



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Asociación de la proteína de retinoblastoma (RBR1) a *loci* de ciclo celular durante la germinación de maíz”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Cassandra Suárez Espinoza**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos, Facultad de Química -UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Tsvetanka Dimitrova Dinkova, Facultad de Química-UNAM

Dr. Roberto Coria Ortega, Instituto de Fisiología Celular-UNAM

Ciudad de México, enero, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Reconocimientos

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

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

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química - UNAM
Dra. Tsvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química - UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular - UNAM

Se reconoce:

Al financiamiento para la realización de los experimentos por parte de PAPIIT (IN215316 y IA204817) y PAIP (5000-9124 y 5000-9130).

Durante la duración del programa de maestría gocé de una Beca de Maestría Nacional otorgada por CONACyT y posterior al término de la maestría gocé de un Estímulo económico de Ayudante de Investigador Nivel III otorgado por el SNI.

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química - UNAM
Vocal: Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química - UNAM
Vocal: Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular - UNAM
Vocal: Dra. Adriana Garay Arroyo	Instituto de Ecología - UNAM
Secretario: Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes	Instituto de Fisiología Celular - UNAM

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por mi formación académica y humana.

A mi madre, por todo su apoyo y guía en momentos de duda, siempre.

Al Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos por la gran oportunidad de realizar este proyecto bajo su tutoría, por confiar y tener fé en mí.

Al Biól. Víctor Allan Sánchez Camargo, a la Dra. Sara Margarita Garza Aguilar y al Dr. Elpidio García Ramírez por su guía y sugerencias experimentales indispensables para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A los miembros del comité tutor, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y Dr. Roberto Coria Ortega que criticaron, discutieron y enriquecieron este proyecto.

A los miembros del Jurado, doctores Francisco Javier Pasencia de la Parra, Eleazar Martínez Barajas, Marina Macías Silva, Adriana Garay Arroyo y Carlos Leonardo Peraza Reyes por la revisión, corrección y mejora del presente trabajo escrito.

A mis compañeros de laboratorio: Javier, Mingyar y Pablo por sus sugerencias, críticas y aportación de ideas a este trabajo; a Samantha, Jesús, Damaris, Aldo y Mariana.

A David, por su apoyo incondicional, su amistad, el ánimo y la fuerza brindada en momentos difíciles.

A CONACyT por la beca otorgada, al SNI por el Estímulo Económico de Ayudante de Investigador Nivel III, a los proyectos CONACyT (CB220661), PAPIIT (IN215316 y IA204817) y PAIP (5000-9124 y 5000-9130) por el financiamiento para la realización de los experimentos llevados a cabo.

## Contenido

<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>8</b>
<b>Figuras.....</b>	<b>9</b>
<b>Tablas.....</b>	<b>10</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>11</b>
1.1. El maíz.....	11
1.1.1. Origen, evolución y domesticación del maíz.....	11
1.1.2. La semilla de maíz.....	13
1.1.3. Usos del maíz.....	15
1.2. La germinación.....	16
1.3. El ciclo celular.....	19
1.3.1. El ciclo celular en plantas.....	21
1.3.2. Regulación del ciclo celular en plantas.....	22
1.4. La proteína de retinoblastoma.....	24
1.4.1. Estructura de la proteína de retinoblastoma en mamíferos.....	26
1.4.2. Rb como regulador del ciclo celular en mamíferos.....	28
1.4.3. La proteína de retinoblastoma en plantas.....	31
1.4.3.1. RBR y la familia de factores transcripcionales E2F en Arabidopsis.....	32
1.4.3.2. El papel de la proteína RBR en la transición G <sub>1</sub> -S en plantas.....	35
1.4.3.3. Regulación de la transcripción de genes mediada por RBR a través del complejo heterodimérico E2F-DP en plantas.....	37
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>44</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>45</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>45</b>
5.1. Objetivo general.....	45
5.2. Objetivos particulares.....	45

<b>6. Materiales y metodología.....</b>	<b>46</b>
6.1. Material biológico.....	46
6.1.1. Semillas y hojas de plántula de maíz.....	46
6.1.2. Cepas.....	46
6.1.3. Cultivos bacterianos.....	46
6.2. Validación del anticuerpo anti-RBR1 de maíz.....	47
6.2.1. Expresión y purificación del péptido inmunogénico recombinante.....	47
6.2.2. Cuantificación del péptido inmunogénico purificado por el método de Bradford.....	49
6.2.3. Obtención de extractos proteicos totales de semillas y hojas de plántula de maíz.....	49
6.2.4. Extracción de proteínas nucleares de ejes embrionarios de maíz.....	50
6.2.5. Caracterización de los anticuerpos anti-RBR1 de maíz mediante ensayos de competencia.....	50
6.3. Determinación de la presencia de ZmRBR1 durante la germinación de semillas maíz y en extractos nucleares.....	51
6.4. Determinación de la interacción de ZmRBR1-ZmE2FA/B1;1 durante la germinación de maíz.....	51
6.4.1. Interacción <i>in vitro</i> entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz.....	51
6.4.1.1. Purificación de las proteínas GST-ZmRBR1 PC y PeX-ZmE2FA/B1;1 recombinantes.....	52
6.4.1.2. Purificación del anticuerpo anti-ZmE2FA/B1;1 por western blot..	53
6.4.1.3. Determinación de la Interacción <i>in vitro</i> entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz.....	53
6.4.2. Determinación de la interacción <i>in vivo</i> entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz.....	55
6.5. Determinación de los <i>loci</i> a los que ZmRBR1 se asocia durante la germinación de maíz.....	55

6.5.1. Extracción de la cromatina de puntas de raíz de ejes embrionarios de maíz.....	56
6.5.2. Inmunoprecipitación de la cromatina asociada a RBR1 durante la germinación de maíz.....	57
6.5.3. Amplificación de la cromatina asociada a ZmRBR1 durante la germinación de maíz por PCR.....	58
<b>7. Resultados.....</b>	<b>60</b>
7.1. Validación de los anticuerpos anti RBR1 de maíz.....	60
7.1.1. La proteína RBR1 está presente en el eje embrionario durante la germinación de maíz.....	62
7.2. RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos <i>in vitro</i> y durante la germinación de maíz...63	63
7.2.1. RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz interactúan <i>in vitro</i> .....	63
7.2.2. RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos durante la germinación de maíz...68	68
7.3. RBR1 se asocia a <i>loci</i> blancos de E2F importantes para la fase S del ciclo celular durante la germinación de maíz.....	70
<b>8. Discusión de resultados.....</b>	<b>73</b>
8.1. La proteína RBR1 se expresa en extractos proteicos y durante la germinación de maíz.....	73
8.2. RBR1 interactúa con E2FA/B1;1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> durante la germinación de semillas de maíz.....	75
8.3. RBR1 se asocia temporalmente a los promotores de los genes blanco de E2F importantes para la fase S del ciclo celular durante la germinación de maíz.....	80
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>83</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>84</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>85</b>
<b>12. Apéndices.....</b>	<b>99</b>

## Resumen

La germinación de las semillas tiene como propósito principal el establecimiento de una nueva planta. El proceso de germinación involucra el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de sus procesos de desarrollo. Como consecuencia de la entrada de agua a la semilla (imbibición) se reactivan procesos celulares importantes como el ciclo celular, un proceso seguido por la protrusión de la radícula, evento que define el final del proceso de germinación. Dado que la mayoría de las células en las zonas meristemáticas de la semilla seca se encuentran detenidas en la fase  $G_1$ , un proceso de germinación exitoso requiere que las células de la semilla reactiven su metabolismo celular a partir de  $G_1$  y completen la primera ronda de divisiones celulares, la semilla puede continuar entonces con los procesos de proliferación y crecimiento durante el desarrollo posterior y dar lugar a una nueva planta. En este contexto, nuestra estrategia ha consistido en analizar los mecanismos moleculares y a los reguladores de la fase  $G_1$  y la transición  $G_1$ -S a nivel de interacción entre proteínas clave y su interacción con los promotores de genes importantes para la fase S de ciclo celular: la proteína asociada a retinoblastoma (RBR) y el factor transcripcional E2F (factor de unión a promotor de adenovirus E2).

En el presente trabajo, se reporta la validación de anticuerpos policlonales específicos contra RBR1 de maíz con los cuales se determinó que la proteína endógena está presente en la semilla seca y a lo largo de la germinación de manera aparentemente constante. Se determinó también que ésta forma complejos con E2FA/B1;1 *in vitro* e *in vivo*; además, se describió la unión de RBR1 a promotores de genes blanco de E2F claves para la entrada a la fase S del ciclo celular: *MCM3*, *PCNA1* y *RPA2* durante la germinación. Dentro de las conclusiones principales de este trabajo, RBR1 interactúa posiblemente con E2FA/B1;1 para reprimir la expresión de sus genes blanco en la semilla seca y, a las 15 h, cuando las células de la radícula deberían estar en fase S, esta interacción se reduce permitiendo la expresión de genes clave para el inicio de la replicación del DNA. Con los resultados obtenidos en este trabajo RBR1 actúa como regulador negativo del ciclo celular durante la germinación de maíz una función que no había sido descrito anteriormente.



## Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
a.C.	Antes de Cristo
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
DNA	Ácido desoxirribonucleico
APC	Complejo promotor de anafase
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
CDC6	Proteina de ciclo celular 6
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
DNMT	Metiltransferasa de DNA
DP	Socio de dimerización
E2F	Factor de unión a promotor de adenovirus E2
EST	Marcador de secuencia expresada
HDAC	Histona desacetilasa
HMT	Histona metil transferasa
HP1	Proteina de heterocromatina 1
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
KRP	Proteina relacionada a Kip
MCM	Proteina de mantenimiento de mini-cromosomas
ORC	Complejo de reconocimiento de origen
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RBR	Proteina relacionada a retinoblastoma
Rep A	Proteina de replicación A
RNR	Ribonucleótido reductasa
SV40 TAg	Antígeno T grande del virus 40 vacuolado del simio
TOR	Diana de rapamicina
WDV	Virus del enanismo del trigo
WEE	Protein-cinasa inhibidora de mitosis

## Figuras

1. Teocintle (*Zea mexicana*) y maíz (*Zea mays*).
2. Secciones verticales de la semilla de maíz madura.
3. Curso temporal de toma de agua y algunos cambios importantes asociados a la germinación de semillas ortodoxas.
4. Representación esquemática de los eventos más importantes en el ciclo celular eucariótico.
5. La transición G1-S.
6. La transición G2-M.
7. Estructura general de la proteína de retinoblastoma.
8. Esquema general de la estructura de la familia de factores transcripcionales E2F y sus asociaciones con las proteínas *pocket* en mamíferos.
9. Esquema de las características estructurales de Rb y algunos de sus homólogos en plantas.
10. Organización estructural y propiedades de unión al DNA de la familia de factores transcripcionales E2F en *Arabidopsis*.
11. Modelo para la regulación transcripcional mediada por RBR-E2F/DP durante la transición G<sub>1</sub>-S.
12. Alineamiento esquemático de ZmRBR1 y ZmRBR3 con Rb de humanos (HsRb).
13. E2Fs típicos que pertenecen a la familia de factores transcripcionales E2F/DP de maíz y expresión de RNAm de ZmE2FA/B1;1.
14. Acumulación de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de semillas de maíz.
15. Expresión y purificación del péptido de ZmRBR1 recombinante.
16. Validación de los anticuerpos anti-RBR1 de maíz por ensayo de competencia.
17. Inmunodetección de la proteína RBR1 durante la germinación de maíz, en puntas de hojas y extractos nucleares.
18. Interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz.
19. Interacción *in vivo* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz.
20. Asociación de RBR1 a los sitios E2F presentes en los promotores de *MCM3*, *PCNA1* y *RPA2*.

## Tablas

1. Clasificación taxonómica del maíz.

## Apéndices

1. Expresión y purificación de las proteínas GST-ZmRBR1 y ZmE2FA/B1;1 recombinantes.
2. Controles negativos para la interacción RBR1-E2FA/B1;1 de maíz.
3. Interacción *in vitro* entre las proteínas GST-ZmRBR1 PC y ZmE2FA/B1;1 recombinantes utilizando los anticuerpos anti E2FA/B1;1 sin purificar.
4. Purificación del anticuerpo anti E2FA/B1;1 de maíz.
5. Controles de entrecruzamiento de los anticuerpos anti RBR1 de maíz a la resina proteína A-agarosa.
- 6.

Tabla A.6.1. Elementos E2F potenciales presentes en los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1*.

Tabla A.6.2. Cebadores utilizados para la amplificación de los sitios E2F presentes en los promotores de los genes *MCM3*, *PCNA1*, *RPA2* y sin sitios E2F, *CYCD3;1a*.

## 1. Introducción

### 1.1. El maíz

El maíz es una planta de origen americano y de importancia fundamental en el desarrollo de las antiguas culturas de América, ya que constituyó su alimento básico; además, tiene una importancia histórica ya que quizá fue una de las primeras plantas en ser cultivadas. El maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays*, es una planta herbácea, monocotiledónea, anual (Raven et al., 1992) y está clasificada como miembro de la familia de las gramíneas *poaceae* (Tabla 1).

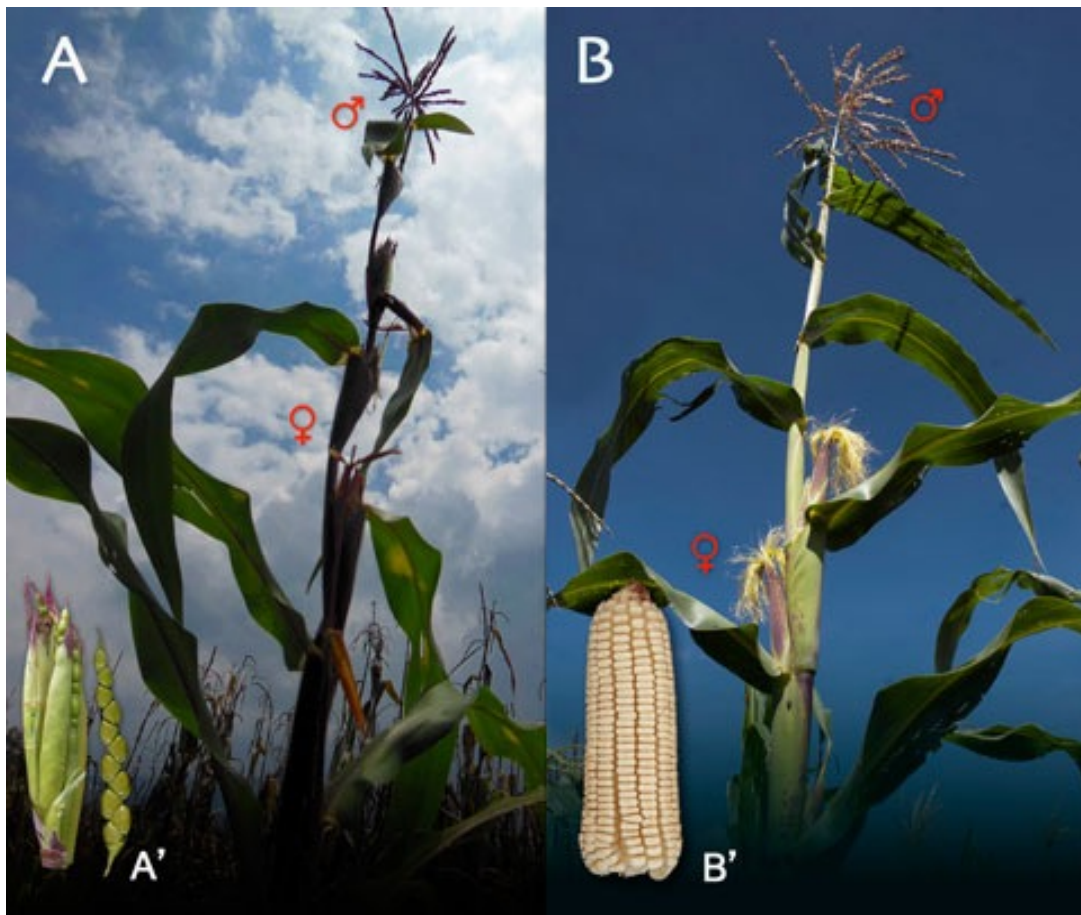
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Subclase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Poaceae
<b>Género</b>	<i>Zea</i>
<b>Especie</b>	<i>Zea mays</i>

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

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

El maíz, uno de los tres granos básicos que alimentan a la humanidad, tuvo su origen y diversificación inicial en las montañas y valles de México. La historia de la presencia del maíz en México ha sido conocida a través de representaciones encontradas en esculturas, pinturas, mitos, festividades y ceremonias de la época prehispánica. Una de sus primeras representaciones fue la del dios olmeca del maíz (*Homshuk*) cuya cultura estaba fundada en

el cultivo del maíz y floreció entre los años 1500 y 300 a.C. (Joralemon, 1971; Florescano, 2003). El hombre otorgó al maíz el papel de protagonista en un sinnúmero de relatos míticos; por ejemplo y acerca del origen del hombre, el *Popol Vuh*, documento escrito por los Mayas Quiché de Guatemala y recopilado hacia finales del siglo XVI (Saravia, 1965), legó uno de los más bellos relatos registrados, en donde se relata que una vez que las divinidades creadoras poblaron el mundo con animales del cielo y de la tierra, crearon al hombre a partir del maíz.



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

Especímenes de mazorcas de maíz se han recuperado de cuevas en Oaxaca, México, que datan de más de 6,000 años a.C. Estudios en la variación de microsatélites del genoma de maíz indican que ésta planta surgió de un solo evento de domesticación hace alrededor de 9000 años (Matsuoka *et al.*, 2001). Por otro lado, en la diversificación del maíz

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

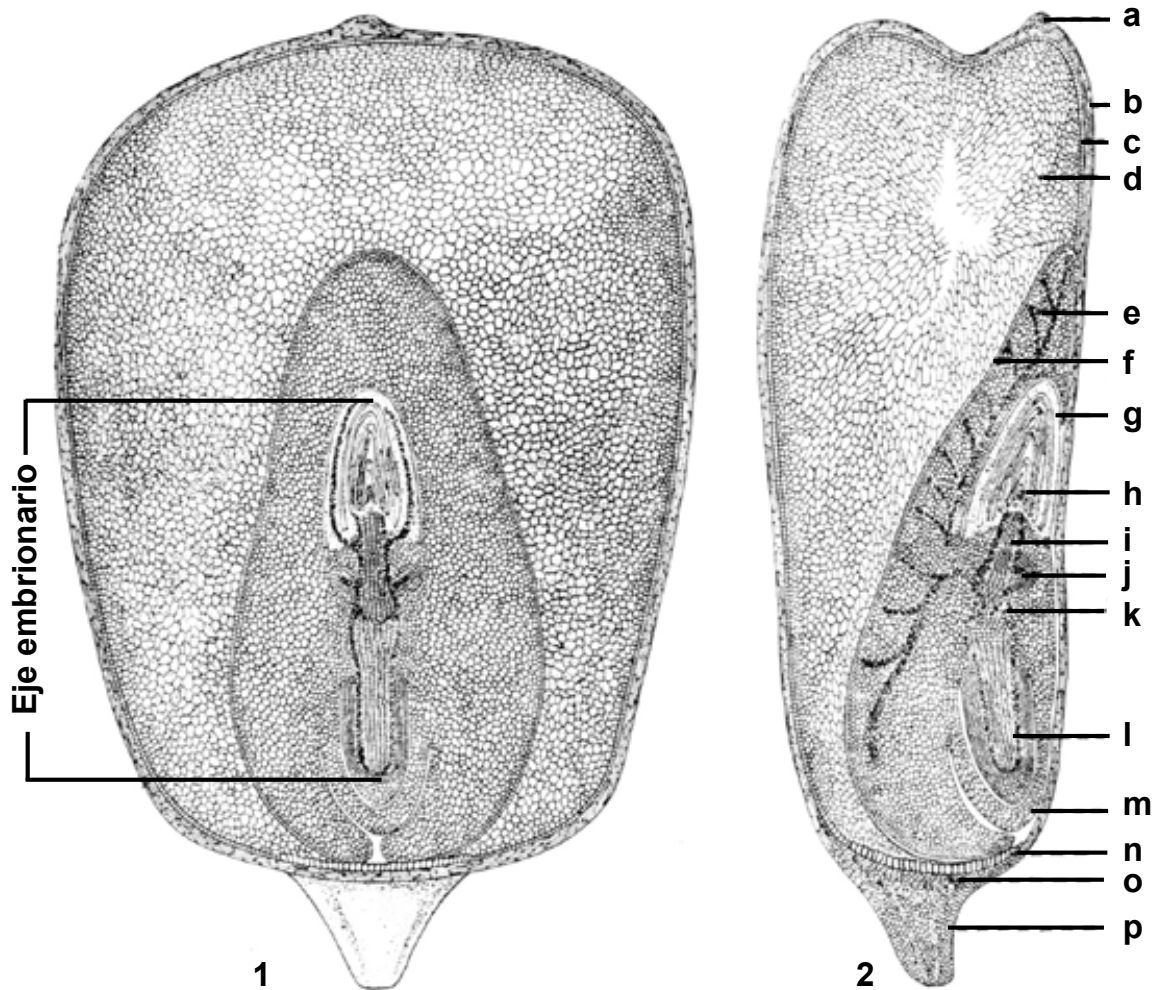
El origen del maíz ha sido debatido por largo tiempo, pero se cree que el progenitor más probable del maíz es el teocintle (*Zea mexicana*) (Fig. 1) o el teocintle tipo 'Balsas' (*Zea mays parviglumis*), un miembro cubierto de maleza del género *Zea* (Beadle, 1939). Los teocintles tienen varios tallos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

### **1.1.2. La semilla de maíz**

La semilla de maíz madura, conocida como cariopsis, está compuesta de tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Fig. 2). El pericarpio es la capa externa del grano y se deriva de la pared del ovario, por lo que es genéticamente idéntica a la planta madre. El endospermo y el embrión están rodeados y sujetos por el pericarpio y representan genéticamente a la siguiente generación ya que poseen material genético de las líneas paterna y materna. El endospermo representa aproximadamente el 85% del peso

total del grano y sirve como fuente de energía (en forma de gránulos de almidón y cuerpos proteicos) para el embrión durante varios días posteriores a la germinación. La capa más externa del endospermo consiste de una capa de células especializadas llamada aleurona; durante la germinación, las giberelinas, hormonas producidas en el embrión, permiten que las células de la aleurona liberen amilasas para hidrolizar el almidón y proveer de azúcares necesarios para el inicio del crecimiento de una nueva planta, por lo tanto, estimulan la germinación y la elongación celular.

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



**Figura 2. Secciones verticales de la semilla de maíz madura** vista 1) de frente y 2) de perfil. a) Cubierta del estilo, b) pericarpio, c) aleurona, d) endospermo, e) escutelo, f) capara granular del escutelo, g) coleoptilo, h) plúmula, i) primer internodo, j) primordio de raíz lateral adventicia, k) nodo escutelar y l) radícula; m) coleorriza, n) células conductoras basales de endospermo, o) capa de absición, p) pedúnculo (modificado de Coe, 2001).

### 1.1.3. Usos del maíz

El maíz constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo (FAS, USDA circular WAS 12-18; diciembre del 2018) y está entre los alimentos que tienen aplicaciones más diversas. Su uso se centra no sólo en la alimentación humana, también forma parte de la alimentación animal por sí mismo o como ingrediente en la composición de piensos para aves, cerdos y vacas. Por otra parte, los tallos de maíz, una vez separada la mazorca, son utilizados como forraje. Desde el punto de vista industrial, esta planta también se utiliza para la obtención de edulcorantes alimentarios, de almidón y de alcohol. De las partes no comestibles se obtiene también furfural, un



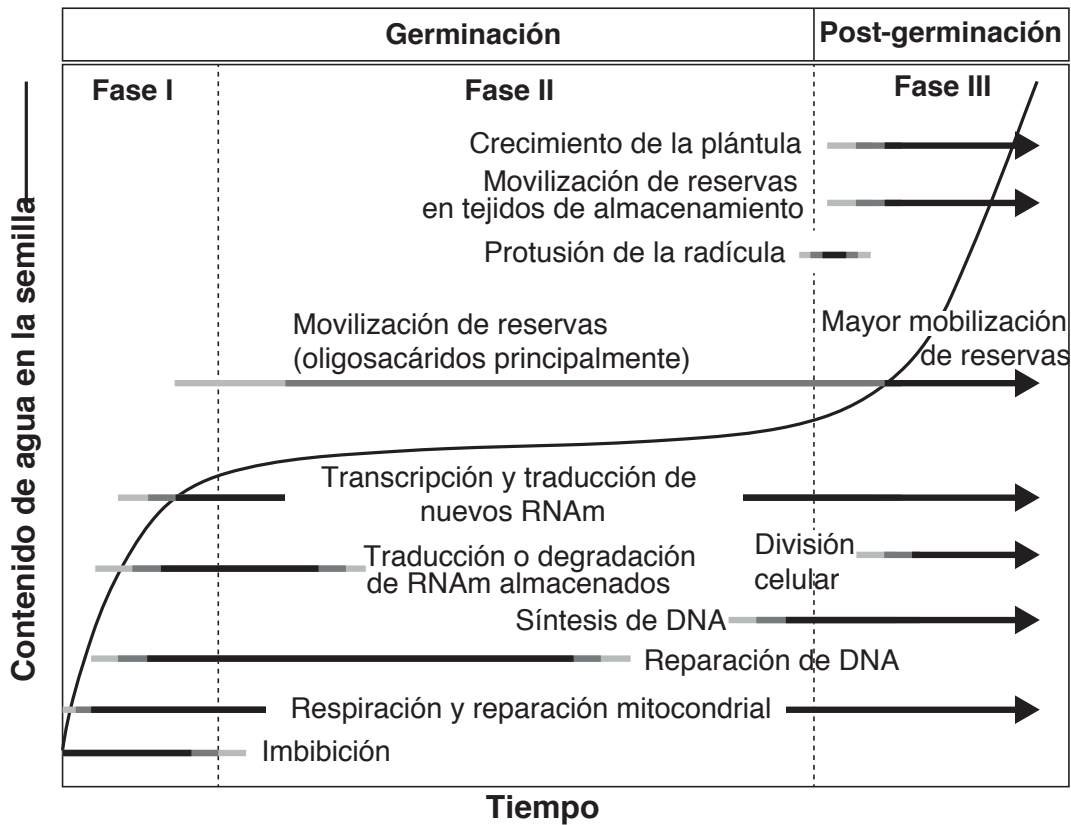
compuesto utilizado en la industria del caucho, resinas, plásticos e insecticidas (Paliwal *et al.*, 2001).

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

## **1.2. La germinación**

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

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



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

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

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

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

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

Desde décadas atrás, estudios en germinación de ejes embrionarios de maíz indicaron que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Deltour y Jaqmard, 1974; Conger y Carabia, 1976; Deltour, 1985) y durante las primeras horas de germinación, las células se sincronizan parcialmente y entran a la fase S entre las 12 y 15 h post-imbibición (Baíza *et al.*, 1989), por lo que la germinación de las semillas proporciona un modelo fisiológico para el estudio del ciclo celular. Durante las horas tempranas de la germinación de las semillas, el patrón de expresión de las proteínas existentes puede no exhibir cambios cualitativos importantes, pero a tiempos de germinación más avanzados puede presentarse. Es muy probable que las proteínas reguladoras sean producidas a niveles por debajo de los niveles de detección electroforética (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981); sin embargo, las células de ejes embrionarios secos poseen niveles visibles de todas las proteínas analizadas que son consideradas propias del ciclo celular como son las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclina (Cdks), PCNA, las DNA polimerasas y las DNA ligasas, entre otras (García *et al.*, 2002 y 2006; Gutierrez *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005). Aunque algunas de ellas no sufren modificaciones en sus niveles a lo largo de la germinación, como por ejemplo las

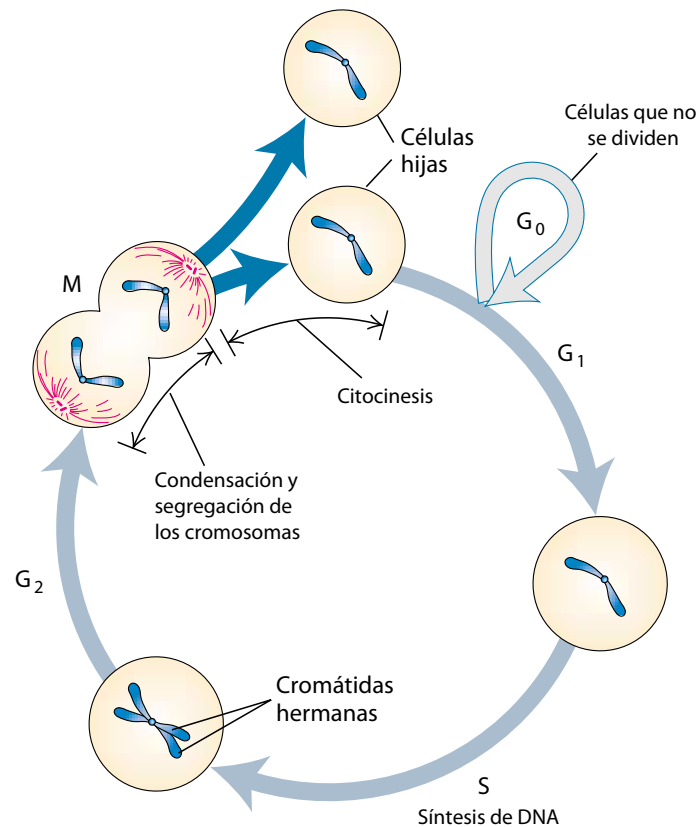
DNA polimerasas y las Cdks, si se observan cambios en su actividad (Vázquez-Ramos, 2003).

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

### **1.3. El ciclo celular**

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

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



**Figura 4. Representación esquemática de los eventos más importantes en el ciclo celular eucariótico.**

En la fase G<sub>1</sub>, la célula percibe e integra las señales ambientales e internas las cuáles inducen una serie de cambios transcripcionales para iniciar la fase S o de síntesis donde el material genético se duplica. Durante la fase G<sub>2</sub>, la célula verifica la integridad del genoma recién duplicado para que finalmente durante la fase M el material genético se segregue en dos células hijas (Modificado de Lodish *et al.*, 2006).

Las fases deben llevarse a cabo de manera ordenada y cada una debe completarse antes de que la siguiente fase comience. Para esto, es esencial que las distintas fases del ciclo celular estén coordinadas con precisión (Vázquez-Ramos, 2003). Además de las variantes en cuanto a cómo se regulan las distintas fases del ciclo celular entre distintas especies, existe también una variedad de programas de ciclo celular dentro de una misma especie, los cuales son asociados a etapas específicas del desarrollo o condiciones fisiológicas específicas. Por ejemplo, los ciclos durante la embriogénesis, son regularmente rápidos y con una o ambas interfases omitidas. Por otro lado, en tejidos maduros diferenciados, las células entran a un ciclo de endoreduplicación (endociclo) donde la fase S no es seguida por la fase M (mitosis) sino por una fase S adicional de replicación del DNA, generando células poliploides o multinucleadas (Jakoby y Schnittger, 2004).

### 1.3.1. El ciclo celular en plantas

Desde hace algunas décadas se ha progresado de manera importante en el entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan la proliferación celular, revelando que los mecanismos fundamentales del ciclo de división celular están conservados en todos los eucariotes (Harashima *et al.*; 2013). A su vez, el estudio de los procesos de desarrollo y la disponibilidad de secuencias de genomas completos han permitido entender que los mecanismos de formación de patrones han evolucionado de manera independiente en plantas y animales (Meyerowitz, 2002), por lo que se esperaría que el control del ciclo celular difiera entre plantas y otros grupos, no sólo en sus detalles, sino también en los mecanismos por los cuáles la influencia de aspectos ambientales y del desarrollo interactúan con el control del ciclo celular.

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

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

fragmoplasto y la banda de pre-profase (*PPB*, por sus siglas en inglés) (Smith, 2002). Las células de plantas, a diferencia de las de animales, no desarrollan tumores, excepto en situaciones de respuesta a ciertos patógenos (Doonan y Hunt, 1996).

El estudio del ciclo celular en plantas se ha incrementado exponencialmente durante los últimos años y se ha demostrado que los principios básicos del ciclo celular están conservados (Harashima *et al.*; 2013). A pesar del hecho de haber diferencias claras entre plantas y animales en la forma en la cual las células están estructuradas y organizadas, el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular así como aspectos que pudieron haber producido diferencias importantes en la regulación del ciclo, los ciclos celulares de ambos son muy similares así como las proteínas y procesos involucrados en él (Vázquez-Ramos, 2003).

Desde que la secuencia entera del genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentra disponible, se sabe que la cantidad de genes que participan en el ciclo celular es mucho mayor lo que hace este proceso aún más complejo en plantas que en mamíferos. El número de genes de las proteínas reguladoras participantes en el ciclo celular como CDKs, ciclinas, inhibidores de CDKs (KRPs), excede a los encontrados en humanos (Vandepoele *et al.*, 2002) lo que podría estar relacionado con el modo de vida sésil de las plantas. Las plantas no pueden escapar de las condiciones adversas a las cuáles están sujetas y, por lo tanto, se adaptan al ajustar sus programas de desarrollo en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales que se presenten y por ello, se piensa que el tener un mayor número de genes de ciclo celular permite un ajuste preciso en su desarrollo y además, colonizar diferentes hábitats (Sterck *et al.*; 2007). Algunas ciclinas han demostrado ser afectadas diferencialmente por reguladores del crecimiento vegetal como las citoquininas, brasinosteroides y azúcares como la sacarosa (De Veylder *et al.*, 1999; Riou-Khamichi *et al.*, 2000). Una explicación alternativa del número reducido de genes de ciclo celular en mamíferos comparado con el de plantas es la frecuente ocurrencia del empalme alternativo de intrones en los genes de mamíferos, un proceso que ha sido raramente reportado en plantas (Pan *et al.*, 2008; Dominguez *et al.*, 2016).

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

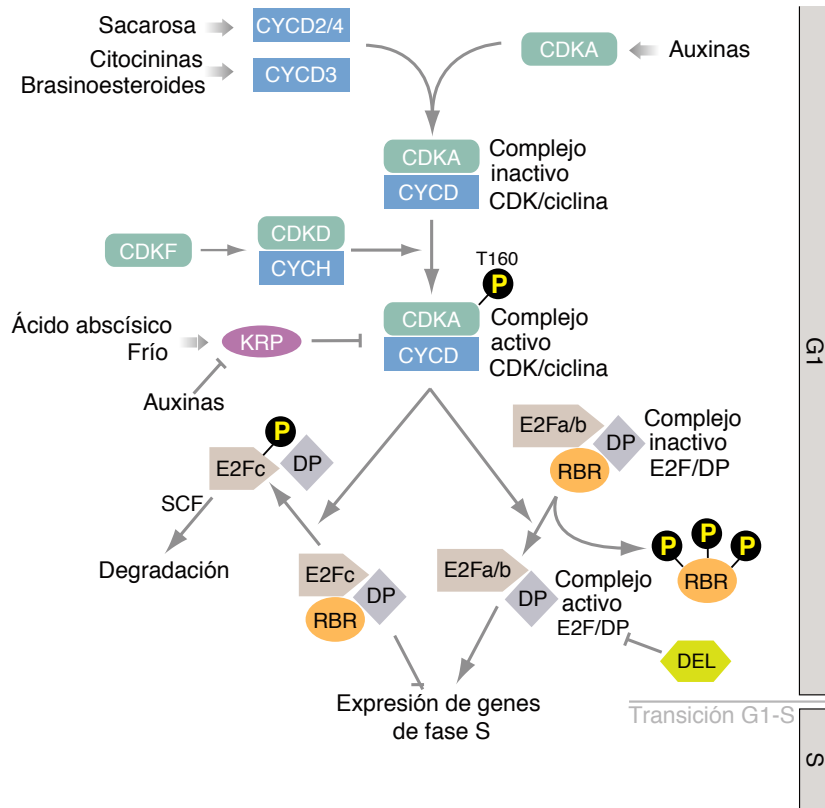
Los genes reguladores del ciclo celular que se expresan en una fase, codifican diversas proteínas con funciones en fases subsecuentes del ciclo celular y son reguladas por cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas. Existen tres restricciones importantes durante el ciclo y ocurren durante las transiciones G<sub>1</sub>-S, G<sub>2</sub>-M y durante la metafase de la fase M.

En la transición G<sub>1</sub>-S (Fig. 5), la presencia de factores de crecimiento como sacarosa, auxinas, citocininas y brasinosteroides, promueve la asociación de las ciclinas D (CYCD) con cinasas dependientes de ciclina tipo A (CDKA) formando el complejo CDKA/CYCD activado mediante fosforilación en la T160 de CDKA por otro complejo ciclina/cdk (CDKD/CYCH). En respuesta a estímulos antimitogénicos como ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés) o bajas temperaturas, las proteínas KRPs (*Kip Related Proteins*) pueden inhibir al complejo CDKA/CYCD activado. El complejo activado CDKA/CYCD puede activar la transición G<sub>1</sub>-S mediante dos vías, promoviendo la destrucción del complejo represor de la transcripción E2Fc/DP/RBR mediante la degradación de E2Fc por la vía del proteasoma y, por otro lado, a través de la fosforilación de RBR (*Retinoblastoma Related*) provocando la pérdida de afinidad por el factor transcripcional E2F, lo cual libera a E2F y permite que se una a las secuencias reguladoras de sus genes blanco y permita el avance hacia la fase S (Inzé, 2006), donde ocurre la replicación del DNA (Fig. 5).

Durante la fase G<sub>2</sub> (Fig. 6) se verifica la integridad del genoma recién duplicado y las ciclinas de los tipos A, B y probablemente D (CYCA, CYCB y CYCD) se asocian con CDKs tipo A y B (CDKA y CDKB). Algunas CDKsB se encuentran bajo el control transcripcional de la vía E2F enlazando así las transiciones G<sub>1</sub>-S y G<sub>2</sub>-M. Durante esta última, la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas CDKs puede ser regulada negativamente por otra familia de cinasas llamada WEE, que son activadas por condiciones como la pérdida de integridad del DNA, evitando así la entrada a la mitosis hasta que las condiciones sean las adecuadas. En animales, una fosfatasa tipo CDC25 remueve los grupos fosfato inhibidores presentes en las CDKs; sin embargo, no se ha identificado aún en plantas una fosfatasa que tenga esta función (Inzé y De Veylder, 2006). Una vez que los complejos CDK/CYC están activos, la célula entra finalmente a la fase M para segregarse el material genético en dos



células hijas y dividirse. La salida de la mitosis requiere de la destrucción proteolítica de las ciclinas iniciada por el complejo promotor de anafase (APC) mediante su asociación con la proteína CCS52 (Inzé, 2006).

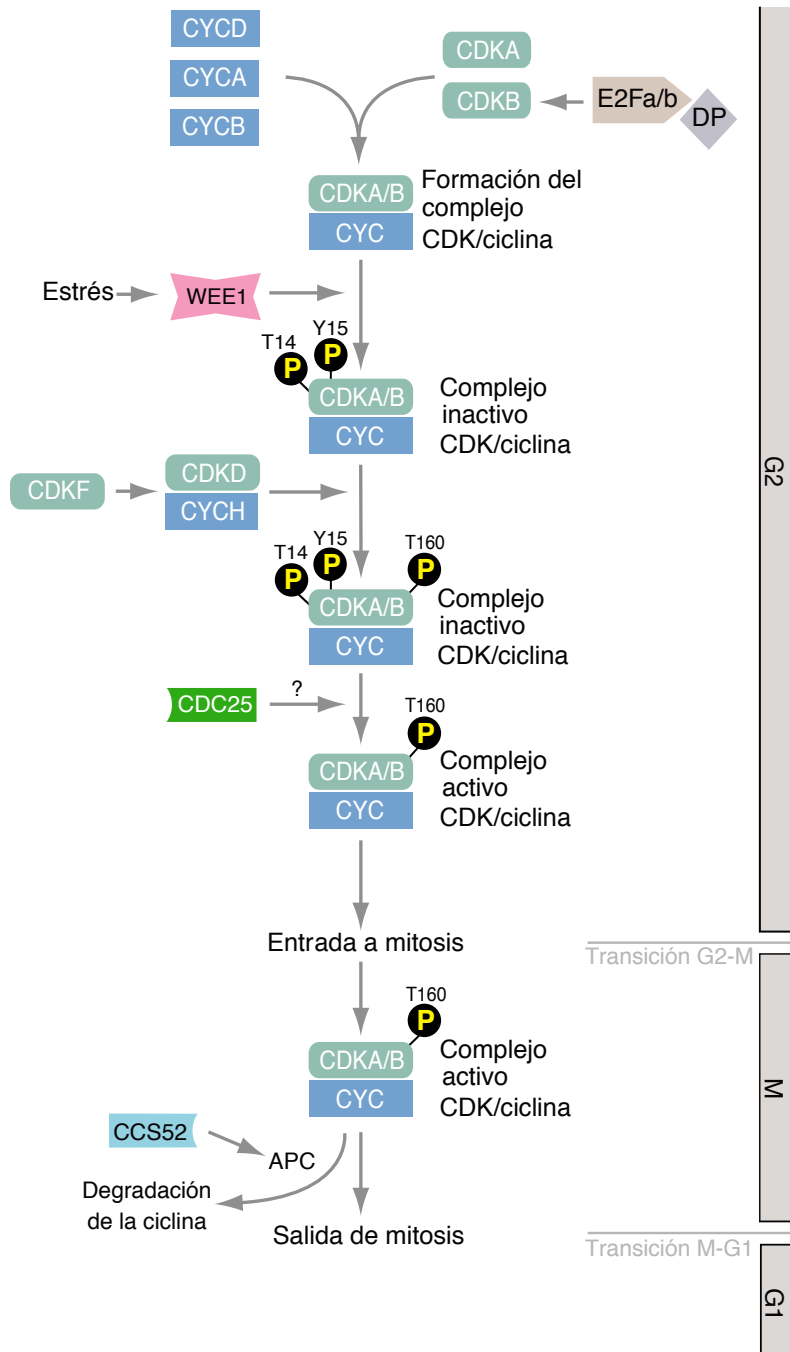


**Figura 5. La transición G<sub>1</sub>-S.** Representación esquemática de la regulación del ciclo celular durante la transición G<sub>1</sub>-S en plantas (Inzé, 2006). En presencia de factores de crecimiento, las CYCsD formarán complejos activos con las CDKs tipo A. Estos complejos fosforilarán a RBR y ésta liberará al dímero de factores transcripcionales E2F/DP activando así la transcripción de genes de fase S y el avance del ciclo celular.

#### 1.4. La proteína de retinoblastoma

Una de las características de las células cancerígenas es su habilidad de proliferar a pesar de los mecanismos de regulación del crecimiento existentes. El crecimiento de las células está regulado por una red celular compleja, modulada por oncogenes y proteínas supresoras de tumores. Un regulador clave de esta red, afectando el arresto del ciclo celular, es la proteína supresora de tumores de retinoblastoma humana (Rb). Hace más de 50 años, se observó que un tipo de cáncer (más tarde llamado retinoblastoma) que afectaba a niños

principalmente, ocurría de manera repentina en algunos de ellos y era heredado en otros (Falls, 1951; Falls y Neel, 1951). En 1971, Alfred Knudson propuso que la formación del tumor requería dos eventos genéticos que inactivaban a ambos alelos de un gen susceptible de Rb (Knudson, 1971). El estudio intensivo para delucidar los mecanismos moleculares que causaban el desarrollo de este tumor llevó a la identificación y clonación del gen *Rb* (Friend *et al.*, 1986) que representaba a un participante clave en la regulación del ciclo celular y el ejemplo modelo de los genes supresores de tumores.



**Figura 6. La transición G<sub>2</sub>-M.**

Representación esquemática de la regulación del ciclo celular durante la transición G<sub>2</sub>-M en plantas (Inzé, 2006). Durante la fase G<sub>2</sub>, las CYCs tipo A, B y D formarán complejos con CDKs A y B. Ante la pérdida de integridad del DNA, la cinasa WEE fosforila e inactiva a los complejos CYC/CDK. Una cinasa tipo CDC25 elimina las fosforilaciones inhibitorias de los complejos CDK/CYC permitiendo la entrada a la fase M. La degradación de las ciclinas mediante el complejo APC promueve la salida de la fase M.

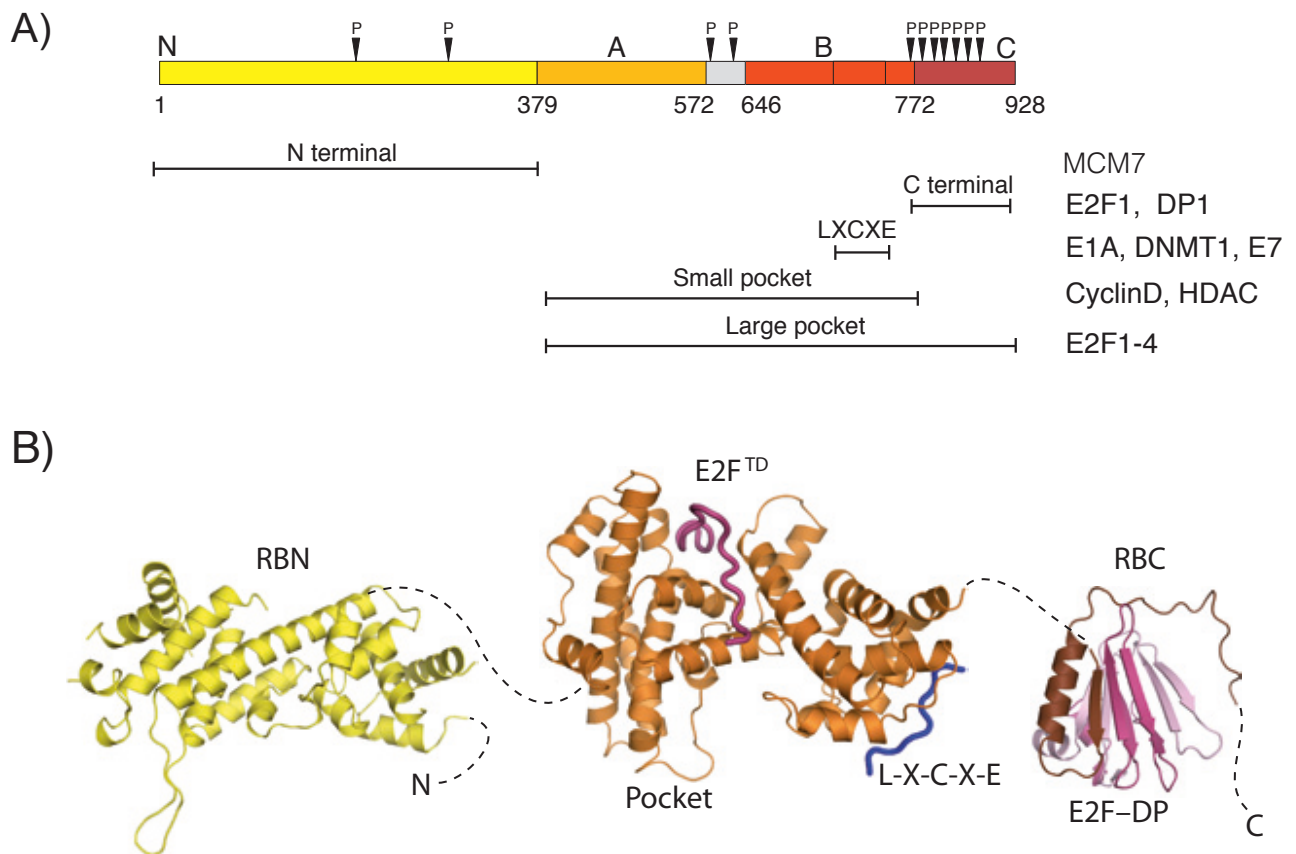
La proteína supresora de tumores de retinoblastoma (Rb) y sus proteínas relacionadas, p107 y p130, son reguladores negativos de la proliferación celular que figuran prominentemente en la mayoría de los modelos de control del ciclo celular. En mamíferos, Rb es parte de una familia de proteínas que incluye a p107 y p130 cuyas funciones son parcialmente redundantes con las de Rb (Classon y Dayson, 2001; Claudio *et al.*, 2002). Estas proteínas reguladoras son también conocidas como “proteínas *pocket*” debido a la estructura de sus dominios A y B en el extremo carboxilo terminal (Livingston *et al.*, 1993). Además de su participación en la regulación de la transición G<sub>1</sub>-S del ciclo celular, Rb participa en distintos procesos celulares como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Lipinski y Jacks, 1999; Classon y Harlow, 2002; Hickman *et al.*, 2002). En humanos, se ha encontrado que Rb está inactivo en casi todos los tumores, sugiriendo que la inactivación de Rb es un requisito en el desarrollo del cáncer (Sherr, 2000). Se han encontrado homólogos de la proteína de retinoblastoma humana en especies como: *Xenopus laevis* (Destree *et al.*, 1992), *Allus gallus* (pollo) (Boehmelt *et al.*, 1994), *Mus musculus* (ratón) (Huppi *et al.*, 1996), *Drosophila melanogaster* (mosca) (Du *et al.*, 1996), *Caenorhabditis elegans* (nematodo) (Lu y Horvitz, 1998) y en plantas como: maíz (Graf *et al.*, 1996), tabaco (Nagakami *et al.*, 1999) y *Arabidopsis thaliana* (Kong *et al.*, 2000).

#### **1.4.1. Estructura de la proteína de retinoblastoma en mamíferos**

Diversos estudios han revelado que las funciones de Rb en distintas vías celulares como el ciclo celular y la apoptosis se llevan a cabo mediante la estimulación o inhibición de la actividad de sus proteínas interactoras. Por lo tanto, un punto de inicio importante para entender la función de Rb es su estructura, la cual funciona como andamiaje para poder llevar a cabo estas múltiples interacciones con proteínas (Dick y Rubín, 2013).

La proteína Rb de humanos es una fosfoproteína de 110 kDa que comprende de 928 aminoácidos y posee tres dominios distintivos: la región amino terminal, los dominios A y B (dominio *pocket*) separados por una región espaciadora (*linker*) y el dominio carboxilo terminal (Fig. 7a). Esta estructura general está conservada dentro de los miembros de la familia de proteínas *pocket*. El dominio amino terminal posee dos plegamientos tipo ciclina

(de cinco alfa hélices cada uno) (Hassler *et al.*, 2007; Kim y Cho, 1997), posee sitios de fosforilación consenso por Cdks y se sabe que se une al carboxilo terminal de la proteína *Mcm7 in vitro* e *in vivo* (Sternner *et al.*, 1998). El dominio *pocket* está constituido por los subdominios A y B separados por una secuencia espaciadora no conservada; además, poseen plegamientos tipo ciclina de cinco alfa hélices en cada subdominio y cinco alfa hélices adicionales en el subdominio A, tres alfa hélices y una estructura tallo-bucle en el B (Lee *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001) que interactúan entre ellos mediante uniones no covalentes de tal manera que el dominio *pocket* se pliega en una sola unidad estructural (Fig. 7b).



**Figura 7. Estructura general de la proteína de retinoblastoma.** a) Diagrama esquemático de la estructura de los dominios de Rb. Se muestra el dominio amino terminal (N, amarillo), el dominio *pocket* (A y B, naranja y naranja oscuro respectivamente), segmento interdominio (gris) y el dominio carboxilo terminal (C, rojo). Se muestran los sitios de fosforilación por Cdks (P) y algunas de sus interacciones con otras proteínas (modificado de Gutzat *et al.*, 2012). b) Estructura cristalográfica del complejo Rb-E2F-DP donde: RBN (amino terminal en amarillo), E2F<sup>TD</sup> (dominio de transactivación de E2F, en rosa), RBC (carboxilo terminal en café), E2F-DP (regiones de esas proteínas que interaccionan con Rb en rosa) (modificado de Dick y Rubin, 2013).

El dominio *pocket* es crítico para la función de la proteína y es el más conservado dentro de la familia de proteínas *pocket* (Rb, p107 y p130); además, se ha identificado como la región mínima necesaria para unirse a proteínas que contienen el motivo LxCxE (Leu-X-Cys-X-Glu) (Chen *et al.*, 1995), como las proteínas oncovirales: adenovirus E1A, SV40 TAg y el virus de papiloma humano E7 (Dyson, 1998); y las ciclinas tipo D (Dowdy *et al.*, 1993). El dominio B contiene los aminoácidos que interactúan con la secuencia LxCxE y el dominio A es requerido para que el dominio B adquiera su conformación activa explicando así la necesidad de ambos dominios para formar un represor activo (Kim *et al.*, 2001) y unirse a proteínas como el factor transcripcional E2F (Hiebert *et al.*, 1991) y HDAC1 (Brehm *et al.* 1998, Luo *et al.*, 1998) entre otras. El dominio carboxilo terminal de Rb es intrínsecamente desordenado (Rubin *et al.*, 2005), así como algunas asas de su extremo amino terminal y los segmentos interdominios. Estas secuencias contienen sitios de fosforilación por CDKs que juegan un papel crítico en la inactivación de Rb (Burke *et al.*, 2010 y 2012). La estructura cristalográfica de la región carboxilo terminal reveló que ésta, en complejo con E2F1 y su socio de dimerización DP1, forman un complejo ternario en el cual tanto E2F1 como DP1 están en contacto con la región carboxilo terminal de Rb y que E2F1 puede unirse a esta región sólo si la dimerización con DP1 se ha llevado a cabo (Rubin *et al.*, 2005), sugiriendo que DP1 estabiliza el complejo RB-E2F1 (Fig. 7b).

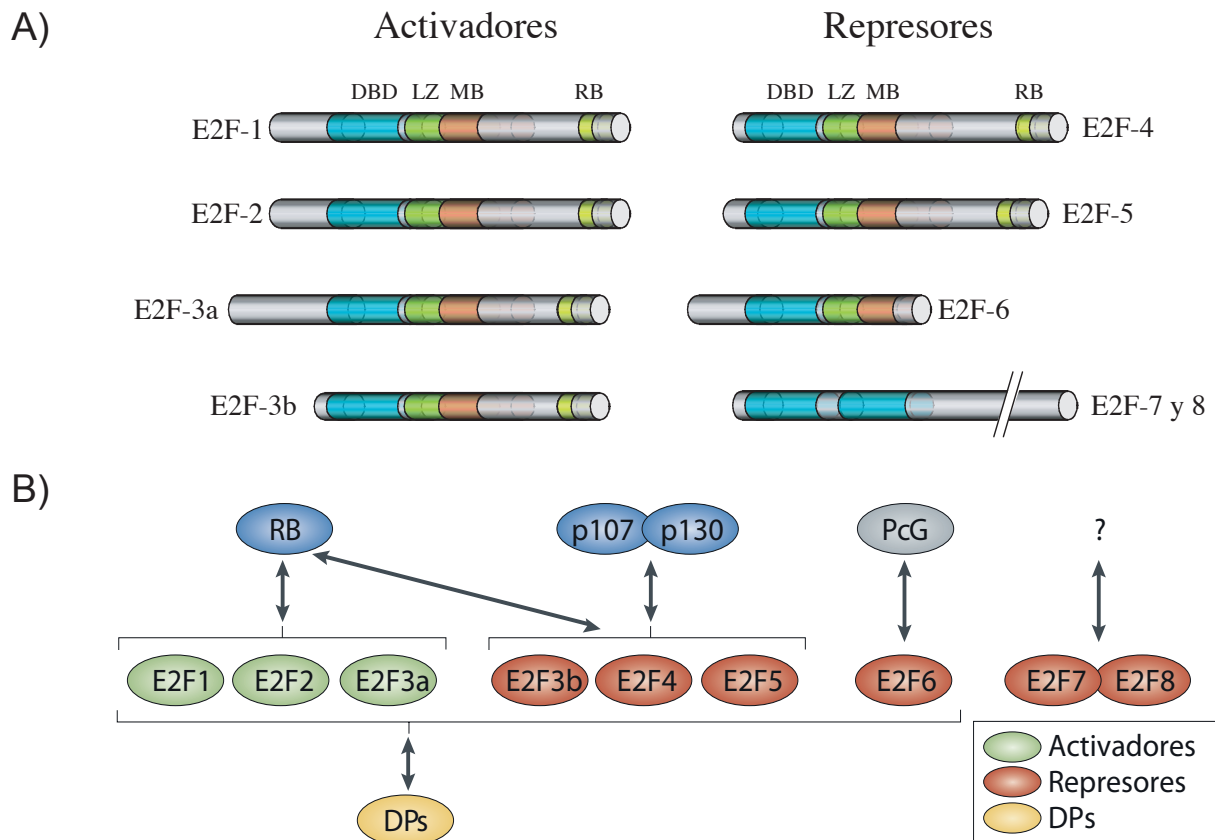
#### **1.4.2. Rb como regulador del ciclo celular en mamíferos**

Rb y sus proteínas relacionadas, p107 y p130, regulan a la familia de factores transcripcionales E2F (Lee *et al.*, 1987; Ewen *et al.*, 1991; Mayol *et al.*, 1993; Umen y Goodenough, 2001). Estos factores de transcripción fueron identificados originalmente en estudios con adenovirus humano que revelaron que uno de los promotores tempranos del virus es activado por una proteína celular, E2F (Helin *et al.*, 1992). Más tarde, su socio de dimerización, DP, fue identificado (Helin *et al.*, 1993). Como ha sido demostrado por diferentes investigadores, las proteínas *pocket* juegan un papel en la inhibición directa de E2F, en el reclutamiento tanto de histonas desacetilasas (HDACs) como de otros factores remodeladores de la cromatina, como son: miembros del complejo remodelador de nucleosomas SWI/SNF dependiente de ATP, DNMT (DNA metiltransferasa) y una metiltransferasa de la histona H3 (Suv39H1), para regular el ciclo celular mediante la

represión transcripcional (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Cam y Dynlacht, 2003).

En células quiescentes de mamíferos, Rb interactúa con los factores transcripcionales E2F/DP para formar complejos que inhiben la transcripción de genes blanco de E2F. En respuesta a estímulos, las cinasas dependientes de ciclina Cdk4 y Cdk6 en complejo con las ciclinas D (Cyc D) fosforilan a Rb en múltiples sitios durante la fase G<sub>1</sub> temprana (Kitakawa *et al.*, 1995), seguido por Cdk2 y ciclinas E en G<sub>1</sub> tardía (Sherr, 1996), ocasionando que Rb pierda afinidad por el complejo E2F/DP permitiendo la transcripción de genes blanco de dicho complejo que regulan la entrada a la fase S (Weinberg, 1995) y el avance del ciclo celular.

Los sitios de unión al DNA de la proteína E2F contienen a la secuencia consenso TTT(C/G)(C/G)CGC y están presentes en los promotores de genes cuyas funciones son requeridas para la proliferación celular, o bien, promueven la progresión ordenada del ciclo celular. En mamíferos, la familia E2F se divide en subgrupos de acuerdo a su función (Fig. 8A). E2Fs 1-2, los E2F “activadores”, son requeridos para la transactivación de genes blanco involucrados en la transición G<sub>1</sub>-S y por lo tanto, en la progresión del ciclo celular (Kosugi y Ohashi, 2002). El locus *E2F3* codifica dos proteínas, E2F3a y E2F3b que difieren en su patrón de expresión; E2F3a es un activador transcripcional que se expresa durante la fase S, mientras que E2F3b es expresado de manera constante durante el ciclo celular. Por otro lado, E2F1, 2 y 3 poseen propiedades de transactivación y de unión al DNA similares entre ellas. E2F1, 2 y 3 son regulados específicamente por Rb, mediante su represión. La fosforilación de Rb provoca la liberación de estos E2Fs en G<sub>1</sub> tardía y correlaciona con la activación de los genes blanco de E2F. En contraste, E2F 4 y 5 poseen actividad represora, se encuentran en el núcleo durante las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> donde se unen a p107 y p130 (y durante G<sub>1</sub> temprana también a Rb) (Müller *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Trimarchi y Lees, 2002). La sobreproducción de estas proteínas en fibroblastos privados de suero no induce la entrada a fase S (Lukas *et al.*, 1996), sino que inducen la salida de ciclo celular y la diferenciación (Lindeman *et al.*, 1998). E2F6, 7 y 8 también son considerados represores transcripcionales (Morkel *et al.*, 1997) y no se unen a ninguna de las proteínas *pocket*, dado que en su estructura no poseen dominios de unión a ellas (Fig. 8B).



**Figura 8. Esquema general de la estructura de las proteínas de la familia de factores transcripcionales E2F y sus asociaciones con las proteínas *pocket* en mamíferos.** A) E2F1-6 contienen un dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio de dimerización con DP que incluye dos motivos conservados, una secuencia repetida de leucinas (LZ) y el *marked box* (MB). E2F7 y E2F8 poseen dos DBD distintos (de Bruin *et al.*, 2003) mientras que E2F1-5 tienen un dominio conservado en el extremo carboxilo involucrado en la asociación con miembros de la familia pRB (Modificado de Frolov y Dyson, 2004). B) Complejos formados entre los miembros de la familia E2F y las proteínas *pocket* en mamíferos (Modificado de Van den Heuvel y Dyson, 2008).

Estudios previos mostraron que p107 y p130 también tienen la habilidad de detener el crecimiento celular y asociarse con las proteínas virales E1A y el SV40 TAg de manera similar a Rb (Yee y Branton, 1985; Harlow *et al.*, 1986; Dyson *et al.*, 1989; Classon *et al.*, 2001; Cobrinik, 2005). Adicionalmente, p107 y p130 son sustratos de Cdk/Cyc y, cuando son fosforilados, liberan a las proteínas E2F y permiten la progresión del ciclo celular (Ashizawa *et al.*, 2001; Calbo *et al.*, 2002; Farkas *et al.*, 2002). En contraste, existen diferencias funcionales entre los miembros de las proteínas *pocket*; mientras que la pérdida de Rb es letal en embriones de ratón, la pérdida de p107 o p130 resulta en un fenotipo viable (Jacks *et al.*, 1992; Cobrinik *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996). Además, las mutaciones en p107 y p130

no se han asociado al desarrollo de cáncer ya que, la pérdida de cualquiera de ellas, no provoca la formación de tumores en ratones (Robanus-Manndag *et al.*, 1998; Dannenberg *et al.*, 2004; Classon *et al.*, 2001 y 2002; Burkhardt *et al.*, 2008).

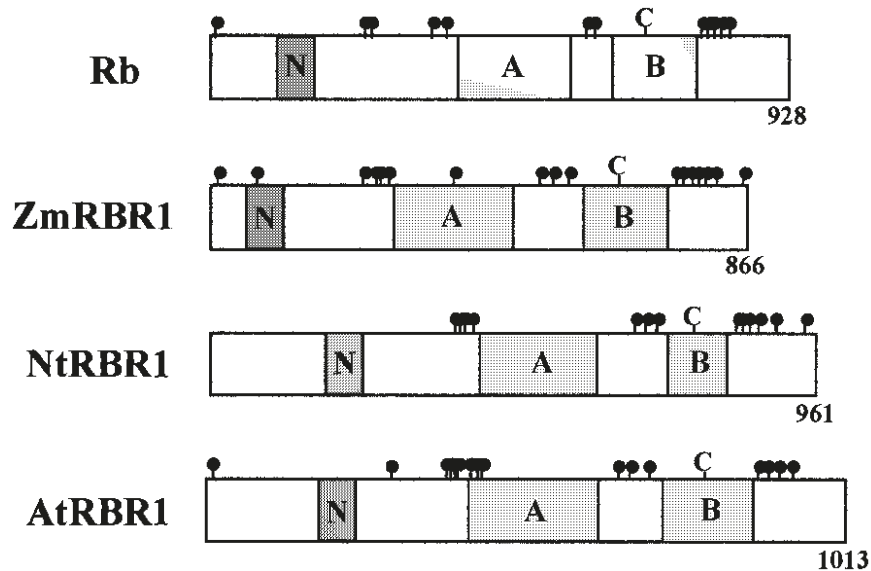
Además de regular el ciclo celular, Rb tiene múltiples funciones celulares y forma complejos con otras proteínas involucradas en diferentes vías (Zheng y Lee, 2001) como la proliferación celular, la diferenciación, apoptosis y en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Gordon y Du, 2011). La acumulación de Rb es crítica para la diferenciación celular y el desarrollo embrionario (Lipinski y Jacks, 1999) además está implicada en la regulación de la maquinaria de replicación y en los puntos de control del ciclo celular en respuesta al daño a DNA (Zheng y Lee, 2002).

#### **1.4.3. La proteína de retinoblastoma en plantas**

Evidencia de la existencia de la vía de Rb en plantas se demostró al aislarse un EST (*expressed sequence tag*) putativo homólogo de Rb en maíz (Shen, 1994) y al identificarse el motivo LxCxE en miembros de la familia de ciclinas D de *Arabidopsis thaliana* y *Medicago sativa* (alfalfa), así como en RepA, una proteína del geminivirus WDV (*wheat dwarf geminivirus*) (Dahl *et al.*, 1995; Soni *et al.*, 1995; Xie *et al.*, 1995). El motivo LxCXE en RepA es necesario para que RepA pueda unirse a p130 de humanos y el virus pueda replicarse en células de plantas (Xie *et al.*, 1995). Los primeros cDNAs de los homólogos de Rb en plantas llamados *RETINOBLASTOMA-RELATED* (RBR) fueron identificados y clonados por primera vez de maíz (Grafi *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996; Ach *et al.*, 1997) y más tarde en tabaco (Nakagami *et al.*, 1999) y en *Arabidopsis* (Kong *et al.*, 2000), concomitante con la identificación de genes en *Drosophila melanogaster* y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Du *et al.*, 1996), por lo que es claro que los genes de Rb se encuentran en diferentes phyla y reinos, incluyendo a las algas unicelulares (Durfee *et al.*, 2000). El nivel más alto de identidad entre las proteínas de retinoblastoma en plantas y animales (alrededor del 40% en similitud de secuencia) se encuentra en los dominios A y B (de Jager, 1999) (Fig. 9). El descubrimiento de homólogos de las proteínas Rb en otras especies confirma que la vía en la que RB participa podría tener una función importante en el desarrollo de todos los eucariotes y no sólo en animales. Las ciclinas D (CYCD) también se unen a RBR mediante



el motivo LxCxE necesario para su interacción (Meijer, 2000). Finalmente, la familia de factores transcripcionales E2F/DP, que interactúa con Rb en animales, está también conservada en plantas (De Veylder *et al.*, 2002), por lo que los mecanismos clave que gobiernan el control del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación también se encuentran conservados (Nakagami *et al.*, 2002).



**Figura 9. Esquema de las características estructurales de Rb y algunos de sus homólogos en plantas.**

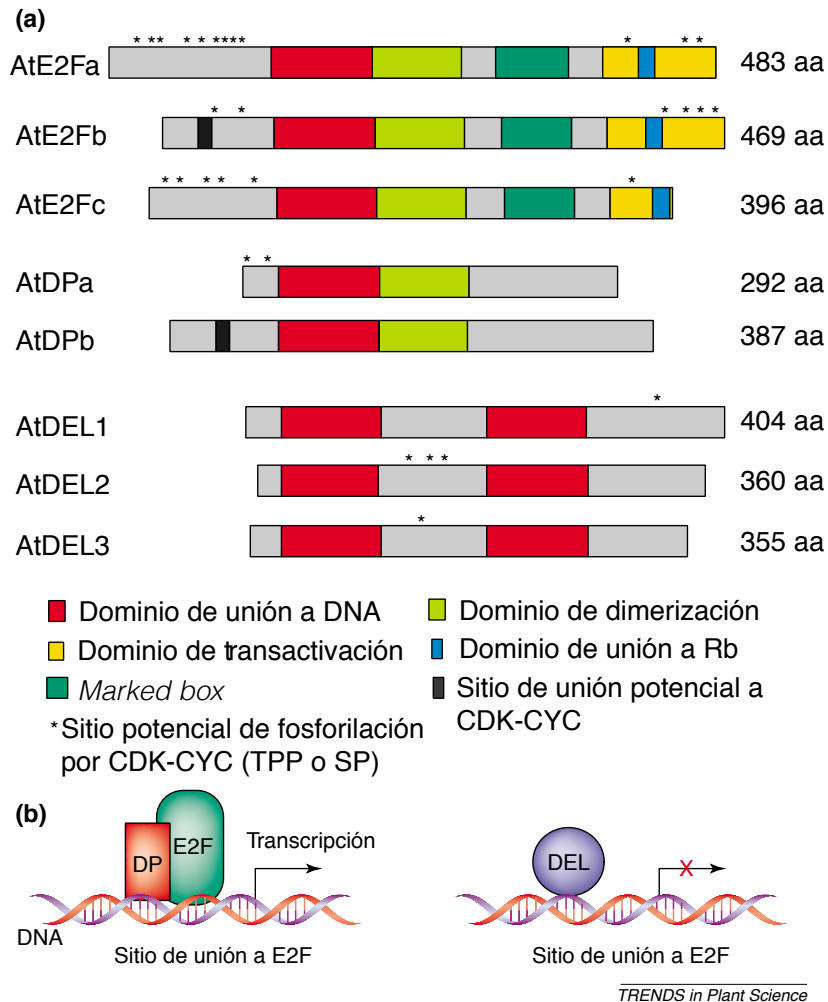
Se muestra la comparación estructural de la proteína de retinoblastoma de humanos (Rb), *Zea mays* (ZmRBR1), *Nicotiana tabacum* (NtRBR1) y *Arabidopsis thaliana* (AtRBR1). Se muestran en cajas las regiones conservadas, el extremo amino (N) y los subdominios A y B (del dominio *pocket*). Los círculos negros representan los sitios potenciales de fosforilación por CDKs y un residuo de cisteína conservada en el dominio B (C). Los números indican los aminoácidos presentes en las proteínas (modificado de Durfee *et al.*, 2000).

#### 1.4.3.1. RBR y la familia de factores transcripcionales E2F en Arabidopsis

Posterior a la identificación inicial en Arabidopsis de los genes de E2F (Ramírez-Parra y Gutierrez, 2000; de Jager *et al.*, 2001) y DP (Magyar *et al.*, 2000), se logró identificarlos en otras especies como tabaco (Chabouté *et al.*, 2000), arroz (Kosugi y Ohashi, 2002b) y maíz (Sabelli *et al.*, 2005). Estos estudios revelaron que las plantas contienen un grupo complejo de miembros de la familia E2F-DP, siendo los encontrados en *A. thaliana* (seis E2F y dos DP) los más estudiados. Tres de los factores transcripcionales E2F en Arabidopsis, nombrados AtE2Fa, b y c, comparten la misma organización en sus dominios incluyendo los dominios de unión al DNA, de dimerización con DP, de interacción con la proteína RBR y de

regulación transcripcional (Fig. 10). Estos E2Fs están estructuralmente relacionados con la familia E2F1-5 de humanos. E2Fa y E2Fb poseen propiedades de activadores transcripcionales, mientras que E2Fc posee una naturaleza represora. Todos poseen dominios de unión a RBR1. Las otras tres proteínas E2F identificadas en Arabidopsis, E2Fd/DEL2, E2Fe/DEL1 y E2Ff/DEL3 (de Jager *et al.*, 2001) se consideran como E2Fs atípicos ya que contienen el dominio de unión al DNA duplicado y funcionan de manera independiente de la proteína DP, además de que no poseen dominios de unión a RBR1. Estas propiedades están conservadas en E2F7 (Bracken *et al.*, 2004) y E2F8 (Christensen *et al.*, 2005), las cuales fueron identificadas basadas en la información obtenida anteriormente de los genes *E2F* atípicos en Arabidopsis. Arabidopsis posee dos proteínas DP (DPa y DPb) que también están relacionadas estructuralmente a la proteína DP1 de humanos, compartiendo los dominios de unión al DNA y de dimerización (Fig. 10). Las proteínas E2F se unen al DNA como heterodímero con las proteínas DP, mientras que las proteínas DEL se unen como monómeros. Las secuencias de DNA reconocidas de manera específica por el dímero E2F-DP y por los monómeros DEL son similares y concuerdan con los sitios de unión al DNA en animales, con la secuencia consenso TTT(C/G)(C/G)CGC. Debido a que las proteínas DEL carecen de dominio de transactivación y por lo tanto no son activadores transcripcionales, podrían funcionar como dominantes negativos ya que su producción inhibe la transcripción mediada por E2F-DP probablemente debido a su ocupación de los sitios de unión a E2F (Kosugi y Ohashi, 2002a).

Los complejos E2F-DP en plantas se unen, *in vitro*, a una secuencia específica de DNA, el sitio consenso de unión a E2F, con mayor afinidad que E2F por sí solo (Ramírez-Parra y Gutierrez, 2000). Además, la co-producción de E2F y DP en plantas incrementa la expresión de un gen reportero conteniendo en su promotor un sitio de unión a E2F (Kosugi y Ohashi, 2002c).



**Figura 10. Organización estructural y propiedades de unión al DNA de la familia de factores transcripcionales E2F en Arabidopsis.** a) Dominios presentes en la familia de factores transcripcionales E2F, b) Las proteínas E2F se unen al DNA como heterodímeros E2F-DP mientras que las proteínas DEL se unen como monómeros y ya que carecen del dominio de transactivación, son incapaces de activar la transcripción (Modificado de Shen, 2002).

La proteína relacionada a retinoblastoma 1 (RBR1) y sus blancos, los factores transcripcionales E2F, juegan un papel importante en los procesos de proliferación y diferenciación (Wildwater *et al.*, 2005; Wyrzykowska *et al.*, 2006). El genoma de Arabidopsis codifica para una proteína homóloga a Rb, AtRBR1, no posee homólogos para p107 ni p130 (Vandepoele *et al.*, 2002) (Fig. 9) y tienen tres genes, E2Fa, E2Fb y E2Fc, cuyas proteínas interactúan con RBR1. AtRBR1 es esencial en el desarrollo general de las plantas, en la formación de gametos y es requerida para el arresto de la mitosis en el saco embrionario (Ebel *et al.*, 2004; Gutzat *et al.*, 2012). La actividad transcripcional de E2F es regulada

mediante su unión a RBR1 en condiciones normales; en fenotipos sobreexpresantes de E2Fa, la expresión de sus genes blanco incrementa y no es posible la inactivación mediada por RBR1 endógena (De Veylder *et al.*, 2002). Se ha demostrado la interacción de AtE2Fb (un E2F activador) y AtE2Fc (represor) con RBR1 por ensayos de doble híbrido y *pull down* con proteínas recombinantes e *in vivo*. Mientras que AtE2Fb es un activador y es reprimido por RBR, AtE2Fc forma complejos represores en cooperación con RBR1 (de Jager *et al.*, 2001; del Pozo *et al.*, 2002; Magyar *et al.*, 2012). Las mutantes de *RBR1* son letales en gametofitos de *Arabidopsis* (Ebel *et al.*, 2004) y la sobreexpresión inducible de *AtRBR1* perjudica el mantenimiento de células madre en meristemas de raíz y su reducción expande el *pool* de células madre sugiriendo que los niveles de RBR1 regulan la diferenciación de las células hijas (Wildwater *et al.*, 2005). Además, la sobreexpresión transitoria de *AtRBR1* resultó en la inducción de la diferenciación en las células del meristemo apical del brote en tabaco, lo cual pone en evidencia el papel de RBR como regulador del balance entre la proliferación y la diferenciación celular (Wyrzykowska *et al.*, 2006; Borghi *et al.*, 2010).

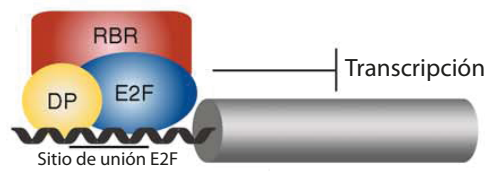
Adicionalmente, RBR1 forma complejos con otras proteínas involucradas en diferentes vías. En células hijas de la corteza y de la epidermis del meristemo de raíz, RBR1 inhibe la transcripción de genes blanco del heterodímero de factores transcripcionales SCARECROW (SCR)/SHORTROOT (SHR) al interactuar con SCR a través del motivo LxCxE. La ruptura del complejo RBR-SCR/SHR promueve divisiones asimétricas tejido-específicas probablemente debido a la fosforilación de RBR1 mediada por el complejo CDKB1/CYCD6;1 (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012 y 2013). Por otro lado, RBR1 mantiene la integridad del genoma de los meristemas al ser reclutado, junto con E2Fa y posiblemente *AtBRCA1* (*breast and ovarian cancer type1 susceptibility protein*), a sitios en el DNA dañados y mediante la regulación de genes DDR (*DNA damage response*) blancos de E2Fa incluyendo a *AtBRCA1* involucrados también en la muerte celular (Horvath *et al.*, 2017).

#### **1.4.3.2. El papel de la proteína RBR en la transición G<sub>1</sub>-S en plantas**

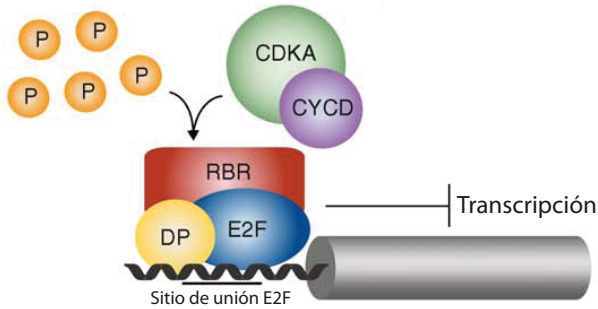
La conservación de los dominios estructurales y los sitios de fosforilación sugiere que RBR de plantas posee propiedades bioquímicas similares a Rb de mamíferos. La función canónica de Rb como regulador negativo del ciclo celular durante la transición G<sub>1</sub>-S está

conservada en plantas también (revisado de Gruissem, 2007). En mamíferos, la interacción entre las ciclinas D y Rb mediante el motivo LxCXE es esencial para la fosforilación de la proteína por los complejos CDK-CycD (Dowdy *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993). Por ejemplo, RBR de tabaco (NtRBR) (Fig. 9) es fosforilado por el complejo CDKA-CYCD3 *in vitro* (Nakagami *et al.*, 1999) y su fosforilación ocurre sólo durante G<sub>1</sub> a S temprana en células BY-2 (Nakagami *et al.*, 2002). Por otro lado, la interacción entre las ciclinas D de Arabidopsis y RBR1 de maíz requiere el motivo LxCxE (Huntley *et al.*, 1998), similar a la interacción entre CycD y Rb de mamíferos. Asimismo, las ciclinas D están conservadas en plantas (Oakenfull *et al.*, 2002), su expresión está asociada con la proliferación celular y responde a señales mitogénicas como sacarosa o citocininas (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). En Arabidopsis, hay 12 CDKs (CDKA y CDKB) implicadas en la regulación del ciclo celular (Gutierrez, 2009); sin embargo, la mutante nula de *cdka;1*, que disminuye la producción de semillas (Nowack *et al.*, 2006), sugiere que RBR1 es fosforilada principalmente por CDKA;1 y su fosforilación permite que los genes blanco de RBR-E2F críticos para la entrada a fase S se transcriban (Nowack *et al.*, 2012). E2Fa y E2Fb interactúan con RBR1 *in vivo* y la eficiencia de esta interacción se incrementa con la dimerización de E2Fs con DPa. El incremento de la fosforilación de RBR1 inducida por la sobreexpresión de *CycD3;1* rompe la interacción entre RBR1 y E2Fb más no la de RBR1 con E2Fa (Magyar *et al.*, 2012). Una vez identificados estos componentes en plantas, se pudo colocar a las CYCsD río arriba de la vía RBR-E2F/DP en el control de la transición G<sub>1</sub>-S. Durante G<sub>0</sub> en plantas, los genes de fase S blancos de E2F no son transcritos por el efecto inhibitorio de la proteína RBR sobre el complejo E2F/DP. Cuando las células entran a ciclo celular, las CYCD se acumulan y forman complejos con CDKA que fosforilan a RBR liberando al complejo E2F/DP activando entonces la transcripción de genes necesarios para la fase S (Fig. 11) (de Veylder, 2009). De esta manera, genes canónicos de inicio y avance de la replicación podrían ser inhibidos indirectamente por RBR a través de E2F/DP.

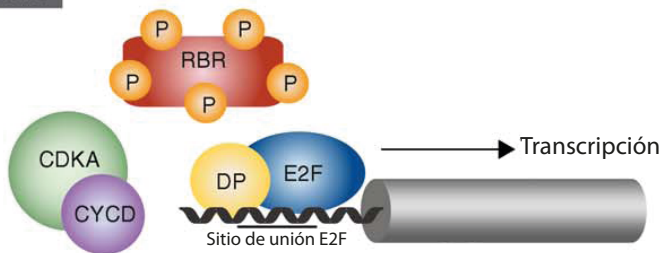
G0



G1



G1/S



**Figura 11. Modelo para la regulación transcripcional mediada por RBR-E2F/DP durante la transición G<sub>1</sub>-S.** La formación de los complejos E2F-DP-RB es regulada durante el ciclo celular y la disociación de RBR permite la activación de los genes regulados por el heterodímero de factores transcripcionales E2F-DP y la entrada a la fase S (Modificado de de Veylder, 2009). La flecha indica activación mientras que las flechas truncas inhibición.

### 1.4.3.3. Regulación de la transcripción de genes mediada por RBR a través del complejo heterodimérico E2F-DP en plantas.

La regulación positiva de genes característicos de la fase S del ciclo celular que contienen sitios de unión a E2F en sus regiones promotoras, está relacionada con la fosforilación de RBR y la unión de E2F-DP y RBR. En tabaco, NtE2F interactúa con NtRBR (Sekine *et al.*, 1999), NtE2F-NtDP junto con NtRBR se unen a sitios E2F *in vitro*. La expresión transitoria de NtRBR1 inhibe la transcripción desde el promotor de *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen* que actúa como factor de procesividad para la DNA polimerasa  $\delta$  en células eucarióticas y es esencial para la replicación) de tabaco, conferida por la co-expresión de NtE2F y NtDP y su actividad represora es cancelada por CYCD más no por CYCA o CYCB (Uemukai *et al.*, 2005). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en plantas de *Arabidopsis* que producen a la proteína de fusión

AtRBR1:RFP se determinó que AtRBR1:RFP se une a las secuencias de los promotores de genes importantes para la entrada a la fase S del ciclo celular (*PCNA1*, *CDC6*, *MCM2*, *MCM5*, *ORC1* y *ORC3*) (Nowack *et al.*, 2012) y a reguladores del cambio de proliferación celular a la entrada a endociclo *CCS52A1* y *CCS52A2*, los cuáles son blancos de AtE2FA. Por otro lado, la sobreexpresión de una mutante trunca de E2FA que carece del dominio de unión a RBR1 (E2FA<sup>ARB</sup>) interfiere con el reclutamiento de RBR1 a los promotores a través de E2Fa y causa que la expresión de *CCS52* se active y ocasionando la reducción del tamaño de los meristemas de raíz y el crecimiento celular prematuro y la entrada a endociclo en hojas. Con base en estos datos podemos concluir que E2FA y RBR1 forman un complejo represor en células en proliferación que inhibe la diferenciación celular prematura y la entrada a endociclo (Magyar *et al.*, 2012). Además, en hojas de *Arabidopsis* RepA<sup>WT</sup> libera a E2FA (deja de interactuar con RBR1) y activa a *PCNA1*, *CDC6*, *CDT1* y a miembros del complejo de reconocimiento de orígenes de replicación blancos de E2F (Castellano *et al.*, 2001), más no la mutante RepA<sup>E198K</sup> (Desvoyes *et al.*, 2006). Finalmente, RBR1 se encuentra enriquecido en el promotor de *PCNA1* (Johnston *et al.*, 2008) sugiriendo que las proteínas virales en plantas, al unirse a RBR, liberan al complejo E2F-DP que es capaz de activar a los genes que codifican para proteínas de replicación que facilitan la replicación del DNA viral.

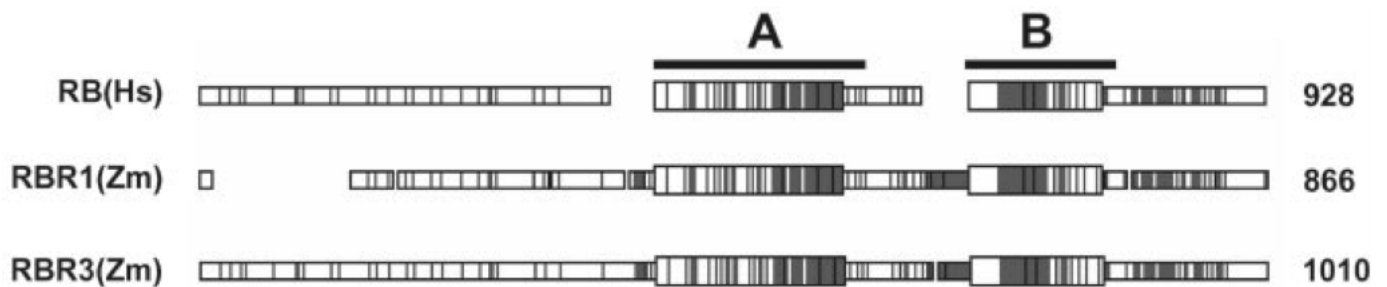
A pesar de que es claro el control del ciclo celular mediado por Rb o RBR en plantas y que este involucra a los factores transcripcionales E2F; no es el único factor que determina la regulación génica. La inactivación de la transcripción de genes blanco de E2F por RBR podría ocurrir también mediante el reclutamiento de otras proteínas ya que la accesibilidad de los factores de transcripción y de la maquinaria de transcripción a sitios específicos del DNA dependen de la estructura de la cromatina que los rodea, por lo que factores como el reposicionamiento de nucleosomas, composición de las histonas, la metilación del DNA y la modificación postraducciona de histonas son cruciales (Nelissen *et al.*, 2007). En maíz, la interacción *in vivo* entre RBR y HDAC es capaz de suprimir la transcripción de un gen reportero (Rossi *et al.*, 2003). En *Arabidopsis thaliana* se ha visto que existe un circuito regulador dependiente de RBR y del complejo represor de polycomb (PRC2) que establecen la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) durante el desarrollo de gametofitos (Johnston *et al.*, 2008). En tomate y en maíz, RBR interactúa con

MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 (MSI1) que reprime a la expresión de MET1, una metilasa de DNA que actúa de manera coordinada con la replicación del DNA y que es requerida para el mantenimiento de la heterocromatina. Finalmente, en Arabidopsis se ha encontrado que tanto RBR y MSI1 se unen a la misma región del promotor de *MET1* (Jullien *et al.*, 2008), por lo que RBR funciona también como proteína de anclaje aunque esas interacciones no se abordarán en el presente trabajo.



## 2. Antecedentes

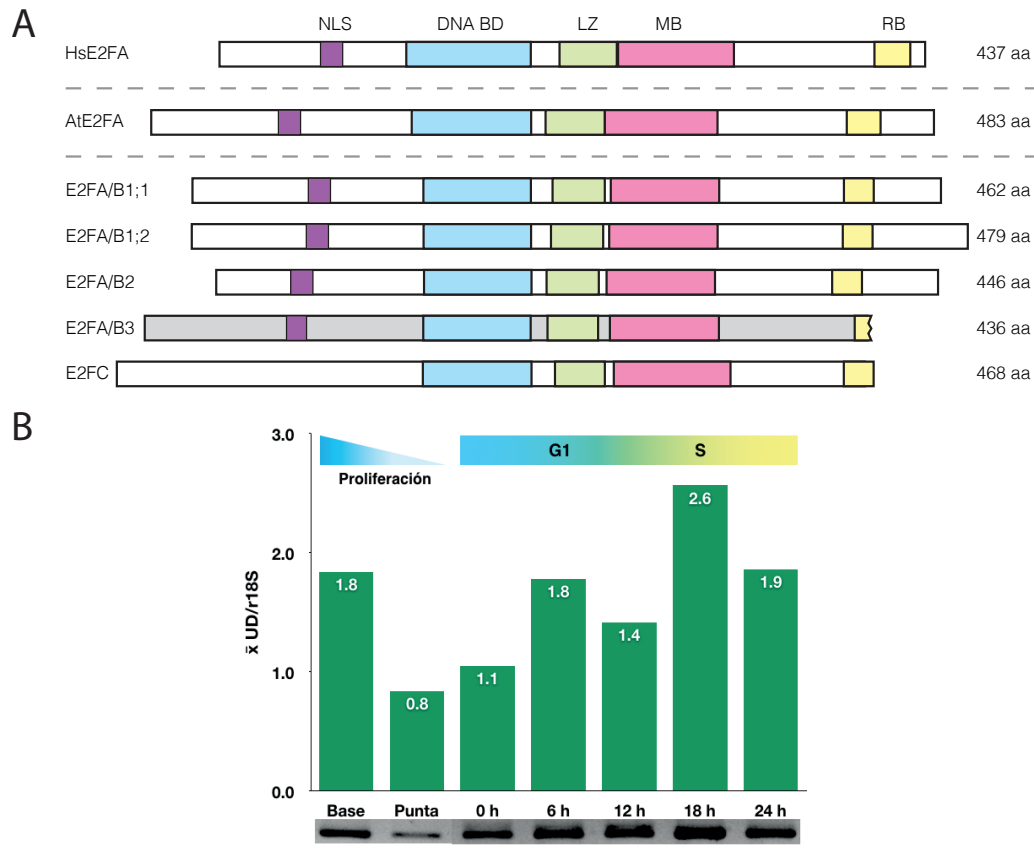
La vía RBR-E2F se encuentra conservada en plantas (de Veylder *et al.*, 2007; Gutierrez, 2005b; Durfee *et al.*, 2005) y aunque *Arabidopsis thaliana* posee sólo un gen que codifica para RBR (AtRBR1), maíz posee cuatro: RBR1/RBR2 con un 89.7% de identidad de secuencia y RBR3/RBR4 con una identidad de 90.8% entre si (RBR1/RBR3 46.2% y RBR2/RBR4 44.4%). Estas cuatro proteínas comparten un 30% de identidad con Rb humana en la región del dominio *pocket* (Sabelli y Larkins, 2005) (fig. 12).



**Figura 12. Alineamiento esquemático de ZmRBR1 y ZmRBR3 con Rb de humanos (HsRb).** El alineamiento muestra los dominios *pocket* (A y B) conservados. Las regiones conservadas se muestran sombreadas (Sabelli y Larkins, 2005).

RBR1 es ortólogo de Rb de humanos y aunque RBR3 muestra las propiedades típicas de interacción de las proteínas *pocket*, es distinto de RBR1/2 en términos de expresión ya que *RBR1* se expresa de manera constitutiva durante el desarrollo del endospermo mientras que la expresión de *RBR3* está asociada a actividad mitótica. Además, se han visto diferencias en la estructura, RBR3 posee una secuencia de aminoácidos más larga (111kDa vs 96 kDa) en virtud de su dominio amino terminal. El subdominio A está identificado como la única región que comparte similitud con p107 y p130 de mamíferos, los cuales están involucrados en la supresión del crecimiento y la interacción con los complejos CDK-CYCA o CYCE (Castano *et al.*, 1998; Sabelli y Larkins, 2005). En callos transgénicos embriogénicos de maíz transformados con RepA, RBR1 reprime la expresión de *RBR3*, el cual posee dos motivos de unión a E2F en su promotor, por lo que *RBR3* es blanco de la vía RBR1/E2F (Sabelli y Larkins, 2005). La presencia de RBR1 en hojas de maíz en desarrollo, se distingue por un gradiente a lo largo de la hoja con los niveles más altos en la punta de la hoja asociado con la diferenciación celular y niveles menores en las zonas de proliferación en la base de la hoja (Huntley *et al.*, 1998). RBR1

regula la proliferación celular, la endoreduplicación y la muerte celular en maíz durante el desarrollo del endospermo (Sabelli *et al.*, 2013).

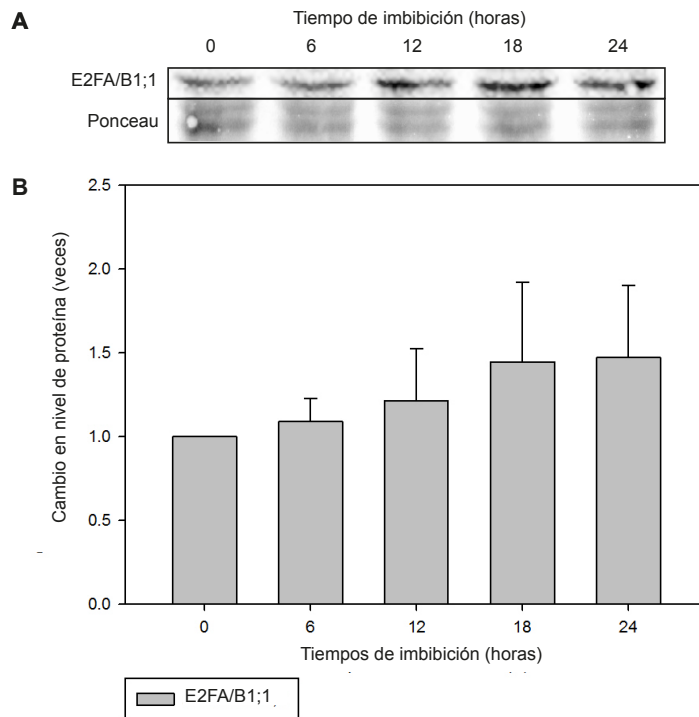


**Figura 13. E2Fs típicos que pertenecen a la familia de factores transcripcionales E2F/DP de maíz y expresión de RNA<sub>m</sub> de ZmE2FA/B1;1.** A) Organización estructural general de los miembros E2F típicos de maíz. Se muestra la organización estructural de E2FA de humanos (HsE2FA) y de Arabidopsis (AtE2FA) como referencia, y los elementos: señales de localización nuclear (NLS), dominio de unión al DNA (DNA BD), dominio de dimerización con DP (LZ), *marked box* (MB) y el dominio de unión a RBR (RB). B) Expresión de *ZmE2FA/B1;1* en tejidos proliferativos, diferenciados y durante la germinación de semillas de maíz. Se observa un incremento en la expresión en tejidos proliferativos (base de hoja) y un pico de expresión a las 18 h post-imbibición de ejes embrionarios de semillas de maíz donde la mayoría de las células se encuentran en la fase S del ciclo celular (Sánchez-Camargo, datos no publicados).

En nuestro laboratorio, se caracterizó previamente la familia de factores transcripcionales E2F/DP, sus niveles de expresión durante distintos tiempos después de la imbibición de ejes embrionarios de maíz, así como en distintos tejidos proliferativos y diferenciados como la base y la punta de la hoja, respectivamente. Se lograron detectar 12 genes cuyos niveles de expresión fueron diferenciales sin mostrar patrones aparentes, a

excepción de *ZmE2FA/B1;1*, el cual se observó más representado en tejidos proliferativos de hojas, mientras que durante la germinación mostró un patrón de acumulación con un pico máximo a las 18 h post-imbibición (Fig. 13) (Sánchez-Camargo, datos no publicados). Este patrón es similar al observado para la actividad de la DNAPol- $\delta$  de maíz, reportado por García y colaboradores en 2006, y que coincide con el tiempo en que la mayoría de las células del eje embrionario ha entrado a fase S (Baíza *et al.*, 1989)

Además, se estudiaron los niveles de acumulación de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. No se encontró un patrón de acumulación similar al observado el RNA<sub>m</sub> de la misma (Fig. 13), por el contrario, los niveles de proteína cambiaron muy poco o se mantuvieron constantes a lo largo de la germinación (Fig. 14), lo que sugiere que existe un equilibrio entre la síntesis y degradación de E2FA/B1; y su actividad podría estar regulada por localización intracelular, por regulación postraduccional o por inactivación (Suárez-Espinoza, tesis de licenciatura 2017).



**Figura 14. Acumulación de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de semillas de maíz.** A) Inmunodetección de E2FA/B1;1 por western blot en extractos proteicos totales de ejes embrionarios extraídos de semillas embebidas por 0, 6, 12, 18 y 24 h en el tamaño esperado (alrededor de 50 kDa). Debajo, tinción de la membrana con rojo de Ponceau. B) Densitometría promedio expresada como cambio en el nivel de proteína respecto a 0 h (n=3), se muestran las barras correspondientes al error estándar promedio (Suárez-Espinoza, tesis de licenciatura 2017).

Se han encontrado funciones similares entre los reguladores de la transición G<sub>1</sub>-S de mamíferos en maíz. Se ha demostrado que ZmRBR1 interacciona con E2F1 de humanos mediante ensayos de doble híbrido e inhibe la activación transcripcional mediada por HsE2F1 a través de un gen reportero en células de mamíferos (Huntley *et al.*, 1998) así como con AtE2Fa y AtE2Fb (de Jager *et al.*, 2001). A pesar de que la interacción entre Rb/RBR con los factores transcripcionales E2F ha sido descrita en otras especies, ésta no se ha descrito en maíz; sin embargo, se ha estudiado esta interacción de manera indirecta. La expresión del gen WDV RepA estimula, y del gen ZmRBR1<sup>341-866</sup> inhibe la división celular en células BY2 de tabaco. RepA interactúa con RBR y podría estar liberando su efecto inhibitorio sobre E2F permitiendo el avance del ciclo celular, mientras que RBR al interactuar con E2F lo detendría (Gordon-Kamm *et al.*, 2002). La regulación negativa de RBR1 en una línea transgénica de maíz durante el desarrollo del endospermo resulta en el incremento de la transcripción de genes blanco de E2F importantes para la fase S del ciclo celular a través de RBR1, como *RBR3*, *MCM2-7* y *PCNA1* (medidos por RT-PCR, Sabelli *et al.*, 2013), promoviendo así la replicación del DNA y el avance del ciclo celular.

### 3. Justificación

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

En nuestro laboratorio estamos interesados en dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la transición G<sub>1</sub>-S durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Se han descrito ya otros miembros de la transición G<sub>1</sub>-S como las CDKs (tipo A y B), las ciclinas tipo D y las proteínas inhibitorias KRP; sin embargo, se sabe poco de la vía RBR-E2F/DP de maíz. Se conocen los niveles de expresión diferenciales de los genes de la familia E2F, siendo *ZmE2FAB1;1* el más abundante en tejidos proliferativos y mostró un patrón de acumulación durante la germinación, con un pico máximo a las 18 h post-imbibición similar al observado para la actividad de la DNAPol- $\delta$  de maíz. Este tiempo además coincide con el tiempo en que la mayoría de las células meristemáticas del eje embrionario ha entrado a fase S del ciclo celular. Los programas de transcripción génica específica son objetivos clave para el inicio y regulación del ciclo celular durante la germinación. Dado que la proteína RBR reprime el avance del ciclo celular controlando la transcripción de genes blanco de E2F, los *loci* a los que se asocie permitirá conocer mejor su papel como regulador del ciclo celular en maíz.

#### **4. Hipótesis**

La proteína RBR1 de maíz se asociará a los promotores de genes de ciclo celular, *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1*, a través de su interacción con el factor transcripcional E2F durante la germinación de maíz.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. General**

Determinar la asociación de la proteína de retinoblastoma (RBR) a *loci* blancos de E2F específicos del ciclo celular durante la germinación de maíz.

##### **5.2. Particulares**

- a) Determinar la interacción de RBR1 con E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz.
- b) Determinar los promotores de genes de fase S del ciclo celular (*PCNA1*, *MCM3* y *RPA2*) a los cuales RBR1 se asocia durante la germinación de maíz

## **6. Materiales y Metodología**

### **6.1. Material Biológico**

#### **6.1.1. Semillas de maíz y hojas de plántula de maíz**

Para la inmunodetección de proteínas en semillas de maíz variedad (V.) Chalqueño se seleccionaron las semillas lo más homogéneas en apariencia posible (cosecha febrero 2016) y fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 min con agitación manual constante y posteriormente se lavaron con agua desionizada. Una vez eliminado el olor a hipoclorito, se enjuagaron durante 5 min en una solución Sin-Bac® (bromo cloro dimetil hidantoína) al 5% en agua desionizada durante 5 minutos con agitación manual constante. Las semillas destinadas a inmunodetección durante la germinación fueron embebidas por 0, 12, 18 y 24 h y aquellas destinadas a la obtención de plántulas se mantuvieron durante 3 días en oscuridad a 25°C y después se cambiaron a fotoperiodo (16 h luz / 8 h de oscuridad) a 25°C durante 11 días más. El tejido de plántula fue obtenido a los 14 días post imbibición y se eligió a la segunda hoja de 10 plántulas cuyas puntas fueron separadas, como muestras de un tejido diferenciado (Huntley, 1998).

#### **6.1.2. Cepas**

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) para la obtención de cepas de mantenimiento y *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL (Stratagene) para la expresión de las proteínas: 6xHis-ZmRBR Ct, GST-ZmRBR1 PC, PeX-ZmE2FA/B1;1, 6xHis-aE2FA/B1;1 y GST que corresponden al extremo carboxilo terminal de ZmRBR1 unido a seis residuos de histidina en el extremo amino, el dominio *pocket* y la región carboxilo terminal de RBR1 fusionado a GST (glutación-S-transferasa) en el extremo amino, la proteína ZmE2FA/B1;1 de longitud completa unida al Profinity Exact Tag (Bio-Rad) en el extremo amino, el péptido de la región carboxilo terminal utilizado para generar el anticuerpo aE2FA/B1;1 fusionado a seis residuos de histidina en el extremo amino y GST obtenida al expresar el vector vacío Gateway® pDEST™15 (ThermoFisher Scientific), respectivamente.

#### **6.1.3. Cultivos bacterianos**

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio de cultivo LB (Sigma-Aldrich) con antibióticos a 37°C en agitación constante. Los cultivos de poco volumen ( $\leq 5$  mL) fueron contenidos en tubos de ensayo, mientras que los de mayor volumen ( $\geq 50$  mL) en matrices Erlenmeyer de, al menos, el doble de capacidad que el volumen del cultivo. Los medios de cultivo utilizados fueron esterilizados previamente por autoclave (121°C, 20 psi, 20 min), posterior a la esterilización y cuando la temperatura de los cultivos ahora estériles descendió a alrededor de 40°C, se añadieron los antibióticos correspondientes.

## **6.2. Validación del anticuerpo anti-RBR1 de maíz**

### **6.2.1. Expresión y purificación del péptido inmunogénico recombinante**

Se inocularon células de *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL con el vector Gateway® pDEST™ 17 (Life Technologies) que contenía el fragmento de DNA que codifica el fragmento del péptido inmunogénico recombinante correspondiente ya sea a la región carboxilo terminal de la proteína ZmRBR1 (Zamora-Zaragoza, tesis de maestría 2014), o bien de ZmE2FA/B1;1 (Sánchez-Camargo, datos sin publicar) en 5.0 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cloranfenicol (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Los cultivos fueron incubados durante 12 h a 37°C y en agitación constante. De ellos, se tomaron 2.5 mL y se inocularon 250.0 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cloranfenicol (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en un matraz Erlenmeyer y se incubó a 37°C en agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 - 0.9 leída a 600 nm de longitud de onda. La expresión del péptido recombinante se indujo adicionando IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.5 mM e incubando durante 3 h a 37°C en agitación. Los cultivos inducidos se centrifugaron a 6,000 x g por 15 min a 4°C. Para purificar:

a) El péptido inmunogénico de RBR1 (6His-ZmRBR1 Ct): Se siguió el protocolo de purificación bajo condiciones nativas: las células empastilladas se resuspendieron en 10.0 mL de PBS-Tritón 1% (pH 7.4) en hielo y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete Mini libre de EDTA (Roche), DTT 1mM y PMSF 10mM. Las células se lisaron por sonicación a pulsos de 20 s encendido por 20 s apagado 5 veces. Los lisados se centrifugaron a 12,000 rpm por 20 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante obtenido a través de



un filtro con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Ya que el péptido recombinante expresa 6 histidinas en el extremo amino, el filtrado se hizo pasar por la resina Protino® Ni-TED Resin (MACHEREY-NAGEL) previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0) para purificar el péptido recombinante por cromatografía de afinidad. La resina unida al péptido inmunogénico se lavó con amortiguador de lavado nativo ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8.0) 5 veces. Posteriormente se eluyó el péptido tres veces con 1 mL de una disolución de imidazol 500 mM en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM y NaCl 300 mM pH 8.0 a 4°C y la resina fue regenerada y almacenada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

b) El péptido inmunogénico de E2FA/B1;1 (6xHis-aZmE2FA/B1;1): Se siguió el protocolo bajo condiciones desnaturizantes: las células empastilladas se resuspendieron en 10.0 mL de amortiguador de lisis desnaturizante (urea 7M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, Tris-HCl 0.01 M pH 8.0) y se incubaron durante 15 min con agitación a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó a 12,000 x g por 30 min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. Se filtró el sobrenadante obtenido a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Ya que el péptido recombinante expresa 6 histidinas en el extremo amino, el filtrado se hizo pasar por la resina Protino® Ni-TED Resin (MACHEREY-NAGEL) previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos (urea 7 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, Tris-HCl 0.01 M pH 8.0) para purificar el péptido recombinante por cromatografía de afinidad. La resina unida al péptido inmunogénico se lavó con amortiguador de lavado desnaturizante (urea 8 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, Tris-HCl 0.01 M pH 6.3) 5 veces. Posteriormente se eluyó el péptido cuatro veces con 1 mL de amortiguador de elución 1 (urea 8 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, Tris- HCl pH 5.9) y cuatro veces más con amortiguador de elución 2 (urea 8 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, Tris- HCl pH 4.5) a temperatura ambiente. La resina fue regenerada y almacenada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las fracciones resultantes en cada paso de la purificación se monitorearon por electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-glicina desnaturizante al 10% (SDS-PAGE), el gel se preparó como se indica en Sambrook y Fritsch, 1989 y se corrió a 85 volts hasta que el frente de corrida pasara por el gel concentrador, luego a 100 volts durante el corrimiento en el gel separador. El amortiguador de electrodos utilizado fue de Tris-glicina-SDS 1x (Sambrook y

Fritsch 1989). Las muestras se cuantificaron por el método de Bradford y se prepararon añadiendo amortiguador de carga 1x (SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, glicerol 4%, Tris-HCl 40 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.01%) y calentando a 92°C por 10 min.

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

En una placa de Elisa se realizó una curva patrón utilizando cantidades crecientes de albúmina bovina sérica (BSA) y adicionando 1  $\mu$ L de reactivo de Bradford. De las eluciones que se obtuvieron del péptido inmunogénico purificado se utilizaron 3  $\mu$ L, se llevaron a 10  $\mu$ L con agua y se adicionaron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford (Bradford, 1973). Las soluciones se cuantificaron por duplicado a 595 nm de longitud de onda en el lector de placas de Elisa Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System (Biotek) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.2.3. Obtención de extractos proteicos totales de semillas y hojas de plántula de maíz**

Se germinaron 10 semillas de maíz durante 0, 6, 12, 15, 18, 24 y 28 h bajo las condiciones mencionadas en 6.1.1. De ellas se extrajeron los ejes embrionarios con ayuda de un escalpelo y se colocaron en un mortero donde se homogeneizaron con amortiguador de extracción de proteínas (Tris-HCl pH 7.5 25mM,  $MgCl_2$  15mM, KCl 25mM,  $Na_2EDTA$  pH 8.0 5mM, NaCl 250mM, Tritón x-100 0.2% y en fresco DTT 1.0 mM, NaF 1mM,  $Na_2VO_4$  1mM, glicerol 30%, 1 tableta de cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete Mini libre de EDTA (Roche),  $\beta$ -glicerofosfato 60mM). Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford (6.2.2.). Para la obtención de extractos proteicos totales de hojas de plántulas, se obtuvieron las segundas hojas de 10 plántulas de maíz de 14 días bajo las condiciones mencionadas en 6.1.1. Con ayuda de un escalpelo, se separaron las puntas (3-4cm de longitud) y se colocaron en un mortero donde se homogeneizaron en amortiguador de extracción de proteínas (Tris pH 7.5 25mM, NaCl 75mM,  $MgCl_2$  15 mM, EDTA pH 8.0 5mM, DTT 1mM, Tritón x-100 0.1%, glicerol 5%, 1 tableta de cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete Mini libre de EDTA (Roche),  $\beta$ -glicerofosfato 60mM , NaF 1mM,  $Na_2VO_4$  0.2mM, pirofosfato de sodio 2.5 mM). Este material

biológico fue utilizado para obtener extractos proteicos totales de igual manera que se describió anteriormente para los análisis subsecuentes.

#### **6.2.4. Extracción de proteínas nucleares de ejes embrionarios de maíz**

Se utilizaron 20 semillas de maíz sin imbibir bajo las condiciones mencionadas en 6.1.1. De ellas se extrajeron los ejes embrionarios con ayuda de un escalpelo y se colocaron en un mortero donde se homogeneizaron hasta que se obtuvo un polvo fino que se resuspendió en 1 mL de amortiguador NIB estéril a 4 °C (Tris-HCl 10 mM pH 9.5, KCl 100mM, sacarosa 0.5M (en fresco), espermidina 4mM, espermina 4mM, β-mercaptoetanol 0.1% (en fresco)). Se filtraron los núcleos obtenidos con una membrana de nylon 30 μm. Posteriormente se añadió el doble del volumen de filtrado obtenido de amortiguador NIB-T a 4 °C (amortiguador NIB adicionado con 10% de Tritón X-100) y se incubó durante 15 min a 4°C en agitación a baja velocidad. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 3,500 rpm a 4°C y la pastilla resultante se resuspendió en 100 μL de amortiguador de extracción de proteínas utilizado en 6.2.3.

#### **6.2.5. Caracterización de los anticuerpos anti-RBR1 de maíz mediante ensayos de competencia**

Se incubaron durante 12 h cantidades crecientes del péptido inmunogénico de RBR1, con el que fue generado el anticuerpo, obtenido en 6.2.1. (0, 60, 120 μg) y 120 μg de BSA como control negativo con suero inmune 1:1000 en PBS 1x adicionado con 0.5mM NaCl y Tween 20 0.9%. Se corrieron 50 μg de extracto total de ejes embrionarios (sección 6.2.3.) de semillas sin imbibir, 50 μg de extracto total de puntas de la tercera hoja de plántulas de 14 días de maíz y 20 μL de extractos nucleares de ejes embrionarios (sección 6.2.4) en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sección 6.2.1) y se transfirieron por western blot a una membrana PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Milipore) mediante transferencia húmeda en una cámara Mini-Trans-Blot® (Bio-rad) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La membrana se bloqueó posteriormente en suero bovino fetal (Biowest) al 30% durante 1.5 h en agitación y se cortó en 4 fragmentos para separar los carriles que contienen cantidades iguales de extracto total. Cada fragmento de membrana se incubó con el

anticuerpo primario previamente incubado con cantidades crecientes del péptido recombinante, BSA diluida en PBS 1x (Sambrook y Fristsch, 1989) adicionada con NaCl 0.5 mM y Tween 20 (Thermo Scientific) 0.9%, o con el suero preimmune durante 12 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS1x-NaCl-Tween 20, y se incubaron con anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación diluido 1:30,000. Posteriormente, los fragmentos se lavaron 3 veces con PBS1x-NaCl-Tween 20 por 15 minutos para finalmente incubarlos con 0.5 mL de la solución de detección por quimioluminiscencia Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). El revelado se realizó en el equipo ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad).

### **6.3. Determinación de la presencia de ZmRBR1 durante la germinación de semillas maíz y en extractos nucleares.**

Se separaron 50 µg de los extractos proteicos totales de ejes embrionarios de maíz obtenidos en 6.2.4 por SDS-PAGE (descrito en la sección 6.2.1) y se realizó western blot descrito en 6.2.5 pero sin cortar las membranas PVDF y utilizando como anticuerpo primario anti RBR1 de maíz diluido 1;1000, para los extractos nucleares donde se utilizó además un anticuerpo comercial anti AtRBR1 de Arabidopsis. Se utilizó el equipo ChemiDoc™ MP System para el revelado de las membranas PVDF utilizando las soluciones Pierce™ ECL Western Blotting Substrate. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa computacional Image Lab™ (Bio-Rad) para determinar la presencia de la proteína RBR1 a los distintos tiempos de germinación y en extractos nucleares de semillas sin imbibir. Se utilizó como control de carga para cada muestra las imágenes de las mismas membranas PVDF reveladas anteriormente teñidas con rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0.1% en 5% ácido acético glacial) durante 5 min y lavadas por 2 min con ácido acético 5% para retirar el exceso de colorante.

### **6.4 Determinación de la interacción entre ZmRBR1-ZmE2FA/B1;1 durante la germinación de maíz**

#### **6.4.1 Interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz**

#### **6.4.1.1. Purificación de las proteínas GST-ZmRBR1 PC y PeX-ZmE2FA/B1;1 recombinantes**

1) GST-ZmRBR1 PC. Se inocularon células de *E.coli* BL21-CodonPlus®-RIL con el vector Gateway® pDEST™15 (ThermoFisher Scientific) que contiene al fragmento de DNA que codifica para el dominio *pocket* de ZmRBR1 y su extremo carboxilo (aminoácidos 275 a 867) unido a GST en el extremo amino (Zamora-Zaragoza, Tesis de maestría 2014) en 5.0 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/µL). La proteína recombinante se indujo bajo las condiciones mencionadas en 6.2.1. Ya que la proteína recombinante expresa en el extremo amino la proteína GST, el filtrado obtenido se hizo pasar por una resina de glutatión-agarosa (SIGMA-Aldrich) previamente equilibrada con PBS 1x para separar al péptido recombinante por cromatografía de afinidad. La resina unida al péptido inmunogénico se lavó con PBS-tritón 2% y PBS-tritón 1%. Posteriormente se eluyó al péptido con 3 mL de una disolución de glutatión reducido 10mM en Tris-HCl 50 mM pH 9.5 a 4°C y la resina fue regenerada y almacenada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

2) PeX-ZmE2FA/B1;1. Se inocularon células de *E.coli* BL21-CodonPlus®-RIL con el vector Profinity eXact™ pPAL7 (Bio-Rad) que sobreexpresa a la proteína de fusión con el Profinity eXact™ Tag (Bio-Rad) de 8.2 KDa en el extremo amino y a la proteína ZmE2FA/B1;1 de longitud completa en el extremo carboxilo (Sánchez-Camargo, datos no publicados) en 5.0 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/µL). La proteína recombinante se indujo bajo las condiciones mencionadas en 6.2.1. El filtrado se hizo pasar por la resina Profinity eXact™, que contiene una proteasa inmovilizada que permite obtener a proteínas recombinantes con el extremo amino nativo, previamente equilibrada con Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 7.2 para separar al péptido recombinante por cromatografía de afinidad. La resina unida al péptido inmunogénico se lavó con la misma solución y la proteína fue eluída con Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y NaF pH 7.2 a temperatura ambiente y la resina fue regenerada y almacenada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Las fracciones resultantes de 1) y 2) en cada paso de la purificación se monitorearon por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sección 6.2.1.) y por western blot

(sección 6.2.5).

#### **6.4.1.2. Purificación del anticuerpo anti-ZmE2FA/B1;1 por western blot**

A partir de la construcción pDEST17-aE2FA/B1;1 generada anteriormente (Sánchez-Camargo, datos sin publicar), se indujo la expresión del péptido utilizado para generar el anticuerpo aE2FA/B1;1 fusionado a seis residuos de histidina en el extremo amino que permitió su purificación por el método desnaturizante utilizando la resina Protino® Ni-TED Resin (MACHEREY-NAGEL) de acuerdo a lo descrito en 6.2.1. Las fracciones resultantes en cada paso de la purificación se monitorearon por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sección 6.2.1.) y por western blot (sección 6.2.5) para identificar la banda correspondiente al aE2FA/B1;1 y que además fuera reconocida por los anticuerpos anti E2FA/B1;1. Se separaron 25 µL del péptido purificado en cada carril y se transfirieron a una membrana (western blot, sección 6.2.5.) la cual fue teñida con colorante rojo de Ponceau para después recortar la banda que corresponde a 6xHis-aE2FA/B1;1 y lavarla con amortiguador TBST (Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05% pH 7.6) por 10 min y con glicina 100 mM pH 2.5 por 15 min. La membrana se bloqueó con 5% de leche sin grasa en TBST durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó tres veces con TBST por 10 min y se incubó con 3 mL de suero inmune en agitación suave durante 12 h a 4°C. La membrana se lavó tres veces con TBST por 10 min y se eluyeron los anticuerpos cuatro veces al incubarla con 1 mL de glicina 100 mM pH 2.5 durante 2 min. Las eluciones fueron neutralizadas al momento con Tris-HCl 2 M pH 8.5 para llegar una concentración final de Tris-HCl 150 mM. Las eluciones obtenidas se dializaron contra PBS (Sambrook y Fritsch, 1989) en agitación durante 4 h a 4°C, se reemplazó la solución de PBS resultante y se incubaron durante 12 h bajo las mismas condiciones. Las eluciones se almacenaron a 4°C y se monitorearon por western blot (sección 6.2.5.).

#### **6.4.1.3. Determinación de la Interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz**

Una vez verificada la obtención de las proteínas recombinantes en el tamaño esperado, se inocularon por triplicado células de *E.coli* BL21-CodonPlus®-RIL con ambas construcciones en 5.0 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/µL). Los cultivos

fueron incubados durante 12 h a 37°C y en agitación constante. De ellos, se tomaron 4.0 mL y se inocularon matraces de 4.0 L de capacidad conteniendo 1.0 L de medio LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 - 0.8 leída a 600 nm de longitud de onda. La expresión de las proteínas se indujo adicionando IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.5 mM y se incubaron durante 3.0 h a 37°C en agitación, con excepción de ZmE2FA/B1;1 que se indujo durante 4 h. Los cultivos inducidos se centrifugaron a 6,000 x g por 15 min a 4°C. Para determinar la interacción GST-ZmRBR1 PC / PeX-ZmE2FA/B1;1, las células empastilladas de cada cultivo se resuspendieron en 10.0 mL de PBS-Tritón 1.0% pH 7.4 y se les adicionaron 100 µL de cocktail de inhibidores de proteasas cComplete Mini libre de EDTA (Roche), DTT 1 mM y PMSF 10 mM. Las pastillas de células disueltas se juntaron para obtener un volumen final de 20.0 mL y se lisaron por sonicación a pulsos de 20 s encendido por 20 s apagado 5 veces. Los lisados se centrifugaron a 12,000 rpm por 20 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante obtenido con un tamaño de poro de 0.45 µm y se incubó durante 18 h a 4°C en agitación constante. Los complejos GST-ZmRBR1 PC / PeX-ZmE2FA/B1;1 se purificaron utilizando la resina glutatión-agarosa (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a lo descrito en 6.4.1.1 (1). Como control positivo se utilizó una muestra correspondiente al cultivo inducido y las proteínas recombinantes purificadas. Como controles negativos, se purificó a PeX-E2FA/B1;1 utilizando la resina glutatión-agarosa (Thermo Fisher Scientific) (sección 6.4.1.1 (1)) y se determinó la interacción GST / PeX-ZmE2FA/B1;1 utilizando las células de *E.coli* BL21-CodonPlus®-RIL (Stratagene) que contienen al vector vacío Gateway® pDEST™15 (ThermoFisher Scientific) permitiendo así sobreexpresar a GST e inmunodetectarla con anticuerpos comerciales anti GST. La interacción se determinó de la misma manera que para GST-ZmRBR1 PC / Pex-ZmE2FA/B1;1. Todas las eluciones se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% como concentración final, se incubaron a 4°C por 15 min y se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Las pastillas resultantes se lavaron con 200 µL de acetona al 100% y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C dos veces. La acetona residual fue evaporada a sequedad y las pastillas resultantes se resuspendieron en 10 µL de Tris 1M, 5 µL de amortiguador de carga 1x (sección 6.2.1) y 5 µL de agua desionizada estéril. Todas las eluciones obtenidas se separaron por electroforesis SDS-PAGE (sección 6.2.1) y se inmunodetectaron las proteínas por western blot (sección 6.2.5)

utilizando los anticuerpos anti-ZmRBR1 y anti-ZmE2FA/B1;1 purificados obtenidos en 6.4.1.2 por triplicado.

#### **6.4.2. Determinación de la interacción *in vivo* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz**

A 60  $\mu$ L de proteína A-Agarosa (Roche) se le adicionaron 90  $\mu$ L de anticuerpo anti ZmRBR1, se llevó a un volumen final de 700  $\mu$ L con PBS 1x y se incubó a 13 rpm durante 2 h a temperatura ambiente. La resina se centrifugó a 3000 rpm por 3 min y se lavó con 700  $\mu$ L de borato de sodio 200 mM pH 9.0 con agitación durante 5 min. La resina se centrifugó y se tomaron 7  $\mu$ L de ella como control (fracción unida). Se le adicionaron 700  $\mu$ L de borato de sodio 200 mM y DMP (dimetil pimelimidato, Sigma-Aldrich) 50 mM pH 8.3, se incubó por duplicado durante 45 min con agitación a temperatura ambiente, se centrifugó y se lavó con 700  $\mu$ L de borato de sodio 200 mM y etanolamina pH 8.0 durante 5 min en agitación y se centrifugó. La resina se incubó con la misma solución por 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Se tomaron 7  $\mu$ L de ella como control (fracción no entrecruzada). La resina restante se lavó con PBS 1x durante 5 min en agitación y se eliminaron los anticuerpos no unidos covalentemente al lavarla con glicina 100 mM pH 2.5 y PBS 1x, se centrifugó y se tomaron 7  $\mu$ L como control (fracción entrecruzada). Las fracciones obtenidas se eluyeron con 10  $\mu$ L de glicina 100 mM pH 2.5. La resina resultante se incubó con 1 mg de extractos proteicos totales de semillas de maíz de 0, 15 y 28 h post germinación (sección 6.2.3.) durante 12 h a 4°C ajustada a un volumen final de 700  $\mu$ L con PBS 1x, transcurrido el tiempo las muestras se centrifugaron y se tomaron 5  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra como control (fracción no adsorbida). La resina se lavó tres veces con PBS 1x a 4°C, se centrifugó y se tomaron 15  $\mu$ L del último sobrenadante como control (lavado). La resina se eluyó con 30  $\mu$ L de glicina 100 mM pH 2.5, se agitó suave y manualmente durante 5 min y se centrifugó. A las eluciones obtenidas se les adicionó 5  $\mu$ L de amortiguador de carga 1x (sección 6.2.2) y 5  $\mu$ L de Tris 1.0 M. La resina se lavó con PBS 1x a 4°C y se almacenó en PBS 1x y azida de sodio 0.02% para su uso posterior. Todas las eluciones obtenidas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sección 6.2.1.) y analizadas por western blot (sección 6.2.5) por triplicado.

#### **6.5. Determinación de los *loci* a los que ZmRBR1 se asocia durante la germinación de**



## maíz

### 6.5.1. Extracción de la cromatina de puntas de raíz de ejes embrionarios de maíz

Se germinaron 100 semillas de maíz durante 0, 15 y 28 h bajo las condiciones mencionadas en 6.1.1. por triplicado. De ellas se extrajeron las puntas de raíz de los ejes embrionarios con ayuda de un escalpelo, se sumergieron en 30.0 mL de amortiguador A (Tris 100 mM pH 8.0, sacarosa 400 mM, butirato de sodio 10 mM, formaldehído 1%, PMSF 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM) y se sometieron a pulsos de vacío de 5 min tres veces. Se adicionaron 2.5 mL de glicina 2.0 M y se les dio un pulso más por 5 min, se lavaron con 30.0 mL de agua desionizada estéril a 4°C cinco veces y se decantaron para secarlos con toallas de papel. Las puntas de raíz de los ejes embrionarios resultantes se homogeneizaron en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta que se obtuvo un polvo fino para almacenarlos a -70°C hasta su uso. El material biológico obtenido se resuspendió en 30 mL de amortiguador B (tris 10 mM pH 8.0, sacarosa 400 mM, butirato de sodio 10 mM, PMSF 0.1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM) y se incubó en agitación suave durante 40 min a 4 °C. Las soluciones fueron filtradas en tubos falcon con ayuda de dos filtros de nylon con un tamaño de poro de 30 y 100  $\mu$ m (Millipore). Los filtrados fueron centrifugados a 2880 x g a 4°C durante 30 min y las pastillas resultantes fueron resuspendidas en 1.0 mL de amortiguador C (tris 10 mM pH 8.0, sacarosa 125 mM, butirato de sodio 10 mM,  $MgCl_2$  10 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 0.1 mM, inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina, antipaína y pepstatina 1  $\mu$ g/mL,  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM). Las muestras se centrifugaron a 12,000 x g durante 10 min a 4°C. Las pastillas resultantes se disolvieron en 300  $\mu$ L de amortiguador D (tris 10 mM pH 8.0, sacarosa 1.6 M, butirato de sodio 10 mM,  $MgCl_2$  2 mM, Tritón X-100 0.15%, PMSF 0.1 mM, inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina, antipaína y pepstatina 1  $\mu$ g/mL,  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM) y se colocaron sobre 1500  $\mu$ L de amortiguador D. Las muestras se centrifugaron a 16,000 x g durante 1 h a 4°C. Las pastillas resultantes se disolvieron en 1 mL de amortiguador de lisis de núcleos (tris 50 mM pH 8.0, EDTA 5.62 mM pH 8.0, SDS 0.133%, PMSF 0.1 mM e inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina, antipaína y pepstatina 1  $\mu$ g/mL). Se tomaron 10  $\mu$ L como control sin sonicar y el restante se sometió a sonicación a pulsos de 3 s encendido por 27 s apagado 13 veces al 20% de amplitud y se centrifugaron a 12,000 x g por 5 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos estériles de

1.5 mL y se tomaron 10  $\mu$ L para purificar el DNA y monitorear la eficiencia de la sonicación. El sobrenadante restante se congeló con ayuda de nitrógeno líquido y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. A los 10  $\mu$ L tomados anteriormente se les adicionaron 100  $\mu$ L de amortiguador TE (tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0), NaCl 0.21 mM y SDS al 0.83% para desentrecruzarlos. Las muestras resultantes se incubaron a  $65^{\circ}\text{C}$  por 12 h y el DNA fue extraído mediante fenol-cloroformo (Sambrook y Fritsch, 1989) y las pastillas resultantes se resuspendieron en 40  $\mu$ L de amortiguador TE. Se separaron 10  $\mu$ L del DNA purificado obtenido con 1  $\mu$ L de amortiguador de carga 10x para DNA (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30%) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X (Tris 50 mM, acetato de sodio 1 mM, EDTA 2mM pH 8.5) teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las muestras se separaron durante 30 min a 80 V en buffer TAE 1X utilizando 4  $\mu$ L de GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) como referencia. El gel fue observado bajo luz UV con ayuda de un transiluminador.

### **6.5.2. Inmunoprecipitación de la cromatina asociada a RBR1 durante la germinación de maíz**

Las muestras de 0, 15 o 28 h obtenidas en 6.5.1. se descongelaron en hielo. Se lavaron 40  $\mu$ L de proteína A-Agarosa (Roche) tres veces con amortiguador de incubación ChIP (tris 50 mM pH 8.0, NaCl 120.77 mM, tritón x-100 0.08%) incubando por 5 min en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$ , centrifugando a 1500 rpm por un minuto y retirando el sobrenadante cada vez; 100  $\mu$ L más de proteína A-Agarosa (Roche) fueron bloqueados con 1 mL de amortiguador de incubación ChIP adicionado con 1 mg/mL de DNA de esperma de salmón (Sigma Aldrich D1626) y 0.25 mg/mL de BSA en agitación por 12 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y la resina se lavó con 1 mL de amortiguador de incubación ChIP por 5 min en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  dos veces para finalmente almacenar la resina resultante en el mismo amortiguador a  $4^{\circ}\text{C}$ . La resina sin bloquear se incubó con 200  $\mu$ L de cromatina sonicada en 500  $\mu$ L de amortiguador de incubación ChIP durante 1 h en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante se incubó durante una hora más en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  con la resina bloqueada bajo las mismas condiciones para eliminar las interacciones inespecíficas entre la resina y las muestras biológicas. Del sobrenadante se tomaron 30  $\mu$ L (*input*) y se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. Se tomaron 75  $\mu$ L de la cromatina resultante y se

incubaron con 10  $\mu$ L de anticuerpo anti RBR1 de maíz o de suero preinmune (*mock*) durante 1 h en agitación a 4 °C y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se incubaron con 20  $\mu$ L de resina bloqueada durante 1 h en agitación a 4°C y se centrifugaron a 1500 rpm por 1 min a 4°C. Las resinas resultantes se lavaron tres veces con 1 mL de cada amortiguador donde cada lavado implicó incubarlas con amortiguador de bajas sales (tris 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, tritón x-100 1%), amortiguador de altas sales (tris 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, SDS 0.1%, tritón x-100 1%), amortiguador de LiCl (tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0, LiCl 250 mM, igepal CA-89 1%, desoxicolato de sodio 1%) y amortiguador TE durante 5 min en agitación a 4°C centrifugando a 1500 rpm por 1 min a 4°C y retirando el sobrenadante cada vez. Posterior al último lavado se retiró todo el sobrenadante y las resinas se eluyeron con 250  $\mu$ L de amortiguador de elución (SDS 1%, bicarbonato de sodio 0.1 M) a 65°C por 15 min para después centrifugarlas a 6000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Las eluciones se recuperaron en tubos de 1.5 mL y las resinas se eluyeron una vez más bajo las mismas condiciones. Las eluciones obtenidas se desentrecruzaron junto con la resina obteniendo un volumen final de 500  $\mu$ L y se les adicionaron 20  $\mu$ L de NaCl 5M para incubarlas a 65°C durante 12 h. A la muestra correspondiente al *input* se le adicionaron 100  $\mu$ L de amortiguador TE, 5  $\mu$ L de NaCl 5M y 5  $\mu$ L de SDS al 20% y se desentrecruzó bajo las mismas condiciones. Las muestras resultantes se centrifugaron con un pulso de 13,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos para microcentrífuga de 1.5 mL para purificar el DNA contenido en ellas por extracción con fenol-cloroformo (Sambrook y Fritsch, 1989), las pastillas resultantes se resuspendieron en 55  $\mu$ L de amortiguador TE y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

### **6.5.3. Amplificación de la cromatina asociada a ZmRBR1 durante la germinación de maíz por PCR**

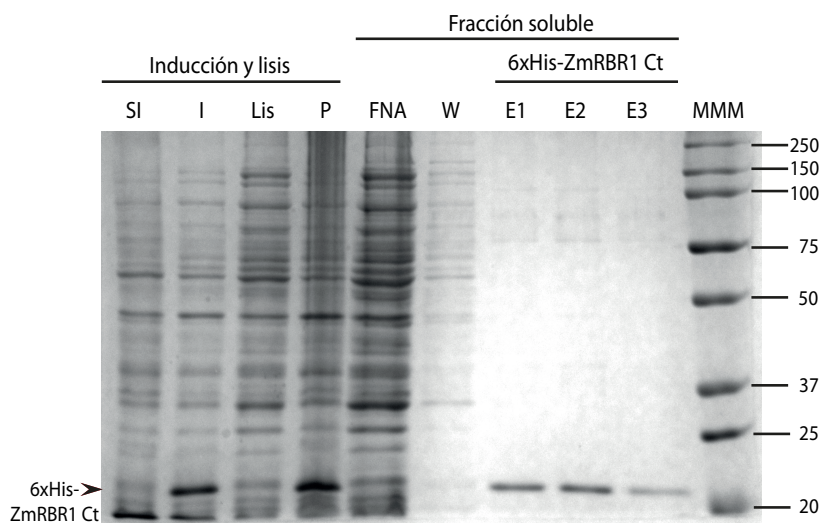
Se utilizaron cebadores específicos para PCR diseñados previamente (Sánchez-Camargo, datos sin publicar) que permiten amplificar los sitios E2F en los promotores de los genes *MCM3*, *PCNA1*, *RPA2* y una región de promotor de la *CYCD3;1a* sin sitios E2F (apéndice 6, tabla A.6.2.). Para las reacciones de PCR se utilizó como templado 3.0  $\mu$ L de las eluciones obtenidas en 6.5.2. y el *input*, cebadores 0.2 mM, 5  $\mu$ L de la enzima Jumpstart™ Taq

ReadyMix™ (Sigma Aldrich), se llevaron a un volumen de 10 µL con agua y se utilizaron las temperaturas de alineamiento del par de cebadores predichas por el *software* Amplifx con 32 ciclos de amplificación. Para la corroboración de los productos de PCR obtenidos se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% de acuerdo a lo descrito en 6.5.1.

## 7. Resultados

### 7.1. Validación de los anticuerpos anti RBR1 de maíz

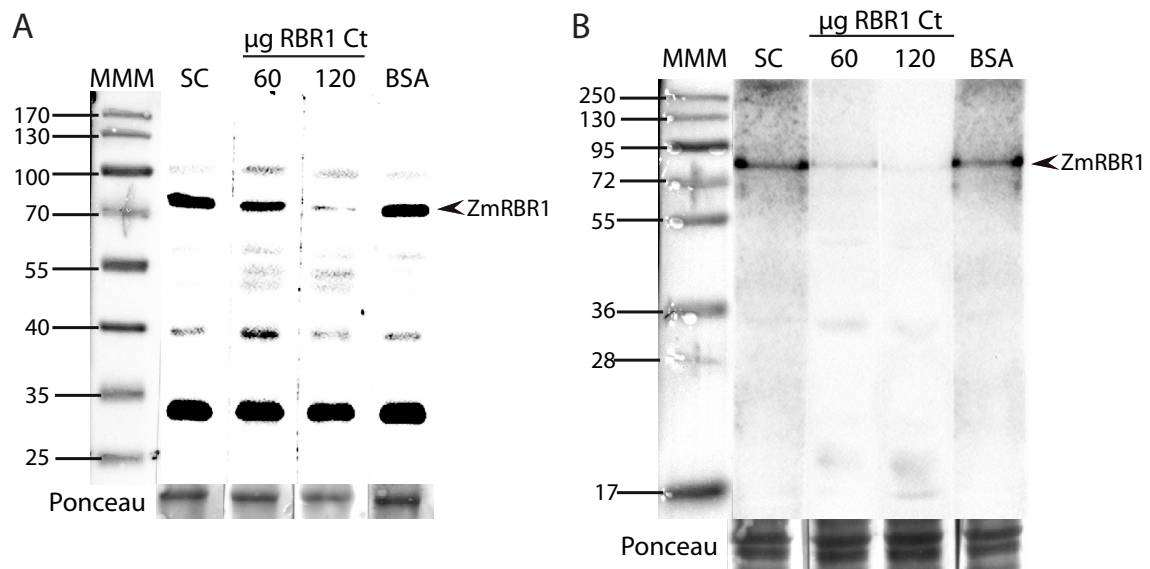
La construcción pDEST17-ZmRBR1Ct se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL competentes las cuales se seleccionaron por su resistencia a antibióticos. Una vez obtenida la cepa de expresión con el vector conteniendo al inserto ZmRBR1, se indujo la expresión de la proteína de fusión que contiene seis histidinas en el extremo amino y al inserto en el carboxilo de acuerdo a la metodología descrita previamente. La expresión de la proteína se monitoreó por electroforesis (SDS-PAGE) y la proteína se purificó por cromatografía de afinidad (Fig. 15). La masa molecular de la proteína codificada teórica predicha por el programa computacional ExPASy: PeptideMass (Gasteiger *et al.*, 2005) es de 21 kDa. Durante la purificación, se tomaron muestras de cada fracción resultante: las células lisadas inducidas con IPTG, la fracción no adsorbida por la resina, el último lavado a la columna previo a la elución y las fracciones eluidas. Se observan algunas bandas de tamaño superior al esperado en las eluciones obtenidas pertenecientes a la fracción soluble en menor cantidad comparado con la proteína recombinante por lo que se obtuvo una purificación parcial (fig. 15). El péptido recombinante purificado se recolectó en tres eluciones distintas.



**Figura 15. Expresión y purificación del péptido de ZmRBR1 recombinante.** Se muestran las proteínas correspondientes a la inducción de ZmRBR1 Ct indicándose: el cultivo bacteriano sin inducir (SI), cultivo inducido (I), lisado (Lis), fracción insoluble en la pastilla (P), fracción no adsorbida (FNA), el lavado de la columna (W), las eluciones del péptido (E1, E2, E3) y el marcador de masa molecular (MMM).

Se empleó el péptido purificado, para validar los anticuerpos anti-ZmRBR1 mediante ensayos de competencia (Fig. 16) y se observó que al preincubarse la misma cantidad de anticuerpo con cantidades crecientes de péptido recombinante, la intensidad de la banda

reconocida por western blot, proveniente de extractos de puntas de hoja de 14 días donde ZmRBR1 había sido detectada anteriormente (Huntley *et al.*, 1998) (Fig. 16 A) y de ejes embrionarios sin imbibir (Fig. 16 B) correspondiente a 74 kDa, disminuye y es menor al peso molecular de la proteína ZmRBR1 completa predicho por el programa computacional ExPASy: PeptideMass (Gasteiger *et al.*, 2005) que corresponde a 96 kDa. La mayor cantidad de péptido recombinante con que se incubó el suero inmune fue de 120  $\mu\text{g}$  y como competidor negativo, se utilizó la misma cantidad de BSA para verificar que el causante de la disminución en el reconocimiento de la banda correspondiente a RBR1 es la unión al antígeno contra el que se generaron los anticuerpos y no cualquier otro. Aunque la proteína BSA es una proteína de mediano peso molecular y con una gran cantidad de epítomos, no compitió con RBR1 endógena, lo cual indicó que los anticuerpos son específicos. A pesar de haber logrado identificar una banda alrededor de 100 kDa y otra en 30 kDa en extractos de puntas de hoja, ninguna disminuyó por lo que se trata de bandas inespecíficas reconocidas por el anticuerpo anti RBR1 de maíz.



**Figura 16. Validación de los anticuerpos anti-RBR1 de maíz por ensayo de competencia.** Western blot utilizando 50  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos totales de A) puntas de hojas de 14 días post imbibición y B) ejes embrionarios sin imbibir. Para ambos casos se muestra el marcador de masa molecular (MMM), suero inmune sin competir (SC), suero inmune competido con 60 y 120  $\mu\text{g}$  del péptido inmunogénico recombinante correspondiente al extremo carboxilo purificado (60, 120), el suero inmune preincubado con 120  $\mu\text{g}$  de BSA (BSA). Se muestra la tinción de las proteínas de las mismas membranas con rojo de Ponceau como control de carga.

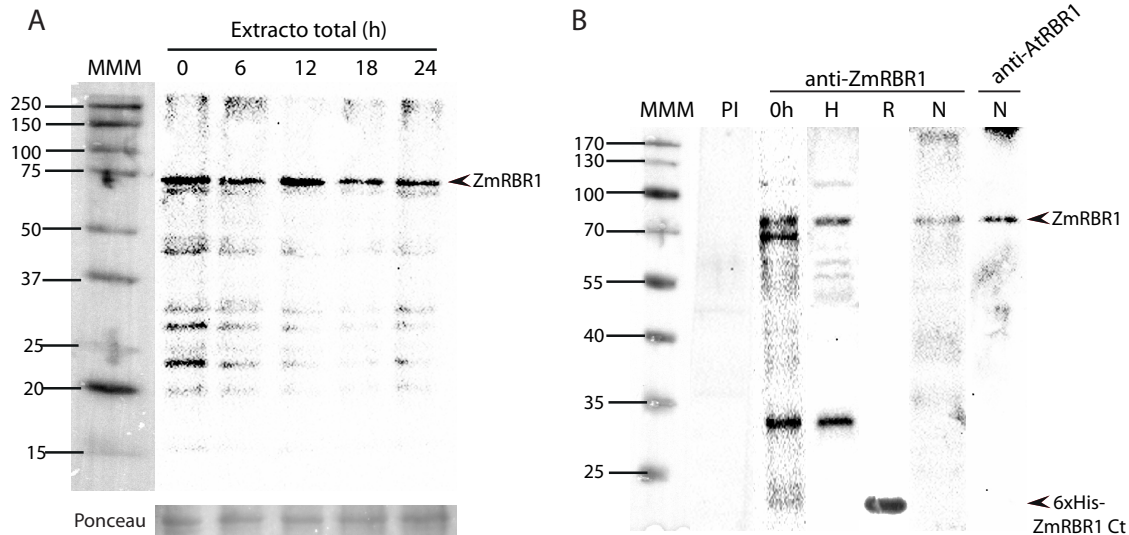
### **7.1.1. La proteína RBR1 está presente en el eje embrionario durante la germinación de maíz**

Ya que el eje embrionario contiene todas las estructuras que darán origen a las diferentes partes de la nueva planta posterior a la germinación, resulta relevante determinar si RBR1 está presente en el eje embrionario durante la germinación. Dentro del eje se encuentran los meristemos del tallo y la raíz, lo cuales son nichos de células altamente proliferativas que se generan a partir de células madre y continúan proliferando hasta alcanzar zonas donde la tasa de división celular es menor y comienzan procesos de elongación celular seguidos de diferenciación, donde las células dejan de dividirse. Por lo tanto, es factible que un regulador del avance del ciclo celular, como es RBR1, se encuentre presente en las células del eje embrionario durante la germinación, ya que en este proceso ocurre una reactivación metabólica global que incluye la activación del ciclo celular.

Con los anticuerpos validados anti-RBR1 se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína en extractos proteicos totales de ejes embrionarios a 0, 6, 12, 18 y 24 h de imbibición para determinar la presencia de ZmRBR1 durante la germinación. Se logró detectar a la banda correspondiente a la proteína ZmRBR1 en 74 kDa de manera aparentemente constante durante la germinación y se utilizó como control de carga la misma membrana con las proteínas teñidas con rojo de Ponceau (Fig. 17 A). Se inmunodetectó además a ZmRBR1 en puntas de hojas de plántulas de 14 días, tejido diferenciado en el cual había sido identificada alrededor de 100 kDa (Huntley, 1998) y en extractos proteicos nucleares de ejes embrionarios sin imbibir (Fig. 17 B) donde RBR1 llevaría a cabo su función como represor transcripcional. En todos los casos se observó la banda correspondiente a 74 kDa que es menor al predicho de 96 kDa. Ya que los anticuerpos reconocen al extremo carboxilo de RBR1, ésta podría estar perdiendo un fragmento del extremo amino al volverse inestable fuera del ambiente celular fisiológico.

Para la inmunodetección de RBR1 en extractos nucleares se utilizaron dos anticuerpos, los anticuerpos anti RBR1 de maíz validados previamente (Fig. 16) y anticuerpos comerciales que reconocen a RBR1 de *Arabidopsis thaliana*. Cabe señalar que en el genoma de maíz existen cuatro genes que codifican para proteínas RBR, RBR1-4 y ya que RBR1 es la más

cercana filogenéticamente a AtRBR1 y comparten el 43% en identidad de secuencia, los anticuerpos anti AtRBR1 reconocieron una banda correspondiente a RBR1 en 74 kDa de la misma manera que lo hicieron los anticuerpos anti RBR1 de maíz. Por lo que la banda detectada en 74 kDa corresponde a RBR1 de maíz.



**Figura 17. Inmunodetección de la proteína RBR1 durante la germinación de maíz, en puntas de hojas y extractos nucleares.** A) Inmunodetección de RBR1 por western blot en extractos proteicos totales de ejes embrionarios extraídos de semillas embebidas por 0, 6, 12, 18 y 24 h (74 kDa). Debajo, tinción de la membrana con rojo de Ponceau. B) Inmunodetección de RBR1 con el anticuerpo anti RBR1 de maíz por western blot en extractos proteicos totales utilizando el suero preinmune como control negativo (PI), extracto proteico de ejes embrionarios sin imbibir (0h), extractos proteicos totales de puntas de hoja de plantas de 14 días post imbibición (H), y la fracción del péptido inmunogénico recombinante correspondiente al extremo carboxilo de RBR1 purificado en el tamaño esperado (21 kDa) (R) y extractos proteicos nucleares de semillas sin imbibir (N). Para los extractos proteicos nucleares de semillas sin imbibir (N) se utilizó además un anticuerpo anti RBR1 de *Arabidopsis* (anti-AtRBR1, N).

## 7.2. RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos *in vitro* y durante la germinación de maíz

### 7.2.1. RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz interactúan *in vitro*

Anteriormente se reportó la interacción *in vitro* de RBR1 de maíz con E2Fa y b de *Arabidopsis thaliana* (de Jager *et al.*, 2001). Estos E2Fs poseen la misma organización estructural que E2FA/B1;1 de maíz (fig. 10 y 13) que incluye al dominio de unión a RBR y son cercanas filogenéticamente (Sánchez-Camargo, datos sin publicar), por lo que sería factible que RBR1 y E2FA/B1;1 interactuaran por reconocimiento entre sus secuencias



proteicas.

Para estudiar la interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz, se utilizaron las construcciones GST-ZmRBR1 PC y PeX-ZmE2FA/B1;1 para transformar células de *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL competentes las cuales se seleccionaron por su resistencia a antibióticos. Una vez obtenidas las cepas de expresión con el vector conteniendo a los insertos ZmRBR1 PC que contiene el dominio *pocket* más el carboxilo terminal (región que se sabe interactúa con E2F) y ZmE2FA/B1;1 de longitud completa, se indujo la expresión de las proteínas de fusión que contienen en el extremo amino la proteína GST y el Profinity eXact™ Tag (Bio-Rad) respectivamente, con los insertos en el extremo carboxilo de acuerdo a la metodología descrita previamente. La expresión de las proteínas se monitoreó por electroforesis (SDS-PAGE) e inmunodetección y las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas empacadas con las resinas de glutatión-agarosa y Profinity eXact™ respectivamente (apéndice 1, Fig. A1). Las masas moleculares para las mismas predichas por el programa computacional ExPASy: PeptideMass (Gasteiger *et al.*, 2005) son de 91 y 52 kDa respectivamente, ya que la resina Profinity eXact™ permite obtener el extremo amino nativo al perder el Profinity eXact™ Tag de 8.2 kDa durante la elución. Durante la purificación se tomaron muestras de cada fracción resultante, como en 7.1.1, y las proteínas recombinantes se recolectaron en tres eluciones distintas. Se observan algunas bandas de tamaño inferior a los esperados para las proteínas recombinantes en las eluciones obtenidas, pertenecientes a la fracción soluble, y se observan también las bandas en el tamaño esperado para RBR1 y de tamaño mayor para E2FA/B1;1 (60 kDa). Esto podría deberse a la presencia de una fracción remanente del Profinity eXact™ Tag durante las eluciones (apéndice 1, Fig. A1). Estos resultados muestran que las proteínas recombinantes pudieron ser expresadas, purificadas y reconocidas por los anticuerpos específicos validados previamente anti ZmRBR1 (Fig. 16) y anti E2FA/B1;1 (Suárez-Espinoza, Tesis de licenciatura 2017).

Una vez establecidas las condiciones que permiten obtener a las proteínas recombinantes y para poder estudiar la interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz con RBR1 unido a la resina de glutatión-agarosa como proteína de anclaje, se determinó si E2FA/B1;1 podía unirse a esta resina por sí sola y si la proteína de fusión GST, que estaría unida por el

extremo amino a RBR1, podría interactuar con ella evitando así falsos positivos para los experimentos subsecuentes.

Se indujo la expresión de la proteína E2FA/B1;1 de maíz utilizando células de *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL transformadas con PeX-ZmE2FA/B1;1 como inserto. Posterior a la inducción, las células se lisaron y el lisado se hizo pasar por una columna empacada con la resina de glutatión-agarosa. Durante la purificación, se tomaron muestras de cada fracción resultante y se monitorearon por inmunodetección empleando los anticuerpos anti E2FA/B1;1 de maíz (apéndice 2, Fig. A2.A). Se observa la banda del tamaño esperado que incluye el Profinity eXact™ Tag de 8.2 kDa (60 kDa) en el cultivo bacteriano inducido, en el extracto total de lisis y en la fracción no adsorbida a la columna, mas no en las eluciones. Esto indica que E2FA/B1;1 no interacciona de manera inespecífica con la resina de glutatión-agarosa. Se indujo también la expresión del vector vacío Gateway® pDEST™15 (ThermoFisher Scientific) que codifica para la proteína GST cuya masa molecular predicha por el programa computacional ExPASy: PeptideMass (Gasteiger, 2005) es de 25.3 kDa. Al incubar los lisados de los cultivos bacterianos transformados con los vectores Gateway® pDEST™15 y PeX-ZmE2FA/B1;1 se observa una banda del tamaño esperado para GST (25 kDa) en el cultivo inducido y en la elución al inmunodetectar con anticuerpos comerciales anti GST (apéndice 2, fig. A2.B). E2FA/B1;1 estuvo presente en el cultivo inducido mas no en la elución al intentar detectarla utilizando el anticuerpo anti E2FA/B1;1 de maíz (apéndice 2, Fig. A2.C), por lo que pEx-ZmE2FA/B1;1 no interacciona con la proteína GST, la cual estará fusionada a RBR1 al purificar a los complejos RBR1-E2FA/B1;1.

Una vez eliminada la posibilidad de falsos positivos en los ensayos de interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz, se indujo la expresión de las proteínas RBR1 y E2FA/B1;1 utilizando células de *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL transformadas con pDEST17-RBR1 PC y PeX-ZmE2FA/B1;1 como insertos (sección 6.4.1.3). Los lisados de los cultivos se incubaron y los complejos resultantes se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna empacada con resina de glutatión-agarosa (apéndice 3). En la elución obtenida, se logró inmunodetectar a la proteína RBR1 en el tamaño esperado (91 kDa,apéndice 3, Fig. A3.A) utilizando el anticuerpo anti RBR1 de maíz mientras que al tratar de inmunodetectar a E2FA/B1;1 se obtuvo el mismo patrón de bandas obtenido para RBR1. Ya que ambos

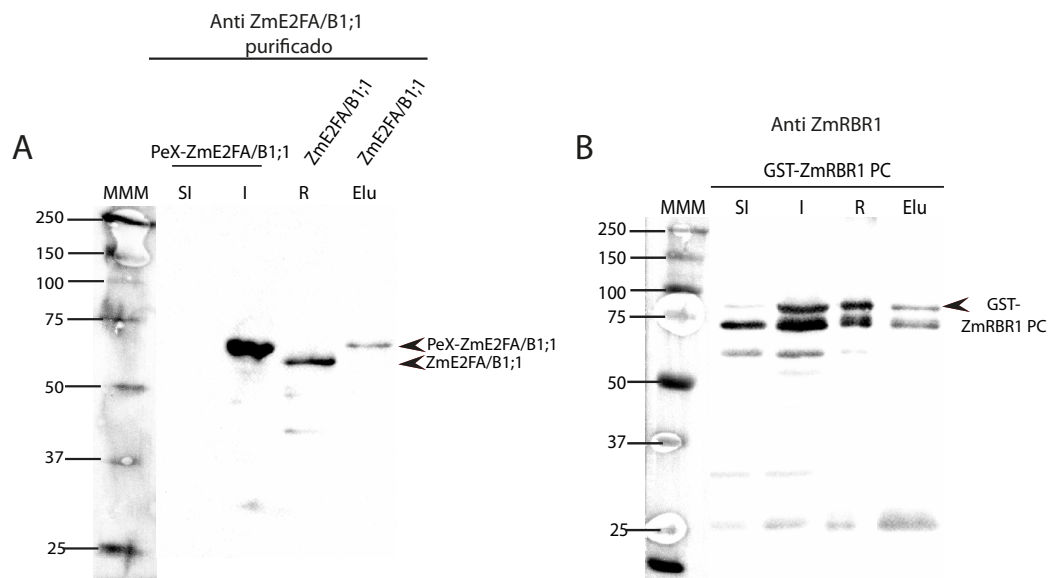
anticuerpos fueron generados con un péptido inmunogénico fusionado a GST en el extremo amino, la mezcla de anticuerpos anti E2FA/B1;1 de maíz contienen anticuerpos que detectan a GST fusionado a RBR1 presente en la elución de los complejos RBR1-E2FA/B1;1 (apéndice 3, Fig. A3.B). Para prevenir este artefacto, fue necesario purificar los anticuerpos anti E2FA/B1;1 utilizando como estrategia la purificación por membrana (western blot).

Para purificar los anticuerpos anti E2FA/B1;1, se utilizaron las células disponibles de *E. coli* BL21-CodonPlus®-RIL transformadas con la construcción pDEST17-aE2FA/B1;1 (Sánchez-Camargo, datos no publicados) y se indujo a la proteína de fusión que contiene seis histidinas en el extremo amino y el fragmento correspondiente al péptido inmunogénico contra el cual se generaron los anticuerpos anti E2FA/B1;1 de maíz en el extremo carboxilo, de acuerdo a la metodología descrita en 6.4.2.1. y que permitió su purificación por cromatografía de afinidad (sección 6.2.2). La masa molecular de este péptido recombinante predicha por el programa computacional ExPASy: PeptideMass (Gasteiger, 2005) es de 15 kDa. Las fracciones resultantes en cada paso de la purificación se monitorearon por electroforesis en gel de poliacrilamida. Durante la purificación del péptido fue posible detectar a la proteína en el tamaño esperado en las eluciones obtenidas bajo condiciones más ácidas (apéndice 4, Fig. A4.A y E5-E8) con la mayor cantidad de péptido purificado presente en las eluciones 6 y 7 e inmunodetectarla en las mismas con el anticuerpo anti E2FA/B1;1 (apéndice 4, Fig. A4.B).

Ya que los anticuerpos anti E2FA/B1;1 reconocen a la proteína recombinante en el tamaño esperado en la elución, se purificaron los anticuerpos con la misma al transferirla a una membrana por western blot, la membrana resultante se tiñó con rojo de Ponceau para detectar la banda en 15 kDa, recortarla e incubarla con los anticuerpos, posteriormente se lavó y los anticuerpos unidos de manera específica fueron eluidos, permitiendo así eliminar a los anticuerpos anti GST que estaban presentes. Para demostrar lo anterior, el anticuerpo purificado (sección 6.4.2.1) se utilizó para inmunodetectar a E2FA/B1;1 en los cultivos bacterianos inducidos, en la recombinante purificada y a GST-ZmRBR1 PC (apéndice 4, Fig. A4.C). Se detectó una sola banda correspondiente a la masa molecular de E2FA/B1;1 en el cultivo inducido (60 kDa) y la recombinante purificada que podría conservar un fragmento de

Profinity eXact™ Tag de 8.2 kDa (55 kDa). Ninguna banda fue detectada por el anticuerpo anti E2FA/B1;1 para el caso de la recombinante GST-ZmRBR1 PC por lo que concluimos que los anticuerpos purificados ya no reconocen a la proteína GST.

Una vez purificado el anticuerpo anti E2FA/B1;1 de maíz, se determinó por triplicado la interacción *in vitro* entre la región que abarca el dominio *pocket* más el carboxilo terminal de RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz utilizando los anticuerpos anti RBR1 y anti E2FA/B1;1 purificados de acuerdo a la metodología descrita en 6.4.1.3. En resumen, las proteínas se sobreexpresaron en cultivos independientes, éstos se mezclaron, lisaron e incubaron en un amortiguador en condiciones fisiológicas para purificar por afinidad a GST-RBR1 PC con una resina de glutatión-agarosa y finalmente determinar la interacción por inmunodetección en caso de que E2FA/B1;1 co-purificara con RBR1 al interactuar con ésta. En la Figura 18 A se observa que E2FA/B1;1 está presente en la elución obtenida por lo que GST-RBR1 PC se une a la resina de glutatión agarosa y E2FA/B1;1 co-eluye con RBR1 al interaccionar con ella y no mediante interacciones inespecíficas con la resina o con GST (apéndice 2, Fig. A2).



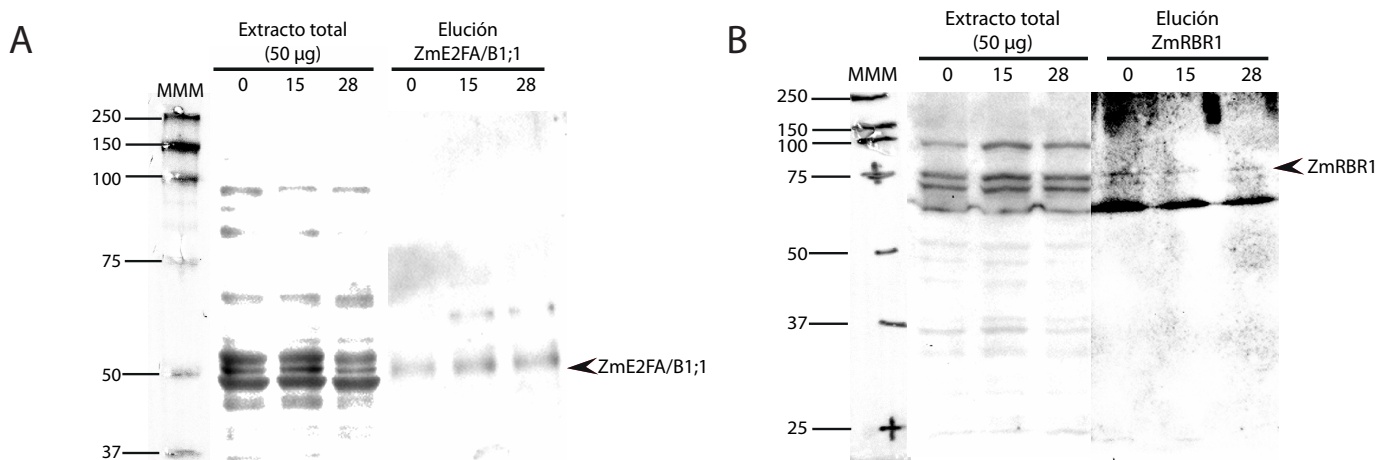
**Figura 18. Interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz.** A) E2FA/B1;1 coeluye con RBR1 al purificar a RBR1 por cromatografía de afinidad. Se muestra la inmunodetección de E2FA/B1;1 recombinante en el cultivo bacteriano inducido (I) y la recombinante purificada como controles positivos (R); se observa a E2FA/B1;1 presente en la elución (Elu) al ser co-purificada con RBR1 de la resina de glutatión-agarosa utilizando los anticuerpos anti E2FA/B1;1 de maíz purificados (55 kDa). B) Inmunodetección de RBR1 recombinante en el cultivo bacteriano inducido (I), la recombinante purificada (R) y en la elución al purificarla por afinidad utilizando la resina de glutatión-agarosa utilizando los anticuerpos anti RBR1 de maíz (91 kDa).

### 7.2.2. RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos durante la germinación de maíz

Dado que las proteínas RBR1 y E2FA/B1;1 son reguladores clave para el inicio y avance del ciclo celular, forman complejos *in vitro* y están presentes en los ejes embrionarios de maíz durante la germinación donde ocurre una reactivación metabólica global que incluye la activación del ciclo celular, resulta factible que estas proteínas formen complejos *in vivo* durante la germinación.

Para estudiar la interacción RBR1-E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz, se entrecruzaron los anticuerpos anti RBR1 de maíz validados en 7.1.3 a la proteína A acoplada a agarosa con DMP (dimetil pimelimidato), de acuerdo a la metodología descrita en 6.4.2 para determinar la presencia de los complejos RBR1-E2FA/B1;1 en extractos proteicos totales de maíz de 0, 15 y 28 h post imbibición y evitar la interferencia que generarían las inmunoglobulinas de cadena pesada (50 kDa) en la detección de E2FA/B1;1 de maíz en las eluciones (52 kDa). Durante el entrecruzamiento se tomaron muestras de cada fracción resultante: resina sin entrecruzar, fracción no unida a la resina, resina después de entrecruzar, fracción no unida a la resina y el último lavado a la resina previo a la elución de las columnas para 0, 15 o 28 h post imbibición (apéndice 5, Fig. A5). Utilizando los anticuerpos anti E2FA/B1;1 se trataron las fracciones obtenidas durante el entrecruzamiento de la proteína A-agarosa y no fue posible detectar bandas en la resina sin extracto proteico ni en la resina adicionada con extracto total de 0, 15 y 28 h post imbibición, por lo que la resina no posee proteínas unidas a ella que sean reconocidas por los anticuerpos y los extractos proteicos totales no interactúan de manera inespecífica con la resina. Las fracciones eluidas de la resina sin entrecruzar y las fracciones no unidas a la resina mostraron la banda correspondiente a las inmunoglobulinas de cadena pesada (50 kDa) para las columnas que se utilizaron para inmunoprecipitar los complejos RBR1-E2FA/B1;1 de maíz a las 0, 15 y 28 h post imbibición y corresponde a las inmunoglobulinas que aunque se unieron a la resina, no permanecieron unidas ya que no fueron entrecruzadas a ella por lo que los anticuerpos que quedaron unidos covalentemente no serían separados de la resina al eluir a los complejos RBR1-E2FA/B1;1, como se muestra en la resina eluída después del entrecruzamiento (apéndice 5, Fig. A5).

Una vez verificado el entrecruzamiento de los anticuerpos a la resina, ésta fue incubada con 1 mg de extractos proteicos totales de 0, 15 y 28 h; se observaron diversas bandas en la fracción no adsorbida y ninguna en el último lavado de la resina previo a la elución, asegurando así que las proteínas presentes en las eluciones serán las debidas a la interacción de las proteínas de los extractos proteicos totales con el anticuerpo entrecruzado a la resina y no por alguna otra (apéndice 5, Fig. A5). Posterior a los lavados de las columnas, se eluyeron las proteínas unidas a los anticuerpos anti-RBR1 y se inmunodetectaron utilizando el anticuerpo anti E2FA/B1;1. Se logró detectar una banda de 52 kDa en los extractos proteicos utilizados como control positivo en todos los tiempos estudiados y en las eluciones, por lo que E2FA/B1;1 está presente en la eluciones debido a su interacción con RBR1 endógena y esta última fue detectada con los anticuerpos correspondientes de manera específica (Fig. 19 A). De igual manera, se utilizaron los anticuerpos anti RBR1 de maíz para inmunodetectar a RBR1 tanto en las eluciones de las columnas como en los extractos proteicos totales y se observó una banda alrededor de 74 kDa correspondiente a RBR1 de maíz (Fig. 19 C). Por todo lo anterior podemos concluir que las proteínas RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos durante la germinación de ejes embrionarios de maíz al ser detectados en la eluciones obtenidas.



**Figura 19. Interacción *in vivo* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz.** A) Inmunodetección de E2FA/B1;1 en extractos totales de 0, 15 y 28 h post imbibición y en complejo con RBR1 de maíz presente en las eluciones a los mismos tiempos utilizando los anticuerpos anti E2FA/B1;1 de maíz (52 kDa). B) Inmunodetección de RBR1 de maíz presente en los extractos proteicos y en las eluciones de 0, 15 y 28 h post imbibición utilizando el anticuerpo anti RBR1 de maíz (74 kDa).

### **7.3. RBR1 se asocia a *loci* blancos de E2F importantes para la fase S del ciclo celular durante la germinación de maíz**

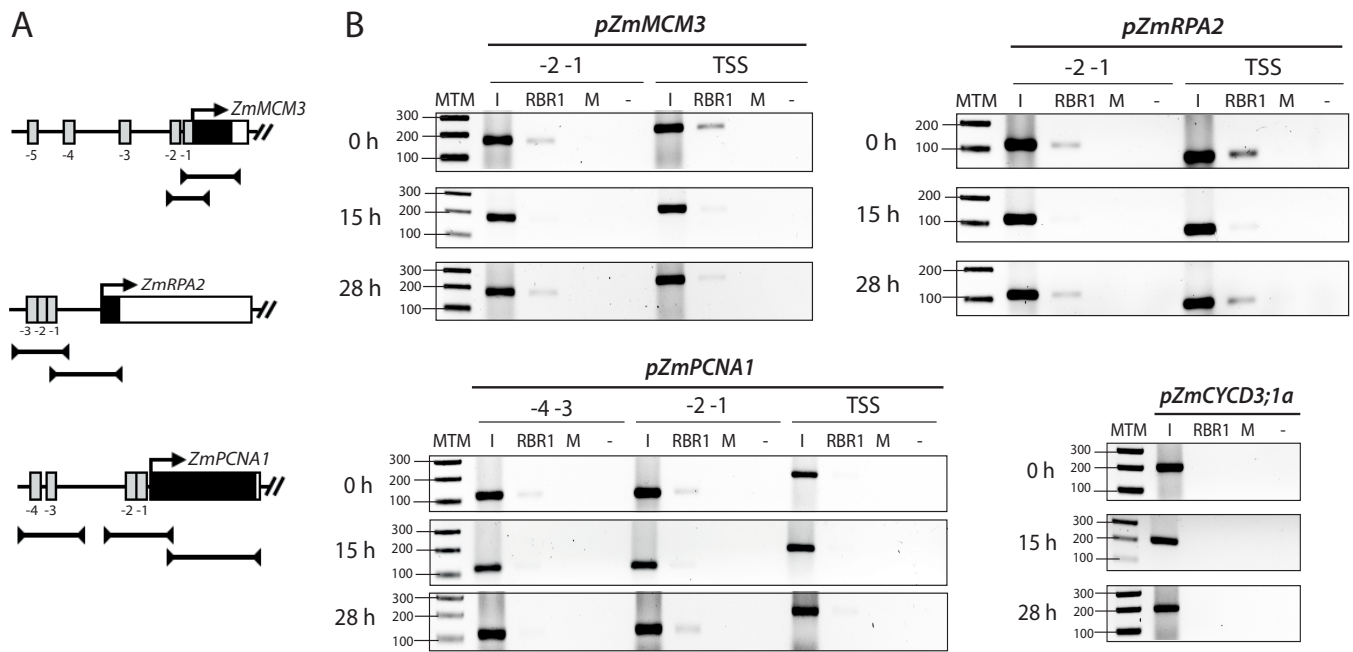
Más allá de describir la interacción RBR1-E2FA/B1;1, resulta importante conocer las funciones que estos complejos podrían estar llevando a cabo durante la germinación de maíz. Debido a que la función canónica de RBR1 durante el ciclo celular es reprimir la expresión de genes blanco de E2F, es fundamental determinar la asociación de RBR1 a genes como: *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1* importantes para la entrada a la fase S. Para que las células entren a fase S, debe llevarse a cabo el ensamble del complejo pre-replicativo en los sitios de origen de la replicación, dicho complejo reclutará a MCM3 como parte de la helicasa de DNA y separará el DNA en dos hebras sencillas para que RPA2 se una a ambas cadenas, evitando así que se formen estructuras secundarias y la DNA polimerasa  $\delta$  pueda unirse a ellas y duplicarlas. PCNA1 es el factor de procesividad de la polimerasa y permite que ésta pueda llevar a cabo ciclos catalíticos progresivos sin disociarse del DNA por lo que la expresión de estos genes y su traducción es fundamental para la entrada a la fase S del ciclo celular.

Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina asociada a RBR1 utilizando extractos nucleares de puntas de raíz de ejes embrionarios, tejido en el cual se encuentra el meristemo de raíz que posee nichos de células altamente proliferativas y que con la entrada de agua a la semilla durante la germinación reactivarán sus procesos metabólicos incluyendo al ciclo celular. Ya que RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos durante la germinación, se esperaba que RBR1 se asocie a través de E2FA/B1;1 a la secuencia consenso reconocida de manera específica por ésta y que es parte de los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1* (apéndice 6. Tabla A.6.1, Sánchez-Camargo, datos no publicados).

Para lo anterior, se germinaron semillas por 0, 15 y 28 h por triplicado, se extrajeron las puntas de raíz de los ejes embrionarios resultantes y el tejido se entrecruzó con formaldehído para fijar los complejos proteicos a las regiones de DNA a las cuales se encontrarán asociados en esos tiempos. De este tejido se obtuvieron extractos nucleares, éstos se sonicaron para obtener fragmentos de DNA de 300-800 pb adecuados para la

técnica, se incubaron con proteína A agarosa, con los anticuerpos anti RBR1 de maíz o con el suero preinmune como control negativo. Los complejos proteicos con RBR1 y el DNA asociado unidos a la resina se lavaron, se eluyeron y se desentrecruzaron para finalmente purificar el DNA presente en las eluciones de acuerdo a lo descrito en la sección 6.5. Se diseñaron cebadores específicos y se amplificaron los sitios E2F en los promotores de los genes *MCM3*, *RPA2*, *PCNA1* y al promotor de *CYCD3;1a* (apéndice 6. tabla A.6.2, Sánchez-Camargo, datos no publicados) que no contiene sitios de reconocimiento por el factor transcripcional E2F, como control negativo, utilizando el DNA purificado como templado de acuerdo a la metodología descrita en 6.5.3. Se observó que RBR1 se une a los sitios E2F presentes en los promotores estudiados al detectar los amplicones en los tamaños esperados a las 0 h, donde posiblemente las células se encuentran en G<sub>1</sub>, la asociación parece disminuir a las 15 h durante la fase S, e incrementar de nuevo a las 28 h donde las células se encontrarían ya sea en la fase de mitosis o bien en la transición hacia G<sub>1</sub> del ciclo celular (Fig. 20 B). Se utilizó el promotor del gen de *CYCD3;1a* que no contiene sitios de unión a E2F en su secuencia como control negativo y no se observó la asociación de RBR1 a esta región. Se encontró también a RBR1 asociado al sitio de inicio de la transcripción, que no posee sitios canónicos E2F en su secuencia; lo anterior podría deberse al traslape de los cebadores que amplifican esta región, con la que amplifican los sitios E2F (Fig. 20 A) o debido a la cercanía entre estas regiones (100-150 pb) donde la región ocupada de las mismas por los complejos RBR1-E2F y otras proteínas podrían abarcar más de un sitio. Se utilizaron como controles negativos al suero preinmune y a la reacción de PCR sin templado. En ninguno de los casos se observaron amplicones por lo que la interacción de RBR1 con los sitios estudiados está dada por el reconocimiento específico del anticuerpo anti RBR1 de maíz por RBR1 y el DNA asociado a 0, 15 y 28 h de imbibición y no por alguna otra razón.





**Figura 20. Asociación de RBR1 a los sitios E2F presentes en los promotores de *MCM3*, *PCNA1* y *RPA2* durante la germinación de maíz.** A. Diagrama esquemático de los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1*. Se muestran en rectángulos grises los sitios consenso reconocidos por E2F y con una flecha el sitio de inicio de la transcripción. Los segmentos inferiores indican la región que amplifican los cebadores (Sánchez-Camargo, datos no publicados). B. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos a partir de cromatina asociada a RBR1 correspondiente a la región promotora de *MCM3*, *RPA2*, *PCNA1* y *CYCD3;1a* durante 0, 15 y 28 h de imbibición determinada por ChIP-PCR. Se muestran los sitios E2F en números, el sitio de inicio de la transcripción (TSS), el marcador de tamaño molecular (MTM), input (I), cromatina asociada a RBR1 (RBR1) y al suero preinmune (M) y la reacción sin templado (-).

## 8. Discusión de resultados

### 8.1 La proteína RBR1 se expresa en extractos proteicos y durante la germinación de maíz

Todos los reguladores del ciclo celular que se han buscado a nivel de proteína se encuentran en el eje embrionario durante la germinación (García *et al.*, 2002 y 2006; Gutierrez *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008; Godínez-Palma *et al.*, 2013; Garza-Aguilar *et al.*, 2017), lo cual nos hace pensar que el ciclo celular y su reactivación durante la germinación es una compleja red de procesos bioquímicos y fisiológicos que involucra a una gran cantidad de reguladores actuando de manera sincronizada y funcionando ordenadamente en tiempo y espacio para coordinar el desarrollo adecuado de una nueva planta. Dentro de los reguladores del ciclo celular, la proteína de retinoblastoma permite el avance ordenado del ciclo al regular la actividad de los complejos heterodiméricos de factores transcripcionales E2F/DP y al ser fosforilada por complejos CDK/CYCD liberará al factor transcripcional permitiendo que se transcriban los genes cuyas funciones son requeridas para la entrada a la fase S, donde el material genético se duplica. Cuando estas funciones ya no sean requeridas, inhibirá al complejo E2F/DP inactivando nuevamente la transcripción. En general, el número de genes y proteínas de RBRs en plantas es mayor que en animales (Lendvai *et al.*, 2007; Sabelli y Larkins, 2015) y el estudiarlas se convierte en un punto de suma relevancia para conocer sus posibles funciones o si existe redundancia funcional. El genoma de maíz (*Zea mays*) posee cuatro genes RBR que pueden ser separados en dos tipos, *RBR1/RBR2* y *RBR3/RBR4* debido a la alta similitud entre sus secuencias (Sabelli y Larkins, 2006). Una hipótesis podría ser que cada una de ellas se expresa en tejidos y etapas distintas del desarrollo, llevando a cabo funciones similares; sin embargo, se ha reportado que *RBR1* se expresa de manera constitutiva durante el desarrollo de endospermo y *RBR3* está asociado a actividad mitótica; además, *RBR3* es blanco de la vía RBR1/E2F (Sabelli y Larkins, 2005) por lo que sus funciones no son redundantes y es necesario contar con anticuerpos que permitan reconocer a la proteína de interés para poder inferir su función o posibles funciones durante la germinación de maíz. RBR1 es ortólogo de Rb de humanos y controla la proliferación celular durante el desarrollo de endospermo (Sabelli y Larkins, 2005); además, se han

descrito las interacciones entre ZmRBR1 y E2Fs de distintas especies así como la regulación negativa de genes blanco de E2F a través de ZmRBR1 (Huntley *et al.*, 1998; de Jaguer *et al.*, 2001; Sabelli *et al.*, 2013). Sin embargo, no se han descrito éstas durante la germinación de maíz donde se han encontrado expresados a otros reguladores clave del ciclo celular. Con base en lo anterior, se eligió a RBR1 como candidato para el estudio de su interacción con miembros de la familia de factores transcripcionales E2F y su papel canónico como represor transcripcional marcando un primer acercamiento a las posibles funciones que podría estar llevando a cabo como regulador clave del ciclo celular durante la germinación de maíz.

Durante el presente trabajo y como paso crítico para la realización del mismo, se validaron los anticuerpos anti RBR1 de maíz generados anteriormente (Zamora-Zaragoza, datos no publicados). Utilizando la región que corresponde al péptido inmunogénico como anzuelo, se hizo un BLAST en la base de datos del genoma de maíz (Gramene.org, release 56) y se obtuvo como resultado los números de acceso que corresponden a RBR1 y RBR2 de maíz (GRMZM2G003043 y GRMZM2G153150 respectivamente), los cuales comparten un 90% de identidad en secuencia y que podrían ser productos de un evento de duplicación génica; sin embargo, los niveles de transcrito de *RBR1* superan a los de *RBR2* en embriones de maíz en una relación 2:1 (Nájera-Martínez *et al.*, 2008). Se validaron entonces los anticuerpos capaces de distinguir a RBR1 y 2 de entre el resto de los miembros de la familia de represores transcripcionales RBR de maíz, los cuales habían sido caracterizados anteriormente y que comprende de cuatro miembros (Sabelli *et al.*, 2013).

Con los anticuerpos validados anti RBR se detectó una banda de 74 kDa era RBR1 (fig. 16). El tamaño teórico esperado de RBR1 es de 96 kDa, y anteriormente se reportó su inmunodetección en extractos proteicos totales de endospermo de maíz en ese tamaño esperado, más una banda debajo de 75 kDa con una intensidad mayor (Sabelli *et al.*, 2013). En otro reporte se inmunodetectó a RBR1 en puntas de hoja de maíz en 100 kDa y también se detectaron otras bandas alrededor de 80 kDa (Huntley *et al.*, 1998). Aunque en este trabajo se lograron detectar bandas poco representadas de 100 kDa en extractos totales de puntas de hoja de maíz, éstas no desaparecieron durante los ensayos de competencia realizados y no fue posible detectarlas en extractos totales durante la germinación de

semillas de maíz, ni en extractos proteicos nucleares de ejes embrionarios de maíz donde la banda de 74 kDa fue inmunodetectada con el anticuerpo a validar y con un anticuerpo comercial anti-RBR de *Arabidopsis thaliana* de longitud completa (Fig. 17). Por lo tanto, la banda de 74 kDa puede corresponder a un producto de proteólisis de RBR1 de maíz, a pesar de haber obtenido los extractos proteicos utilizando distintos amortiguadores e inhibidores de proteasas, así como el seguimiento estricto del mismo protocolo utilizado por Huntley y sus colaboradores en 1998. Aunado a lo anterior, el anticuerpo validado reconoce al extremo carboxilo de RBR1 por lo que el fragmento faltante podría corresponder al extremo amino de la proteína y corresponde con los valores reportados para un marco de lectura abierto capaz de codificar a ZmRBR1 de 683 aminoácidos (75 kDa) (Xie *et al.*, 1998) y que conserva los dominios pocket y carboxilo terminal críticos para su función (Ramírez-Parra *et al.*, 1999), aunque se requerirán más experimentos para poder discernir de manera precisa entre estas diferencias.

## **8.2. RBR1 interacciona con E2FA/B1;1 *in vitro* e *in vivo* durante la germinación de semillas de maíz**

La función canónica de RBR como regulador negativo del ciclo celular durante la transición G<sub>1</sub>-S está basada en la interacción de RBR con el dímero de factores transcripcionales E2F/DP para formar complejos que inhiben la transcripción de genes de fase S blancos de E2F. Existen reportes en los que se ha descrito la interacción de RBR1 de maíz con E2F1 de humanos (Huntley *et al.*, 1998), E2Fa y b de *Arabidopsis thaliana* (de Jager *et al.*, 2001) y con E2F de trigo (*Triticum monococcum*) (Ramírez-Parra *et al.*, 1999) mediante ensayos de doble híbrido. En este último reporte también se realizaron ensayos de *pull down* utilizando extractos proteicos totales de trigo y dos proteínas RBR recombinantes: una que incluye los dominios *pocket* y carboxilo terminal y otra a la que le fue sustraída la región carboxilo terminal. Con estos experimentos demostraron que el dominio carboxilo de ZmRBR1 es necesario para que interactúe con TmE2F, aunque estas interacciones no han sido descritas con E2Fs de maíz.

Se caracterizó previamente a los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F/DP de maíz de los cuales *ZmE2FA/B1;1* se observó más representado en tejidos

proliferativos, mientras que durante la germinación de semillas de maíz mostró un patrón de acumulación durante su avance con un pico máximo a las 18 h, tiempo en que la mayoría de las células del eje embrionario ha entrado a la fase S del ciclo celular (Sánchez-Camargo, datos no publicados). Se estudió a E2FA/B1;1 a nivel de proteína y su abundancia no cambió o cambió muy poco durante la germinación de semillas de maíz (Suárez-Espinoza, tesis de licenciatura 2017), lo cual sugiere la existencia de otros mecanismos que podrían estar regulando su actividad más allá de la degradación proteica, como su interacción con la proteína relacionada a retinoblastoma RBR1.

La interacción *in vitro* entre RBR1 y E2FA/B1;1 de maíz se determinó mediante la sobreexpresión en cultivos independientes de las proteínas recombinantes GST-RBR1 PC (que posee los dominios *pocket* y carboxilo terminal de RBR1) y PeX-E2FA/B1;1 (que expresa a E2FA/B1;1 de longitud completa) (apéndice 1, fig. A1). La presencia de los complejos en las eluciones fue determinada por inmunodetección por western blot utilizando los anticuerpos anti-E2FA/B1;1 purificados (fig. 18) y anti RBR1 de maíz validado anteriormente (fig. 16). Nuestros resultados demuestran que E2FA/B1;1 se encuentra presente en las eluciones obtenidas por lo que forma complejos con RBR1 de maíz a través de sus dominios *pocket* y carboxilo terminal, esta interacción está dada sólo por la afinidad entre sus secuencias y no por las interacciones entre GST y E2FA/B1;1 ni de esta última con la resina utilizada (apéndice 2, fig. A2). Esta interacción, al menos *in vitro*, no había sido descrita entre RBR1 y ningún miembro de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz, en este caso E2FA/B1;1 que podría considerarse un E2F activador ya que posee características en su secuencia muy similares a E2Fs a y b, también activadores en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, más experimentos son necesarios para determinar si ZmRBR1 forma complejos con otros miembros de la familia E2F de maíz y si ZmRBR3/RBR4 podrían formar complejos con E2FA/B1;1. Por otra parte, el estudio de la bioquímica de esta interacción necesita completarse usando diferentes fragmentos de RBR1 para conocer más sobre la naturaleza de esta interacción.

Las interacciones entre proteínas tienen funciones clave en todos los procesos celulares y el caracterizarlas son un requisito para el entendimiento de estos procesos a nivel molecular y bioquímico. Una de las preguntas que surgió del estudio de la interacción *in vitro* entre RBR1

y E2FA/B1;1 de maíz fue si estas proteínas forman complejos no sólo por afinidad entre sus secuencias proteicas, sino en el contexto y ambiente celular de la germinación de semillas de maíz.

Para determinar la interacción *in vivo* entre RBR1 y E2FA/B1;1 durante la germinación de semillas de maíz se eligió como estrategia la coimmunoprecipitación de los complejos presentes en extractos proteicos totales de semillas secas y germinadas por 15 y 28 h, utilizando el anticuerpo anti-RBR1 de maíz validado previamente (Fig. 16) y entrecruzado mediante uniones covalentes a una resina para evitar de esta manera la coelución de las inmunoglobulinas de cadena pesada (50 kDa) con los complejos RBR1-E2FA/B1;1, cuya detección proporcionaría falsos positivos al tratar de inmunodetectar a E2FA/B1;1 en 52 kDa. Esta estrategia fue elegida tras llevar a cabo, bajo distintas condiciones, la coimmunoprecipitación con el anticuerpo anti-ZmE2FA/B1;1 y no conseguir la inmunoprecipitación de ninguna proteína dentro de los límites de detección por western blot.

En la Figura 19 se demuestra que RBR1 y E2FA/B1;1 coeluyen al separar a los complejos presentes en los extractos proteicos de los anticuerpos anti-RBR1 de maíz entrecruzados a la resina; ambas proteínas fueron detectadas en el tamaño esperado (74 y 52 kDa respectivamente) en los extractos totales utilizados como control positivo y en la eluciones, por lo tanto, RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos *in vivo* en la semilla seca y a las 15 y 28 h post imbibición de semillas de maíz.

Una semilla seca mantiene un metabolismo prácticamente nulo hasta que la entrada de agua provoca el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de sus procesos de desarrollo (Bewley y Black, 1994), para permitir que las células del eje embrionario se sometan a la primera ronda de división celular. Las células en los meristemas son las primeras en activarse (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003) y, en maíz, la fase S comienza alrededor de las 12 h de imbibición y la primera aparición de figuras mitóticas ocurre hacia las 24 h (Baiza *et al.*, 1989); además, tanto en maíz como en *Arabidopsis thaliana* las células en los meristemas alcanzan etapas tempranas de mitosis antes de que la radícula protruya (Baiza *et al.*, 1989; Masubelele *et al.*, 2005).

Con base en lo anterior y en los resultados obtenidos en este trabajo, RBR1 se encontró en complejo con E2FA/B1;1 en la semilla seca (0 h, G<sub>1</sub>) lo cual resulta interesante dada la virtualmente nula actividad metabólica en estas semillas. Es posible que esto represente más bien el estado metabólico de las células al momento de su desecación. La entrada de agua a la semilla provoca que las células en los tejidos del eje embrionario se reactiven y con el tiempo entren a ciclo celular. A las 15 h se esperaría que las células se encuentren en fase S, donde el material genético se duplica. A este tiempo y de acuerdo al modelo canónico, se esperaría que RBR1 fuera fosforilado por complejos activos CDK/CYCD y como consecuencia liberaran a E2FA/B1;1 para que la transactivación de sus genes blanco específicos de fase S se llevara a cabo. Sin embargo, RBR1 se mantuvo en complejo con E2F aunque no es clara la ubicación de esos complejos. A las 28 h RBR1 formó complejos con E2F probablemente debido a que algunas células podrían haber iniciado una nueva ronda de división celular y encontrarse en G<sub>1</sub>.

El hecho de que el complejo RBR1-E2FA/B1;1 aun esté presente a las 15 h post imbibición donde las células se encontrarían en la fase S del ciclo celular, podría deberse a que las células no están sincronizadas y a ese tiempo exista un *pool* de RBR1 que aún se encuentre en complejo con E2FA/B1;1, o bien existan otros mecanismos que regulen al complejo RBR1-E2FA/B1;1 como: a) la ubicación de los complejos en *loci* celulares diferentes en la cromatina, en donde la regulación por fosforilación tendría lugar, b) el complejo RBR1-E2FA/B1;1 posea otras funciones específicas durante la fase S o c) que la activación de los genes blanco de E2F específicos de fase S se pueda llevar a cabo mediante un mecanismo independiente de la interacción con RBR1.

Para apoyar estas especulaciones, existen reportes sobre la formación de complejos RBR-E2F *in vivo* durante la proliferación celular en hojas de *Arabidopsis thaliana* donde se observó que RBR se encuentra en complejo con E2FA cuando la mayoría de las células proliferan y con E2FB cuando comienzan a diferenciarse. En líneas sobreexpresantes de CYCD3;1 se incrementa la abundancia de los complejos RBR-E2FA y disminuye la de los complejos RBR-E2FB; además, no es posible detectar la fosforilación por CDK-CYC en los residuos Ser807/811 de RBR al encontrarse en asociación con E2FA. En resumen, RBR al ser fosforilado, libera a E2FB y promueve la proliferación, mientras que E2FA permanece

asociado a RBR y mantiene los meristemas al reprimir la diferenciación celular (Magyar *et al.*, 2012).

Se ha descrito que la función de la proteína TOR1 se encuentra río arriba o en paralelo de la vía RBR1-E2F en la estimulación del ciclo celular. En respuesta a glucosa, TOR1 fosforila el extremo amino de E2FA, lo cual resulta en su activación y la entrada a la fase S en el meristemo de raíz quiescente, aunque no estudiaron la presencia de RBR en complejo con E2FA (Xiong *et al.*, 2013). Además, mediante estudios computacionales, se encontró que el 95% de los genes blanco de E2Fa putativos en *Arabidopsis* coinciden con los genes activados por la vía TOR1-glucosa por lo que E2Fa es sustrato de la cinasa TOR1 y ésta controla la proliferación celular a través del factor transcripcional E2F, lo cual rompe el concepto de la regulación del ciclo celular basada en la cascada conservada CDK-CYC-RBR-E2F. La conexión directa TOR-E2F provee una entrada al ciclo celular alternativa a través de señalización por glucosa en los meristemas de otros órganos y en otros eucariotes.

En el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* el homólogo de RBR, MAT3, al ser fosforilado permanece unido al heterodímero E2F1/DP durante todas las fases del ciclo celular al formar un complejo ternario con la cromatina. El estado de fosforilación podría cambiar las interacciones de este complejo ternario con otras proteínas efectoras para reprimir o activar la progresión del ciclo celular (Olson *et al.*, 2010).

En células animales, el daño al DNA promueve la formación estable del complejo Rb-E2F1 en células proliferativas y estos complejos son detectables incluso cuando Rb se encuentra fosforilado (Iannari *et al.*, 2009). En otro estudio, el daño al DNA promueve la monofosforilación de Rb y lo activa para regular la transcripción y en células sanas, Rb es monofosforilado en G<sub>1</sub> temprana por complejos activos Cdk4/6-CycD y es capaz de interactuar con E2F1-4; en G<sub>1</sub> tardía es hiperfosforilado por Cdk2-CycE y mantiene este estado durante las fases S, G<sub>2</sub> y M; sin embargo, su interacción con E2F no fue estudiada (Narasimha *et al.*, 2014).

Debido al alto grado de conservación de estas proteínas en distintos reinos, sería de



esperarse que la regulación de los complejos RBR/E2F mantuviera algunas similitudes en maíz. Con base en los estudios realizados en nuestro laboratorio, sabemos por aproximaciones *in vitro* que RBR1 es fosforilada al menos en la región carboxilo por diferentes complejos de CDKA con CYCsD (CYCD2;2, CYCD4;2, CYCD5;3 y CYCD6;1) (Godínez-Palma *et al.*, 2017) pero serán necesarios más experimentos para determinar el estado de fosforilación de RBR1 en complejo con E2FA/B1;1 a los tiempos estudiados, así como su interacción con otros miembros de la familia de factores transcripcionales E2F y otras proteínas para saber más sobre la naturaleza de esta interacción y su relevancia fisiológica durante la germinación de maíz.

### **8.3. RBR1 se asocia temporalmente a los promotores de los genes blanco de E2F importantes para la fase S del ciclo celular durante la germinación de maíz**

La vía RBR/E2F juega un papel crucial en la regulación de la expresión génica tanto en células proliferativas como en células diferenciadas. Los sitios de unión al DNA de la proteína E2F contienen a la secuencia consenso TTT(C/G)(C/G)CGC y están presentes en los promotores de genes cuyas funciones son requeridas para la proliferación celular y están conservados en genes de plantas (Albani *et al.*, 2000; Magyar *et al.*, 2000; Ramírez-Parra y Gutierrez, 2000; Kosugui y Ohashi, 2002b). La represión de los genes blanco de E2F ocurre, posiblemente y no exclusivamente, mediante el enmascaramiento del dominio de transactivación de E2F al interactuar con RBR y/o mediante el reclutamiento de factores remodeladores de la cromatina.

Más allá de la interacción entre RBR1 y E2FA/B1;1 y de si estos complejos están presentes durante la germinación de semillas de maíz, resulta importante saber si RBR1 se encuentra unido a promotores de genes blanco de E2F específicos de fase S en su papel como represor transcripcional. Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina asociada a RBR1 presentados en este trabajo (Fig. 20) muestran que en la semilla seca RBR1 se encuentra unido a los sitios E2F de los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1*; a su vez se encontró asociado al sitio de inicio de la transcripción, el cual no posee sitios de unión a E2F consenso. Estas asociaciones disminuyen a las 15 h y son visibles de nuevo a las 28 h por lo que RBR1 modifica su interacción con estos sitios durante la germinación de maíz. Las

regiones promotoras de los genes que se estudiaron contienen más de un sitio de unión a E2F en su secuencia y la cercanía entre ellos no permite el diseño de cebadores que permita amplificarlos de manera independiente, de igual manera la cercanía entre estos sitios y el sitio de inicio de la transcripción provoca el traslape de los cebadores diseñados para amplificarlos (Fig. 20 A) y ocasiona que el sitio de inicio de la transcripción sea amplificado a pesar de no tener un sitio E2F en su secuencia. Aunado a esto, al sonicar la cromatina se obtuvieron fragmentos de 300-700 pb de tamaño correspondientes a lo recomendado para la técnica, que podrían contener a RBR1 unido a otros sitios presentes en los fragmentos aumentando así la posibilidad de su amplificación.

Cualquiera que fuera el caso, RBR1 está unido a los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1* muy probablemente a través de E2F en la semilla seca cuando las células se encuentran en G<sub>1</sub> y RBR1 podría estar reprimiendo su transcripción, ya que su expresión no es requerida sino hasta la fase G1 avanzada. Conforme la germinación avanza y debido a que las células no están sincronizadas, esta asociación disminuye más no desaparece a las 15 h cuando algunas de las células podrían haber iniciado la replicación del material genético en la fase S, mientras que otras probablemente permanecen en G<sub>1</sub>. La expresión de estos genes es crítica para el avance del ciclo celular y RBR1, al liberar a E2F permite su expresión. A las 28 h la asociación parece incrementar de nuevo cuando ha iniciado la mitosis y algunas células han comenzado una nueva ronda de división celular (salida a G<sub>1</sub>).

A las 15 h (Fig. 20 B) RBR1 liberaría al dímero de factores transcripcionales E2F/DP, probablemente E2FA/B1;1, debido a su fosforilación en múltiples sitios por complejos activos CDK/CYC. Aunque durante la germinación la formación de los complejos proteicos RBR1/E2FA/B1;1 no cambie (Fig. 19), su asociación podría disminuir al menos para los complejos ubicados en los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1*.

En un reporte en callos transgénicos de maíz donde RBR1 está inhibido, los niveles de mensajero de *RBR3*, el cual posee cuatro sitios E2F en su promotor, parecen estar controlados por RBR1 a través de la actividad de E2F/DP (Sabelli *et al.*, 2005), aunque sólo demuestran la interacción *in vitro* de un solo miembro de la familia E2F de maíz, E2F1. En una línea transgénica de maíz que regula negativamente a RBR1 en endospermo en

desarrollo mediante RNAi, los genes *RBR3*, *MCM2-7* y *PCNA* son regulados positivamente (Sabelli *et al.*, 2013) lo que sugiere de manera indirecta que la ausencia de RBR1 permite la expresión de estos genes al no interactuar con E2F/DP e inhibirlos.

En células de tabaco, la expresión del gen que codifica para la proteína viral WDV Rep A (*wheat dwarf virus replication associated protein*) estimula la división celular, ya que al interactuar con ZmRBR1 lo inactiva y permite la expresión de los genes blanco de E2F. Por otro lado, la expresión de *RBR1* inhibe la división celular al reprimir la expresión de los genes de fase S (Gordon-Kamm *et al.*, 2002). En una línea transgénica de tabaco en la cual RBR es regulado negativamente, se determinó mediante PCR semicuantitativo que la transcripción de genes blanco de E2F como *RNR*, *PCNA*, *MCM* y *CDC6* (Chabouté *et al.*, 2000; Egelkrout *et al.*, 2002; de Jager *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2002) se incrementa, lo cual es un indicativo de la liberación de E2F de la represión transcripcional mediada por RBR que probablemente lleva al inicio de la replicación del DNA y la progresión del ciclo celular.

Debido al alto grado de conservación de RBR y E2F en eucariotes, así como de otras proteínas reguladoras del ciclo celular como CDKs, CYCs entre otras, sería de esperarse que la regulación de los complejos RBR/E2F y su asociación a promotores de genes de fase S sea similar en maíz. RBR1 y E2FA/B1;1 forman complejos *in vitro* y son aparentemente constantes durante la germinación de ejes embrionarios de maíz; por otra parte, RBR1 se asocia a los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1* blanco de E2F y su asociación cambia durante la germinación, por lo que deben existir otros mecanismos mediante los cuales se regule la formación de estos complejos y sus funciones durante la germinación como la ubicación de los complejos en *loci* celulares diferentes en la cromatina, en donde la regulación por fosforilación tendría lugar o el complejo posea otras funciones específicas durante la fase S, entre otros. Cualquiera que sea el caso, más estudios serán necesarios para dilucidar de manera precisa la manera en la que el complejo RBR1-E2FA/B1;1 se regula durante la germinación, y si la asociación de RBR1 a los *loci* estudiados en el presente trabajo ocurre a través de E2FA/B1;1 o algún otro miembro de la familia de factores transcripcionales E2F de maíz.

## 9. Conclusiones

Con los resultados de este trabajo se estableció el primer estudio sobre la función de RBR1 como regulador del ciclo celular durante la germinación de maíz.

Se validaron los anticuerpos anti-RBR1 de maíz que habían sido generados anteriormente capaces de reconocer a las proteínas RBR1 y 2 de maíz de manera específica. Con estos anticuerpos fue posible identificar a RBR1 en tejidos proliferativos como los ejes embrionarios de semillas de maíz, en tejidos diferenciados como punta de hojas de maíz y extractos nucleares de ejes embrionarios de maíz por lo que RBR1 es una proteína nuclear con funciones durante la proliferación y diferenciación celular.

La formación de los complejos RBR1/E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz es regulada posiblemente de forma distinta a la fosforilación canónica de RBR por complejos CDK/CYC ya que la presencia de estos complejos no cambia durante la germinación de semillas de maíz. Serán necesarios experimentos adicionales para conocer el estado de fosforilación de RBR1 y E2FA/B1;1 y conocer mejor el papel de esta interacción durante la germinación y su relevancia fisiológica en la progresión ordenada del ciclo celular.

La ocupación de los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1* por RBR1 cambia con el avance del ciclo celular durante la germinación de semillas de maíz. Esta es la primera evidencia que se tiene sobre el papel de RBR1 en ejes embrionarios de maíz durante la germinación en su papel canónico como represor transcripcional de los genes blanco de E2F, posiblemente E2FA/B1;1, durante la transición G<sub>1</sub>-S del ciclo celular. Al menos para los genes estudiados en el presente trabajo, RBR1 ocupa la región promotora en la semilla seca cuando las células se encuentran en G<sub>1</sub> del ciclo celular, a las 15 h post germinación ésta asociación disminuye cuando las células se encontrarían en fase S y a las 28 h incrementa con el inicio de un nuevo ciclo. De igual manera, más experimentos serán necesarios para conocer con exactitud las asociaciones en estos promotores con los distintos miembros de la familia de factores transcripcionales E2F *in vivo* así como el estudio de otros genes importantes para la transición G<sub>1</sub>-S.

## 10. Perspectivas

En este trabajo, se abrieron algunas vertientes para continuar esclareciendo las funciones de RBR1 como represor transcripcional y la regulación de los complejos RBR1/E2FA/B1;1 durante la germinación. En primera instancia, determinar el estado de fosforilación de RBR1 en complejo con E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz mediante geles Phos-Tag<sup>TM</sup> y western blot o por inmunodetección utilizando anticuerpos comerciales que reconozcan distintas fosforilaciones en RBR. Además, realizar los ensayos de interacción tanto *in vitro* como *in vivo* de RBR1 y E2FC, un E2F que comparte características en su secuencia similares a los E2F represores de *Arabidopsis thaliana*, así como los ensayos de fosforilación de RBR1; de esta manera podrían compararse con los resultados obtenidos en el presente trabajo y conocer la especificidad en cuanto a la formación de complejos y la regulación de ellos durante la germinación. De igual manera, sería relevante la generación de anticuerpos que reconozcan a RBR3 y 4 para llevar a cabo estos mismos experimentos ya que a pesar de la gran conservación de los mecanismos y proteínas reguladoras del ciclo, las plantas poseen un mayor número de genes y miembros de las diferentes familias que participan en el ciclo celular, razón por la cual conocerlas individualmente se convierte en un punto de suma relevancia para resolver preguntas puntuales sobre las funciones que podrían estar realizando o si existe redundancia funcional.

Ya que RBR1 se une a los promotores de distintos genes a través de E2F, para determinar si es a través de E2FA/B1;1 se deberá hacer el experimento contrario, donde se inmunoprecipite la cromatina asociada a E2FA/B1;1 y se busquen los mismos sitios para colocar a ambas proteínas en el mismo tiempo y espacio, así como a otros miembros de ambas familias. Además, sería recomendable realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina utilizando anticuerpos comerciales que reconozcan marcas de histonas, ya sean activadoras o represoras, mediante inmunoprecipitación utilizando extractos proteicos y así determinar la presencia también de otras proteínas remodeladoras de la cromatina como histonas desacetilasas, proteínas del complejo remodelador de nucleosomas y otras proteínas que pudieran ser reclutadas por RBR como represor transcripcional y conectar así la vía RBR-E2F/DP con el control epigenético.

## 11. Referencias

**Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P.C., Grissem, W.** (1997) RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein, *Mol. Cell.Biol.* 17: 5077–5086.

**Ach, R.A., Taranto, P., Grissem, W.** (1997b) Conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *Plant Cell* 9, 1595–1606

**Albani, D., Mariconti, L., Ricagno, S., Pitto, L., Moroni, C., Helin, K., Cella, R.** (2000) DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Dacus carota*. *J. Biol. Chem.* 275: 19258-19267.

**Attucci, S., Carde, J.P., Raymond, P., Saint Gès, V., Spiteri, A., Pradet, A.** (1991) Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiol.* 95:390-398.

**Ashizawa, S., Nishizawa, H., Yamada, M., Higashi, H., Kondo, T., Ozawa, H., Hatakeyama, M.** (2001). Collective inhibition of pRB family proteins by phosphorylation in cells with p16INK4a loss or cyclin E overexpression. *J Biol Chem*, 276 (14), 11362-11370.

**Baíza, A. M., Vázquez-Ramos, J. M., Sánchez de Jiménez, E.** (1989) DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *Plant Physiol.* 135:416-421.

**Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G., Aalena, R. B.** (2001) The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.* 29, 4319–4333

**Beadle, G.W.** (1939) Teosinte and the origin of maize. *J. Hered.* 30:245–247.

**Bewley, J.D., Marcus, A.** (1990) Gene expression in seed development and germination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 38: 165-193.

**Bewley, J.D., Black, M.** (1994) Seeds: Physiology of development and germination. 2nd ed. New York Press.

**Bewley, J.D.** (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* 9: 1055-1066.

**Black, M., Bewley, J.D., Halmer, P.** (2006) The Encyclopedia of Seeds: Technology and Uses. *UK: Cromwell Press.*

**Boehmelt, G., Ulrich, E., Kurzbauer, R., Mellitzer, G., Bird, A., Zenke, M.** (1994) Structure and expression of the chicken retinoblastoma gene. *Cell Growth Differ*, 5, 221-230.

**Borghi, L., Gutzat, R., Fütterer, J., Laizet, Y., Hennig, L., Grissem, W.** (2010). Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *Plant Cell* 22: 1792–1811.

**Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A. and Helin, K.** (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29: 409–417.

- Bradford, Marion M.** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., Kouzarides, T.** (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597–601.
- Burke, J.R., Deshong, A.J., Pelton, J.G., Rubin, S. M.** (2010) Phosphorilation-induced conformational changes in the retinoblastoma protein inhibit E2F transactivation domain binding. *J. Biol. Chem.* 285, 16286-16293.
- Burke, J.R., Hura, G.L., Rubin, S.M.** (2012) Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. *Genes Dev.* 26, 1156-1166.
- Burkhart, D. L., Sage, J.** (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 8 (9), 671-682.
- Calbo, J., Parreno, M., Sotillo, E., Yong, T., Mazo, A., Garriga, J., Grana, X.** (2002). G1 cyclin/cyclin-dependent kinase-coordinated phosphorylation of endogenous pocket proteins differentially regulates their interactions with E2F4 and E2F1 and gene expression. *J Biol Chem*, 277 (52), 50263-50274.
- Cam, H., Dynlacht, B.D.** (2003) Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell*, 3, 311-316.
- Castano, E., Kleyner, Y., Dynlacht, B. D.** (1998) Dual cyclin-binding domains are required for p107 to function as a kinase inhibitor, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 5380–5391.
- Castellano, M.M., del Pozo, J.C., Ramirez-Parra, E., Brown, S., Gutierrez, C.** (2001) Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreplication. *Plant Cell* 13: 2671–2686.
- Chabouté M.-E., Clement, B., Sekine, M., Philipps, G. and Chaubet-Gigot, N.** (2000) Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotidreductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell.* 12, 1987–2000.
- Chen, P.L., Riley, D.J. and Lee, W.H.** (1995) The retinoblastoma protein as a fundamental mediator of growth and differentiation signals. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 5, 79-95.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., et al.** (2005) Characterization of E2F8, a novel E2F like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Research.* 33:5458–5470.
- Classon, M., Dyson, N.** (2001) p107 and p130, versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 264, 135–147.
- Classon, M., Harlow, E.** (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 910–917.
- Claudio, P.P., Tonini, T., Giordano, A.** (2002) The retinoblastoma family: twins or distant cousins?, *Genome Biol* 3, reviews 3012.1–3012.9.
- Cobrinik, D., Lee, M.H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R.A., Jacks, T.** (1996) Shared role of the pRB- related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* 10:1633–44.

- Cobrinik, D.** (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24 (17), 2796-2809.
- Coe, E. H.** (2001) The origins of maize genetics. *Nature Rev. Genet.* 2: 898-905,
- Comai, L., Harada, J.J.** (1990) Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of transition from embryogeny to germination. *Proc Natl. Acad sci U.S.A.*. 87:2671-2674.
- Conger, B.V., Carabia, J.V.** (1976) Microspectrophotometric determination of the 2c and 4c nuclear component in the root and shoot of the dormant maize embryo. *Environm. Experimen. Bot.* 16:171-175.
- Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Blilou, I., Grieneisen, V. A., Sozzani, R., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., Caballero-Pérez, J., Horvath, B., Long, Y., Mähönen, A. P., Zhang, H., Xu, J., Murray, J. A. H., Benfey, P. N., Bako, L., Marée, A. F. M., Scheres, B.** (2012) A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150: 1002-1015.
- Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Wachsman, G., Du, Y., Arteága-Vázquez, M., Zhang, H., Benjamins, R., Blilou, I., Neef, A., Chandler, V., Scheres, B.** (2013) A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the Arabidopsis root stem cell organizer. *PLOS Biol.* 11 (11): e1001724.
- Dahl, M., Meskiene, I., Bogre, L., Ha, D., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H., Heberle-Bors, E.** (1995) The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle, *Plant Cell* 7: 1847–1857.
- Dannenbergh, J. H., Schuijff, L., Dekker, M., van der Valk, M., te Riele, H.** (2004). Tissue-specific tumor supresor activity of retinoblastoma gene homologs p107 and p130. *Genes Dev.*: 18: 2952-62.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., Leone, G.** (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* 278: 42041-42049.
- de Jager, S.M., Menges, M., Bauer, U.M., Murray, J.A.** (2001) Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene *AtCDC6* and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol Biol* 47: 555–568.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., Gutierrez, C.** (2002) Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(*AtSKP2*) pathway in response to light. *Plant Cell* 14: 3057–3071
- Deltour, R., Jaqmard, A.** (1974) Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays*. *Annals of Botany.* 38: 329-334.
- Deltour, R.** (1985) Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. *J. Cell Sci.* 75: 43-83.
- Destree, O.H., Lam, K.T., Peterson-Maduro, L.J., Eizema, K., Diller, L., Gryka, M.A., Frebourg, T., Shibuya, E. and Friend, S.H.** (1992) Structure and expression of the *Xenopus* retinoblastoma gene. *Dev Biol*, 153, 141-149.



- Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N.H., Gutierrez, C.** (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol* 140:67–80.
- De Veylder, L., De Almeida Engler, J., Burssens, S., Manevski, A., Lesucere, B., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D.** (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta*. 208: 453-462.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Engler, J.D., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van der Schueren, E., Jacquard, A., Engler, G., Inze, D.** (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor, *EMBO J.* 21:360–1368.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Inze, D.** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:655–665.
- De Veylder, L., Berckmans, B.** (2009) Transcriptional control of the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol.* 12:599-605.
- Dick, F.A., Rubin, S.M.** (2013) Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews.* 14: 297-306.
- Dominguez, D., Tsai, Y., Weatheritt, R., Wang, Y., Blencowe, B., Wang, Z.** (2016) An extensive program of periodic alternative splicing linked to cell cycle progression. *eLIFE* 5:e10288.
- Doonan, J., Hunt, T.** (1996) Why don't plants get cancer? *Nature.* 380: 481-482
- Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A., Weinberg, R.A.** (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73: 499–511.
- Du, W., Vidal, M., Xie, J.E., Dyson, N.** (1996) RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev*, 10: 1206-1218.
- Durfee, T., Feiler, H.S., Gruissem, W.** (2000) Retinoblastoma-related proteins in plants: homologues or orthologues of their metazoan counterparts? *Plant Mol Biol*, 43, 635-642.
- Durfee, T., Feiler, H.S., Gruissem, W.** (2000) Retinoblastoma-related proteins in plants: Homologues or orthologues of their metazoan counterparts? *Plant Mol Biol* 43:635–642.
- Dyson, N., Buchkovich, K., Whyte, P., Harlow, E.** (1989). The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell*, 58 (2), 249-255.
- Dyson, N.** (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245-2262.
- Ebel, C., Mariconti, L., Gruissem, W.** (2004) Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* 429: 776–780.
- Egelkrout, E. M., Mariconti, L., Settlege, S.B., Cella, R., Robertson, D., Hanley-Bowdoin, L.** (2002) Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell.* 14:3224-3236.
- Ehrenshaft, M., Brambl, R.** (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiol.* 93: 295-304.

- Ewen, M.E., Xing, Y.G., Lawrence, J.B. y Livingston, D.M.** (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*, 66, 1155-1164.
- Falls, H.F.** (1951) The role of heredity in ophthalmology. *N Y State J Med*, 51, 2624-2627.
- Falls, H.F., Neel, J.V.** (1951) Genetics of retinoblastoma. *AMA Arch Ophthalmol*, 46, 367-389.
- Farkas, T., Hansen, K., Holm, K., Lukas, J., Bartek, J.** (2002). Distinct phosphorylation events regulate p130- and p107-mediated repression of E2F-4. *J Biol Chem*, 277 (30), 26741-26752.
- Florescano, E.** (2003) Imágenes y significados del dios del maíz. En: Esteva. G y C.Marielle (eds.) Sin maíz no hay país. CONACULTA. México, D.F. pp. 36-55.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., et al.** (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643–646.
- Frolov, M., Dyson, N.** (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci.*117: 2173-2181.
- García, E., Laquel, P., Castroviejo, M., Plasencia, J., Vázquez-Ramos, J.M.** (2002) Maize replicative alpha-type DNA polymerase: separation of polymerase and primase activities and recognition of primase subunits. *Physiol Plant* 114:533-539.
- García, E., Quiroz, F., Uchiyama, Y., Sakaguchi, K., Vázquez-Ramos, J.M.** (2006) Expression of a maize  $\delta$ -type DNA polymerase during seed germination. *Physiol Plant* 127: 268-276.
- Garza-Aguilar, S. M., Lara-Núñez, A., García-Ramírez, E., Vázquez-Ramos, J.** (2017) Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physiologia Plantarum*. 160: 84-97.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.** (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press pp. 571-607
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D., Grandjean, O.** (2001) Mutations in like heterochromatin protein 1 affect flowering time and plant architecture in Arabidopsis. *Development* 128, 4847–4858
- Gaut, B. S., Doebley, J. F.** (1997) DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc Nat Acad Sci USA*. 94: 6809–6814.
- Godínez-Palma, S.K., García, E., Sánchez M. de L., Rosas, F., Vázquez-Ramos, J.M.** (2013) Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J Exp Bot* 64(18):5661-5671.
- Godínez-Palma, S. K., Rosas-Bringas, F. R., Rosas-Bringas, O. M., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J., Vázquez-Ramos, J.** (2017) Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D-cyclin-dependent kinase complexes. *J Exp Bot*. 68,7:1585-1597.

**Gordon-Kamm, W., Dilkes, B.P., Lowe, K., Hoerster, G., Sun, X., Ross, M., Church, L., Bunde, C., Farrell, J., Hill, P., Maddock, S., Snyder, J., Sykes, L., Li, Z., Woo, Y. M., Bidney, D., Larkins, B. A.** (2002) Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Proc Nat Acad Sci USA*: 99 (18): 11975-80.

**Gordon, G., Du, W.** (2011) Conserved RB functions in development and tumor suppression. *Prot Cell* 2, 11: 864-878.

**Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R., Kaelin, W.G.** (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8962–8967.

**Gruissem, W.** (2007) Function of the retinoblastoma-related protein in plants. In: Inze D, ed, Cell cycle control and plant development. *Oxford: Blackwell Scientific*, pp 164–186.

**Gutierrez, R., Quiroz-Figueroa, F., Vázquez-Ramos, J.M.** (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiol* 17:139-148.

**Gutierrez, C.** (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat Cell Biol* 7:535–541.

**Gutierrez, C.** (2009) The Arabidopsis cell division cycle. In: *The Arabidopsis Book* 7, e0120.

**Gutzat, R., Borghi, L., Gruissem, W.** (2012) Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci.* 3: 1360-1385.

**Harashima, H., Dissmeyer, N., Schnittger, A.** (2013) Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol* 23,7: 345-356.

**Harlow, E., Whyte, P., Franza, B. R., Jr., Schley, C.** (1986). Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol Cell Biol*, 6 (5), 1579-1589.

**Hassler, M., Singh, S., Yue, W.W., Luczynski, M., Lakbir, R., Sanchez-Sanchez, F., Bader, T., Pearl, H.L., Mitnacht, S.** (2007) Crystal structure of the retinoblastoma protein N domain provides insight into tumor suppression, ligand interaction, and holoprotein architecture. *Mol. Cell* 28, 371–385.

**Helin, K., Lees, A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E., Fattaey, A.** (1992) A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell.* 70: 337–350.

**Helin, K., Wu, C.L., Fattaey, A.R., Lees, J.A., Dynlacht, B.D., Ngwu, C., Harlow, E.** (1993) Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* 7: 1850–1861.

**Hickman, E.S., Moroni, M.C., Helin, K.** (2002) The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12, 60–66.

**Hiebert, S., Chellapan S., Horowitz, J., Nevins, J.** (1991) The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* 6:177-185.

**Horvath, B. M., Kourova, H., Nagy, S., Nemeth, E., Magyar, Z., Papdi, C., Ahmad, Z., Sanchez-Perez, G. F., Perilli, S., Blilou, I., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Meszaros, T., Binarova, P.,**

- Bogre, L., Scheres, B.** (2017) Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J.* 10.15252/embj.201694561.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutierrez, C., Doonan, J. H., Murray, J.A.H.** (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* 37, 155–169.
- Huppi, K., Siwarski, D., Mock, B.A., Dosik, J., Hamel, P.A.** (1996) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the mouse p107 gene. *Mamm Genome*, 7, 353-355.
- Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., Lees, J.A.** (2009) Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor supresor protein. *Cancer Cell.* 15: 184-194.
- Iltis, H. H.** (1983) From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science* 222, 886–894.
- Inzé, D., De Veylder, L.,** (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu Rev Plant Biol.* 40:77-105.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., Weinberg, R.A.** (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*; 359:295–300.
- Jakoby, M., Schnittger, A.** (2004) Cell cycle and differentiation. *Curr Opini in Plant Biol*, 7: 661-669.
- Johnston, A.J., Matveeva, E., Kirioukhova, O., Grossniklaus, U., Grisse, W.** (2008) A dynamic reciprocal RBR-PRC2 regulatory circuit controls Arabidopsis gametophyte development. *Current Biol* 18, 1680–1686.
- Joralemon, P.D.** (1971) A study of Olmec Iconography. Dumbarton Oaks, Trustees for Harvard University. Studies in Pre-Columbian Art and archeology, Num. 7. Washington, D.C.
- Jullien, P.E., Mosquna, A., Ingouff, M., Sakata, T., Ohad, N., Berger, F.** (2008) Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in Arabidopsis. *PLoS Biology* 6, e194.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., Sherr, C.J.** (1993) Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase, CDK4. *Genes Dev* 7, 331–342.
- Kim, H., Cho, Y.** (1997) Structural similarity between the pocket region of retinoblastoma tumour suppressor and the cyclin-box. *Nature Struct Biol.* 4: 390-395.
- Kim, H., Ahn, B., Cho, Y.** (2001) Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen. *EMBO J.* 20. 295-304.
- Kitagawa, M., Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Segawa, K., Hanks, S.K., Taya, Y., Nishimura, S., Okuyama, A.** (1995) Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene.* 2:229-236
- Knudson, A.G., Jr.** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68, 820-823.

- Kong, L.J., Orozco, B.M., Roe, J.L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H.S., Durfee, T., Miller, A.B., Grisse, W., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L.** (2000) A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J*, 19: 3485-3495.
- Kosugi, S., Ohashi, Y.** (2002a) E2Fs, E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *J of Biol Chem*. 277: 16553-16558.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y.** (2002b) E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J*. 29: 45–59.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y.** (2002c) Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol*. 28: 833-843.
- Lara-Núñez, A., de Jesús, N., Vázquez-Ramos, J.** (2008) Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plantarum*, 132: 79-88.
- Lee, W.H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y. and Lee, E.Y.** (1987) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*, 235, 1394-1399.
- Lee, W.H., Shew, J.Y., Hong, F.D., Sery, T.W., Donoso, L.A., Young, L.J., Bookstein, R. and Lee, E.Y.** (1987b) The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*, 329, 642-645.
- Lee, M.H., Williams, B.O., Mulligan, G., Mukai, S., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., Jacks, T.** (1996) Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev*; 10:1621–32.
- Lee, J.O., Russo, A.A., Pavletich, N.** (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 391, 859-865.
- Lendvai, A., Pettkó-Szandtner, A., Csordás-Tóth, É., MiskolcziGábor , P., Horváth, V., Györgyey, J., Dudits, D.** (2007) Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot*, 58,7:1663-1675.
- Li, J., Hu, P.P., Shen, X., Yu, Y., Wang, X.** (1997) E2F4-RB and E2F4-p107 complexes suppress gene expression by transforming growth factor  $\beta$  through E2F binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 4948-4953.
- Lindeman, G.J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B., Livingston, D.M.** (1998) A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev*. 12: 1092–1098
- Lipinski, M.M., Jacks, T.** (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18, 7873–7882.
- Livingston, D.M., Kaelin, W., Chittenden, T., Qin, X.** (1993) Structural and functional contributions to the G1 blocking action of the retinoblastoma protein. *Br J Cancer* 68, 264–268.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M., P., Zipursky, L., Darnell, J.** (2006) *Molecular Cell Biol*, 5th edition, WH Freeman, pp 854.
- Lu, X. and Horvitz, H.R.** (1998) lin-35 and lin-53, two genes that antagonize a *C. elegans* Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48. *Cell*, 95, 981-991.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., Helin, K.** (1996) Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular Cell Biol*. 16: 1047–1057
- Luo, R.X., Postigo, A.A., Dean, D.C.** (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463–473.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D., Harel-Bellan, A.** (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*, 391, 601-605.
- Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S. and Inzé, D.** (2000) Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 486: 79–87.
- Magyar, Z., Horvath, B., Khan, S., Mohammed, B., Henriques, R., De Veylder, L., Bako, L., Scheres, B., Boegre, L.** (2012) *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J* 31, 1480–1493.
- Magyar, Z., Ito, M., Binarová, P., Mohamed, B., Laszlo, B.,** (2013). Cell Cycle Modules in Plants for Entry into Proliferation and for Mitosis, *Plant Genome Div. 2*: 77-92.
- Mangelsdorf, P. C., Reeves, R.G.** (1938) The origin of maize. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24: 303–312.
- Masubelele, N.H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., Nieuwland, J., Scofield, S., Murray, J.A.H.** (2005) D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15694–15699.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez-Gonzalez, J., Buckler, E., Doebley, J.** (2001) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA* . 99: 6080–6084.
- Mayol, X., Grana, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q. y Giordano, A.** (1993) Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (Rb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene*, 8, 2561-2566.
- Meijer, M., Murray, J.A.** (2000) The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* 43:621–33.
- Meloni, A.R., Smith, E.J., Nevins, J.R.** (1999) A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9574–9579.

- Meyerowitz, E. M.** (2002) Plants compared to animals: the broader comparative study of development. *Science*, 295: 1482-1485.
- Mora, C. et al.** (2011) How many species are on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 8: e1001127.
- Morkel, M., Winkel, J., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Hagemeyer, C.** (1997) An E2F-like repressor of transcription. *Nature*. 390:567–568
- Müller, H., Moroni, M.C., Vigo, E., Petersen, B.O., Bartek, J., Helin, K.** (1997) Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol.* 17: 5508–5520.
- Nájera-Martínez, M., Ramírez-Parra, E., Vázquez-Ramos, J., Gutierrez, C., Plasencia, J.** (2008) Cloning and molecular characterisation of the maize retinoblastoma gene (*ZmRBR2*). *Plant Sci.* 175,5:685:693.
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H., Shinmyo, A.** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant J* 18, 243–252.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., Shinmyo, A.** (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco, *Plant Cell* 14:1847–1857.
- Narasimha, A.M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., Dowdy, S. F.** (2014) Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife*. 3:e02872.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., Kingston, R.E.** (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475–487
- Nelissen, H., Boccardi, M.T., Himanen, K., Van Lijsebettens, M.** (2007). Impact of core histone modifications on transcriptional regulation and plant growth. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 243–263.
- Nicolás, G., Aldasoro, J.J.** (1979) Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum*. *J Exp Bot.* 30:1163-1170.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., Kouzarides, T.** (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561–565
- Nonogaki, H., Bassel, G.W., Bewley, J.D.** (2010) Gene expression during germination. *Plant Sci* 179: 574-581.
- Nowack, M., Grini, P. E., Jakoby, M. J., Lafos, M., Koncz, C., Schnittger, A.** (2006) A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nature Gen* 38 (1): 63-67.
- Nowack, M.K., Harashima, H., Dissmeyer, N., Zhao, X., Bouyer, D., Weimer, A.K., De Winter, F., Yang, F., Schnittger, A.** (2012) Genetic framework of cyclin-dependent kinase function in Arabidopsis. *Developmental Cell* 22, 1030–1040.

- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philosop Trans Royal Soc London*. 357:749–760
- Olson, B.J., Oberholzer, M., Li, Y., Zones, J. M., Kohli, H. S., Bisova, K., Fang, S.C., Meisenhelder, J., Hunter, T., Umen, J. G.** (2010) Regulation of the chlamydomonas cell cycle by a stable, chromatin-associated retinoblastoma tumor suppressor complex. *Plant Cell*. 22:3331-3347.
- Osborne, D. J.**, (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can J Bot*, 61: 3568-3577.
- Paliwal, R.L., Granados, G., Lafitte, H.R.** (2001) El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colecciónn FAO: Producción y protección vegetal. 28.
- Pan, Q., Shai, O., lee, L. J., Frey, B. J., Blencowe, B.J.** (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Gen*, 40: 1413-1415.
- Ramírez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M. B., Gutierrez, C.** (1999) The cloning of plant E2F, a plant retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G<sub>1</sub>/S regulators. *Nucleic Acids Res*. 27,17:3527-3533.
- Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C.** (2000) Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F–DNA binding. *FEBS Lett*. 486, 73–78.
- Raven, P. H., Evert, R.F., Eichhorn, S. E.** (1992) Biology of plants. Worth Publishers, Inc. N.Y, 545-562.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M.S., Murray, J.H.A.** (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol and Cel Biol*, 20:4513-4521.
- Robanus-Maandag, E., Dekker, M., van der Valk, M., Carrozza, M. L., Jeanny, J. C., Dannenberg, J. Berns, A. H., te Riele, H.** (1998). p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev*, 12 (11), 1599-1609.
- Ross, J.F., Liu, X. and Dynlacht, B.D.** (1999) Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell*, 3, 195-205.
- Rossi ,V., Locatelli, S., Lanzaova, C., Boniotti, M.B., Varotto, S., Pipal, A., Goralik-Schramel, M., Lusser, A., Gatz, C., Gutierrez, C., Motto, M.** (2003) A maize histone deacetylase and retinoblastoma-related protein physically interact and cooperate in repressing gene transcription. *Plant Mol Biol* 51, 401–413.
- Rubin, S.M., Gall, A.L., Zheng, N., Pavletich, N.P.** (2005) Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell* 123, 1093–1106.
- Sabelli, P.A., Dante, R.A.,Leiva-Nieto, J.T., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., Larkins, B.A.** (2005) RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(37):13005-12.



- Sabelli, P.A., Liu, Y., Dante, R. A., Lizarraga, L. E., Nguyen, H. N., Brown, S. W., Klingler, J. P., Jingjuan, Y., LaBrant, E., Layton, T. M., Feldman, M., Larkins, B. A.** (2013) Control of cell proliferation, edoreduplication, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA*. doi: 10.1073/pnas.1304903110
- Salon, C., Raymond, P., Pradet, A.** (1988) Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *J Biol Chem*. 263: 12278-12287.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., López, S.,** (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem Biophys Res Comm*. 99: 445-450.
- Sánchez M. de L., Gurunsiague, S.H., Bradford, K. J., Vázquez-Ramos, J.M.** (2005) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J Exp Bot* 56(412): 515-523.
- Saravia, A.** (1965) Popol Vuh: Antiguas historias de los indios Quiché de Guatemala. Editorial Porrúa, México.
- Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A.** (1999) Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett*. 460: 117–122.
- Shen, B., Carneiro, N., Torres-Jerez, I., Stevenson, B., McCreery, T., Helentjaris, T., Baysdorfer, C., Almira, E., Ferl, R.J., Habben, J.E., Larkins, B.** (1994) Partial sequencing and mapping of clones from two maize cDNA libraries, *Plant Mol. Biol*. 26: 1085–1101.
- Shen, W-H.** (2001) NtSET1, a member of a newly identified subgroup of plant SET -domain containing proteins, is chromatin-associated and its ectopic overexpression inhibits tobacco plant growth. *Plant J*. 28, 371–383
- Shen, W.H.** (2002) The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci*. 7: 505–511.
- Sherr, C. J.** (1996) Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293):1672-7.
- Sherr, C.J.** (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689–3695.
- Smith, L. G.** (2002) Plant cytokinesis: monitoring to the finish. *Current Biol*. 12: R206-R209.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., Murray, J.** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif, *Plant Cell* 7: 85–103.
- Sterck, L., Rombauts, S., Vandepoele, K., Rouzé, P., Van der Peer, Y.** (2007) How many genes are there in plants (...and why are ther there)? *Current Opin Plant Biol* 10:199-203.
- Sterner, J.M., Dew-Knight, S., Musahl, C., Kornbluth, S., Horowitz, J.M.** (1998) Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol* 18:2748–2757.

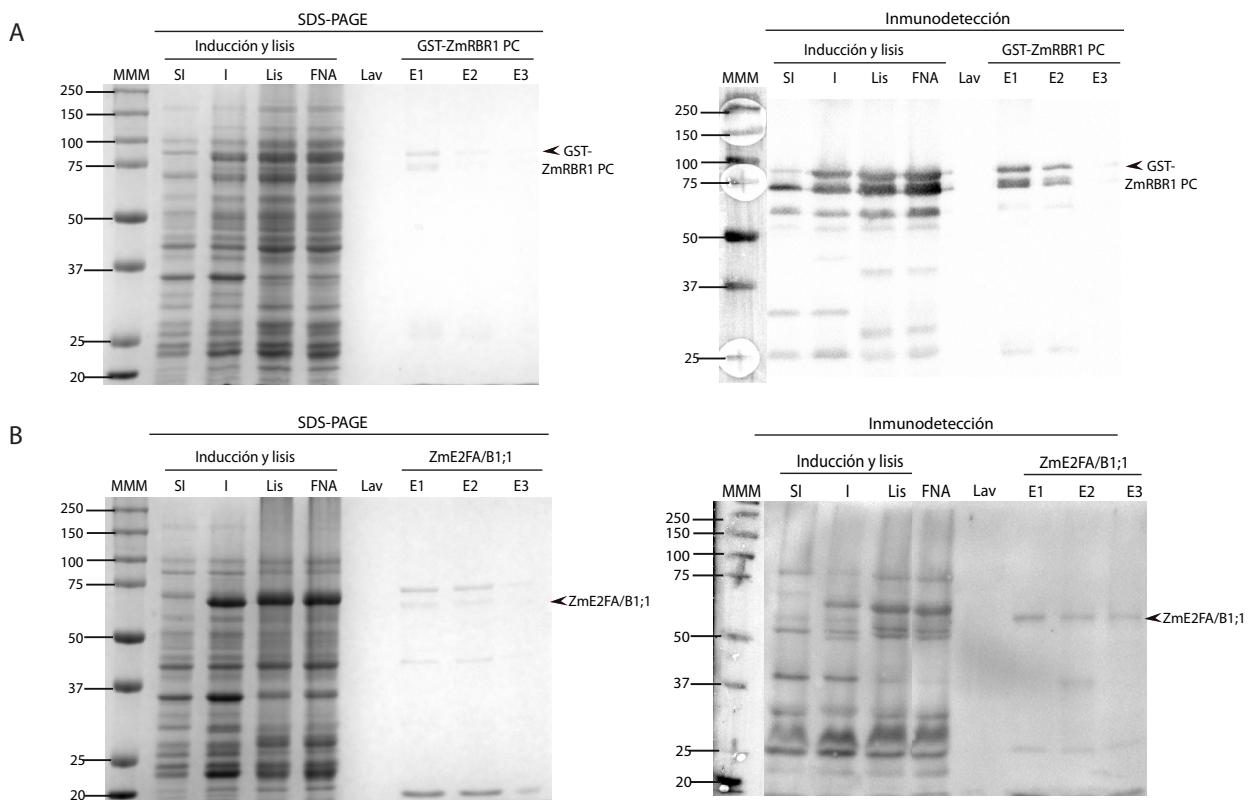
- Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R., Bergounioux, C.** (2002) Two E2F sites in Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *J. Biol. Chem.* 277:32978-32984.
- Suárez-Espinoza, C.** (2017) Estudio de la proteína E2FA/B1;1 durante la germinación de maíz. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Trimarchi, J.M., Lees, J.A.** (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:11–20.
- Uemukai, K., Iwakawa, H., Kosugi, S., de Jager, S., Kato, K., Kondorosi, E., Murray, J.A.H., Ito, M., Shinmyo, A., Sekine, M.** (2005) Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* 57, 83–100.
- Umen, J.G. y Goodenough, U.W.** (2001) Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in Chlamydomonas. *Genes Dev*, 15, 1652-1661.
- Van den Heuvel, S., Dyson, N.J.** (2008) Conserved functions of the pRB and the E2F families. *Mol Cell Biol*, 9: 713-724.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., Inzé, D.,** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 14: 903-916.
- Vázquez-Ramos, J., de la Paz, M., B** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res.* 13: 113-130.
- Vincent, P. L. D.** (2002) Zea mays (Maize, Corn). Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. Encyclopedia of Life Sciences,; 1-7.
- Wang, N.P., Chen, P.L., Huang, S., Donoso, L.A., Lee, W.H. and Lee, E.Y.** (1990) DNA-binding activity of retinoblastoma protein is intrinsic to its carboxyl-terminal region. *Cell Growth Differ*, 1, 233-239.
- Wachsman, G., Heidstra, R., Scheres, B.** (2011) Distinct cell-autonomous functions of *Retinoblastoma-related* in Arabidopsis stem cells revealed by the brother of rainbow clonal analysis system. *Plant Cell* 23: 2581-2591.
- Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J.M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Grissem, W., Scheres, B.** (2005) The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell* 123: 1337–1349.
- Weinberg, R.A.** (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 5:323-330.
- Wyrzykowska, J., Schorderet, M., Pien, S., Grissem, W., Fleming, A.J.** (2006) Induction of differentiation in the shoot apical meristem by transient overexpression of a retinoblastoma-related protein, *Plant Physiol.* 141:1338–1348.
- Xie, Q., Suarez-Lopez, P., Gutierrez, C.** (1995) Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus-requirement for efficient viral DNA replication, *EMBO J.* 14: 4073–4082.

- Xie, Q., Sanz-Burgos, P., Hannon, G.J., Gutierrez, C.** (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins, *EMBO J.* 15:4900–4908.
- Xiong, Y., Sheen, J.** (2013) Moving beyond translation: glucose TOR signalling in the transcriptional control of the cell cycle. *Cell Cycle.* 12:1989-1990.
- Yee, S. P., Branton, P. E. (1985).** Detection of cellular proteins associated with human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides. *Virology*, 147 (1), 142-15.
- Zamora-Zaragoza, J.** (2014) Caracterización de la ciclina CycD6;1 de maíz y sus interacciones con otros reguladores del ciclo celular. Tesis de maestría. UNAM.
- Zhang, H.S., Dean, D.C.** (2001) Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* 20, 3134–3138.
- Zheng, L., Lee, W.H.** (2001) The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res*, 264, 2 - 18.
- Zheng, L., Lee, W.H.** (2002) Retinoblastoma tumor suppressor and genome stability. *Adv Cancer Res*, 85, 13 - 50.
- Zlatanova, J.S., Ivanov, P.V., Stoilov, L.M., Chimshirova, K.V., Stanchev, B.S.** (1987) DNA repair precedes replicative synthesis during early germination of maize. *Plant Molec Biol*, 10:139-144.

## 12. Apéndices

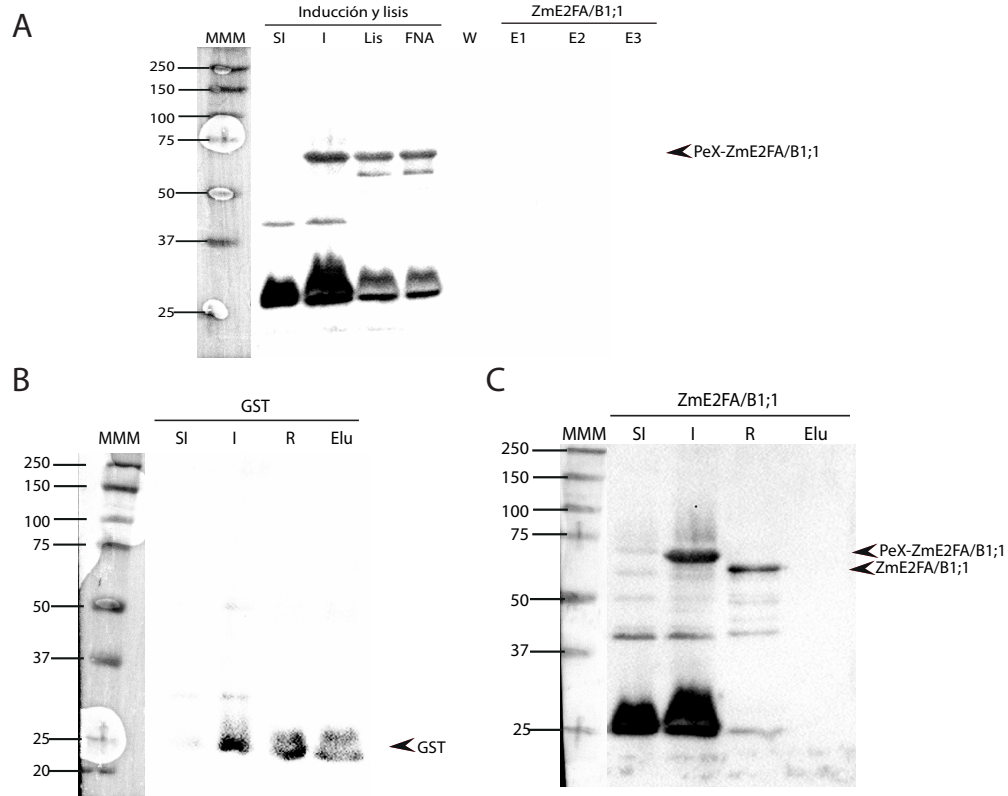
### Apéndice 1. Expresión y purificación de las proteínas GST-ZmRBR1 y ZmE2FA/B1;1 recombinantes.

**Figura A1.** A. Inducción de la expresión de la proteína RBR1 recombinante fusionada a GST por electroforesis (SDS-PAGE) e inmunodetección utilizando el anticuerpo anti ZmE2FA/B1;1 (91 kDa). B. Inducción de la expresión de la proteína ZmE2FA/B1;1 recombinante fusionada al Profinity eXact™ Tag por electroforesis (SDS-PAGE) e inmunodetección utilizando el anticuerpo anti ZmRBR1 (60 kDa). Se indica para todos los casos: el marcador de masa molecular (MMM), el cultivo bacteriano sin inducir (SI), cultivo inducido (I), extracto total de lisis (Lis), fracción no adsorbida (FNA), el lavado de la columna (Lav) y las eluciones de las proteínas (E1, E2, E3).



## Apéndice 2. Controles negativos para la interacción RBR1-E2FA/B1;1 de maíz.

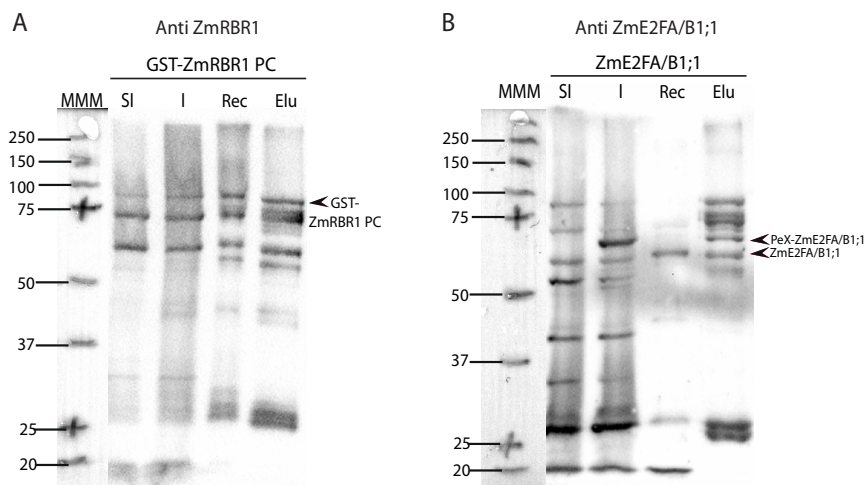
**Figura A2.** A. Inmunodetección de la expresión y purificación de la proteína ZmE2FA/B1;1 recombinante y análisis de su interacción con la resina de glutatión-agarosa utilizando el anticuerpo anti ZmE2FA/B1;1. Se indica: el marcador de masa molecular (MMM), el cultivo bacteriano sin inducir (SI), cultivo inducido (I), extracto total de lisis (Lis), fracción no adsorbida (FNA), el lavado de la columna (Lav) y las eluciones de las proteínas (E1, E2, E3). B. Inmunodetección de la expresión y purificación de la proteína GST recombinante con la resina de glutatión-agarosa utilizando un anticuerpo comercial anti GST y C. Inmunodetección de la interacción GST-E2FA/B1;1 utilizando el anticuerpo anti ZmE2FA/B1;1. Se indica: el marcador de masa molecular (MMM), el cultivo bacteriano sin inducir (SI), cultivo inducido (I), la proteína recombinante purificada (R) y la elución (Elu).



**Apéndice 3. Interacción *in vitro* entre las proteínas GST-ZmRBR1 PC y ZmE2FA/B1;1 recombinantes utilizando los anticuerpos anti-E2FA/B1;1 sin purificar.**

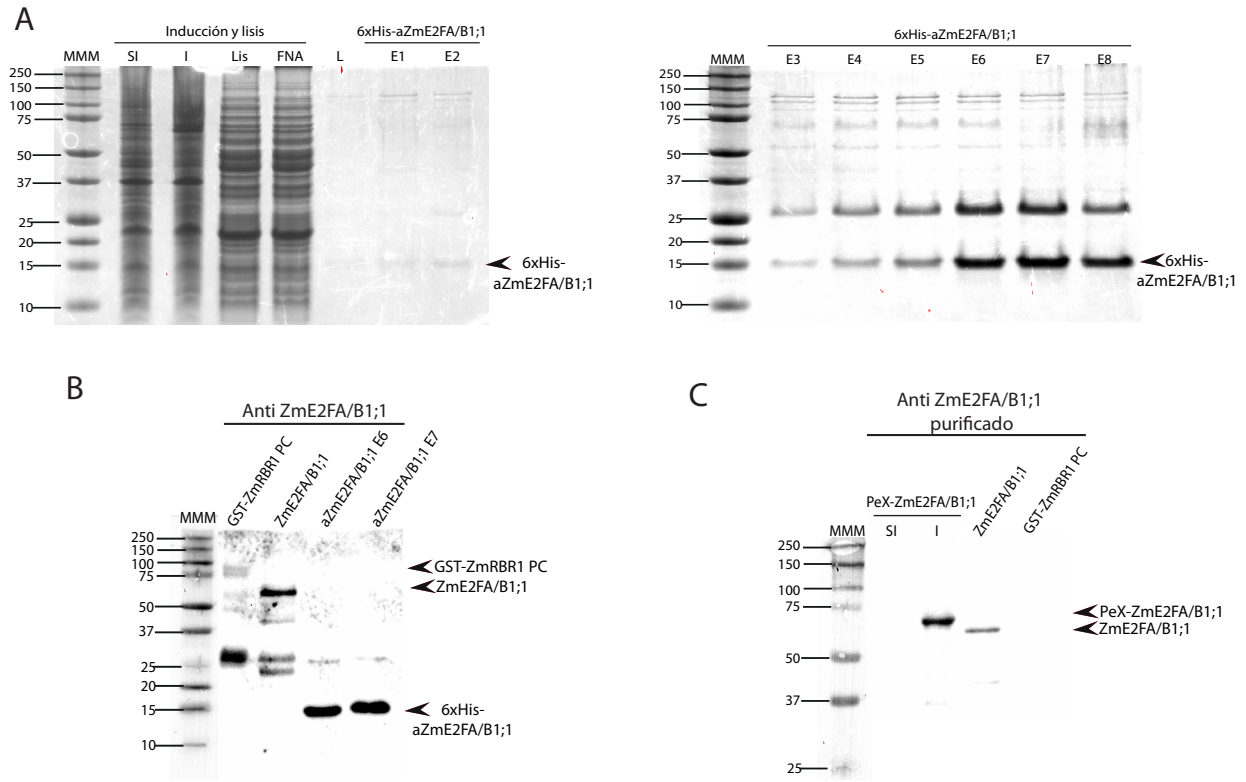
**Figura A3.** A. Inducción e inmunodetección de la proteína GST-ZmRBR1 PC recombinante en la

elución. B. Inducción e inmunodetección de la proteína ZmE2FA/B1;1 recombinante en la elución. Para ambos casos se muestra el marcador de masa molecular (MMM), el cultivo bacteriano sin inducir (SI), cultivo inducido (I), la proteína recombinante purificada (Rec) y la fracción eluida (Elu).



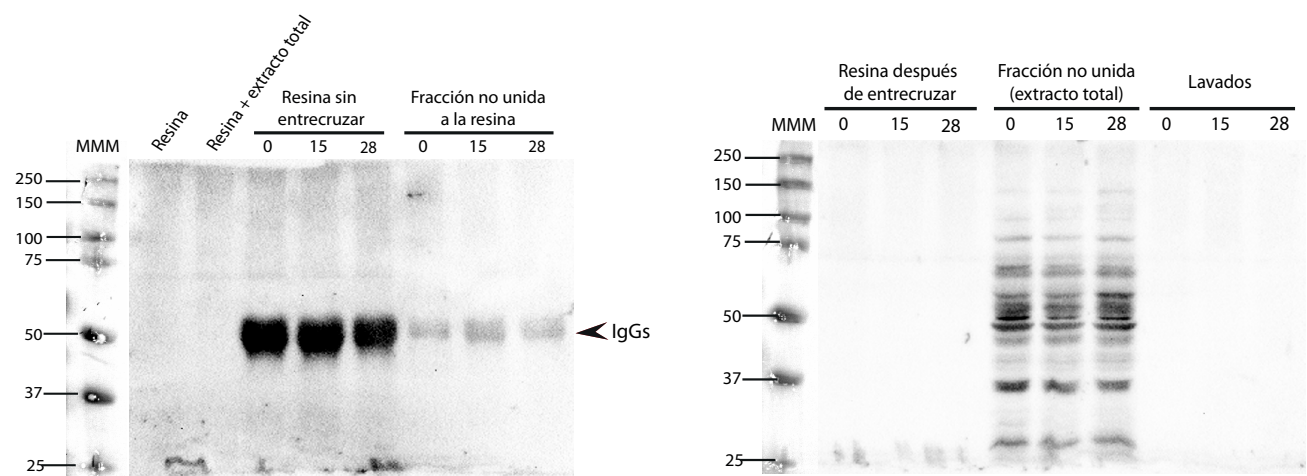
#### Apéndice 4. Purificación del anticuerpo anti E2FA/B1;1 de maíz.

**Figura A4.** A. Inducción y purificación del péptido de ZmE2FA/B1;1 recombinante. El primer carril corresponde al marcador de masa molecular (MMM), hacia la derecha el cultivo bacteriano sin inducir (SI), cultivo inducido (I), extracto total de lisis (Lis), fracción no adsorbida (FNA), el lavado de la columna (Lav) y las eluciones de las proteínas (15 kDa, E1-E8). B. Inmunodetección de las recombinantes GST-ZmRBR1 PC, ZmE2FA/B1;1 y el péptido inmunogénico aZmE2FA/B1;1 (E6 y 7) con el anticuerpo anti E2FA/B1;1 de maíz. C. Inmunodetección utilizando el anticuerpo purificado anti E2FA/B1;1 de maíz de las proteínas recombinantes en el cultivo bacteriano sin inducir (SI), cultivo inducido (I) (60 kDa) y las recombinantes ZmE2FA/B1;1 (55 kDa) y GST-ZmRBR1 PC purificadas.



**Apéndice 5. Controles de entrecruzamiento de los anticuerpos anti-RBR1 de maíz a la resina Proteína A-agarosa.**

**Figura A5.** Se muestra el marcador de masa molecular (MMM) y los controles correspondientes al entrecruzamiento de los anticuerpos a la resina Proteína A-agarosa para las columnas generadas para extractos de 0, 15 y 28 h de germinación.



## Apéndice 6.

**Tabla A.6.1. Elementos E2F potenciales presentes en los promotores de *MCM3*, *RPA2* y *PCNA1*.**

Nombre del gen	Sitio	Elementos potenciales E2F	Posición
<i>MCM3</i>	-1	5'-TTTGGCGG-3'	-150
	-2	5'-TTTCGCGC-3'	-193
<i>PCNA1</i>	-1	5'-TTTCGCGG-3'	-203
	-2	5'-GCGGGAAA-3'	-214
	-3	5'-GCGGGAAA-3'	-355
	-4	5'-GCGGGAAA-3'	-382
<i>RPA2</i>	-1	5'-TCTCCCGCC-3'	-124
	-2	5'-TTTGCCCG-3'	-134
	-3	5'-TTTCCCGC-3'	-145

**Tabla A.6.2. Cebadores utilizados para la amplificación de los sitios E2F presentes en los promotores de los genes *MCM3*, *PCNA1*, *RPA2* y sin sitios E2F, *CYCD3;1a*.**

Nombre del gen	Cebador	Secuencia	Amplicón (pb)	Tm (°C)
<i>MCM3</i>	Fw-2-1	5'-AATAGTCAGCCAAGAGCCCAACGA-3'	150	56.8
	Rw-2-1	5'-AGGCGGGCGGATTTGGATTTG-3'		
	FwTSS	5'-AACCACCTCTTCCAGCCACAC-3'	216	
	RwTSS	5'-CCATTGCCTCCTCGTTGATTTCC-3'		
<i>PCNA1</i>	Fw-3-4	5'-TGAGTGGAGGGAAGGGAGGAGGAG-3'	118	58.9
	Rw-3-4	5'-GCGGTTTGGGAAAGGGCGGG-3'		
	Fw-2-1	5'-AATCTTCCGGAGCAAGGAGCAT-3'	126	
	Rw-2-1	5'-GGGGATTAATAGGGAGTCGTTTGGG-3'		
	FwTSS	5'-CCCAAACGACTCCCTATTAATCCC-3'	208	
	RwTSS	5'-ATCGCCTCAGGACCTTCTT-3'		
<i>RPA2</i>	Fw-3-2-1	5'-CCCACAGTCAGTCAGTCACTC-3'	114	60.8
	Rw-3-2-1	5'-CTCAAAGGAGCGGAGTCCTAT-3'		
	FwTSS	5'-GTTCTCCCGCCAGGTTGCTC-3'	74	
	RwTSS	5'-ATGCGATGCGAGGG-3'		
<i>CYCD3;1a</i>	FwpCYCD3;1a	5'-AAGAGACGGATGGAGAGGCA-3'	200	60.8
	RwpCYCD3;1a	5'-GGAGCGAGAGAGAGAGTGA-3'		