579	-1.652	0.058	0.017	0.925
E P	E2Fa_b1_1		100	0.473	67.119	-2.453	0.018	0.019	0.964
E M	E2Fa_b1_1		101	0.346	69.155	-1.580	0.018	0.019	0.964
E L	E2Fa_b1_1		102	0.481	88.071	-1.190	0.018	0.019	0.964
E T	E2Fa_b1_1		103	0.358	49.599	-1.568	0.018	0.019	0.964
E P	E2Fa_b1_1		104	0.448	63.514	-1.165	0.018	0.019	0.964
E V	E2Fa_b1_1		105	0.328	50.460	-1.019	0.053	0.043	0.903
E S	E2Fa_b1_1		106	0.539	63.171	-1.023	0.053	0.043	0.903
E A	E2Fa_b1_1		107	0.524	57.701	-1.690	0.053	0.043	0.903
E K	E2Fa_b1_1		108	0.582	119.656	-1.511	0.053	0.043	0.903
E T	E2Fa_b1_1		109	0.415	57.519	-0.946	0.113	0.043	0.844
E V	E2Fa_b1_1		110	0.428	65.722	-1.428	0.113	0.043	0.844
E K	E2Fa_b1_1		111	0.564	115.953	-0.853	0.113	0.043	0.844
E A	E2Fa_b1_1		112	0.311	34.228	-0.790	0.184	0.043	0.773
E S	E2Fa_b1_1		113	0.576	67.495	-1.320	0.184	0.043	0.773
E K	E2Fa_b1_1		114	0.637	131.010	-1.086	0.268	0.043	0.689
E A	E2Fa_b1_1		115	0.337	37.093	-1.648	0.268	0.043	0.689
E K	E2Fa_b1_1		116	0.420	86.332	-1.135	0.268	0.043	0.689
E A	E2Fa_b1_1		117	0.425	46.846	-0.708	0.354	0.048	0.598
E K	E2Fa_b1_1		118	0.592	121.816	-0.426	0.354	0.048	0.598
E N	E2Fa_b1_1		119	0.514	75.250	-1.135	0.268	0.043	0.689
E S	E2Fa_b1_1		120	0.495	58.049	-1.997	0.184	0.043	0.773
E K	E2Fa_b1_1		121	0.605	124.407	-1.734	0.113	0.043	0.844
E T	E2Fa_b1_1		122	0.569	78.934	-1.075	0.113	0.043	0.844
E G	E2Fa_b1_1		123	0.429	33.723	-1.843	0.053	0.043	0.903
E P	E2Fa_b1_1		124	0.319	45.280	-2.331	0.053	0.043	0.903
E Q	E2Fa_b1_1		125	0.554	99.016	-2.115	0.053	0.043	0.903
E T	E2Fa_b1_1		126	0.492	68.227	-1.405	0.018	0.047	0.935
E P	E2Fa_b1_1		127	0.412	58.505	-2.935	0.018	0.047	0.935
E T	E2Fa_b1_1		128	0.466	64.676	-1.355	0.018	0.047	0.935
B S	E2Fa_b1_1		129	0.148	17.310	-3.012	0.053	0.043	0.903
E N	E2Fa_b1_1		130	0.542	79.334	-0.905	0.053	0.043	0.903

Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E V	E2Fa_b1_1		131	0.491	75.421	-2.165	0.053	0.043	0.903
E G	E2Fa_b1_1		132	0.486	38.264	-2.449	0.058	0.017	0.925
E S	E2Fa_b1_1		133	0.429	50.244	-1.299	0.058	0.017	0.925
E P	E2Fa_b1_1		134	0.593	84.161	-0.242	0.113	0.043	0.844
E L	E2Fa_b1_1		135	0.512	93.802	-1.237	0.053	0.043	0.903
E N	E2Fa_b1_1		136	0.569	83.287	-1.156	0.053	0.043	0.903
E P	E2Fa_b1_1		137	0.542	76.910	-1.782	0.053	0.043	0.903
E P	E2Fa_b1_1		138	0.574	81.380	-1.986	0.053	0.043	0.903
E T	E2Fa_b1_1		139	0.297	41.152	-1.303	0.018	0.019	0.964
E P	E2Fa_b1_1		140	0.489	69.460	-1.852	0.058	0.017	0.925
E V	E2Fa_b1_1		141	0.539	82.798	-1.333	0.053	0.043	0.903
E G	E2Fa_b1_1		142	0.502	39.507	-1.812	0.113	0.043	0.844
E T	E2Fa_b1_1		143	0.361	50.071	-1.125	0.113	0.043	0.844
E C	E2Fa_b1_1		144	0.377	52.931	-0.816	0.184	0.043	0.773
E R	E2Fa_b1_1		145	0.290	66.295	-0.401	0.455	0.046	0.498
B Y	E2Fa_b1_1		146	0.233	49.728	-0.571	0.561	0.047	0.393
E D	E2Fa_b1_1		147	0.295	42.538	-0.492	0.660	0.049	0.291
E N	E2Fa_b1_1		148	0.297	43.437	-0.319	0.751	0.050	0.199
B S	E2Fa_b1_1		149	0.059	6.856	-0.513	0.879	0.010	0.111
B L	E2Fa_b1_1		150	0.038	6.903	-0.360	0.970	0.001	0.030
B G	E2Fa_b1_1		151	0.116	9.098	-0.110	0.970	0.001	0.030
E L	E2Fa_b1_1		152	0.227	41.637	0.456	0.988	0.000	0.012
B L	E2Fa_b1_1		153	0.052	9.448	0.526	0.988	0.000	0.012
B T	E2Fa_b1_1		154	0.022	2.996	0.719	0.970	0.001	0.030
E K	E2Fa_b1_1		155	0.338	69.547	0.933	0.988	0.000	0.012
E K	E2Fa_b1_1		156	0.313	64.466	0.909	0.988	0.000	0.012
B F	E2Fa_b1_1		157	0.027	5.479	0.768	0.988	0.000	0.012
B I	E2Fa_b1_1		158	0.057	10.600	0.396	0.988	0.000	0.012
E N	E2Fa_b1_1		159	0.490	71.780	1.325	0.970	0.001	0.030
B L	E2Fa_b1_1		160	0.108	19.848	0.615	0.970	0.001	0.030
B L	E2Fa_b1_1		161	0.049	8.899	0.795	0.923	0.002	0.076
E K	E2Fa_b1_1		162	0.525	108.013	0.342	0.782	0.003	0.216
E Q	E2Fa_b1_1		163	0.642	114.751	-0.588	0.406	0.004	0.590
B A	E2Fa_b1_1		164	0.200	22.084	-0.410	0.053	0.005	0.942
E P	E2Fa_b1_1		165	0.777	110.313	-0.297	0.016	0.005	0.979
E D	E2Fa_b1_1		166	0.717	103.363	-0.528	0.003	0.003	0.994
E G	E2Fa_b1_1		167	0.300	23.626	-0.701	0.004	0.085	0.910
E I	E2Fa_b1_1		168	0.348	64.361	-0.562	0.005	0.336	0.660
B L	E2Fa_b1_1		169	0.093	17.065	0.723	0.004	0.514	0.481
E D	E2Fa_b1_1		170	0.311	44.801	0.786	0.021	0.279	0.699
B L	E2Fa_b1_1		171	0.055	10.052	0.740	0.802	0.014	0.185
E N	E2Fa_b1_1		172	0.468	68.486	1.453	0.923	0.002	0.076
E N	E2Fa_b1_1		173	0.437	64.035	1.549	0.923	0.002	0.076
B A	E2Fa_b1_1		174	0.043	4.739	-0.384	0.970	0.001	0.030
B A	E2Fa_b1_1		175	0.066	7.262	-0.874	0.938	0.007	0.055
E E	E2Fa_b1_1		176	0.609	106.322	0.707	0.879	0.010	0.111
E V	E2Fa_b1_1		177	0.405	62.202	0.908	0.802	0.014	0.185
B L	E2Fa_b1_1		178	0.097	17.816	0.320	0.600	0.003	0.397
E E	E2Fa_b1_1		179	0.519	90.634	-0.027	0.257	0.016	0.727
B V	E2Fa_b1_1		180	0.141	21.733	-0.209	0.113	0.043	0.844
E Q	E2Fa_b1_1		181	0.487	86.978	0.171	0.118	0.150	0.732
E K	E2Fa_b1_1		182	0.351	72.180	0.539	0.199	0.152	0.649
B R	E2Fa_b1_1		183	0.245	56.128	0.498	0.307	0.165	0.527



Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B R	E2Fa_b1_1	184	0.176	40.327	0.647	0.428	0.171	0.402	
B I	E2Fa_b1_1	185	0.047	8.695	0.061	0.538	0.173	0.289	
B Y	E2Fa_b1_1	186	0.143	30.602	0.736	0.605	0.105	0.290	
B D	E2Fa_b1_1	187	0.105	15.073	-0.233	0.701	0.107	0.192	
B I	E2Fa_b1_1	188	0.028	5.161	0.605	0.751	0.050	0.199	
B T	E2Fa_b1_1	189	0.065	8.960	0.002	0.751	0.050	0.199	
B N	E2Fa_b1_1	190	0.095	13.923	0.484	0.831	0.044	0.125	
B V	E2Fa_b1_1	191	0.034	5.164	0.373	0.831	0.044	0.125	
B L	E2Fa_b1_1	192	0.060	10.949	0.213	0.831	0.044	0.125	
B E	E2Fa_b1_1	193	0.228	39.867	-0.136	0.717	0.014	0.269	
B G	E2Fa_b1_1	194	0.056	4.415	-1.462	0.751	0.050	0.199	
B I	E2Fa_b1_1	195	0.066	12.173	-0.008	0.561	0.047	0.393	
E G	E2Fa_b1_1	196	0.336	26.459	0.069	0.605	0.105	0.290	
B L	E2Fa_b1_1	197	0.075	13.806	0.096	0.605	0.105	0.290	
B I	E2Fa_b1_1	198	0.050	9.287	0.669	0.649	0.163	0.188	
E E	E2Fa_b1_1	199	0.460	80.345	1.156	0.538	0.173	0.289	
E K	E2Fa_b1_1	200	0.414	85.222	0.538	0.538	0.173	0.289	
E T	E2Fa_b1_1	201	0.439	60.945	0.752	0.278	0.093	0.628	
E L	E2Fa_b1_1	202	0.438	80.216	-0.932	0.053	0.043	0.903	
E K	E2Fa_b1_1	203	0.434	89.192	0.035	0.018	0.088	0.893	
E N	E2Fa_b1_1	204	0.430	62.893	-0.504	0.020	0.205	0.775	
E R	E2Fa_b1_1	205	0.359	82.280	1.272	0.003	0.718	0.279	
B I	E2Fa_b1_1	206	0.053	9.787	0.542	0.001	0.900	0.099	
B R	E2Fa_b1_1	207	0.222	50.746	1.385	0.001	0.959	0.040	
B W	E2Fa_b1_1	208	0.039	9.355	-0.661	0.001	0.900	0.099	
E K	E2Fa_b1_1	209	0.218	44.884	0.856	0.002	0.816	0.182	
B A	E2Fa_b1_1	210	0.063	6.921	-2.462	0.004	0.420	0.576	
B L	E2Fa_b1_1	211	0.271	49.638	-0.490	0.004	0.138	0.858	
E D	E2Fa_b1_1	212	0.465	66.978	-1.718	0.005	0.045	0.951	
E D	E2Fa_b1_1	213	0.502	72.309	-1.709	0.018	0.019	0.964	
B S	E2Fa_b1_1	214	0.276	32.347	-1.417	0.018	0.019	0.964	
E S	E2Fa_b1_1	215	0.412	48.251	-1.592	0.176	0.004	0.820	
E V	E2Fa_b1_1	216	0.521	80.032	-1.527	0.406	0.004	0.590	
E Q	E2Fa_b1_1	217	0.547	97.766	-1.325	0.176	0.004	0.820	
B L	E2Fa_b1_1	218	0.205	37.499	-0.810	0.502	0.002	0.495	
E D	E2Fa_b1_1	219	0.459	66.084	-0.202	0.858	0.002	0.139	
E N	E2Fa_b1_1	220	0.654	95.790	0.885	0.970	0.001	0.030	
E G	E2Fa_b1_1	221	0.317	24.964	0.361	0.970	0.001	0.030	
B I	E2Fa_b1_1	222	0.117	21.645	0.243	0.970	0.001	0.030	
E S	E2Fa_b1_1	223	0.583	68.292	1.223	0.970	0.001	0.030	
E A	E2Fa_b1_1	224	0.418	46.075	1.595	0.970	0.001	0.030	
B L	E2Fa_b1_1	225	0.053	9.704	0.252	0.970	0.001	0.030	
E Q	E2Fa_b1_1	226	0.389	69.493	1.292	0.988	0.000	0.012	
E A	E2Fa_b1_1	227	0.545	60.026	1.316	0.970	0.001	0.030	
B E	E2Fa_b1_1	228	0.195	34.014	0.176	0.970	0.001	0.030	
B V	E2Fa_b1_1	229	0.090	13.833	0.026	0.970	0.001	0.030	
E E	E2Fa_b1_1	230	0.556	97.133	0.772	0.923	0.002	0.076	
E N	E2Fa_b1_1	231	0.451	65.982	1.211	0.858	0.002	0.139	
B L	E2Fa_b1_1	232	0.056	10.272	0.278	0.858	0.002	0.139	
E S	E2Fa_b1_1	233	0.366	42.895	0.545	0.970	0.001	0.030	
E L	E2Fa_b1_1	234	0.494	90.433	0.123	0.970	0.001	0.030	
B Q	E2Fa_b1_1	235	0.236	42.078	0.054	0.970	0.001	0.030	
B E	E2Fa_b1_1	236	0.117	20.510	-1.402	0.970	0.001	0.030	

Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E Q	E2Fa_b1_1		237	0.521	92.997	0.960	0.923	0.002	0.076
E A	E2Fa_b1_1		238	0.397	43.749	1.281	0.923	0.002	0.076
B L	E2Fa_b1_1		239	0.052	9.594	0.562	0.970	0.001	0.030
E D	E2Fa_b1_1		240	0.280	40.319	0.018	0.970	0.001	0.030
E E	E2Fa_b1_1		241	0.528	92.329	1.010	0.970	0.001	0.030
B R	E2Fa_b1_1		242	0.181	41.541	0.588	0.970	0.001	0.030
B I	E2Fa_b1_1		243	0.060	11.119	1.020	0.970	0.001	0.030
E S	E2Fa_b1_1		244	0.534	62.538	1.538	0.970	0.001	0.030
E D	E2Fa_b1_1		245	0.447	64.413	1.415	0.970	0.001	0.030
B I	E2Fa_b1_1		246	0.043	7.992	0.094	0.970	0.001	0.030
E R	E2Fa_b1_1		247	0.376	86.104	0.853	0.970	0.001	0.030
E E	E2Fa_b1_1		248	0.594	103.807	1.077	0.970	0.001	0.030
E K	E2Fa_b1_1		249	0.305	62.718	0.097	0.970	0.001	0.030
B L	E2Fa_b1_1		250	0.101	18.548	-0.419	0.923	0.002	0.076
E R	E2Fa_b1_1		251	0.472	108.088	0.872	0.858	0.002	0.139
E G	E2Fa_b1_1		252	0.517	40.672	0.728	0.782	0.003	0.216
B L	E2Fa_b1_1		253	0.131	24.004	0.119	0.622	0.015	0.363
E T	E2Fa_b1_1		254	0.328	45.438	-0.594	0.339	0.016	0.645
E E	E2Fa_b1_1		255	0.526	91.857	-0.646	0.257	0.016	0.727
E D	E2Fa_b1_1		256	0.364	52.467	0.228	0.257	0.016	0.727
E E	E2Fa_b1_1		257	0.546	95.474	-1.273	0.430	0.016	0.555
E N	E2Fa_b1_1		258	0.652	95.453	-0.414	0.430	0.016	0.555
E N	E2Fa_b1_1		259	0.392	57.389	-1.175	0.339	0.016	0.645
E Q	E2Fa_b1_1		260	0.458	81.727	-0.742	0.181	0.016	0.803
E R	E2Fa_b1_1		261	0.566	129.591	-0.331	0.115	0.016	0.868
E W	E2Fa_b1_1		262	0.312	75.132	-0.634	0.058	0.017	0.925
E L	E2Fa_b1_1		263	0.458	83.896	-1.203	0.053	0.043	0.903
E Y	E2Fa_b1_1		264	0.385	82.168	-1.239	0.113	0.043	0.844
B V	E2Fa_b1_1		265	0.171	26.329	-0.595	0.184	0.043	0.773
E T	E2Fa_b1_1		266	0.360	49.960	-0.632	0.430	0.016	0.555
E E	E2Fa_b1_1		267	0.439	76.658	0.159	0.782	0.003	0.216
E D	E2Fa_b1_1		268	0.589	84.832	0.416	0.802	0.014	0.185
B D	E2Fa_b1_1		269	0.218	31.428	-0.200	0.717	0.014	0.269
B I	E2Fa_b1_1		270	0.066	12.192	-0.456	0.622	0.015	0.363
E K	E2Fa_b1_1		271	0.479	98.571	0.813	0.522	0.016	0.462
E G	E2Fa_b1_1		272	0.619	48.692	0.024	0.257	0.016	0.727
B L	E2Fa_b1_1		273	0.114	20.873	0.240	0.115	0.016	0.868
E P	E2Fa_b1_1		274	0.482	68.453	-1.166	0.058	0.017	0.925
B S	E2Fa_b1_1		275	0.236	27.706	-1.583	0.018	0.019	0.964
B F	E2Fa_b1_1		276	0.131	26.292	-1.445	0.058	0.017	0.925
E Q	E2Fa_b1_1		277	0.537	95.819	-0.387	0.058	0.017	0.925
E N	E2Fa_b1_1		278	0.569	83.287	-0.882	0.018	0.019	0.964
E E	E2Fa_b1_1		279	0.291	50.908	-0.170	0.019	0.141	0.840
B T	E2Fa_b1_1		280	0.086	11.998	-0.527	0.004	0.616	0.381
B L	E2Fa_b1_1		281	0.075	13.714	0.465	0.001	0.900	0.099
B I	E2Fa_b1_1		282	0.027	4.976	0.360	0.001	0.959	0.040
B A	E2Fa_b1_1		283	0.026	2.810	-0.045	0.001	0.959	0.040
B I	E2Fa_b1_1		284	0.027	4.958	0.736	0.001	0.959	0.040
E K	E2Fa_b1_1		285	0.323	66.379	0.664	0.001	0.900	0.099
B A	E2Fa_b1_1		286	0.116	12.805	0.657	0.004	0.197	0.799
E P	E2Fa_b1_1		287	0.360	51.013	0.926	0.005	0.045	0.951
E H	E2Fa_b1_1		288	0.570	103.738	-0.574	0.018	0.047	0.935
E G	E2Fa_b1_1		289	0.655	51.509	-1.506	0.018	0.047	0.935

Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E T	E2Fa_b1_1		290	0.294	40.708	-0.836	0.019	0.141	0.840
E T	E2Fa_b1_1		291	0.542	75.148	0.316	0.022	0.552	0.426
B L	E2Fa_b1_1		292	0.135	24.719	0.694	0.021	0.756	0.223
E E	E2Fa_b1_1		293	0.553	96.644	0.267	0.023	0.655	0.322
B V	E2Fa_b1_1		294	0.130	20.012	1.174	0.021	0.451	0.528
E P	E2Fa_b1_1		295	0.389	55.185	-0.682	0.019	0.141	0.840
B D	E2Fa_b1_1		296	0.240	34.526	-0.200	0.052	0.084	0.864
E P	E2Fa_b1_1		297	0.374	53.127	-0.910	0.113	0.043	0.844
E D	E2Fa_b1_1		298	0.621	89.414	-1.095	0.268	0.043	0.689
E E	E2Fa_b1_1		299	0.438	76.536	-1.051	0.268	0.043	0.689
E A	E2Fa_b1_1		300	0.413	45.546	-2.171	0.268	0.043	0.689
E G	E2Fa_b1_1		301	0.416	32.700	-1.925	0.268	0.043	0.689
E D	E2Fa_b1_1		302	0.644	92.800	-1.629	0.191	0.086	0.723
E Y	E2Fa_b1_1		303	0.401	85.651	-1.893	0.113	0.043	0.844
E L	E2Fa_b1_1		304	0.519	95.102	-1.842	0.113	0.087	0.800
E Q	E2Fa_b1_1		305	0.505	90.175	-0.861	0.052	0.084	0.864
E R	E2Fa_b1_1		306	0.478	109.370	-0.245	0.056	0.142	0.802
E R	E2Fa_b1_1		307	0.364	83.264	0.253	0.021	0.451	0.528
B Y	E2Fa_b1_1		308	0.057	12.160	-0.018	0.021	0.756	0.223
B R	E2Fa_b1_1		309	0.091	20.747	0.099	0.011	0.918	0.071
B I	E2Fa_b1_1		310	0.038	6.956	-0.440	0.011	0.918	0.071
B V	E2Fa_b1_1		311	0.094	14.402	0.519	0.011	0.918	0.071
B L	E2Fa_b1_1		312	0.020	3.589	1.086	0.011	0.918	0.071
B R	E2Fa_b1_1		313	0.173	39.617	0.244	0.003	0.718	0.279
B S	E2Fa_b1_1		314	0.098	11.521	-0.648	0.004	0.420	0.576
E T	E2Fa_b1_1		315	0.571	79.239	0.040	0.004	0.138	0.858
E M	E2Fa_b1_1		316	0.605	121.081	-1.682	0.004	0.085	0.910
E G	E2Fa_b1_1		317	0.385	30.268	-1.347	0.005	0.045	0.951
E P	E2Fa_b1_1		318	0.412	58.392	0.299	0.005	0.262	0.733
B I	E2Fa_b1_1		319	0.060	11.174	-0.134	0.002	0.816	0.182
B D	E2Fa_b1_1		320	0.220	31.745	0.519	0.001	0.959	0.040
B V	E2Fa_b1_1		321	0.028	4.288	0.426	0.001	0.959	0.040
B Y	E2Fa_b1_1		322	0.075	15.963	0.222	0.001	0.959	0.040
B L	E2Fa_b1_1		323	0.041	7.489	-0.169	0.001	0.959	0.040
B V	E2Fa_b1_1		324	0.027	4.135	0.670	0.002	0.816	0.182
B S	E2Fa_b1_1		325	0.243	28.515	0.128	0.005	0.262	0.733
E Q	E2Fa_b1_1		326	0.475	84.835	0.122	0.018	0.019	0.964
E F	E2Fa_b1_1		327	0.522	104.846	-1.244	0.018	0.019	0.964
E D	E2Fa_b1_1		328	0.638	91.993	-1.971	0.058	0.017	0.925
E E	E2Fa_b1_1		329	0.749	130.920	-1.373	0.018	0.019	0.964
E K	E2Fa_b1_1		330	0.519	106.758	-0.608	0.053	0.043	0.903
E F	E2Fa_b1_1		331	0.447	89.653	-1.428	0.056	0.142	0.802
E E	E2Fa_b1_1		332	0.587	102.619	-0.742	0.056	0.142	0.802
E E	E2Fa_b1_1		333	0.544	95.019	-0.815	0.018	0.088	0.893
E L	E2Fa_b1_1		334	0.386	70.713	-2.743	0.018	0.047	0.935
E G	E2Fa_b1_1		335	0.705	55.507	-1.687	0.018	0.047	0.935
E G	E2Fa_b1_1		336	0.500	39.350	-1.374	0.018	0.047	0.935
E V	E2Fa_b1_1		337	0.430	66.060	-2.273	0.018	0.088	0.893
E A	E2Fa_b1_1		338	0.504	55.596	-1.690	0.018	0.047	0.935
E T	E2Fa_b1_1		339	0.439	60.889	-0.380	0.005	0.015	0.979
E P	E2Fa_b1_1		340	0.282	40.058	-2.205	0.018	0.019	0.964
E A	E2Fa_b1_1		341	0.475	52.367	-1.398	0.018	0.019	0.964
E K	E2Fa_b1_1		342	0.632	130.064	-0.782	0.018	0.019	0.964

Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E H	E2Fa_b1_1		343	0.625	113.706	-1.755	0.058	0.017	0.925
E S	E2Fa_b1_1		344	0.454	53.209	-2.785	0.018	0.019	0.964
E N	E2Fa_b1_1		345	0.595	87.035	-1.877	0.018	0.019	0.964
E V	E2Fa_b1_1		346	0.330	50.690	-1.600	0.018	0.019	0.964
E P	E2Fa_b1_1		347	0.365	51.794	-1.409	0.018	0.019	0.964
E R	E2Fa_b1_1		348	0.542	124.095	-1.332	0.018	0.047	0.935
E H	E2Fa_b1_1		349	0.656	119.381	-0.913	0.018	0.047	0.935
E Q	E2Fa_b1_1		350	0.453	80.870	-1.317	0.018	0.019	0.964
E P	E2Fa_b1_1		351	0.626	88.886	-0.732	0.018	0.019	0.964
E A	E2Fa_b1_1		352	0.403	44.367	-0.809	0.018	0.047	0.935
E E	E2Fa_b1_1		353	0.549	95.840	-1.443	0.053	0.043	0.903
E D	E2Fa_b1_1		354	0.612	88.232	-0.776	0.053	0.043	0.903
E F	E2Fa_b1_1		355	0.389	77.972	-0.701	0.053	0.043	0.903
E N	E2Fa_b1_1		356	0.580	84.912	-0.991	0.053	0.043	0.903
E T	E2Fa_b1_1		357	0.439	60.848	-1.230	0.053	0.043	0.903
E S	E2Fa_b1_1		358	0.450	52.717	-1.631	0.053	0.043	0.903
E Y	E2Fa_b1_1		359	0.479	102.255	-1.409	0.113	0.043	0.844
E A	E2Fa_b1_1		360	0.383	42.196	-1.789	0.113	0.043	0.844
E G	E2Fa_b1_1		361	0.478	37.642	-1.091	0.113	0.043	0.844
E Q	E2Fa_b1_1		362	0.603	107.624	-0.857	0.113	0.087	0.800
E S	E2Fa_b1_1		363	0.413	48.392	-1.295	0.113	0.043	0.844
E S	E2Fa_b1_1		364	0.483	56.584	-2.179	0.113	0.043	0.844
E T	E2Fa_b1_1		365	0.455	63.081	-1.454	0.184	0.043	0.773
E L	E2Fa_b1_1		366	0.516	94.461	-0.823	0.184	0.043	0.773
E M	E2Fa_b1_1		367	0.408	81.741	-1.309	0.184	0.043	0.773
E G	E2Fa_b1_1		368	0.510	40.137	-1.743	0.184	0.043	0.773
E V	E2Fa_b1_1		369	0.319	49.092	-0.910	0.184	0.043	0.773
E A	E2Fa_b1_1		370	0.541	59.596	-1.173	0.113	0.043	0.844
E H	E2Fa_b1_1		371	0.512	93.078	-1.636	0.113	0.043	0.844
E D	E2Fa_b1_1		372	0.542	78.045	-1.227	0.113	0.043	0.844
B A	E2Fa_b1_1		373	0.284	31.341	-0.947	0.113	0.043	0.844
E Q	E2Fa_b1_1		374	0.503	89.872	-0.474	0.184	0.043	0.773
E H	E2Fa_b1_1		375	0.473	86.057	-0.930	0.181	0.016	0.803
E S	E2Fa_b1_1		376	0.510	59.737	-1.205	0.115	0.016	0.868
E Q	E2Fa_b1_1		377	0.553	98.694	-0.888	0.115	0.016	0.868
E K	E2Fa_b1_1		378	0.614	126.259	-1.050	0.181	0.016	0.803
B I	E2Fa_b1_1		379	0.232	42.976	-0.734	0.115	0.016	0.868
E P	E2Fa_b1_1		380	0.422	59.924	-1.429	0.058	0.017	0.925
E Q	E2Fa_b1_1		381	0.603	107.642	-2.291	0.058	0.017	0.925
E D	E2Fa_b1_1		382	0.477	68.736	-1.317	0.058	0.017	0.925
E P	E2Fa_b1_1		383	0.433	61.386	-1.035	0.184	0.043	0.773
E S	E2Fa_b1_1		384	0.311	36.473	-1.147	0.184	0.043	0.773
B A	E2Fa_b1_1		385	0.294	32.399	-1.170	0.268	0.043	0.689
E L	E2Fa_b1_1		386	0.344	62.950	-1.741	0.257	0.016	0.727
E H	E2Fa_b1_1		387	0.558	101.427	-1.268	0.257	0.016	0.727
E D	E2Fa_b1_1		388	0.479	68.981	-1.632	0.181	0.016	0.803
E F	E2Fa_b1_1		389	0.394	79.096	-1.662	0.115	0.016	0.868
E G	E2Fa_b1_1		390	0.465	36.572	-1.874	0.018	0.019	0.964
E G	E2Fa_b1_1		391	0.333	26.176	-0.963	0.018	0.047	0.935
B M	E2Fa_b1_1		392	0.110	22.011	-0.579	0.020	0.205	0.775
B T	E2Fa_b1_1		393	0.192	26.561	-0.122	0.021	0.451	0.528
E R	E2Fa_b1_1		394	0.398	91.073	-0.646	0.021	0.451	0.528
B I	E2Fa_b1_1		395	0.065	11.951	-0.510	0.005	0.336	0.660

Columns	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E S	E2Fa_b1_1		396	0.285	33.449	-0.509	0.004	0.197	0.799
B P	E2Fa_b1_1		397	0.134	18.986	-0.957	0.005	0.045	0.951
E S	E2Fa_b1_1		398	0.343	40.223	-0.248	0.005	0.015	0.979
E D	E2Fa_b1_1		399	0.530	76.344	-0.675	0.018	0.019	0.964
B V	E2Fa_b1_1		400	0.241	37.011	-1.627	0.018	0.019	0.964
E H	E2Fa_b1_1		401	0.591	107.430	-1.178	0.018	0.019	0.964
E T	E2Fa_b1_1		402	0.420	58.240	-0.426	0.058	0.017	0.925
E D	E2Fa_b1_1		403	0.492	70.883	-0.935	0.113	0.043	0.844
B S	E2Fa_b1_1		404	0.212	24.823	0.355	0.113	0.087	0.800
B D	E2Fa_b1_1		405	0.093	13.430	-0.502	0.125	0.227	0.648
B Y	E2Fa_b1_1		406	0.063	13.378	0.825	0.148	0.418	0.435
B W	E2Fa_b1_1		407	0.113	27.152	0.369	0.148	0.418	0.435
B L	E2Fa_b1_1		408	0.064	11.682	0.672	0.148	0.418	0.435
B L	E2Fa_b1_1		409	0.154	28.179	-1.403	0.064	0.216	0.721
B T	E2Fa_b1_1		410	0.138	19.210	-0.016	0.052	0.084	0.864
E E	E2Fa_b1_1		411	0.425	74.160	-0.039	0.018	0.019	0.964
E G	E2Fa_b1_1		412	0.656	51.619	-1.019	0.018	0.019	0.964
E D	E2Fa_b1_1		413	0.450	64.773	-1.397	0.018	0.019	0.964
B V	E2Fa_b1_1		414	0.166	25.468	-0.301	0.018	0.088	0.893
B S	E2Fa_b1_1		415	0.119	13.947	-1.263	0.020	0.205	0.775
B M	E2Fa_b1_1		416	0.033	6.643	0.753	0.069	0.386	0.545
B T	E2Fa_b1_1		417	0.093	12.857	0.138	0.069	0.386	0.545
B D	E2Fa_b1_1		418	0.142	20.390	-0.086	0.069	0.386	0.545
B M	E2Fa_b1_1		419	0.077	15.468	-0.189	0.066	0.296	0.638
B W	E2Fa_b1_1		420	0.102	24.651	0.589	0.056	0.142	0.802
E K	E2Fa_b1_1		421	0.464	95.363	0.157	0.018	0.047	0.935
B T	E2Fa_b1_1		422	0.094	12.996	-0.337	0.018	0.019	0.964
E E	E2Fa_b1_1		423	0.584	102.007	-1.351	0.018	0.019	0.964
E Q	E2Fa_b1_1		424	0.426	76.101	-1.078	0.018	0.019	0.964
B A	E2Fa_b1_1		425	0.146	16.111	-0.983	0.053	0.043	0.903
E Q	E2Fa_b1_1		426	0.392	70.011	-0.136	0.053	0.043	0.903
B W	E2Fa_b1_1		427	0.112	26.936	-0.412	0.113	0.043	0.844
E D	E2Fa_b1_1		428	0.335	48.259	-0.364	0.113	0.043	0.844
E E	E2Fa_b1_1		429	0.360	62.927	-0.605	0.386	0.097	0.517
B M	E2Fa_b1_1		430	0.136	27.134	-0.071	0.502	0.102	0.396
B D	E2Fa_b1_1		431	0.298	42.985	-0.938	0.502	0.102	0.396
B F	E2Fa_b1_1		432	0.176	35.363	-0.388	0.455	0.046	0.498
B L	E2Fa_b1_1		433	0.104	19.116	-0.263	0.502	0.102	0.396
E S	E2Fa_b1_1		434	0.360	42.169	0.147	0.455	0.046	0.498
E E	E2Fa_b1_1		435	0.457	79.908	-0.648	0.354	0.048	0.598
E D	E2Fa_b1_1		436	0.340	48.980	-1.014	0.386	0.097	0.517
B V	E2Fa_b1_1		437	0.168	25.868	-0.559	0.278	0.093	0.628
B V	E2Fa_b1_1		438	0.306	47.032	-1.675	0.113	0.087	0.800
B T	E2Fa_b1_1		439	0.218	30.278	-0.798	0.053	0.043	0.903
E P	E2Fa_b1_1		440	0.321	45.550	-1.690	0.053	0.043	0.903
E R	E2Fa_b1_1		441	0.429	98.241	0.057	0.058	0.017	0.925
E A	E2Fa_b1_1		442	0.457	50.328	-2.050	0.018	0.019	0.964
E H	E2Fa_b1_1		443	0.563	102.392	-1.986	0.018	0.019	0.964
E N	E2Fa_b1_1		444	0.514	75.323	-1.472	0.018	0.019	0.964
E Q	E2Fa_b1_1		445	0.467	83.406	-0.607	0.018	0.019	0.964
E Q	E2Fa_b1_1		446	0.327	58.420	-1.049	0.018	0.019	0.964
E L	E2Fa_b1_1		447	0.324	59.324	-2.443	0.018	0.019	0.964
E V	E2Fa_b1_1		448	0.562	86.349	-2.603	0.018	0.019	0.964

Columnas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	E T	E2Fa_b1_1	449	0.386	53.524	-1.372	0.018	0.019	0.964
	E V	E2Fa_b1_1	450	0.407	62.617	-2.189	0.018	0.047	0.935
	E D	E2Fa_b1_1	451	0.713	102.801	-2.129	0.018	0.047	0.935
	E G	E2Fa_b1_1	452	0.472	37.107	-1.807	0.018	0.019	0.964
	E P	E2Fa_b1_1	453	0.370	52.489	-1.224	0.018	0.047	0.935
	E H	E2Fa_b1_1	454	0.528	95.970	-0.901	0.018	0.088	0.893
	E M	E2Fa_b1_1	455	0.328	65.693	-1.310	0.004	0.138	0.858
	E E	E2Fa_b1_1	456	0.572	99.963	-1.302	0.004	0.138	0.858
	B V	E2Fa_b1_1	457	0.208	31.908	-0.970	0.005	0.045	0.951
	E P	E2Fa_b1_1	458	0.511	72.553	-1.001	0.005	0.045	0.951
	E S	E2Fa_b1_1	459	0.617	72.277	-2.073	0.005	0.045	0.951
	E T	E2Fa_b1_1	460	0.577	80.072	-2.529	0.005	0.015	0.979
	E D	E2Fa_b1_1	461	0.614	88.535	-1.684	0.003	0.003	0.994
	E P	E2Fa_b1_1	462	0.834	118.401	-1.061	0.003	0.003	0.994

**Figura A.1.3. Alineamiento de la construcción pDEST15-E2FA/B1;1 con la secuenciación en *forward* y *reverse*.** La referencia es la construcción pDEST15-ZmE2FA/B1;1 teórica y está alineada con los resultados de la secuenciación en *forward* (pDEST15-ZmE2FA/B1;1 FW) y en *reverse* (pDEST15-ZmE2FA/B1;1 RW). Se observa el cromatograma correspondiente a las secuenciaciones mostrando la calidad de las mismas y los residuos mostrados en escala de grises, siendo gris claro los residuos con menor identidad y negro los idénticos.

