



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de la expresión a nivel de proteína de la ciclina
Zeama;CycD6;1 durante la germinación de maíz (*Zea mays*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JORGE ZAMORA ZARAGOZA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Jorge Manuel Vázquez Ramos

VOCAL: **Profesor:** Felipe Cruz García

SECRETARIO: **Profesor:** Francisco Javier Plasencia de la Parra

1er. SUPLENTE: **Profesora:** Martha Patricia Coello Coutiño

2° SUPLENTE: **Profesora:** Tzvetanka Dimitrova Dinkova

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 _____

SUSTENTANTE: Jorge Zamora Zaragoza _____

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABREVIATURAS.....	4
FIGURAS.....	5
TABLAS.....	5
APÉNDICES.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. El Maíz.....	6
1.2. Germinación.....	9
1.3. Ciclo Celular.....	12
1.3.1 Regulación y reguladores del ciclo celular.....	14
1.3.1.1. Las Cdks y su regulación.....	15
1.3.1.2. Ciclinas.....	17
1.3.1.2.1. Las ciclinas D y la transición G1/S.....	19
1.3.1.2.1.1. Ciclina D6;1.....	21
2. ANTECEDENTES.....	23
3. HIPÓTESIS.....	25
4.JUSTIFICACIÓN	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOLGÍA.....	26
6.1 Material biológico.....	26
6.1.1. Semillas de maíz.....	26
6.1.2. Cepas.....	26
6.1.3. Conejos	26
6.1.4. Plásmidos.....	26
6.1.5. Cultivos bacterianos.....	26
6.2. Técnicas generales.....	27
6.2.1. Electroforesis de DNA.....	27
6.2.2. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	27
6.2.3. Purificación de DNA plasmídico	27
6.2.4. Preparación de células competentes.....	27
6.2.5. Transformación de células competentes.....	28
6.2.6. Electroforesis de proteínas	28
6.2.7. Western blot	29
6.2.8. Inmunoprecipitación	29
6.2.9. Restauración de membranas	30
6.3. Obtención de Anticuerpos α -CycD6;1	30
6.3.1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de nt y aa de Zeama;CycD6;1.....	30
6.3.2. Amplificación de cDNA	30
6.3.3. Ligación en el vector de clonación	31

6.3.4. Clonación en el vector de expresión	31
6.3.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante	31
6.3.6. Inmunización de conejos y obtención del suero inmune	32
6.3.7. Ensayo de competencia	32
6.4. Ensayos de germinación	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1. Anticuerpos policlonales anti-CycD6;1.....	34
7.1.1. Elección del péptido utilizado para inmunizar conejos.....	34
7.1.2. Amplificación de cDNA del péptido inmunogénico.....	36
7.1.3. Clonación del cDNA en el vector de clonación pGem-T Easy	36
7.1.4. Clonación en el vector de expresión pGex-4T2	37
7.1.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante.....	39
7.1.6. Obtención y validación de anticuerpos policlonales anti-CycD6;1 (α -CycD6;1).....	40
7.2. Expresión de CycD6;1 durante la germinación	42
7.2.1. Expresión de CycD6;1 durante la germinación en inanición de sacarosa.....	43
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
8.1. Elección del péptido inmunogénico	46
8.2. Obtención y validación del suero inmune	47
8.3. CycD6;1 interacciona con CdkA	49
8.4. CycD6;1 durante la germinación	50
8.4.1. CycD6;1 durante la germinación en inanición de sacarosa	51
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS	54
11. REFERENCIAS	56
<i>Apéndice 1.....</i>	<i>61</i>
<i>Apéndice 2.....</i>	<i>68</i>
<i>Apéndice 3.....</i>	<i>69</i>
<i>Apéndice 4.....</i>	<i>70</i>

Resumen

Abordado desde el punto de vista molecular, podemos decir que la germinación inicia con la entrada de agua (imbibición) a la semilla quiescente, que desencadena un conjunto de procesos bioquímicos que permiten al embrión estar en condiciones de reiniciar la primera ronda de divisiones celulares exitosas (proliferación) en las zonas meristemáticas. Esta definición involucra necesariamente el proceso mediante el cual una célula da origen a dos células genéticamente iguales, es decir, el ciclo celular. La progresión del ciclo celular es regulada por la formación y activación de complejos proteínicos de las Cinasas Dependientes de Ciclina (Cdks) con sus subunidades reguladoras, las ciclinas. Las ciclinas tipo D actúan principalmente durante la fase G1 y en la transición hacia la fase S mediante la vía de RB, y constituyen un sensor de las condiciones extracelulares que permitan la proliferación celular. Sin embargo, gran parte de lo que sabemos acerca de los mecanismos de regulación del ciclo celular ha sido descrito en modelos animales y, a pesar de que dichos mecanismos son conservados en otros eucariontes, es necesario estudiarlos específicamente en el modelo de interés, ya que existen diferencias notables de una especie a otra. En plantas, la familia de ciclinas tipo D es considerablemente más numerosa que en mamíferos; por ejemplo, en nuestro grupo hemos reportado la expresión transcripcional de 15 de los 17 genes que conforman la familia de ciclinas D de maíz. Sin embargo, los patrones de expresión transcripcional de un gen no reflejan necesariamente su comportamiento a nivel de proteína.

En el laboratorio estamos interesados en analizar los mecanismos moleculares involucrados en la transición de la fase G1 a S durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Para estudiar el papel que las ciclinas D de maíz juegan en la regulación del ciclo celular y saber si son redundantes o no, es necesario contar con anticuerpos policlonales específicos que nos permitan identificar las proteínas mediante western-blot. Aquí se presenta el proceso de obtención de anticuerpos policlonales específicos que reconocen a la ciclina CycD6;1 de maíz así como su perfil de expresión proteínica durante la germinación de ejes embrionarios.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
aa	Aminoácido (s)
Arath	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albúmina sérica bovina
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
Cks	Subunidad de Cdk
Cyc	Ciclina
CycD	Ciclina tipo D
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GST	Glutación S-Transferasa
h	Horas
Ick	Inhibidor de Cdk
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KDa	Kilodaltones
Krp	Kip related protein
Krpm	1000x revoluciones por minuto
LB	Luria-Bertani
LB100	LB con ampicilina 100mM
mRNA	RNA mensajero
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Difluoruro de polivinildeno
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
tRNA	RNA de transferencia
Zeama	<i>Zea mays</i>

FIGURAS

1. Secciones verticales de la semilla de maíz madura
2. Esquema del brote de semilla de maíz germinada.
3. Procesos celulares asociados a la germinación.
4. Representación esquemática del ciclo celular.
5. Regulación de la actividad de CDK.
6. Representación esquemática de la transición G1/S
7. Péptido inmunogénico
8. Amplificación de cDNA de *cycD6;1* por RT-PCR.
9. Doble digestión de clonas candidatas de pGem-T Easy a tener el inserto.
10. Secuencia codificante teórica para la proteína recombinante (CDS) GST-CycD6;1.
11. Verificación de la clonación en el vector de expresión.
12. Alineamiento con ClustalW entre la secuencia de aminoácidos teórica y la resultante de la secuenciación.
13. Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-CycD6;1
14. Suero preinmune
15. Validación de anticuerpos α -CycD6;1 mediante ensayo de competencia.
16. Interacción CycD6;1 con CDKA.
17. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación.
18. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación en inanición de sacarosa.
19. Comparación de CycD6;1 durante la germinación en presencia y ausencia de sacarosa.

5

TABLAS

1. Clasificación taxonómica del maíz.
2. Composición química de las partes principales de la semilla de maíz.

APÉNDICES

1. Análisis in silico de la secuencia de aminoácidos de ZmCycD6;1
2. Esquemas de los vectores de clonación (pGem-T Easy) y de expresión (pGex-4T2).
3. *Primers* diseñados para amplificar y clonar CycD6;1 y condiciones de amplificación.
4. Esquema de inmunización.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Maíz

Hace aproximadamente 30 mil años el territorio mexicano fue habitado por primera vez por grupos nómadas de cazadores-recolectores; sin embargo, una de las primeras muestras de domesticación del teocinte (*Zea mays ssp. parviglumis*), el cual, por su cercanía filogenética se cree que es el ancestro silvestre del maíz actual (*Zea mays*), data de alrededor del año 3500 a.C. La constante selección de plantas de teocinte con mejores características por parte de estos grupos nómadas conllevó una rapidísima evolución produciendo así una nueva especie que morfológicamente difiere enormemente pero genéticamente es muy similar (Piperno *et al.*, 2009; Vela, 2011).

El maíz constituye, junto con otros elementos de la vida cotidiana, el centro de la cosmovisión mesoamericana como lo demuestra su papel fundamental en mitos de origen, donde se explica que el ser humano está hecho de maíz o procede de esta planta (Carrillo, 2009), y esto no es de extrañar si tomamos en cuenta la total dependencia mutua que existía entre la sociedad mesoamericana y el maíz, y por lo tanto, la expresión “Los hombres de Maíz” dista de ser únicamente una metáfora popular proveniente de la mitología mesoamericana (Perales, 2009).

La amplia extensión del cultivo de maíz en diversas culturas está principalmente dada por su importancia como alimento, la cual se ve reflejada en las representaciones del maíz que podemos encontrar en los registros de restos de cerámica y pinturas pertenecientes a estas culturas, especialmente en México, y en el centro y sur del continente Americano.

Al igual que otros integrantes de la familia de las gramíneas o Poaceae (Tabla 1), el maíz se compone principalmente por follaje. El tallo, similar al bambú, es delgado y segmentado por juntas o articulaciones llamadas nodos, y el espacio entre ellos se denomina internodo. De cada nodo sale una hoja en dirección opuesta a la que sale del nodo contiguo. El maíz, a diferencia de la mayoría de las gramíneas, posee flores unisexuales, es decir, la inflorescencia masculina está separada de la inflorescencia femenina.

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

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

La semilla madura, también llamada cariopsis, posee tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión. Estas difieren considerablemente en su composición química (Tabla 2). El pericarpio es la capa dura y transparente exterior de la semilla. El endospermo y el embrión representan genéticamente a la siguiente generación ya que poseen material genético de las líneas paterna y materna, a diferencia del pericarpio que, por derivar de la pared del ovario, es genéticamente idéntica a la planta madre. El endospermo representa aproximadamente 85% del peso total del grano y sirve de fuente de energía (en forma de gránulos de almidón y cuerpos proteicos) para el embrión durante varios días posteriores a la germinación.

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. Esta estructura está dividida en 5 o 6 nodos de los cuales 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.

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 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 propiciar que el coleoptilo emerja del suelo y junto con él, las hojas. La radícula por su parte se

encuentra cubierta por la coleoriza, estructura que sirve de protección a la raíz primaria durante la germinación (Vincent, 2002). Ver figura 2.

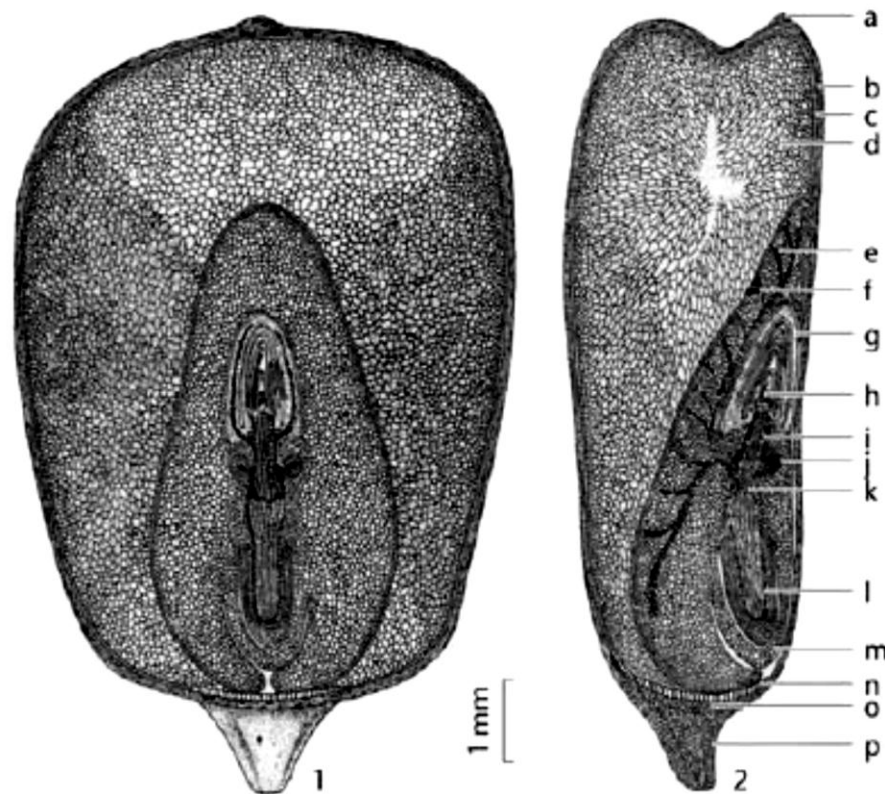


Figura 1. Secciones verticales de la semilla de maíz madura vista 1) de frente y 2) perfil. a) cubierta del estilo, b) pericarpio, c) aleurona, d) endospermo, e) escutelo, f) capa granular del escutelo, g) coleoptilo, h) plúmula, i) primer internodo, j) primordio de raíz lateral adventicia, k) nodo escutelar,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

Por su gran importancia en diversos ámbitos de la sociedad mundial actual, así como por la amplísima disponibilidad de información y estudios acerca de su biología, el maíz representa una excelente planta modelo para la ciencia básica y aplicada, así como para la vinculación de estas con otros sectores de la sociedad como son el agrícola e industrial en general. Es por esto que el maíz, a diferencia de otras plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, puede representar tanto el modelo como el objeto de estudio en sí. En nuestro grupo de trabajo hemos adoptado al maíz, particularmente la germinación de semillas, como nuestro modelo para el estudio del ciclo celular.

Tabla 2. Composición química de las partes principales de la semilla de maíz expresado en porcentaje según datos de la FAO. (<http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S03.htm>)

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

1.2. Germinación

La germinación es un proceso que generalmente tiene como resultado el establecimiento de una nueva planta en desarrollo a partir de una semilla madura, aunque esto último no depende de la germinación *per se*, sino de procesos de desarrollo ulteriores. Sin embargo, es difícil dar una definición concisa del concepto “germinación”, ya que el límite que divide el proceso germinativo del desarrollo de la planta es bastante confuso. A pesar de esto, delimitar la definición de germinación se vuelve crucial para poder realizar un trabajo científico al respecto. De este modo, es probable que la mejor manera de conciliar el problema de las variadas definiciones y confusiones sobre el proceso de germinación sea proporcionar no una definición universal, sino particular y en contexto con la perspectiva de quien necesita dicha definición para dirigir su estudio. Por ello, en el ámbito agronómico se tiene por término de la germinación el momento en que la plántula emerge de la superficie del suelo, mientras que desde el punto de vista de la fisiología vegetal, la germinación comprende únicamente hasta la elongación del eje embrionario, generalmente el extremo radicular, lo cual se hace visible cuando este atraviesa la cubierta de la semilla. Los procesos posteriores a la protrusión radicular o apical (cualquiera que ocurriera primero) no son, para el fisiólogo vegetal, parte de la germinación, sino del crecimiento y desarrollo de la planta. Es preciso apuntar que según esta definición de la fisiología vegetal, una semilla puede completar el proceso germinativo y detener su crecimiento para no emerger nunca del suelo, lo cual es absolutamente contradictorio para el enfoque agronómico (Bewley and Black, 1985).

Ya que en nuestro grupo de trabajo nos hemos enfocado a estudiar el ciclo celular durante la germinación del maíz, nos es preciso adoptar una definición de la germinación distinta a la de agrónomos y fisiólogos, puesto que nuestro campo de

estudio pertenece a la biología molecular. Así pues, desde nuestro punto de vista, definimos a la germinación como la serie de eventos bioquímicos que llevan a la célula a la consecución del primer ciclo celular completo y a la multiplicación celular restante (Vázquez Ramos, 1990). Dichos procesos incluyen la hidratación de membranas y demás estructuras celulares, reactivación de proteínas y ribosomas, aumento de la actividad respiratoria, síntesis de macromoléculas, elongación celular, es decir, aquellos involucrados en el paso desde una semilla quiescente, casi totalmente deshidratada y con un metabolismo casi nulo, a una semilla con metabolismo muy activo que resulta en el crecimiento del embrión. (Vázquez Ramos, 1990; Bewley and Black, 1985). La definición anterior sugiere que una vez que las células de una semilla reactivan el metabolismo celular y completan la primera ronda de divisiones celulares, la semilla puede continuar los procesos de proliferación y crecimiento durante el desarrollo según su propio programa genético y así dar lugar a la planta.

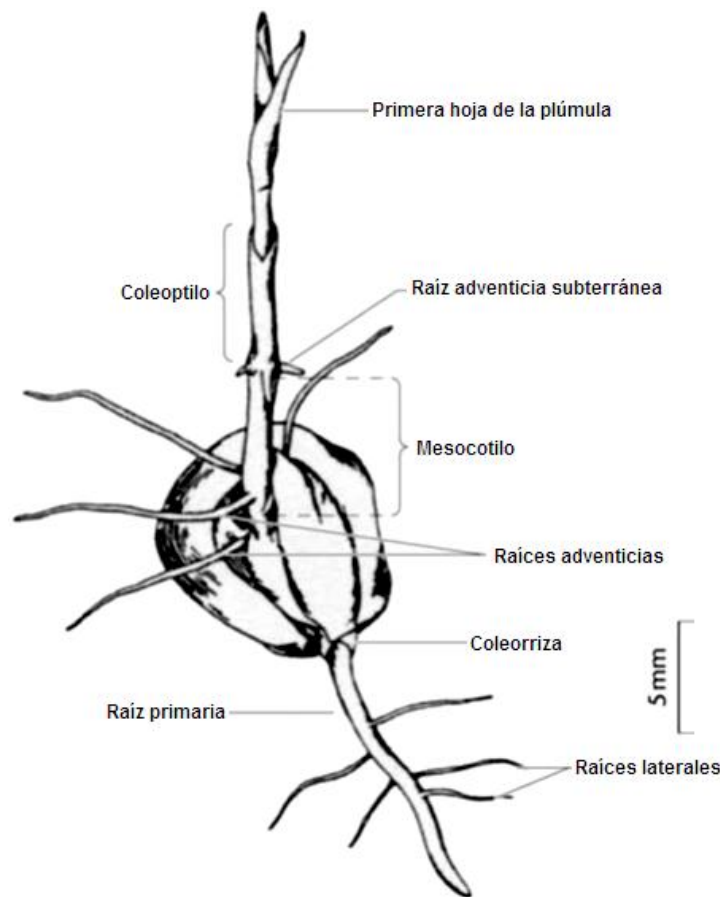


Figura 2. Esquema del brote de semilla de maíz germinada. Se observan etapas tempranas del desarrollo de varios tipos de raíz y de la hoja. Modificado de Freeling y Walbot, 1994.

Cabe señalar que si bien el término de la germinación es confuso y por ello podemos darnos la libertad de delimitarlo según nuestro enfoque, el inicio de la germinación es siempre la entrada de agua a la semilla quiescente, puesto que se sabe que bajo condiciones adecuadas de temperatura y oxígeno, la toma de agua es suficiente y necesaria para que la germinación comience (Mayer y Poljakoff, 1975).

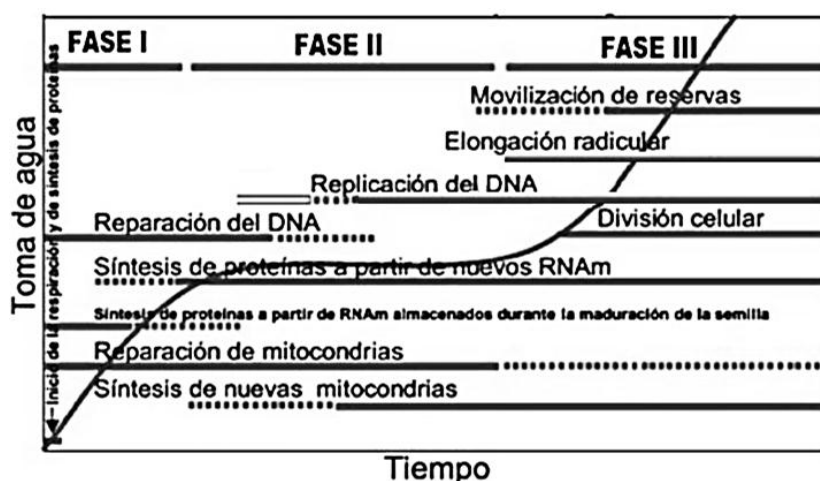


Figura 3. Procesos celulares asociados a la germinación. El esquema relaciona procesos de la célula en relación al tiempo y a la entrada de agua a la semilla.

Con base en la definición bioquímica de germinación, el ciclo celular toma un papel trascendental en la regulación de este proceso, puesto que se sabe que la reactivación del ciclo celular en el meristemo radicular precede a la protrusión de la radícula. Dicha reactivación del ciclo celular está dada principalmente por la expresión de los genes de ciclinas D, y por lo tanto, estos genes son reguladores importantísimos de la velocidad de germinación (Masubelele *et al.*, 2005).

En semillas secas de *Arabidopsis*, las células del embrión quedan arrestadas en la fase G1 del ciclo celular (Bewley y Black, 1994). De igual manera, la mayoría de las células embrionarias de maíz quedan arrestadas en G1 durante su maduración (Deltour y Jacqmard, 1974), y nuestro grupo ha reportado que el ciclo celular se reactiva estando aún en esta fase durante las primeras 6 horas posteriores a la imbibición, mientras que a fase S comienza cerca de las 12 horas y alrededor de las 28 a 32 horas después de la imbibición se observan células en

fase M, coincidiendo esto con la protrusión de la radícula (Baíza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991; Herrera *et al.*, 2000).

Como se ha visto, la germinación de semillas proporciona un modelo fisiológico excelente para el estudio de la reactivación de la proliferación ya que en semillas secas la mayoría de las células, si no es que todas, se encuentran detenidas en la fase G1, particularmente las que están en las zonas meristemáticas. La toma de agua por parte de la semilla seca activa el metabolismo gradualmente (fig. 3) así como el ciclo celular. 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). Incluso, algunas de ellas no sufren modificaciones en dichos niveles a lo largo del proceso germinativo, como por ejemplo las DNA polimerasas y las Cdks, aunque sí se observan cambios en su actividad (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003). Las ciclinas por su parte muestran un comportamiento fluctuante durante la germinación, con una correlación parcial con su actividad de cinasa asociada (Quiroz-Figueroa and Vázquez-Ramos, 2006; Lara-Núñez *et al.*, 2008).

12

1.3. Ciclo Celular.

Todos los seres vivos, desde las bacterias hasta los mamíferos, son producto de repetidas rondas de crecimiento y división celular. En el caso de los organismos unicelulares, una sola ronda de crecimiento y división resulta en un nuevo individuo, pero para organismos multicelulares son requeridas secuencias largas y complejas de estos procesos para poder originar un organismo funcional.

Todas las células se reproducen llevando a cabo una secuencia unidireccional de eventos ordenados durante los cuales el material celular se divide de manera aproximadamente equitativa en dos nuevas células. Sin embargo, dentro de este material celular, el DNA debe ser estrictamente duplicado y repartido de manera exacta en las dos células, de modo que cada una cuente con una copia completa del genoma de la especie, puesto que es este el que contiene codificada la

información necesaria para el desarrollo de un nuevo individuo. Esta serie ordenada de eventos de duplicación (replicación) del material genético y su posterior segregación, junto con el material celular restante, en las células nuevas se denomina ciclo celular, y en él recae la principal función de todo ser vivo: la reproducción.

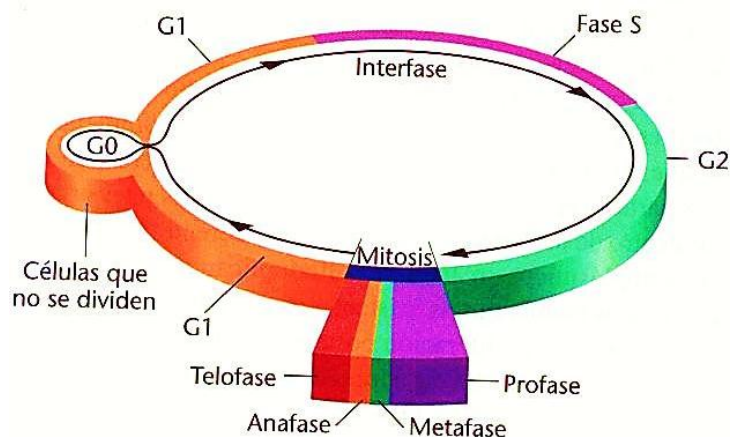


Figura 4. Representación esquemática del ciclo celular (Klug y Cummings, 1999)

Metabólicamente, el ciclo celular puede verse como una sucesión de la fase de replicación y crecimiento celular (interfase), y la fase de segregación equitativa del DNA (mitosis). Sin embargo, en realidad el ciclo celular comprende una serie de procesos cuya organización va más allá de lo que hemos dicho. Esto se hace patente en las células eucariontes, las cuales poseen un sistema de regulación del ciclo celular mucho más complejo y fino que el de las células procariontes. La caracterización y estudio de este sistema de regulación ha permitido la identificación de tres fases previas a la separación de los cromosomas, las cuales constituyen la interfase (fig. 4). Estas tres fases tienen distintos propósitos, como son la percepción de que las condiciones extra e intra celulares sean óptimas para poder inicial y concluir el ciclo celular (fase G1) ya que una vez que la célula entra a este proceso debe concluirlo pues de lo contrario puede quedar arrestada a mitad del ciclo o incluso entrar en apoptosis. Una vez que se ha percibido estas condiciones óptimas, el material genético debe replicarse, lo cual ocurre durante la fase de síntesis o fase S. Concluida esta, durante la fase G2 se asegura la integridad y duplicidad del genoma para que, durante la fase M (mitosis) pueda repartirse en dos núcleos que formarán parte cada uno de una de las dos células

hijas. Cuando el material genético queda repartido en ambos núcleos, únicamente queda la fase de citocinesis, donde las células hijas se separan físicamente (Vázquez Ramos, 2003; Alberts *et al.*, 2002).

La organización básica del ciclo celular y su sistema de control son esencialmente los mismos en todas las células eucariontes, lo cual nunca significa que sean exactamente iguales, puesto que existen características como el tiempo de duración de cada fase que pueden variar no solo de una especie a otra, sino de un tipo celular a otro dentro de un mismo organismo, es por esto que podemos estudiar el proceso del ciclo celular de manera global en muchos modelos celulares diferentes, pero debemos ser cautelosos con los resultados derivados de dicho estudio, pues pueden ser específicos del modelo que se utilice.

1.3.1 Regulación y reguladores del ciclo celular.

El ciclo celular es un proceso importantísimo en el desarrollo de cualquier organismo y, por lo tanto, es comprensible que la evolución se haya encargado de imponer sobre él un muy estricto control de moléculas catalíticas cuya actividad es regulada muy finamente. El control y regulación de los eventos de proliferación en eucariontes se llevan a cabo a todo lo largo del ciclo celular; sin embargo, existen tres puntos de regulación muy estrictos, ampliamente estudiados y bien referidos en la literatura. Estos son: 1) la transición de la fase G1 hacia la fase S (la cual se analizará con detalle más adelante), 2) la transición de G2 a M y 3) el alineamiento de los cromosomas condensados en el centro de la célula durante la metafase en la mitosis.

Grosso modo, la progresión del ciclo celular está determinada por distintas proteín-quinasas de serina y treonina que requieren la unión de una subunidad regulatoria llamada ciclina para poder activarse, y por lo tanto son denominadas Cinasas dependientes de ciclina (Cdks). Uno de los sustratos más conocidos de estas Cdks que es fosforilado en una fase específica del ciclo celular es la histona H1 en cromosomas mitóticos. Otra proteína blanco de los complejos ciclina-kinasa bien caracterizada durante el ciclo celular es la proteína de retinoblastoma (Rb), cuya fosforilación juega un importante papel en la transición G1/S. En otros casos,

la fosforilación mediada por Cdks sirve para la eliminación de componentes específicos del ciclo celular, ya que el reconocimiento de proteínas blanco para proteólisis mediada por ubiquitinación normalmente requiere de fosforilaciones previas. En este contexto, es necesario señalar que estas degradaciones mediadas por la actividad de ciertas Cdks se dan en tiempos específicos sobre componentes necesarios de la fase que concluyó, de manera que la célula no puede regresar a dicha fase y, por lo tanto, el ciclo adquiere una secuencia unidireccional de sus fases (King *et al.*, 1996).

1.3.1.1. Las Cdks y su regulación.

Las Cdks actúan diferencialmente en las distintas etapas del ciclo celular. Como ejemplo tenemos que en *Arabidopsis thaliana*, los niveles de mRNA de CdkA no varían a lo largo del ciclo celular, pero su actividad de cinasa aumenta en la fase G1 y permanece alta durante la fase S. Por otra parte, en células BY-2 de tabaco, la actividad de cinasa de CdkA permanece alta durante G2, mientras que en células de *Arabidopsis* hay una reducción en esta actividad durante G2 y aparece un segundo pico de actividad en la transición hacia la fase M. Las Cdks de tipo B son únicas de plantas y su expresión transcripcional está regulada por la progresión del ciclo celular, lo cual no se ha observado en ningún otro tipo de Cdk en ninguna otra especie. Las CdkB1 se expresan desde el inicio de la fase S hasta la fase M en la mayoría de las especies examinadas (revisado en Dewitte y Murray, 2003).

Las Cdks poseen sitios de unión a ATP y a su sustrato dentro de la región catalítica, la cual se encuentra entre los lóbulos formados por los extremos N-terminal y C-terminal. La unión de la respectiva ciclina estabiliza al sitio catalítico (revisado por Joubés *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de la unión de la ciclina, el sitio activo de la Cdk permanece restringido por una estructura de asa llamada “loop T”, la cual al ser fosforilada en un residuo conservado de treonina (T160) cambia su conformación para permitir la correcta unión del sustrato y el acceso al grupo γ -fosfato del ATP unido al sitio activo. Esta fosforilación activadora en T160 es llevada a cabo por una Cinasa Activadora de Cdk (Cak) (revisado por Dewite, 2003).

Además de la unión con ciclinas y la fosforilación por Cak, existe una regulación de la actividad de Cdk dada por fosforilación inhibitoria en los residuos T14 y Y15 catalizada por la cinasa Wee1. Esta regulación ya ha sido reportada tanto en *Arabidopsis* como en maíz (Sun *et al.* 1999; Sorrell *et al.*, 2002).

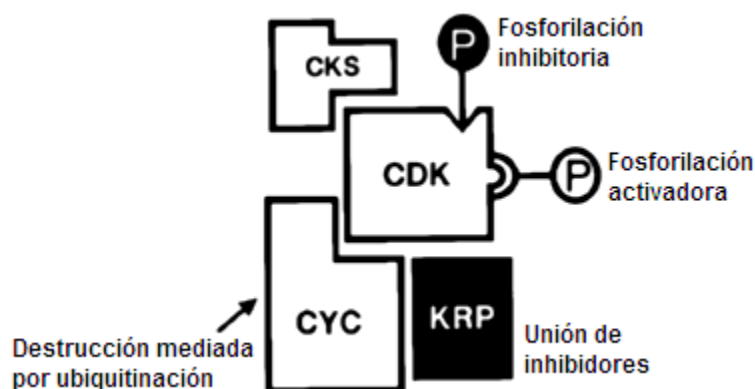


Figura 5. Regulación de la actividad de CDK. Modificado de Dewitte y Murray, 2003.

Para que la Cdk pueda ser activada entonces, es necesario que estas fosforilaciones en T14 y Y15 sean removidas. En lavadura y en mamíferos, esta fosfatasa se denomina Cdc25, y aunque aún no se conoce algún homólogo directo en plantas, es probable la existencia de un equivalente funcional (Dewitte y Murray, 2003).

Así como las ciclinas son proteínas que promueven la actividad de las Cdk, existe otro tipo de proteínas que se unen a los complejos ciclina-cinasa para regularlos negativamente, estas son denominadas inhibidores de Cdk (Ick) y a pesar de poseer una función regulatoria esencial en el ciclo celular, la conservación de secuencia entre los Ick de animales (Kip) y los de plantas (Kip Related Proteins o Krp) es muy limitada; sin embargo, las Kip y Krp poseen homología de función (Wang *et al.*, 1999). Otro regulador del complejo ciclina-cinasa es la subunidad de Cdk (Cks) que puede actuar como inhibidor o activador de la actividad de CDK y aparentemente su función es importante para el correcto andamiaje del complejo ciclina-Cdk con sus respectivos sustratos (Bourne *et al.*, 1996).

Cabe mencionar que las Cdk pueden funcionar también fuera del ciclo celular y regular otros procesos. Por ejemplo, CdkA, además de su función regulatoria en la interfase, juega un papel importante en el control de la dinámica

de los microtúbulos y por lo tanto, en la progresión de la mitosis (Steinborn *et al.*, 2002). Además de ello, se le ha asociado una función crítica en la reprogramación de células diferenciadas que, adyacentes a un daño tisular en gametoforos, regresan a un estado proliferativo desdiferenciado en *Physcomitrella patens* (Ishikawa *et al.*, 2011). Otro caso es el de CdkB1;1, cuya supresión reduce el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* principalmente mediante la inhibición de la elongación, independientemente de la división celular o la endoreduplicación (Yoshizumi *et al.*, 1999).

1.3.1.2. Ciclinas.

Las primeras ciclinas se identificaron en huevos de erizo de mar como unas proteínas cuyos niveles de acumulación fluctuaban durante el ciclo celular y es a ello que deben su nombre, es decir, a su aparición transitoria y cíclica (Evans *et al.*, 1983). Estas proteínas constituyen el mecanismo principal de control de la actividad de Cdk, ya que sin la unión de la ciclina, la subunidad Cdk es inactiva (revisado por Dewitte y Murray, 2003).

Las ciclinas son una superfamilia de proteínas con homología relativamente baja, pero que comparten una región poco conservada de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos denominada centro de ciclina, el cual a su vez está constituido por dos dominios, el dominio ciclina amino y ciclina carboxilo. (Nugent *et al.*, 1991; Noble, *et al.*, 1997)

El dominio ciclina amino es el que define a las ciclinas por ser el más conservado entre ellas, además de poseer 5 aminoácidos no contiguos altamente conservados que se saben esenciales para la función de las ciclinas mitóticas (ciclinas tipo A y B) y que están presentes igualmente en las ciclinas D (Menges *et al.*, 2007). El dominio ciclina carboxilo es menos conservado y está presente en muchas pero no todas las ciclinas, lo cual sugiere que pueda tener una función específica pero no crítica (Wang *et al.*, 2004).

La acumulación de las ciclinas depende ampliamente tanto de la regulación transcripcional, como del recambio proteico dado por un balance específico entre la traducción de mensajeros y la degradación de las proteínas. Las ciclinas de tipo A y

B poseen un motivo llamado “caja de destrucción” que las identifica para ser removidas por el complejo promotor de anafase (APC), mientras que las ciclinas D poseen cajas PEST para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma (revisado por Dewitte y Murray, 2003).

Existen muy diversos tipos de ciclinas en los organismos eucariontes, y algunos de ellos están conservados entre animales y plantas; sin embargo, también existen familias de ciclinas particulares a algunas especies. Por ejemplo, sabemos que en el genoma humano existen 22 genes de ciclinas que se agrupan con base en el análisis de su función y secuencia de aminoácidos (Nakamura *et al.*, 1995; Pines, 1995). Estos grupos son A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, T Y UNG2, y solo 5 de ellos (A, B, C, H, L) están presentes en plantas, aunque el grupo C solo se ha encontrado en *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2004). Por otro lado, existen tipos de ciclinas que solo se encuentran en plantas, como son las ciclinas tipo D que aunque se denominan igual que las ciclinas D de animales, forman un grupo distinto y no muestran homología de secuencia con ellas, aunque sí poseen funciones similares. Lo mismo ocurre con las ciclinas T y F, que en plantas fueron nombradas así porque son similares en secuencia a las ciclinas T y F de mamíferos, pero aunque las T están relacionadas igualmente a las T, H y L de humanos, no son ortólogos y forman un grupo aparte, lo mismo que las F, las cuales aparentemente son particulares de monocotiledóneas (Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006). También son específicas de plantas las ciclinas SDS que participan en la meiosis (Azumi *et al.*, 2002) y la ciclina J18 que aparentemente solo está presente en *Arabidopsis*. Las ciclinas U tampoco están presentes en mamíferos, pero en el 2004 Wang *et al.* mostraron que están filogenéticamente agrupadas con al menos tres genes de protistas.

Las ciclinas A y B participan en la transición G2/M, mientras que las ciclinas D actúan durante la fase G1 y en la transición hacia la fase S. Las tres familias de ciclinas (A, B y D) son considerablemente más numerosas en plantas que en animales, por lo que es de esperar que posean más de una función o estén asociadas a otros procesos independientemente de su participación en el ciclo celular, o bien, también cabe la posibilidad de que algunos parálogos sean redundantes.

1.3.1.2.1. Las ciclinas D y la transición G1/S.

Como vimos, los complejos ciclina-cinasa actúan fosforilando sustratos específicos, lo cual provoca, junto con los procesos de degradación de proteínas, la progresión ordenada y unidireccional de las fases del ciclo celular. En nuestro grupo de trabajo hemos enfocado nuestra atención en uno de los principales puntos de regulación del ciclo celular y tiene relación justamente con esta actividad de los complejos Cyc/Cdk: la transición de la fase G1 a la fase S. Durante este proceso, tanto en animales como en plantas, están involucradas principalmente las ciclinas de tipo D.

Estructuralmente, todas las ciclinas D poseen el dominio ciclina amino pero el ciclina carboxilo está solo en algunas. Todas poseen también los 5 aminoácidos no contiguos que son esenciales para la estructura de ciclina. Además, todas excepto la CycD6;1, poseen el motivo LxCxE hacia el extremo amino. Este último está muy conservado en todas las ciclinas D (plantas y animales) y es esencial para la unión a la proteína Rb (Ewen *et al.*, 1993; Soni *et al.*, 1995) pues se ha demostrado que, *in vitro*, las ciclinas D de plantas que tienen mutado este motivo son incapaces de unirse a la proteína RBR. (Ach *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 1998)

El papel fundamental de las ciclinas tipo D es integrar las señales extracelulares con la maquinaria del ciclo celular (Sherr, 1995). La fase G1 está involucrada en la percepción y respuesta a señales de crecimiento, de desarrollo y ambientales (Oakenfull *et al.*, 2002) que permitirán a la célula progresar apropiadamente a lo largo de cada una de las demás fases hasta completar exitosamente el ciclo celular. Cuando existen las condiciones favorables para que la célula prolifere, las ciclinas D forman complejos con una Cdk, que en el caso de animales puede ser Cdk4 o Cdk6 y una vez ensamblado el complejo, Cdk4 debe fosforilarse en la treonina 172 (T172) para adquirir actividad de cinasa. Esta fosforilación en T172 se debe al complejo de una Cak con ciclina H (Sherr, 1994).

En plantas, las ciclinas D forman complejos con la CdkA durante la fase G1 (Oakenfull *et al.*, 2002) y se ha visto que, analógicamente al mecanismo de activación por Cak, existe un residuo de treonina fosforilable (T191) necesario para

la actividad del complejo y su importación al núcleo (Nakagami *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha visto que si no existen condiciones favorables para la proliferación, como fuentes de carbono y señales hormonales, el complejo está unido a un Ick que puede ser de la familia Ink4 o de tipo kip (Krp en plantas) (Toyoshima y Hunter, 1994; Lee *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997).

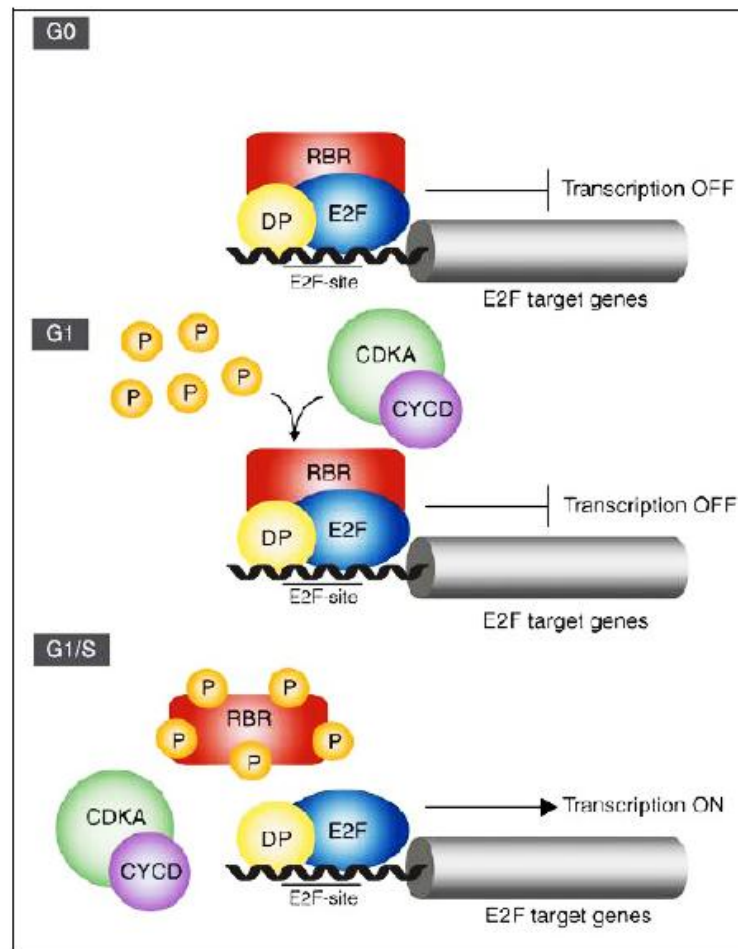


Figura 6. Representación esquemática de la transición G1/S.

Una vez que el complejo cycD-Cdk es activo, puede entonces fosforilar a la proteína Rb (llamada así por habersele descubierto en células de retinoblastoma) en múltiples sitios ubicados principalmente en el extremo carboxilo de esta (Nakagami *et al.*, 2002). En estado hipofosforilado, la proteína Rb se encuentra unida al factor de transcripción E2F, impidiendo que este se una a los promotores de sus genes blanco; pero conforme Rb pasa a un estado hiperfosforilado, se desprende de E2F y este puede entonces unirse a una secuencia canónica en los promotores de genes que reconoce (revisado en Inzé y De Veylder, 2006), y que

en general, son genes cuyas proteínas serán necesarias para el comienzo y la progresión de la fase S (fig. 6).

Aparentemente E2F no controla únicamente la transcripción de genes relacionados con el ciclo celular, pues un estudio del genoma de *Arabidopsis* mostró que cerca de 6 mil genes son potencialmente regulados por E2F, de los cuales, apenas una tercera parte se relacionan al ciclo celular (Ramirez-Parra *et al.*, 2003). Sin embargo, por medio de microarreglos y herramientas bioinformáticas, fue posible identificar 70 genes blanco de E2F putativos que se conservan entre *Arabidopsis* y arroz. Estos genes codifican para proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, replicación del DNA y en la dinámica de la cromatina (Vandepoele *et al.*, 2005).

1.3.1.2.1.1. Ciclina D6;1.

En maíz hay al menos un gen de ciclina de cada uno de los 7 subgrupos en los que está dividida la familia de ciclinas D de plantas. Algunas de las ciclinas D poseen cajas PEST, lo cual sugiere que pueden degradarse vía proteasoma (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), tal como sucede con la CycD3;1 de *Arabidopsis*. (Planchais *et al.*, 2004).

En particular, *cycD6;1* es el único miembro del subgrupo de genes *cycD6* en maíz y genómicamente tiene una organización típica de las ciclinas D que consiste de 6 exones y 5 intrones. Por otra parte, una característica de CycD6;1 que la distingue de todas las demás ciclinas D es que carece del motivo de unión a RBR (LxCxE). Al igual que otras CycDs, *Zeama;CycD6;1* es regulada por fitohormonas al menos a nivel de mRNA durante la germinación de ejes embrionarios, pues cuando esta se produce en presencia de benciladenina, el nivel de transcrito decrece al inicio, pero se recupera a niveles normales hacia las 16 horas postimbibición. No pasa lo mismo con ácido abscísico, pues con esta condición la expresión se inhibe significativamente durante el proceso germinativo (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

En cuanto a la función específica que CycD6;1 pueda tener, solo se sabe que en plántulas participa importantemente en el proceso de formación de patrones

celulares mediante divisiones formativas asimétricas de células madre de raíz conocidas como células iniciales de corteza y endodermis (cortex/endodermis initial cells; CEI), y en plantas adultas, en la formación de primordios que darán origen a raíces laterales, pero no es importante para las divisiones proliferativas. El gen *cycD6;1* es regulado directamente por los factores transcripcionales Shortroot y Scarecrow. Así mismo, se ha visto que semillas de *Arabidopsis* mutantes en el gen de *cycD6;1* no se ven afectadas significativamente en el proceso de germinación (Sozzani *et al.*, 2010).

2. ANTECEDENTES

- Los distintos patrones de expresión de CycDs de maíz sugieren que no son redundantes, sino que pueden tener funciones importantes en distintas fases del ciclo celular así como en diferentes tejidos de la planta (Buendía-Monreal *et al.*, 2011).
- En general, la acumulación de transcrito de CycDs de maíz aumenta o es máxima a tiempos tardíos de germinación (18 y 24 h postimbibición), y existe evidencia de que las CycDs están presentes y activas en la fase G2 (Kono *et al.*, 2003), lo cual indica que no están restringidas a una sola fase del ciclo celular.
- A nivel de proteína, Zeama;CycD5;3 y Zeama;CycD4;2 incrementan sus niveles a lo largo de la germinación con un máximo de acumulación a las 18 h, lo cual concuerda con la reactivación del metabolismo por la entrada de agua y por tanto, con la reactivación del ciclo celular (Lara-Núñez *et al.*, 2008).
- La proteína CycD2;2 de maíz puede formar complejos con otras proteínas del ciclo celular como CdkA y PCNA, presentándose estos en distintos tiempos de la germinación (Gutierrez *et al.*, 2005).
- En células en proliferación se presentan diferentes combinaciones de las distintas CycDs unidas a diferentes Cdks, sugiriendo que sus funciones no son redundantes y probablemente regulan la progresión de la fase G1 respondiendo diferencialmente a señales extracelulares (Sherr, 1995).
- La sacarosa es un factor nutricional que regula la expresión de diversos genes y proteínas del ciclo celular. RBR y E2F de plantas son sometidas a degradación vía proteasoma cuanto no hay sacarosa en el medio de cultivo (Hirano *et al.*, 2011). La expresión de CycD2 de Arabidopsis es inducida mediante la adición de sacarosa en el medio de cultivo (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999), mientras que la inducción de la expresión del gen Zeama;CycD2;2 por citocininas se lleva a cabo solo en presencia de sacarosa.

- A nivel de transcrito, Zeama;CycD6;1 no está presente durante las primeras horas de germinación, pero su expresión aumenta hacia las 24 h postimbibición, correlacionando con el aumento en la actividad metabólica que se observa durante la germinación a partir de la entrada de agua. Respecto a los tejidos analizados (mesocotilo, raíz y hoja), el mRNA de Zeama;CycD6;1 se acumula mayoritariamente en la raíz, la cual posee una alta actividad proliferativa y concuerda con la localización de la proteína homóloga de Arabidopsis, Arath;CycD6;1 (Sozzani *et al.*, 2010; Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la expresión transcripcional de un gen no refleja la acumulación de la proteína y que la función recae sobre esta, es necesario contar con anticuerpos capaces de reconocer a la proteína de interés, en este caso la CycD6;1, para estudiar su patrón de acumulación y, posteriormente, inferir una posible función.

4. HIPÓTESIS

La proteína CycD6;1 estará presente en semillas secas de maíz y su patrón de acumulación durante la germinación será modificado cuando esta se lleve a cabo en inanición de sacarosa.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Evaluar la acumulación de la proteína Zeama;CycD6;1 durante la germinación tanto en condiciones normales (sacarosa al 2%) como en inanición de sacarosa.

5.2 Objetivos particulares.

- Obtener anticuerpos policlonales específicos contra la proteína CycD6;1.
- Determinar el patrón de acumulación de la proteína Zeama;CycD6;1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.
- Determinar el patrón de acumulación de la proteína Zeama;CycD6;1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz en inanición de sacarosa.

6. MATERIALES Y MÉTODOLGÍA

6.1 Material biológico

6.1.1. Semillas de maíz

Para los ensayos de germinación se utilizaron ejes embrionarios de semillas secas de maíz (*Zea mays* var. Chalqueño) extraídos con escalpelo y lavados con solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y agua desionizada estéril.

6.1.2. Cepas

Las cepa utilizada para la clonación en los plásmidos de clonación y expresión fue *E. coli* DH5- α , mientras que para la expresión de la proteína recombinante se usó la cepa *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL.

6.1.3. Conejos

Para la inmunización se utilizaron conejos macho cepa Nueva Zelanda.

26

6.1.4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados para la clonación del segmento de DNA codificante para el péptido inmunogénico y para la expresión de la proteína recombinante fueron pGem-T Easy (Promega) y pGex-4T2 (GE Healthcare) respectivamente. Este último cuenta con un promotor inducible por IPTG que permite expresar una proteína de fusión con GST (Glutación S-transferasa) en el extremo amino y el péptido de interés en el extremo carboxilo. Ambos tienen un gen de resistencia a ampicilina para la selección de colonias de células transformantes (apéndice 2).

6.1.5. Cultivos bacterianos

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio Luria-Bertani con ampicilina 100 μ g/mL (LB100) a 37°C en agitación constante (excepto en la preparación de células competentes, donde se utilizó medio LB). Los cultivos de volúmenes pequeños (≤ 5 mL) fueron contenidos en tubos de ensayo, mientras que para volúmenes grandes (≥ 50 mL) se emplearon matraces Erlenmeyer de al menos

el doble de capacidad que el volumen a contener para permitir una buena oxigenación del cultivo y favorecer así el crecimiento de las bacterias. Los cultivos sólidos se hicieron en agar LB100 contenido en cajas Petri. Tanto el medio LB como el agar LB se esterilizaron en autoclave y cuando la temperatura hubo descendido a $\approx 40^{\circ}\text{C}$, se añadió la ampicilina necesaria para obtener LB100.

6.2. Técnicas generales

6.2.1. Electroforesis de DNA

Para verificar todas las transformaciones de células competentes, las reacciones de amplificación y las de digestión de DNA, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1.5% preparado con solución amortiguadora TAE 1x (Tris 50mM, acetato de sodio 1mM, EDTA 2mM) pH 8.5 teñido con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador (UV-Transilluminator, UVP inc). Las fotografías de geles presentadas se obtuvieron con los equipos Fluor-S MultiImager (Bio-Rad) y Digital science Image Station 440CF! (Kodak).

6.2.2. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

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

6.2.3. Purificación de DNA plasmídico

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

6.2.4. Preparación de células competentes

Para preparar células competentes de las cepas utilizadas de *E. coli*, se inocularon 3mL de medio LB con la cepa correspondiente y se incubaron 12 h a 37°C en agitación constante. De este cultivo se tomaron 0.3mL para inocular 250 mL de medio LB contenido en un matraz Erlenmeyer y se incubó 3 h a 37°C en

agitación constante. Pasadas las 3 h, se trasvasó el cultivo a tubos falcon y se colocaron en hielo durante 15 minutos para posteriormente empastillar las células a 4 Krpm por 10 minutos. Las pastillas se lavaron con agitación muy suave con un total de 20mL de cloruro de calcio 0.1M y se volvieron a incubar en hielo 20 minutos. Se centrifugaron los tubos a 4 Krpm por 10 minutos nuevamente y se lavaron las pastillas por agitación muy suave con 1.5mL en total de cloruro de calcio 0.1M. Se repartió el volumen final en alícuotas de 100µL en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad y se incubó en hielo 1 h. Las células fueron almacenadas a -70°C.

6.2.5. Transformación de células competentes

Para realizar la transformación de células competentes con productos de ligación, se utilizaron 10µL de esta reacción. Para transformar con plásmido purificado por miniprep, se utilizaron 2µL del eluato. Se agregó el volumen correspondiente de DNA (de ligación o plásmido purificado) a 100µL de células competentes y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Pasados los 45 minutos, se aplicó un choque térmico a 42°C por 2 minutos y se regresó al hielo por 5 minutos más. Se añadió 1mL de medio LB y se incubó 1 h a 37°C en agitación. En caso de haber transformado con productos de ligación, se centrifugaron las bacterias 1minuto a 5Krpm, se desechó el exceso de medio LB y las células se resuspendieron en el medio restante para luego plaquear con todo el volumen en cajas Petri con agar LB100. Si la transformación se realizó con plásmido purificado, se tomaron 200µL de medio con bacterias sin empastillar y se plaquearon en agar LB100. Las cajas Petri inoculadas se incubaron toda la noche a 37°C para poder observar la formación de colonias.

6.2.6. Electroforesis de proteínas

Para verificar la presencia de proteínas y para los ensayos de western blot se realizaron electroforesis en gel Tris-glicina desnaturalizante de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). El gel se preparó como se indica en Sambrook *et al.*, 1989 y se corrió a 85 volts hasta que el frente de corrida pasara el gel concentrador, luego a 107 volts durante el corrimiento en el gel separador. El amortiguador de electrodos

utilizado fue de Tris-glicina-SDS 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga 1x (SDS 2%, β -mercaptoetanol 2mM, glicerol 4%, Tris-HCl pH 6.8 40mM, azul de bromofenol 0.01%) y calentando a 85°C por 7 minutos.

6.2.7. Western blot

Para los ensayos de western blot se realizaron SDS-PAGE y se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Millipore) en el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) a 2.5 A y 25V por 14 minutos. Las membranas fueron bloqueadas con una disolución al 10% de leche en PBS-Tween20 0.1% por 2 h y luego incubadas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una disolución al 5% de leche en PBS-Tween20 0.1% durante 12 h a 4°C en agitación. Terminado el tiempo de incubación se hicieron tres lavados de 15 minutos con PBS-Tween20 0.1%, se incubaron con un anticuerpo anti-conejo acoplado a una peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación y se repitieron los tres lavados de 15 minutos. Posteriormente se bañaron las membranas con 0.5mL de la solución de detección por quimioluminiscencia Western Blotting Detection Reagent (Millipore). El revelado se hizo en placas fotográficas Hiperfilm ECL 18x24cm (Kodak) utilizando la disolución de revelado GBX developer (Kodak) y de fijación GBX fixer (Kodak).

29

6.2.8. Inmunoprecipitación

En tubos de microcentrífuga de 0.6mL se incubó 15 μ L de agarosa magnetizada-proteína A (Millipore) con 6 μ L de suero inmune por 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Se adicionaron 150 μ g de proteína (cuantificada en extractos proteicos) y se incubaron toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se colocaron los tubos en la base imantada del kit (Millipore) para retirar el sobrenadante y se lavó la agarosa 3 veces con 200 μ L del buffer A (del proveedor) y se cargaron los 15 μ L de agarosa en un SDS-PAGE para realizar el ensayo de western blot.

6.2.9. Restauración de membranas

Para identificar proteínas en una membrana usada, esta se trató con la Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo SCIENTIFIC) por 30min en agitación. Antes y después de este tratamiento las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS-Tween20 0.1%

6.3. Obtención de Anticuerpos α -CycD6;1

Para obtener anticuerpos policlonales específicos contra la proteína CycD6;1 se escogió una secuencia de aminoácidos que satisficiera dos criterios fundamentales: 1) que fuera potencialmente inmunogénica; y 2) que fuera diferencial respecto a las demás ciclinas D de maíz.

6.3.1. Análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de Zeama;CycD6;1

Para predecir la inmunogenicidad del péptido se utilizaron programas computacionales. El primero, EMBOSS: Antigenic (Kolaskar, 1990), predice regiones antigénicas a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína completa. Después se analizó la secuencia de aa en el programa NetSurfP ver. 1.1 - Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions (Petersen, 2009. <http://expasy.org/tools/>) que predice la accesibilidad de la superficie de la proteína y su estructura secundaria con un valor de confianza denominado *Z-score* relacionado a la predicción de superficie. Para comparar la secuencia de todas las ciclinas D de maíz y escoger un péptido que difiriera entre todas, se hizo un alineamiento y una matriz de identidad con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.1.3.0 (Hall, 1999) así como un BLAST en MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org/index.html>)

6.3.2. Amplificación de cDNA

Para la amplificación de cDNA se diseñaron oligonucleótidos (apéndice 3) en el programa AmpliFX v.1.5.3 (<http://ifrrj.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>). A los *primers* se les agregó secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción (BamHI en el forward y EcoRI en el reverse) para la posterior clonación en el vector de expresión, además de tres adeninas en el extremo 5' para un mejor

posicionamiento de las enzimas de restricción. Los oligos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM. La amplificación de cDNA se realizó a partir de RNA total de ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 horas mediante una RT-PCR utilizando el kit comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Las condiciones de reacción se especifican en el apéndice 3.

6.3.3. Ligación en el vector de clonación.

El cDNA de Zeama;CycD6;1 amplificado y purificado se ligó en el vector de clonación pGem-T Easy (Promega) utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1. La mezcla de reacción se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (número de catálogo: A1360) y la reacción se incubó 12 h a 4°C.

6.3.4. Clonación en el vector de expresión

Después de purificar el plásmido pGem-T Easy con el inserto de DNA codificante para el péptido inmunogénico, se hizo una reacción de digestión con las enzimas BamHI y NotI (Invitrogen) a 37°C por 2 h. El fragmento escindido se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se purificó a partir de la banda del gel. El fragmento purificado (inserto) se ligó al vector pGex-4T2 previamente digerido con las mismas enzimas poniendo en la reacción el inserto y el vector en una relación 3:1 e incubando toda la noche a 4°C con la enzima T4 DNA ligase (Promega). Los productos de ligación se usaron para transformar células competentes DH5- α . Al día siguiente se inoculó 3mL de LB100 con una colonia de células transformantes y se incubó 12 h a 37°C para purificar plásmido.

6.3.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante

El plásmido pGex-4T2 con el inserto se utilizó para transformar células competentes *E. coli* BL21 RIL. Una vez seleccionadas con ampicilina, se purificó plásmido para verificar por PCR y doble digestión (BamHI / NotI) que el plásmido contuviera el inserto de longitud esperada. Hecho esto se envió a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM para validar que el plásmido tuviera, en el correcto marco de lectura, la secuencia codificante para la proteína de fusión GST-

CycD6;1. Para la secuenciación, se utilizó el oligonucleótido Reverse pGEX_3_primer recomendado por el proveedor. El resultado de la secuenciación de DNA se tradujo en el marco de lectura adecuado con la herramienta Translate de Expasy Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org/tools/>) y la secuencia de aminoácidos se comparó con la teórica en un alineamiento múltiple ClustalW en BioEdit. La expresión de la proteína recombinante se indujo adicionando IPTG a una concentración final de 0.2 mM a un cultivo bacteriano de *E. coli* BL21RIL con una densidad óptica de 0.4 leída a 600nm. Después de la adición de IPTG se dejó incubando por 2 h a 37°C en agitación constante, se pusieron en hielo 10 minutos y luego se centrifugaron las células a 5Krpm por 15 minutos a 4°C. La expresión de la proteína recombinante se verificó con un SDS-PAGE teñido con azul de coomassie. Las células empastilladas se resuspendieron en PBS-tritón 1% y se lisaron por sonicación. El lisado bacteriano se centrifugó a 12Krpm por 15 minutos a 4°C y la fracción soluble se filtró con un tamaño de poro de 0.45µm. El filtrado se hizo pasar por una resina de glutatión-sefarosa (SIGMA-Aldrich) previamente equilibrada con PBS 1x para separar a la proteína recombinante por cromatografía de afinidad. La resina con la recombinante unida se lavó con PBS-tritón 1% a 4°C y posteriormente se eluyó la proteína con 3mL de una disolución de glutatión reducido 10mM en 50mM de Tris-HCL pH 9.5 a 4°C. Todas las fracciones resultantes se monitorizaron en un SDS-PAGE teñido con azul de coomassie.

32

6.3.6. Inmunización de conejos y obtención del suero inmune

La inmunización de conejos se realizó en el bioterio de la Facultad de Química de la UNAM. Al finalizar el esquema de inmunización (apéndice 4), se obtuvo la sangre del conejo por punción cardíaca a blanco y se separó el suero del paquete celular para lo cual se dejó coagular la sangre y se centrifugó 15 min a 5Krpm.

6.3.7. Ensayo de competencia

Se corrieron 0, 5, 20 y 100 µg de la proteína recombinante así como 100µg de BSA en un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF que, posterior al bloqueo, se cortó en 5 fragmentos para separar los carriles con las distintas

cantidades de proteína recombinante y BSA. Cada fragmento de membrana se incubó por separado con el suero inmune a una dilución de 1:4000 en PBS-Tween1%- leche al 5% por 12 h. Al día siguiente, estas mismas disoluciones del suero se volvieron a utilizar para un ensayo de western blot donde cada disolución se usó para inmunodetectar a la CycD6;1 en 50µg de proteína de extracto proteico total de ejes embrionarios secos. El anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa se utilizó en una dilución de 1:35000.

6.4. Ensayos de germinación

Los ejes embrionarios lavados (apartado 61.1.) se colocaron en lotes de 10 en cajas Petri de vidrio con un papel filtro cubriendo el fondo de la caja, se bañaron con 1mL de disolución de imbibición (Tris-HCL 50mM pH 7.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 10mM, sacarosa 2%) y se incubaron a 25°C por 6, 12, 18 y 24 h. Finalizado el tiempo correspondiente de germinación, cada lote se congeló con nitrógeno líquido y se homogenizó en morteros de porcelana adicionando 1 mL de disolución de extracción de proteínas (70mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM MgCl₂, 75 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM ditioneitol (DTT), 0.1% Triton X-100, 0.25 mM sacarosa, una tableta de coctel inhibidor de proteasas y una de inhibidor de fosfatasas). La muestra se centrifugó a 12Krpm por 1 h, la fracción soluble fue separada y cuantificada por el método de Bradford. En el caso de los ensayos de germinación en inanición de sacarosa, la disolución de imbibición se preparó sin sacarosa. Todo el material y disoluciones se usaron estériles. Los patrones de acumulación de la proteína ZmCycD6;1 se determinaron por western blot y sus respectivas densitometrías realizadas en el programa ImageJ: Image Processing and Analysis in Java (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) fueron normalizadas con Zeama;CycA como control de carga. Las intensidades normalizadas de las bandas se expresan en unidades de densidad relativa (UDR) respecto al tiempo 0. Los ensayos se hicieron por triplicado y el análisis estadístico se hizo mediante una ANOVA de una vía seguido de prueba de Dunnet utilizando el programa GraphPad Prism ver. 5.0 (www.graphpad.com).

7. RESULTADOS

7.1. Anticuerpos policlonales anti-CycD6;1.

De manera global, la estrategia que se siguió para obtener los anticuerpos fue: elegir un fragmento de la proteína potencialmente inmunogénico para luego inducir su expresión en forma de una proteína de fusión con GST en el extremo amino y con esta proteína purificada, inmunizar conejos.

7.1.1. Elección del péptido utilizado para inmunizar conejos.

Por medio del programa EMBOSS: Antigenic se obtuvieron 11 posibles epítomos en la proteína (apéndice 1, tab. A1.1), y el análisis de la secuencia de CycD6;1 con el programa NetSurfP arrojó la probabilidad, para cada uno de los aminoácidos, de que se encontraran ya sea expuestos en la superficie o hacia el interior de la proteína, y además la probabilidad de que estuvieran formando parte de una estructura de α -hélice, de hoja β , o ninguna de las anteriores (apéndice 1, tab. A1.2).

De esta manera, se denominaron como regiones potencialmente inmunogénicas aquellas que contuvieran al menos una secuencia que el programa EMBOSS: Antigenic predijera como antigénicas y que tuviera la mayoría de sus aminoácidos expuestos en la superficie según el programa NetSurfP. Además, las regiones candidatas contienen predicción de estructura secundaria tanto de α -hélice como de “coil”, que refiere a toda estructura que no sea α -hélice ni hoja β , es decir, podría corresponder a estructuras desordenadas o asas que unen otras estructuras; esto con el objeto de tener probables epítomos tanto secuenciales como conformacionales, ya que se requería que los anticuerpos pudieran reconocer tanto a la proteína desnaturalizada en los ensayos de western blot, como en su conformación nativa en los inmunoprecipitados y en ensayos de inmunolocalización que se plantean en las perspectivas de este trabajo.

De las regiones identificadas como potencialmente inmunogénicas, se eligió aquella que fuera menos conservada entre las ciclinas D de maíz (fig. 7 A). Para

esto se realizó un alineamiento múltiple con ClustalW de todas las ciclinas tipo D de maíz reportadas en el trabajo de Buendía-Monreal *et al.* de 2011, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. En la figura A1.3 del apéndice1 se muestra el alineamiento de las 17 ciclinas D de maíz indicando su conservación de secuencia. La Fig A1.2 muestra el alineamiento del péptido con el correspondiente de la CycD2;3, que es con el que tiene mayor identidad (Tabla A1.3.)

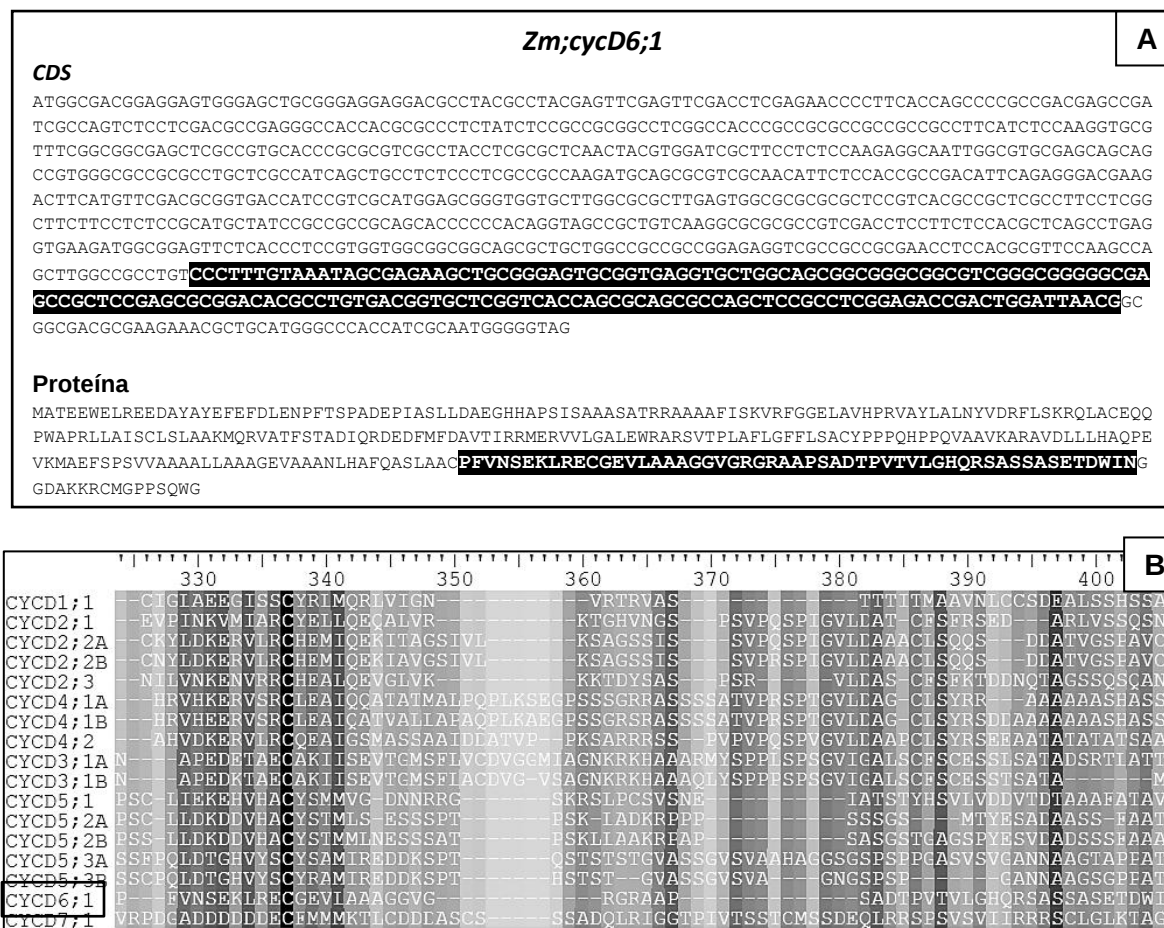


Figura 7. Péptido inmunogénico A) Secuencia codificante para la proteína (CDS) ZmCycD6;1. Sombreado, secuencia codificante para el péptido inmunogénico. En la secuencia de aminoácidos está sombreado el péptido inmunogénico. B) Alineamiento del péptido inmunogénico con las regiones homólogas de las otras 16 CycDs de maíz. La conservación de los aminoácidos en cada posición se expresa gráficamente en una escala de grises donde el negro corresponde a los aminoácidos totalmente conservados, y el gris más claro a los aminoácidos nada conservados.

7.1.2. Amplificación de cDNA del péptido inmunogénico.

Para obtener la secuencia codificante del péptido inmunogénico, se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos diseñados (apéndice 3, tab. A3.1) a partir de RNA total extraído de ejes embrionarios de maíz embebidos durante 24 h. El fragmento amplificado debe tener una longitud total de 178 nucleótidos (fig. 8), dada por la suma de 160 nucleótidos correspondientes a la secuencia codificante más 9 nucleótidos (6 del sitio de restricción y 3 adeninas para el posicionamiento de la enzima de restricción) que se agregaron a cada oligo.

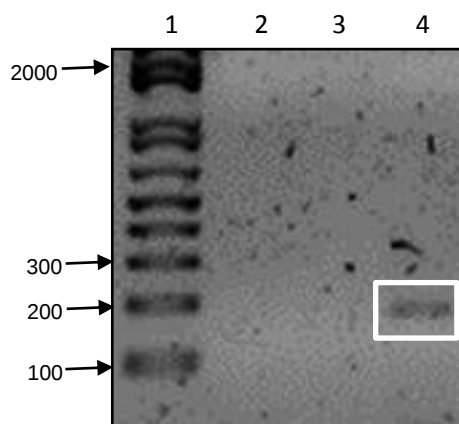


Figura 8. Amplificación de cDNA de *CycD6;1* por RT-PCR. Carril 1, marcador de tamaño DNA. Carriles 2-4, RT-PCR con distintas temperaturas de alineamiento (57, 59 y 61 °C). El recuadro blanco muestra la banda de tamaño esperado. La amplificación se realizó a partir de RNA total de ejes embrionarios embebidos 24 h.

7.1.3. Clonación del cDNA en el vector de clonación pGem-T Easy.

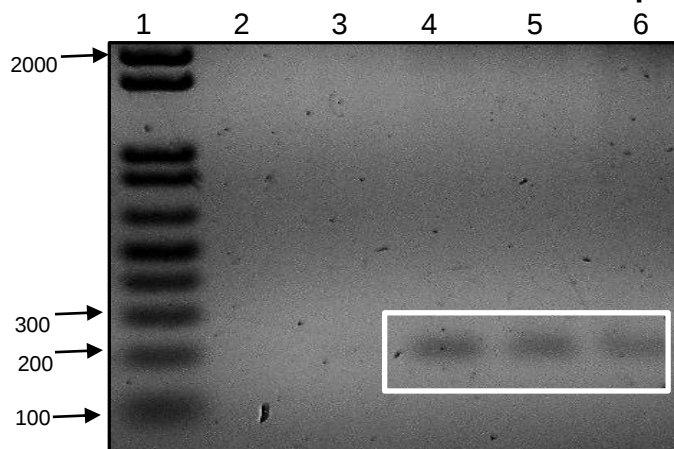


Figura 9. Doble digestión de clonas candidatas de pGem-T Easy a tener el inserto. Carril 1, marcador de tamaño de DNA. Carriles 2-6, clonas candidatas digeridas. En el recuadro blanco se encierran las bandas correspondientes al inserto.

El producto de la amplificación de cDNA se ligó en el vector pGem-T Easy (Promega) y se verificó la clonación mediante una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Not*I para verificar que el inserto estuviera en el vector. El fragmento esperado de la digestión era de 191 pb. En la figura 9 se muestra el gel de la doble digestión que se hizo al plásmido proveniente de 5 colonias diferentes, y se observa que las últimas tres contienen el inserto.

7.1.4. Clonación en el vector de expresión pGex-4T2.

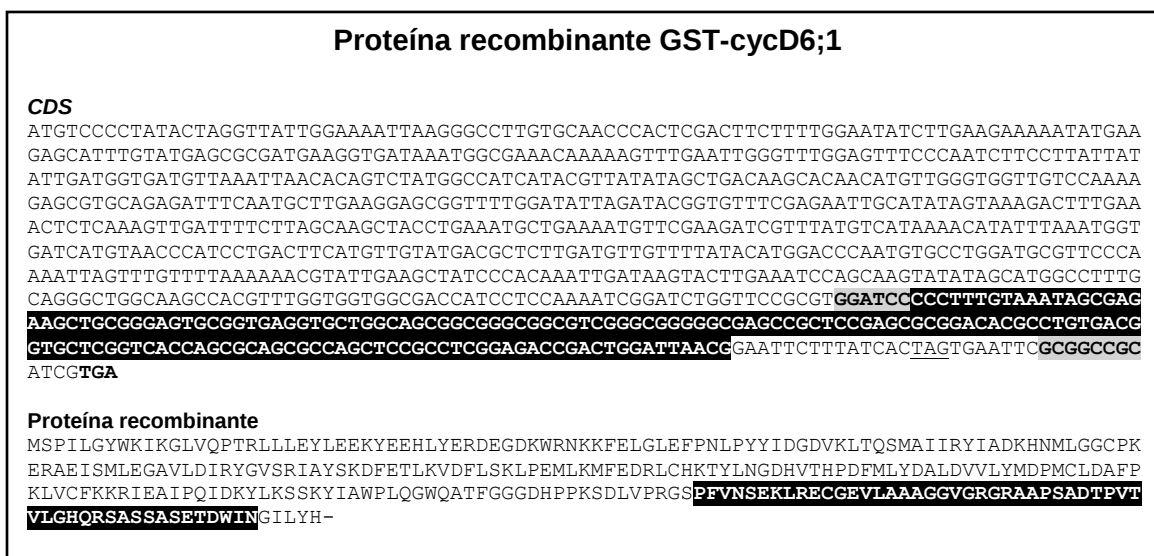


Figura 10. Secuencia codificante teórica para la proteína recombinante (CDS) GST-CycD6;1. Sombreado en negro está la secuencia que codifica para el péptido inmunogénico; sombreado en gris, los sitios *Bam*HI y *Not*I; subrayado, el codón de paro en marco de lectura; en negritas sin sombrear, el codón de paro indicado por el proveedor. En la secuencia de aminoácidos de la proteína está sombreado el péptido inmunogénico.

Una vez que se tuvo clonado el inserto de la secuencia codificante en el vector de clonación, este se cortó con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I para poder hacer una clonación dirigida en el plásmido pGex-4T2, el cual también se cortó en los mismos sitios, de modo que al ligarlos resultó la secuencia codificante para la proteína recombinante GST-CycD6;1 (fig. 10). Después de la reacción de ligación y la transformación de células competentes, se picaron varias colonias para inocular en medio de cultivo y sacar plásmido.

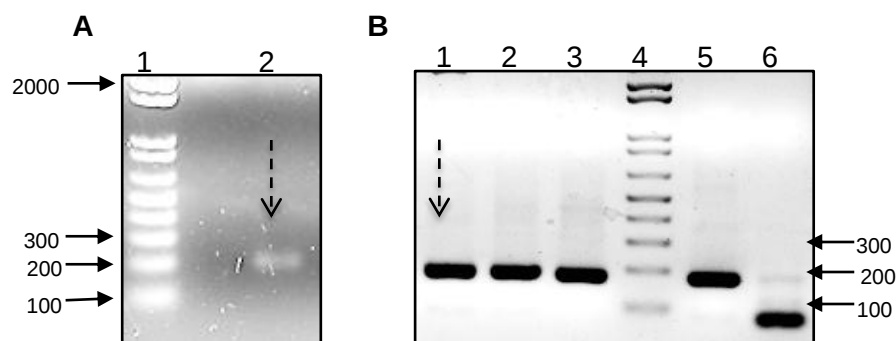


Figura 11. Verificación de la clonación en el vector de expresión. A) Doble digestión (*Bam*HI / *Not*I) de pGex-4T2 conteniendo el inserto de CycD6;1 (Carril 2), carril 1, marcador de longitud (pb). Fragmento esperado, 191pb. B) PCR (35 ciclos) de clonas positivas para la prueba de doble digestión (carriles 1, 2 y 3); carril 4, marcador de longitud; carril 5, control + (inserto clonado en pGem-T Easy); carril 6, control – (pGex-4T2 sin inserto). Fragmento esperado, 178pb. Las flechas verticales punteadas indican la misma clona positiva para ambas pruebas. Geles de agarosa 1.5%

Se verificó la clonación en pGex-4T2 por doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. El fragmento que se escinde se esperaba que fuera de 191 pb. Las clonas que resultaron positivas para la doble digestión se confirmaron con PCR (iProof High-Fidelity PCR Kit. Bio-Rad), donde se esperaba un fragmento de 178 nucleótidos. Una vez que una sola clona candidata diera ambos resultados positivos (fig. 11), se envió a secuenciar para demostrar que la clonación se realizó con éxito (fig. 12).

El resultado de la secuenciación se tradujo a aminoácidos y se comparó con la secuencia teórica de la proteína recombinante (ver apartado 6.3.5). En la figura 12 se muestra el alineamiento de la secuencia teórica con la del resultado de la secuenciación y se observa claramente que son idénticas excepto por los últimos dos aminoácidos de la teórica. En esta figura también se resalta en azul la región de la proteína de fusión correspondiente a GST, y en rojo, la correspondiente al péptido de la CycD6;1. Con este resultado se verifica que la clonación del inserto de *CycD6;1* quedó en el marco de lectura adecuado para producir la proteína de fusión deseada.

Una vez clonado el inserto de *CycD6;1* en el vector de expresión, se indujo la expresión de la proteína de fusión que contiene a GST en el extremo amino, y al inserto en el extremo carboxilo. La inducción de esta proteína se realizó en un cultivo de bacterias *E. coli* BL21-RIL. Esta cepa está suplementada con genes para tRNAs que poseen anticodones que reconocen codones de poco uso en *E. coli* y que codifican para los aminoácidos arginina (R), isoleucina (I) y leucina (L) (Carsten *et al.*, 2001). Cuando el cultivo llegó a 0.4 de densidad óptica (leída a 600nm) se adicionó IPTG a 0.2 mM final y se dejó crecer 2 h más.

Para tener un control positivo se indujo la expresión del vector vacío que codifica para la proteína GST. La predicción en el programa PeptideMass (Expasy) para la masa molecular de la proteína codificada por el vector vacío es de 27.3 KDa. La predicción de masa molecular para la proteína recombinante teórica es de 32.3 KDa, mientras que para la proteína resultante de la secuenciación es de 31.9 KDa. La expresión de la proteína se monitorizó en SDS-PAGE (fig. 13 A) y luego se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de glutatión-sefarosa (fig. 13 B). De la purificación de la proteína se analizaron las fracciones resultantes que fueron: fracción no adsorbida a la columna, fracción de lavado de la columna, fracción eluida, y fracción insoluble resultante de la lisis celular (pellet). Aparentemente la purificación fue completa.

7.1.6. Obtención y validación de anticuerpos policlonales anti-*CycD6;1* (α -*CycD6;1*).

La figura 15 muestra que conforme la misma cantidad de anticuerpo es incubada con mayores cantidades de proteína recombinante, se va perdiendo la intensidad en el reconocimiento de la banda que, por el resultado de la predicción de masa molecular (32.9 KDa), corresponde a la ciclina *CycD6;1*. En este ensayo, la mayor cantidad de proteína recombinante con que se incubó el suero inmune fueron 100 μ g (carril 4), y como control, se utilizó la misma cantidad de BSA para verificar que lo que causa la disminución de la intensidad en la banda es la unión al antígeno contra el que están hechos los anticuerpos y no con cualquier otro. El

suero preimmune solo reconoce muy débilmente a una banda menor a 25 KDa (Fig. 14) ya que el tiempo de exposición de la placa para esta figura fue de 10 minutos.

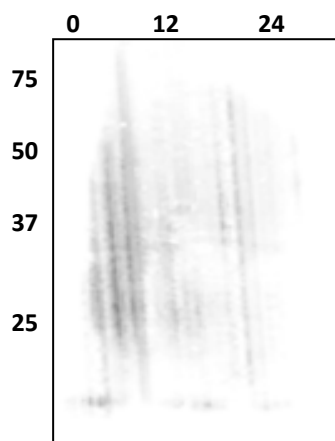


Figura 14. Suero preimmune. Western blot con el suero preimmune sobre extracto proteico de ejes embrionarios embemidos por 0, 12 y 24 h.

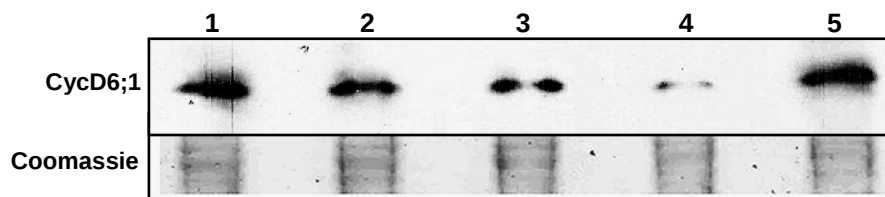


Figura 15. Validación de anticuerpos α -CycD6;1 mediante ensayo de competencia. Western blot sobre extractos proteicos de ejes embrionarios secos. Para la inmunodetección se utilizó suero inmune preincubado con 0, 5, 20 y 100 μ g de proteína recombinante (carriles 1-4). Como competidor negativo se utilizó 100 μ g de BSA (carril 5). Diluciones de los anticuerpos: α -CycD6;1, 1:4000; α -conejo-peroxidasa, 1:35000.

Asimismo, era de esperar que siendo la proteína de interés una ciclina D, tuviera interacción con CdkA, y por lo tanto, se realizó un ensayo cruzado de inmunoprecipitación, es decir, se inmunoprecipitó a CdkA y a CycD6;1 y se realizaron los western blots con los anticuerpos anti-CycD6;1 y anti-CdkA a cada uno de los inmunoprecipitados y a sus respectivos sobrenadantes para verificar que hubiera tal interacción (fig. 16). De esta manera se comprobó 1) la interacción entre CdkA y CycD6;1, y 2) que los anticuerpos α -CycD6;1 sirven para inmunoprecipitar a la proteína.

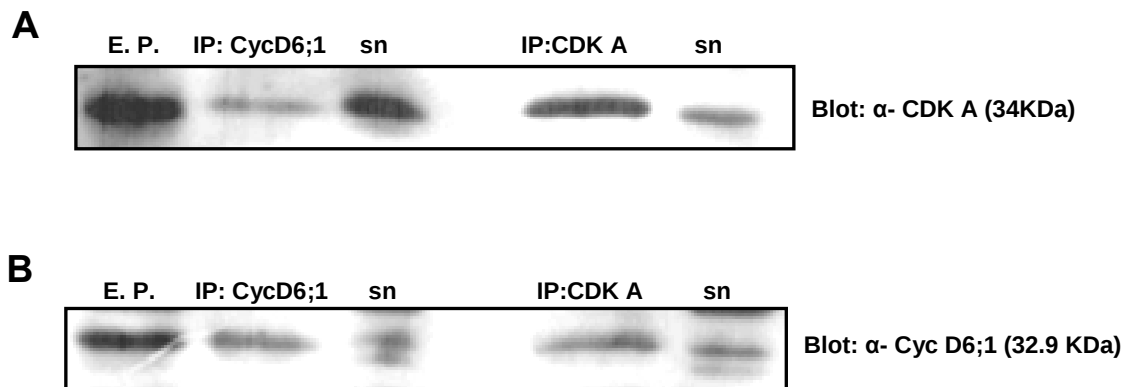


Figura 16. Interacción CycD6;1 con CDKA. Inmunoprecipitaciones cruzadas. En A y B se muestra la inmunoprecipitación (IP) con α -CycD6;1 y con α -CDKA además de sus respectivos sobrenadantes (sn). Como control se utilizó extracto protéico de ejes embrionarios (E.P.). Los western blots se hicieron con A) α -CDKA y con B) α -CycD6;1.

7.2. Expresión de CycD6;1 durante la germinación.

Habiendo obtenido y validado los anticuerpos α -CycD6;1, se realizó la inmunodetección de la proteína por triplicado en extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos durante 0, 6, 12, 18 y 24 horas. En la figura 17 panel A, se muestra el resultado del western blot y se observa la banda que corresponde a la proteína CycD6;1.

En el panel B se muestra la gráfica de las densitometrías resultantes de normalizar la intensidad de la banda de CycD6;1 con el control de carga (CycA). Las intensidades normalizadas fueron comparadas con el tiempo cero (ejes embrionarios sin germinar) y por ello se expresan en unidades de densidad relativa (UDR) al tiempo de 0 h, es decir, semila seca.

El patrón de acumulación de la proteína indica que hay una disminución aparente después de las 6 h, la cuál solo es estadísticamente significativa a las 18 y 24 h. La gráfica y su estadística representan el promedio de tres ensayos biológicos independientes y su error estándar, respectivamente.

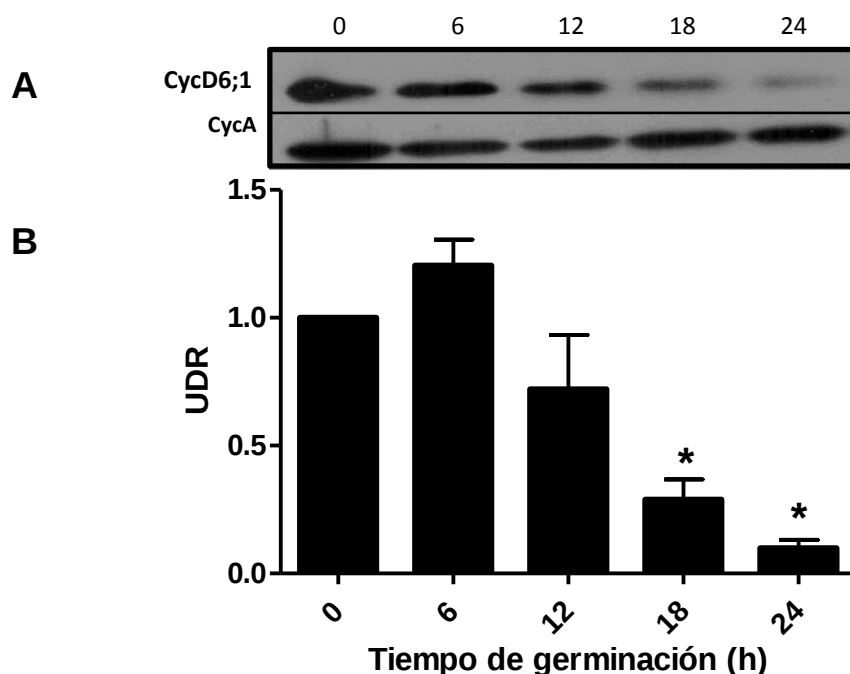


Figura 17. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación. A) Inmunodetección por western blot en extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 6, 12 18 y 24 h. B) Densitometría expresada en unidades de densidad relativa (UDR) respecto a 0 h. Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos y el error estándar se indica con barras de error (n=3).

7.2.1. Expresión de CycD6;1 durante la germinación en inanición de sacarosa.

Se sabe que las ciclinas D están involucradas en la percepción y respuesta a factores ambientales que son decisivos en la activación del ciclo celular como pueden ser las fitohormonas, el estrés y la fuente de carbono, es por esto que también se estudió la acumulación de la proteína durante la germinación en ausencia de la fuente de carbono (inanición de sacarosa). Nuevamente los ejes fueron embebidos por 0, 6, 12, 18 y 24 h, pero esta vez la disolución de imbibición se preparó sin adicionar sacarosa, que en condiciones normales estaría al 2%.

En la figura 18 panel A, se observa que la intensidad de la banda disminuye drásticamente a partir de las 6 h de germinación. Esta disminución es estadísticamente significativa (panel B) y los niveles de proteína se mantienen bajos hasta las 24 h. La normalización de la intensidad de las bandas se hizo igual

que para la figura 16. La gráfica y su estadística representan el promedio de tres ensayos biológicos independientes y su error estándar, respectivamente.

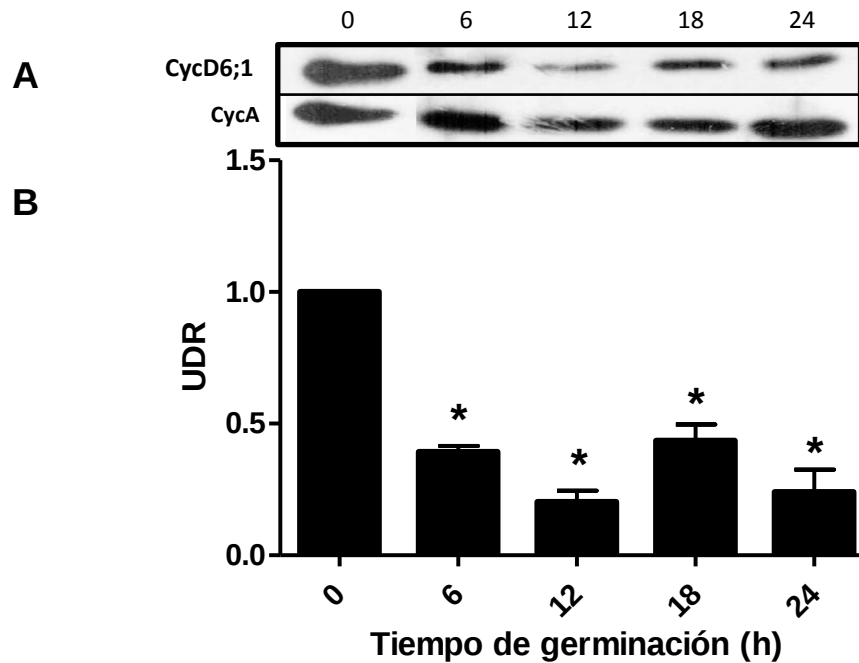


Figura 18. Acumulación de CycD6;1 durante la germinación en inanición de sacarosa. A) western blot en extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos sin sacarosa por 0, 6, 12 18 y 24 h. B) Densitometría en unidades de densidad relativa (UDR) respecto a 0 h. Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos y el error estándar se indica con barras de error (n=3).

En la figura 19 se muestra una gráfica que contiene el resultado de la densitometría de los niveles de la proteína durante la germinación en presencia de sacarosa al 2 % (barras negras), y en inanición de sacarosa (barras blancas). Se observa que cuando los ejes se embeben sin sacarosa, la proteína CycD6;1 disminuye más tempranamente que en condiciones normales (sacarosa al 2%). Sin embargo, a las 18 y 24 h ya no existe diferencia estadísticamente significativa cuando los ejes se embeben con o sin sacarosa.

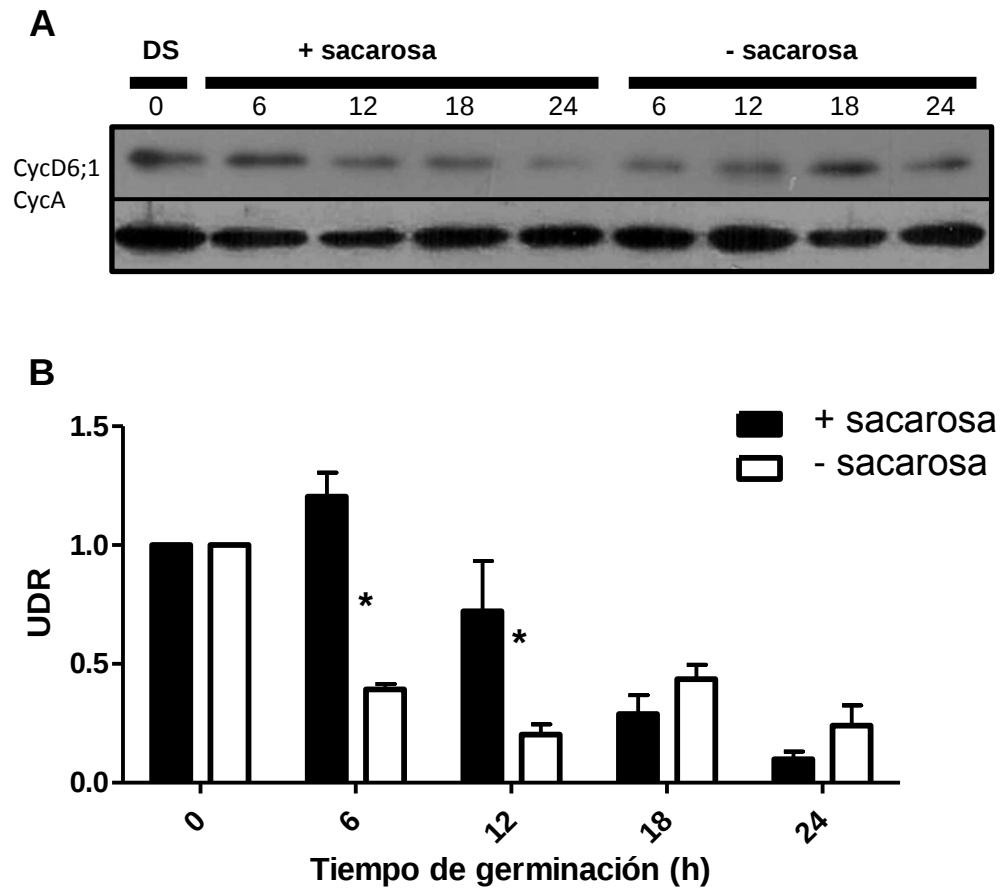


Figura 19. Comparación de CycD6;1 durante la germinación en presencia y ausencia de sacarosa. A) Acumulación de CycD6;1 en semilla seca (DS) y durante la germinación con y sin sacarosa. Gráfica comparativa de la acumulación de CycD6;1 durante la germinación en condiciones normales (barras negras) y en inanición de sacarosa (barras blancas). Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos entre las dos barras de cada tiempo (n=3).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. Elección del péptido inmunogénico.

Uno de los principales objetivos de obtener anticuerpos, fue poder distinguir a la CycD6;1 de entre las demás ciclinas, ya que con la reciente identificación en nuestro laboratorio de 17 genes codificantes para ciclinas D, es importante poder estudiarlas individualmente, puesto que los patrones de acumulación de otras ciclinas durante la germinación sugieren que no son redundantes (Gutiérrez *et al*, 2005; Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006; Godínez, 2010) y por lo tanto, sería un error adjudicar una única función a todas las ciclinas D o bien, adjudicar una serie de funciones distintas a solo una ciclina si los anticuerpos reconocen a más de una. Por lo anterior, la elección del péptido que sirvió como inmunógeno fue un paso crítico de este trabajo.

El análisis de la secuencia completa de la ciclina D6;1 arrojó como resultado una serie de posibles fragmentos de la proteína que pudieron utilizarse para obtener los anticuerpos que permitieran identificarla; por otro lado, el alineamiento de las 17 ciclinas fue el factor decisivo para elegir uno de estos fragmentos.

En el alineamiento del apéndice 1 se muestra en una escala de grises la conservación de aminoácidos entre las 17 CycDs de maíz, siendo el negro representativo de la mayor conservación, y el gris más claro, de conservación nula. Se observa que hay una gran conservación a partir de la posición 120 del alineamiento (que de la CycD6;1 corresponde al aminoácido 53) y hasta la 300 (222 de CycD6;1), región que correspondería prácticamente al dominio ciclina amino completo de todas las ciclinas y la parte inicial del ciclina carboxilo (Buendía, 2011), lo cual representa la región de máxima conservación entre la superfamilia de ciclinas, y más aún entre la subfamilia de ciclinas D. Por esta razón, solo había opción de elegir entre la región previa a la posición 53 de CycD6;1 o la posterior al aminoácido 222. Ambas regiones son poco conservadas, aunque la región del extremo amino contiene más aminoácidos contiguos conservados que la del extremo carboxilo y por lo tanto, estos aminoácidos contiguos podrían funcionar

como epítomos compartidos entre la CycD6;1 y algunas otras. Por esta razón, se descartó la región del extremo amino.

De la región del extremo carboxilo, se procuró que el péptido inmunogénico contuviera tanto aminoácidos que estuvieran formando estructura secundaria como otros que no, para así poder tener anticuerpos en el suero inmune que reconocieran a la proteína tanto en forma desnaturalizada como en conformación nativa, pues la proteína fue identificada de ambas formas en western-blot y en inmunoprecipitado, respectivamente.

El péptido inmunogénico se delimitó con las consideraciones anteriores y el criterio que terminó por definir su longitud y secuencia exactas fue el diseño de los *primers*, ya que para ello hubo que tomar en cuenta que el programa AmpliFX predijera la correcta amplificación del fragmento deseado. Además de estar compuestos por las secuencias que flanquean la secuencia codificante para el péptido inmunogénico, hubo que añadirles los sitios de restricción para la clonación. Una vez diseñados los *primers*, la secuencia de aminoácidos del péptido quedó definida, empezando en la prolina 239 y terminando en la asparagina 291. Con esta secuencia y las de los fragmentos de las otras 16 CycDs que se alinean con ella (Figura 7 B), se realizó una matriz de identidad, de la cual tenemos que la mayor identidad que el péptido tiene con el fragmento homólogo de otra ciclina (CycD2,3) es de 15.6%, valor relativamente bajo que sugiere que la elección del péptido fue correcta.

Por último, se hizo un BLAST en la base de datos del genoma de maíz MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org/index.html>) usando al péptido inmunogénico como secuencia “query” y únicamente se obtuvo como resultado el número de acceso que corresponde al gen *Zeama;cycD6;1*.

8.2. Obtención y validación del suero inmune.

Como se mencionó en el apartado anterior, es importante tener un suero inmune que reconozca a la proteína desnaturalizada y en conformación nativa. Por esta razón, en el esquema de inmunización hubo administraciones del inmunógeno en ambas formas. Las primeras inmunizaciones se realizaron vía subcutánea con

una suspensión conteniendo a la proteína recombinante desnaturalizada en SDS-PAGE y posteriormente se administró en disolución sin desnaturalizar.

Al término del esquema de inmunización hubo que realizar el paso más crítico de este trabajo, que es la validación de los anticuerpos. Para ello, se realizó un ensayo de competencia entre la proteína recombinante y la CycD6;1 de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz. El fundamento de esta prueba es que conforme los anticuerpos son incubados con cantidades mayores de proteína recombinante, hay menos parátomos disponibles para reconocer a los epítomos de la proteína que está presente en los extractos de ejes embrionarios, y esto se ve reflejado en un ensayo de western blot sobre extractos proteicos, habiendo una disminución de la intensidad de la banda que corresponde a la proteína de interés.

La metodología que se siguió para este ensayo de competencia (apartado 6.3.7) permitió que los epítomos involucrados en reconocimiento de la CycD6;1 fueran los mismos que los anticuerpos preincubados con la recombinante reconocieron en un paso previo de la prueba, pues de haber incubado con la proteína recombinante en conformación nativa, cabría la posibilidad de que los anticuerpos que se quedaran unidos a esta fueran mayoritariamente los conformacionales sobre los secuenciales, es decir, que quedaran libres siempre aquellos que reconocen específicamente a la proteína desnaturalizada, y por esta razón, sin importar la cantidad de recombinante con que se preincubara el suero, no se vería la disminución tan marcada en la banda correspondiente a la CycD6;1 de los extractos.

En la figura 15 se muestra el resultado del ensayo de competencia para validar el suero inmune. La máxima cantidad de proteína recombinante utilizada fue 100µg, y se usó la misma cantidad de BSA como un control que demuestra que la disminución de la intensidad de la banda está dada por el reconocimiento específico de los epítomos de la CycD6;1, pues la albúmina al ser una proteína tan grande, posee una gran cantidad de epítomos cuyo reconocimiento inespecífico hubiera causado el mismo efecto que en el caso de la preincubación con la recombinante GST-CycD6;1. Se observa en esta figura que la banda del peso esperado para CycD6;1 disminuye su intensidad conforme se aumenta la cantidad

de recombinante con que se incubó el suero. Con este resultado quedaron validados los anticuerpos α -CycD6;1.

8.3. CycD6;1 interacciona con CdkA.

En este trabajo, supusimos que siendo la proteína de interés una ciclina D, debería tener interacción con CdkA y por ello, demostrar esta interacción fue un resultado para confirmar la validación del suero; sin embargo, ya que la CycD6;1 no posee el motivo de unión a RBR, cabe la posibilidad de que su función no sea típica de una ciclina D y actúe en procesos y con mecanismos diferentes a las demás ciclinas D. Así, además de confirmar la validación de los anticuerpos, la interacción con CdkA indica que el complejo CycD6;1-CdkA existe *in vivo* y debiera tener una actividad de cinasa sobre algún sustrato específico que, a diferencia de las demás ciclinas D, podría no ser RBR, y por lo tanto, estar funcionando en otro aspecto de la regulación del ciclo celular o incluso fuera de él. Por esto es importante evaluar su interacción con CdkB mediante ensayos de inmunoprecipitación, así como su actividad de cinasa asociada sobre RBR. Sin embargo hay que tener en cuenta que en *Arabidopsis*, las ciclinas D4;1 y D5;1 no tienen el motivo LxCxE canónico en su secuencia, sino un motivo divergente (Menges et. Al. 2007). A pesar de esto, la ciclina D4;2 tiene efectos similares a otras ciclinas cuando se sobreexpresa (Kono *et al.*, 2006). No se sabe aún si los motivos relacionados como LxSxE y LxxSxD en Cyc4;2 pueden estar involucrados en la unión a RBR, pero no deja de ser una posibilidad factible.

Por otra parte, se ha reportado que en *Arabidopsis*, CycD6;1 está presente únicamente en células proliferativas que se dividen periclinalmente para diferenciarse en determinados tipos celulares de la raíz (corteza y endodermis) en plántulas, y que además está regulado por dos factores transcripcionales conocidos como Shortroot y Scarecrow, que se sabe, son importantes para la formación de estos patrones celulares (Sozzani *et al.*, 2011). Sabemos también que el inicio de la diferenciación a partir de una célula proliferativa indiferenciada, como en el caso anterior, requiere de una modificación de la expresión génica para permitir la activación de programas de desarrollo que, en una célula indiferenciada, se encuentran reprimidos (Boyer *et al.*, 2005; Bernstein *et al.*, 2006). Por otro lado, se

ha visto que CdkA participa importantemente en el proceso de reprogramación celular de una célula diferenciada que regresa a un estado menos diferenciado y muy proliferativo (Ishikawa *et al.*, 2011). Conociendo además su interacción con CdkA, y buscando un posible nuevo sustrato del complejo CycD6;1-CdkA, es probable que lleguemos a descubrir una nueva función para el subgrupo de CycD6 de plantas, y que esta función pueda estar más relacionada a la diferenciación que a la proliferación.

8.4. CycD6;1 durante la germinación.

La activación de la división celular es un factor clave en la germinación y las ciclinas D de plantas tienen importantes efectos aditivos en el control de la velocidad de activación del ciclo celular, lo que contribuye directamente al control de la velocidad de germinación (Masubelele *et al.*, 2005). Los ensayos de western blot realizados en este trabajo muestran que la acumulación de CycD6;1 varía a lo largo de la germinación, disminuyendo después de las 6 h después de la imbibición, aunque como se observa en la figura 16, esta disminución sólo es significativa a las 18 y 24 h; sin embargo, sería un error pensar que esto refleja la dinámica de la proteína, pues la acumulación es el resultado del balance entre los procesos de degradación y síntesis que probablemente están sucediendo con CycD6;1. Para tener un panorama más claro de lo que sucede con esta proteína, se podría inhibir la síntesis de proteínas para saber si hay síntesis *de novo* una vez que comienza el proceso germinativo, o bien, está habiendo únicamente degradación, lo cual podría sugerir que esta ciclina participa solo muy tempranamente en la reactivación del ciclo celular al iniciar el proceso germinativo, o bien, que no participa en este, sino al final de la maduración de la semilla y al reactivarse el metabolismo en la germinación, la proteína remanente es degradada. Lo anterior se apoya en el hecho de que Sozzani *et al.* (2011) observaron que no hay diferencia en la velocidad de germinación entre semillas *tipo silvestre* de *Arabidopsis* y mutantes en *cycD6;1*. Aunque quepa la posibilidad de redundancia con otra ciclina D que supla la función de CycD6;1 mutada, esto es poco probable, ya que estructuralmente esta ciclina es diferente de las demás y más bien cabría esperar que no hubiera redundancia.

Como se ha mencionado antes, recientemente se reportó que la proteína *Atrath;CycD6;1* se localiza en la raíz y particularmente en las células iniciales de corteza y endodermis en plántulas así como en primordios durante etapas posteriores del desarrollo (Sozzani *et al.*, 2011); en este reporte utilizaron una fusión de *CycD6;1* con GFP para ver a la proteína por microscopía confocal. En contraste con lo anterior, en el presente trabajo estamos reportando la presencia de la proteína endógena en semilla madura de maíz. Esto es un punto importante, porque tomando en cuenta el reporte de la localización en *Arabidopsis* y los resultados de este trabajo, podríamos sugerir que *CycD6;1* no tiene únicamente la función que Sozzani *et al.* reportan, sino alguna más que no ha sido caracterizada a la fecha. Por lo anterior, resulta fundamental evaluar el proceso de maduración de semillas mutantes en *cycD6;1* en comparación con la tipo silvestre.

Por otro lado, si tomamos en cuenta que los niveles de transcrito de *CycD6;1* comienzan a aparecer en los últimos tiempos de la germinación (Buendía-Monreal *et al.*, 2011), es probable que la proteína que se sintetiza de novo sea utilizada después de la germinación, por ejemplo, durante las divisiones en la zona meristemática que propician la protrusión radicular y durante el desarrollo ulterior de la raíz.

8.4.1. *CycD6;1* durante la germinación en inanición de sacarosa.

Se sabe que las ciclinas D de plantas son las responsables de la respuesta tanto a citocininas exógenas como a sacarosa (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999) y que estos dos factores pueden alterar significativamente los patrones de expresión de algunas ciclinas D solo cuando se combinan y no lo hacen por separado, aunque no es el caso de todas, lo cual indica que cada ciclina D responde diferencialmente a los factores ambientales (Riou-Khamlichi *et al.* 2000; Healy *et al.* 2001; Gutiérrez *et al.*, 2005). Es por esto que se planteó la posibilidad de que *CycD6;1* pudiera responder a la inanición de sacarosa, pues existe el antecedente de que *Arath;CycD3;1* es altamente inestable y es sometida a degradación vía proteasoma cuando la fuente de carbono se agota (Planchais *et al.* 2004). Así mismo, otras proteínas involucradas en la transición G1 a S sufren degradación en inanición de sacarosa como E2F y RBR (Hirano *et al.*, 2008; Hirano *et al.*, 2011)

De la misma forma, en este trabajo observamos que CycD6;1 también es sensible a la inanición de sacarosa, pues en condiciones normales, a pesar de que la tendencia de la disminución aparece desde las 12 h, solo es significativa a las 18 y 24 h (fig16, panel B), y cuando la germinación se lleva a cabo en inanición de sacarosa, los niveles de la proteína disminuyen significativamente desde las 6 h (fig. 17).

La aceleración en la disminución de CycD6;1 en inanición de sacarosa podría ser el resultado de un aumento en la velocidad de degradación, o bien, una inhibición de la síntesis. Sin embargo, el hecho de que la tendencia de la proteína sea siempre a disminuir, sugiere que aun habiendo síntesis *de novo* al reactivarse el metabolismo celular, el proceso de degradación es predominante, si no es que el único, pero se da hasta pasadas las 6 h después de la imbibición. Por lo tanto, es probable que la inanición de sacarosa, de algún modo, acelera la reactivación de los procesos de degradación en la célula, pues al no haber condiciones óptimas para la proliferación, es necesario detener el ciclo celular, y esto se lograría degradando a las proteínas responsables de la progresión de este, como son las ciclinas y Cdks. Si esto fuese cierto, cabría esperar que al poner semillas a germinar en presencia de un inhibidor de la degradación de proteínas, los niveles de la CycD6;1 permanecieran constantes a pesar de estar bajo la inanición de sacarosa.

En la figura 18, se observa que a las 6 h, los niveles de proteína en inanición de sacarosa son menores a la mitad de aquellos en condiciones normales de germinación. Lo mismo ocurre a las 12, pero a las 18 y 24 h ya no hay cambio significativo. Esto indica que la inanición de sacarosa acelera el inicio de la degradación de la proteína, pero de manera global, no hay mayor degradación durante las primeras 24 h que cuando hay sacarosa en la disolución de imbibición, ya que a los últimos tiempos de germinación, los niveles de proteína son estadísticamente iguales.

9. CONCLUSIONES

- La estrategia de análisis *in silico* para elegir el inmunógeno fue adecuada.
- Se obtuvieron anticuerpos policlonales que reconocen a la CycD6;1.
- Se demostró la interacción de la CycD6;1 con CDKA.
- La CycD6;1 está presente en semillas secas y sus niveles de acumulación se modifican durante la germinación, habiendo una disminución estadísticamente significativa a partir de las 18 h.
- La inanición de sacarosa durante la germinación provoca una disminución prematura en los niveles de CycD6;1. A pesar de lo anterior, la disminución total de la proteína durante las primeras 24 h posteriores a la imbibición es, estadísticamente, la misma tanto en condiciones normales como en inanición de sacarosa, es decir, la degradación comienza antes, pero no es mayor.

10. PERSPECTIVAS

- En el presente trabajo se obtuvieron anticuerpos capaces de identificar a la CycD6;1, y los patrones de acumulación durante la germinación es solo el inicio de un amplio estudio de que puede ser objeto esta ciclina D. Como primera perspectiva, consideramos necesario purificar a los anticuerpos que reconocen específicamente a la CycD6;1 para evitar inespecificidad debida a los antiGST.
- Además de su respuesta a sacarosa, es posible que pueda modificarse su expresión por otros factores como las fitohormonas (auxinas, citocininas, ABA, brasinosteroides, etc.) o el estrés (hídrico, osmótico, calórico, biótico, etc.). Por lo tanto, los estudios sobre su acumulación deberán hacerse en otras condiciones además de las trabajadas en este estudio para determinar qué factores y cómo regulan a esta ciclina.
- Por otra parte, se sabe que la CycD6;1 de *Arabidopsis* se ha visto solo en ciertas células y participando en el control de la formación de patrones celulares específicos de la raíz (Sozzani *et al.*, 2010) por lo tanto, cabría esperar que en maíz ocurra algo similar, aunque debido a la complejidad de su raíz, no sería extraño encontrarla en otras células de la raíz y/o realizando otras funciones. Además, también sería interesante encontrar a la CycD6;1 en otros tejidos y no limitarnos únicamente a la germinación y a la raíz, que es donde ya se ha visto. Al respecto, se podrían purificar los anticuerpos del suero inmune y hacer ensayos de inmunolocalización por fluorescencia en diferentes tejidos de la planta.
- La mayor peculiaridad de las CycD6 en general es que carecen del motivo de unión a RBR (LxCxE), así que, aunque ya existen estudios *in vitro* donde demuestran que cuando una ciclina D es mutada en este motivo no puede interactuar con RBR, sería ideal demostrar que efectivamente, una ciclina D que de manera natural no posee el motivo de unión, es incapaz de unirse con RBR *in vivo*, lo cual puede hacerse evaluando la actividad de cinasa de inmunoprecipitados de CycD6;1 sobre RBR. Las técnicas para determinar interacción proteína-proteína

pueden ser inadecuadas a este respecto, pues aunque los complejos de CycD-Cdk fosforilen a RBR y se hable de un motivo de unión a esta proteína, esta interacción entre una CycD y RBR es transitoria.

- Con el antecedente de que CycD6;1 de *Arabidopsis* se ha reportado antes solo en determinadas células de la raíz y posterior a la determinación de la interacción con RBR, será necesario saber cómo se regula su expresión para hacerla específica de dichas células y lo que es más importante, a quién y cómo está regulando, pues probablemente esto constituya una de las claves en los patrones de diferenciación celular. Al respecto, ahora que sabemos que CycD6;1 es sensible a la inanición de sacarosa, también sería interesante estudiar esta condición en la formación de dichos patrones celulares y determinar si cualquier afectación en ellos es causada por la respuesta de CycD6;1.

- Ya que comprobamos mediante ensayos cruzados de inmunoprecipitación que CdkA interactúa con CycD6;1, podemos ahora seguir el comportamiento de este complejo durante la germinación, y en los tejidos donde se encuentre la proteína. Además, es necesario comprobar que estos complejos sean activos y cómo está regulada esta actividad, así que para ello deben realizarse ensayos de actividad de cinasa asociada a la ciclina así como estudiar su regulación por fosforilaciones tanto activadoras como inhibitorias o bien, por la unión de inhibidores como Krp. Todo lo anterior es aplicable también a un posible complejo de CycD6;1 con CDKB, lo cual está pendiente de determinar y por lo tanto es también una perspectiva más de este estudio.

11. REFERENCIAS

- Ach RA, Durfee T, Miller AB, Taranto P, Hanley-Bowdoin L, Zambryski PC, Griesem W. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5077–86.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. p.983-1026.
- Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y, Ma H. Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J* 2002; 21: 3081–95.
- Baiza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* 1989 135 : 416–21.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125 : 315–26.
- Bewley JD and Black M. *SEEDS Physiology of development and germination*. 1st ed. New York: Plenum Press; 1985.
- Bewley JD & Black M. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1995.
- Bourne Y, Watson MH, Hickey MJ, Holmes W, Rocque W, *et al.* Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 1996; 84 : 863–74.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122 : 947–56.
- Buendía Monreal M. Caracterización filogenética y de expresión génica de las ciclinas tipo D de maíz. Tesis de maestría; 2011. Posgrado en ciencias Bioquímicas, UNAM. México.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plantarum* 2011; 143 (3) :297-308.
- Carrillo Trueba, C. El Origen del Maíz, naturaleza y cultura en mesoamérica. *Ciencias* 2009; 92-93: 4-13.
- Carstens P, Bonnardel J, Allen R, Waesche A. BL21-CodonPlus™ Cells Correct Expression Problems Caused by Codon Bias. *Strategies* 2001; 14: 50-2.
- Deltour R and Jacquemard A. Relation between water stress and DNA synthesis during Germinations of *Zea mays* L. *Ann Bot* 1974; 38: 529-534.
- Dewitte W and Murray JA. The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol*, 2003; 54: p. 235-64.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33: 389–96.

- Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato JY, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993; 73: 487–97.
- Freeling M and Walbot V, editors. *The Maize Handbook*. New York: Springer-Verlag; 1994.
- Godínez Palma SK. Interacción de las ciclinas D con Cdks durante la germinación en maíz. Tesis de Maestría; 2010. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. México.
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM. Maize Cyclin D2 Expression, Associated Kinase Activity and Effect of Phytohormones During Germination. *Plant Cell Physiol* 2005; 46(1): 166–73.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 1999; 41: 95-8.
- Healy JM, Menges M, Doonan JH, Murray JAH. The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* 2001; 276: 7041-7.
- Herrera I, Sánchez MP, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM. Proliferating cell nuclear antigen expression in maize. Regulation by phytohormones during seed development and germination and its association with a putative cyclin D protein. *Physiol Plant* 2000; 110: 127–34.
- Hirano H, Harashima H, Shinmyo A, Sekine M. Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation. *Plant Mol Biol* 2008; 66: 259–75.
- Hirano H, Harashima H, Shinmyo A, Sekine M. Arabidopsis G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation. *Plant Physiol Biochem* 2011; 49: 687-91.
- Huntley R, Healy JMS, Freeman D, Lavender P, de Jager SM, Greenwood J, *et al.* The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* 1998; 37: 155–69.
- Inzé D and De Veylder L. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu. Rev. Genet* 2006; 40: 77-105.
- Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, *et al.* Physcomitrella Cyclin-Dependent Kinase A Links Cell Cycle Reactivation to Other Cellular Changes during Reprogramming of Leaf Cells. *The Plant Cell*. En prensa 2011.
- Joubès J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin JP. CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 2000; 43(5-6): 607-20.
- Kawamura K, Murray JAH, Shinmyo A, Sekine M. Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. *Plant Mol Biol* 2006; 61: 311–327.
- Kiesselbach TA. *The Structure and Reproduction of Corn*. 50th Anniversary Edition. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; 274: 1652–9.
- Klug WS y Cummings MR. *Conceptos de Genética*. 5ª ed. España: Prentice Hall; 1998.

- Kolaskar,AS and Tongaonkar,PC (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 276: 172-174.
- Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Uchimiya H, Umeda M. Arabidopsis D-Type Cyclin CYCD4;1 Is a Novel Cyclin Partner of B2-Type Cyclin-Dependent Kinase. *Plant Physiol* 2003; 132: 1315–21.
- Kono A, Ohno R, Umeda-Hara C, Uchimiya H, Umeda M. A distinct type of cyclin D, CYCD4;2, involved in the activation of cell division in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 2006; 25: 540–5.
- La H, Li J, Ji Z, Cheng Y, Li X, Jiang S, *et al.* Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa* L.). *Mol Gen Genomics* 2006; 275: 374–86.
- Lara-Núñez A, de Jesús N, Vázquez-Ramos J. Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plantarum* 2008; 132: 79–88.
- Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995; 9: 639–49.
- Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, *et al.* D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(43): 15694-9.
- Mayer AM and Poljakoff A. The germination of seeds. 2nd ed. Oxford England: Pergamon Press; 1975.
- Menges M, Pavesi G, Morandini P, Bögre L, Murray JAH. Genomic Organization and Evolutionary Conservation of Plant D-Type Cyclins. *Plant Physiol* 2007; 145: 1558–76.
- Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH. The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell* 2006; 18: 893-906.
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/ cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 2002; 14 (8): 1847–57.
- Nakamura T, Sanokawa R, Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi, M, Mori N. Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res* 1995; 221: 534–42.
- Nugent JH, Alfa CE, Young T, Hymas JS. Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* 1991; 99: 669-74.
- Noble ME, Endicott JA, Brown NR, Johnson LN. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 482–7.
- Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C and Murray JA Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 357(1422): 749-60.
- Perales RH. Maíz, riqueza de México. *Ciencias* 2009; 92-93: 46-55.
- Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Structural Biology* 2009, 9: 51.

- Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 1995; 308: 697–711.
- Piperno DR, Ranere AJ, Holst I, Iriarte J, Dickau R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 5019–24.
- Planchais S, Samland AK, Murray JAH. Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* 2004; 38: 616–25.
- Quiroz-Figueroa F and Vázquez-Ramos JM. Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiol Plant* 2006; 128: 556–68.
- Ramirez-Parra E, Frundt C, Gutierrez C. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant J* 2003; 33: 801–11.
- Reyes J, Jiménez-García LF, González M, Vázquez-Ramos JM. Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci Res* 1991; 1: 113–7.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, Murray JA. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* 1999; 283: 1541–4.
- Riou-Khamlich C, Menges M, Healy JM, Murray JAH. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4513–21.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sherr CJ. D-Type cyclins. *Trends Biochem Sci Reviews* 1995; 20: 187–90.
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 1995; 7: 85–103.
- Sorrell DA, Marchbank A, McMahon K, Dickinson JR, Rogers HJ, Francis D. A WEE1 homologue from Arabidopsis thaliana. *Planta* 2002; 215: 518–22.
- Sozzani R, Cui H, Moreno-Risueno MA, Busch W, VanNorman JM, Vernoux T, *et al.* Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 2010; 466: 128–32.
- Steinborn K, Maulbetsch C, Priester B, Trautmann S, Pacher T, *et al.* The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev* 2002; 16: 959–71.
- Sun Y, Dilkes BP, Zhang C, Dante RA, Carneiro NP, *et al.* Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4180–5.
- Toyoshima H and Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67–74.
- Vandepoele K, Vlieghe K, Florquin K, Hennig L, Beemster GTS, *et al.* Genomewide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol* 2005; 139: 316–28.

- Vázquez Ramos JM. La bioquímica como herramienta para el estudio de la germinación. En: Molina Moreno J, Estrada Gómez JA, Livera Muñoz M, González Hernández VA, editores. Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México. 1ra ed. Chapingo, México: SOMEFI; 1990 p. 189-202.
- Vázquez Ramos JM. El ciclo celular. En: Jiménez García LF y Merchant Larios H, coords. Biología celular y Molecular. 1ra ed. México: Pearson educación, 2003. p. 595-616.
- Vázquez-Ramos JM and Sánchez MP. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res* 2003; 13: 113-30.
- Vela E. El Maíz. *Arqueología Mexicana* 2011; 38: 10-26.
- Vincent PLD. *Zea mays* (Maize, Corn). Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2002; 1-7.
- Wang GF, Kong HZ, Sun YJ, Zhang XH, Zhang W, Altman N, *et al*. Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* 2004; 135: 1084–99.
- Wang G, Miskimins R, Miskimins WK. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is localized to the cytosol in Swiss/3T3 cells. *Oncogene* 1999; 18: 5204– 10.
- Wang H, Fowke LC, Crosby WL. A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 1997; 386: 451–2.
- Yoshizumi T, Nagata N, Shimada H, Matsui M. An Arabidopsis cell cycle-dependent kinase-related gene, CDC2b, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *Plant Cell* 1999; 11: 1883–96

Apéndice 1. Análisis in silico de la secuencia de aminoácidos de ZmCycD6;1

Tabla A1.1. Epítomos de ZmCycD6;1 predichos por EMBOSS: Antigenic . El péptido inmunogénico contiene los epítomos 10 y 11.

Epítipo	Secuencia	Posición
1	ADEPIASLLDA	30-40
2	GHHAPSISAAA	42-52
3	AAAAFISKV	58-66
4	GELAVHPRVAYLALNYVDR	70-88
5	LSKRQLACEQ	90-99
6	WAPRLLAISCLSLAAKM	102-118
7	MERVVLGA	145-152
8	ARSVTPLAFLGFFLSACYPPPQHPPQVAAVKARAVDLLLHAQPE	157200
9	FSPSVVAAAALLAAAGEVAAANLHAFQASLAACPFVNS	206-243
10	KLRECGEVLAAAG	245-257
11	AAPSADTPVTVLGH	264-277

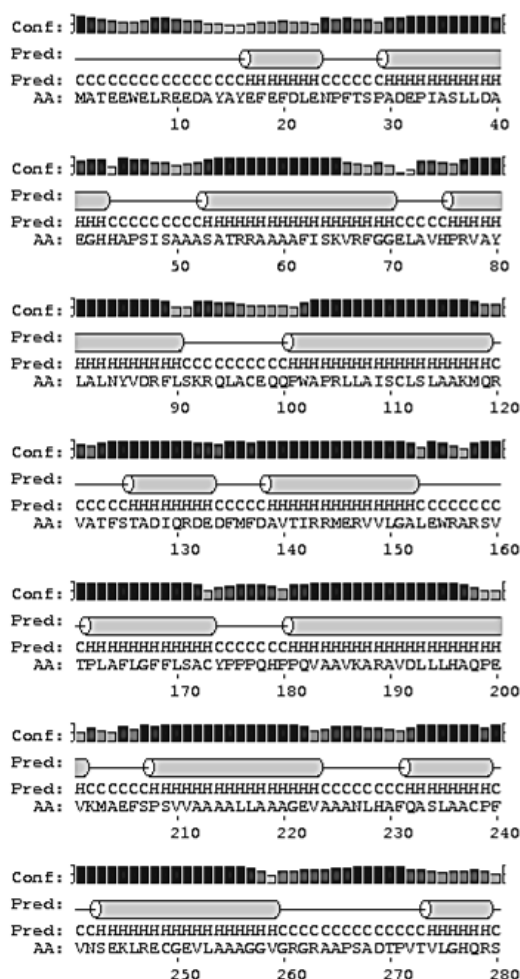


Figura A1.1. Resumen gráfico de la predicción de la estructura secundaria. H= α -hélice, C=otra estructura (diferente de α -hélice y hoja β). El nivel de confianza de la predicción para cada aminoácido (aa) se muestra gráficamente con barras.

Tabla A1.2. Predicción de accesibilidad de los aminoácidos en la superficie de la proteína y de la estructura secundaria (NetSurfP v. 1.1). El péptido inmunogénico va de la posición 239 a la 291.

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

E M	CycD6_1	1	0.649	129.905	-1.661	0.003	0.003	0.994
E A	CycD6_1	2	0.621	68.445	-1.397	0.018	0.047	0.935
E T	CycD6_1	3	0.511	70.890	-0.921	0.053	0.043	0.903
E E	CycD6_1	4	0.614	107.336	-0.372	0.113	0.043	0.844
E E	CycD6_1	5	0.604	105.571	-0.243	0.113	0.043	0.844
E W	CycD6_1	6	0.449	107.960	0.164	0.113	0.087	0.800
E E	CycD6_1	7	0.648	113.223	-0.018	0.113	0.087	0.800
E L	CycD6_1	8	0.287	52.641	0.022	0.113	0.043	0.844
E R	CycD6_1	9	0.486	111.248	0.502	0.115	0.016	0.868
E E	CycD6_1	10	0.638	111.406	0.068	0.181	0.016	0.803
E E	CycD6_1	11	0.671	117.241	-0.204	0.184	0.043	0.773
E D	CycD6_1	12	0.426	61.401	0.094	0.191	0.086	0.723
E A	CycD6_1	13	0.322	35.495	-0.175	0.199	0.152	0.649
E Y	CycD6_1	14	0.433	92.511	0.324	0.199	0.152	0.649
E A	CycD6_1	15	0.262	28.850	-0.232	0.307	0.165	0.527
E Y	CycD6_1	16	0.347	74.175	0.574	0.428	0.171	0.402
E E	CycD6_1	17	0.558	97.465	-0.057	0.502	0.102	0.396
B F	CycD6_1	18	0.237	47.526	0.695	0.561	0.047	0.393
E E	CycD6_1	19	0.512	89.464	-0.285	0.561	0.047	0.393
E F	CycD6_1	20	0.510	102.277	-0.116	0.430	0.016	0.555
E D	CycD6_1	21	0.574	82.685	-0.960	0.339	0.016	0.645
B L	CycD6_1	22	0.191	35.045	-0.306	0.339	0.016	0.645
E E	CycD6_1	23	0.476	83.175	-0.891	0.339	0.016	0.645
E N	CycD6_1	24	0.539	78.910	-0.457	0.257	0.016	0.727
E P	CycD6_1	25	0.348	49.410	-0.439	0.257	0.016	0.727
B F	CycD6_1	26	0.140	28.198	0.136	0.257	0.016	0.727
E T	CycD6_1	27	0.308	42.733	-0.070	0.257	0.016	0.727
E S	CycD6_1	28	0.440	51.580	-0.396	0.455	0.046	0.498
B P	CycD6_1	29	0.272	38.554	0.216	0.660	0.049	0.291
B A	CycD6_1	30	0.124	13.698	-0.360	0.938	0.007	0.055
E D	CycD6_1	31	0.517	74.485	0.074	0.970	0.001	0.030
E E	CycD6_1	32	0.436	76.134	0.635	0.970	0.001	0.030
B P	CycD6_1	33	0.055	7.833	0.796	0.970	0.001	0.030
B I	CycD6_1	34	0.085	15.743	1.100	0.970	0.001	0.030
E A	CycD6_1	35	0.458	50.450	1.720	0.970	0.001	0.030
E S	CycD6_1	36	0.307	35.992	0.710	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	37	0.037	6.793	0.349	0.988	0.000	0.012
B L	CycD6_1	38	0.225	41.143	0.846	0.970	0.001	0.030
E D	CycD6_1	39	0.622	89.645	1.165	0.970	0.001	0.030
E A	CycD6_1	40	0.263	28.939	0.987	0.970	0.001	0.030
B E	CycD6_1	41	0.068	11.827	-1.020	0.923	0.002	0.076
E G	CycD6_1	42	0.535	42.128	-0.004	0.858	0.002	0.139
E H	CycD6_1	43	0.686	124.783	0.496	0.782	0.003	0.216
E H	CycD6_1	44	0.281	51.150	-0.311	0.502	0.002	0.495
B A	CycD6_1	45	0.276	30.404	-0.431	0.109	0.005	0.886
E P	CycD6_1	46	0.600	85.154	-1.744	0.053	0.005	0.942
E S	CycD6_1	47	0.585	68.585	-1.142	0.016	0.005	0.979
B I	CycD6_1	48	0.284	52.614	-0.165	0.053	0.005	0.942
E S	CycD6_1	49	0.695	81.407	-0.658	0.176	0.004	0.820
E A	CycD6_1	50	0.476	52.444	-0.525	0.246	0.004	0.750
B A	CycD6_1	51	0.093	10.282	-0.485	0.246	0.004	0.750
E A	CycD6_1	52	0.347	38.261	0.809	0.246	0.004	0.750
E S	CycD6_1	53	0.485	56.795	-0.309	0.923	0.002	0.076
E A	CycD6_1	54	0.534	58.814	0.762	0.923	0.002	0.076
B T	CycD6_1	55	0.074	10.333	0.109	0.970	0.001	0.030
B R	CycD6_1	56	0.057	13.099	0.820	0.988	0.000	0.012
E R	CycD6_1	57	0.290	66.502	0.396	0.988	0.000	0.012
B A	CycD6_1	58	0.158	17.412	1.303	0.988	0.000	0.012
B A	CycD6_1	59	0.020	2.171	1.095	0.988	0.000	0.012
B A	CycD6_1	60	0.021	2.292	1.258	0.970	0.001	0.030
E A	CycD6_1	61	0.265	29.192	0.782	0.970	0.001	0.030
B F	CycD6_1	62	0.054	10.778	0.887	0.988	0.000	0.012
B I	CycD6_1	63	0.020	3.681	1.034	0.988	0.000	0.012
B S	CycD6_1	64	0.111	12.986	0.470	0.988	0.000	0.012
E K	CycD6_1	65	0.254	52.268	0.762	0.988	0.000	0.012
B V	CycD6_1	66	0.029	4.396	0.561	0.988	0.000	0.012

B R	CycD6_1	67	0.171	39.090	-0.032	0.970	0.001	0.030
B F	CycD6_1	68	0.192	38.595	-0.153	0.923	0.002	0.076
B G	CycD6_1	69	0.224	17.589	-0.212	0.858	0.002	0.139
E G	CycD6_1	70	0.516	40.601	-0.719	0.694	0.003	0.303
E E	CycD6_1	71	0.565	98.671	0.493	0.430	0.016	0.555
B L	CycD6_1	72	0.143	26.238	0.501	0.109	0.005	0.886
E A	CycD6_1	73	0.640	70.528	0.740	0.016	0.005	0.979
B V	CycD6_1	74	0.056	8.546	0.017	0.053	0.005	0.942
E H	CycD6_1	75	0.322	58.554	0.645	0.053	0.005	0.942
E P	CycD6_1	76	0.392	55.582	-0.720	0.858	0.002	0.139
B R	CycD6_1	77	0.250	57.342	-0.040	0.879	0.010	0.111
B V	CycD6_1	78	0.027	4.181	0.670	0.938	0.007	0.055
B A	CycD6_1	79	0.050	5.510	0.563	0.970	0.001	0.030
B Y	CycD6_1	80	0.116	24.789	0.240	0.988	0.000	0.012
B L	CycD6_1	81	0.070	12.890	0.550	0.988	0.000	0.012
B A	CycD6_1	82	0.019	2.039	0.861	0.988	0.000	0.012
B L	CycD6_1	83	0.039	7.232	-0.185	0.988	0.000	0.012
B N	CycD6_1	84	0.129	18.930	0.722	0.988	0.000	0.012
B Y	CycD6_1	85	0.050	10.578	0.888	0.988	0.000	0.012
B V	CycD6_1	86	0.026	3.965	0.960	0.988	0.000	0.012
B D	CycD6_1	87	0.113	16.355	-0.289	0.988	0.000	0.012
B R	CycD6_1	88	0.135	30.892	0.843	0.988	0.000	0.012
B F	CycD6_1	89	0.036	7.265	0.039	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	90	0.039	7.214	0.146	0.923	0.002	0.076
B S	CycD6_1	91	0.166	19.490	-0.936	0.858	0.002	0.139
E K	CycD6_1	92	0.265	54.408	-0.105	0.694	0.003	0.303
B R	CycD6_1	93	0.297	67.944	0.271	0.430	0.016	0.555
E Q	CycD6_1	94	0.333	59.545	-0.728	0.354	0.048	0.598
B L	CycD6_1	95	0.107	19.537	-0.584	0.307	0.165	0.527
E A	CycD6_1	96	0.377	41.501	-0.146	0.199	0.152	0.649
E C	CycD6_1	97	0.456	64.079	-0.466	0.191	0.086	0.723
E E	CycD6_1	98	0.625	109.240	-0.855	0.184	0.043	0.773
E Q	CycD6_1	99	0.472	84.335	-0.999	0.184	0.043	0.773
E Q	CycD6_1	100	0.441	78.745	-0.745	0.181	0.016	0.803
E P	CycD6_1	101	0.458	64.976	-1.339	0.339	0.016	0.645
E W	CycD6_1	102	0.290	69.673	-0.230	0.522	0.016	0.462
B A	CycD6_1	103	0.158	17.379	0.295	0.622	0.015	0.363
B P	CycD6_1	104	0.052	7.336	-0.476	0.717	0.014	0.269
B R	CycD6_1	105	0.130	29.747	0.211	0.802	0.014	0.185
B L	CycD6_1	106	0.034	6.189	-0.609	0.911	0.033	0.057
B L	CycD6_1	107	0.032	5.823	0.102	0.938	0.007	0.055
B A	CycD6_1	108	0.027	2.931	-0.368	0.938	0.007	0.055
B I	CycD6_1	109	0.034	6.290	-0.248	0.938	0.007	0.055
B S	CycD6_1	110	0.031	3.610	0.067	0.938	0.007	0.055
B C	CycD6_1	111	0.020	2.836	1.007	0.975	0.003	0.022
B L	CycD6_1	112	0.039	7.214	-0.026	0.975	0.003	0.022
B S	CycD6_1	113	0.058	6.821	0.415	0.975	0.003	0.022
B L	CycD6_1	114	0.036	6.500	0.064	0.938	0.007	0.055
B A	CycD6_1	115	0.024	2.667	-0.344	0.938	0.007	0.055
B A	CycD6_1	116	0.076	8.386	-2.065	0.782	0.003	0.216
B K	CycD6_1	117	0.248	50.993	0.102	0.600	0.003	0.397
B M	CycD6_1	118	0.197	39.380	0.446	0.339	0.016	0.645
E Q	CycD6_1	119	0.434	77.548	-0.053	0.257	0.016	0.727
E R	CycD6_1	120	0.620	142.003	-1.405	0.268	0.043	0.689
E V	CycD6_1	121	0.384	59.021	-0.682	0.115	0.016	0.868
E A	CycD6_1	122	0.532	58.648	-0.192	0.018	0.019	0.964
B T	CycD6_1	123	0.208	28.808	0.216	0.115	0.016	0.868
B F	CycD6_1	124	0.306	61.454	-0.488	0.257	0.016	0.727
E S	CycD6_1	125	0.369	43.294	1.088	0.257	0.016	0.727
B T	CycD6_1	126	0.043	5.964	-0.366	0.923	0.002	0.076
E A	CycD6_1	127	0.431	47.496	0.917	0.923	0.002	0.076
E D	CycD6_1	128	0.441	63.505	1.048	0.923	0.002	0.076
B I	CycD6_1	129	0.025	4.588	1.086	0.970	0.001	0.030
B Q	CycD6_1	130	0.105	18.682	0.238	0.975	0.003	0.022
E R	CycD6_1	131	0.487	111.477	1.050	0.938	0.007	0.055
B D	CycD6_1	132	0.228	32.898	0.132	0.879	0.010	0.111
B E	CycD6_1	133	0.078	13.696	-0.279	0.694	0.003	0.303
E D	CycD6_1	134	0.637	91.792	-0.144	0.246	0.004	0.750
E F	CycD6_1	135	0.478	95.975	-0.568	0.246	0.004	0.750
E M	CycD6_1	136	0.321	64.232	-0.271	0.339	0.016	0.645
B F	CycD6_1	137	0.122	24.526	0.224	0.268	0.043	0.689
E D	CycD6_1	138	0.401	57.813	0.894	0.113	0.043	0.844
E A	CycD6_1	139	0.296	32.674	0.829	0.923	0.002	0.076
E V	CycD6_1	140	0.682	104.870	1.085	0.970	0.001	0.030
B T	CycD6_1	141	0.221	30.653	1.454	0.970	0.001	0.030
B I	CycD6_1	142	0.018	3.386	1.102	0.988	0.000	0.012
B R	CycD6_1	143	0.198	45.411	1.537	0.988	0.000	0.012
E R	CycD6_1	144	0.520	119.194	1.266	0.970	0.001	0.030
B M	CycD6_1	145	0.147	29.315	0.590	0.970	0.001	0.030
B E	CycD6_1	146	0.038	6.621	-1.062	0.970	0.001	0.030
B R	CycD6_1	147	0.258	59.174	0.747	0.988	0.000	0.012
E V	CycD6_1	148	0.316	48.600	1.399	0.988	0.000	0.012
B V	CycD6_1	149	0.037	5.610	-0.232	0.975	0.003	0.022
B L	CycD6_1	150	0.043	7.837	0.009	0.975	0.003	0.022
E G	CycD6_1	151	0.523	41.152	1.211	0.938	0.007	0.055

E A	CycD6_1	152	0.330	36.410	1.171	0.831	0.044	0.125
B L	CycD6_1	153	0.050	9.210	0.858	0.354	0.048	0.598
E E	CycD6_1	154	0.501	87.455	0.530	0.053	0.043	0.903
B W	CycD6_1	155	0.116	27.970	-0.481	0.019	0.141	0.840
E R	CycD6_1	156	0.463	105.958	0.505	0.021	0.451	0.528
B A	CycD6_1	157	0.051	5.664	0.167	0.004	0.514	0.481
E R	CycD6_1	158	0.356	81.524	-0.477	0.005	0.336	0.660
B S	CycD6_1	159	0.145	16.982	0.264	0.004	0.197	0.799
B V	CycD6_1	160	0.141	21.702	-0.795	0.018	0.088	0.893
B T	CycD6_1	161	0.075	10.416	0.357	0.005	0.015	0.979
B P	CycD6_1	162	0.031	4.385	-0.546	0.321	0.003	0.675
B L	CycD6_1	163	0.187	34.166	-0.255	0.694	0.003	0.303
E A	CycD6_1	164	0.265	29.247	0.345	0.858	0.002	0.139
B F	CycD6_1	165	0.036	7.125	-0.102	0.923	0.002	0.076
B L	CycD6_1	166	0.028	5.182	-0.192	0.970	0.001	0.030
E G	CycD6_1	167	0.311	24.468	0.332	0.970	0.001	0.030
B F	CycD6_1	168	0.186	37.290	0.913	0.970	0.001	0.030
B F	CycD6_1	169	0.025	4.977	0.762	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	170	0.207	37.828	0.238	0.970	0.001	0.030
E S	CycD6_1	171	0.503	58.952	-0.009	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	172	0.209	23.054	-0.528	0.923	0.002	0.076
B C	CycD6_1	173	0.075	10.544	-1.239	0.782	0.003	0.216
E Y	CycD6_1	174	0.506	108.047	-0.369	0.600	0.003	0.397
E P	CycD6_1	175	0.365	51.808	-0.932	0.406	0.004	0.590
E P	CycD6_1	176	0.409	58.094	-0.726	0.176	0.004	0.820
E P	CycD6_1	177	0.523	74.242	-1.260	0.058	0.017	0.925
E Q	CycD6_1	178	0.648	115.786	-0.755	0.115	0.016	0.868
E H	CycD6_1	179	0.314	57.208	-0.328	0.109	0.005	0.886
E P	CycD6_1	180	0.502	71.248	-0.201	0.502	0.002	0.495
E P	CycD6_1	181	0.522	74.086	-0.159	0.858	0.002	0.139
E Q	CycD6_1	182	0.331	59.152	0.612	0.923	0.002	0.076
B V	CycD6_1	183	0.076	11.666	-0.085	0.923	0.002	0.076
E A	CycD6_1	184	0.329	36.234	0.695	0.970	0.001	0.030
E A	CycD6_1	185	0.267	29.390	0.756	0.970	0.001	0.030
B V	CycD6_1	186	0.037	5.625	-0.445	0.970	0.001	0.030
B K	CycD6_1	187	0.064	13.185	-0.256	0.970	0.001	0.030
E A	CycD6_1	188	0.342	37.677	0.815	0.970	0.001	0.030
B R	CycD6_1	189	0.113	25.923	1.132	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	190	0.020	2.193	0.727	0.970	0.001	0.030
B V	CycD6_1	191	0.106	16.338	0.308	0.970	0.001	0.030
E D	CycD6_1	192	0.254	36.573	0.635	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	193	0.034	6.244	0.450	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	194	0.036	6.573	-0.227	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	195	0.248	45.464	-0.260	0.970	0.001	0.030
B H	CycD6_1	196	0.170	30.978	0.142	0.923	0.002	0.076
B A	CycD6_1	197	0.028	3.053	0.158	0.858	0.002	0.139
B Q	CycD6_1	198	0.104	18.646	-0.347	0.694	0.003	0.303
B P	CycD6_1	199	0.275	38.994	0.073	0.502	0.002	0.495
E E	CycD6_1	200	0.283	49.510	-0.689	0.246	0.004	0.750
B V	CycD6_1	201	0.191	29.403	-0.039	0.257	0.016	0.727
E K	CycD6_1	202	0.389	80.079	0.025	0.257	0.016	0.727
B M	CycD6_1	203	0.078	15.548	-0.714	0.184	0.043	0.773
B A	CycD6_1	204	0.080	8.827	-0.083	0.113	0.043	0.844
E E	CycD6_1	205	0.402	70.299	-0.648	0.018	0.047	0.935
B F	CycD6_1	206	0.087	17.401	0.696	0.005	0.015	0.979
E S	CycD6_1	207	0.333	39.051	0.576	0.018	0.019	0.964
B P	CycD6_1	208	0.124	17.539	-0.280	0.694	0.003	0.303
B S	CycD6_1	209	0.097	11.333	-0.778	0.923	0.002	0.076
B V	CycD6_1	210	0.075	11.466	0.777	0.970	0.001	0.030
B V	CycD6_1	211	0.028	4.288	0.958	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	212	0.019	2.083	1.040	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	213	0.041	4.485	-0.349	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	214	0.028	3.042	0.375	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	215	0.021	2.336	1.030	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	216	0.034	6.170	0.501	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	217	0.055	10.107	0.952	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	218	0.039	4.320	0.703	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	219	0.017	1.862	0.895	0.988	0.000	0.012
B A	CycD6_1	220	0.093	10.260	0.442	0.970	0.001	0.030
B G	CycD6_1	221	0.243	19.124	0.297	0.970	0.001	0.030
B E	CycD6_1	222	0.197	34.398	-0.691	0.923	0.002	0.076
B V	CycD6_1	223	0.130	20.027	-0.148	0.694	0.003	0.303
E A	CycD6_1	224	0.557	61.359	-0.240	0.321	0.003	0.675
E A	CycD6_1	225	0.467	51.408	-0.495	0.176	0.004	0.820
E A	CycD6_1	226	0.626	68.974	-2.187	0.109	0.005	0.886
E N	CycD6_1	227	0.652	95.526	-1.100	0.016	0.005	0.979
E L	CycD6_1	228	0.302	55.315	-0.899	0.058	0.017	0.925
E H	CycD6_1	229	0.553	100.500	-1.716	0.053	0.005	0.942
E A	CycD6_1	230	0.555	61.161	0.139	0.257	0.016	0.727
B F	CycD6_1	231	0.082	16.538	-0.025	0.600	0.003	0.397
E Q	CycD6_1	232	0.356	63.635	0.480	0.858	0.002	0.139
E A	CycD6_1	233	0.603	66.462	0.438	0.923	0.002	0.076
E S	CycD6_1	234	0.273	31.960	0.971	0.923	0.002	0.076
B L	CycD6_1	235	0.044	7.983	0.180	0.938	0.007	0.055
E A	CycD6_1	236	0.382	42.107	1.444	0.938	0.007	0.055

E A	CycD6_1	237	0.589	64.919	0.849	0.879	0.010	0.111
B C	CycD6_1	238	0.199	27.940	0.861	0.694	0.003	0.303
B P	CycD6_1	239	0.217	30.792	-0.373	0.257	0.016	0.727
E F	CycD6_1	240	0.710	142.537	0.675	0.018	0.019	0.964
B V	CycD6_1	241	0.119	18.244	1.114	0.005	0.015	0.979
E N	CycD6_1	242	0.520	76.099	1.757	0.018	0.019	0.964
E S	CycD6_1	243	0.353	41.372	1.404	0.970	0.001	0.030
E E	CycD6_1	244	0.733	128.142	1.216	0.970	0.001	0.030
B K	CycD6_1	245	0.240	49.286	1.856	0.970	0.001	0.030
B L	CycD6_1	246	0.023	4.175	0.526	0.970	0.001	0.030
E R	CycD6_1	247	0.323	74.036	2.261	0.970	0.001	0.030
E E	CycD6_1	248	0.512	89.394	2.037	0.970	0.001	0.030
B C	CycD6_1	249	0.019	2.625	1.283	0.970	0.001	0.030
B G	CycD6_1	250	0.059	4.612	0.602	0.988	0.000	0.012
E E	CycD6_1	251	0.496	86.651	1.986	0.988	0.000	0.012
B V	CycD6_1	252	0.209	32.200	2.060	0.988	0.000	0.012
B L	CycD6_1	253	0.015	2.655	1.396	0.988	0.000	0.012
B A	CycD6_1	254	0.241	26.514	0.774	0.970	0.001	0.030
E A	CycD6_1	255	0.580	63.872	1.504	0.970	0.001	0.030
B A	CycD6_1	256	0.087	9.543	0.894	0.970	0.001	0.030
B G	CycD6_1	257	0.144	11.364	0.171	0.923	0.002	0.076
E G	CycD6_1	258	0.517	40.719	-0.266	0.923	0.002	0.076
E V	CycD6_1	259	0.494	75.943	-0.409	0.782	0.003	0.216
E G	CycD6_1	260	0.288	22.642	-0.467	0.502	0.002	0.495
E R	CycD6_1	261	0.551	126.179	-0.825	0.321	0.003	0.675
E G	CycD6_1	262	0.645	50.801	-1.066	0.176	0.004	0.820
E R	CycD6_1	263	0.522	119.492	-0.712	0.115	0.016	0.868
E A	CycD6_1	264	0.436	48.091	-1.180	0.018	0.019	0.964
B A	CycD6_1	265	0.235	25.941	-1.623	0.018	0.019	0.964
E P	CycD6_1	266	0.525	74.554	-0.833	0.018	0.047	0.935
E S	CycD6_1	267	0.307	35.934	-1.134	0.053	0.043	0.903
E A	CycD6_1	268	0.394	43.452	-1.164	0.052	0.084	0.864
E D	CycD6_1	269	0.526	75.797	-1.287	0.052	0.084	0.864
E T	CycD6_1	270	0.415	57.588	-0.558	0.018	0.047	0.935
E P	CycD6_1	271	0.533	75.661	-1.170	0.053	0.043	0.903
E V	CycD6_1	272	0.484	74.422	-1.404	0.053	0.043	0.903
E T	CycD6_1	273	0.333	46.215	-1.347	0.053	0.043	0.903
E V	CycD6_1	274	0.458	70.364	-0.396	0.113	0.043	0.844
E L	CycD6_1	275	0.281	51.524	-0.294	0.113	0.087	0.800
E G	CycD6_1	276	0.574	45.213	-0.015	0.113	0.087	0.800
E H	CycD6_1	277	0.339	61.682	-0.659	0.118	0.150	0.732
E Q	CycD6_1	278	0.438	78.263	-0.455	0.064	0.216	0.721
E R	CycD6_1	279	0.346	79.326	-0.726	0.066	0.296	0.638
B S	CycD6_1	280	0.174	20.428	-2.026	0.020	0.205	0.775
B A	CycD6_1	281	0.244	26.889	-1.504	0.020	0.205	0.775
E S	CycD6_1	282	0.368	43.083	-0.788	0.020	0.205	0.775
E S	CycD6_1	283	0.458	53.642	-0.981	0.020	0.205	0.775
E A	CycD6_1	284	0.470	51.794	-1.407	0.019	0.141	0.840
E S	CycD6_1	285	0.460	53.889	-0.835	0.053	0.043	0.903
E E	CycD6_1	286	0.563	98.426	-0.665	0.058	0.017	0.925
E T	CycD6_1	287	0.559	77.533	-0.938	0.058	0.017	0.925
E D	CycD6_1	288	0.473	68.159	-0.783	0.053	0.043	0.903
E W	CycD6_1	289	0.404	97.282	-1.288	0.053	0.043	0.903
E I	CycD6_1	290	0.371	68.653	-0.984	0.052	0.084	0.864
E N	CycD6_1	291	0.486	71.136	-1.305	0.052	0.084	0.864
E G	CycD6_1	292	0.378	29.756	-1.386	0.052	0.084	0.864
E G	CycD6_1	293	0.480	37.760	-1.712	0.052	0.084	0.864
E D	CycD6_1	294	0.546	78.751	-0.996	0.053	0.043	0.903
B A	CycD6_1	295	0.168	18.492	-1.106	0.018	0.047	0.935
E K	CycD6_1	296	0.542	111.469	-0.208	0.018	0.047	0.935
E K	CycD6_1	297	0.622	127.945	-0.300	0.018	0.047	0.935
E R	CycD6_1	298	0.588	134.583	-0.833	0.018	0.047	0.935
E C	CycD6_1	299	0.434	61.004	-1.241	0.018	0.047	0.935
E M	CycD6_1	300	0.504	100.770	-2.234	0.018	0.047	0.935
E G	CycD6_1	301	0.490	38.539	-0.751	0.018	0.019	0.964
E P	CycD6_1	302	0.495	70.240	0.167	0.003	0.003	0.994
E P	CycD6_1	303	0.489	69.361	-1.391	0.018	0.019	0.964
E S	CycD6_1	304	0.534	62.573	-1.058	0.018	0.047	0.935
E Q	CycD6_1	305	0.633	113.090	-0.547	0.018	0.047	0.935
E W	CycD6_1	306	0.489	117.532	-1.587	0.018	0.019	0.964
E G	CycD6_1	307	0.895	70.413	-2.495	0.003	0.003	0.994

Tabla A1.3. Porcentaje de identidad entre el péptido inmunogénico y los fragmentos que de las demás CycDs que corresponden a la misma posición en el alineamiento.

Fragmento	CycD6;1
CycD1;1	8.9%
CycD2;1	10.4%
CycD2;2A	9.8%
CycD2;2B	11.2%
CycD2;3	15.6%
CycD4;1A	13.7%
CycD4;1B	12.5%
CycD4;2	7.7%
CycD3;1A	8.6%
CycD3;1B	10.0%
CycD5;1	11.7%
CycD5;2A	9.5%
CycD5;2B	5.9%
CycD5;3A	5.1%
CycD5;3B	7.2%
CycD6;1	ID
CycD7;1	5.0%

66

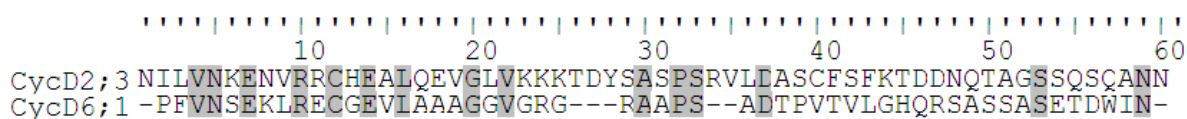


Figura A1.2. Alineamiento del péptido inmunogénico con la Cyc2;3. Los aminoácidos idénticos están sombreados en gris.

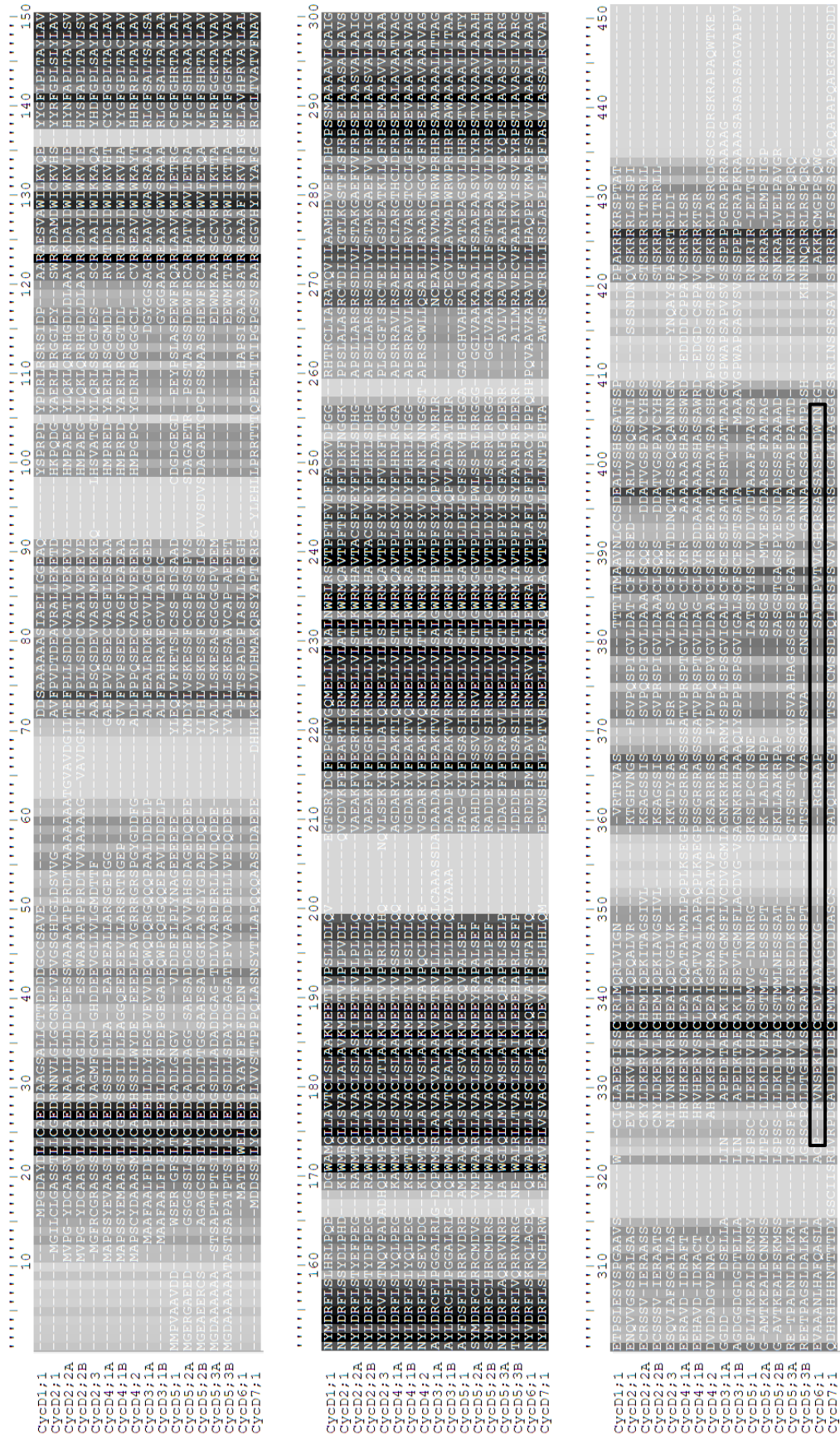
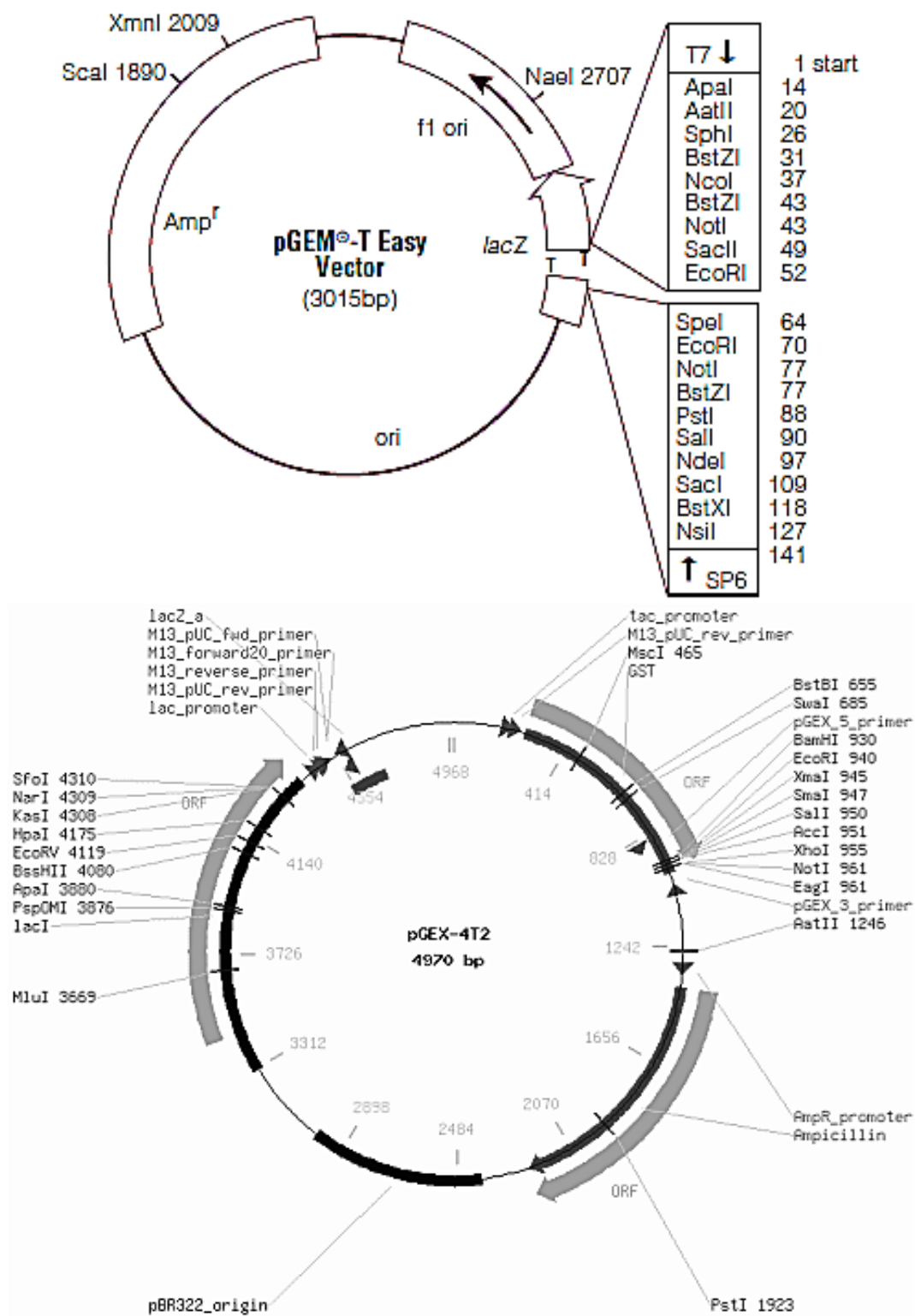


Figura A1.3. Regiones conservadas entre las 17 Ciclinas D de maíz. La conservación de los aminoácidos en cada posición se expresa gráficamente en una escala de grises donde el negro corresponde a los aminoácidos totalmente conservados, y el gris más claro a los aminoácidos nada conservados. Encerrado en el rectángulo negro está el péptido inmunogénico

Apéndice 2. Esquemas de los vectores de clonación (pGem-T Easy) y de expresión (pGex-4T2).



Apéndice 3. *Primers* diseñados para amplificar y clonar CycD6;1 y condiciones de amplificación.

Tabla A3.1. *Primers*.

Ciclina	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
CycD6;1	FW AAAGGATCCCCCTTTGTAAATAGCGAGAAGCTG	178
	RV AAAGAATTCCGTTAATCCAGTCGGTCTCC	

Tabla A3.2. Condiciones de amplificación de CycD6;1 por RT-PCR y PCR.

Reacción	Condiciones
OneStep RT-PCR (Quiagen)	30 min a 50°C, 15 min a 95°C
	35 ciclos (50 s a 94°C, 50 s a 61°C, 45 s a 72°C)
	10 min a 72°C
PCR (iProof High-Fidelity PCR 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

Apéndice 4. Esquema de inmunización.

Día	Recombinante administrada	Vía de administración
1	2 mg con PA y AIF	Subcutánea
7	0.5 mg con PA y AIF	Subcutánea
20	1.5mg con AIF	Subcutánea
27	4 mg en SSI	Intraperitoneal
46	0.5mg en SSI	Intravenosa
50	Sangría de cosecha	Punción cardiaca

PA: Poliacrilamida

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

SSI: Solución Salina Isotónica