



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la familia de factores transcripcionales E2F/DP de maíz durante la germinación

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Victor Allan Sánchez Camargo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez
Instituto de Ecología, UNAM

Dr. Félix Recillas Targa
Instituto de Fisiología, UNAM

Ciudad de México. Diciembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220661) y por la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-PAPIIT IN215316/IN205219, PAIP 5000-9124, PAIP 5000-9130).

El autor fue beneficiario del Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología en modalidad Maestría y Doctorado, así como Beca Mixta para Movilidad al Extranjero (CVU 445289). También recibió apoyo como Asistente de Proyecto Nivel Doctorado (Proyecto CB220661).

La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) otorgó apoyos mediante el Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP) para Estancia en el Extranjero, Asistencia a Congreso Nacional e Internacional.

La mayor parte de esta tesis fue realizada en el Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, bajo la supervisión del Dr. Jorge M. Vázquez Ramos y con apoyo constante de la Dra. Aurora Lara Núñez y el Dr. Elpidio García Ramírez.

Las metodologías relacionadas con cromatina fueron establecidas en colaboración con la Dra. Maike Stam, en Swammerdam Institute for Life Sciences, Universiteit van Amsterdam.

Los experimentos de PCR en tiempo real y microscopía confocal fueron realizados con asesoría técnica del Dr. Jorge Herrera Díaz y la Dra. Karina Jiménez Durán, respectivamente, en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

Los anticuerpos policlonales empleados en este estudio fueron generados con el apoyo del QFB Atonatiu Gómez Martínez, en el Bioterio de la Facultad de Química, UNAM.

Este proyecto fue desarrollado en estrecha colaboración con Q. A. Cassandra Suárez Espinoza y M. en C. Samantha Romero Rodríguez, cuyas tesis de licenciatura y maestría derivan de esta investigación.

Comité Tutor de Doctorado

Dr. Jorge Manuel Vázquez
Ramos

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. María de la Paz Sánchez

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Félix Recillas-Targa

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

Tabla de contenidos

Resumen	9
Summary	10
Capítulo 1	
Introducción	11
1. Antecedentes	11
2. Hipótesis	18
3. Objetivo general	18
4. Estructura de la tesis	19
Capítulo 2	
La raíz del eje embrionario de maíz como modelo biológico para estudios de proliferación celular y diferenciación	21
1. Introducción	22
2. Materiales y métodos	26
3. Resultados	27
4. Discusión	35
5. Conclusiones	37
Capítulo 3	
Caracterización de la familia de factores transcripcionales E2F/DP durante la germinación de maíz	39
1. Introducción	40
2. Materiales y métodos	42
3. Resultados	46
4. Discusión	57
5. Conclusiones	63
Capítulo 4	
Discusión general: La familia E2F y el ciclo celular durante la germinación	64

1. Regulación de la expresión genética y el ciclo celular durante la germinación	64
2. La familia E2F de maíz y la germinación	66
3. Conclusiones generales	71
Referencias	73
Anexo I: Información suplementaria	82
1. Figuras suplementarias	83
2. Tablas suplementarias	102
Anexo II: Publicaciones derivadas de esta tesis	112

Índice de figuras

Fig.-1.1 Red de regulación transcripcional de la transición G1/S del ciclo celular en plantas	14
Fig.-1.2 Organización de dominios y motivos proteicos de la familia E2F/DP	15
Fig.-2.1 Incorporación de agua a los ejes embrionarios durante la germinación	28
Fig.-2.2 Longitud de ejes embrionarios durante germinación y plántulas post-germinación	29
Fig.-2.3 Tamaño celular en zonas de crecimiento de la raíz del eje embrionario	31
Fig.-2.4 Morfología y tamaño de núcleos celulares durante la germinación	32
Fig.-2.5 Expresión de genes marcadores de proliferación y diferenciación en distintas zonas de la raíz del eje embrionario	33
Fig.-2.6 Expresión de marcadores de proliferación y diferenciación celular en la raíz primaria	34
Fig.-3.1 Caracterización de la familia de genes E2F/DP de maíz	47
Fig.-3.2 Genes E2F de maíz se expresan en tejidos de plántulas y en ejes embrionarios durante germinación	49
Fig.-3.3 Las proteínas ZmE2Fa/b1;1 y ZmE2Fc forman heterodímeros con ZmDPb2 y pueden unirse al DNA	51
Fig.-3.4 Posibles genes blanco de E2F en el genoma de maíz y su clasificación funcional	52
Fig.-3.5 Genes blanco putativos de E2F contienen promotores con múltiples sitios de unión a E2F y se expresan durante la germinación	54
Fig.-3.6 Las proteínas E2F se asocian diferencialmente a sus genes blanco durante la germinación	56
Fig.-3.7 Dinámica de marcas epigenéticas en promotores de ciclo celular	58
Fig.-S3.1 Características genómicas de los genes E2F/DP candidatos de maíz	83

Fig.-S3.2 Análisis del <i>locus</i> del gen <i>ZmE2Fa/b3</i>	84
Fig.-S3.3 Filogenia y organización de motivos y dominios en las proteínas de la familia E2F/DP	85
Fig.-S3.4 Análisis de secuencia de los miembros de la familia E2F de maíz	88
Fig.-S3.5 Esquema general de los motivos y dominios de las proteínas E2F, DEL y DP de plantas	89
Fig.-S3.6 Motivos proteicos en E2F, DEL y DP de plantas	90
Fig.-S3.8 Expresión de posibles genes blanco de E2F en las tres principales categorías funcionales identificadas	93
Fig.-S3.9 Estandarización de entrecruzamiento y fragmentación de cromatina de maíz	94
Fig.-S3.10 Generación de anticuerpos policlonales anti-E2F de maíz	95
Fig.-S3.11 Controles de inmunoprecipitación de cromatina para los diferentes sitios E2F estudiados	97
Fig.-S3.12 Regulación de la expresión de los genes E2F de maíz	98
Fig.-S3.13 Las proteínas E2F de maíz poseen actividades transcripcionales opuestas	99
Fig.-S3.14 La proteína ZmRBR1 interacciona y co-localiza con las proteínas E2F en promotores blanco de E2F	100
Fig.-S3.15 Accesibilidad de cromatina en <i>loci</i> blanco de E2F	101

Índice de tablas

Tabla suplementaria S1. Cebadores empleados para experimentos de expresión semi-cuantitativa (RT-PCR)	102
Tabla suplementaria S2. Cebadores para expresión de genes en tiempo real (RT-qPCR)	103
Tabla suplementaria S3. Cebadores empleados para clonar marcos de lectura abiertos	103
Tabla suplementaria S4. Sondas de DNA de cadena sencilla para EMSA	104
Tabla suplementaria S5. Cebadores para ChIP-(q)PCR	105
Tabla suplementaria S6. Información genómica de genes E2F/DP de distintas especies vegetales	106
Tabla suplementaria S7. Información de los sitios E2F en las sondas de EMSA	110
Tabla suplementaria S8. Cebadores empleados para anotar el <i>locus</i> <i>ZmE2Fa/b3</i>	110
Tabla suplementaria S9. Cebadores empleados para clonar las regiones inmunogénicas de E2F de maíz	111

Abreviaturas

ATG	Sitio de un gen donde inicia la región codificante	ATP	Trifosfato de adenosina
BLAST	Herramienta de búsqueda mediante alineamiento local de secuencias	CCS52A	Gen <i>Cell Cycle Switch 52A</i>
CDK	Cinasa dependiente de ciclina (<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>)	cDNA	DNA complementario
CED	Dominio de elongación celular en la raíz del embrión (<i>Cell Elongation Domain</i>)	ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (<i>Chromatin immunoprecipitation</i>)
CPD	Dominio de proliferación celular en la raíz del embrión (<i>Cell Proliferation Domain</i>)	CYC	Ciclina
DEL	Miembro atípico de la familia E2F (<i>DP-E2F-Like</i>)	DNA-BD	Dominio proteico de unión a DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico	DTT	Ditiotreitol
DP	Socio de dimerización de E2F (<i>Dimerization Partner</i>)	EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
E2F	Miembro típico de la familia E2F (<i>E2-binding Factor</i>)	Fig.	Figura
EMSA	Ensayo de retardamiento de movilidad electroforética (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	TF	Factor transcripcional (<i>Transcription Factor</i>)
Fig. Sup.	Figura suplementaria	G2	Fase de crecimiento 2 en el ciclo celular (<i>Gap2/Growth2</i>)
G1	Fase de crecimiento 1 en el ciclo celular (<i>Gap1/Growth1</i>)	GO	Ontología genética (<i>Gene Ontology</i>)
GC	Nucleótidos de DNA guanina y citocina	h	Horas
GST	Etiqueta para purificación por afinidad, derivada de la enzima Glutación-S Transferasa	H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la Histona H3
H3ac	Acetilación de Histona H3	hpi	Horas post-imbibición

H3K4me3	Trimetilación de la lisina 4 de la Histona H3	IGEPAL CA-630	Detergente no iónico derivado de octilfenol. Sustituto de Nonidet-P40
HR	Recombinación homóloga de DNA	M	Mitosis
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido	mRNA	RNA mensajero
<i>MCM</i>	Gen <i>Minichromosome Maintenance</i>	NIBT	Buffer para aislamiento de núcleos enriquecido con Tritón X-100
NIB	Buffer para aislamiento de núcleos (<i>Nuclei Isolation Buffer</i>)	ORF	Marco de lectura abierto de un gen
NLS	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear Localisation Signal</i>)	PBS	Buffer de fosfatos (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
<i>P</i>	Valor de probabilidad estadística	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>PCNA</i>	Gen de antígeno de proliferación celular (<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)	PMSF	Inhibidor de proteasas Fluoruro de metilvinilsulfonilo (<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i>)
PIC	Cocktail inhibidor de proteasas (<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>)	PVDF	Fluoruro de polivinilideno
pRB	Proteína de Retinoblastoma	RE	Elemento de respuesta en un promotor (<i>Responsive Element</i>)
RBR	Proteína relacionada con la proteína de retinoblastoma (<i>Retinoblastoma-Related</i>)	<i>RPA</i>	Gen de proteína de replicación A (<i>Replication Protein A</i>)
RNA	Ácido ribonucleico	qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa	S	Fase de Síntesis del ciclo celular
<i>RTH6</i>	Gen <i>Root hairless-6</i>	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante
SDS	Dodecilsulfato de Sodio (<i>Sodium Dodecylsulphate</i>)	TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
Tabla Sup.	Tabla suplementaria	TBS-T	Buffer de Tris Salino
TOR	Cinasa blanco de rapamicina (<i>Target Of Rapamycin</i>)	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSS	Sitio de inicio de transcripción en un gen		

Resumen

En eucariontes, la familia de factores transcripcionales E2F es reconocida como uno de los reguladores principales de la transición G1/S del ciclo celular, teniendo como genes blanco actores implicados en ambas fases. Durante la germinación de semillas en plantas, el avance del ciclo celular es controlado por factores ambientales y elementos endógenos, por lo que resulta un modelo relevante para el estudio de su regulación. La germinación de semillas ortodoxas inicia con la entrada de agua a la semilla, evento que dispara una serie de cambios bioquímicos y moleculares en el embrión latente, y tiene como objetivo la producción de una nueva planta. La hipótesis de trabajo de nuestro grupo de investigación considera al ciclo celular como un evento crucial para que la germinación sea exitosa. Ya que el eje embrionario posee un número limitado de células, es necesaria la reactivación de la proliferación celular y su coordinación con la diferenciación para generar un nuevo organismo. Durante las dos primeras etapas de la germinación ocurren eventos que podrían estar ligados con el avance del ciclo celular, *i. e.* fases G1 y S. El objetivo central de esta tesis es el estudio del papel de la familia E2F/DP en la regulación de la transición G1/S del ciclo celular durante germinación. La medición de constantes fisiológicas como el peso fresco y longitud de ejes embebidos, y características morfológicas celulares y subcelulares, indicaron que la etapa I de la germinación ocurre desde la imbibición hasta las 12 horas post-imbibición (hpi) y la etapa II va de las 12 a las 24 hpi. La expresión de genes marcadores de ciclo celular como *E2Fa/b1;1* y de diferenciación de raíces, como *Roothairless-6*, en distintas regiones de la raíz, a lo largo de la germinación y en raíces en desarrollo, indicó que la raíz del eje embrionario puede dividirse en dos dominios principales, uno de proliferación celular y uno de diferenciación. También se caracterizó la familia de factores transcripcionales E2F/DP en maíz durante la germinación, incluyendo el descubrimiento de todos los genes presentes en su genoma. Estudios de expresión mostraron que 9 de los 12 genes identificados se transcriben diferencialmente durante la germinación y en tejidos proliferativos o diferenciados de plántulas. Estudios *in vitro* permitieron reconstituir heterodímeros recombinantes E2F-DP, capaces de reconocer la secuencia consenso para E2F en el DNA reportada en otras especies. Sin embargo, al estudiar sitios E2F presentes en promotores de maíz, la interacción *in vitro* mostró diferencias importantes en el reconocimiento de ciertas secuencias. Estudios *in vivo* mediante inmunoprecipitación de cromatina mostraron evidencia de la asociación diferencial a promotores con sitios E2F durante la germinación. Por un lado, *E2Fa/b1;1*, relacionado con activación transcripcional, fue reclutado a promotores después de 15 hpi, mientras que *E2Fc*, un posible represor, únicamente fue localizado en la semilla seca o después de 28 hpi, tiempos previos o posteriores a la transición G1/S, respectivamente. Estos patrones de asociación podrían relacionarse con la expresión de genes blanco de fase S observados, los cuales comienzan a incrementar de manera significativa después de 12 hpi, cuando la transición G1/S ocurre. Por otro lado, estudios de estructura de cromatina en dichos promotores mostraron un incremento en marcas de histona relacionadas con activación transcripcional (acetilación de Histona H3 y trimetilación de la lisina 4 de Histona H3). Resultados de nuestro grupo de investigación muestran que complejos reguladores de ciclo celular, como ciclinas asociadas a cinasas dependientes de ciclinas (CYC/CDK), provenientes de semillas secas, tienen la capacidad de fosforilar proteínas *in vitro*. Por otro lado, también se han detectado mRNAs y proteínas de diversos reguladores en la semilla seca. La evidencia recopilada en este trabajo nos ha permitido comenzar a entender cómo los eventos que ocurren durante las dos etapas iniciales de la germinación podrían tener conexión con el ciclo celular, posicionando a las vías de CYC/CDK/KRP y E2F/DP/RBR, e incluso la estructura de la cromatina en *loci* específicos, como componentes clave para reanudar el ciclo celular (de manera exitosa) en un embrión que recién ha despertado de un estado de latencia en la semilla seca.

Summary

The eukaryotic family of transcription factors E2F is recognised as one of the main regulators of the G1/S transition of the cell cycle, regulating target genes involved in both phases. During seed germination, cell cycle progression is controlled by environmental factors and endogenous elements, making it a relevant model for the study of its regulation. The germination of orthodox seeds starts with the entry of water into the seed, an event that triggers a series of biochemical and molecular changes in the dormant embryo, and aims at the production of a new plant. The working hypothesis of our research group considers the cell cycle as a crucial event for successful germination. Since the embryonic axis has a limited number of cells, the reactivation of cell proliferation and its coordination with differentiation is necessary to generate a new organism. During the first two stages of germination, events occur that could be linked to cell cycle progression, *i.e.* G1 and S phases. Thus, the central objective of this thesis is to study the role of the E2F/DP family in the regulation of the G1/S transition of the cell cycle during germination. First, the times at which the three stages of germination occur were defined based on physiological constants such as fresh weight and length of embedded axes, and cellular and sub-cellular morphological characteristics indicated that the stage I of germination starts with imbibition and continues until 12 hours post imbibition (hpi), while the second stage occurs between 12 and 24 hpi. The expression of cell cycle marker genes such as *E2Fa/b1;1* and root differentiation genes such as *Roothairless-6* in different regions of the root, throughout germination, and in developing roots, suggested that the root of the embryonic axis can be divided into two main domains, one with cell proliferation characteristics while the other possesses differentiation properties. The E2F family of transcription factors in maize was characterised during germination, including the discovery of all E2F/DP genes present in its genome. Expression studies showed that 9 of the 12 identified genes are differentially transcribed during germination and in proliferative or differentiated seedling tissues. *In vitro* studies allowed the reconstitution of recombinant E2F-DP heterodimers capable of recognising the E2F-binding DNA consensus sequence reported in other species. However, when studying E2F sites present in maize promoters, the *in vitro* interaction showed important differences in the recognition of certain sequences. *In vivo* chromatin immunoprecipitation studies showed differential association to promoters with E2F sites during germination. On the one hand, *E2Fa/b1;1*, related to transcriptional activation, was recruited to promoters after 15 h post-imbibition (hpi), whereas *E2Fc*, a putative repressor, was only localised in dry seed or after 28 hpi, time points occurring before or after the G1/S transition, respectively. These patterns of association could be related to the observed expression of S-phase target genes, which begin to increase significantly after 12 hpi when the G1/S transition occurs. On the other hand, chromatin structure studies on these promoters showed an increase in histone marks related to transcriptional activation (Histone H3 acetylation and Histone H3 lysine 4 trimethylation). Results from our research group showed that cell cycle regulatory complexes, such as cyclins associated with cyclin-dependent kinases (CYC/CDK), from dry seeds can phosphorylate proteins *in vitro*. On the other hand, mRNAs and proteins of various regulators have also been detected in the dry seed. The evidence gathered in this work has allowed us to begin to understand how the events that occur during the two initial stages of germination could be connected to the cell cycle, positioning the CYC/CDK/KRP and E2F/DP/RBR pathways, and even the chromatin structure at specific *loci*, as key components for successfully resuming the cell cycle in an embryo that has just awakened from dormancy in the dry seed.

Capítulo 1

Introducción*

Acerca de este capítulo

En esta sección se proporcionan conceptos y antecedentes que permitirán al lector entender la motivación de este trabajo de tesis, mismos que serán detallados al momento de ser abordados durante el desarrollo del manuscrito. Además, se indican los objetivos principales, así como los retos enfrentados para llevar a término el proyecto. Finalmente, se describe la estructura de la tesis.

1. Antecedentes

1.1. Germinación de semillas

El desarrollo de las semillas de angiospermas inicia con la doble fertilización, proceso que dará origen a sus estructuras principales: el embrión y el endospermo (Reiser & Fischer, 1993). La mayoría de las semillas ortodoxas atraviesan por una etapa de desecación hacia el final de su desarrollo, misma que es acompañada de una reducción global de actividad metabólica y disminución en expresión de genes, de modo que el embrión entra en un estado de latencia por un periodo de tiempo indefinido (Angelovici *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013).

Ya que la germinación tiene el propósito de reproducir la planta de la cual se originó la semilla, el embrión latente deberá reactivar sus funciones metabólicas como respuesta a la imbibición para continuar con sus procesos de desarrollo. Esto sugeriría que las semillas contienen algún tipo de memoria bioquímica, o que adquieren rápidamente la capacidad, para reiniciar los programas morfogenéticos que darán lugar al desarrollo de una nueva planta (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

* Parte de este capítulo fue publicado como: Sánchez-Camargo V. A. y Juárez-Díaz J. A. (2019) Ciclo celular durante la germinación. En: Guevara-Fefer P. (ed). *Un viaje alrededor de la semilla*. 153 pp. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Una de las estrategias de almacenamiento de información en las semillas consiste en la acumulación de RNAs mensajeros (mRNAs) específicos durante la etapa de maduración, mismos que se encargarán de sostener las primeras etapas de la germinación (Rajjou *et al.*, 2004; Angelovici *et al.*, 2010). Al embeber las semillas, esta información deberá ser discriminada de mRNAs residuales, posiblemente mediante traducción selectiva haciendo uso de factores de traducción específicos (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984; Beltrán-Peña *et al.*, 1995; Rajjou *et al.*, 2004; Fait *et al.*, 2006; Angelovici *et al.*, 2010). Sin embargo, para que la germinación sea exitosa, la expresión de los genes requeridos en etapas subsecuentes deberá ser establecida de manera adecuada (Rajjou *et al.*, 2004; van Zanten *et al.*, 2011).

Como consecuencia de la entrada de agua, las células en los tejidos de la semilla se elongan y posteriormente, comienzan a dividirse, proceso que lleva a la protrusión de la radícula, evento que marca el final de la germinación desde el punto de vista fisiológico (Spiegel & Marcus, 1975; Bewley *et al.*, 2013). A nivel bioquímico, la germinación requiere restablecer las condiciones adecuadas para el reinicio de la proliferación celular; por lo que en este trabajo se definirá a la germinación como una serie de procesos bioquímicos y moleculares que comienzan con la entrada de agua a la semilla y culminan con la conclusión de la primera ronda de ciclo celular exitoso (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

El tamaño de las plantas, al igual que el de los demás organismos pluricelulares, es determinado por el número, tamaño y organización tridimensional de las células que los constituyen. Respecto al número de células, este depende directamente de la cantidad de células que se dividen y su tasa de división, así como de la duración de la fase de proliferación celular durante la etapa del desarrollo en que se encuentre el órgano en cuestión o el organismo mismo (Sugimoto-Shirasu & Roberts, 2003). Ya que el eje embrionario de maíz está compuesto principalmente por el meristemo apical del tallo y de la raíz (Baíza *et al.*, 1989), durante la germinación, los procesos tanto de división como de expansión celular, así como de diferenciación, deberán ocurrir en estrecha coordinación entre sí para generar una nueva planta.

1.2. Ciclo celular

El ciclo celular típicamente comprende cuatro fases principales, incluyendo una fase inicial de crecimiento y acumulación de energía (G1), una fase de replicación del material genético de la célula (S), seguido de una fase de verificación de integridad del DNA replicado (G2) y una fase de condensación del material genético y su segregación entre dos nuevas células (M). Este ciclo, también conocido como ciclo mitótico y generalmente se asocia con la división celular, ya que la fase M está acoplada a cariocinesis y citocinesis. El ciclo celular mitótico da origen a dos células hijas con número cromosómico (n) y contenido de DNA nuclear (c) idénticos a los de la célula madre (Bertoli *et al.*, 2013; Matthews *et al.*, 2021). Además del ciclo mitótico existen variantes del ciclo celular, como la endoreduplicación, que serán discutidas a lo largo de este trabajo.

La progresión ordenada a través de las distintas fases del ciclo celular es regulada por múltiples mecanismos, entre los cuales se encuentra la fosforilación reversible de proteínas, interacciones proteína-proteína y degradación específica de proteínas vía proteasoma 26S (Dudits *et al.*, 2007). Los

principales actores de esta regulación son los complejos proteicos formados por las cinasas dependientes de ciclina (CDK), las cuales representan la subunidad catalítica del complejo, y otra subunidad reguladora, que, por aparecer y desaparecer periódicamente durante las distintas fases del ciclo celular, son denominadas ciclinas (CYC) (Evans *et al.*, 1983). Estos complejos (CYC/CDK) dirigen la progresión unidireccional del ciclo celular fosforilando proteínas clave para avanzar de una fase del ciclo a la siguiente (Dudits *et al.*, 2007).

1.3. Control transcripcional del ciclo celular

Los principales puntos de control del ciclo celular se encuentran entre las transiciones de las fases G1/S y G2/M, así como dentro de M, específicamente en el paso de metafase a anafase. Las proteínas que regulan las distintas fases del ciclo celular son controladas de manera rigurosa; uno de los principales modos de control es su expresión a manera de ondas transcripcionales cuyos picos coinciden con las transiciones G1/S, G2/M y M/G1. Con base en el trabajo realizado en *Saccharomyces cerevisiae*, se sugiere que las ondas de transcripción del ciclo celular forman redes reguladoras en que una onda es activada por la anterior, contiene activadores de la siguiente y, a su vez, activa la transcripción de represores de sí misma (Bertoli *et al.*, 2013). La red transcripcional de G1/S es la más estudiada y será el foco de atención para el desarrollo de este trabajo. Durante G1/S, la fosforilación de represores transcripcionales catalizada por complejos CYC/CDK, como la proteína de retinoblastoma (pRB), libera al heterodímero de proteínas E2F-DP permitiendo la activación de sus genes blanco de G1/S, entre los cuales resaltan genes necesarios para el inicio y avance de la replicación del DNA (fase S), además de otros genes que codifican ciclinas de G1, como las de tipo D. El incremento en abundancia de CYCDs durante G1/S refuerza un bucle de retroalimentación positivo, comprometiendo a la célula a un nuevo ciclo de división, impulsando la transición G1/S (Fig 1.1-A). Paralelamente, también se activa la expresión de represores transcripcionales de G1/S, que durante S formarán un bucle de retroalimentación negativa, deteniendo la expresión de genes de G1/S para evitar el reinicio de fase S (Fig. 1.1-B), siendo este un mecanismo crucial mediante el cual la familia E2F/DP salvaguarda la integridad del genoma (Bertoli *et al.*, 2013; Cuitiño *et al.*, 2019).

1.4. La familia E2F/DP en plantas

En plantas se han identificado reguladores de la transición G1/S que son estructural y funcionalmente similares a los de mamíferos. Entre las primeras proteínas reguladoras en ser descritas en *Arabidopsis thaliana* y otras plantas, se encuentran ciclinas relacionadas con las de tipo D de humano. Estas proteínas conservan un motivo LxCxE que participa en la unión con la proteína pRB (Dahl *et al.*, 1995; Soni *et al.*, 1995), ayudando a mediar su fosforilación por CDKs.

La identificación de estos componentes de la maquinaria de ciclo celular en plantas, así como una proteína con el motivo LxCxE en un geminivirus que infecta cereales, y que es capaz de interactuar con la proteína heteróloga pRB de humano (Xie *et al.*, 1996), llevó a suponer que las plantas no sólo poseen homólogos de pRB, sino que también podrían conservar miembros de la familia de factores

transcripcionales (FTs) E2F/DP. Poco tiempo después se logró identificar a distintos componentes de la vía, como la proteína RETINOBLASTOMA RELATED (RBR) (Graf *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996). Posteriormente, E2F (Ramírez-Parra *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 1999) y DP (Magyar *et al.*, 2000; Ramírez-Parra & Gutierrez, 2000) fueron caracterizados. Con esta evidencia se concluyó que en plantas la vía RBR-E2F-DP se encuentra activa, y actualmente se han reportado miembros en múltiples especies vegetales (Albani *et al.*, 2000; Chaboute *et al.*, 2000; de Jager *et al.*, 2001; Kosugi & Ohashi, 2002a; Mariconti *et al.*, 2002; Sabelli *et al.*, 2013; Rauber *et al.*, 2016).

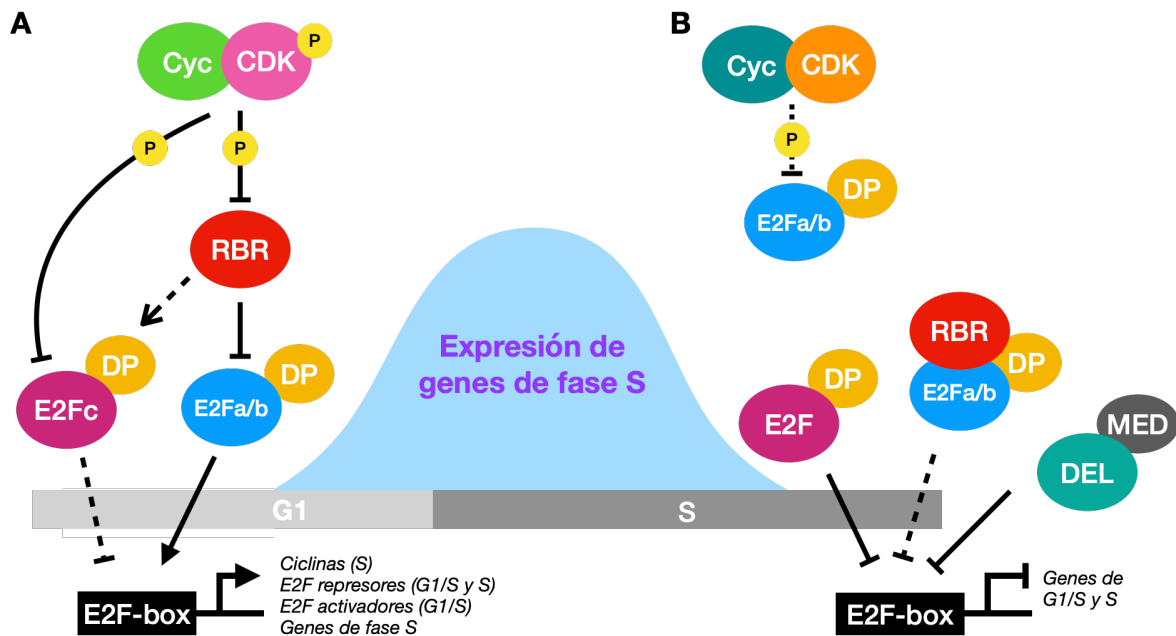


Fig.-1.1 | Red de regulación transcripcional de la transición G1/S del ciclo celular en plantas.

A. Bucla de retroalimentación positiva de G1/S. Una vez establecidas las condiciones adecuadas para entrada al ciclo celular, los complejos CYC/CDK de fase G1 se acumulan y al ser activados fosforilan a sus proteínas blanco, entre ellas los represores transcripcionales RBR y E2Fc; por un lado, liberando a los complejos E2F activadores, y por otro, estimulando la degradación de E2Fc, permitiendo el recambio por E2F activadores. Entre los genes activados durante G1/S se encuentran genes necesarios para el inicio de y avance de fase S, pero también otros como genes de ciclinas de G1/S y posiblemente de fase S (*e.g.* ciclinas A y ciclina E en mamíferos), además de genes de E2F represores como E2Fc y DEL (para mayor detalle ver siguiente sección). **B.** Bucla de retroalimentación negativa de fase S. La función de algunos genes expresados durante la ola transcripcional de G1/S, podría impedir la expresión de genes de avance de G1/S y establecimiento de S, para evitar estrés replicativo una vez iniciada dicha fase. Por su parte, CYC/CDKs de S podrían fosforilar a E2F activadores, ocasionando la disociación de estos complejos del DNA o desestabilizándolos, mientras que E2F represores como E2Fc y DEL los reemplazarían en promotores de G1/S y S, evitando así su expresión. Además, la asociación de RBR también podría contrarrestar la actividad de E2F activadores o potenciar la represión por E2Fc, impidiendo el reinicio de la fase S.

En *Arabidopsis* han sido descritas seis proteínas E2F y dos DP. Tres E2Fs de *Arabidopsis* (E2Fa, E2Fb y E2Fc) presentan una organización de dominios similar entre ellas y son conocidas también como

E2F típicas, incluyendo un dominio de unión a DNA, de dimerización con DP, de interacción con RBR y de transactivación (de Jager *et al.*, 2001; Mariconti *et al.*, 2002). E2Fa-c se encuentran relacionados estructuralmente con los miembros de la subfamilia E2F1–5 de mamíferos. E2Fa y E2Fb presentan propiedades de activadores transcripcionales, mientras que E2Fc podría actuar como un represor. Los tres genes restantes, llamados E2Fd/DEL2, E2Fe/DEL1 y E2Ff/DEL3, o atípicos, presentan dominios de unión a DNA duplicados, al igual que E2F7 y E2F8 de humano. Finalmente, el genoma de *Arabidopsis* codifica dos DP (DPa y DPb) relacionados con DP1 de humano y se componen de un dominio de unión a DNA y un dominio de dimerización con E2F. E2Fa-c dimerizan con ambos DP para formar heterodímeros funcionales con capacidad de unirse al DNA (Fig. 1.2). Sin embargo, únicamente DPa es capaz de estimular la localización nuclear de E2F (Kosugi & Ohashi, 2002b).

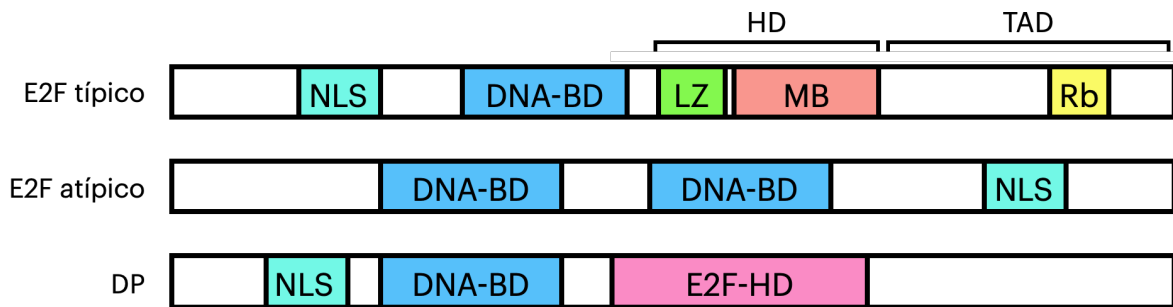


Fig.-1.2 | Organización de dominios y motivos proteicos de la familia E2F/DP. Los miembros típicos como E2F1-5 de humano o E2Fa-c de *Arabidopsis*, poseen un dominio de unión a DNA (DNA-BD), un dominio de heterodimerización con DP (HD) conformado por un zipper de leucinas (LZ) y *marked box* (MB), y un dominio de transactivación (TAD), que alberga un motivo de interacción con proteínas de la familia de RB (Rb). Los miembros E2F atípicos como E2F7-8 de humano y DEL1-3 de *Arabidopsis*, presentan dos dominios de unión a DNA y no dimerizan con DP. Por su parte, las proteínas tipo DP, como DP1-3 de humano y DPa y b de *Arabidopsis*, exhiben un dominio de unión a DNA (DNA-BD) y un dominio de heterodimerización con E2F (E2F-HD). Los tres tipos de proteínas de la familia E2F/DP pueden poseer o no señal de localización nuclear (NLS) en la región indicada, dependiendo del gen en cuestión. Los diagramas no se presentan escala.

De manera similar a los activadores transcripcionales de la familia E2F en mamíferos, se ha observado que el complejo E2Fa-DPa de *Arabidopsis* puede dirigir la entrada a fase S en células diferenciadas e inactivas mitóticamente (Rossignol *et al.*, 2002) y tanto E2Fa como E2Fb estimulan el ciclo celular en cultivos de células vegetales. Por su parte, la sobreexpresión constitutiva de E2Fa-DPa o E2Fb en plantas, ocasiona proliferación celular de manera ectópica y E2Fa-DPa también estimula endorreproducción (de Veylder *et al.*, 2002; Kosugi & Ohashi, 2003; Sozzani *et al.*, 2006). En contraste, la sobreexpresión de una forma estabilizada de E2Fc reduce la división celular y aumenta la endorreproducción (del Pozo *et al.*, 2006).

Los miembros tipo DEL no interactúan con proteínas tipo DP ni activan transcripción de genes, pero son capaces de antagonizar la función de E2F-DP y reprimir expresión genética uniéndose a los mismos sitios que E2F-DP (Kosugi & Ohashi, 2002c). DEL1 ha sido implicado en la supresión

de endorreduplicación a través de la regulación de un componente del complejo promotor de anafase, *CCS52A2* (Lammens *et al.*, 2009). También se ha sugerido la participación de E2F en procesos de desarrollo. Por ejemplo, para que la parte aérea de la plántula emerja del suelo después de la germinación, en ausencia de luz, el hipocótilo se elonga empleando como fuente de energía las reservas de los cotiledones (escotomorfogénesis); una vez alcanzada la superficie del suelo, la luz señala el cese de la elongación del hipocótilo etiolado y dispara la maduración de cloroplastos; en este punto la plántula continuará con su desarrollo obteniendo energía principalmente de la fotosíntesis (fotomorfogénesis). En la oscuridad, las células dejan de proliferar y se elongan, mientras que la luz estimula la proliferación celular. La presencia de luz juega papeles opuestos en la estabilidad de E2Fb y E2Fc, respectivamente. Mientras que la luz estimula la acumulación de E2Fb y degradación de E2Fc, la oscuridad estabiliza a E2Fc y disminuye los niveles de E2Fb. Debido a esto, se ha propuesto que E2Fc reprime la división celular en oscuridad y estimula elongación celular (del Pozo *et al.*, 2002). Por su parte, E2Fb incrementa la expresión de genes de G1/S así como la expresión de *DEL1*, permitiendo la transición de G2 a M y proliferación celular (del Pozo *et al.*, 2002; Berckmans *et al.*, 2011). Por otro lado, *DEL3* ha sido implicado en la regulación del crecimiento celular y regula la expresión de genes relacionados con la biogénesis de pared celular (Ramírez-Parra *et al.*, 2004). E2Fa y E2Fb también han sido relacionados con la regulación del tamaño celular, aunque a través de mecanismos distintos (He *et al.*, 2004; Sozzani *et al.*, 2006).

La secuencia consenso de unión a DNA de los heterodímeros E2F-DP en mamíferos ha sido establecida como TTTSSCGS (siendo S, C o G), sin importar el sentido respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) y localizándose en los primeros ~1000 pb río arriba del TSS (Tao *et al.*, 1997; Black & Azizkhan-Clifford, 1999; Zheng *et al.*, 1999; Kent *et al.*, 2017). Mediante análisis bioinformáticos, Ramírez-Parra y col. (2003) reportaron una secuencia más larga que la de mamíferos, distribuida a lo largo del genoma de *Arabidopsis* (TTTSSCGSS), la cual fue identificada en 5,765 genes (cerca del 23 % del total de genes de *Arabidopsis*). Sin embargo, análisis transcriptómicos de ciclo celular en cultivos celulares sincrónicos indicaron que sólo una fracción de estos blancos putativos muestran patrones de expresión compatibles con un papel en fase S (Menges & Murray, 2002), apuntando a que la presencia del motivo E2F consenso no es la única determinante para su expresión durante el ciclo celular (Wells *et al.*, 2000; Schlisio *et al.*, 2002; Weinmann *et al.*, 2002; Giangrande *et al.*, 2004).

Otro mecanismo crítico para el control del ciclo celular es la función de RBR, el cual es un represor transcripcional de los blancos de E2F. La represión mediada por proteínas de la familia de pRB se basa en la asociación al extremo carboxilo de E2F y el enmascaramiento de su dominio de transactivación (Lee *et al.*, 2002; Liban *et al.*, 2016). En *Arabidopsis*, se ha definido un motivo conservado de 17 aminoácidos en E2F que podrían participar en la interacción con RBR, DYWX_{7/8}S(M/I)TD(M/I)W (donde X representa cualquier aminoácido), aunque hasta la fecha no se cuenta con estudios de mutación detallados de esta secuencia (Ramírez-Parra *et al.*, 2007).

Además de su papel en ciclo celular, los FTs de la familia E2F/DP participan en procesos de diferenciación, reparación de daño en el DNA, respuesta inmune, entre otros (revisado en (Sánchez-Camargo *et al.*, 2021)). En el Anexo II de esta tesis, se presenta una revisión bibliográfica actualizada

sobre las funciones típicas y atípicas de la familia E2F/DP tanto en células animales como en plantas.

1.5. Control del ciclo celular durante la germinación de maíz

Actualmente se cuenta con amplio conocimiento del ciclo celular en especies vegetales, principalmente como resultado del estudio de plantas modelo como *A. thaliana* y *Oryza sativa*. Sin embargo, hasta ahora no existen estudios enfocados en entender la relación entre el ciclo celular y la germinación. En nuestro grupo de trabajo se ha hipotetizado que podría existir una conexión entre ambos procesos ya que se ha observado que durante la maduración de las semillas la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour & Jacqumard, 1974; Masubelele *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005). Por otro lado, la síntesis replicativa nuclear del DNA en embriones de maíz comienza entre las 12 y 15 horas después de la imbibición (hpi), teniendo un máximo de actividad hacia las 18 h, apareciendo las primeras figuras mitóticas a las 30 h, momento en que la protrusión radicular comienza (Vázquez-Ramos & Osborne, 1986; Baíza *et al.*, 1989; García-Ramírez *et al.*, 2006), por lo que se podría inferir que, posterior a la imbibición y hasta las 12 hpi las células del eje embrionario se encuentran en fase G1, entre 12 y 30 hpi transitarían hacia S/G2, para que finalmente, después de 30 hpi, ocurra la fase M.

No obstante, ha resultado intrigante que mRNAs de múltiples familias de reguladores del ciclo se encuentran presentes en la semilla seca y a lo largo de la germinación, desafiando el modelo clásico de regulación transcripcional del ciclo celular a modo de oleadas. Por ejemplo, de las 17 CYCD codificadas en el genoma de maíz, 15 se encuentran presentes durante las primeras 24 hpi (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008; Buendía-Monreal *et al.*, 2011); del mismo modo, productos de los 8 genes de inhibidores de CDK de la familia KRP han sido detectados en germinación (Godínez-Palma *et al.*, 2017). Adicionalmente, mRNAs de las familias de reguladores *CYCB*, *CDKA*, *CDKB*, *RBR*, entre otros, también se han encontrado presentes tanto en la semilla seca como después de la imbibición (Lara-Núñez *et al.*, 2017, 2021).

Por otro lado, también se ha estudiado la abundancia de numerosas proteínas de las familias antes mencionadas, así como sus asociaciones y actividad enzimática de algunas de ellas. En la semilla seca y a lo largo de la germinación se han identificado complejos CYCD-CDK con capacidad de fosforilar sustratos, incluso en asociación con PCNA y cromatina, indicando que estos podrían ser almacenados en forma activa (Herrera *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2002; Martínez-Mata, 2011; Garza-Aguilar *et al.*, 2017, 2019). Ya que los blancos canónicos de estos complejos son nucleares, actualmente se están realizando estudios de localización subcelular de complejos CYCD-CDK, así como de su actividad sobre diversos sustratos a lo largo de la germinación (Axosco-Marín, en preparación). También se han comenzado esfuerzos para entender la influencia del metabolismo de azúcares como glucosa y sacarosa, mediante el estudio de la vía de señalización de la cinasa TOR, sobre el ciclo celular, principalmente en las primeras horas post-imbibición. Dichos estudios pioneros indican que los azúcares podrían, además de ser fuente de carbono, operar como moléculas señalizadoras, dirigiendo a las células a procesos de proliferación o diferenciación, dependiendo del

carbohidrato en cuestión (Garza-Aguilar *et al.*, 2017; Lara-Núñez *et al.*, 2017, 2021; Díaz-Granados *et al.*, 2020).

Derivado de estas observaciones, el control de la transición G1/S durante la germinación sería un punto crucial para que las células, que recién han despertado de un periodo de latencia, se comprometan a la división celular para posteriormente dar paso a la germinación de la semilla.

2. Hipótesis

Durante la germinación de maíz, la transición G1/S podría ocurrir entre las 12 y 18 hpi. En este punto, genes y proteínas de la familia E2F se encontrarían expresados para regular el paso de G1 a S. Para ello, las proteínas E2F con función activadora, se asociarán a promotores de sus genes blanco para estimular su expresión. Una vez atravesada la fase S, proteínas E2F con función represora se asociarán a los mismos *loci* para reprimir la expresión de genes de G1/S y dicha asociación será dependiente de la secuencia de unión de E2F en el DNA. Lo anterior ocurrirá en un contexto de estructura de cromatina permisiva para transcripción durante G1/S, seguido de un estado cromatínico represivo una vez terminada la fase S, limitando así la expresión extemporánea de genes blanco de E2F.

3. Objetivo general

Caracterizar a la familia E2F/DP como reguladores del ciclo celular durante germinación de semillas de maíz.

3.1. Objetivos particulares

- ~ Establecer un modelo biológico para estudiar proliferación celular durante germinación.
- ~ Identificar los genes de la familia E2F codificados en el genoma de maíz.
- ~ Estudiar la dinámica de formación de complejos E2F-DP *in vitro*.
- ~ Estudiar la capacidad de complejos E2F-DP de asociarse con sitios E2F en el DNA.
- ~ Generar anticuerpos policlonales anti-E2F.
- ~ Identificar posibles genes blanco de E2F en el genoma de maíz.
- ~ Determinar la expresión de los genes blanco-putativos de E2F durante germinación.
- ~ Estudiar la dinámica de asociación de proteínas E2F a promotores blanco durante germinación.
- ~ Estudiar marcas de cromatina relacionadas con activación y represión transcripcional en promotores blanco de E2F a lo largo de la germinación.

4. Estructura de la tesis

El primer capítulo presenta una introducción breve sobre el ciclo celular y la función de la familia E2F/DP, así como conceptos básicos sobre germinación de semillas y antecedentes de ciclo celular en germinación de maíz.

El segundo capítulo se enfocó en definir a la germinación como un modelo adecuado para responder a nuestras interrogantes. Para ello, se estudió la temporalidad de las etapas de la germinación de la variedad de maíz Chalqueño y la morfología de las células en distintas regiones del eje embrionario. Las observaciones se centraron en la punta de la raíz, ya que es esta la primera estructura que protruye de la semilla y su meristemo apical es de los primeros en entrar en división celular después de la imbibición. Además, se estudió la expresión de posibles genes marcadores tanto de proliferación celular como de diferenciación. Con la información recopilada se pudo establecer que los primeros 2 mm de la punta de la raíz del eje embrionario pueden ser empleados para realizar estudios de ciclo celular durante germinación.

Una vez definido el modelo de estudio, el objetivo del tercer capítulo fue descubrir todos los genes tipo E2F que existen en el genoma de maíz, así como sus patrones de expresión durante germinación y en tejidos proliferativos o diferenciados de plántulas. Se estudió la formación de complejos entre algunas proteínas E2F y DP y se evaluó su capacidad de asociarse con diversos sitios E2F consenso en el DNA. Para llevar a término este capítulo se abordaron retos importantes, como la generación de anticuerpos anti-E2F y el establecimiento del protocolo de inmunoprecipitación de cromatina en muestras complejas y con escasas células, como la punta de la raíz del eje embrionario. Nuestras observaciones indicaron que podría existir una dinámica de ocupación de sitios E2F en promotores durante germinación; la cual involucraría a distintos miembros de la familia con funciones transcripcionales activadoras o represoras. Además, la ocupación de promotores de fase S por proteínas tipo E2F, coincide con la presencia del represor RBR en los mismos sitios, sugiriendo que RBR podría modular la actividad de E2F ya que, a pesar de existir un entorno de cromatina abierta en el promotor de los genes blanco, su expresión disminuye hacia el final de la germinación. De este proyecto, se desprendieron la tesis de licenciatura de Samantha Romero-Rodríguez (Facultad de Química, UNAM, 2019) y la tesis de maestría de Cassandra Suárez Espinoza (Facultad de Química, UNAM, 2019). En la primera, se demostró que distintas proteínas E2F de maíz pueden funcionar como activadoras o represoras de transcripción, respectivamente; mientras que la segunda presentó evidencia de la interacción de distintos E2Fs con el regulador RBR y la asociación de este último a promotores con sitios E2F durante germinación. En conjunto, estos resultados (discutidos en el capítulo 3) y los obtenidos en el presente proyecto de tesis, aportaron información que ayudará a entender mejor la posible conexión entre la vía E2F-DP-RBR y la transición G1/S con la germinación de maíz.

Finalmente, en el cuarto capítulo se presenta una discusión global con el objetivo de conectar los procesos que ocurren al final del desarrollo de la semilla y las primeras horas post-imbibición con la vía de E2F/DP. Además, se discute el concepto de la memoria bioquímica de la semilla y los mecanismos mediante los cuales podría estar gobernada, tales como el almacenamiento de mRNAs y su traducción selectiva al inicio de la germinación. También se analizan eventos propios de la

primera etapa de germinación que podrían ser regulados por la vía E2F/DP, como la reparación del DNA del embrión que precede al inicio de la replicación del genoma. Por otro lado, se manifiesta la importancia del metabolismo energético y la influencia de la vía de TOR sobre el ciclo celular, principalmente en la síntesis de DNA, posiblemente a través de la estimulación de la actividad de E2F y el concomitante aumento de la expresión de sus genes blanco para facilitar dicha fase. Esta línea de pensamiento pretende compartir con el lector la visión de que las dos etapas iniciales de germinación se relacionan estrechamente con la fase G1 y la transición G1/S, entre otros mecanismos, posiblemente a través de la vía E2F-DP-RBR, la cual actuaría como un nodo de integración de información que iría desde señales concernientes al estatus energético, hasta de integridad del genoma del embrión, permitiendo que las células del meristemo apical de la raíz se comprometan a la división celular y, en consecuencia, dando lugar a la protrusión radicular, *i. e.* germinación.

Capítulo 2

La raíz del eje embrionario de maíz como modelo biológico para estudios de proliferación celular y diferenciación*

Resumen

La germinación de las semillas se divide en tres fases caracterizadas por la tasa de entrada de agua. En semillas ortodoxas, la entrada de agua es la señal que dispara el inicio de la germinación, provocando una serie de cambios bioquímicos y moleculares que desembocan en la protrusión radicular a través de la testa de la semilla. En nuestro grupo de investigación se ha hipotetizado, además, que para que la germinación sea exitosa, es necesario el establecimiento del ciclo celular en tejidos del embrión latente. Anteriormente se han realizado estudios acerca de la regulación del ciclo en ejes embrionarios completos durante germinación. Sin embargo, el objetivo de esta tesis es profundizar en la función de la familia de factores transcripcionales E2F en el ciclo celular durante la germinación. Ya que en el eje embrionario podrían ocurrir de manera simultánea tanto procesos de proliferación como de diferenciación, resulta necesario distinguir aquellas regiones donde la proliferación celular se encuentra enriquecida y los procesos de diferenciación se encuentren menos representados y viceversa. El presente capítulo se enfocó en tratar de realizar dicha distinción. Como primer objetivo se definieron los tiempos de las fases de la germinación. Parámetros fisiológicos como el peso fresco y longitud del eje embrionario, así como la tasa germinativa y la aparición de pelos radicales en el eje embrionario indicaron que la primera fase comienza con la imbibición de la semilla y se extiende hasta 12 horas post-imbibición (hpi); la segunda fase ocurre entre 12 y 24 hpi, cuando comienza a protruir la radícula, para finalmente dar paso a la tercera etapa, donde ocurren eventos de diferenciación como la aparición de pelos radicales. También, se observó que células en la región que contiene al meristemo apical de la raíz (denominada CPD) no experimentan cambios importantes de tamaño después de la imbibición, mientras que células en la región adyacente (denominada CED), se elongan después de 28 hpi. Por otro lado, la estructura observada de núcleos celulares aislados de CPD coincide con la estructura de núcleos en división celular, sugiriendo que estos podrían encontrarse (arrestados) en ciclo celular en la semilla seca o entrando a ciclo celular a 15 hpi, mientras que núcleos de CED de ejes de 15 hpi muestran características de núcleos en diferenciación. Estudios de expresión mostraron que en los primeros 2 mm de la punta de raíz del eje embrionario, genes marcadores de proliferación se encuentran enriquecidos, mientras que en los 2 mm adyacentes su expresión es menor. De manera opuesta, un gen marcador de diferenciación de raíz se

* Parte de este capítulo se encuentra en preparación para publicación en colaboración con Dra. Karina Jiménez-Durán (USAH-Facultad de Química, UNAM) y Dra. Aurora Lara-Núñez (Departamento de Bioquímica, UNAM).

encontró poco expresado en la punta de la raíz, mientras que en la zona adyacente sus niveles fueron elevados. En conjunto, nuestras observaciones indican que los primeros 2 mm de la punta de la raíz del eje embrionario podrían emplearse para estudios de proliferación, mientras que la región adyacente, para estudios de diferenciación celular.

1. Introducción

La aparición de la semilla durante la evolución de las plantas es una de las innovaciones clave para su perpetuación y dispersión en un ambiente predominantemente seco. La reproducción sexual de las gimnospermas y angiospermas, así como del clado extinto de las pteridoespermatofitas, depende de la producción de semillas, las cuales se definen como la unidad estructural de reproducción y propagación (Linkies *et al.*, 2010).

La semilla es el producto de la fecundación del óvulo o, en el caso de la reproducción asexual, de la apomixis. En el grupo de las angiospermas, cuando el polen bi- o tri-nucleado interactúa con el estigma, germina y elonga el tubo polínico para alcanzar al gametofito femenino (el saco embrionario), comenzando así el proceso de la doble fertilización, dando origen a dos estructuras principales: 1) el cigoto ($2n$) y 2) el endospermo (Reiser & Fischer, 1993). Mientras que el cigoto resulta de la fusión de un núcleo espermático (n) con la célula huevo del arqueogonio (n), el endospermo es originado de la fusión del otro núcleo espermático (n) con los dos núcleos polares de la célula central del saco embrionario, conformando de manera típica una célula triploide ($3n$). Las semillas maduras de angiospermas comúnmente comprenden tres estructuras principales: 1) el embrión, que representa principalmente al esporofito; 2) los tejidos u órganos de almacenamiento que son los cotiledones (forman parte del embrión) y/o el endospermo; y 3) la testa, que es la estructura de protección.

Después de su formación, las semillas atraviesan por una última fase de maduración-deseccación que en la mayoría de las semillas ortodoxas señala el cese del desarrollo de la semilla (Bewley *et al.*, 2013) y está acompañada por una reducción de la actividad transcripcional global (Fait *et al.*, 2006). Una vez ocurrido el periodo de maduración-deseccación, las semillas permanecen en un estado de quiescencia de duración variable. Al ser provistas con agua, temperatura permisiva, oxígeno y otros estímulos ambientales necesarios, las semillas se embeben, incrementan su metabolismo y finalmente completan la germinación mediante la protrusión de una parte del embrión a través de la testa, generalmente la radícula.

La germinación es un proceso que consta de tres fases, comúnmente llamadas hidratación (fase I), germinación (fase II) y crecimiento (fase III) (Bewley *et al.*, 2013). La fase I es rápida, mecánica e independiente del estado metabólico de la semilla, incluso ocurre en semillas muertas. En ésta, se producen rupturas en las membranas internas debido al cambio estructural de los lípidos de la membrana como consecuencia de las fuerzas de hidratación de los tejidos embrionarios, de las paredes celulares y de los organelos. Al reactivarse secuencialmente las funciones celulares, comienza la síntesis de proteínas a partir de moléculas de mRNA almacenadas durante el secado de la semilla y posteriormente, ocurre la transcripción *de novo* tanto de mRNAs como de RNAs de trans-

ferencia y ribosomales. El incremento en la absorción de agua también está acompañado de un aumento proporcional en la actividad mitocondrial debido a la reparación de estos organelos y hay un incremento de la actividad respiratoria, esencial para la obtención de energía necesaria para la siguiente fase (Bove *et al.*, 2002; Bewley *et al.*, 2013). La fase II es lenta y acompaña a los procesos metabólicos descritos anteriormente. Durante esta fase se observa una reducción casi total en la entrada de agua a la semilla, disminuyen los procesos de reparación, incrementa el número de mitocondrias, comienza la replicación del DNA y normalmente, es en esta fase cuando comienza la protrusión de la radícula (Elder & Osborne, 1993). La fase III se considera como un evento tardío, es una fase rápida que se relaciona con la elongación celular previa a la división. En este punto comienza la movilización de reservas de la semilla e inicia el crecimiento de la planta, por lo que depende también de factores externos, tales como la temperatura, calidad e intensidad de la luz, entre otros, así como de señales químicas, como hormonas (Elder & Osborne, 1993; Bewley *et al.*, 2013).

El proceso germinativo involucra la reactivación del metabolismo y el reinicio de los procesos de desarrollo, implicando que las semillas ya contienen o adquieren rápidamente una memoria bioquímica, posiblemente en forma de mRNAs y enzimas almacenadas, así como características epigenéticas que permiten la expresión selectiva de determinados genes, para llevar a cabo el programa morfogénico que dará lugar al desarrollo de la nueva planta. En el caso de semillas ortodoxas, como la de maíz, para que la germinación se establezca, únicamente se requiere de la entrada de agua (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1982), lo cual desencadena la expansión celular en tejidos de la semilla y posteriormente, las células de los tejidos meristemáticos comienzan a dividirse, proceso que lleva a la protrusión de la radícula, marcando el final de la germinación desde el punto de vista fisiológico (Spiegel & Marcus, 1975; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003; Bewley *et al.*, 2013). Por lo tanto, la emergencia de la radícula se debe inicialmente a la elongación celular (consecuencia de la hidratación) y posteriormente, a la proliferación.

Las células meristemáticas generalmente se encuentran entre las primeras células en ser reactivadas metabólicamente y también son las primeras en entrar en división celular (Baíza *et al.*, 1989). Las evidencias experimentales indican que la división celular no es necesaria para que la germinación visible ocurra. Sin embargo, el establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para que el crecimiento y el desarrollo de la planta se lleven a cabo (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003; Bewley *et al.*, 2013).

El ciclo celular eucarionte típicamente comprende cuatro fases. En la fase G1, la célula percibe e integra señales ambientales e internas, las cuales inducen una serie de cambios transcripcionales para iniciar la fase S (de síntesis), dando lugar a la duplicación del material genético. En la fase G2, verifica que todo el genoma se haya duplicado correctamente para que, finalmente en la fase M (de mitosis), el material genético se reparta de manera equitativa para formar dos nuevas células (Matthews *et al.*, 2021). Se ha reportado previamente que, durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del embrión son arrestadas en la fase G1 del ciclo, permaneciendo en esta fase en la semilla seca (Deltour & Jacquard, 1974; Masubelele *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005). También se ha observado que en ejes embrionarios de maíz la síntesis replicativa de DNA nuclear comienza entre las 12 y 15 horas después de la imbibición (hpi), teniendo un máximo de actividad

hacia las 18 hpi y apareciendo las primeras figuras mitóticas tras 30 hpi (Vázquez-Ramos & Osborne, 1986; Georgieva *et al.*, 1993; García-Ramírez *et al.*, 2006), apuntando a un posible vínculo entre la germinación y el ciclo celular.

En etapas posteriores a la germinación, la planta comienza o continua con sus programas genéticos de crecimiento y de desarrollo. El ciclo celular, además de generar las células que formarán los nuevos tejidos, también juega un papel crucial en procesos de desarrollo haciendo uso de variantes especializadas (Sugimoto-Shirasu & Roberts, 2003; Ishida *et al.*, 2009). Por ejemplo, durante el desarrollo de endospermo de maíz, posterior a la doble fertilización, ocurre la formación de un sincicio mediante mitosis acitocinéticas, que posteriormente será celularizado y entrará en rondas sucesivas de endorreduplicación, ciclo especializado en que las células transitan por las fases G1, S y G2, omitiendo la fase M, resultando en células poliploides (Sabelli & Larkins, 2009). Otro ejemplo es la raíz primaria, en la cual se pueden definir tres zonas, una de proliferación o meristemo apical (distal), una de elongación y otra de diferenciación (proximal). Mientras que en la primera zona ocurren divisiones celulares mitóticas ($2n$), en la zona de diferenciación las células de la epidermis acumulan material genético mediante endorreduplicación (células poliploides) (Hayashi *et al.*, 2013; Hochholdinger *et al.*, 2018). Aunque la función específica de la endorreduplicación no es del todo entendida, se ha podido relacionar tanto con el tamaño celular, como con dosis génica en tejidos con altas tasas metabólicas o metabolismos especializados (Lee *et al.*, 2009). Existen genes marcadores asociados con funciones especializadas en las distintas regiones de la raíz. En el caso de la zona de diferenciación de la raíz, el gen *Roothairless-6 (RTH6)* ha sido descrito por su papel en la elongación de pelos radicales después de haber brotado, ya que codifica para una calosa sintasa involucrada en la remodelación de la pared celular y cuya expresión se confina a la región de diferenciación de la raíz en plántulas de maíz (Li *et al.*, 2016; Hochholdinger *et al.*, 2018).

El objetivo principal de este capítulo es aportar evidencia que ayude a proponer a la germinación (de maíz) como un modelo biológico para realizar estudios tanto de ciclo celular como de diferenciación, en contextos que van desde el fisiológico, tisular y celular, hasta el molecular. Para ello, se midieron algunos parámetros fisiológicos de la germinación tales como la toma de agua y longitud del eje embrionario, así como la aparición de pelos radicales como indicador de diferenciación. Para realizar estudios más detallados, la raíz fue dividida en dos secciones: la primera, que incluye al meristemo apical y con una posible tasa proliferativa elevada, fue denominada dominio de proliferación celular (CPD, por sus siglas en inglés); la segunda sección, con una posible tasa proliferativa menor que CPD, pero con una tasa de elongación mayor, fue nombrada dominio de elongación celular o CED (nomenclatura basada en Ivanov & Dubrovsky, 2012). En CPD, encontramos que no existen cambios importantes en el tamaño de las células a lo largo de la germinación. Por el contrario, células en CED atravesaron por un incremento de longitud importante a 28 hpi. También se estudió la morfología del núcleo de estas células y se observó que únicamente núcleos provenientes de CED incrementan su tamaño y su morfología cambia a 15 hpi. Al analizar la expresión de genes marcadores de proliferación y diferenciación en distintas zonas de crecimiento de la raíz del eje embrionario, estos se encontraron expresados de manera diferencial tanto a tiempos tempranos como tardíos, indicando que, a pesar de no encontrar evidencias morfológicas a nivel de tejidos, los procesos de diferenciación podrían ser disparados (a nivel molecular) de manera temprana al ocurrir la

imbibición. Finalmente, la expresión de genes marcadores coincidió con los patrones morfológicos de los núcleos celulares. Los datos recopilados en este capítulo apuntan a que la raíz de semillas en germinación, específicamente CPD, podría emplearse como modelo biológico para estudiar ciclo celular. Por su parte, la región adyacente CED, podría emplearse para el estudio de eventos tempranos de diferenciación.

2. Materiales y métodos

2.1. Germinación de semillas y cosecha de ejes embrionarios

Semillas de maíz V. Chalqueño (lote 2017) fueron seleccionadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio 1.5 % v/v en agitación constante por 5 min, seguido de un lavado de solución Sin-Bac® (1-bromo-3-cloro-5,5-dimetilhidantoina) 5 % y se enjuagaron con agua desionizada. Lotes de 10 semillas se acomodaron en filas entre dos capas dobles de toallas de papel, se enrollaron y se humedecieron con agua desionizada. Los rollos con semillas se colocaron en un vaso de precipitados con agua desionizada y se incubaron a 25° C en oscuridad (Mendez-Natera *et al.*, 2008). Una vez transcurrido el tiempo de germinación, los embriones fueron extraídos de la semilla con ayuda de un escalpelo y colocados sobre una toalla de papel húmedo durante el procedimiento. Los ejes embrionarios fueron separados del escutelo y colectados en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml para su posterior procesamiento.

2.2. Mediciones de ejes embrionarios

La tasa de germinación fue calculada embebiendo dos grupos de 50 semillas, considerando como germinadas aquellas semillas cuya raíz hubiese protruido a través de la testa. El peso fresco fue determinado pesando 100 ejes embrionarios de manera individual en una balanza analítica. La longitud se midió a partir de fotografías de los ejes embrionarios tomadas en compañía de una referencia de escala, empleando el software ImageJ V1.51 (Schneider *et al.*, 2012). La presencia de pelos radicales se determinó a simple vista y en casos especiales se empleó un microscopio estereoscópico para corroborar.

2.3. Cortes histológicos

Tres ejes embrionarios por cada tiempo de germinación fueron procesados siguiendo el protocolo reportado por García-Ayala (2017). Brevemente, los ejes fueron tratados con solución fijadora (formaldehído 4 %, etanol 50 %, ácido acético glacial 10 %) y deshidratados en concentraciones ascendentes de etanol (70 % a 100 %). Posteriormente, el tejido se aclaró con etanol-xilol (3:1, 1:1, 1:3) y xilol puro. Los ejes se infiltraron con xilol-paraplast y paraplast puro, solidificando en forma de bloque. Los bloques fueron cortados en microtomo rotatorio a 4-6 μm de grosor, los cortes fueron

colocados en portaobjetos para posteriormente ser desparafinados a 60° C y se trataron con xilol. Finalmente, los cortes fueron hidratados gradualmente en concentraciones decrecientes de etanol (100 % a 30 %) y se tiñeron con safranina y verde rápido. Las preparaciones fueron montadas y observadas bajo microscopio óptico.

2.4. Aislamiento y medición de núcleos celulares

Ejes embrionarios de lotes de 20 semillas (secas o germinadas) fueron cosechados y se colectaron 2 mm de la punta de la raíz del eje embrionario (CPD) y los 2 mm adyacentes (CED). El aislamiento de núcleos se basó en el protocolo reportado por Pavlova y col. (2010). Brevemente, se pulverizó el tejido en nitrógeno líquido y fue transferido a tubos de 1.5 ml para ser fijado durante 20 min con formaldehído 4 % en PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4). Las muestras se centrifugaron 5 min, 500 xg a 4° C, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados adicionales con PBS. Los precipitados se resuspendieron en buffer NIB (10 mM Tris-HCl pH 9.5, 500 mM sacarosa, 100 mM KCl, 10 mM EDTA, 4 mM espermidina, 1 mM spermine) adicionado con 0.1 % de β-mercaptoetanol. Los núcleos se filtraron en serie, primero con maya de nylon de 100 μm y posteriormente 40 μm. El filtrado se centrifugó 3 min, 500 xg a 4° C. Posteriormente, el sobrenadante se decantó suavemente y los precipitados conteniendo los núcleos se lavaron con buffer NIBT (NIB adicionado con 1 % tritón X-100). Los núcleos fueron teñidos en NIB con Hoechst 33342 (1 μg/ml) durante 10 min en oscuridad, enseguida se realizaron tres lavados con NIB sin aditivos. Finalmente, los núcleos se resuspendieron en NIB y se realizaron preparaciones fijas para microscopía que fueron almacenadas en oscuridad hasta su análisis bajo el microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus).

Las mediciones se llevaron a cabo en ImageJ utilizando como referencia la escala del microscopio. Por cada tiempo y sección de ejes embrionarios se midieron entre 700 y 1000 núcleos.

2.5. Extracción de RNA total

Se colectaron 50 ejes embrionarios provenientes de semillas secas o embebidas (15, 28 y 54 h) y sus raíces fueron disectadas (ver sección 3.7 de este capítulo para mayor detalle). Las muestras se pulverizaron en nitrógeno líquido y se extrajo RNA total mediante TRIzol Reagent (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA fue tratado con 10 unidades de DNaseI (Invitrogen) y se purificó con el kit FavorPrep Total RNA Mini Kit (Favorgen), siguiendo el protocolo para limpieza de muestras. El RNA se eluyó dos veces con agua grado biología molecular. Finalmente, se cuantificó a 260 nm mediante una dilución 1:10.

La integridad del RNA purificado se monitoreó mediante electroforesis, para ello se cargaron 500 ng de RNA en un gel de agarosa 2.0 % en TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acetato, 1 mM EDTA) teñido con bromuro de etidio (1 μg/ml). El gel fue observado bajo luz UV con ayuda de un transiluminador y documentado en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

2.6. Síntesis de cDNA

Para sintetizar cDNA de las muestras de eje embrionario se partió de 5 µg de RNA total previamente purificado. Como cebador se empleó oligo dT₍₁₈₎ y se utilizó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como control negativo se trató una muestra de RNA purificado sin añadir la enzima transcriptasa reversa.

2.7. PCR en Tiempo Real

La expresión de los genes *E2Fa/b1;1*, *roothairless-6 (RTH6)* y *EF1-a* fue determinada empleando como templado para PCR cuantitativo las muestras de cDNA de la sección anterior (RT-qPCR). Para ello, se prepararon reacciones con el cDNA equivalente a 10 ng de RNA retrotranscrito, empleando el kit 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix Plus (ROX) (Solis Biodyne) y se corrió el programa recomendado por el fabricante: desnaturalización inicial 98° C 8 min, 40 ciclos (95° C 15 s, 60° C 30 s), en el aparato Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ThermoFischer). Para calcular expresión absoluta, se realizaron curvas de calibración para cada juego de oligos empleando 0.2, 1.0, 5.0 y 25 ng de cDNA de eje completo proveniente de semilla seca. Como control negativo se empleó RNA sin tratamiento con transcriptasa reversa. Para cada muestra de cDNA se realizaron tres réplicas experimentales.

Los cebadores utilizados fueron: (secuencia de 5' a 3') qFE2F1;1-GCTGTTGTGAAGATTGGC-GAGG, qRE2F1;1-AATGGAGCAGGGATGAATGAGCA; rth_F- CTGGGTGCTTGCTCATC-TGT, rth_R-GTTGGCAGCTTGTGATGGAG (Li *et al.*, 2016); qFEF1-a-TGGGCCTACTGG-TCTTACTACTGA, qREF1-a-ACATACCCAGCGTTCAGATCCT (Lin *et al.*, 2014). Los productos de un experimento de PCR fueron secuenciados para corroborar la especificidad de cada juego de cebadores.

3. Resultados

3.1. El peso fresco del eje embrionario sigue una cinética de toma de agua similar a la de la semilla y el escutelo

Ya que el modelo biológico de este proyecto es el eje embrionario de maíz, se caracterizaron algunos procesos fisiológicos relacionados con la germinación. La primera incógnita por responder fue si el contenido de agua en el eje sigue una tendencia similar a la de la semilla completa y a la del embrión (escutelo y eje) reportada previamente (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998; López-Coria *et al.*, 2019). Para ello, se embebieron tres lotes de semillas de maíz y fueron incubados en la oscuridad, una vez transcurrido el tiempo establecido, se extrajeron los ejes embrionarios y se determinó su peso fresco. En la Fig. 2.1 se muestra la distribución del peso de los ejes a lo largo de la germinación, en la gráfica se puede identificar un primer incremento en peso desde la primera hora post-imbibi-

ción que permanece sin cambios hasta 12 hpi, cuando se observa un segundo incremento que se mantiene constante después de 21 h. Finalmente, a partir de 24 hpi el peso fresco del eje continúa incrementando hasta las 54 h estudiadas. De manera similar al embrión, el eje embrionario también muestra una cinética de toma de agua marcada por incrementos en peso seguidos de fases estacionarias, sugiriendo que la hidratación del eje ocurre de manera regulada (Fig. 2.1).

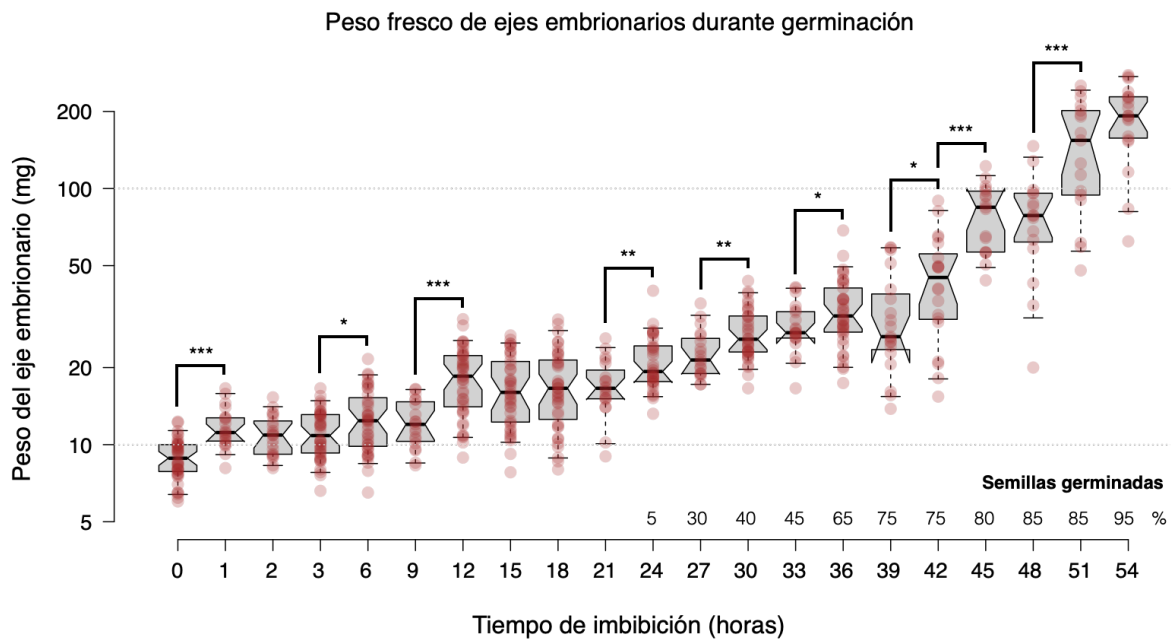


Fig.-2.1 | Incorporación de agua a los ejes embrionarios durante la germinación. Peso fresco de ejes provenientes de semillas secas o embebidas durante diferentes tiempos. El porcentaje de raíces protruidas se muestra sobre los tiempos de imbibición correspondientes. El experimento fue realizado por duplicado embebiendo 50 semillas por cada tiempo. Las medias cuyas diferencias son estadísticamente significativas se indican con asteriscos (prueba *t* de Student: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3.2. Cambios en longitud del eje embrionario acompañan al inicio de la germinación visible

Ya que el incremento de peso fresco podría relacionarse con la elongación celular (Sugimoto-Shirasu & Roberts, 2003), se midió la longitud de ejes embrionarios a lo largo de la germinación para saber si existe dicha relación. A diferencia del peso fresco, la longitud del eje embrionario permanece sin cambios importantes hasta las 24 hpi (Fig. 2.2), cuando ocurre un ligero incremento en tamaño que coincide con el inicio de la germinación visible (5 %; Fig. 2.2). A partir de este momento, la longitud de los ejes comienza a incrementar, alcanzando el 50 % de protrusión radicular entre las 33 y 36 hpi. Finalmente, la tasa de incremento en longitud continuó hasta las 54 h estudiadas, lo cual es consistente con el incremento en peso fresco y el incremento en porcentaje de germinación (Fig. 2.2).

3.3. La protrusión radicular es seguida por la aparición de pelos radicales en el eje embrionario

En semillas ortodoxas, las primeras 2 fases de la germinación son etapas germinativas, mientras que la tercera es post-germinativa y es en esta última cuando comienzan a ocurrir eventos de diferenciación celular (Bewley *et al.*, 2013). Un indicador de diferenciación empleado frecuentemente en maíz y otras plantas es la presencia de pelos radicales, que, durante el desarrollo del sistema radical, aparecen como protrusiones provenientes de células epidérmicas en la zona más alejada del meristemo apical de la raíz (Hochholdinger *et al.*, 2018). En maíz, después de 39 hpi aproximadamente 75 % de las raíces han protruido y la tasa de elongación del eje embrionario se mantiene constante, por lo cual nos preguntamos si también los procesos de diferenciación podrían estar teniendo lugar en las raíces de los ejes embrionarios. Para resolver dicha interrogante, semillas fueron embebidas durante distintos tiempos y las raíces protruidas se analizaron bajo microscopio estereoscópico, en busca de pelos radicales. Las observaciones realizadas indicaron que después de 39 hpi los pelos radicales comenzaron a desarrollarse (5 %), y una vez transcurridas 45 hpi, hasta un 50 % de las raíces mostraron la presencia de dichas estructuras (Fig. 2.2), sugiriendo que los programas de diferenciación de la raíz comienzan de manera inmediata a la protrusión radicular o incluso antes.

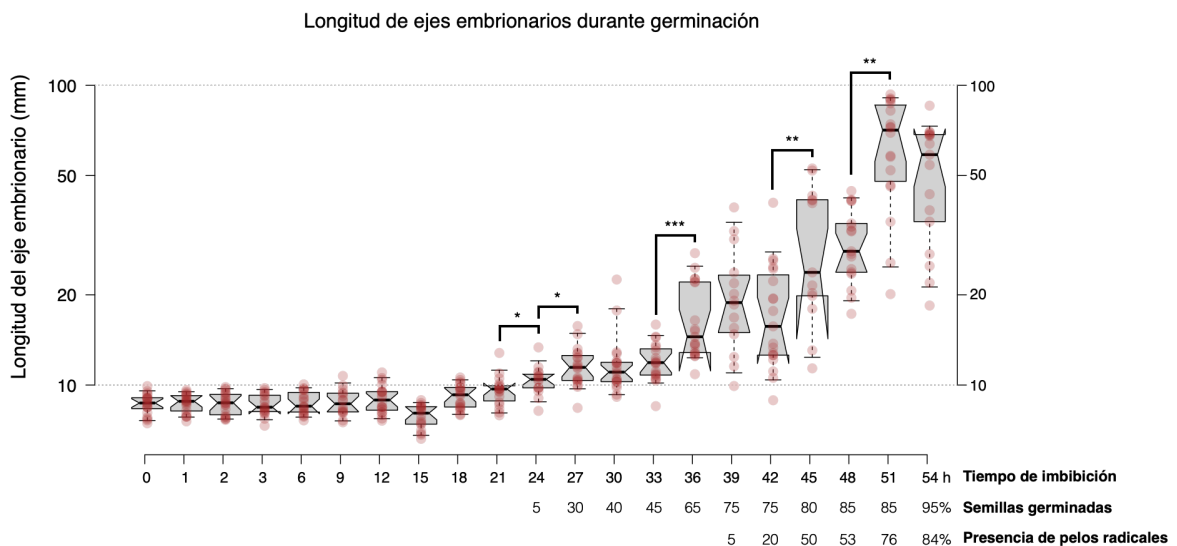


Fig.-2.2 | Longitud de ejes embrionarios durante germinación y plántulas post-germinación. Ejes embrionarios provenientes de semillas secas o embebidas durante diferentes tiempos, así como plántulas (posterior a protrusión radicular) se midieron digitalmente desde la punta de la plúmula (parte aérea) a la punta de la raíz. El experimento fue realizado por duplicado con 50 semillas por tiempo. Los porcentajes de germinación y presencia de pelos radicales se indican bajo los tiempos correspondientes. Las medias estadísticamente diferentes se indican con asteriscos (prueba *t* de Student, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3.4. Durante la germinación ocurren cambios de tamaño celular en zonas específicas del eje embrionario

Para conocer si a nivel celular también ocurren cambios importantes en etapas tempranas de la germinación, se colectaron ejes embrionarios provenientes de semillas secas o embebidas por 28 h, momento en que el primer incremento en longitud ha ocurrido y la germinación comienza a ser evidente (>30 % de raíces protruidas). Los ejes fueron fijados en solución FAA, embebidos en parafina y se realizaron cortes histológicos. Los cortes fueron teñidos con safranina y verde rápido para definir estructuras como núcleo y citoplasma, respectivamente, además de las paredes celulares. Siguiendo los patrones histológicos reportados por García-Ayala (2017), la raíz del eje embrionario se dividió en dos secciones de 2 mm aproximadamente. Así, el meristemo apical de la raíz se encuentra contenido en la región apical o dominio de proliferación celular (CPD), mientras que en la región adyacente o dominio de elongación celular (CED) se encontraría la región donde células epidérmicas se elongan (Fig. 2.3-A). Las observaciones en CPD se enfocaron en células del centro quiescente, adyacentes a la cofia. En CED se analizaron las células de la epidermis, ya que aparecen como una hilera regular de células, siendo fácilmente distinguibles y son estas células donde los pelos radicales se originan. Los cortes histológicos mostraron que las células epidérmicas en CPD son de forma cuadrada con diámetros similares y su tamaño no varía significativamente entre los dos tiempos estudiados (Fig. 2.3-B y C). Por su parte, las células en CED en la semilla seca presentan una forma aplanada, mientras que a 28 hpi se observa un incremento en el radio ápico-basal, adquiriendo una forma cuadrangular con radios similares (Fig. 2.3-B y C). Las observaciones anteriores refuerzan la idea de que la protrusión radicular se podría relacionar con la elongación celular, que ocurre principalmente en la zona proximal de la raíz y a su vez, con el incremento de peso fresco.

3.5. Núcleos celulares en el eje embrionario atraviesan por cambios morfológicos durante germinación

Para saber si existen otras diferencias entre las células de las diferentes zonas de la raíz del eje embrionario, se estudió también el tamaño y morfología del núcleo celular. Para ello, se colectaron ejes embrionarios provenientes de semilla seca o embebidas por 15 y 30 h, respectivamente y se optimizaron las condiciones para el aislamiento y tinción de los núcleos. Tras numerosos ajustes, únicamente fue posible obtener núcleos íntegros de semilla seca y de 15 hpi. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342, el cual es un colorante similar a DAPI, altamente permeable a membranas que se intercala con DNA de doble cadena (Garner, 2009); una vez teñidos fueron montados en preparaciones temporales y visualizados bajo microscopio confocal (UV). Las observaciones mostraron que los núcleos provenientes de semilla seca tanto de CPD como de CED, así como aquellos aislados de CPD de 15 hpi, presentan una forma esférica irregular, con zonas densamente teñidas o cromocentros (Fig. 2.4-A). Además, en éstos se observa un arreglo de cromatina característico de células quiescentes o en fase G1 del ciclo celular con forma de dona, con una región central sin teñir, que podría corresponder al nucléolo (Mineur *et al.*, 1998; Pontvianne *et al.*, 2016). Por otro

lado, tanto en CPD como en CED se observó un incremento del diámetro nuclear después de 15 h de imbibición; además, en CPD no se observaron cambios mayores en la morfología del núcleo en los tiempos estudiados. En contraste, los núcleos provenientes de CED mostraron cambios en la organización de cromocentros, los cuales parecieran localizarse en la periferia del núcleo al observar distintos planos bajo el microscopio confocal (Fig. 2.4-A).

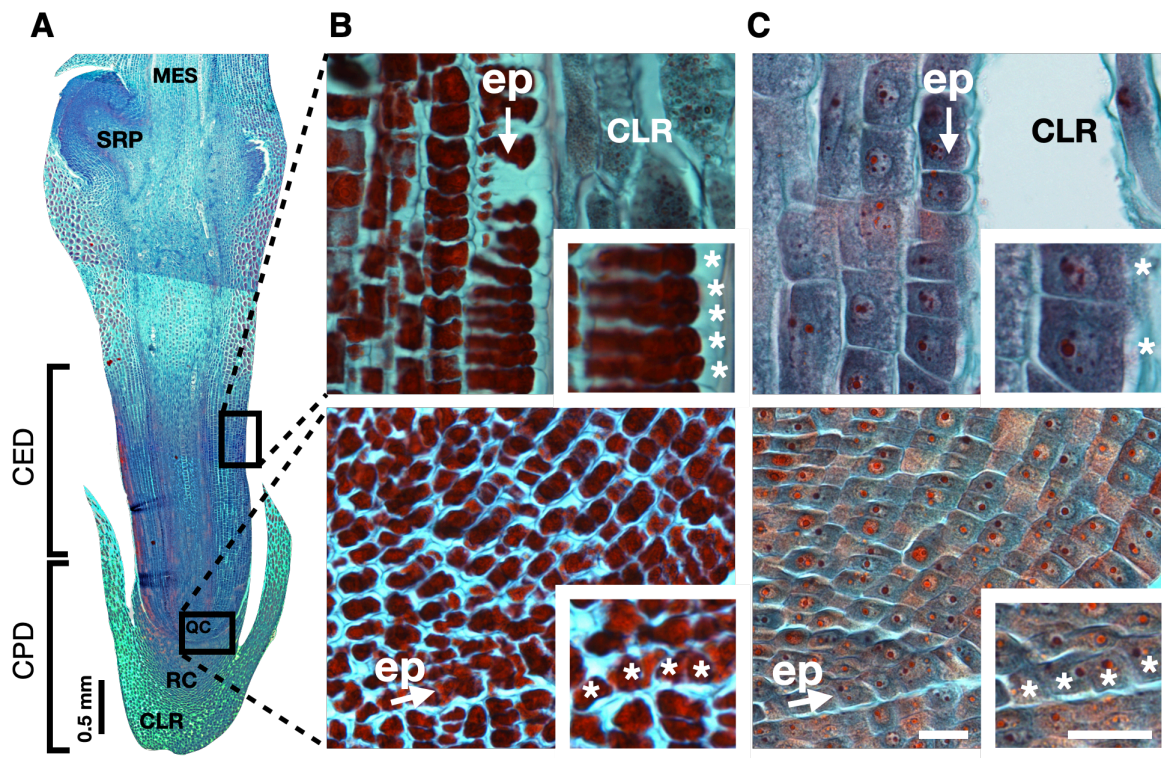


Fig.-2.3 | Tamaño celular en zonas de crecimiento de la raíz del eje embrionario. **A.** Corte longitudinal de la región de la raíz del eje embrionario obtenido de semilla seca. Se indican las regiones a comparar (CPD y CED) y los sitios donde se realizaron acercamientos; barra de escala 0.5 mm. Se realizaron cortes en raíces provenientes de semillas secas (columna **B**) o embebidas durante 28 h en agua (columna **C**). En las imágenes correspondientes a CED (paneles superiores) se señala con una flecha la hilera de células epidérmicas (ep) y en CPD (paneles inferiores) se indican las mismas células a la altura del prospectivo centro quiescente (QC). En los insertos en B y C se muestran acercamientos a las células de la epidermis para contrastar los tamaños celulares entre CPD y CED antes y después de la imbibición; cada asterisco señala una célula. Éstas son imágenes representativas de tres experimentos de germinación independientes. Barras de escala en C (20 μm) también corresponden a los cortes histológicos en B. MES, mesocotilo; SRP, primordio de raíz seminal; RC, cofia; CLR, coleoriza. La imagen A fue proporcionada por la Dra. Aurora Lara-Núñez de la Facultad de Química, UNAM (artículo en preparación).

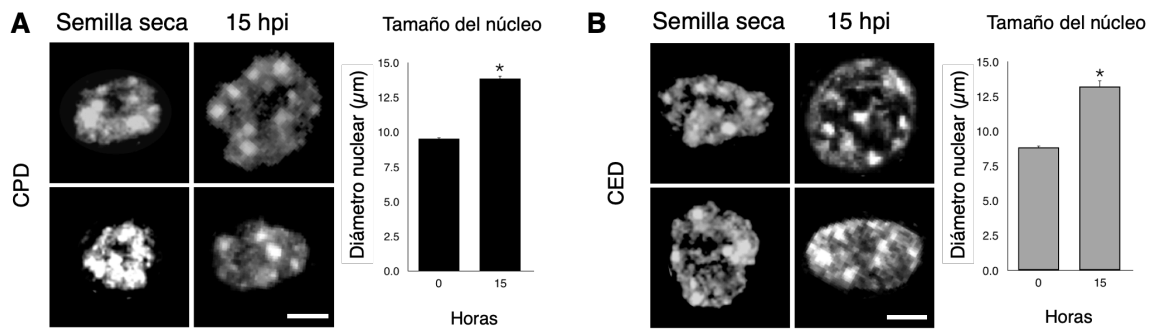


Fig.-2.4 | Morfología y tamaño de núcleos celulares durante la germinación. Núcleos en solución aislados de CPD (A) y CED (B), partiendo de 20 ejes embrionarios de semillas secas o embebidas en agua durante 15 h. Las imágenes de los distintos planos obtenidos con el microscopio confocal fueron apiladas digitalmente en el eje Z y se midió el diámetro máximo con el software ImageJ. Se muestran dos imágenes representativas de los núcleos por cada tiempo de imbibición. Las gráficas muestran el diámetro nuclear promedio de cuatro réplicas biológicas (700-1000 núcleos fueron medidos por cada réplica). Barra de escala: 5 μm. Los datos fueron analizados mediante la prueba *t* de Student (* $P < 0.001$).

3.6. Genes marcadores de proliferación y diferenciación se expresan diferencialmente en distintas zonas de la raíz del eje embrionario durante la germinación

Estudios previos en nuestro grupo de trabajo indican que durante la germinación de maíz la transición entre fases G1/S del ciclo celular podría ocurrir entre 12 y 18 hpi, momento en que la actividad de DNAPol- δ (polimerasa replicativa nuclear) muestra un incremento significativo (García-Ramírez *et al.*, 2006). Para robustecer dicha hipótesis, se estudió la expresión de un gen de la familia E2F, factores transcripcionales conocidos por su papel en la regulación de la transición G1/S. Además, se estudió la expresión de un gen marcador de zona de raíz y un gen constitutivo, tanto en CPD como en CED. Para ello, se extrajo RNA total de las dos secciones de ejes embrionarios de semilla seca o embebidas por 15 y 28 h y se midió la expresión de genes mediante RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados mostraron un incremento gradual en la expresión de *E2Fa/b1;1* tanto en CPD como en CED a lo largo de la germinación, siendo la expresión en CPD la más representada. Por el contrario, el gen marcador de diferenciación *RTH6* (*Roothairless-6*), que codifica para una enzima calosa sintasa involucrada en el desarrollo temprano de pelos radicales en maíz (Li *et al.*, 2016), se vio enriquecido en CED a las 15 h, pero a diferencia del patrón de acumulación de E2F, *RTH6* mostró una caída importante a las 28 h, regresando a niveles cercanos a los de semilla seca (Fig. 2.5). Inesperadamente, *EF1-a* (*Elongation Factor 1-alpha*), seleccionado por ser un gen cuya expresión no varía en diversos tejidos ni bajo múltiples condiciones (Lin *et al.*, 2014), mostró un patrón similar al de *E2Fa/b1;1*, incrementando en ambas zonas de la raíz, durante el avance de la germinación (Fig. 2.5).

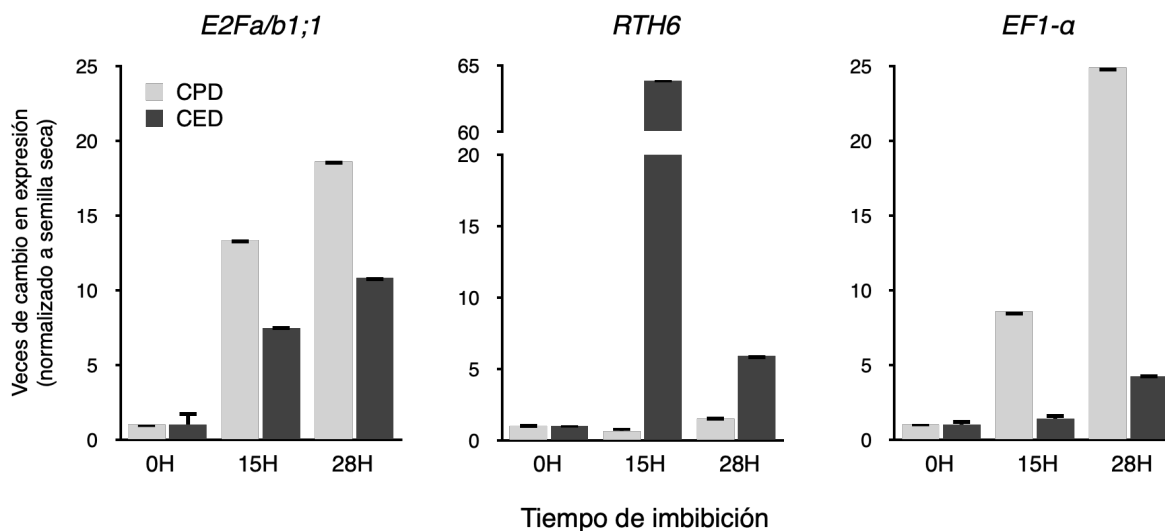


Fig.-2.5 | Expresión de genes marcadores de proliferación y diferenciación en distintas zonas de la raíz del eje embrionario. Valores de expresión absoluta de *E2Fa/b1;1*, *RTH6* y *EF1-a* en CPD y CED durante la germinación, normalizados al valor de CPD en semilla seca. Las gráficas muestran valores promedio de tres réplicas biológicas y las barras el error estándar de la media.

3.7. Los genes *E2Fa/b1;1*, *RTH6* y *EF1-a* se expresan diferencialmente en distintas zonas de la raíz después de la germinación

Ya que *RTH6* participa en la elongación de pelos radicales, el patrón atípico en su expresión en CED durante germinación (Fig. 2.5), nos llevó a preguntarnos si este gen se expresa también en raíces que ya han desarrollado pelos radicales. Para contestar esta pregunta, se embebieron semillas por 54 h, momento en que más del 80 % de las raíces muestran la presencia de dichas estructuras (Fig. 2.2). Con ayuda de un microscopio estereoscópico se disectaron 2 mm de la punta de la raíz (CPD) y 2 mm de la región donde se observan abultamientos en la epidermis, que posteriormente se elongarán para originar los pelos radicales (nombrada zona de diferenciación joven o YDZ) (Li *et al.*, 2016). También se colectaron 2 mm de la zona donde los pelos radicales se encuentran completamente desarrollados (DZ; Fig. 2.6-A). Se extrajo RNA total de las distintas secciones y se estudió la expresión de los tres genes mediante RT-qPCR. Nuevamente, la expresión de *EF1-a* y *E2Fa/b1;1* se observó enriquecida en CPD, mientras que en YDZ y DZ la expresión es menor con respecto a CPD (Fig. 2.6-B). Por otro lado, la expresión de *RTH6* mostró un patrón consistente con su función en el desarrollo pelos radicales. Como se hipotetizó, ya que en CPD no existen pelos radicales, la expresión de *RTH6* fue baja. En YDZ, los niveles de *RTH6* alcanzan los mayores niveles observados, consistentes con su función, ya que en esta zona los pelos radicales han brotado y comenzarán a elongarse (Fig. 2.6-A), confirmando que en esta región de la raíz ya han comenzado programas de diferenciación a las 54 hpi. Finalmente, la expresión de *RTH6* en DZ fue menor que en YDZ, posi-

blemente debido a que en DZ los pelos radicales ya se encuentran totalmente desarrollados y la actividad de calosa sintasa no es requerida más (Fig. 2.6).

En conjunto, los resultados de parámetros fisiológicos, los tamaños celulares y de núcleo, así como la expresión de genes marcadores de proliferación y diferenciación celular nos permiten proponer la punta de raíz del eje embrionario (CPD) como un modelo adecuado para estudiar proliferación celular, mientras que la zona adyacente podría ser empleada para estudios relacionados con elongación y/o diferenciación de la raíz (CED en ejes embrionarios o YDZ y EZ en plántulas).

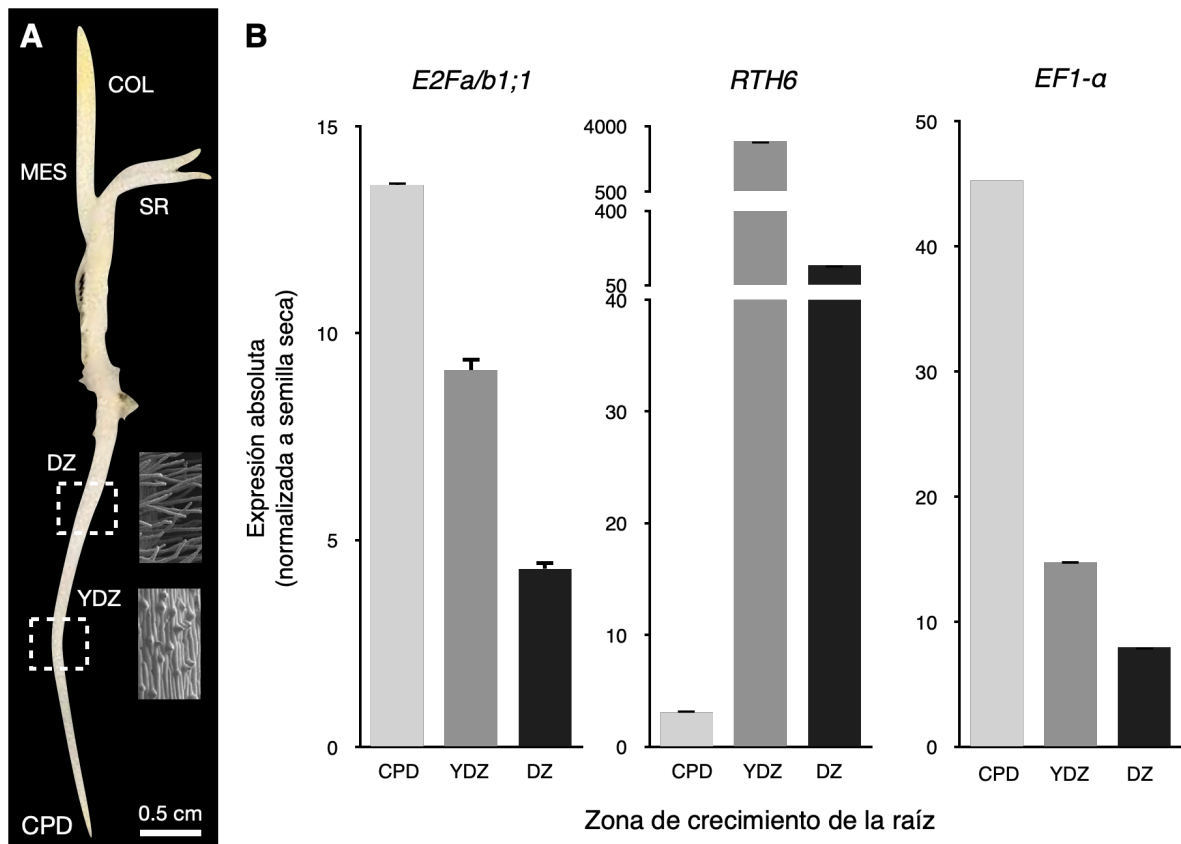


Fig.-2.6 | Expresión de marcadores de proliferación y diferenciación celular en raíz primaria. **A.** Plántula de 54 hpi donde se indican las zonas de la raíz analizadas (CPD, YDZ y DZ). Los insertos muestran la apariencia de células epidérmicas observadas con microscopio electrónico de barrido (imágenes ilustrativas tomadas de Li *et al.*, 2016; no se encuentran a escala). Los pequeños abultamientos en YDZ son pelos radicales que han comenzado a brotar, mientras que las protrusiones alargadas en DZ corresponden a pelos radicales desarrollados. Barra de escala 0.5 cm. MES, mesocotilo; COL, coleoptilo; SR, raíces seminales. **B.** Expresión absoluta de los genes *E2Fa/b1;1*, *RTH6* y *EF1-a* en las distintas zonas de raíz, normalizada al valor de CPD en la semilla seca. Las gráficas muestran valores promedio de tres réplicas biológicas y las barras el error estándar de la media.

4. Discusión

4.1. Cambios fisiológicos durante la germinación

La germinación de semillas ortodoxas ocurre en etapas marcadas, entre otros eventos, por la tasa de incorporación de agua. La primera etapa se caracteriza por ser rápida y responde principalmente al contacto de la semilla seca con el agua. En células vivas, finaliza al alcanzar un equilibrio hídrico impuesto por la presión de turgencia, la cual restringe el paso de agua a la célula. En el caso de células muertas, las fuerzas de hidratación no son contrarrestadas por la turgencia y ocasionan la salida de solutos hacia el apoplasto. Durante la segunda fase de germinación, el contenido de agua se mantiene constante para volver a incrementar durante la tercera etapa, la cual es considerada germinativa (Bewley *et al.*, 2013). Los datos recabados en este trabajo indican que existe un ligero desfase entre las tasas de incremento de peso fresco de la semilla completa, el escutelo (López-Coria *et al.*, 2019) y el eje embrionario. Por ejemplo, a 6 hpi la semilla ha alcanzado hasta 40 % del peso que tendrá al momento de la germinación (García-Ramírez, en preparación), en contraste, el eje embrionario incrementa apenas un 20 % de su peso fresco (Fig. 2.1). Estas diferencias en la cinética de toma de agua entre la semilla y estructuras como el eje, indican que el flujo de agua hacia el eje embrionario podría ser un evento regulado. El agua transportada hacia el eje, además de solvatar el contenido celular para reactivar funciones, también influye en el tamaño del embrión, ya que bajos potenciales hídricos inhiben la elongación celular (Nonami, 1998). Como se observa en la Fig. 2.2, los primeros cambios significativos en longitud del eje embrionario ocurren alrededor de las 24 hpi, cuando el eje ha duplicado su masa y es en este punto que la germinación se vuelve visible en algunos ejemplares (5 %). El segundo incremento importante en longitud coincide con el punto en que más de la mitad de las raíces han protruido (36 hpi), una vez alcanzado este punto, tanto longitud como peso fresco continúan en aumento hasta las 54 hpi estudiadas. Además de los parámetros anteriores, la presencia de pelos radicales como un indicador de procesos de diferenciación en la raíz (Hochholdinger *et al.*, 2018), indica que la aparición de dichas estructuras comienza a ocurrir (5 %) en cuanto las raíces protruyen (Fig. 2.2). En conjunto, estos datos permiten definir las distintas etapas de la germinación de la semilla de maíz. La primera fase comenzaría inmediatamente después de la imbibición y se extendería hasta 12 hpi, cuando ocurre el primer incremento en peso fresco; la fase II ocurriría entre las 12 y 24 hpi, momento en que el eje aumentó su longitud y la protrusión radicular comenzó. Finalmente, la fase post-germinativa comenzaría alrededor de las 36 hpi, cuando más del 50 % de las raíces han protruido y los procesos de diferenciación han comenzado.

4.2. Cambios en tamaño celular y nuclear durante la germinación

Durante la germinación el eje embrionario atraviesa por cambios morfológicos a nivel celular. Tal es el caso de CPD, donde la organización de las células de lo que podría ser el prospectivo centro quiescente en la semilla seca, muestran una morfología un tanto irregular, posiblemente por la falta de agua en el eje embrionario; una vez embebidas las semillas, las células adquieren una apariencia

turgente, formando hileras con apariencia más regular que en la semilla seca (Fig. 2.3-B y C, paneles inferiores). Por otra parte, el tamaño celular cambia de manera diferencial en CPD y CED después de la imbibición. Mientras que en CPD las células mantienen un tamaño similar tanto en semillas secas como embebidas, las células epidérmicas y del córtex en CED incrementan de tamaño notablemente (Fig. 2.3-B y C, paneles superiores), apuntando a que es en esta región de la raíz donde podría ocurrir la elongación que permite la protrusión de la radícula a través de la testa, culminando así el proceso germinativo.

En *Arabidopsis* se ha observado que el núcleo celular atraviesa por una compactación global de cromatina durante la etapa de secado de la semilla y una vez germinada, el núcleo recupera su tamaño (van Zanten *et al.*, 2011). En maíz, los núcleos provenientes de semillas secas mostraron una región central sin teñir que podría corresponder al nucléolo característico de células en G1 (Fig. 2.4-A) (Pontvianne *et al.*, 2016). Por su parte, la presencia del nucléolo coincide con datos de citometría de flujo que indican que más del 80 % de las células del eje embrionario se encuentran detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Sánchez *et al.*, 2005), sugiriendo que las células en CPD y CED se encuentran en esta fase del ciclo celular en la semilla seca. Cuando las semillas fueron embebidas por 15 h, los núcleos atravesaron por cambios de tamaño significativos, sin embargo, el nucléolo desaparece en CED y la organización de la cromatina cambia, como lo indica el arreglo de los cromocentros en la periferia del núcleo (Fig. 2.4-B). Dicha organización se asemeja a aquella en células animales diferenciadas, en que regiones de heterocromatina, principalmente centrómeros, se adosan a la envoltura nuclear (Mayer *et al.*, 2005). Así, la presencia del nucléolo en núcleos de CPD embebidos por 15 h podría indicar que estas células permanecen en G1, mientras que su desaparición, en conjunto con el cambio en organización de cromatina, podrían sugerir que procesos de diferenciación en CED han sido disparados desde tiempos tempranos de la germinación, aunque estos no sean evidentes sino hasta después de la germinación (36 hpi), como en el caso de pelos radicales.

4.3. Expresión de marcadores moleculares durante la germinación

El incremento gradual en la expresión del gen marcador de ciclo celular, *E2Fa/b1;1*, en las distintas zonas de crecimiento de la raíz a lo largo de la germinación podría indicar que las células del eje embrionario estarían atravesando por el ciclo celular (Fig. 2.5). Además, la expresión de dicho marcador se observó más enriquecida en CPD, sugiriendo que las células en esta zona de crecimiento podrían estar transitando hacia la fase S del ciclo celular, mientras que la menor expresión en CED indicaría un menor número de células en ciclo celular o un avance más lento de G1. Previamente, mediante citometría de flujo con núcleos provenientes de ejes embrionarios de maíz embebidos fuera de la semilla (*ex situ*), se encontró que las células en CPD atraviesan por las distintas fases del ciclo celular en las primeras 60 hpi, mientras que en CED los porcentajes en las distintas fases se mantienen similares a los de semilla seca, sugiriendo que estas células, efectivamente, no entran al ciclo durante las primeras etapas de germinación (García-Ayala, 2017), aunque es importante señalar que podrían existir diferencias importantes en cuanto al avance del ciclo celular entre ejes embrionarios germinados *ex situ* o en la semilla (Vázquez-Ramos, com. pers.). Por su parte, la abundancia del marcador de diferenciación *RTH6* mostró un patrón de expresión peculiar, incremen-

tando a 15 hpi y disminuyendo a las 28 hpi (Fig. 2.5). Esto nos llevó a preguntarnos si su expresión se relaciona con su papel reportado en desarrollo de pelos radicales (Li *et al.*, 2016), ya que estas estructuras no son evidentes sino hasta después de 36 hpi. Nuestros resultados muestran que la expresión de este gen efectivamente se encuentra enriquecida tanto en la región de la raíz donde los pelos radicales están totalmente desarrollados y son distinguibles a simple vista, como en la región donde comienzan a brotar y son visibles únicamente bajo el microscopio, mientras que en CPD es apenas detectable (Fig. 2.6), lo cual es consistente con los patrones de expresión reportados por Li *et al.*, 2016. Lo anterior indica que además de ser un gen marcador de desarrollo de pelos radicales, a 15 hpi podrían estar ocurriendo eventos de especificación tempranos en CED, incluso antes de ser detectables a nivel morfológico. Si estos datos los comparamos con la morfología nuclear similar a la de células en diferenciación (Fig. 2.4-B) y la baja tasa de división celular (García-Ayala, 2017), podríamos sugerir que células en CED adquirirían un destino celular desde tiempos tempranos después de la imbibición.

En nuestro grupo de investigación se ha empleado como modelo de estudio de ciclo celular el eje embrionario completo y se han generado datos de gran relevancia sobre la función de proteínas del ciclo celular como ciclinas tipo A, B y D, CDKs tipo A y B, así como sus reguladores KRP y otras proteínas cruciales como PCNA, durante la germinación (Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008; Godínez-Palma *et al.*, 2013, 2017; Garza-Aguilar *et al.*, 2019). Sin embargo, para entender mejor el papel de reguladores del ciclo celular se requiere de un modelo de estudio que permita diferenciar entre proliferación y diferenciación, ya que es común encontrar a proteínas de ciclo celular también participando en procesos relacionados con diferenciación (Soufi & Dalton, 2016). En este capítulo, nuestras observaciones a nivel fisiológico, celular y molecular nos permitieron acotar el dominio de proliferación celular de la raíz del eje embrionario en germinación para realizar estudios de ciclo celular, mientras que la zona adyacente podría servir como herramienta para estudios de diferenciación temprana, sin embargo, se requiere de más experimentos para robustecer nuestros resultados.

5. Conclusiones

En este capítulo se determinaron parámetros fisiológicos de la germinación de semillas de maíz y se encontró que la fase I de la germinación ocurre durante las primeras 12 hpi, la fase II entre 12 y 24 hpi, culminando con el inicio de la germinación visible, dando paso a la fase III, en que ocurren procesos de crecimiento y diferenciación, como la aparición de pelos radicales. Los cambios observados a nivel macroscópico son soportados por cambios a nivel morfológico, principalmente cambios en la forma y tamaño de las células en CED, que a su vez concuerdan con el inicio de la germinación visible. A nivel subcelular, la morfología de núcleos de semilla seca sugiere que las células tanto de CPD como de CED se encuentran en la fase G1 del ciclo celular. Al embeber las semillas, los núcleos de CPD permanecen sin cambios morfológicos mientras que los núcleos de CED atraviesan por cambios en organización de cromocentros a 15 hpi, de manera similar a algunas células animales que transitan a diferenciación. Finalmente, estas observaciones fueron corrobo-

radas empleando genes marcadores de proliferación y diferenciación, cuya expresión está en sintonía con su posible función en las distintas zonas de crecimiento de la raíz del eje embrionario durante la germinación. En conjunto, estos datos permiten avanzar en el empleo de CPD para estudios de ciclo celular y CED para estudios de diferenciación (temprana) en el eje embrionario durante la germinación.

Capítulo 3

Caracterización de la familia de factores transcripcionales E2F/DP durante la germinación de maíz*

Resumen

Para que el proceso germinativo ocurra de manera exitosa, es necesario el reinicio y establecimiento del ciclo celular en los tejidos del eje embrionario, mismo que se encuentra en un estado de latencia en la semilla seca. Las fases del ciclo celular son reguladas a distintos niveles por numerosas familias de proteínas, principalmente durante sus transiciones. Una de las transiciones más estudiadas es la de G1/S y ha sido caracterizada por la función de la familia E2F/DP, cuyos miembros activan o reprimen expresión de genes blanco de manera coordinada con la división celular. En conjunto con la vía de RBR, la familia E2F juega un papel preponderante en la regulación no sólo de la replicación del DNA y el ciclo celular, sino en múltiples procesos celulares como el mantenimiento de la integridad del genoma, diferenciación, entre otros (revisado en extenso en Sánchez-Camargo et al., 2021). A pesar de la importancia de la familia E2F para el control del ciclo celular, en maíz ha sido poco estudiada. Por ello, en este capítulo se realizó una caracterización sistemática de la familia E2F/DP. Ya que se desconoce cuántos miembros la componen, se identificaron todos los genes tipo E2F, DEL y DP en el genoma de maíz, encontrando 12 posibles genes que se agrupan filogenéticamente con miembros de la familia E2F de *Arabidopsis* y otras plantas, y comparten la misma estructura de motivos y dominios proteicos. La expresión diferencial de 9 de los 12 genes candidatos en ejes embrionarios durante germinación y en tejidos proliferativos y diferenciados de plántulas refuerza la idea de que la familia E2F podría participar no solamente en el ciclo celular, sino también en otros procesos. Estudios de interacción empleando proteínas recombinantes arrojaron que, del mismo modo que en otras especies, los miembros E2F de maíz (E2Fa/b1;1 y E2Fc) forman heterodímeros con proteínas tipo DP (DPb2). Además, mediante ensayos de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA), se demostró que ambos complejos son capaces de unirse a una secuencia E2F consenso en el DNA similar a la de *Arabidopsis*. Del mismo modo, se encontró que los complejos E2F-DP de maíz son capaces de unirse a sitios E2F en promotores de múltiples genes de maíz de fase S con secuencias diversas. A pesar de que los sitios estudiados cubren el consenso de sitios E2F reportado para plantas, nuestros experimentos permitieron identificar cuatro tipos principales de sitios

* Parte de este capítulo fue publicado como: Sánchez-Camargo V. A., Suárez-Espinoza C., Romero-Rodríguez S., Garza-Aguilar S. M., Stam M., García-Ramírez E., Lara-Núñez A. y Vázquez-Ramos J. M. (2020). Maize E2F transcription factors. Expression, association to promoters of S-phase genes and interaction with the RBR1 protein in chromatin during seed germination. *Plant Science*, 296, 110491.

E2F: 1) aquellos unidos con afinidades similares tanto por E2Fa/b1;1 como por E2Fc, mientras que otros fueron unidos preferencialmente por 2) E2Fa/b1;1 o 3) por E2Fc, mientras que el tipo 4) no fue reconocido por ninguno de los dos complejos proteicos. Ya que los genes de fase S estudiados *in vitro* incrementan su expresión durante la germinación, estudiamos la asociación de las proteínas E2Fa/b1;1 y E2Fc con dichos promotores *in vivo* durante germinación. Se generaron anticuerpos policlonales específicos y mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) encontramos que E2Fa/b1;1 comienza a acumularse en sitios E2F una vez embebidas las semillas y continúa con esta tendencia de aumento hacia tiempos tardíos. En contraste, E2Fc se encuentra asociado a los mismos sitios E2F en la semilla seca y, al ocurrir la imbibición, pareciera desasociarse del DNA, para volver a asociarse en tiempos tardíos. Para entender mejor la regulación de promotores de ciclo celular, se estudiaron marcas de cromatina en los sitios E2F mediante ChIP, encontrando que podría existir un entorno permisivo para la transcripción, como lo indica el enriquecimiento de acetilación de histona H3 (H3ac) y la trimetilación de la lisina 4 de histona H3 (H3K4me3). El incremento en la ocupación de promotores por E2Fa/b1;1 coincide con el incremento de H3ac y el aumento en expresión de dichos genes después de la imbibición, mientras que la disminución en expresión coincide con la aparición de E2Fc, RBR y la marca represora H3K27me3. En conjunto, la información recopilada permitió avanzar en el entendimiento del papel de la familia E2F en la regulación del ciclo celular durante la germinación y la dinámica entre las proteínas tanto dentro de la familia como con su regulador RBR, en el contexto de la cromatina.

1. Introducción

Desde el punto de vista bioquímico y molecular, el reinicio y avance del ciclo celular es necesario para que la germinación de la semilla tenga éxito (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Durante muchos años se ha planteado la hipótesis de que las semillas almacenan selectivamente mRNAs y proteínas que son importantes para que las semillas comiencen a germinar (Kimura & Nambara, 2010). De acuerdo con esto, se han detectado proteínas reguladoras del ciclo celular en ejes embrionarios provenientes de semillas secas de maíz, tales como ciclinas (CYCs), cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), PCNA, inhibidores de CYC/CDK, DNA polimerasas, entre otras y también se ha visto que complejos CYC/CDK provenientes de semillas secas son activos, ya que son capaces de fosforilar sustratos *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2005; García-Ramírez *et al.*, 2006; Garza-Aguilar *et al.*, 2017; Godínez-Palma *et al.*, 2017). No obstante, también se ha encontrado que tanto la actividad transcripcional como la traduccional parecen ser necesarias para que la germinación avance, ya que inhibidores de RNA polimerasa II (RNAPII), como α -amanitina, e inhibidores de traducción, como la cicloheximida, reducen o inhiben totalmente la protrusión de la radícula (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981; Vázquez-Ramos & Reyes-Jiménez, 1990).

En eucariontes, el ciclo celular comprende cuatro fases principales, G1, S, G2 y M (Harashima *et al.*, 2013). En la fase G1, las células perciben e integran señales ambientales e internas que a su vez inducen una serie de cambios transcripcionales que promoverán el inicio de la fase S, en la que se duplica el material genético. En la fase G2, las células verifican que la duplicación de su DNA se haya completado correctamente para que, en la fase M (mitosis), los cromosomas duplicados se repartan por igual entre las dos células hijas resultantes. Las diferentes transiciones del ciclo celular están bien controladas por redes transcripcionales muy conservadas (Harashima *et al.*, 2013). En el caso de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, la actividad de los factores de transcripción (TF) de

la familia E2F/DP es la encargada de regularla. Durante la fase G1 temprana, E2F se encuentra unido a sus genes blanco, en complejo con su socio de dimerización DP, y su actividad está reprimida por la proteína de retinoblastoma (pRB, o su homólogo de plantas RBR), proteína que enmascara el dominio de transactivación de E2F (Dimova & Dyson, 2005). Una vez avanzado G1, la acumulación y activación de los complejos CYC/CDK de G1 promueve la fosforilación de RBR, lo que conduce a la liberación del heterodímero E2F-DP, permitiendo la activación de los genes necesarios para el inicio y avance de la fase S (Inze & de Veylder, 2006).

En *Arabidopsis thaliana* se han descrito seis proteínas E2F y dos DP. Tres proteínas E2F (AtE2Fa, AtE2Fb y AtE2Fc) se consideran E2F típicas y comparten una organización de dominios similar: una señal de localización nuclear, un dominio de unión a DNA, un *zipper* de leucinas, un dominio para la dimerización con DP y un dominio de transactivación, el cual contiene un motivo de interacción con RBR embebido. AtE2Fa y AtE2Fb son activadores transcripcionales, mientras que AtE2Fc podría funcionar como represor. Los miembros de AtDP (AtDPa y AtDPb), interactúan con AtE2Fa-c formando heterodímeros funcionales capaces de unirse al DNA (Mariconti *et al.*, 2002). Los E2F restantes, DEL1 (*DP-E2F-LIKE1*), DEL2 y DEL3, se consideran E2F atípicos debido a que poseen dos dominios de unión a DNA en tándem que le permiten a estas proteínas unirse al DNA como monómeros, y no contienen dominios de unión a DP o de transactivación (Kosugi & Ohashi, 2002c). La secuencia de DNA consenso reconocida por E2Fs típicos y atípicos en *Arabidopsis* es WTTSSCSS (W=T/A), y dichas secuencias se localizan en los primeros 1000 pb río arriba de los sitios de inicio de la transcripción de sus genes blanco (Vandepoele *et al.*, 2005).

La proteína reguladora de E2F, RBR, es codificada por un único gen en el genoma de *Arabidopsis*, mientras que en maíz la familia comprende cuatro genes, considerados como dos grupos de parálogos: RBR1/RBR2 y RBR3/RBR4, respectivamente (Dante *et al.*, 2014). La expresión de la proteína RBR1 en hojas de maíz en desarrollo forma un gradiente ápico-basal con altos niveles en la punta, relacionados con diferenciación celular, mientras que en la base de la hoja los niveles de RBR1 son bajos y pueden estar relacionados con proliferación (Huntley *et al.*, 1998). Evidencia indirecta indica que la interacción de RBR y E2F ocurre en maíz de manera similar a otras especies, ya que callos transgénicos de maíz expresando la proteína viral RepA, que contrarresta la unión de RBR1 a E2F, ocasiona un fenotipo de aumento tanto de la expresión de genes blanco de E2F como de proliferación celular (Sabelli *et al.*, 2005). Por último, el extremo carboxilo de RBR1 de maíz conserva múltiples sitios de fosforilación que son modificados por los complejos CYC/CDK (Bonioti & Gutierrez, 2001).

Ya que no existen estudios detallados sobre la función de la familia E2F de maíz, el objetivo de este trabajo fue la caracterización genómica de la familia de estos factores transcripcionales de maíz. Nuestros resultados indicaron la existencia de 12 genes cuyos RNA mensajeros se almacenan en semillas secas y posteriormente se expresan de forma diferencial durante el proceso de germinación y en diferentes tejidos de plántulas. Se demostró, además, que dos E2F típicos heterodimerizan con la proteína DPb2 de maíz y que los complejos resultantes son capaces de unir secuencias de unión tipo E2F presentes en promotores de genes de la maquinaria de replicación de DNA de maíz. Mediante inmunoprecipitación de cromatina observamos asociación diferencial de proteínas E2F a promotores de genes que contienen elementos de respuesta a E2F, así como la dinámica de tres

marcas epigenéticas en promotores de genes blanco de E2F. Los resultados obtenidos nos ayudaron a entender mejor la regulación transcripcional de los genes de ciclo celular y la dinámica del reclutamiento de E2F a estos genes, en un contexto de estructura de la cromatina, durante la germinación.

2. Materiales y métodos

2.1. Análisis de genomas de plantas

Se analizaron los genomas de maíz (*Zea mays*, MaizeSequence, release 5b.60) (Schnable *et al.*, 2009), arroz (*Oryza sativa*, Ensembl Plants release 18, Genome assembly MSU6) (Ouyang *et al.*, 2007) y de *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) (Lamesch *et al.*, 2012). Los miembros de la familia E2F de maíz se identificaron mediante una búsqueda BLAST utilizando las secuencias de proteínas reportadas para cada E2F, DEL y DP de humano, *Arabidopsis* y arroz.

2.2. Construcción de árboles filogenéticos

Para construir el árbol filogenético se determinó el modelo de sustitución adecuado alineando las secuencias proteicas completas de E2F, DEL y DP de maíz, arroz y *Arabidopsis* utilizando el servidor ProtTest 2.4 (Abascal *et al.*, 2005). Los árboles de máxima verosimilitud se construyeron en el servidor PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) con 1000 réplicas de *bootstrap*. Los genes E2F/DP de maíz se nombraron según su identidad con los genes de *Arabidopsis* y su posición en el árbol filogenético.

2.3. Extracción de RNA total

Semillas de maíz V. Chalqueño se desinfectaron y se incubaron en lotes de diez semillas en oscuridad a 25° C. Una vez transcurrido el tiempo de imbibición, se extrajeron los ejes embrionarios de las semillas con un bisturí y se procesaron. Las plántulas se obtuvieron germinando semillas durante tres días y fueron transferidas después a de día largo (16 h luz y 8 h oscuridad) a 25° C, durante 11 días adicionales. Con base en el diseño experimental de Li y col. (2010) se eligieron dos secciones de la hoja (base y punta). También se colectaron el coleoptilo y los primeros 2 mm de la punta de la raíz primaria, raíces seminales y laterales (incluyendo la zona de proliferación del meristemo). Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se extrajo RNA total con TRIzol (Invitrogen), se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en agua de grado biología molecular libre de nucleasas.

2.4. Análisis semicuantitativo de la expresión génica

El RNA total se trató con DNase RQ1 (Promega) y se sintetizó cDNA con la enzima M-LV RT (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor, utilizando oligo dT₍₁₈₎ como cebador y de 1 a 5 µg de RNA. Para detectar los transcritos de los genes E2F candidatos se diseñaron cebadores específicos (Tabla Sup. S1). Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima JumpStart™ Taq Ready-Mix™ (Sigma-Aldrich). Los experimentos fueron realizados por triplicado con tres muestras biológicas independientes.

2.5. Análisis de genes blanco de E2F

Se analizaron 1000 pb río arriba de la región codificante (ATG) de todos los genes anotados en el genoma de maíz, buscando los sitios canónicos de unión a E2F reportados para plantas WTTSSC-SS ($p < 10^{-3}$) (Vandepoele *et al.*, 2002, 2005) y TYTCCCGCC ($P < 10^{-4}$ y 10^{-3}) (Ramírez-Parra *et al.*, 2003) mediante la herramienta de búsqueda de motivos FIMO de MEME Suite 5.4.1 (Grant *et al.*, 2011). Los genes con motivos E2F fueron filtrados y se les asignó categoría funcional mediante la herramienta ShinyGO v0.76.1 (FDR $< 10^{-4}$) (Ge *et al.*, 2020).

2.6. Expresión absoluta mediante RT-qPCR

Se diseñaron cebadores específicos utilizando el software Primer3Plus para amplificar los genes blanco de E2F (Untergasser *et al.*, 2012) (Tabla Sup. S2). Los experimentos de RT-qPCR se realizaron utilizando el sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) con el kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qPCR with ROX (Life technologies), utilizando RNA de ejes de embriones de semillas secas, o de ejes de semillas imbuidas en agua durante 12, 15, 18 o 28 h. La cuantificación absoluta se realizó mediante curvas estándar construidas empleando diluciones seriadas de DNA genómico de maíz para cada gen. Los experimentos se realizaron con tres réplicas biológicas y tres réplicas experimentales.

2.7. Clonación de genes E2F y DP

Los marcos de lectura abiertos (ORF) de E2Fa/b1;1, E2Fc y DPb2 se amplificaron mediante PCR utilizando la enzima iProof™ High-Fidelity Master Mix (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los productos de PCR se adenilaron y fueron ligados al vector pGEM®-T Easy (Promega). E2Fa/b1;1, E2Fc y DPb2 se subclonaron en el vector pPAL7 (Bio-Rad), que genera proteínas recombinantes sin etiqueta tras ser eluidas. Una construcción adicional de DPb2 fusionada a GST, se generó en el vector pGEX-4T2 (GE Healthcare); las clonas positivas se comprobaron mediante análisis de restricción y secuenciación (los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla Sup. S3).

2.8. Western blot

Extractos proteicos o proteínas recombinantes se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF, se bloquearon con leche descremada al 5 % y se lavaron con buffer TBS-T (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, Tween-20 0.1 %). Los anticuerpos primarios (dilución 1:500) se incubaron durante toda la noche en leche. Las membranas fueron lavadas con TBS-T y se añadió el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Por último, se añadió el sustrato de peroxidasa para detectar quimioluminiscencia utilizando el aparato ChemiDoc-MP (Bio-Rad). El análisis densitométrico de tres réplicas de *western blot* se realizó con el software Image Lab V5.2.1 (Bio-Rad), los valores obtenidos se normalizaron con los de las membranas teñidas con rojo de Ponceau S y se reajustaron a los valores de la semilla seca.

2.9. Interacción proteína-proteína *in vitro*

Las diferentes construcciones se transformaron y sobreexpresaron en la cepa de *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIPL (Agilent). Las proteínas recombinantes eXact-ZmE2Fa/b1;1 o eXact-ZmE2Fc se utilizaron como anzuelo para unir a la proteína GST-ZmDPb2. Los lisados bacterianos expresando a las distintas proteínas se incubaron con la resina glutatión-sefarosa durante 3-4 h a 4° C en rotación continua. Las proteínas eluidas se identificaron mediante *western blot* utilizando los anticuerpos correspondientes para inmunodetectar tanto a las proteínas de anclaje como a sus proteínas interactoras.

2.10. Ensayo de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA)

Se identificaron los elementos de respuesta a E2F en los promotores de los genes *MCM3;1*, *PCNA1* y *RPA2* de maíz para ser usados como sonda de EMSA. Se sintetizaron oligonucleótidos (sentido y antisentido) incluyendo los sitios E2F flanqueados por 10 pb en el promotor (Tabla Sup. S4) y fueron alineados. Ensayos de EMSA fueron realizados incubando 500 ng de las proteínas recombinantes correspondientes (sin etiqueta) con 7.5 fmol de sonda (marcada con ³²P-γATP) en buffer EMSA recién preparado (12 % glicerol v/v, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM MgCl₂ y 1 mM DTT) y se incubó en hielo durante 20 min. Las muestras se separaron en de poliacrilamida al 5 % en buffer TAE 0.5X, los geles se secaron con calor y vacío, se expusieron a una placa de europio. Las placas expuestas se analizaron con la ayuda del aparato Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad) y el software Quantity One® 1-D (Bio-Rad). Los experimentos se realizaron al menos tres veces.

2.11. Extracción de proteínas nucleares de maíz

Se aislaron núcleos celulares utilizando el mismo protocolo de inmunoprecipitación de cromatina (ver sección 2.12 de este capítulo para más detalles): tras el paso de sonicación, el entrecruzamiento se revirtió incubando las muestras a 65° C durante toda la noche. Las proteínas solubles se extra-

jeron en buffer de Extracción 1 recién preparado (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mM KCl, 10 % glicerol, 0.01 % SDS, 0.5 mM β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF, cóctel de inhibidores de la proteasa (PIC) [aprotinina, leupeptina, antipaina, pepstatina 1 μ g/ml]) y se incubaron en hielo. La mezcla se centrifugó, se recuperó el sobrenadante y para liberar las proteínas asociadas al DNA, el precipitado se resuspendió en el buffer de Extracción 2 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 440 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 % glicerol, 0.5 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM PMSF y PIC), se incubó en hielo por 15 min y se centrifugó para finalmente mezclar ambos sobrenadantes. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.12. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Se siguió el protocolo establecido por Haring y col (2007). Brevemente, las puntas de raíces de 100 ejes embrionarios fueron fijadas en Buffer A (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM sacarosa, 10 mM butirato de sodio, 1.5 % formaldehído, 5 mM β -mercaptoetanol y 1 mM PMSF) aplicando vacío. Los tejidos se enjuagaron y se pulverizaron en nitrógeno líquido. Los tejidos pulverizados se lisaron en Buffer B (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM sacarosa, 10 mM butirato de sodio, 5 mM β -mercaptoetanol y 1 mM PMSF) con agitación suave, los núcleos liberados se recuperaron filtrando con maya de nylon (100 μ m de poro), se centrifugaron y los precipitados se lavaron con Buffer C (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM sacarosa, 10 mM butirato de sodio, 10 mM $MgCl_2$, 1 % Triton-X100, 5 mM β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF y PIC). Los núcleos se resuspendieron en Buffer D (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.6 M sacarosa, 10 mM butirato de sodio, 2 mM $MgCl_2$, 0.15 % Tritón X-100, 5 mM β -mercaptoetanol, 0.1 mM PMSF y PIC), se colocaron en la superficie de una cama de Buffer D y se centrifugaron durante 60 minutos a máxima velocidad. Los núcleos resultantes se resuspendieron en Buffer de Lisis Nuclear (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5.62 mM EDTA pH 8.0, 0.133 % SDS, 0.1 mM PMSF y PIC). La cromatina entrecruzada se sonicó en hielo (Vibra-Cell VCX-500; Sonics & Materials, Inc.), obteniendo fragmentos de DNA entre 300 y 800 pb. La cromatina fragmentada se diluyó y se incubó a 4° C en Buffer ChIP (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 % v/v Tritón X-100, 150 mM NaCl) y proteína A-agarosa (Roche). Se recuperó el sobrenadante, se añadieron 10 μ g/ml de BSA y proteína A agarosa bloqueada (véase Haring *et al.*, 2007), y se incubó nuevamente a 4° C. Se recuperó el sobrenadante aclarado que contenía la cromatina y se guardó una fracción como *input*; el resto se inmunoprecipitó con suero pre-inmune o con el anticuerpo correspondiente (anti-E2Fa/b1;1, anti-E2Fc), anti-H3K9/K14ac (cat. 06-599, Merck), anti-H3K4me3 (cat. ab8580, Abcam) o anti-H3K27me3 (cat. ab6002, Abcam). A continuación, se añadió proteína A-agarosa bloqueada para precipitar los inmunocomplejos. La resina se centrifugó y se lavó tres veces con un Buffer de bajas sales (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100 y 0.1 % SDS), tres lavados con un Buffer de altas sales (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 % Triton-X100 y 0.1 % SDS), tres lavados con Buffer de LiCl (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 % IGEPAL CA-630, 1 % deoxicolato de sodio y 250 mM LiCl), tres lavados con Buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). Se realizaron dos eluciones con Buffer de elución (1 % SDS, 10 mM

NaHCO₃), se mezclaron y se añadió Buffer de desentrecruzamiento (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.83 % SDS), la mezcla se incubó durante toda la noche a 65° C y el DNA inmunoprecipitado se purificó utilizando fenol-cloroformo. El DNA purificado se utilizó para amplificar por PCR las regiones promotoras que contienen sitios E2F y también el sitio de inicio de transcripción, o promotores control. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y la especificidad de los cebadores se comprobó mediante secuenciación de los productos. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla Sup. S5. Cada experimento de ChIP-PCR se realizó con tres muestras biológicas independientes.

3. Resultados

3.1. Caracterización genómica de la familia de proteínas E2F de maíz

El reinicio del ciclo celular es un factor determinante para la germinación de las semillas (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Debido a la importancia de la familia E2F para la progresión del ciclo celular, fue necesario identificar los genes que codifican a sus distintos miembros en el genoma de maíz. Mediante búsqueda TBLASTN en el genoma utilizando como *query*, secuencias tipo E2F de humano, *Arabidopsis* (Mariconti *et al.*, 2002) y arroz (Guo *et al.*, 2007), se identificaron 25 candidatos, de los cuales, después de análisis para descartar falsos negativos, se obtuvieron 12 secuencias consideradas como genes *bona fide* de la familia E2F/DP (compuesta por los subgrupos E2F, DEL y DP). Los genes candidatos se distribuyeron en 12 *loci*, a lo largo de diez cromosomas y conservan la estructura genética de los genes E2F de otras especies. En el caso de E2F típicos, sus genes presentan de 13 a 14 exones, 9-10 exones para DEL y 7-9 para DP (Fig. Sup. S3.1; Tabla Sup. S6). Del grupo típico de genes E2F de maíz, cuatro de ellos tienen una identidad de secuencia de aminoácidos similar con los activadores transcripcionales E2Fa y E2Fb de *Arabidopsis* (~40 %) y fueron clasificados en un subgrupo denominado E2Fa/b: $\zeta_{mE2Fa/b1;1}$ (GRMZM2G041701), $\zeta_{mE2Fa/b1;2}$ (AC2338-5.01_FG005), $\zeta_{mE2Fa/b2}$ (GRMZM2G052515) y $\zeta_{mE2Fa/b3}$ (*locus* chr2:57,722,541-57,731,989; para más detalles sobre su anotación véase la Fig. Sup. S3.2). Debido a su similitud con AtE2Fa y E2Fb, estos factores de transcripción (TF) podrían ser considerados como activadores transcripcionales putativos. El otro gen típico, ζ_{mE2Fc} (GRMZ2G050590) se relaciona con el represor E2Fc de *Arabidopsis* (~28 %) y fue considerado como una proteína represora putativa (Fig. 3.1-A; Fig. Sup. S3.3-A). Tres de los cuatro miembros DP de maíz se agruparon con AtDPb y fueron anotados como $\zeta_{mDPb1;1}$ (GRMZM2G063387), $\zeta_{mDPb1;2}$ (GRMZM2G086072) y ζ_{mDPb2} (GRMZM2G13902-4), mientras que el cuarto, ζ_{mDPc} (GRMZM2G462623), se denominó así por compartir una identidad de sólo 23 % y no agruparse con proteínas DP de *Arabidopsis*, creando una nueva categoría que incluye secuencias exclusivas de plantas monocotiledóneas (Fig. 3.1-A; Fig. Sup. S3.3-B).

Finalmente, los tres genes tipo DEL de maíz mostraron una identidad cercana al 30 % con los tres miembros DEL de *Arabidopsis*; sin embargo, en el árbol filogenético se agruparon consistentemente con AtDEL1, y por ello se denominaron ζ_{mDEL1a} (GRMZM2G060000), ζ_{mDEL1b} (GRMZM2G-

378665) y *ZmDEL1c* (GRMZM2G361659) (Fig. 3.1-A; Fig. Sup. S3.3-C). El análisis de secuencia de las proteínas de la familia E2F de maíz mostró una estructura conservada de dominios y motivos similar a la de otras plantas y mamíferos (Mariconti *et al.*, 2002; Dimova & Dyson, 2005; Guo *et al.*, 2007).

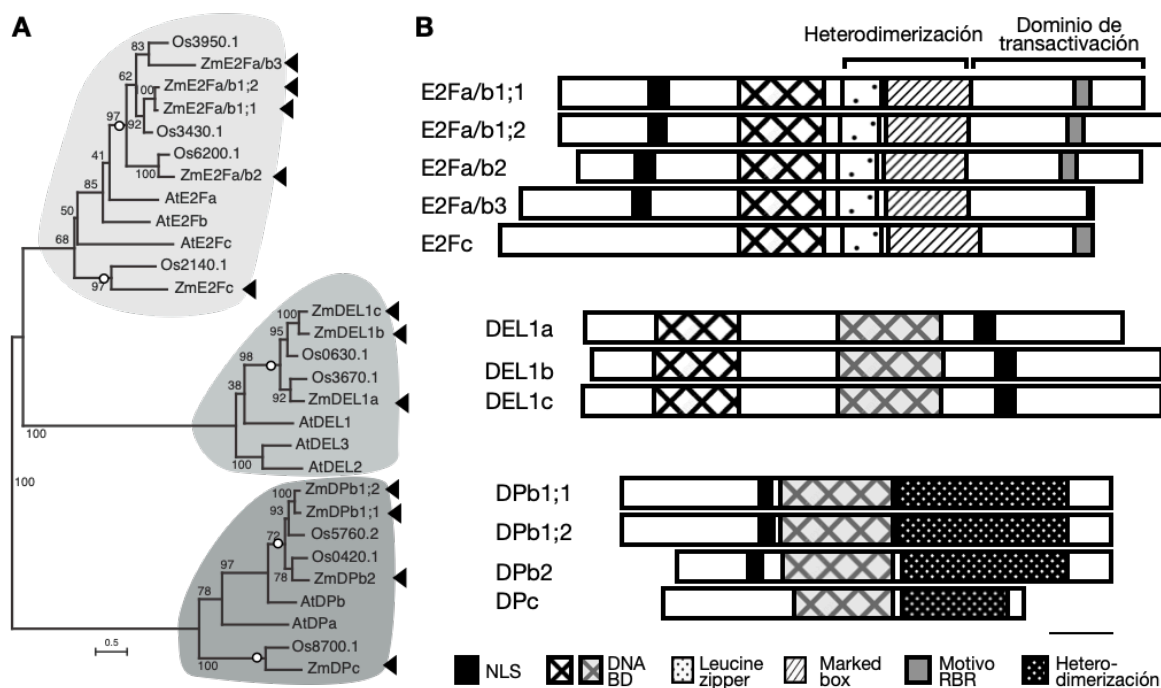


Fig.-3.1 | Caracterización de la familia de genes E2F/DP de maíz. **A.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con secuencias de proteínas E2F de *Arabidopsis* (At), arroz (Os) y maíz (Zm). Se forman tres subgrupos principales que con secuencias E2F típicas (subgrupo superior), DEL (atípicas; subgrupo medio) y DP (subgrupo inferior) y se pueden observar subclados específicos de gramíneas dentro de los subgrupos (indicados con círculos blancos). Los IDs de arroz corresponden con los últimos cuatro dígitos del número de anotación del respectivo gen (Tabla Sup. S6). Los 12 genes candidatos de maíz se indican con puntas de flecha y el resultado de 1000 réplicas de *bootstrap* para cada clado se muestra arriba de las ramas (%). Escala: número de sustituciones de aminoácidos por sitio. **B.** Representación gráfica de la organización de dominios de las proteínas E2F de maíz. Los miembros típicos de E2F tienen una señal de localización nuclear (NLS), un dominio de unión a DNA (DNA BD), un *marked box* y un *zipper* de leucinas, un dominio de transactivación que incluye al motivo RBR, que en E2Fa/b3 está truncado debido a un codón de paro de traducción prematuro. En las proteínas E2F atípicas se identificaron dos dominios de unión a DNA y una NLS putativa en el extremo carboxilo. El subgrupo DP contiene una NLS, un dominio de unión a DNA y un dominio de heterodimerización con E2F. Escala: 50 aminoácidos.

Los miembros típicos de E2F de maíz presentan un dominio conservado de unión al DNA que incluye la firma RRXYD (donde X representa cualquier aminoácido), un *zipper* de leucinas y un *marked box*, necesario para la interacción con su socio DP; hacia el extremo carboxilo se encuentra el dominio de transactivación con un motivo de interacción con RBR embebido en él (Fig. 3.1-B; Fig.

Sup. S3.4-A). Dentro del subgrupo DP se identificaron tres motivos altamente conservados, la señal de localización nuclear en el extremo amino, excepto para ZmDPc que carece de ella, un dominio de unión al DNA y un dominio de heterodimerización de E2F (Fig. Sup. S3.4-B). Finalmente, las proteínas del subgrupo DEL conservan tres motivos principales, dos de ellos correspondientes al dominio de unión al DNA, ambos con la firma RRXYD que les permite unirse al elemento de respuesta E2F como proteína monomérica, y un tercer motivo en el extremo carboxilo con un posible papel en la localización nuclear de estas proteínas (Fig. 3.1-B; Figs. Sup. S3.4, S3.5, S3.6). Los análisis de secuencia de las proteínas candidatas de maíz corroboraron que todas son miembros de la familia E2F/DP.

3.2. Los genes E2F de maíz se expresan durante germinación de semillas y en tejidos de plántulas

Para determinar los niveles de expresión de los diferentes genes E2F, diversos tejidos de maíz fueron analizados. Se obtuvieron muestras de la segunda hoja de plántula con un gradiente de proliferación-diferenciación (Li *et al.*, 2010), punta de la raíz incluyendo al meristemo apical, coleótilo y ejes embrionarios provenientes de semillas de maíz secas o embebidas por 6, 12, 18 y 24 h en agua (Fig. 3.2-A). Los mRNAs fueron detectados mediante RT-PCR punto final en combinación con cebadores específicos para cada uno de los 12 candidatos. Únicamente 9 de los 12 genes fueron detectados en los tejidos analizados (Fig. 3.2-B). *ZmE2Fa/b1;1*, *ZmE2Fa/b2* y *ZmE2Fc* se encontraron expresados en tejidos de plántulas y en semillas en germinación, mientras que *ZmE2Fa/b3* se detectó solamente en semillas durante germinación. *ZmDEL1a* se expresó ampliamente en todas las muestras, mientras que *ZmDEL1c* sólo fue detectado en la base de la hoja (zona de proliferación) y en las puntas de las raíces. Por último, a excepción de *ZmDPc*, el subgrupo DP se encontró expresado en todos los tejidos estudiados.

3.3. ZmE2Fa/b1;1 y ZmE2Fc en complejo con ZmDPb2 reconocen el motivo canónico E2F en el DNA

La función canónica de las proteínas E2F, ya sean típicas o atípicas, se basa en su capacidad de unión a los promotores de sus genes blanco y depende del reconocimiento del motivo consenso WTTSSCSS en el DNA. Para comprobar si las proteínas E2F de maíz son capaces de reconocer dicha secuencia consenso en el DNA, se clonaron dos genes E2F típicos y se fusionaron con la etiqueta eXact para su purificación por afinidad. Se seleccionó a *ZmE2Fa/b1;1* y a *ZmE2Fc*, ya que, según su posición en el árbol filogenético, el primero podría tener una función activadora mientras que el segundo podría ser un represor. Además, se eligió un gen ampliamente expresado del subgrupo DP, *ZmDPb2*, el cual se fusionó con GST. Para reconstituir los complejos E2F-DP recombinantes, se indujeron las proteínas correspondientes en *E. coli* y se mezclaron las fracciones solubles de los cultivos de ZmE2Fa/b1;1 o ZmE2Fc con las fracciones solubles de cultivos de ZmDPb2; los complejos proteicos formados se anclaron a una resina de afinidad (glutación-sefarosa) mediante la fracción GST-DPb2. Después de lavar las resinas, las proteínas unidas se eluyeron y se analizaron

mediante *western blot*. Primero, se confirmó la prevalencia de la subunidad GST-DPb2 unida a la resina tras los lavados, empleando un anticuerpo anti-GST (Figs. 3.3-A y B paneles superiores). Después, utilizando un anticuerpo anti-eXact, se detectaron las proteínas E2F fusionadas con eXact, en los eluatos que contenían a DPb2 (Fig. 3.3-A y B, paneles inferiores), mientras que en presencia de la etiqueta GST sin DPb2, ninguna de las proteínas ZmE2Fa/b1;1 o ZmE2Fc pudieron ser detectadas en las fracciones eluidas (Fig. Sup. S3.7-A), demostrando así que tanto ZmE2Fa/b1;1 como ZmE2Fc eran capaces de unirse a la proteína ZmDPb2. Experimentos realizados con el sistema de doble híbrido en levadura confirmaron las interacciones DPb2-E2Fa/b1;1 y DPb2-E2Fc (Fig. Sup. S3.7-B).

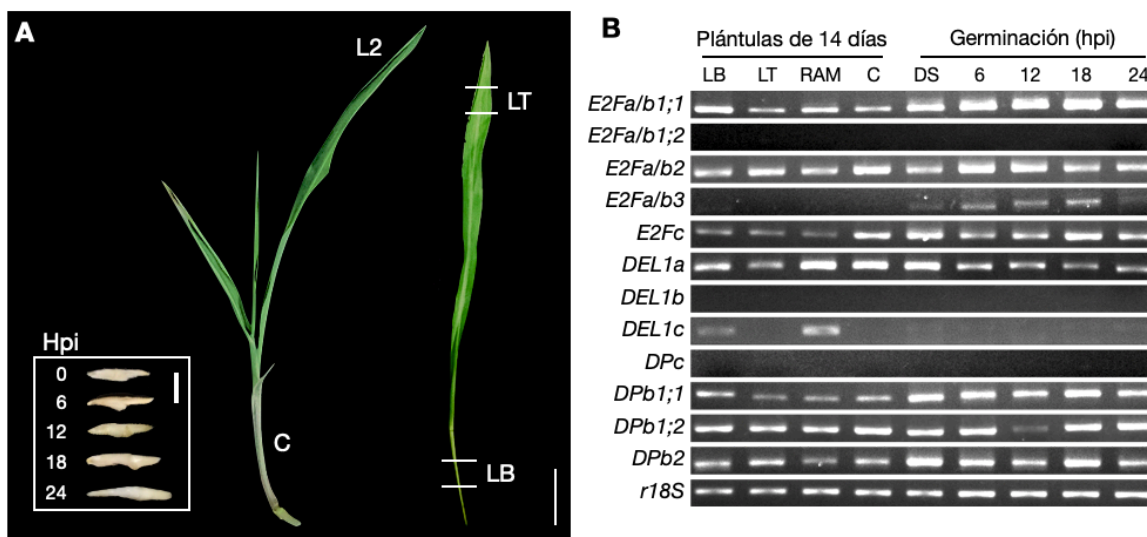


Fig.-3.2 | Genes E2F de maíz se expresan en tejidos de plántulas y en ejes embrionarios durante germinación. A. Se colectó 1 cm de tejido de hoja por encima del sitio de aparición de las raíces de corona (LB) y 1 cm por debajo de la punta (LT) de la segunda hoja de plántulas de 14 días (L2), también se cosechó el coleóptilo (C) y se embebieron semillas para extraer ejes de los tiempos indicados (inserto). Se obtuvieron, además, 2 mm de la punta de raíces primarias y secundarias. RNA total fue extraído y se construyó cDNA a partir de este. La barra de escala es 2 cm y 0.5 cm en el inserto. B. Se realizaron experimentos de RT-PCR utilizando cDNA de tejidos proliferativos (LB y RAM) y diferenciados (LT y C) de plántulas y ejes embrionarios de semillas secas o germinadas y los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. La subunidad ribosomal 18S (*r18S*) se utilizó como control de carga. LB: base de la segunda hoja; LT: punta de la hoja; RAM: punta de raíz; C: coleóptilo; DS: semilla seca; hpi: horas post-imbibición.

Para averiguar si el heterodímero E2F-DP reconoce la caja E2F consenso reportada para trigo y otras plantas (Ramírez-Parra *et al.*, 2003), se realizaron ensayos de EMSA utilizando versiones de las proteínas recombinantes sin etiqueta ZmE2Fa/b1;1 o ZmE2Fc, en complejo con ZmDPb2 (clonadas en el vector pPAL7, ver sección 2.7). Como sonda de DNA se empleó el elemento de respuesta a E2F (RE) localizado en la posición -195 pb en el promotor de *PCNA1* de maíz, ya que esta caja E2F es idéntica a la reportada para *Arabidopsis* (Ramírez-Parra *et al.*, 2003). Los resultados de EMSA

demonstraron que tanto ZmE2Fa/b1;1 (Fig. 3.3-C) como ZmE2Fc (Fig. 3.3-D) requieren la presencia de ZmDPb2 para unirse al motivo E2F en el DNA, ya que la adición de cantidades crecientes de ZmDPb2 recombinante (5, 50 o 500 ng), incrementó de manera clara la señal del retardamiento electroforético, mientras que las proteínas monoméricas no causaron dicho desplazamiento. Además, pudimos demostrar que el reconocimiento del elemento de respuesta a E2F es específico, ya que, ensayos de competencia con un exceso de sonda de DNA sin marcar, mostraron que la señal de retardamiento de movilidad desapareció, mientras que con un exceso de 1000 veces con sonda sin marcar y mutada en dos nucleótidos cruciales para la interacción (Ramírez-Parra *et al.*, 2003), la señal de retardamiento no fue afectada por la presencia del competidor no radiactivo (Fig. 3.3-C y D).

3.4. Genes con sitios E2F en el genoma de maíz pertenecen a múltiples categorías funcionales

Para saber más acerca de los posibles genes blanco de E2F, se analizó 1 kpb, río arriba de los promotores de todos los genes anotados en el genoma de maíz (39,756) en busca de dos motivos E2F reportados en *Arabidopsis* y otras plantas. Por un lado, el motivo de plantas WTTSSCSS (Vandepoele *et al.*, 2002) arrojó 58,886 sitios E2F, mientras que el motivo TYTCCCGCC identificó entre 16,592 y 44,344 genes, dependiendo de la astringencia del análisis, indicando que por cada gen podría existir más de un sitio E2F en su promotor (Fig. 3.4-A). Posteriormente, indagamos en la posible función de aquellos genes en la intersección de los dos motivos (con diferentes valores de probabilidad), seleccionando un grupo de 10,066 genes (Fig. 3.4-A). Los análisis de ontología revelaron que, entre las categorías funcionales de este conjunto de genes, las mejor representadas son meiosis II de polen, ensamble del complejo pre-replicativo, replicación de DNA, así como reparación por recombinación homóloga (HR) (Figs. 3.4-B; Sup. S3.10).

Dado que se identificaron más sitios E2F que genes, quisimos conocer la distribución de dichos sitios E2F en sus potenciales promotores blanco. Para ello, se contabilizó el número de sitios E2F por promotor, encontrando que de los 10,066 posibles blancos de E2F, 32.5 % poseen únicamente un sitio, mientras que el 30.1 % presentan dos sitios y el resto tres o más, llegando a encontrar genes con hasta 12 sitios putativos (Fig 3.4-C). Esta tendencia es distinta en *Arabidopsis*, donde únicamente ~33 % de genes blanco de E2F poseen más de un sitio de unión en su promotor (Vandepoele *et al.*, 2002), mientras que nuestro análisis revela que en maíz >60 % contienen dos o más sitios. Para saber si existen patrones en la posición de los sitios E2F, estos fueron mapeados sobre las regiones promotoras correspondientes. En general, la posición de las cajas E2F muestra una disminución en frecuencia conforme se aleja del sitio donde inicia la región codificante (ATG), sin embargo, es notable la presencia de dos picos de abundancia de sitios E2F alrededor de las posiciones -300 y -475, lo cual podría sugerir que la posición de las cajas E2F en maíz no es del todo aleatoria (Fig 3.4-D), a diferencia de *Arabidopsis* y arroz, donde la mayoría de los sitios E2F se distribuyen preferencialmente a lo largo de los primeros -400 o -300 pb río arriba del ATG, respectivamente (Vandepoele *et al.*, 2002), siendo el primer reporte de este tipo de distribución de sitios E2F a nivel genoma.

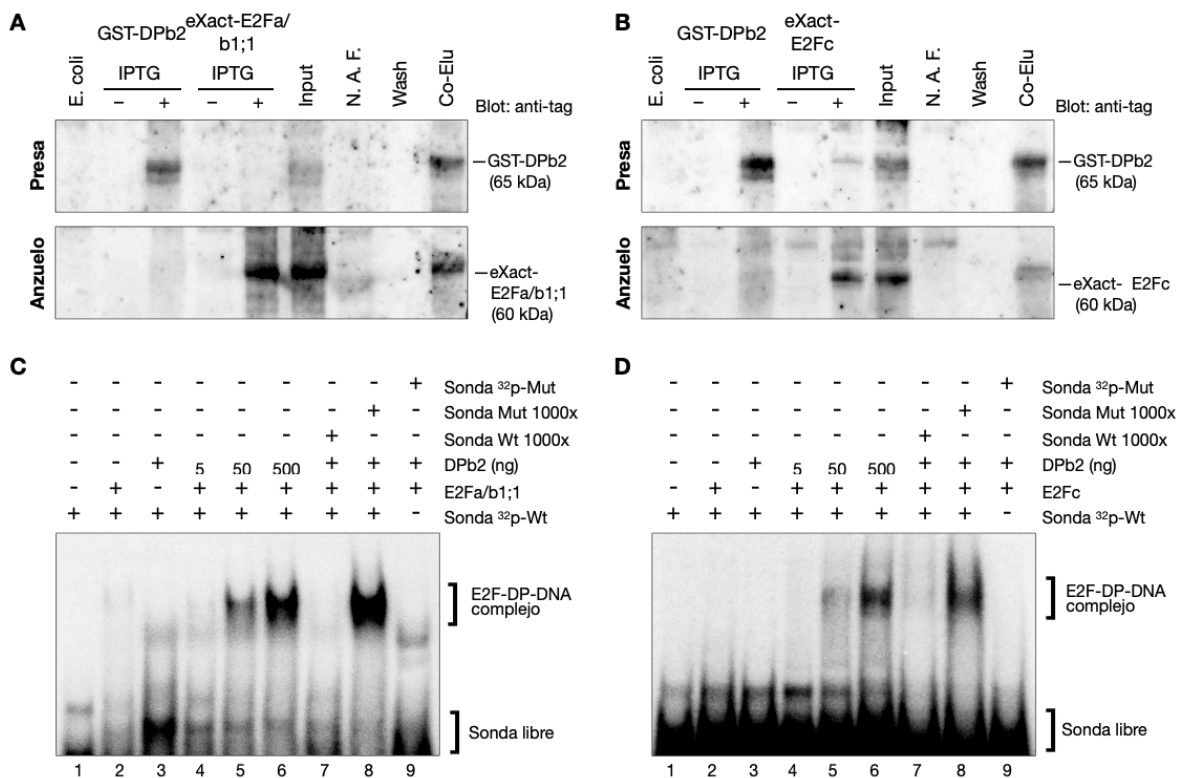


Fig.-3.3 | Las proteínas ZmE2Fa/b1;1 y ZmE2Fc forman heterodímeros con ZmDPb2 y pueden unirse al DNA. Ensayos de *pull-down* utilizando lisados bacterianos expresando (A) eXact-ZmE2Fa/b1;1 o (B) eXact-ZmE2Fc en presencia de GST-ZmDPb2. La fracción GST-ZmDPb2 se ancló a la resina de afinidad glutatión-seferosa y su unión a la resina se confirmó mediante *western blot* (paneles superiores), se lavaron las resinas y se monitoreó la interacción con eXact-E2Fa/ b1;1 o eXact-E2Fc en los eluatos (panel inferior). Carriles: *E. coli*, extracto total de *E. coli*; proteína antes (-) o después (+) de la inducción con IPTG; *Input*, mezcla de fracciones solubles con las proteínas recombinantes inducidas; N. A. F., fracción no adsorbida a la columna de afinidad; *Wash*, muestra del lavado previo a la elución; *Co-Elu*, fracción eluida de la resina unida a GST-DPb2. Los carriles son los mismos para los paneles superiores e inferiores. C. Ensayos de EMSA utilizando las proteínas recombinantes ZmE2Fa/b1;1 o (D) ZmE2Fc con ZmDPb2, utilizando como sonda la caja -4 del promotor *ZmPCNA1* que incluye la secuencia consenso de DNA de E2F. Carriles: 1, sonda de DNA marcada radiactivamente; 2, sonda con proteína E2F; 3, sonda con proteína DPb2; 4, 5, 6, sonda con proteínas E2F y DPb2 en cantidades crecientes (5, 50, 500 ng); 7, sonda con proteínas E2F y DPb2 y 5 pmol de sonda fría; 8, sonda *WT* con proteínas E2F y DPb2 y 5 pmol de sonda mutada fría. Los ensayos se realizaron con 500 ng de proteínas recombinantes, de lo contrario se menciona la cantidad. Se indican tanto la señal de desplazamiento debido a la interacción proteína-DNA como la sonda no unida.

3.5. Genes con elementos de respuesta a E2F incrementan su expresión durante la germinación

Una vez identificados posibles genes blanco E2F de maíz, se seleccionaron tres genes ortólogos que forman parte de la maquinaria de replicación y son blanco de E2F en otras especies: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 3;1 (MCM3;1)*, *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 1 (PCNA1)* y *REPLICATION PROTEIN A2 (RPA2)* (Tabla Sup. S7) (Kosugi & Ohashi, 2002a; Stevens *et al.*, 2002; Sabelli *et al.*, 2013). Se diseñaron cebadores específicos para monitorear mediante RT-qPCR la expresión de estos genes en el eje embrionario durante la germinación, eligiendo aquellos que mostraran un patrón de acumulación compatible con el avance del ciclo, *i. e.* acumulación entre 9 y 15 hpi, cuando la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran en la transición G1/S o en fase S temprana (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

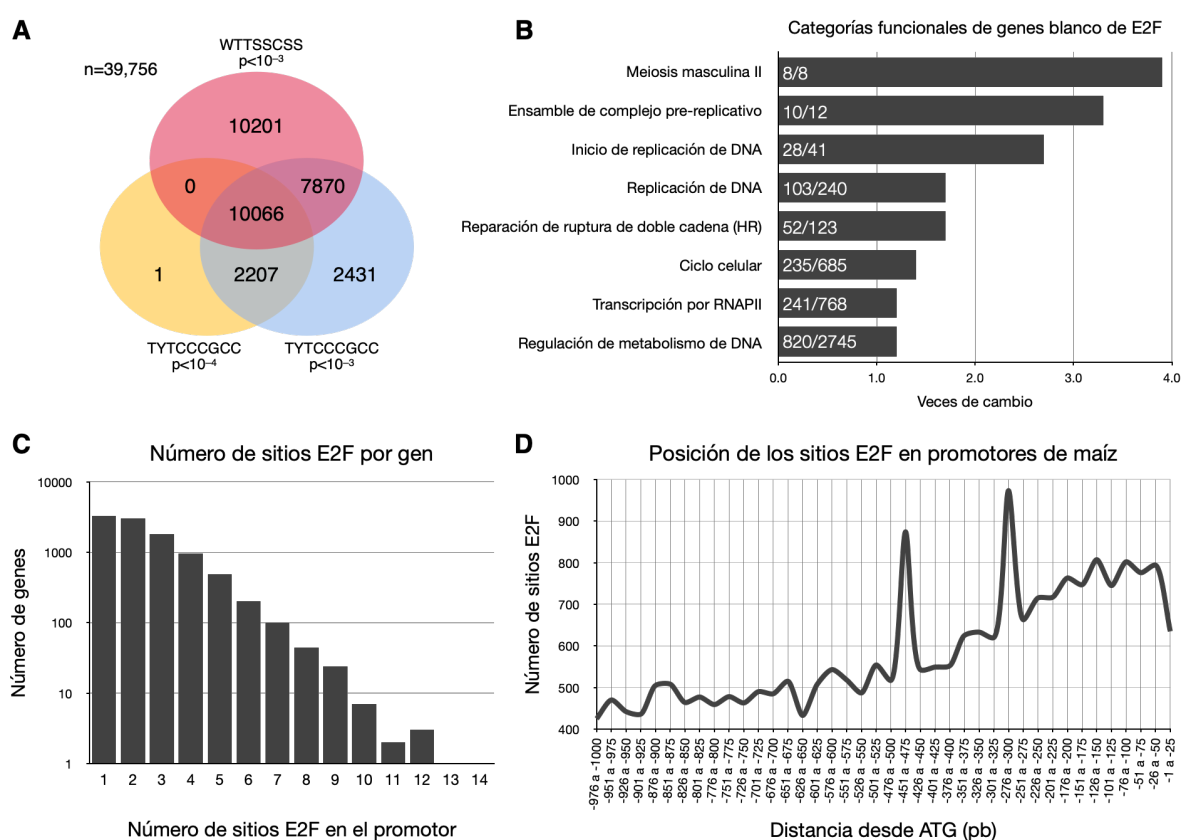


Fig.-3.4 | Posibles genes blanco de E2F en el genoma de maíz y su clasificación funcional. **A.** Diagrama de Venn mostrando el número de genes identificados con el motivo E2F en el genoma de maíz. Se muestran los valores de corte (p) debajo de cada motivo. No fue posible detectar candidatos con corte $p < 10^{-4}$ en WTTSSCSS debido a la presencia de múltiples bases ambiguas en el motivo. n = número de genes anotados en el genoma. **B.** Categorías funcionales más representadas en los 10,066 genes de la intersección en (A). El valor de FDR (*false discovery rate*) fue ajustado a condiciones estrictas ($FDR < 10^{-4}$). En cada barra se indica el número de genes con sitios E2F entre el total que componen la categoría funcional. **C.** Número de cajas E2F en los 10,066 genes con la secuencia consenso WTTSSCSS o TYTCCCGCC. El gráfico se muestra en escala logarítmica. **D.** Posición de los sitios E2F en los promotores blanco a lo largo de -1000 pb río arriba del inicio de la región codificante.

El gen *MCM3;1*, con cinco sitios potenciales para la unión de E2F en su promotor (Fig. 3.5-A), mostró un patrón de expresión cíclico durante la germinación (Fig. 3.5-B). *RPA2*, con tres cajas E2F en tándem y *PCNA1* con cuatro sitios distribuidos en dos pares en su promotor (Fig. 3.5-A), mostraron un patrón de expresión creciente a partir de las 15 h y hasta las 28 hpi (Fig. 3.5-B). Dado que estos tres genes contienen REs para E2F en sus regiones promotoras, es posible que la vía E2F participe en la regulación de su expresión a medida que avanza la germinación, y el ciclo celular.

3.6. Los heterodímeros E2F-DPb2 se asocian a sitios E2F en promotores de genes de maíz

Para comprobar si los REs de E2F presentes en los promotores de los genes blanco de E2F pueden ser unidos por las proteínas E2F-DP, se realizaron ensayos de EMSA utilizando las proteínas recombinantes, tanto ZmE2Fa/b1;1 como ZmE2Fc, en complejo con ZmDPb2, empleando como sondas los sitios E2F individuales en los promotores (flanqueados por 10 pb río arriba y 10 pb río abajo; Tabla Sup. S4) de los genes *MCM3;1* y *PCNA1*, y una sonda que incluye los tres sitios E2F en el promotor de *RPA2*, ya que están separados por únicamente dos nucleótidos (Tabla Sup. S7). Los cinco sitios E2F en el promotor de *MCM3;1* tienen la secuencia consenso WTTSSCSS; ya que el motivo es parcialmente palindrómico, se encontró un sitio "bidireccional" en la posición distal (caja -5, WTTSSCSSTTW) y cuatro cajas adicionales distribuidas hacia el sitio de inicio de transcripción (TSS por sus siglas en inglés) (Fig. 3.5-A). Las cajas -5, -2 y -1 fueron unidas por ambos complejos E2F-DPb2, sin embargo, la señal de retardamiento fue más intensa para el complejo ZmE2Fa/b1;1-DPb2 que para el que contenía a ZmE2Fc, mientras que la caja -3 fue unida preferentemente por ZmE2Fc y la caja -4 no fue reconocida eficientemente por ninguno de los tipos de complejos proteicos (Fig. 3.5-C). Las cajas -4, -3 y -2 en el promotor de *PCNA1* fueron unidas indistintamente por ambas proteínas E2F, mientras que la unión a la caja -1 no fue estable con ningún heterodímero con E2F. Por último, la sonda triple de *RPA2* mostró señal de retardamiento tanto con ZmE2Fa/b1;1 como con ZmE2Fc. Estos resultados mostraron que el reconocimiento de algunas cajas de E2F es compartido por los dos tipos de complejos que contienen E2F, mientras que para otras cajas (consenso) el reconocimiento del DNA podría depender de la subunidad E2F en el heterodímero.

3.7. Las proteínas ZmE2Fa/b1;1 y ZmE2Fc se unen diferencialmente a sus promotores blanco durante la germinación

Para estudiar la asociación *in vivo* de proteínas E2F a promotores de genes de replicación, se establecieron las condiciones de ChIP en colaboración con el grupo de la Dra. Maïke Stam (Universidad de Ámsterdam) (Fig. Sup. S3.8). Se estudió la unión de ZmE2Fa/b1;1 y ZmE2Fc a las distintas cajas E2F en los promotores de *MCM3;1*, *RPA2* y *PCNA1*. Como tejido problema, se emplearon puntas de raíces de ejes embrionarios (ver Capítulo 2 de esta tesis): ejes de semilla seca, con la mayoría de las células detenidas en la fase G0-G1; a 15 hpi, cuando se está iniciando fase S y, finalmente, a 28 hpi, cuando el ciclo celular y la germinación están en fases tardías (Vázquez-Ramos &

Primero, se cuantificaron los niveles de expresión tanto de $ZmE2Fa/b1;1$ como de $ZmE2Fc$ mediante RT-qPCR, encontrando un aumento importante en su expresión a 15 y 28 hpi (Fig. 3.6-A). Para inmunodetectar a las proteínas $ZmE2Fa/b1;1$ y $ZmE2Fc$, se generaron anticuerpos policlonales específicos, respectivamente (Fig. Sup. S3.9). Análisis de *western blot* utilizando los anticuerpos generados, mostraron que los niveles de ambas proteínas en el núcleo celular incrementaron con el avance de la germinación (Fig. 3.6-B). Para averiguar si las proteínas $ZmE2Fa/b1;1$ y $ZmE2Fc$ se encontraban unidas a promotores de sus genes blanco, se preparó cromatina de puntas de raíces en los tiempos mencionados anteriormente. La cromatina se fragmentó y se incubó con los anticuerpos dirigidos contra el E2F activador o el represor de maíz, empleando como control el suero pre-inmune correspondiente (Fig. Sup. S3.11). Es importante mencionar que la existencia de parálogos de los tres genes de interés (*MCM3;1*, *PCNA1* y *RPA2*), con identidad de secuencia de promotor de 71-84 % y alto contenido de GC (>66 %), dificultaron el diseño de cebadores específicos para qPCR (Bustin *et al.*, 2009), por esta razón, el DNA de los inmunocomplejos en la cromatina se amplificó por PCR punto final. Además, dado que los diferentes sitios E2F están muy cerca unos de otros, los cebadores para amplificar los sitios E2F de interés cubrieron más de una caja a la vez (Fig. 3.5-A, Tabla Sup. 8).

Los resultados obtenidos indicaron que las cajas -2 -1 de *MCM3;1* se encontraban unidas por $ZmE2Fc$ desde la semilla seca, mientras que a las 15 hpi no se detectó ninguno de los dos E2F estudiados. A 28 hpi, la presencia de $ZmE2Fa/b1;1$ se vio enriquecida y $ZmE2Fc$ fue detectable nuevamente (Fig. 3.6-C). En la región del TSS de *MCM3;1*, que incluye la caja -1 (Tabla Sup. S7), $ZmE2Fc$ también fue localizado en las semillas sin embeber y fue desapareciendo con el avance de la germinación. Por su parte, $ZmE2Fa/b1;1$ fue reclutado únicamente a 15 hpi y la asociación tanto de $ZmE2Fa/b1;1$ como de $ZmE2Fc$ a dicho TSS, disminuyó hacia las 28 hpi. Una situación similar se observó en el promotor *RPA2*. La presencia de $ZmE2Fc$ se encontró enriquecida tanto en los ejes de semillas secas como a las 28 h en los sitios E2F, mientras que la presencia del activador $ZmE2Fa/b1;1$ fue predominante a tiempos tardíos. El patrón de asociación al TSS de *RPA2* (que incluye al sitio E2F -1) mostró un aumento en la presencia de $ZmE2Fa/b1;1$ a medida que avanzó la germinación, mientras que $ZmE2Fc$ fue apenas detectable. El fragmento *PCNA1* -4 -3 indicó un incremento de la asociación de $ZmE2Fa/b1;1$ después de las 15 h, mientras que $ZmE2Fc$ nuevamente se encontró en niveles elevados tanto en los ejes de embriones provenientes de semilla seca como a 28 hpi. El fragmento que contiene los sitios -2 y -1 mostró un nivel creciente en el reclutamiento de $ZmE2Fa/b1;1$ durante la germinación; por su parte, $ZmE2Fc$ se encontró asociado en niveles similares en los tiempos estudiados. Finalmente, el TSS de *PCNA1* no mostró señal para ninguno de los dos TFs. El promotor de *CYCD3;1a* de maíz (Buendía-Monreal *et al.*, 2011) se utilizó como control negativo ya que no contiene cajas canónicas de E2F (Tabla Sup. S7) y, como se hipotetizó, no se encontró enriquecimiento de la señal de $ZmE2Fa/b1;1$ o $ZmE2Fc$ en su promotor. El estudio de los promotores blanco mediante ChIP reveló que existe una compleja dinámica de ocupación de los REs a E2F por miembros activadores y represores de la familia E2F, durante la germinación.

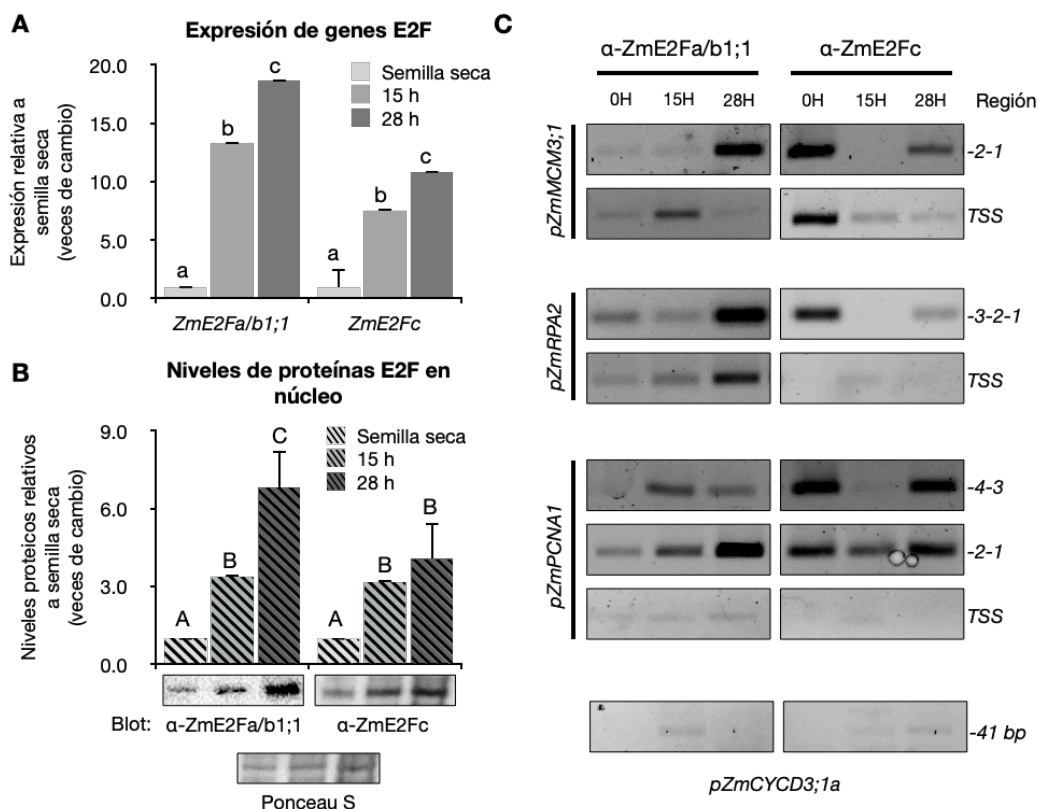


Fig.-3.6 | Las proteínas E2F se asocian diferencialmente a sus genes blanco durante la germinación. A. Expresión de los genes *ZmE2Fa/b1;1* y *ZmE2Fc* en puntas de raíces de embriones, determinada por RT-qPCR. Los valores se normalizaron con respecto a semilla seca. B. Western blot utilizando anticuerpos anti-ZmE2Fa/b1;1 o anti-ZmE2Fc en extractos nucleares preparados a partir de puntas de raíces de semillas en germinación. Los histogramas representan el valor densitométrico medio de tres réplicas biológicas normalizadas a semilla seca. Debajo de cada gráfico se muestra un blot representativo y se presenta una membrana teñida con Rojo Ponceau S como control de carga. Las barras representan el error estándar de la media; letras diferentes representan medias estadísticamente diferentes: $P < 0.1$ para (A) y $P < 0.5$ para (B) en una prueba *post hoc* de Tukey. C. Se estudió la asociación de las proteínas E2F a sus genes blanco durante germinación (0-28 hpi) mediante ChIP-PCR, utilizando anticuerpos policlonales contra las proteínas de maíz. Para los controles de validación de anticuerpos, ChIP y PCR véanse las Figs. Sup. S3.10 y S3.11. Abreviaturas: h, horas después de la imbibición; TSS, sitio de inicio de la transcripción.

3.8. Promotores blanco de E2F se encuentran decorados con distintas marcas epigenéticas durante la germinación

Para entender mejor la regulación transcripcional de los genes blanco de E2F, se estudió la dinámica de marcas de histonas durante la germinación. Los experimentos se centraron en los sitios E2F y TSS de los genes *MCM3;1*, *PCNA1* y *RPA2*. También se analizaron regiones cercanas al TSS de *CYCD3;1a* y *Actin1*, ambos genes expresados durante germinación, y un *locus* silenciado decorado densamente con la marca H3K27me3 (Makarevitch *et al.*, 2013), en adelante denominado

H3K27me3V5, ya que ninguno de estos *loci* presenta sitios E2F. Nuevamente se preparó cromatina a partir de puntas de raíces y se inmunoprecipitó con anticuerpos contra las marcas relacionadas con activación transcripcional H3K9/K14ac (H3ac) y H3K4me3, depositada por el complejo *trithorax*, o contra H3K27me3, marca represiva mediada por el complejo *polycomb* (Makarevitch *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2019). El DNA asociado a las marcas de histonas se amplificó mediante PCR y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los resultados mostraron niveles similares de H3ac a lo largo de la germinación en el TSS de *PCNA1*; esta misma marca aumentó después de 15 h en el TSS de *RPA2* (Fig. 3.7-A). Posiblemente debido a la proximidad entre las cajas E2F de *RPA2* -3-2-1 o *PCNA1* -1-2 y el TSS (Tabla Sup. S7), los patrones de acetilación fueron muy similares en el promotor correspondiente. Finalmente, no hubo enriquecimiento significativo en el *locus* *MCM3;1* (cajas E2F y TSS). Inesperadamente, *Actin1*, un gen altamente expresado, no mostró niveles significativos de H3ac, así como tampoco se observó en *CYCD3;1a* y *H3K27me3V5* (Fig. 3.7-A). Por otra parte, exceptuando a *H3K27me3V5*, todos los promotores analizados mostraron un fuerte enriquecimiento de la marca H3K4me3, con cierta disminución (*i.e.* *RPA2* -3-2-1, *PCNA1* -4-3 y TSS y *CYCD3;1a*) o aumento (*MCM3;1* y *RPA2* TSS) respecto a la semilla seca, a medida que avanzaba la germinación (Fig. 3.7-B). Los niveles de la marca represiva H3K27me3 se enriquecieron únicamente en el *locus* control *H3K27me3V5* y aumentaron significativamente en las tres cajas E2F de *RPA2* a 28 hpi (Fig. 3.7-C). De acuerdo con los niveles elevados de la marca relacionada con *trithorax* y los bajos niveles de la marca represora H3K27me3, la cromatina parece ser accesible en el TSS de los genes expresados durante germinación, así como en las cajas E2F en los promotores de los genes blanco de E2F.

4. Discusión

El objetivo de nuestro grupo de investigación es comprender el establecimiento del ciclo celular durante la germinación de las semillas y, en este contexto, el estudio de las proteínas de la familia E2F resulta fundamental. Aunque la familia de proteínas E2F/DP se encuentra conservada entre especies, el análisis filogenético recuperó evidencia clara de la formación de clados que contienen secuencias de proteínas exclusivamente de dicotiledóneas o monocotiledóneas, respectivamente. A pesar de ser proteínas con dominios funcionales conservados, fuera de estas regiones, las proteínas parecen haber divergido tras la separación de los dos grupos de plantas. Por ejemplo, al analizar secuencias proteicas se identificaron motivos conservados únicamente dentro de ciertas subclases de E2Fs, DELs y DPs (Figs. Sup. S3.3, S3.5, S3.6). El estudio de dichos motivos clado-específicos, podría permitir el descubrimiento de nuevas secuencias putativas que modulan la actividad de los TFs E2F de forma única dentro de cada grupo de plantas, *e. g.* sitios de modificación postraduccional, dominios de interacción con otras proteínas, sitios que afecten a la localización subcelular o su estabilidad, entre otros.

Únicamente 9 de los 12 genes E2F identificados en maíz se encontraron expresados en algunos de los tejidos analizados mediante PCR semicuantitativo, lo que indica que son genes funcionales. Con la excepción de *DEL1c*, el cual únicamente se expresó en la región meristemática de la hoja (base) y

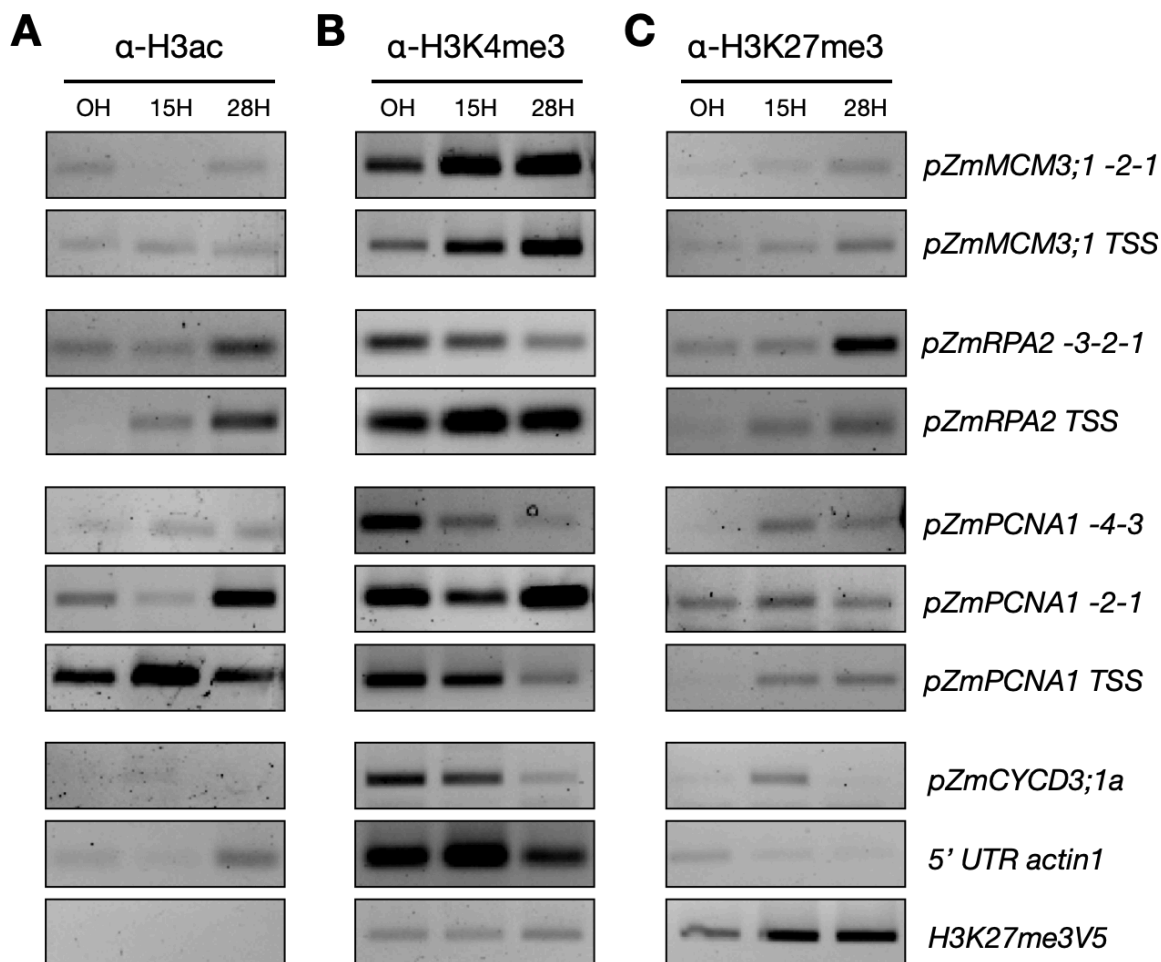


Fig.-3.7 | Dinámica de marcas epigenéticas en promotores de ciclo celular. Se estudiaron marcas epigenéticas presentes en regiones genómicas con sitios E2F (*pZmMCM3;1*, *pZmPCNA1* y *pZmRPA2*) o sin ellos (*pZmCYCD3;1a*, *actin1* 5'UTR, *locus H3K27me3V5*) mediante ChIP. El DNA asociado a las distintas marcas de histona se inmunoprecipitó utilizando anticuerpos contra H3ac (A), H3K4me3 (B) y H3K27me3 (C). El DNA recuperado se sometió a PCR utilizando los mismos cebadores que en la Fig. 3.6-C. Se muestran imágenes representativas de tres réplicas biológicas.

en la punta de la raíz, todos los genes E2F/DEL/DP se expresan de forma estable en los tejidos estudiados y durante la germinación. Es interesante señalar que dos de los genes no expresados, *E2Fa/b1;2* y *DEL1b*, tienen un gen parálogo expresado (*E2Fa/b1;1* y *DEL1c*, respectivamente), mientras que *DPc* no tiene ninguno (Fig. 3.2). Para indagar en este respecto, se analizaron datos transcriptómicos públicos (Winter *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Sekhon *et al.*, 2011) en busca de evidencia de la expresión de los tres genes E2F no detectados, sin embargo, la alta identidad de secuencia (>95 %) entre los parálogos de E2Fs podría dificultar el mapeo diferencial de lecturas cortas de RNA-seq entre los *loci* duplicados, arrojando niveles de expresión idénticos entre ellos (Fig. Sup.

S3.12-A). Por otro lado, no podemos descartar la posibilidad de una anotación errónea de los genes E2F predichos en la base de datos del genoma de maíz, por lo que los cebadores de PCR podrían unirse a regiones no expresadas como en el caso de *E2Fa/b3* (Fig. Sup. S3.1). Curiosamente, DPc, un gen que parece estar presente exclusivamente en monocotiledóneas, se expresa específicamente en ciertas etapas del desarrollo de las hojas (Baute *et al.*, 2016) y en baja proporción en algunos tejidos de los granos de maíz y durante desarrollo floral temprano (<http://bar.utoronto.ca>), lo que podría sugerir un papel específico durante el desarrollo de esta planta monocotiledónea.

Las proteínas E2F de humano se agrupan en dos tipos de proteínas distintos, por un lado están las conocidas como típicas, E2F1-E2F3a que forman complejos con DP1-DP3 para estimular transcripción, mientras que E2F3b-E2F6, también en complejo con DP1-DP3, la contrarrestan (Cartwright *et al.*, 1998; Trimarchi *et al.*, 1998; Attwooll *et al.*, 2005; Dimova & Dyson, 2005). Por otro lado, las proteínas atípicas E2F7 y E2F8 pueden actuar como monómeros o formar homo y heterodímeros entre ellas, mostrando en ambos casos una función represora (Li *et al.*, 2008). Del mismo modo, los homólogos de E2F en *Arabidopsis* se dividen en proteínas activadoras (E2Fa y E2Fb, en complejo con DPa), o represoras (E2Fc en complejo con DPb) y DEL1, DEL2 y DEL3 (como monómeros) y todas ellas reconocen la misma secuencia de DNA. Es importante señalar que en gramíneas no se pudo identificar ninguna proteína del tipo DPa, por el contrario, la gran mayoría de los miembros del tipo DP son similares a DPb (Fig. Sup. S3.3-B). Desde el punto de vista evolutivo, DPb parece ser el estado ancestral del subgrupo DP en las angiospermas, ya que todas las especies analizadas contienen al menos un miembro de este clado, mientras que DPa sólo se encuentra en plantas dicotiledóneas. De forma consistente, los complejos heterólogos reconstituidos *in vitro* por Kosugi & Ohashi (2002b) utilizando a DPb de *Arabidopsis* (dicotiledónea) con E2F de arroz (monocotiledónea), mostraron una mayor afinidad por el DNA que los que contenían DPa como socio de dimerización, lo que podría sugerir una preferencia de interacción por el grupo basal conservado DPb sobre el grupo DPa derivado de dicotiledóneas. Las gramíneas contienen un tercer tipo de DP, denominado DPc (Fig. Sup. S3.3-C), sin embargo, no pudimos estudiar este gen durante la germinación de semillas ya que no se encontró expresado aun empleando diferentes juegos de cebadores. Nuestros resultados también mostraron que las proteínas tanto ZmE2Fa/b1;1 como ZmE2Fc, son capaces de formar complejos con ZmDPb2 *in vitro* (Fig. 3.3-A, B) aunque con afinidades distintas dependiendo del sistema experimental (Fig. 3.3-A, 3.3-B y Fig. Sup. S3.7-B), y de unirse a la misma secuencia de DNA (Fig. 3.3-C, -D). Es interesante mencionar que experimentos de transactivación en levadura demostraron que E2Fa/b1;1 es capaz de estimular expresión de un gen reportero y dicha actividad está asociada a su extremo carboxilo terminal (Fig. Sup. S3.13) (Romero-Rodríguez, 2019). Por el contrario, la proteína E2Fc no mostró la capacidad de activar transcripción. Sin embargo, este tipo de experimentos no son suficientes para confirmar si E2Fc puede actuar como represor. Curiosamente, las proteínas E2Fc de todas las especies estudiadas en esta tesis se encuentran truncadas al final de la región de interacción con RBR, mientras que E2F activadores contienen un motivo corto adicional en el C-terminal (indicado como motivo 27 en las Figs. Sup. S3.3-A y S3.6). Experimentos en los que se añadió el motivo 27 de ZmE2Fa/b1;1 al extremo carboxilo de ZmE2Fc, transformaron a este último en un factor activador, lo que sugiere que E2Fc podría haber perdido su carácter transactivador durante la evolución y la forma de contrar-

restar la actividad de los E2F activadores podría ser 1) compitiendo por el RE de E2F en el DNA y/ o 2) reclutando al represor transcripcional RBR a sus promotores blanco (Romero-Rodríguez y Sánchez-Camargo, en preparación).

La abundancia relativa de los transcritos de genes de ciclo celular controlados putativamente por E2F, incrementó a medida que avanzó la germinación (Fig. 3.5-B), sugiriendo que podría ser consecuencia de la unión de E2F a sus REs en los promotores de estos genes (Fig. 3.5-A). Los complejos activadores o no activadores se unieron con distinta afinidad a las cajas de E2F *in vitro*, probablemente dependiendo de los nucleótidos que cubren la secuencia consenso de DNA WTTSSCSS (Fig. 3.5-C, Tabla Sup. S7). Por ejemplo, la caja -2 en *MCM3;1* (TTTCGCGC) fue unida con mayor afinidad por ZmE2Fa/b1;1 que por ZmE2Fc, y por el contrario, la caja *MCM3;1* -3 (TTTGGCCC) fue unida preferentemente por ZmE2Fc. Por otro lado, la caja -1 de *PCNA1* (TTTCGCGG), una secuencia predicha como blanco de E2F según el consenso de *Arabidopsis* (Ramírez-Parra *et al.*, 2003; Vandepoele *et al.*, 2005), sólo se unió débilmente a ZmE2Fa/b1;1. En contraposición, la caja -3 en *MCM3;1* no contiene los nucleótidos CG en las posiciones seis y siete (subrayados), reportados como necesarios para la interacción con el motivo E2F en *Arabidopsis* (Ramírez-Parra *et al.*, 2003), es capaz de interactuar con ZmE2Fc de manera eficiente. Por lo tanto, aunque existe la asociación con secuencias generales consenso, podrían existir también secuencias preferidas de manera especie-específica; alternativamente, las secuencias que no fueron unidas por E2Fa/b1;1 o E2Fc, podrían ser reconocidas por otros complejos E2F-DP no estudiados aquí.

In vivo, la dinámica de ocupación de los promotores por E2Fs activadores o represores debe seguir un importante bucle de regulación (Bertoli *et al.*, 2013). Para que la transcripción de genes necesarios para la transición G1/S y la fase S ocurra de manera adecuada, los genes blanco deben estar desprovistos tanto de E2Fs represores como de RB (Attwooll *et al.*, 2004; del Pozo *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, los complejos CYC/CDK participan en este proceso, fosforilando a la proteína E2Fc para su degradación dependiente del proteasoma 26S (del Pozo *et al.*, 2002, 2006; de Jager *et al.*, 2009) e hiperfosforilando a la proteína RBR para liberar al complejo E2F-DP, revirtiendo la represión de E2Fs activadores, permitiendo así la expresión de los genes blanco de G1/S y S (Inzé & de Veylder, 2006). La germinación de las semillas proporciona un modelo para estudiar la transición G1/S, ya que la mayoría de las células de los ejes embrionarios de semillas secas están en fase G1 (o G0) y tras la imbibición avanzan a través del ciclo celular, teniendo lugar la replicación entre las 12 y las 18-20 h y apareciendo las primeras estructuras mitóticas hacia las 24-28 hpi (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003; Sánchez *et al.*, 2005). Durante G1 tardío, tras superar la represión de RBR, como consecuencia de la actividad de complejos CYC/CDK, la vía E2F autorregula su expresión mediante el RE a E2F en sus promotores, reforzando un bucle de retroalimentación positiva, garantizando la acumulación de la proteína E2F para activar de forma coordinada el gran número de genes blanco de E2F necesarios para la transición G1/S y la fase S, tras el compromiso de entrada a replicación del DNA (Bertoli *et al.*, 2013). La Fig. 3.6-A muestra un patrón de acumulación de los productos de los genes *ZmE2Fa/b1;1* y *ZmE2Fc* tras la imbibición de la semilla y la Fig. 3.6-B muestra un aumento correspondiente en los niveles de proteína E2F a lo largo de la germinación. Análisis de secuencia de los promotores de los genes *ZmE2Fa/b1;1* y *ZmE2Fc* reveló dos cajas E2F en cada promotor (Fig. Sup. S3.12-B), lo que sugiere un escenario en el que las proteínas E2F podrían

autorregular su expresión también en maíz. Los datos de ChIP indicaron que los promotores de algunos genes de ciclo celular como *MCM3;1*, *RPA2* y *PCNA1* estaban unidos al TF no activador ZmE2Fc; hacia las 15 h, cuando la replicación estaría teniendo lugar, sólo se encontró asociado el activador ZmE2Fa/b1;1 y hacia las 28 h, pi hacia el final de un ciclo celular completo, se encontraron tanto los E2F no activadores como los activadores (Fig. 3.6-B). Incidentalmente, nuestros resultados de asociación de E2Fc a sus promotores blanco, coinciden con la localización de RBR1 de maíz a los mismos *loci* en etapas finales de la germinación (Suárez-Espinoza, 2019)(Fig. Sup. S3.14). Por otro lado, también resalta que los niveles de proteína E2F (Fig. 3.6-B) no se correlacionan con los de unión a los promotores; esto se podría deber a la existencia de miles de sitios blanco de E2F a lo largo del genoma (Fig. 3.4) en los que las proteínas E2F podrían localizarse (Vandepoele *et al.*, 2005; Hénaff *et al.*, 2014), además de todos mecanismos que regulan a E2F antes de que puedan alcanzar sus objetivos en la cromatina (del Pozo *et al.*, 2002; Kosugi & Ohashi, 2002a, 2002b; Xiong *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016; Kállai *et al.*, 2020). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que los genes blanco de E2F son reprimidos en la semilla seca y quizá a tiempos tempranos de germinación por ZmE2Fc y ZmRBR1 (Suárez-Espinoza, 2019), ya sea en complejo o de manera individual. A medida que avanza la germinación, el activador ZmE2Fa/b1;1 se une a sus promotores diana, posiblemente para estimular la expresión de genes de G1/S y S. Por otro lado, a 28 hpi tanto el E2F activador como el no activador están unidos a los mismos promotores, indicando quizás un control transcripcional dinámico en las fases tardías del ciclo celular. En concordancia con nuestras observaciones, la aparición de ZmRBR1 en fases tardías (Fig. Sup. S3.14) podría ser de importancia también para permitir la correcta entrada a una siguiente ronda de proliferación celular.

Se ha propuesto que las semillas poseen una memoria bioquímica que permite reiniciar el metabolismo una vez que se da la imbibición (Harris & Dure, 1978) y esta memoria podría estar representada, al menos parcialmente, por el transcriptoma y el proteoma "almacenados" durante la maduración de las semillas (Nakabayashi *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2016); existen evidencias que prueban que las moléculas almacenadas contienen información relacionada tanto con el desarrollo tardío de las semillas como con las primeras etapas de la germinación (Rajjou *et al.*, 2004; Kimura & Nambara, 2010). Hasta ahora no existe suficiente información de este tipo reportada para maíz, sin embargo, en nuestro laboratorio se ha reunido evidencia de que los reguladores del ciclo celular están presentes y activos a lo largo del proceso de germinación, y para algunas de estas proteínas, parece haber un equilibrio entre síntesis y degradación, lo cual sugiere que no se trata únicamente de vestigios del proceso de desarrollo anterior (Cruz-García *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2000; Godínez-Palma *et al.*, 2013; Garza-Aguilar *et al.*, 2017). Estudios recientes han demostrado la existencia de *switches* transcripcionales en *Arabidopsis* en la transición de semilla seca a germinación (Fait *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2008; Howell *et al.*, 2009; Footitt *et al.*, 2015), siendo la regulación de la estructura de la cromatina por los complejos *trithorax* y *polycomb* un factor determinante (Molitor *et al.*, 2014; Footitt *et al.*, 2015). En este trabajo se estudiaron algunas marcas reguladoras de la estructura de la cromatina. La presencia de H3ac en TSSs de distintos genes blanco de E2F concuerda con la activación de su expresión a medida que avanza la germinación (Fig. S3.7-A). Se sabe también que la marca H3K4me3 se establece en promotores proximales y principalmente alrededor de la región del TSS de los cuerpos de genes activos e indica cromatina accesible (Lauria & Rossi,

2011; Peng *et al.*, 2019). En nuestro sistema, encontramos a H3K4me3 enriquecida en la mayoría de los promotores estudiados, desde la semilla seca hasta 28 hpi (Fig. 3.7-B), lo que sugiere un estado de cromatina abierta (Fuchs & Schubert, 2012; He *et al.*, 2014), que, interpretado desde la hipótesis de la memoria bioquímica de la semilla, podría plantear un escenario en el que al final del desarrollo de la semilla, genes que necesitarían ser expresados de manera temprana podrían mantenerse con un estado de cromatina permisiva para transcripción. Por otro lado, en *Arabidopsis* H3K4me2 y me3 están estrechamente relacionadas con la replicación del DNA, ya que se encuentran enriquecidas en sitios donde se establecen orígenes de replicación tempranos (Costas *et al.*, 2011a); durante la germinación de maíz, la fase S del ciclo celular comienza alrededor de 12 a 15 hpi, por lo que no se descarta que los altos niveles de H3K4me3 observados en este trabajo, también pudieran estar relacionados con la replicación del DNA.

Experimentos de accesibilidad de cromatina mediante FAIRE-PCR (*Formaldehyde-assisted Isolation of Responsive Elements*), metodología que permite identificar regiones sin nucleosomas y/o ricas en elementos regulatorios en el DNA, indicaron que durante germinación existe una ocupación dinámica de las regiones que contienen sitios E2F. En la semilla seca, se encontró que tanto sitios E2F como TSSs se encuentran accesibles, posteriormente, su ocupación por proteínas incrementa a las 15 hpi en los tres genes y en *PCNA1* y *RPA2* la accesibilidad se recupera a las 28 hpi (Fig. Sup. S3.15), pudiendo relacionarse con la presencia del complejo transcripcional de la RNAPII, coincidiendo con el incremento de expresión de estos genes. Por su parte, los resultados de ChIP respecto a las marcas de cromatina indicaron que en las semillas secas los sitios E2F en los promotores de *MCM3;1*, *RPA2* y *PCNA1* son accesibles (Fig. 3.7), pero están unidos por ZmE2Fc (Fig. 3.6), y posiblemente por RBR (Suárez-Espinoza, 2019). Esto sugiere que, aunque existe un estado de cromatina transcripcionalmente permisivo, los represores E2Fc y RBR1, ya sea como complejo o por vías independientes, podrían impedir el inicio prematuro del ciclo celular mediante la represión de genes de G1/S (blanco de E2F). En este tenor, sería interesante estudiar la ocupación promotores por las proteínas E2F y RBR, así como el estado de cromatina en fases tardías del desarrollo de la semilla, para averiguar si estas podrían estar "preparándose" para reiniciar el ciclo celular tras el periodo de latencia.

La marca H3K27me3 se detectó principalmente después de 15 hpi en los promotores de los genes *MCM3;1*, *PCNA1* y *RPA2*, pudiendo estar relacionada con la represión de la expresión de estos genes en tiempos tardíos de la germinación (Fig. 3.5). Aunque en este trabajo las marcas de los complejos *trithorax* y *polycomb*, consideradas mutuamente excluyentes (Schmitges *et al.*, 2011; Geisler & Paro, 2015), fueron detectadas en los mismos promotores, no descarta que pueda deberse a la diversidad de tejidos presentes en las puntas de las raíces, como la epidermis, el (prospectivo) centro quiescente y cofia de la raíz (Hochholdinger & Tuberosa, 2009), donde los *loci* estudiados podrían estar decorados por diferentes marcas de histona a los mismos tiempos después de la imbibición.

5. Conclusiones

Las proteínas E2F/DP de maíz poseen funciones opuestas: ZmE2Fa/b1;1 se caracterizó como un activador transcripcional, mientras que ZmE2Fc podría estar funcionando como un factor antagónico, compitiendo diferencialmente por los sitios E2F en promotores, y quizás reclutando a ZmRBR1 a los promotores objetivo. De este modo, la familia E2F/DP en concierto con las proteínas RBR, podría conducir a una regulación fina de la expresión de sus genes blanco durante la germinación de la semilla, en particular de los genes de replicación del DNA, siendo la accesibilidad de la cromatina un factor clave para la función del E2F. Finalmente, nuestras observaciones son consistentes con el concepto de una memoria bioquímica en las semillas, añadiendo a los reguladores del ciclo celular almacenados presentes en las semillas secas (mRNAs y proteínas), un posible nivel de regulación adicional impuesto por la estructura de la cromatina, la cual podría favorecer la reanudación de la expresión génica de blancos de E2F (entre otros), e incluso facilitar otros procesos como la reparación y replicación del genoma, una vez reactivada la semilla por la entrada de agua.

Capítulo 4

Discusión general

La familia E2F y el ciclo celular durante la germinación

Acerca de este capítulo

En este capítulo se contrastan datos previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación y otros, con los resultados de este proyecto. Así mismo, el autor proporciona una visión integrada del proceso germinativo y eventos relacionados con el ciclo celular, incluyendo desde el almacenamiento de información en la semilla seca, hasta el despertar metabólico del embrión y su compromiso a proliferación celular.

1. Regulación de la expresión genética y el ciclo celular durante la germinación

Uno de los primeros objetivos de esta tesis fue definir las etapas de la germinación de maíz V. Chalqueño, que como en otras semillas ortodoxas, están claramente marcadas por el contenido de agua en la semilla. Conocer la temporalidad de estas etapas es de suma importancia, ya que son acompañadas por procesos característicos, tanto a nivel celular como molecular, cuya finalidad es culminar con la germinación exitosa, incluyendo proliferación celular, pero también podría preparar al embrión para procesos de desarrollo. Durante la primera etapa, al añadir agua a una semilla de maíz que ha perdido más del 80 % de humedad como parte de su programa de maduración y secado, ésta se embeberá rápidamente, principalmente por efectos físicos, hasta alcanzar un equilibrio. Concomitante a la imbibición se reactivarán funciones mitocondriales tales como respiración y comenzará la reparación de estructuras y macromoléculas dañadas durante la desecación, almacenamiento e imbibición. Una vez hidratados los componentes celulares, la presión de turgencia impedirá la absorción de agua en exceso, deteniendo el incremento de peso fresco, marcando así el final de la fase I (Bewley *et al.*, 2013). Nuestras observaciones indican que esta fase

comenzaría al momento de la imbibición y se extiende hasta las 12 hpi, cuando el incremento en peso fresco alcanza una meseta. La segunda fase de la germinación pareciera transcurrir sin grandes cambios ya que ni el peso fresco ni la longitud del eje embrionario cambian. Sin embargo, una vez que los componentes celulares han sido restaurados y el metabolismo energético ha sido restablecido, ocurre un incremento abrupto de síntesis de RNA, así como de proteínas entre las 14 y 17 hpi (Cruz-García *et al.*, 1995). Entre los genes expresados diferencialmente (DEGs) en esta etapa, se encuentran múltiples componentes de la maquinaria de ensamblaje de cromatina y nucleosomas, movimiento de componentes celulares, receptores acoplados a proteína G y estrés oxidativo, entre otros (Wang *et al.*, 2022). En *Arabidopsis*, el citoesqueleto también atraviesa por cambios importantes durante la germinación, pasando de una conformación aparentemente aleatoria en semillas secas, a una conformación ordenada una vez embebidas, favoreciendo la organización de las células en los tejidos del eje embrionario (Yan *et al.*, 2020). De acuerdo con lo anterior, las células en el meristemo apical de raíz en semillas secas de maíz parecieran tener forma irregular, mientras que pasadas 28 hpi, las células adquieren un aspecto turgente y se pueden apreciar claramente arregladas en hileras de células uniformes. Durante la fase II de la germinación, uno de los eventos más relevantes es un segundo pico de síntesis de DNA, pero esta vez mayor que el de la primera fase y corresponde a la replicación del genoma de células en el embrión. En esta etapa, la adición de *a*-amanitina tiene un efecto de inhibición sobre la síntesis replicativa de DNA (Zúñiga-Aguilar *et al.*, 1995), indicando que la expresión de nuevos genes es necesaria para replicar el genoma, aunque la identidad de dichos genes permanece elusiva. En cebada (*Hordeum vulgare*), la protrusión radicular ocurre a las 72 hpi. En la semilla seca, alrededor del 60-62 % del genoma de la planta se encuentra representado como RNA (~13,000 transcritos). A tiempos tempranos de imbibición (24-48 hpi) no ocurren grandes cambios a nivel de expresión de genes y el transcriptoma en este punto es similar al de la etapa de maduración de la semilla en el eje embrionario (>99 % o 13,050 transcritos aprox.), mientras que en el endospermo muestra una similitud de sólo 46 % previo a la imbibición (Sreenivasulu *et al.*, 2008), por lo que se ha hipotetizado que las etapas tempranas podrían ser llevadas a cabo con proteínas almacenadas durante la maduración, así como la síntesis de nuevas proteínas con mRNAs presentes en la semilla seca (Fait *et al.*, 2006; Angelovici *et al.*, 2010). De tal suerte que la semilla podría poseer un tipo de memoria bioquímica que contiene la información requerida para germinar. De manera interesante, mRNAs y proteínas reguladoras del ciclo celular también han sido detectados en este banco de información, tentándonos a preguntar si el ciclo celular también forma parte del programa de germinación.

En nuestro grupo de investigación se ha reportado la presencia de mRNAs de familias de reguladores tales como CYCD, CYCB y CYCA, CDKA y CDKB, ICK/KRP, CKS, PCNA, E2F, DEL, DP y RBR, así como de la maquinaria de replicación de DNA como RPA, MCM, DNA POL- α , DNA POL- δ y DNA POL- ϵ , tanto en semillas secas como embebidas (Coello-Coutiño *et al.*, 1994; Herrera *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2002; García-Ramírez *et al.*, 2006; Lara-Nunez *et al.*, 2008; Buendía-Monreal *et al.*, 2011; Godínez-Palma *et al.*, 2013, 2017; Garza-Aguilar *et al.*, 2017, 2019; Sánchez-Camargo *et al.*, 2020). Además, se ha encontrado a muchas de estas proteínas como monómeros o asociadas en complejos multiméricos, con actividad enzimática sobre distintos sus-

tratos nucleares relacionados con el ciclo celular (Garza-Aguilar *et al.*, 2017). Ya que la mayoría de las células del embrión tienen un contenido de DNA similar al de fase G0/G1 del ciclo celular y posterior a la imbibición transitan hacia G2/M (Sánchez *et al.*, 2005), es tentador emplear a la germinación como modelo para estudiar al ciclo.

Desde el punto de vista del ciclo celular, durante la fase I de la germinación o inicio de la II, el embrión se prepara para transitar hacia la replicación. Entre los eventos que deben tener lugar es la adecuación de su estado metabólico, ya que la replicación es un proceso celular sumamente costoso en términos energéticos (Salazar-Roa & Malumbres, 2017). La primera fase de la germinación es sensible a factores tanto ambientales como internos. Por ejemplo, la presencia de la hormona ácido abscísico (ABA) podría impactar tanto en la regulación traduccional como en el metabolismo energético del embrión mediante la vía de señalización de las cinasas SnRK1-TOR. En presencia de ABA, la fosforilación mediada por cinasas SnRK1 provoca la disociación de subunidades del complejo mTORC, que es la forma activa de la vía TOR (Belda-Palazón *et al.*, 2020; Obomighie *et al.*, 2021), impactando la función de otras cinasas río abajo como S6K, la cual a su vez regula tanto biogénesis de ribosomas como control traduccional al fosforilar a la proteína ribosomal S6 (rpS6). El control traduccional mediante la vía TOR en germinación se ve manifestado por la caída del contenido total de proteínas al tratar ejes embrionarios de maíz con el inhibidor selectivo de TOR AZD-8085 (Díaz-Granados *et al.*, 2020). Por otro lado, TOR también podría estar controlando el ciclo celular en la germinación integrando señalización por glucosa, como lo indica la estimulación de expresión de marcadores de ciclo celular, por ejemplo, del gen *ZmCYCD4;2* o la proteína *ZmCYCD3;1*, así como la síntesis *de novo* de DNA en meristemas de raíz durante las primeras 24 hpi (Díaz-Granados *et al.*, 2020). Por otra parte, en *Arabidopsis* se ha observado que la vía glucosa-TOR estimula al ciclo celular en el meristemo apical de la raíz mediante la fosforilación de E2Fa y E2Fb, provocando que estos factores transcripcionales (FTs) sean reclutados a sus *loci* blanco de fase S, favoreciendo la activación transcripcional y en consecuencia el tránsito hacia dicha fase, todo esto probablemente de manera alterna a la vía CYC-CDK (Xiong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). El efecto de la adición del inhibidor AZD-8085 durante la germinación, además de afectar a la síntesis proteica, ocasiona una inhibición total de la síntesis de DNA aún en presencia de glucosa, indicando que la señalización por glucosa y TOR también podría participar en dicho proceso en maíz (Díaz-Granados *et al.*, 2020). Desde el punto de vista de la germinación, pareciera existir una función adicional para la cinasa TOR, quien además de orquestar el balance energético y el control traduccional en el eje embrionario, podría participar también en la modulación del inicio de la replicación del genoma durante la fase II de germinación, *i.e.* transición G1/S y fase S del ciclo celular.

2. La familia E2F de maíz y la germinación

El enfoque central de esta tesis fue el estudio de la familia E2F de maíz, la cual es una familia de FTs que se encarga de la regulación transcripcional de la transición G1/S. Considerando el incremento súbito en actividad de DNA POL- δ a las 18 hpi (García-Ramírez *et al.*, 2006), podríamos

asumir como hipótesis de trabajo que la transición G1/S del ciclo celular ocurriría entre las 12 y 18 hpi, y de acuerdo con nuestros datos de toma de agua, coincide con la transición entre las fases I y II de la germinación. Al estudiar la expresión de genes de la familia E2F, encontramos que, de manera similar a otras familias de reguladores del ciclo, los RNA mensajeros de estos FTs también se encontraban almacenados en la semilla seca y expresados a lo largo de la germinación. De entre los E2F candidatos, *E2Fa/b1;1* y *E2Fc* mostraron un patrón de acumulación de mRNA, así como de sus proteínas conforme la germinación avanzó. Dichos patrones de expresión podrían ser compatibles con el avance del ciclo celular. Análisis globales de promotores de maíz, mostraron un enriquecimiento de sitios E2F en promotores de la maquinaria de replicación del DNA. Nuestros experimentos indicaron que la expresión de algunos de estos, tales como *MCM3;1*, *RPA2* y *PCNA1*, incrementa de manera significativa entre las 12 y 15 hpi, alcanzando un máximo a 18 hpi, confirmando que entre 12 y 15 h podría tener lugar la transición G1/S. Siguiendo dos estrategias experimentales distintas se pudo demostrar que los genes antes mencionados son blancos de E2F. Mediante ensayos de tipo EMSA, se encontró asociación de los complejos recombinantes E2Fa/b1;1-DPb2 y E2Fc-DPb2 con las distintas cajas E2F identificadas en los promotores, encontrando que estos complejos son capaces de reconocer diferencialmente secuencias de tipo E2F consenso de plantas. La asociación fue eficiente para la secuencia TTTCCCCC en el promotor de *MCM3;1* de maíz, que carece de los nucleótidos GC en las posiciones 6 y 7, necesarios para la unión de E2Fs de *Arabidopsis* (Ramírez-Parra *et al.*, 2003). Esto sugiere que las secuencias reconocidas por proteínas E2F podrían variar entre especies e incluso depender de las subunidades que forman el complejo, pudiendo constituir un nivel de regulación adicional de la familia E2F. En *Arabidopsis*, se ha observado que el promotor del gen ortólogo *MCM3*, también posee 5 sitios E2F putativos y su patrón de expresión responde al ciclo celular, acumulándose previo al inicio de la replicación en células sincronizadas con afidicolina (fase S temprana) y disminuye cuando inicia mitosis. Cuando el motivo -4 (distal) de su promotor es mutado, el dominio de expresión de *MCM3* se extiende a todo el ciclo, mientras que la mutación del sitio -2 (proximal) disminuye de manera importante su expresión (Stevens *et al.*, 2002). Ensayos de expresión transitoria fusionando el promotor de *MCM3* al reportero *GUS*, indicaron que en presencia del activador E2Fa y las cajas -2 y -4, el gen reportero era activado, mientras que la mutación de la caja distal (-4) ocasionaba una actividad aún mayor. Por el contrario, mutaciones en la caja proximal (-2) ocasionaron la pérdida de la capacidad de activación por E2Fa. Por otro lado, también se ha observado que únicamente la caja distal es unida por E2Fc *in vitro* (Stevens *et al.*, 2002), indicando que la caja distal podría tener una función represora en conjunto con E2Fc, mientras que la caja proximal podría ser activada constitutivamente por E2Fa y el juego de ocupación de estas cajas por los dos tipos de complejos moldea la expresión cíclica de *MCM3* durante el ciclo celular en *Arabidopsis*. Recapitulando nuestros resultados, las cajas proximales -1 y -2 en *MCM3;1* son reconocidas por el activador E2Fa/b1;1 mientras que la caja -3, más alejada del ATG, es reconocida por E2Fc, pudiendo existir conservación en las funciones de las distintas cajas E2F durante la evolución. Sin embargo, hasta la fecha no se han detectado patrones de secuencia que den indicios si una caja E2F pudiera ser activadora o represora, lo cual permitiría un mejor entendimiento de la regulación mediada por la familia E2F.

En este proyecto, también se estudió mediante CHIP la asociación *in vivo* tanto de E2Fa/b1;1 como de E2Fc con las cajas de sus posibles blancos a lo largo de la germinación. En los sitios proximales -1 y -2 de *MCM3;1*, la proteína activadora fue encontrada únicamente a 28 hpi, cuando la replicación ya ha avanzado, sin embargo, los datos de expresión de su gen indican que a las 12 hpi este gen ya ha sido activado, por lo tanto, se desconoce si a las 15 hpi estudiadas el FT podría haberse disociado del promotor, para ser reclutado a 28 hpi nuevamente. En el caso de los promotores de *RPA2* y *PCNA1*, E2Fa/b1;1 incrementa su asociación al DNA conforme avanza la germinación, tanto en sitios proximales como distales de *PCNA1*. Aunque es complicado establecer un patrón de asociación compatible con el ciclo celular para E2Fa/b1;1, desconocemos qué ocurre en tiempos previos a 12 h y entre 12 y 15 hpi, donde quizá G1/S pudiera estar ocurriendo, sin embargo, los niveles de asociación de E2Fa/b1;1 a 28 h no descartan un posible incremento gradual de asociación, que sería compatible con los patrones de incremento paulatino en expresión de los tres genes. Por otro lado, desconocemos si otros miembros de la familia también expresados, como E2Fa/b2 o E2Fa/b3, pudieran asociarse a los mismos sitios en los tiempos investigados, supliendo la función de E2Fa/b1;1. En contraste, la asociación de E2Fc mostró un patrón interesante en todos los casos, localizándose en promotores únicamente en la semilla seca y a 28 hpi. Dicha asociación en la semilla seca podría estar previniendo la expresión prematura de genes de ciclo celular, mientras que su asociación a tiempos tardíos podría detener la expresión de genes de G1/S durante fases posteriores del ciclo, terminando con la ola transcripcional de los blancos de miembros E2F activadores, como lo indica la caída en expresión de *MCM3;1* o la estabilización de la cantidad de transcritos de *RPA2* y *PCNA1* a 28 hpi.

En *Arabidopsis*, se ha observado que plantas mutantes simples (*e2fa* o *e2fb*) no presentan un fenotipo y la sobreexpresión tanto de *E2Fa* como de *E2Fb*, estimula la reentrada a ciclo celular en tejidos diferenciados (de Veylder *et al.*, 2002), implicando que existe redundancia funcional entre ambos FTs. Sin embargo, también se ha encontrado que E2Fb, en conjunto con RBR1, regulan el ciclo celular a nivel de G1/S de manera canónica, mientras que E2Fa-RBR1 lo regulan mediante la represión de la expresión de genes involucrados en el *switch* de mitosis a endociclo y elongación celular (Sozzani *et al.*, 2006; Berckmans *et al.*, 2011; Magyar *et al.*, 2012; Leviczky *et al.*, 2019), indicando que los genes blanco que regulan uno y otro FT son diferentes, a pesar de poseer los mismos sitios E2F en sus regiones promotoras. En este respecto, aunque no existen estudios exhaustivos que comparen a nivel global los blancos de E2Fa y E2Fb, pareciera que sus niveles de expresión son importantes para producir fenotipos, ya que la sobreexpresión de *E2Fa* en presencia de *DPa* empleando promotores fuertes, inducen, además de proliferación ectópica, un fenotipo de endorreduplicación generalizada, mientras que la sobreexpresión de *E2Fb* no altera la ploidía de la planta y pareciera estar implicado en reparación de daño a DNA, principalmente (de Veylder *et al.*, 2002; Magyar *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2021). Siguiendo esta línea de pensamiento, sería interesante conocer de manera precisa a qué sitio E2F se estarían uniendo las proteínas E2F, ya que el diseño de nuestros experimentos de CHIP no permiten saberlo debido a que los sitios en los promotores están muy cerca unos de otros. Esta información contribuiría a entender mejor si existe un recambio en los promotores, *i.e.* diferencia funcional de los sitios E2F. Por otro lado, la distribución de sitios E2F en promotores de maíz muestra un patrón peculiar, localizándose a cierta distancia del TSS y con una distancia

entre ellos cercana a 150 pb o un nucleosoma de distancia, por lo que sería interesante estudiar si la estructura de la cromatina podría también regular la accesibilidad a dichos sitios, permitiendo la asociación diferencial de proteínas E2F (Hogan *et al.*, 2006) ayudando a explicar nuestras observaciones de FAIRE-qPCR.

Además del juego entre E2F activadores y represores, G1/S también es regulada por la asociación de la proteína RBR a FTs de la familia E2F. Ya que RBR carece de la capacidad de unirse al DNA directamente, Suárez-Espinoza (2019) estudió la asociación de RBR1 a *loci* con sitios E2F en maíz, asumiendo que su reclutamiento podría ocurrir a través de la interacción con otras proteínas, como E2F. Los patrones de asociación de RBR1 con el DNA emularon aquellos de E2Fc descritos en el Capítulo 3 de esta tesis, siendo detectado únicamente en semilla seca o después de 28 de imbibición. De manera similar a E2Fc, RBR1 podría participar en la represión de genes de ciclo celular tanto a tiempos tempranos como tardíos, ya sea para evitar el inicio prematuro de la replicación en semilla seca o ayudando a contrarrestar la actividad de E2Fa/b1;1, el cual se encuentra asociado a sus promotores blanco a 28 hp (Suárez-Espinoza, 2019). Sin embargo, nuestros experimentos no permiten saber si E2F y RBR se asocian a los *loci* correspondientes de manera independiente o como complejo.

En años recientes, se ha comenzado a caracterizar un tipo de complejo en *Arabidopsis* que contiene subunidades DP, RBR, E2F, MYB y MuvB-core (TCX5 o LIN54), también conocido como complejo DREAM. Este complejo se encarga de la activación de genes de G2/M cuando contiene a las subunidades E2Fb y MYB3R4, estimulando proliferación. También existe una versión alternativa que contiene a E2Fc y MYB3R3, el cuál posee funciones antagónicas al primero, reprimiendo la transición G2/M a través de un elemento de respuesta conocido como MSA (*Mitotic-Specific Activator*) (Kato *et al.*, 2009), promoviendo quiescencia o endociclos (Kobayashi *et al.*, 2015) y más recientemente se ha implicado en reparación de DNA, mediante la asociación a NAC044, gen homólogo de SOG1, con RBR1 (Lang *et al.*, 2021). Ya que en maíz no existe una clara distinción entre E2Fa y E2Fb y únicamente E2Fc se encuentra conservado, no podemos descartar la posibilidad de que los complejos E2Fa/b1;1-RBR1 y E2Fc-RBR1 encontrados durante germinación, pudieran formar parte de macrocomplejos reguladores del ciclo celular, como del tipo DREAM. Interesantemente, al analizar genes con sitios E2F de maíz fue posible identificar numerosos homólogos de componentes del complejo DREAM como E2F, RBR, DP, DEL, MYB3R4/5, TCX (datos no mostrados), apuntando a que podría existir una conexión entre la vía E2F y DREAM.

Aunque no se ha reportado un vínculo claro entre E2F y la germinación —o no se han hecho esfuerzos por estudiar si existe—, recientemente Perrotta *et al.* (2021) sobreexpresaron el gen *DcE2F1* de zanahoria y al propio *AtE2Fa* en *Arabidopsis* y observaron que, además de producir los fenotipos reportados previamente en plántulas, como cotiledones alargados con un mayor número de células (de Veylder *et al.*, 2002), la sobreexpresión de ambos E2F estimuló la tasa de germinación en semillas estratificadas, indicando que, efectivamente, E2F también podría regular germinación.

La estructura de la cromatina a nivel global también podría desarrollar una función importante en la germinación de maíz (Zhang *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2015). Dada la ocupación diferencial de promotores por las proteínas E2F nos preguntamos si la estructura de la cromatina en estos *loci* po-

dría proveer pistas sobre la accesibilidad de promotores y expresión de los genes blanco. Experimentos de ChIP con anti-H3K4/K9ac mostraron un incremento gradual de la acetilación de H3 en la región proximal del promotor y el sitio de inicio de transcripción (TSS) tanto de *RPA2* como de *PCNA1*, a partir de 15 hpi. En general, esta marca podría indicar que estos genes se encuentran transcripcionalmente activos (Wang *et al.*, 2009) y en línea con nuestros datos de RT-qPCR, la expresión de *RPA2* y *PCNA1* comienza a incrementar a partir de las 15 h. Otra de las marcas estudiadas fue H3K4me3, la cual promueve activación transcripcional en la mayoría de los genes de maíz que decora (Peng *et al.*, 2019), esta se encontró enriquecida tanto en TSSs como en sitios E2F, apuntando a una estructura permisiva para transcripción. Cuando se estudió la marca represora H3K27me3 (Peng *et al.*, 2019), encontramos que esta comenzó a volverse evidente después de 15 hpi en los *loci* de los tres genes estudiados.

Las marcas de cromatina estudiadas a lo largo de la germinación, por un lado, podrían indicar que los *loci* de estos genes se mantienen accesibles (H3K4me3) desde la semilla seca y que eventualmente son activados (H3ac) conforme la germinación avanza, para posteriormente ser inactivados a las 28 hpi (H3K27me3). Por otro lado, las mismas marcas, además de impactar la expresión de genes, también tienen una función importante en la replicación del DNA. Por ejemplo, marcas relacionadas con una estructura de cromatina laxa podrían facilitar la replicación del DNA, ya que cualquier proteína unida al DNA podría actuar como barrera física para el paso de la maquinaria de replicación, por lo tanto, en cromatina abierta el paso de la horquilla sería menos complicado que en regiones heterocromáticas. En *Arabidopsis* se ha visto que el paisaje epigenético de los orígenes de replicación (ORI) incluye enriquecimiento de marcas asociadas con genes activos tales como H3K4me2, H3K4me3, H3ac y H4ac (Costas *et al.*, 2011b; Desvoyes *et al.*, 2014). Por su parte, sitios decorados con H3K27me3 y H3K9me3, han sido relacionados con regiones ricas en heterocromatina y regularmente son zonas del genoma que se replican de manera tardía (Du *et al.*, 2019).

Los niveles elevados de H3K4me3 observados a lo largo de la germinación de maíz, podrían relacionarse con la preparación de las células del meristemo apical de la raíz del eje embrionario para entrar a proliferación, manteniendo un estado de cromatina abierta en *loci* relacionados con el ciclo celular, pero a la vez, asegurándose de que represores como E2F y/o RBR1 eviten la activación prematura de dichos genes. Cuando las semillas son embebidas y la actividad de CYCD-CDK sobre E2F y RBR fuera reestablecida, el recambio de complejos E2F represores por activadores se vería favorecida en promotores de G1/S, como lo indica su ausencia en todos los promotores a 15 hpi, permitiendo el avance del ciclo. Por otro lado, la función tanto de RBR como de E2F es requerida para responder a daño a DNA (Horvath *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2019; Lang *et al.*, 2021), por lo que la presencia de estas proteínas en la semilla seca podría resultar en una ventaja a la hora de activar las vías de respuesta de daño a DNA en germinación temprana (Vázquez-Ramos & Osborne, 1986; Zarain *et al.*, 1987). Además del control transcripcional, la estructura de cromatina abierta también podría facilitar la especificación de orígenes de replicación una vez entrada la fase S, favoreciendo el inicio y avance de la replicación del DNA característica de la fase II de germinación.

A lo largo de esta disertación se trató de manifestar la relación estrecha que existe entre eventos propios de la germinación y del ciclo celular, especialmente a tiempos tempranos (fases I y II). También se expuso la importancia tanto de la actividad transcripcional como de la traduccional durante

germinación, haciendo hincapié en la basta cantidad de información almacenada en la semilla al final de su desarrollo y cómo es que el eje embrionario ejecuta estas instrucciones pre-programadas. Por otra parte, se ha indagado en la relación entre la regulación traduccional, energética y del ciclo celular a través de la vía TOR.

Desde el punto de vista del ciclo celular, las etapas tempranas de germinación (fases I y II) podrían considerarse como preparativas para la replicación, en que las células del eje embrionario, detenidas en G1/S, reanudarán sus funciones para transitar hacia fase S. Entre los eventos tempranos se encuentran la restauración del metabolismo energético, la reparación del genoma y la acumulación de reguladores del ciclo para que, una vez alcanzado el punto de compromiso a división celular, la vía E2F ejerza un papel preponderante en la regulación de la expresión de genes necesarios para la fase S. Finalmente, durante su etapa tardía de maduración, la semilla seca podría prepararse para germinar manteniendo un estado cromatínico permisivo para la transcripción de genes requeridos al inicio de la germinación una vez embebida.

3. Conclusiones generales

Mediante la medición de parámetros fisiológicos se pudo determinar que la fase I de la germinación de maíz V. Chalqueño va desde la imbibición de la semilla hasta las 12 hpi y la fase II transcurre entre las 12 y 24 hpi. Durante estas primeras dos etapas de la germinación, las células en el dominio de proliferación celular de la raíz del eje embrionario transitan entre las fases G1 y S del ciclo celular, como lo sugieren el tamaño celular, la morfología del núcleo y la expresión de genes marcadores a lo largo de la germinación.

En el genoma de maíz existen doce posibles genes de la familia E2F/DP, de los cuales nueve se expresan de manera diferencial en el eje embrionario durante la germinación, así como en tejidos proliferativos y diferenciados de plántulas.

Las proteínas E2Fa/b1;1 y E2Fc se asocian con DPb2, respectivamente, y complejos heterodiméricos E2F-DP de maíz se unen de manera específica a sitios consenso de reconocimiento por E2F en el DNA, *in vitro*.

Algunos genes de fase S, como *MCM3;1*, *PCNA1* y *RPA2*, que participan en la replicación del DNA, así como los genes de ciclo celular *E2Fa/b1;1* y *E2Fc*, poseen (múltiples) sitios E2F en su región promotora y su expresión incrementa gradualmente conforme la germinación avanza.

Algunos de los sitios E2F en los promotores de genes de replicación son unidos diferencialmente por complejos E2Fa/b1;1-DPb2 y E2Fc-DPb2 *in vitro*.

La presencia de la proteína E2Fa/b1;1 en el núcleo incrementa conforme la germinación avanza. Los niveles de asociación de esta proteína a promotores con sitios E2F, de manera general, incrementan gradualmente con el avance de la germinación.

La proteína E2Fc también se acumula en el núcleo con el avance de la germinación. Sin embargo, esta se encuentra unida a promotores de sus genes blanco en la semilla seca y a 15 hpi no es detectada. Tras 28 hpi, E2Fc es reclutada nuevamente a los mismos promotores.

Los promotores blanco de E2F estudiados, mostraron niveles constantes de la marca de cromatina asociada con activación transcripcional H3K4me3, tanto en la semilla seca como en germinación. La marca de cromatina abierta H3ac, fue encontrada enriquecida cerca de sitios de inicio de transcripción y sus niveles fueron incrementando con el avance de la germinación. Los niveles de la marca represora H3K27me3 mostraron un aumento gradual a partir de 15 h, que continuó hasta las 28 hpi.

4. Referencias

1. Abascal F, Zardoya R. & Posada D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 21: 2104.
2. Albani D., Mariconti L., Ricagno S., Pitto L., *et al.*, Cella R. (2000). DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*. *J Biol Chem*. 275: 19258–19267.
3. Angelovici R., Galili G., Fernie A.R. & Fait A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci*. 15: 211–218.
4. Attwooll C., Denchi E.L. & Helin K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J*. 23: 4709–4716.
5. Attwooll C., Oddi S., Cartwright P., Prosperini E., *et al.*, Helin K. (2005). A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner. *J Biol Chem*. 280: 1199–1208.
6. Baíza A.M., Vázquez-Ramos M. & Sánchez de Jiménez E. (1989). DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *J Plant Physiol*. 135: 416–421.
7. Belda-Palazón B., Adamo M., Valerio C., Ferreira L.J., *et al.*, Baena-González E. (2020). A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. *Nat Plants*. 6: 1345–1353.
8. Beltrán-Peña E., Ortíz-López A. & de Jiménez E.S. (1995). Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol Biol*. 28: 327–336.
9. Bennetzen J.L., Schmutz J., Wang H., Percifield R., *et al.*, Devos K.M. (2012). Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nat Biotechnol*. 30: 555–561.
10. Berckmans B., Lammens T., van den Daele H., Magyar Z., *et al.*, de Veylder L. (2011). Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiol*. 157: 1440–1451.
11. Bertoli C., Skotheim J.M. & de Bruin R.A.M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14: 518–528.
12. Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W.M. & Nonogaki H. (2013). Germination. pp. 133–181. *Seeds*, Springer New York, NY.
13. Black A.R. & Azizkhan-Clifford J. (1999). Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene*. 237: 281–302.
14. Boniotti M.B. & Gutiérrez C. (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J*. 28: 341–350.
15. Bove J., Jullien M. & Grappin P. (2002). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol*. 3: 1–5.
16. Bradford M.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.
17. Buendía-Monreal M., Rentería-Canett I., Guerrero-Andrade O., Bravo-Alberto C.E., *et al.*, Vázquez-Ramos J.M. (2011). The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plant*. 143: 297–308.
18. Cartwright P., Müller H., Wagener C., Holm K. & Helin K. (1998). E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene*. 17: 611–623.
19. Castresana J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol*. 17: 540–552.
20. Chaboute M.E., Clement B., Sekine M., Philipps G. & Chaubet-Gigot N. (2000). Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell*. 12: 1987–2000.

Referencias

21. Coello-Coutiño P, García-Ramírez E. & Vázquez-Ramos J.M. (1994). Preparation of an antibody against a maize DNA polymerase holoenzyme: identification of the polymerase catalytic subunit. *Can J Bot.* 72: 818–822.
22. Costas C., Desvoyes B. & Gutiérrez C. (2011a). A chromatin perspective of plant cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta.* 1809: 379–387.
23. Costas C., Sánchez M. de la P, Stroud H., Yu Y., *et al.*, Gutiérrez C. (2011b). Genome-wide mapping of *Arabidopsis thaliana* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat Struct Mol Biol.* 18: 395–400.
24. Cruz-García F, Jiménez L.F. & Vázquez-Ramos J.M. (1995). Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds. *Seed Sci Res.* 5: 15–23.
25. Cruz-García F, Zúñiga-Aguilar J.J. & Vázquez-Ramos J.M. (1998). Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol Plant.* 102: 573–581.
26. Cuitiño M.C., Pécot T, Sun D, Kladney R., *et al.*, Leone G. (2019). Two Distinct E2F Transcriptional Modules Drive Cell Cycles and Differentiation. *Cell Rep.* 27: 3547–3560.
27. Dahl M., Meskiene I, Bögre L., Ha D.T., *et al.*, 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.
28. Dante R.A., Larkins B.A. & Sabelli P.A. (2014). Cell cycle control and seed development. *Front Plant Sci.* 5: 493.
29. Deltour R. & Jacquard A. (1974). Relation between Water Stress and DNA Synthesis during Germination of *Zea mays* L. *Ann Bot.* 38: 529–534.
30. Desvoyes B., Fernández-Marcos M., Sequeira-Mendes J., Otero S., *et al.*, Gutiérrez C. (2014). Looking at plant cell cycle from the chromatin window. *Front Plant Sci.* 5: 369.
31. Díaz-Granados V.H., López-López J.M., Flores-Sánchez J., Olguin-Alor R., *et al.*, Lara-Núñez A. (2020). Glucose modulates proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant Physiol Biochem.* 155: 126–135.
32. Dimova D.K. & Dyson N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene.* 24: 2810–2826.
33. Du Q, Bert S.A., Armstrong N.J., Caldon C.E., *et al.*, Clark S.J. (2019). Replication timing and epigenome remodeling are associated with the nature of chromosomal rearrangements in cancer. *Nat Commun.* 10: 1–15.
34. Dudits D., Cserhádi M., Miskolczi P. & Horváth G. v (2007). The Growing Family of Plant Cyclin-Dependent Kinases with Multiple Functions in Cellular and Developmental Regulation. pp. 1–30. In: Inzé D. (eds), *Cell Cycle Control and Plant Development*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
35. Elder R.H. & Osborne D.J. (1993). Function of DNA synthesis and DNA repair in the survival of embryos during early germination and in dormancy. *Seed Sci Res.* 3: 43–53.
36. Evans T, Rosenthal E.T, Youngblom J, Distel D. & Hunt T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 33: 389–396.
37. Fait A., Angelovici R., Less H., Ohad I., *et al.*, Galili G. (2006). *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.* 142: 839–854.
38. Footitt S., Muller K., Kermod A.R. & Finch-Savage W.E. (2015). Seed dormancy cycling in *Arabidopsis*: chromatin remodelling and regulation of DOG1 in response to seasonal environmental signals. *Plant J.* 81: 413–425.
39. Fuchs J. & Schubert I. (2012). Chromosomal Distribution and Functional Interpretation of Epigenetic Histone Marks in Plants. pp. 231–253. In: Bass H. & Birchler J. (eds), *Plant Cytogenetics. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, Springer New York, NY.
40. García-Ayala B.B. (2017). Proliferación celular en la zona radicular de ejes embrionarios de maíz y el efecto de azúcares. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
41. García-Ramírez E., Quiroz-Figueroa F, Uchiyama Y, Sakaguchi K. & Vázquez-Ramos J.M. (2006). Expression of a maize δ -type DNA polymerase during seed germination. *Physiol Plant.* 127: 268–276.
42. Garner D.L. (2009). Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology.* 71: 11–21.
43. Garza-Aguilar S.M., Axosco-Marin J., Lara-Núñez A., Guerrero-Molina E.D., *et al.*, Vázquez-Ramos J.M. (2019). Proliferating cell nuclear antigen associates to protein complexes containing cyclins/cyclin dependent kinases susceptible of inhibition by KRPs during maize germination. *Plant Sci.* 280: 297–304.
44. Garza-Aguilar S.M., Lara-Núñez A., García-Ramírez E. & Vázquez-Ramos J.M. (2017). Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination. *Physiol Plant.* 160: 84–97.

Referencias

45. Ge S.X., Jung D., Jung D. & Yao R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. 36: 2628–2629.
46. Geisler S.J. & Paro R. (2015). Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development*. 142: 2876–2887.
47. Georgieva E.I., López-Rodas G., Hittmair A., Feichtinger H., *et al.*, Loidl P. (1993). Maize embryo germination - I. Cell cycle analysis. *Planta*. 192: 118–124.
48. Giangrande P.H., Zhu W., Rempel R.E., Laakso N. & Nevins J.R. (2004). Combinatorial gene control involving E2F and E Box family members. *EMBO J*. 23: 1336.
49. Godínez-Palma S.K., García-Ramírez E., Sánchez M. de la P., Rosas F. & Vázquez-Ramos J.M. (2013). Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination. *J Exp Bot*. 64: 5661–5671.
50. Godínez-Palma S.K., Rosas-Bringas F.R., Rosas-Bringas O.G., García-Ramírez E., *et al.*, Vázquez-Ramos J.M. (2017). Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D-cyclin-dependent kinase complexes. *J Exp Bot*. 68: 1585–1597.
51. Gómez M.S., Falcone Ferreyra M.L., Sheridan M.L. & Casati P. (2019). *Arabidopsis* E2Fc is required for the DNA damage response under UV-B radiation epistatically over the microRNA396 and independently of E2Fe. *Plant J*. 97: 749–764.
52. Graf G., Burnett R.J., Helentjaris T., Larkins B.A., *et al.*, 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.
53. Grant C.E., Bailey T.L. & Noble W.S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*. 27: 1017–1018.
54. Gu J., Chao H., Gan L., Guo L., *et al.*, Li M. (2016). Proteomic Dissection of Seed Germination and Seedling Establishment in Brassica napus. *Front Plant Sci*. 7: 1482.
55. Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., *et al.*, Gascuel O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 59: 307–321.
56. Guo J., Song J., Wang F. & Zhang X.S. (2007). Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Mol Biol*. 64: 349–360.
57. Gutiérrez 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*. 46: 166–173.
58. Harashima H., Dissmeyer N. & Schnittger A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol*. 23: 345–356.
59. Haring M., Offermann S., Danker T., Horst I., *et al.*, Stam M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods*. 3: 11.
60. Harris B. & Dure L. 3rd (1978). Developmental regulation in cotton seed germination: polyadenylation of stored messenger RNA. *Biochemistry*. 17: 3250–3256.
61. Hayashi K., Hasegawa J. & Matsunaga S. (2013). The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: Endoreduplication precedes rapid cell expansion. *Sci Rep*. 3: 2723.
62. He S., Yan S., Wang P., Zhu W., *et al.*, Li L. (2014). Comparative analysis of genome-wide chromosomal histone modification patterns in maize cultivars and their wild relatives. *PLoS One*. 9: e97364.
63. He S.S., Liu J., Xie Z., O'Neill D. & Dotson S. (2004). *Arabidopsis* E2Fa plays a bimodal role in regulating cell division and cell growth. *Plant Mol Biol*. 56: 171–184.
64. Hénaff E., Vives C., Desvoyes B., Chaurasia A., *et al.*, Casacuberta J.M. (2014). Extensive amplification of the E2F transcription factor binding sites by transposons during evolution of Brassica species. *Plant J*. 77: 852–862.
65. Herrera I., Sánchez M. de la P., Molina J., Plasencia J. & Vázquez-Ramos J.M. (2000). Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol Plant*. 110: 127–134.
66. Hochholdinger F. & Tuberosa R. (2009). Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Curr Opin Plant Biol*. 12: 172–177.
67. Hochholdinger F., Yu P. & Marcon C. (2018). Genetic Control of Root System Development in Maize. *Trends Plant Sci*. 23: 79–88.
68. Hogan G.J., Lee C.K. & Lieb J.D. (2006). Cell cycle-specified fluctuation of nucleosome occupancy at gene promoters. *PLoS Genet*. 2: 1433–1450.

Referencias

69. Horvath B.M., Kourova H., Nagy S., Nemeth E., *et al.*, Blilou I. (2017). *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J.* 36: 1261–1278.
70. Hou H., Wang P., Zhang H., Wen H., *et al.*, Li L. (2015). Histone Acetylation is Involved in Gibberellin-Regulated sodCp Gene Expression in Maize Aleurone Layers. *Plant Cell Physiol.* 56: 2139–2149.
71. Howell K.A., Narsai R., Carroll A., Ivanova A., *et al.*, Whelan J. (2009). Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiol.* 149: 961–980.
72. Inze D. & de Veylder L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet.* 40: 77–105.
73. Ishida T., Fujiwara S., Miura K., Stacey N., *et al.*, Sugimoto K. (2009). SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 21: 2284–2297.
74. Ivanov V.B. & Dubrovsky J.G. (2012). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* 18: 237–243.
75. de Jager S.M., Menges M., Bauer U.M. & Murra 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.
76. de Jager S.M., Scofield S., Huntley R.P., Robinson A.S., *et al.*, Murray J.A.H. (2009). Dissecting regulatory pathways of G1/S control in *Arabidopsis*: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Mol Biol.* 71: 345–365.
77. Jaillon O., Aury J.-M., Noel B., Policriti A., *et al.*, Wincker P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature.* 449: 463–467.
78. Kállai B.M., Kourová H., Chumová J., Papdi C., *et al.*, Magyar Z. (2020). γ -Tubulin interacts with E2F transcription factors to regulate proliferation and endocycling in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 71: 1265–1277.
79. Kato K., Gális I., Suzuki S., Araki S., *et al.*, Ito M. (2009). Preferential Up-Regulation of G2/M Phase-Specific Genes by Overexpression of the Hyperactive Form of NtmybA2 Lacking Its Negative Regulation Domain in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiol.* 149: 1945–1957.
80. Kent L.N., Bae S., Tsai S.Y., Tang X., *et al.*, Leone G. (2017). Dosage-dependent copy number gains in E2f1 and E2f3 drive hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest.* 127: 830–842.
81. Kimura M. & Nambara E. (2010). Stored and neosynthesized mRNA in *Arabidopsis* seeds: effects of cycloheximide and controlled deterioration treatment on the resumption of transcription during imbibition. *Plant Mol Biol.* 73: 119–129.
82. Kobayashi K., Suzuki T., Iwata E., Nakamichi N., *et al.*, Ito M. (2015). Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* 34: 1992–2007.
83. Kosugi S. & Ohashi Y. (2002a). 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.
84. Kosugi S. & Ohashi Y. (2002b). Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol.* 128: 833–843.
85. Kosugi S. & Ohashi Y. (2002c). E2Fs, E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *J Biol Chem.* 277: 16553–16558.
86. Kosugi S. & Ohashi Y. (2003). Constitutive E2F Expression in Tobacco Plants Exhibits Altered Cell Cycle Control and Morphological Change in a Cell Type-Specific Manner. *Plant Physiol.* 132: 2012.
87. Lamesch P., Berardini T.Z., Li D., Swarbreck D., *et al.*, Huala E. (2012). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* 40: D1202–10.
88. Lammens T., Li J., Leone G. & de Veylder L. (2009). Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol.* 19: 111–118.
89. Lang L., Pettkó-Szandtner A., Elbasi H.T., Takatsuka H., *et al.*, Schnittger A. (2021). The DREAM complex represses growth in response to DNA damage in *Arabidopsis*. *Life Sci Alliance.* 4: 1–20.
90. Lara-Núñez A., García-Ayala B.B., Garza-Aguilar S.M., Flores-Sánchez J., *et al.*, Vázquez-Ramos J.M. (2017). Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination. *Plant Physiol Biochem.* 113: 20–31.
91. Lara-Núñez A., de Jesús N. & Vázquez-Ramos J.M. (2008). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant.* 132: 79–88.

Referencias

92. Lara-Nunez A., de Jesus N. & Vazquez-Ramos J.M. (2008). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiol Plant.* 132: 79–88.
93. Lara-Núñez A., Romero-Sánchez D.I., Axosco-Marín J., Garza-Aguilar S.M., *et al.*, Vázquez-Ramos J.M. (2021). Two cyclin Bs are differentially modulated by glucose and sucrose during maize germination. *Biochimie.* 182: 108–119.
94. Lauria M. & Rossi V. (2011). Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta.* 1809: 369–378.
95. Lee C., Chang J.H., Lee H.S. & Cho Y. (2002). Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. *Genes Dev.* 16: 3199.
96. Lee H.O., Davidson J.M. & Duronio R.J. (2009). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* 23: 2461–2477.
97. Leviczky T., Molnár E., Papdi C., Ószi E., *et al.*, Magyar Z. (2019). E2FA and E2FB transcription factors coordinate cell proliferation with seed maturation. *Development.* 146: .
98. Li J., Ran C., Li E., Gordon F., *et al.*, Liu C.-G. (2008). Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev Cell.* 14: 62–75.
99. Li L., Hey S., Liu S., Liu Q., *et al.*, Hochholdinger F. (2016). Characterization of maize roothairless6 which encodes a D-type cellulose synthase and controls the switch from bulge formation to tip growth. *Sci Rep.* 6: 34395.
100. Li P., Ponnala L., Gandotra N., Wang L., *et al.*, Brutnell T.P. (2010). The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nat Genet.* 42: 1060–7.
101. Li X., Cai W., Liu Y., Li H., *et al.*, Xiong Y. (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: 2765–2770.
102. Liban T.J., Thwaites M.J., Dick F.A. & Rubin S.M. (2016). Structural Conservation and E2F Binding Specificity within the Retinoblastoma Pocket Protein Family. *J Mol Biol.* 428: 3960–3971.
103. Lin Y., Zhang C., Lan H., Gao S., *et al.*, Zhang S. (2014). Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. *PLoS One.* 9: e95445.
104. Linkies A., Graeber K., Knight C. & Leubner-Metzger G. (2010). The evolution of seeds. *New Phytologist.* 186: .
105. Liu W.Y., Chang Y.M., Chen S.C.C., Lu C.H., *et al.*, Li W.H. (2013). Anatomical and transcriptional dynamics of maize embryonic leaves during seed germination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 3979–3984.
106. Liu Y., Lai J., Yu M., Wang F., *et al.*, Yang C. (2016). The *Arabidopsis* SUMO E3 Ligase AtMMS21 Dissociates the E2Fa/DPa Complex in Cell Cycle Regulation. *Plant Cell.* 28: 2225–2237.
107. López-Coria M., Sánchez-Sánchez T., Martínez-Marcelo V.H., Aguilera-Alvarado G.P., *et al.*, Sánchez-Nieto S. (2019). SWEET Transporters for the Nourishment of Embryonic Tissues during Maize Germination. *Genes (Basel).* 10: 780.
108. Magyar Z., Atanassova A., de Veylder L., Rombauts S. & Inze D. (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 486: 79–87.
109. Magyar Z., Horvath B., Khan S., Mohammed B., *et al.*, Bögre L. (2012). *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J.* 31: 1480–1493.
110. Makarevitch I., Eichten S.R., Briskine R., Waters A.J., *et al.*, Springer N.M. (2013). Genomic distribution of maize facultative heterochromatin marked by trimethylation of H3K27. *Plant Cell.* 25: 780–793.
111. Mariconti L., Pellegrini B., Cantoni R., Stevens R., *et al.*, Albani D. (2002). The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J Biol Chem.* 277: 9911–9919.
112. Martínez-Mata M.Á. (2011). Asociación de PCNA con proteínas del ciclo celular de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
113. Masubelele N.H., Dewitte W., Menges M., Maughan S., *et al.*, Murray J.A.H. (2005). D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 15694–15699.
114. Matthews H.K., Bertoli C. & de Bruin R.A.M. (2021). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:1. 23: 74–88.
115. Mayer A.M. & Poljakoff-Mayber A. (1982). Metabolism of germinating seeds. *The Germination of Seeds*. Pergamon. Oxford, UK. 85–141 pp.
116. Mayer R., Brero A., von Hase J., Schroeder T., *et al.*, Dietzel S. (2005). Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol.* 6: .

Referencias

117. Méndez-Natera J.R., Merazo-Pinto J.F., Zerpa-Zerpa M. & Bolivar C.E. (2008). Efecto de la colocación de semillas de maíz (*Zea mays* L.), caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en papel toallín (enrollados y sin enrollar) sobre la germinación y el vigor. *Revista UDO Agrícola*. 8: 67–71.
118. Menges M. & Murray J.A.H. (2002). Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* 30: 203–212.
119. Mineur P., Jennane A., Thiry M., Deltour R. & Goessens G. (1998). Ultrastructural distribution of DNA within plant meristematic cell nucleoli during activation and the subsequent inactivation by a cold stress. *J Struct Biol.* 123: 199–210.
120. Molitor A.M., Bu Z., Yu Y. & Shen W.-H. (2014). *Arabidopsis* AL PHD-PRC1 complexes promote seed germination through H3K4me3-to-H3K27me3 chromatin state switch in repression of seed developmental genes. *PLoS Genet.* 10: e1004091.
121. Nakabayashi K., Okamoto M., Koshiba T., Kamiya Y. & Nambara E. (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.* 41: 697–709.
122. Nonami H. (1998). Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. *J Plant Res.* 111: 373–382.
123. Obomighie I., Lapenas K., Murphy B.E., Bowles A.M.C., et al., Prischi F. (2021). The Role of Ribosomal Protein S6 Kinases in Plant Homeostasis. *Front Mol Biosci.* 8: 24.
124. Ouyang S., Zhu W., Hamilton J., Lin H., et al., Buell C.R. (2007). The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res.* 35: D883-7.
125. Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R., Dubchak I., et al., Rokhsar D.S. (2009). The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature.* 457: 551–556.
126. Pavlova P., Tessadori F., de Jong H. & Franz P. (2010). Immunocytological analysis of chromatin in isolated nuclei. *Methods Mol Biol.* 655: 413–432.
127. Peng Y., Xiong D., Zhao L., Ouyang W., et al., Li X. (2019). Chromatin interaction maps reveal genetic regulation for quantitative traits in maize. *Nat Commun.* 10: 1–11.
128. Perrotta L., Giordo R., Francis D., Rogers H.J. & Albani D. (2021). Molecular Analysis of the E2F/DP Gene Family of *Daucus carota* and Involvement of the DcE2F1 Factor in Cell Proliferation. *Front Plant Sci.* 12: 652570.
129. Petersen B., Petersen T.N., Andersen P., Nielsen M. & Lundegaard C. (2009). A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol.* 9: 51.
130. Pontvianne F., Carpentier M.C., Durut N., Pavlišťová V., et al., Sáez-Vásquez J. (2016). Identification of Nucleolus-Associated Chromatin Domains Reveals a Role for the Nucleolus in 3D Organization of the *A. thaliana* Genome. *Cell Rep.* 16: 1574–1587.
131. del Pozo J.C., Boniotti M.B. & Gutiérrez C. (2002). *Arabidopsis* E2F α functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF^{AtSKP2} pathway in response to light. *Plant Cell.* 14: 3057–3071.
132. del Pozo J.C., Díaz-Triviño S., Cisneros N. & Gutiérrez C. (2006). The balance between cell division and endoreplication depends on E2F α -DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCF^{SKP2A} pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18: 2224–2235.
133. Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., et al., Job D. (2004). The Effect of α -Amanitin on the *Arabidopsis* Seed Proteome Highlights the Distinct Roles of Stored and Neosynthesized mRNAs during Germination. *Plant Physiol.* 134: 1598.
134. Ramírez-Parra E., Fründt C. & Gutiérrez C. (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33: 801–811.
135. Ramírez-Parra E. & Gutiérrez 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.
136. Ramírez-Parra E. & Gutiérrez C. (2008). Role of E2F transcription factors in plant cell physiology and development. pp. 167–188. In: Bryant J. & Francis D. (eds), *Eukaryotic Cell Cycle*, Garland Science, Group Taylor and Francis Garland Science, Group (United Kingdom), London UK.
137. Ramírez-Parra E., del Pozo J.C., Desvoyes B., Sánchez M. de la P. & Gutiérrez C. (2007). E2F-DP Transcription Factors. pp. 138–163. In: Inzé D. (eds), *Cell Cycle Control and Plant Development*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
138. Ramírez-Parra E., Xie Q., Boniotti M.B. & Gutiérrez C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res.* 27: 3527–3533.

Referencias

139. Rauber R., Cabreira C., de Freitas L.B., Turchetto-Zolet A.C. & Margis-Pinheiro M. (2016). The evolutionary history of the E2F and DEL genes in Viridiplantae. *Mol Phylogenet Evol.* 99: 225–234.
140. Reiser L. & Fischer R.L. (1993). The Ovule and the Embryo Sac. *Plant Cell.* 5: 1291–1301.
141. Rice P., Longden I. & Bleasby A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16: 276–277.
142. Romero-Rodríguez S. (2019). Función transcripcional de las proteínas E2Fa/b1;1 y E2Fc de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.
143. Rossignol P., Stevens R., Perennes C., Jasinski S., *et al.*, Bergounioux C. (2002). AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce *Arabidopsis* leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genom.* 266: 995–1003.
144. Rubin E., Lithwick G. & Levy A.A. (2001). Structure and evolution of the hAT transposon superfamily. *Genetics.* 158: 949–957.
145. Sabelli P.A., Dante R.A., Leiva-Neto J.T., Jung R., *et al.*, 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 U S A.* 102: 13005–13012.
146. Sabelli P.A. & Larkins B.A. (2009). The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol.* 149: 14–26.
147. Sabelli P.A., Liu Y., Dante R.A., Lizarraga L.E., *et al.*, Larkins B.A. (2013). Control of cell proliferation, endoreduplication, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: E1827–36.
148. Salazar-Roa M. & Malumbres M. (2017). Fueling the Cell Division Cycle. *Trends Cell Biol.* 27: 69–81.
149. Sánchez de Jiménez E. & Aguilar R. (1984). Protein Synthesis Patterns Relevance of Old and New Messenger RNA in Germinating Maize Embryos. *Plant Physiol.* 75: 231–234.
150. Sánchez de Jiménez E. & Aguilar R. (1984). Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* 75: 231–234.
151. 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 Commun.* 99: 445–450.
152. Sánchez M. de la P., Gurusinghe 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: 515–523.
153. Sánchez M. de la P., Torres A., Boniotti M.B., Gutiérrez C. & Vázquez-Ramos J.M. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol Biol.* 50: 167–175.
154. Sánchez-Camargo V.A., Romero-Rodríguez S. & Vázquez-Ramos J.M. (2021). Non-Canonical Functions of the E2F/DP Pathway with Emphasis in Plants. *Phyton (B Aires).* 90: 307.
155. Sánchez-Camargo V.A., Suárez-Espinoza C., Romero-Rodríguez S., Garza-Aguilar S.M., *et al.*, Vázquez-Ramos J.M. (2020). Maize E2F transcription factors. Expression, association to promoters of S-phase genes and interaction with the RBR1 protein in chromatin during seed germination. *Plant Sci.* 296: 110491.
156. Sánchez-Nieto S., de Gómez-Puyou M.T., Rodríguez-Sotres R., Carballo A. & Gavilanes-Ruiz M. (1998). Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1414: 175–187.
157. Sato S., Tabata S., Hirakawa H., Asamizu E., *et al.*, Gianese G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature.* 485: 635–641.
158. Schlisio S., Halperin T., Vidal M. & Nevins J.R. (2002). Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. *EMBO J.* 21: 5775.
159. Schmitges F.W., Prusty A.B., Faty M., Stutzer A., *et al.*, Thoma N.H. (2011). Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell.* 42: 330–341.
160. Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., *et al.*, Wilson R.K. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science.* 326: 1112–1115.
161. Schneider C.A., Rasband W.S. & Eliceiri K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9: 671–675.
162. Sekhon R.S., Lin H., Childs K.L., Hansey C.N., *et al.*, Kaepler S.M. (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* 66: 553–563.

Referencias

163. Sekine M., Ito M., Uemukai K., Maeda Y., *et al.*, Shinmyo A. (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* 460: 117–122.
164. Soni R., Carmichael J.P., Shah Z.H. & Murray J. a (1995). A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell.* 7: 85–103.
165. Soufi A. & Dalton S. (2016). Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development.* 143: 4301.
166. Sozzani R., Maggio C., Varotto S., Canova S., *et al.*, Cella R. (2006). Interplay between *Arabidopsis* activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol.* 140: 1355–1366.
167. Spiegel S. & Marcus A. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature.* 256: 228–230.
168. Sreenivasulu N., Usadel B., Winter A., Radchuk V., *et al.*, Wobus U. (2008). Barley Grain Maturation and Germination: Metabolic Pathway and Regulatory Network Commonalities and Differences Highlighted by New MapMan/PageMan Profiling Tools. *Plant Physiol.* 146: 1738–1758.
169. Stevens R., Mariconti L., Rossignol P., Perennes C., *et al.*, Bergounioux C. (2002). Two E2F Sites in the *Arabidopsis* *MCM3* Promoter Have Different Roles in Cell Cycle Activation and Meristematic Expression*. *J Biol Chem.* 277: 32978–32984.
170. Suárez-Espinoza C. (2019). Asociación de la proteína de retinoblastoma (RBR1) a loci de ciclo celular durante la germinación de maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
171. Sugimoto-Shirasu K. & Roberts K. (2003). “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 544–553.
172. Tao Y., Kassatly R.F., Cress W.D. & Horowitz J.M. (1997). Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. *Mol Cell Biol.* 17: 6994–7007.
173. Trimarchi J.M., Fairchild B., Verona R., Moberg K., *et al.*, Lees J.A. (1998). E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 2850–2855.
174. Vandepoele K., Raes J., de Veylder L., Rouzé P., *et al.*, Inzé D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 14: 903–916.
175. Vandepoele K., Vlieghe K., Florquin K., Hennig L., *et al.*, de Veylder L. (2005). Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* 139: 316–328.
176. Vázquez-Ramos J.M. & Osborne D.J. (1986). Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Research/DNA Repair Reports.* 166: 39–47.
177. Vázquez-Ramos J.M. & Reyes-Jiménez J. (1990). Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination of maize axes. *Can J Bot.* 68: 2590–2594.
178. Vázquez-Ramos J.M. & Sánchez M. d. l. P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res.* 13: 113–130.
179. de Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T.S., de Almeida Engler J., *et al.*, Engler G. (2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa–DPA transcription factor. *EMBO J.* 21: 1360–1368.
180. Vogel J.P., Garvin D.F., Mockler T.C., Schmutz J., *et al.*, Lail K. (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature.* 463: 763–768.
181. Wang X., Elling A.A., Li X., Li N., *et al.*, Denga X.W. (2009). Genome-Wide and Organ-Specific Landscapes of Epigenetic Modifications and Their Relationships to mRNA and Small RNA Transcriptomes in Maize. *Plant Cell.* 21: 1053.
182. Wang Y., He J., Ye H., Ding M., *et al.*, Zhao G. (2022). Transcriptome Analysis Revealed the Key Genes and Pathways Involved in Seed Germination of Maize Tolerant to Deep-Sowing. *Plants.* 11: 359.
183. Weinmann A.S., Yan P.S., Oberley M.J., Huang T.H.M. & Farnham P.J. (2002). Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev.* 16: 235–244.
184. Wells J., Boyd K.E., Fry C.J., Bartley S.M. & Farnham P.J. (2000). Target Gene Specificity of E2F and Pocket Protein Family Members in Living Cells. *Mol Cell Biol.* 20: 5797–5807.
185. Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., *et al.*, Provart N.J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One.* 2: e718.
186. Xie Q., Sanz-Burgos A.P., Hannon G.J. & Gutiérrez C. (1996). Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15: 4900–4908.

Referencias

187. Xiong Y, McCormack M., Li L., Hall Q., *et al.*, Sheen J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*. 496: 181–186.
188. Xu X., Pan S., Cheng S., Zhang B., *et al.*, Visser R.G.F. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*. 475: 189–195.
189. Yan H., Chaumont N., Gilles J.F., Bolte S., *et al.*, Bailly C. (2020). Microtubule self-organisation during seed germination in *Arabidopsis*. *BMC Biol.* 18: 1–15.
190. van Zanten M., Koini M.A., Geyer R., Liu Y., *et al.*, Soppe W.J.J. (2011). Seed maturation in *Arabidopsis thaliana* is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 20219–20224.
191. Zarain H. M., Bernal-Lugo I. & Vázquez-Ramos J.M. (1987). Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutat Res.* 181: 103–110.
192. Zhang L., Qju Z., Hu Y., Yang F., *et al.*, Li L. (2011). ABA treatment of germinating maize seeds induces VP1 gene expression and selective promoter-associated histone acetylation. *Physiol Plant.* 143: 287–296.
193. Zheng N., Fraenkel E., Pabo C.O. & Pavletich N.P. (1999). Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev.* 13: 666–674.
194. Zúñiga-Aguilar J.J., López I., Gómez A. & Vázquez-Ramos J.M. (1995). Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination?. *Seed Sci Res.* 5: 219–226.

Anexo I

Información suplementaria

Figuras suplementarias

Figura S3.1

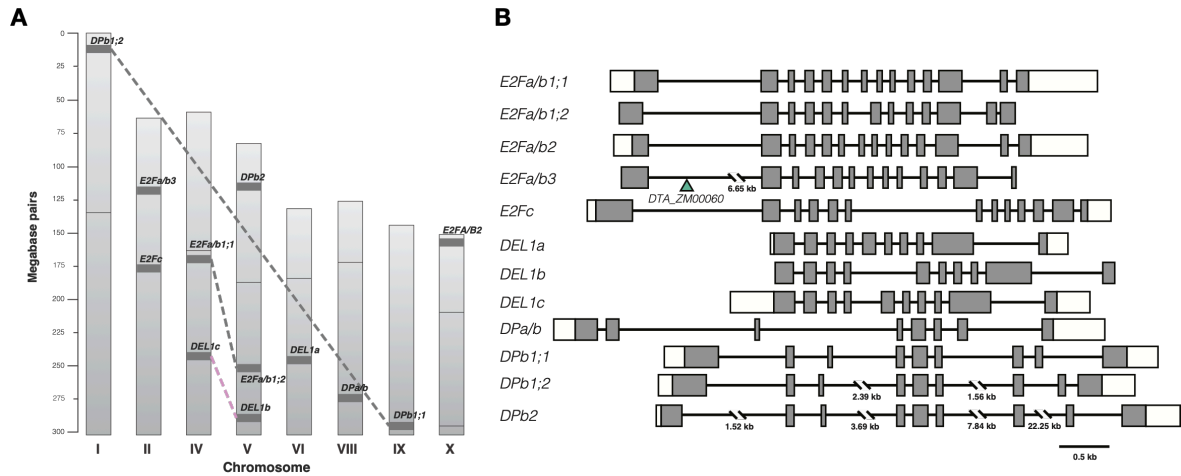


Fig.-S3.1 | Características genómicas de los genes E2F/DP candidatos de maíz. A. Representación esquemática de la posición de los genes candidatos en los cromosomas de maíz. Las líneas punteadas conectan genes parálogos. **B.** Estructura genética de los E2F/DP candidatos. Los recuadros grises representan exones codificantes, los recuadros blancos las UTRs y la línea sólida los intrones. En *E2Fa/b3* se muestra la inserción de un elemento transponible en su primer intrón.

Figura S3.2

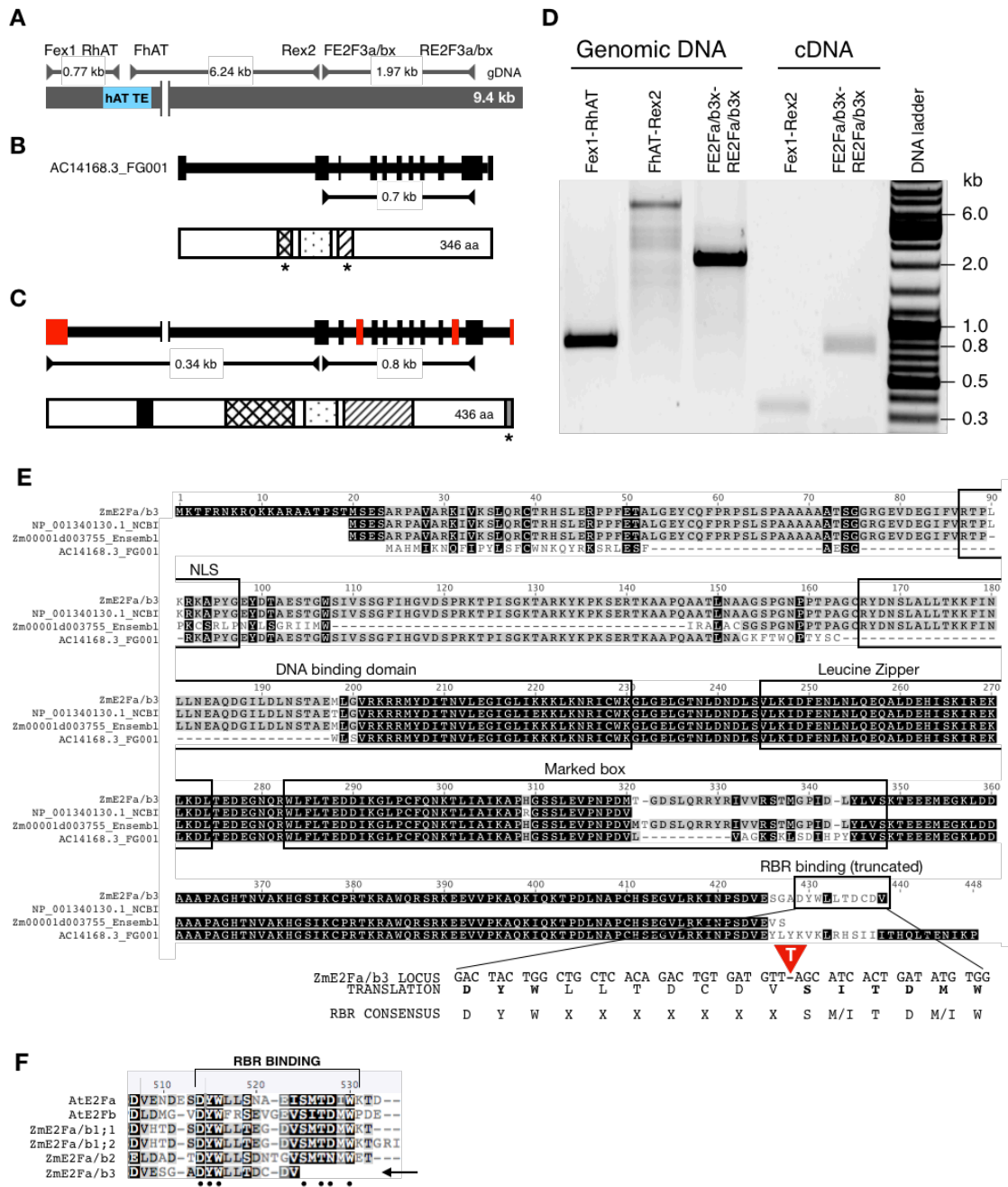
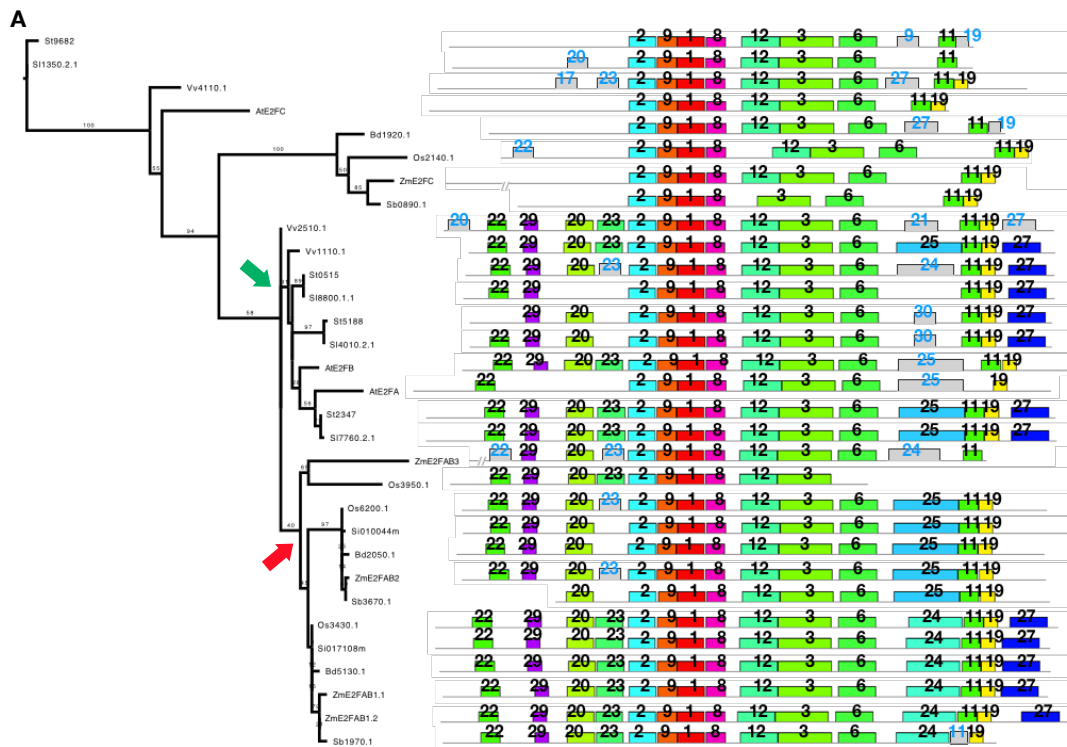


Fig.-S3.2 | Análisis del locus del gen ZmE2Fa/b3. La secuencia anotada para ZmE2Fa/b3 predijo una proteína con un dominio de unión al ADN de tipo E2F incompleto y un dominio parcial de interacción con DP. Un análisis detallado de la región genómica que codifica el dominio de unión al ADN (7 kbp río arriba y 3 kbp río abajo) arrojó la inserción de un retrotransposón de 1434 bp de la superfamilia hAT (97 % de identidad; con ID DTA_ZM00060) (Rubin *et al.*, 2001) (A). El esquema del cDNA predicho por la base de datos alineado con la región genómica se muestra en B, los recuadros negros indican los exones y la línea continua los intrones, también se indica el tamaño del amplicón en el cDNA y debajo de éste, se muestra la pro-

teína codificada y sus dominios. El análisis posterior predijo un cDNA alternativo que codifica una proteína E2F con todos los dominios y motivos característicos (C). Véase el código de textura en la Fig. 3.1-B. Para comprobar esta predicción, se diseñaron cebadores de PCR para amplificar el DNA genómico desde el exón 1 hasta el retrotransposón (0.7 kbp); desde el retrotransposón hasta el exón 2 (6.2 kbp) y desde el exón 2 hasta el 12 (1.9 kbp) (D); de este modo se cubrió todo el *locus* y la secuenciación demostró la presencia del elemento transponible (para los cebadores, véase la Tabla Suplementaria S8). La secuenciación del cDNA permitió predecir una proteína E2F canónica hasta el motivo de interacción con RBR, donde la inserción de un nucleótido crea un codón de paro de la traducción prematuro, produciendo una proteína truncada en su extremo carboxilo. E. Alineamiento de las proteínas predichas por distintas bases de datos y la proteína traducida in silico derivada de este trabajo. La proteína predicha por Ensembl Plants es similar a la de este trabajo, sin embargo carece del motivo de unión a RBR, mientras que nuestros resultados muestran que este motivo ha sido truncado debido a un cambio en el marco de lectura. La amplificación de esta zona muestra la inserción de un residuo de timina (en rojo) que genera un codón de paro de traducción prematuro. F. Alineamiento del motivo de interacción RBR en E2F de *Arabidopsis* y maíz. Los puntos negros bajo la secuencia indican los residuos considerados necesarios para la interacción.

Figura S3.3



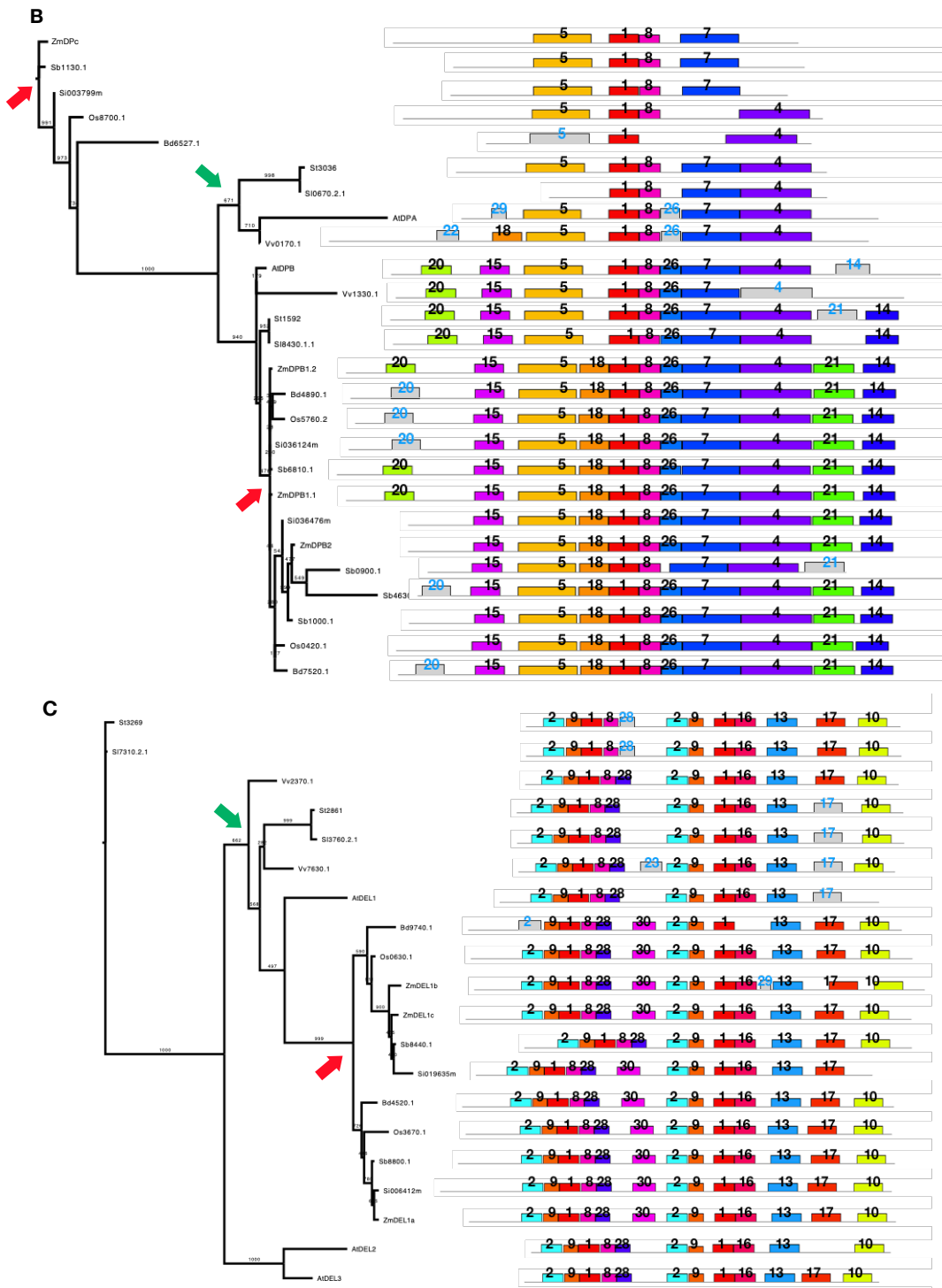


Fig.-S3.3 | Filogenia y organización de motivos y dominios en las proteínas de la familia E2F/DP. Se analizó el genoma de nueve especies de plantas, incluyendo las monocotiledóneas maíz (*Zea mays*, MaizeSequence, release 5b.60), *Brachypodium distachyon* (Ensembl Plants release 18, Genome assembly v1.0) (Vogel *et al.*, 2010), *Sorghum bicolor* (Ensembl Plants release 18, Genome assembly Sorbi1) (Paterson *et al.*, 2009), *Oryza sativa* (Ensembl Plants release 18, Genome assembly MSU6) y *Setaria italica* (Ensembl Plants release 18, Genome assembly JGIv2.0) (Bennet-

zen *et al.*, 2012). Del grupo de eudicotiledóneas se analizaron 4 genomas, *Arabidopsis thaliana* (TAIR10), uva (*Vitis vinifera*, Ensembl Plants release 18, Genome assembly IGGP_12x) (Jaillon *et al.*, 2007), tomate (*Solanum lycopersicum*, Ensembl Plants release 18, Genome assembly SL2.40) (Sato *et al.*, 2012) y papa (*Solanum tuberosum*, Ensembl Plants release 18, Genome assembly 3.0) (Xu *et al.*, 2011). Se realizó una búsqueda BLAST utilizando las secuencias de proteínas reportadas para cada E2F, DEL y DP de humanos, *Arabidopsis* y arroz, seleccionando aquellas con mayor identidad y valor $E < 0$. Se construyó el alineamiento múltiple de secuencias utilizando regiones informativas de las diferentes proteínas determinadas por la herramienta GBLOCKS (Castresana, 2000), luego se determinó el modelo de sustitución y se construyó un árbol filogenético como en la Fig. 3.1. Las flechas rojas indican los clados formados por proteínas de especies monocotiledóneas y las verdes los clados de especies dicotiledóneas. La filogenia de los subgrupos E2F (A), DP (B) y DEL (C) se muestra acompañada de la estructura de dominios y motivos de cada proteína en el lado derecho determinados mediante la herramienta MEMÉ (para mayor detalle ver descripción de la Fig. Sup. S3.6). Los recuadros grises representan predicciones del motivo correspondiente con un valor E mayor al límite establecido.

Figura S3.4

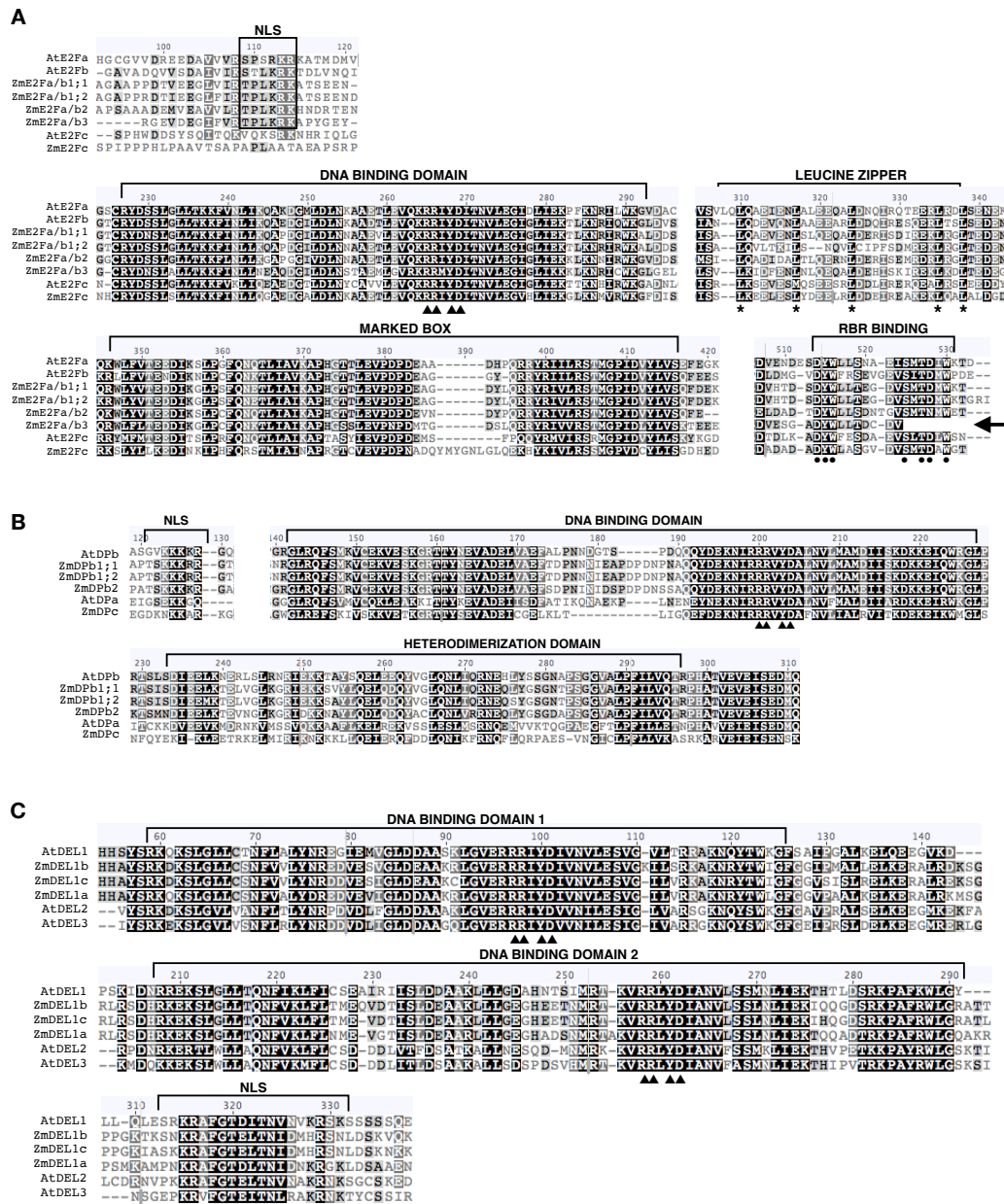


Fig.-S3.4 | Análisis de secuencia de los miembros de la familia E2F de maíz. Los miembros típicos (ZmE2Fa/b1;1, ZmE2Fa/b1; 2, ZmE2Fa/b2, ZmE2Fa/b3 y ZmE2Fc) presentan un dominio de unión al ADN conservado que incluye la firma RRXYD (donde X representa cualquier aminoácido), un zipper de leucinas y *marked box*, necesaria para la interacción con su socio DP; hacia el extremo carboxilo se encuentra el dominio de transactivación con el motivo de interacción RBR DYW(X7/8)S(M/I)TD(M/I)W (Ramírez-Parra & Gutierrez, 2008) embebido (A). ZmE2Fa/b3 tiene un codón de paro de la traducción prematuro que provoca la pérdida de la región de interacción con RBR y el resto del dominio de transactivación. Se predijeron señales de localización nuclear y al igual que en *Arabidopsis*, estas se encuentran en el extremo amino terminal en todos los miembros, con la excepción de E2Fc que carece de ella. En el subgrupo DP se

identificaron tres motivos altamente conservados, la señal de localización nuclear en el extremo amino terminal, excepto en DPa/b que no la tiene, un dominio de unión a DNA y un dominio de heterodimerización con E2F (B). Finalmente, en el subgrupo DEL se conservan tres motivos principales, dos de ellos correspondientes al dominio de unión a DNA, ambos con la señal RXYD que les permite unirse al elemento de respuesta E2F como monómero, y un tercer motivo en el extremo carboxilo con un posible papel en la localización nuclear (C).

Figura S3.5

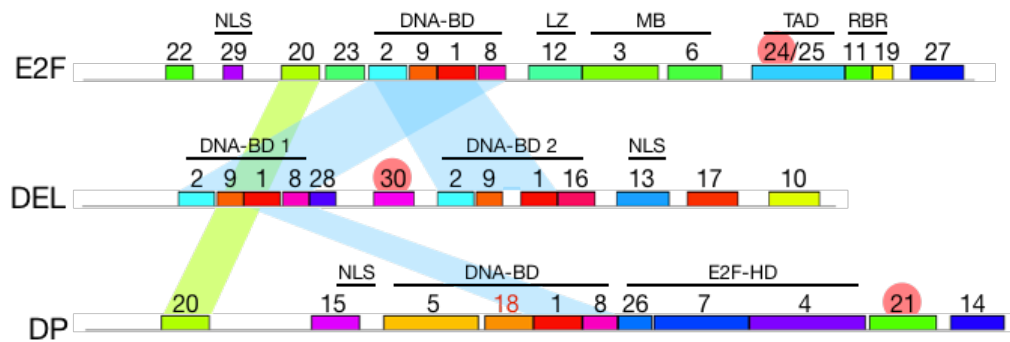
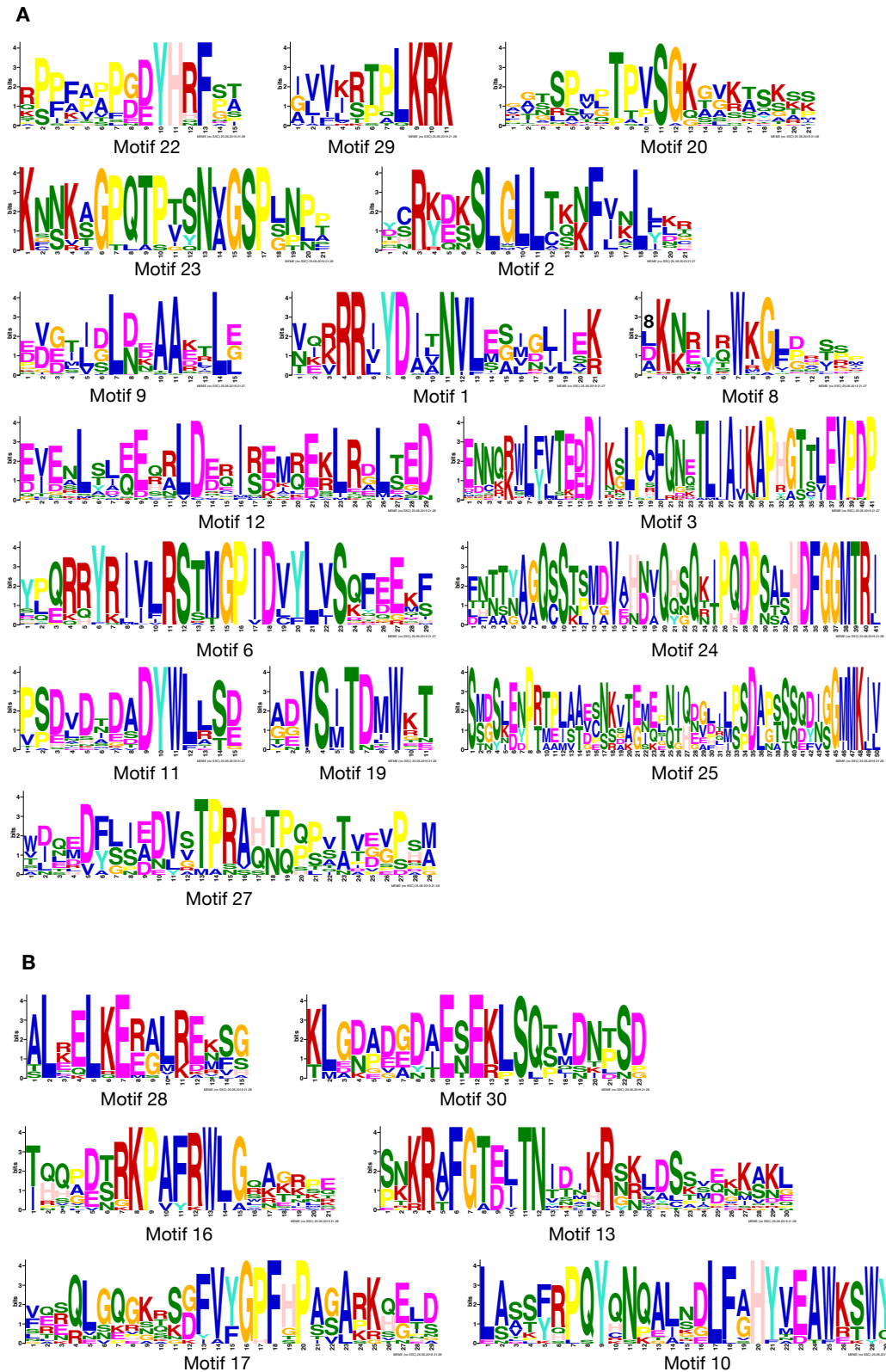


Fig.-S3.5 | Esquema general de los motivos y dominios de las proteínas E2F/DEL/DP de plantas. Los motivos identificados en este estudio se enumeran del 1 al 30 y se indican las regiones con función conocida. Los motivos exclusivos de especies monocotiledóneas se marcan con un círculo rojo. Las regiones homólogas entre subgrupos se indican ligadas por líneas de color. NLS, señal de localización nuclear; DNA-BD, dominio de unión a DNA; LZ, zipper de leucinas; MB, *marked box*; TAD, dominio de transactivación; RBR, motivo de interacción RBR; E2F-HD, dominio de heterodimerización con E2F.

Figura S3.6



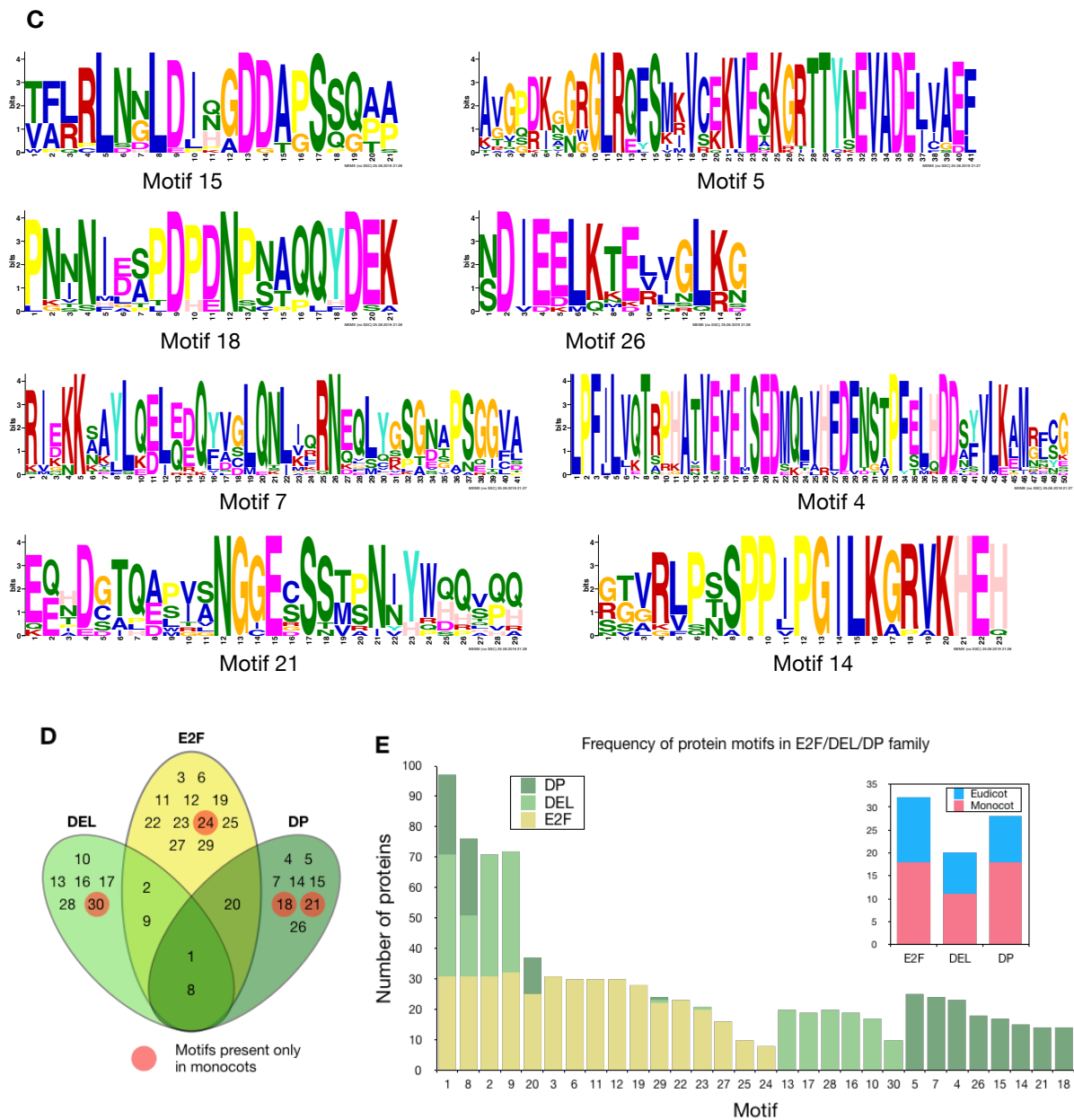


Fig.-S3.6 | Motivos proteicos en E2F/DEL/DP de plantas. Para determinar si las proteínas E2F contienen los dominios característicos de la familia, se analizaron las secuencias putativas. Se generaron secuencias consenso mediante la herramienta "Motif discovery" de MEME suite 5.0.5 (Bailey *et al.*, 2009), correspondientes a los motivos conservados entre las proteínas E2F (A), DEL (B) y DP (C) de las nueve especies vegetales reportadas en esta tesis. D. Diagrama de Venn que muestra los motivos presentes en los subgrupos de proteínas E2F, DEL y DP; en rojo se muestran los motivos presentes exclusivamente en monocotiledóneas. E. Gráfico que ilustra la frecuencia de aparición de los motivos en los diferentes subgrupos de la familia. El inserto muestra el número de miembros de los subgrupos E2F, DEL y DP, en rojo plantas monocotiledóneas y en azul dicotiledóneas.

Cuando se cultiva en presencia de leucina (Leu+) las células crecen normalmente, por el contrario, cuando se cultiva en ausencia del aminoácido (Leu-) únicamente se desarrollan las células en las que interactúan las proteínas DPb2 y E2F y, cuanto más fuerte sea la interacción, se forman colonias a diluciones mayores (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Todas las células fueron transformadas con un plásmido reportero pSH18 con un gen *LacZ* bajo operadores LexA; el medio Leu- fue suplementado con el sustrato de *LacZ*, X-Gal. Sólo aquellas células con la interacción confirmada desarrollarán coloración azul. Se muestran tres colonias independientes para cada interacción. Se utilizaron vectores vacíos como control (paneles inferiores). C. Para demostrar que las proteínas His-RBR1 y eXact-E2Fa/b1;1 no interaccionan con la resina Profinity (panel superior) o Glutalión-Sefarosa (panel inferior), respectivamente, se incubaron lisados bacterianos tras la inducción de la proteína recombinante con la resina de afinidad. Las fracciones de purificación se monitorearon mediante western blot con los anticuerpos indicados. *Input*, fracción soluble tras la inducción; NAF, fracción no adsorbida a la columna; W, lavado; E, elución.

Figura S3.8

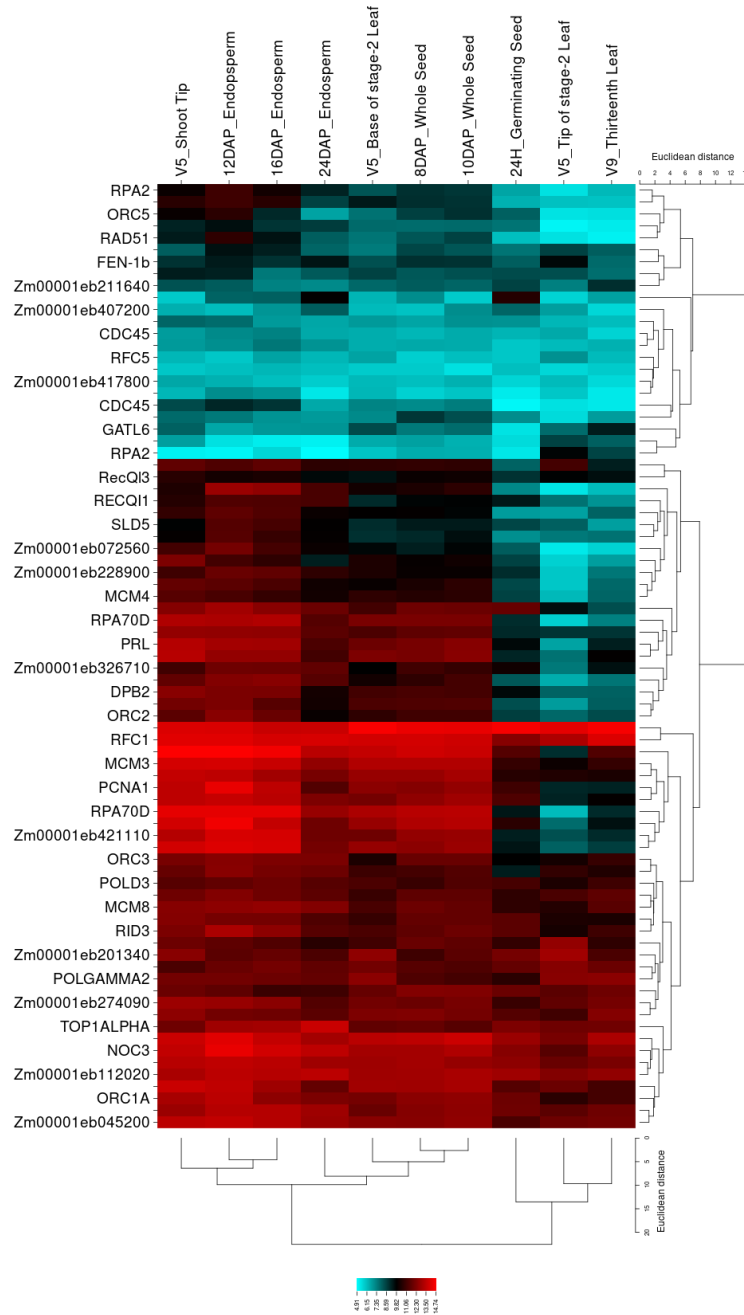


Fig.-S3.8 | Expresión de posibles genes blanco de E2F en las tres principales categorías funcionales identificadas. Se muestran los niveles de expresión en diferentes tejidos durante el desarrollo de maíz, de izquierda a derecha, en la punta del brote de plántula V5, endospermo endoreplicativo de 12 y 16 días después de la polinización (DAP), base de la hoja de plántula V5, endospermo mitótico de 8 DAP o 10 DAP, embrión después de 24 h de germinación, punta de hoja de plántula V5 y la hoja 13. El mapa de calor se construyó utilizando datos de Sekhon *et al.*, 2011.

Figura S3.9

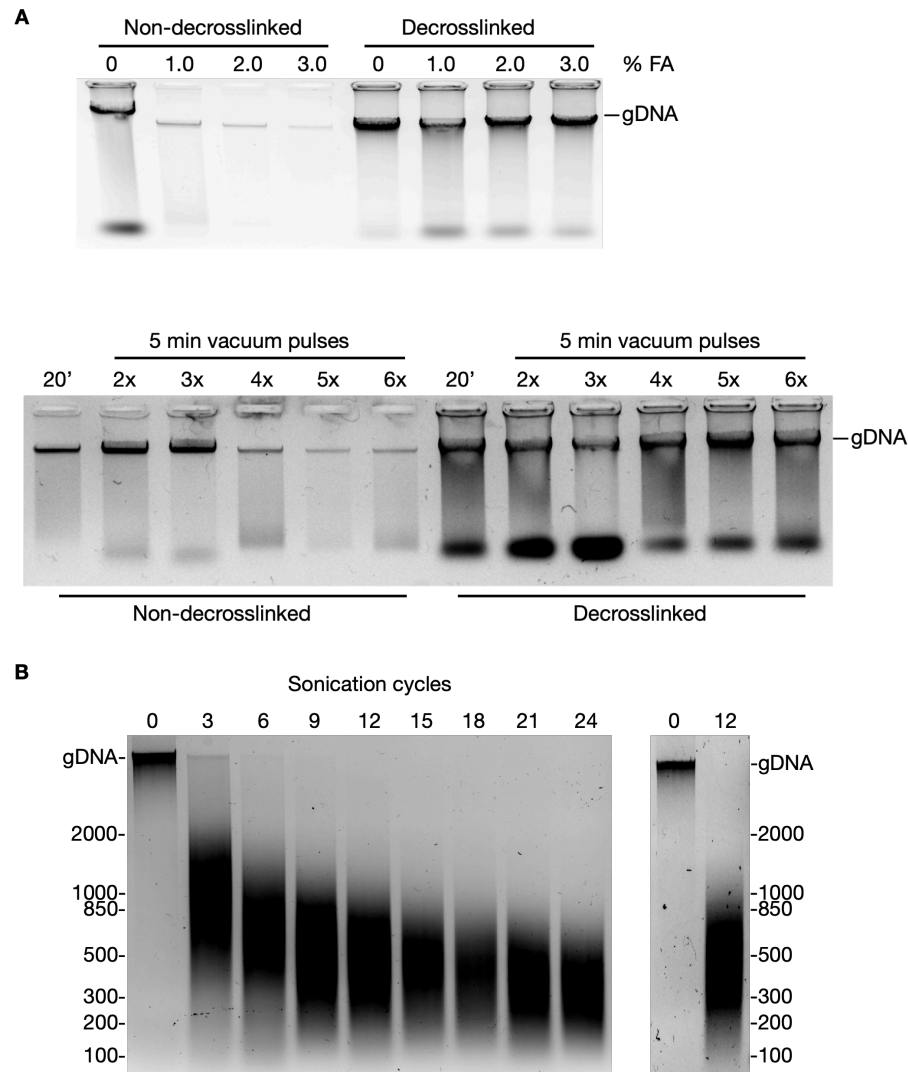


Fig.-S3.9 | Estandarización del entrecruzamiento y fragmentación de cromatina de maíz. A. Estandarización de entrecruzamiento. Se entrecruzaron puntas de raíz de ejes embrionarios con diferentes cantidades de formaldehído (FA). Para evaluar la eficiencia de entrecruzamiento se extrajo DNA con fenol-cloroforno de muestras con o sin reversión de entrecruzamiento (gel superior). Sin desentrecruzamiento, recuperar una cantidad mayor de DNA indica menor eficiencia y posterior a la reversión del entrecruzamiento, se recupera la cantidad total de DNA. La eficiencia se mejoró aplicando pulsos de vacío de 5 minutos (gel inferior). **B.** Estandarización de la fragmentación de cromatina. Se entrecruzó el tejido y se extrajo cromatina, se aplicaron diferentes ciclos de sonicación para fragmentarla, se aisló DNA utilizando columnas de sílica y se cargó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (panel izquierdo). El experimento fue replicado consistentemente (panel derecho) entrecruzando con formaldehído al 1.5 %, con 5 pulsos de vacío y 12 ciclos de sonicación, siendo considerada esta como la condición adecuada.

Figura S3.10

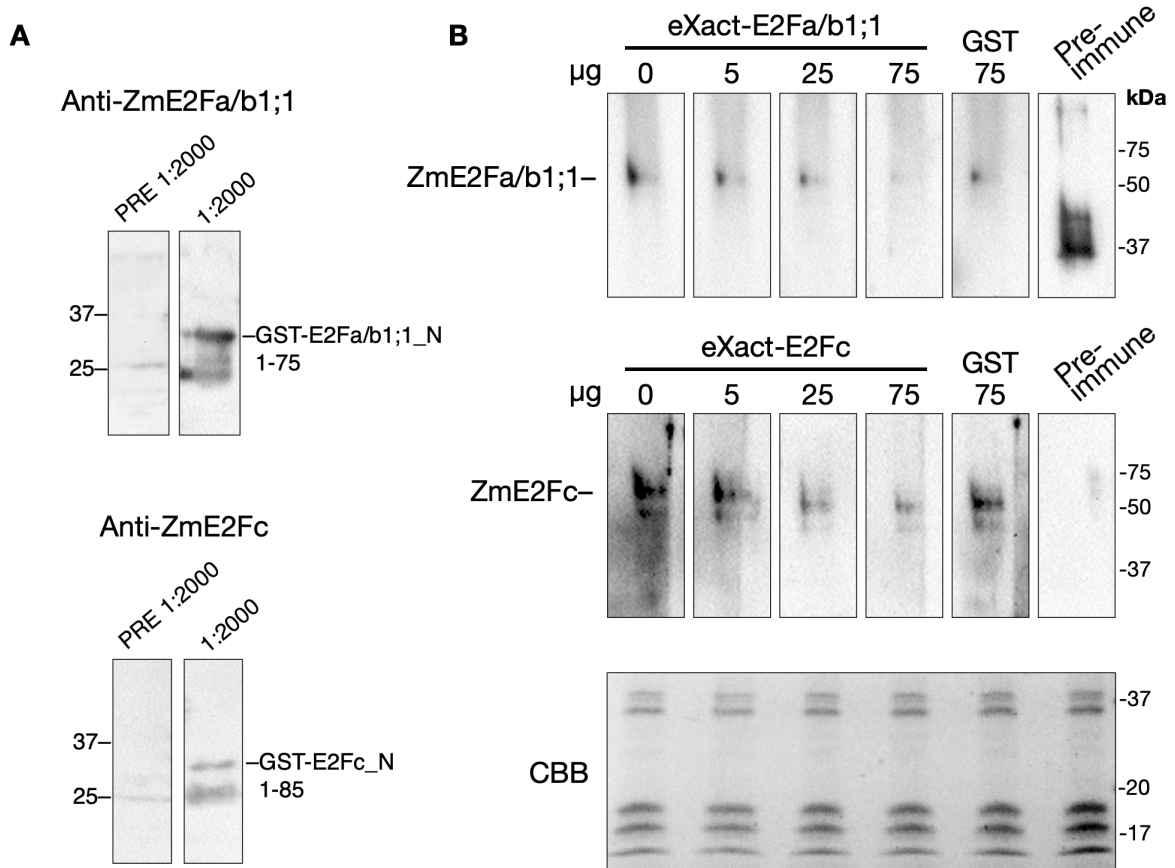


Fig.-S3.10 | Generación de anticuerpos policlonales anti-E2F de maíz. Se generaron anticuerpos policlonales capaces de reconocer las proteínas E2Fa/b1;1 y E2Fc de maíz, seleccionando secuencias potencialmente inmunogénicas (EMBOSSantigenic) (Rice *et al.*, 2000), accesibles al solvente (NetSurfP Ver1.1) (Petersen *et al.*, 2009) y que no se encontraran conservadas entre los miembros E2F/DP de maíz. Para E2Fa/b1;1 se seleccionaron los aminoácidos 1-75 y 1-85 para E2Fc. Estos fueron clonados y expresados en el vector pDEST15 (fusión traduccional con GST al extremo N-terminal) (los cebadores empleados se reportan en la Tabla Suplementaria S9). Se inmunizaron conejos New Zealand (dos animales por construcción) con las proteínas recombinantes. Se recogió el suero preinmune y se inyectaron 100 µg de proteína recombinante a través del ganglio poplíteo, al día siguiente se repitieron las dosis pero en la otra pata. El quinto día se administraron 200 µg de proteína con adyuvante de Freund incompleto (Sigma) por vía subdérmica. A la segunda semana se aplicaron dos dosis más, de 200 µg cada una. La tercera semana se aplicó un refuerzo peritoneal con 200 µg y la cuarta semana se cosechó el suero. Los sueros preinmunes o inmunes se analizaron mediante western blot con la proteína inmunogénica en una dilución 1:2000 (A). En la figura superior, suero anti-E2Fa/b1;1 y en la inferior, suero anti-E2Fc; en ambos casos la proteína de fusión antigénica GST-E2F se reconoce en 33 kDa aproximadamente, mientras que un producto putativo trunco de la fusión que contiene GST se inmunodetectó a 25 kDa. Los antígenos se corroboraron utilizando un anticuerpo comercial anti-GST que detectó ambas bandas de 25 y 33 kDa, indicando la presencia de proteínas de fusión incompletas que contienen la fracción de GST (abajo; carriles de carga 1: GST, 2: GST-E2Fa/b1;1 N_1-75, 3: GST-E2Fc N_1-85).

B. Ensayo de inmunocompetencia. Se separaron extractos proteicos nucleares de ejes embrionarios provenientes de semillas embebidas 28 h, mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Los sueros fueron competidos incubándolos con la cantidad indicada de proteína recombinante E2F completa, o con GST como proteína no relacionada y se utilizaron para realizar ensayos de *western blot*. Tanto para E2Fa/b1;1 (arriba) como para E2Fc (abajo), se observó la disminución de la señal de una proteína de alrededor de 50 kDa, tamaño esperado para ambas proteínas E2F de maíz, al aumentar la cantidad de la proteína competidora; dicha disminución no se observó cuando la proteína competidora era GST, indicando que la proteína reconocida corresponde con E2F endógeno. El suero preinmune no reconoció ninguna proteína en el tamaño esperado. Como control de carga se muestran geles teñidos con azul de Coomassie (CBB) cargados con la misma cantidad de extractos nucleares.

Figura S3.11

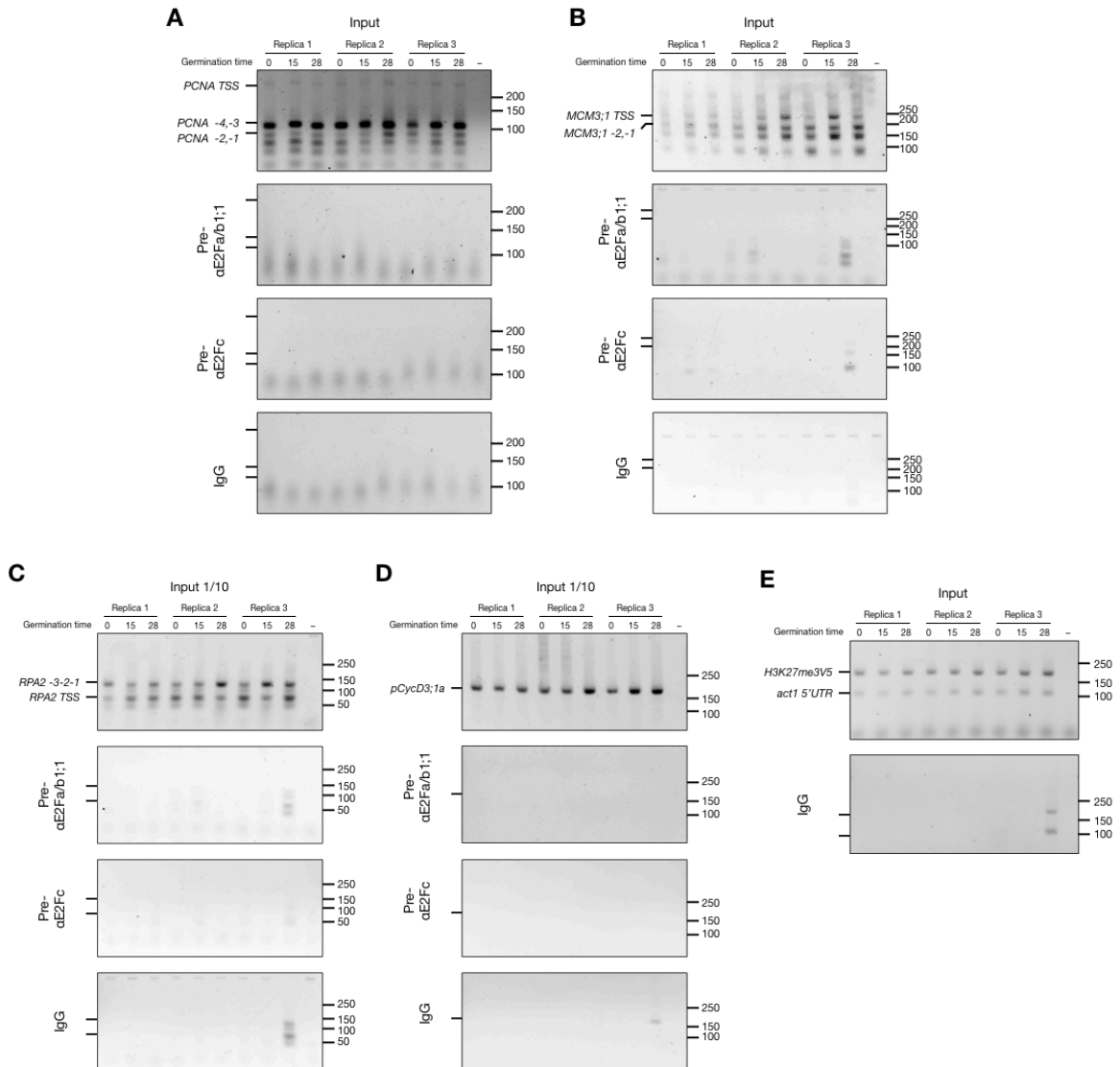


Fig.-S3.11 | Controles de inmunoprecipitación de cromatina para los diferentes sitios E2F estudiados. Se muestran las réplicas de amplificación para los inputs y los inmunoprecipitados control con sueros preinmunes de los anticuerpos generados o IgGs de conejo. Los conjuntos de primers se amplificaron en multiplex para los motivos E2F en *PCNA1* (A), *MCM3;1* (B), *RPA2* (C), *pCYCD3;1a* (D) y el locus *H3K27me3V5* con *act1 5' UTR* (E). Se indican las bandas del tamaño esperado en los inputs. Los productos de PCR fueron secuenciados para corroborar la identidad de los fragmentos amplificados.

Figura S3.12

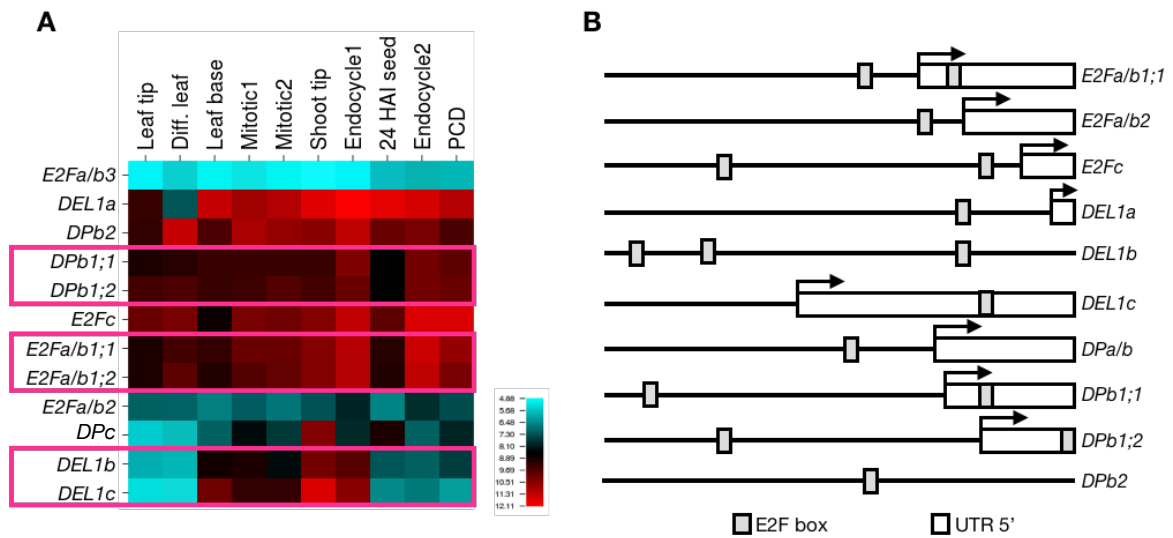


Fig.-S3.12 | Regulación de la expresión de los genes E2F de maíz. A. Expresión de genes en diferentes tejidos durante el desarrollo de maíz: de izquierda a derecha, punta de hoja de plántulas de 14 días, hoja 13 de planta adulta, base de la hoja de plántula de 14 días, endospermo mitótico de 8 DAP o 10 DAP, endospermo endorreproductivo de 12 y 16 DAP, endospermo maduro bajo muerte celular programada (PCD). Los cuadrados rojos indican pares de genes parálogos con niveles de expresión similares. El gráfico se construyó con datos de Sekhon *et al.*, 2011. B. Los genes E2F pueden estar regulados por miembros de la misma familia ya que diez de ellos contienen al menos un sitio E2F en su región promotora dentro de los primeros 1000 pb río arriba de la región codificante.

Figura S3.13

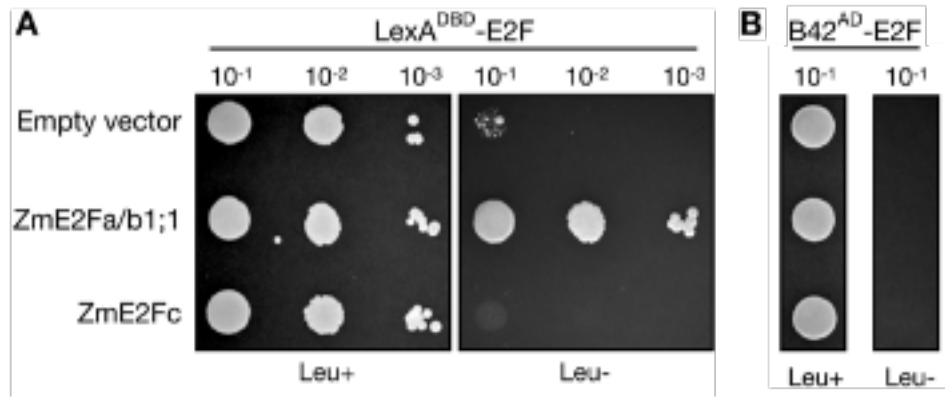


Fig.-S3.13 | Las proteínas E2F de maíz poseen actividades transcripcionales opuestas. ZmE2Fa/b1;1 y ZmE2Fc fusionadas al dominio de unión al ADN LexA (A), o al dominio de transactivación B42 (B42-AD) (B) se expresaron en células de levadura EGY48. Este sistema reportero permite el crecimiento de una cepa leucina-auxotrófica en su ausencia (Leu-). Se muestran diluciones seriadas del inóculo, demostrando una actividad reportera estable. Mediante este ensayo se demostró la capacidad de E2Fa/b1;1 de maíz de estimular transcripción en un sistema heterólogo mientras que E2Fc no fue capaz de permitir el crecimiento de las levaduras auxótroficas (Experimentos realizados por Samantha Romero-Rodríguez, 2019).

Figura S3.14

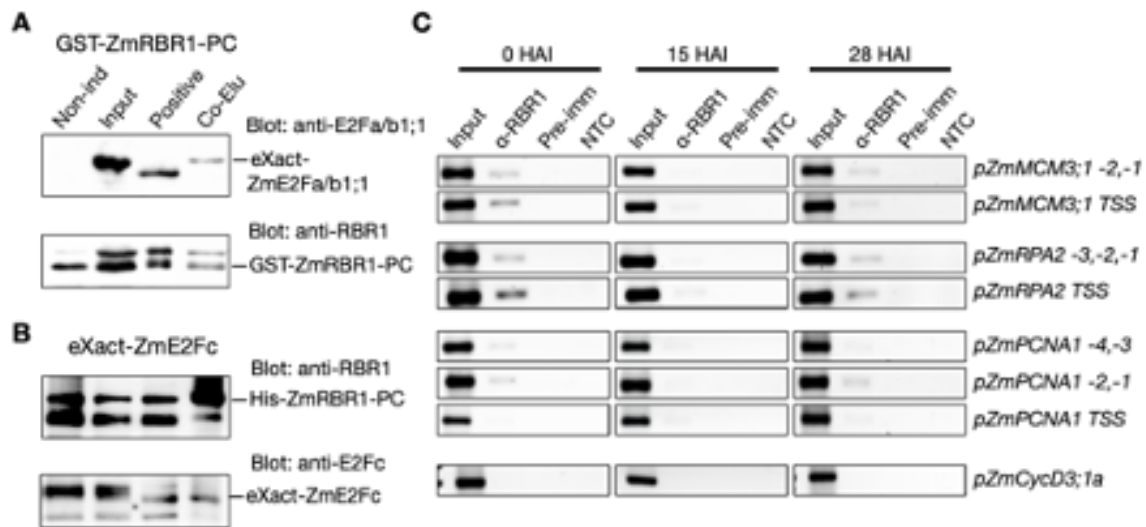


Fig.-S3.14 | La proteína ZmRBR1 interacciona y co-localiza con las proteínas E2F en promotores blanco de E2F. A. eXact-ZmE2Fa/b1;1 y **(B)** eXact-ZmE2Fc interaccionan con péptidos que contienen los dominios pocket A y B, así como el extremo carboxilo terminal de RBR1 (ZmRBR1-PC). Para estudiar las interacciones de RBR1 con E2Fs se realizaron ensayos de pull-down con proteínas recombinantes. Por un lado, GST-ZmRBR1;1-PC fue unida a la resina de glutatión para estudiar la interacción con eXact-ZmE2Fa/b1. Para estudiar la interacción de His-ZmRBR1-PC con E2Fc, eXact-E2Fc fue anclada a la resina Profinity y se detectó la unión de RBR1. No-ind, sin adición de IPTG a los cultivos bacterianos; Input, mezcla de lisados después de la inducción; Positive, proteína blanco del anticuerpo purificada; Co-Elu, elución de la resina con proteínas GST-ZmRBR1-PC o eXact-E2Fc ancladas. Los carriles en B son los mismos que en A. C. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina para estudiar la asociación de ZmRBR1 a sitios E2F durante la germinación. Input, PCR utilizando como templado cromatina fragmentada y desentrecruzada; α -RBR1, ChIP utilizando suero de conejos inmunizados con la proteína GST-ZmRBR1C-terminal; Pre-imm, ChIP empleando suero preinmune del mismo conejo; NTC, PCR sin templado. Los experimentos se realizaron al menos tres veces con muestras biológicas independientes.

Figura S3.15

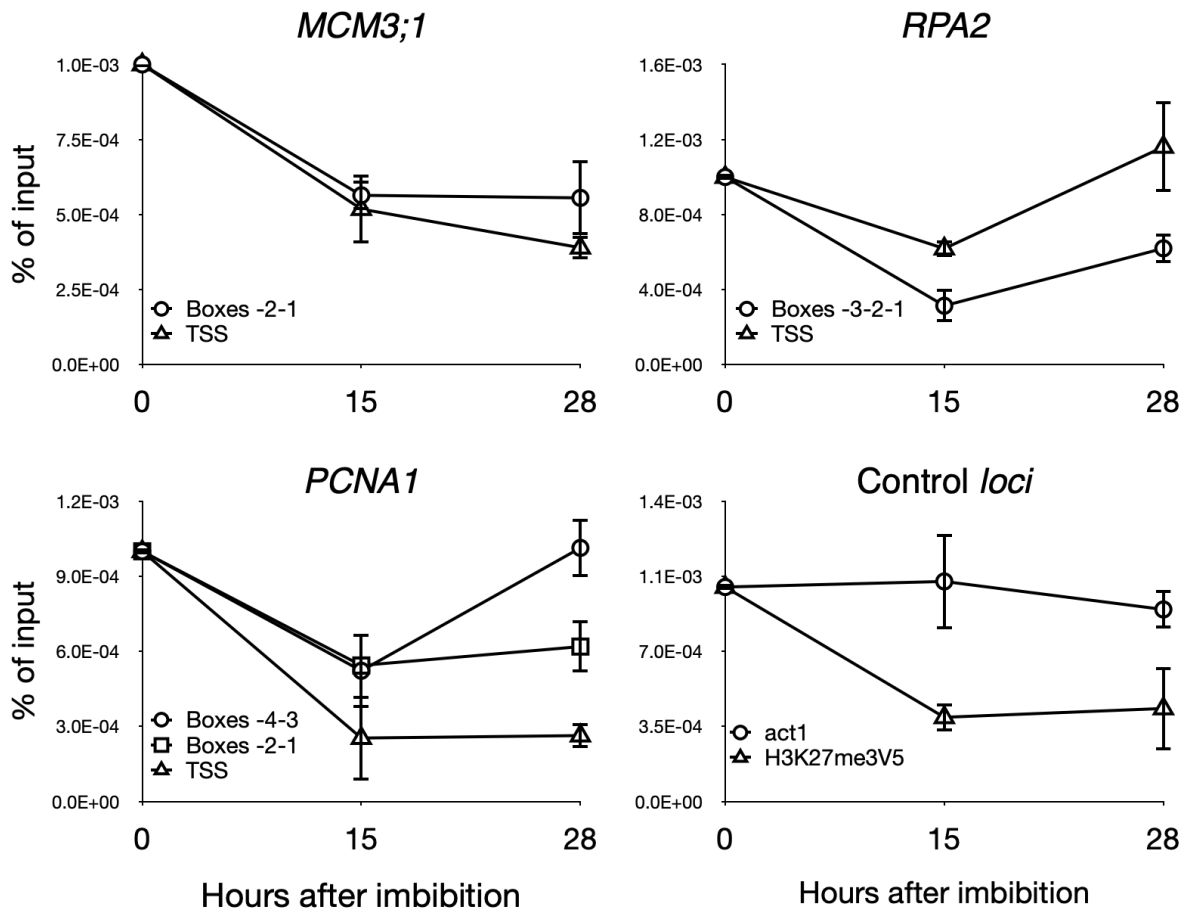


Fig.-S3.15 | Accesibilidad de la cromatina en loci blanco de E2F. Se germinaron semillas y se preparó cromatina de tejido entrecruzado. La cromatina fragmentada se trató con fenol-cloroformo y se precipitó la fase acuosa, que contiene DNA libre de proteínas (cromatina accesible). Se realizaron experimentos de qPCR utilizando los mismos cebadores que en las Figs. 3.6 y 3.7. Los valores se muestran como porcentaje del input y fueron normalizados respecto a la semilla seca. Un mayor porcentaje indica una mayor accesibilidad del DNA en el *locus* indicado.

Tablas Suplementarias

Tabla suplementaria S1. Cebadores empleados para experimentos de expresión semicuantitativa (RT-PCR).

Primer	ID	Año	Secuencia 5-3'	Amplicón (bp)	TM (°C)
FE2Fa/b1;1x	7429	2012	GGAGCAAGCTCTAGATGAGCGTA	586	56
RE2Fa/b1;1x	7430	2012	CATCTCATCCCACTGCGCTTGTT		
FE2Fa/b1;2x	7431	2012	CCGCTTTGCAGGTCTTAACA	670	56.7
RE2Fa/b1;2x	7432	2012	ATCTGGTCCCACTGCACTTCTT		
FE2Fa/b2x	7433	2012	TGCCATGCTTCCAGAATCAGACTC	469	57.5
RE2Fa/b2x	7434	2012	TCAATCCCATCCCACTCATCTGGT		
FE2Fa/b3x	7435	2012	TGCTGAGTCAACCGGATGGAGTAT	820	56
RE2Fa/b3x	7436	2012	TTATGGAGCCATGCTTTGCC		
FE2Fex	7437	2012	GAGCTGAAGATGGAGCCCTTGATT	448	56
RE2Fex	7438	2012	TCCTGCAAACCCAGATTCCCATAC		
FDEL1ax	7439	2012	CGGATCACCGGTGTTACTGTCAATG	319	56
RDEL1ax	7440	2012	GGCTGTTCTCATGTTGCTGTCTG		
FDEL1bx	7441	2012	ATGTGCTTGAGAGTGTCGGGAAGA	572	56
RDEL1bx	7442	2012	ATTTTCTGTGTCCGGCGTTGTG		
FDEL1cx	7443	2012	GGATAGGTTTCGGCGGAGTCTCAATA	209	57.5
RDEL1cx	7444	2012	CGGTTTGCCAGAAGGTTTGTCC		
FDPa/bx	7445	2012	TGCGCTCTTGCTCCTAGGTAACAT	781	58
RDPa/bx	7446	2012	AGGGAGCATCAGTTTGTAGTTCTGG		
FDPb1;1x	7447	2012	GGGACTGCGCCAGTTTAGTATGAA	737	56.5
RDPb1;1x	7448	2012	CTGGAATAGGCGGTGAGCTTGAT		
FDPb1;1x	7447	2012	GGGACTGCGCCAGTTTAGTATGAA	476	56
RDPb1;2x	7449	2012	CATGAGGTCTGGTCTGAACTAGGATA		
FDPb2x	7450	2012	CGAGCAGTTGGTCTGACAAAA	652	56
RDPb2x	7451	2012	CACCAGGAGCTTGGGTACAATCAG		

Tabla suplementaria S2. Cebadores para expresión de genes en tiempo real (RT-qPCR).

Primer	ID	Año	Secuencia 5'-3'	Amplicón (bp)	Efficiency
qFwMCM3;1	N/A	2015	GCACCTTACACCAGAAGCCAAGTAGA	173	1.86
qRvMCM3;1	N/A	2015	GTTACAGACAGACAGACAGGCACCA		
qFwRPA2	N/A	2015	GCGTGCTACTGCTTTCTCAA	80	2.8
qRvRPA2	N/A	2015	GCATCCGAACACACTGAATGAA		
qFWPCNA1	N/A	2015	ATAAGCTGCATGATAAGAAGCCC	89	2.32
qRVPCNA1	N/A	2015	TTAGTTGCTGTTCTAACTTCACA		
qFE2F1;1	N/A	2016	GCTGTTGTGAAGATTGGCGAGG	136	1.88
qRE2F1;1	N/A	2016	AATGGAGCAGGGATGAATGAGCA		
qFwE2FC	1049	2017	CAGAACCATCCAGAAAGCAAGAAA	86	2.3
qRvE2FC	1050	2017	AGAAGCAAGCCAGTAATCAGCA		
qFEF1 α	N/A	2015	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA	135	1.93
qREF1 α	N/A	2015	ACATACCCACGCTTCAGATCCT		

Tabla suplementaria S3. Cebadores empleados para clonar marcos de lectura abiertos.

Primer	ID	Año	Secuencia 5'-3'	Sitio de rest.	Vector	Amplicón (bp)	TM (°C)
FE2FA/B 1 5'UTR	280 8	2013	GGGCGCAGAAGCCATATGT	N/A	pGEM-T Easy	1558	56
RE2FA/B 1 3'UTR	280 9	2013	ATGCCCTGACTAAACTCCAGGTGA	N/A			
FW E2Fa/b	446 6	2012	TATACTAGTATGTCGGGGTTCGGCAGC	SpeI	pPAL7	1409	58
RV E2Fa/b	446 7	2012	CGTTGGAATTCTTATGGATCTGTGCTTGG	EcoRI			
FE2FC 5'UTR	281 0	2013	AAGGCAGCAACCCGCAAATCAA	N/A	pGEM-T Easy	1626	57
RE2FC 3'UTR	281 1	2013	CTGCCTACCATGTACCCTCTGATTTG	N/A			
FW E2Fc	446 8	2012	TTCAAAGCTTTGACTTCTATGGACGGCGC CTCCTC	EcoRI	pPAL7	1436	58
RV E2Fc	446 9	2012	GTCTTGAATTCTTACGTGCCCAAGCATC TGT	HindIII			
FW DPb	447 2	2012	TTAAAAGCTTTGACTTCTATGTTCTCCGGC ACCGGAC	EcoRI	pPAL7	1055	59
RV DPb	447 3	2012	GTCTTGAATTCTTAGTGTTTCATGCTTGACA CGCC	HindIII			
FDPB2 ORF BamHI	727 1	2015	TTAGGATCCATGTTCTCCGGCACCGGAC	BamHI	pGEX-4T-2	1046	58

RV DPb	447 3	2012	GTCTTGAATTCTTAGTGTTTCATGCTTGACA CGCC	HindIII			
--------	----------	------	---	---------	--	--	--

Tabla suplementaria S4. Sondas de DNA de cadena sencilla para EMSA.

Sonda	ID	Año	Secuencia 5'-3'	Hebra
Cons TmE2F -	8482	2017	TATGGTGTCTGAATTGGCGGGAAAGCGGATT	-
Cons TmE2F +	8483	2017	AATCCGCTTTCCTCGCAATTCGACACCATA	+
Cons E2Fmu -	8484	2017	TATGGTGTCTGAATTGGATGGAAAGCGGATT	-
Cons E2Fmu +	8485	2017	AATCCGCTTTCCTATCCAATTCGACACCATA	+
Box -4 pPCNA1-	8697	2014	CAGCCGAGATGGCGGGAAATGCTGGGAAA	-
Box -4 pPCNA1+	8696	2014	TTTCCAGCATTTCCTCGCATCTCGGCTG	+
Box -3 pPCNA1-	8699	2014	GAAGTGTGAGGCGGGAAATGCAGTTGCT	-
Box -3 pPCNA1+	8698	2014	AGCAACTGCATTTCCTCGCTCATCAGTTC	+
Box -2 pPCNA1-	8701	2014	GGAGCGGCCGGCGGGAAAACATTTTCGCG	-
Box -2 pPCNA1+	8700	2014	CGCGAAATGTTTTCTCGCCCGGCGCTCC	+
Box -1 PCNA1-	8703	2014	ACCGCAGCCAGCCGCGAAATGTTTTCTCG	-
Box -1 PCNA1+	8702	2014	CGGGAAAACATTTTCGCGGCTGGCTGCGGT	+
MCM3 -5 DOUBLE BOX -	1235	2017	CTCAAATGTCATTGCCGGGAAAATCCTTCCCC	-
MCM3 -5 DOUBLE BOX +	1234	2017	GGGGAAGGATTTTCTCGGCAATGACATTTGAG	+
MCM3 -4 BOX -	1237	2017	AATTAAGCCTTTTCTCCCTCAATCTCGGA	-
MCM3 -4 BOX +	1236	2017	TCCGAGATTGAGGGGGAAAAGGCTTAATT	+
MCM3 -3 BOX -	1239	2017	GCTGGTAGCATTGGCCAGTAAGGGGTG	-
MCM3 -3 BOX +	1238	2017	CACCCCTTACTGGGCCAAATGCTACCAGC	+
MCM3 -2 BOX -	1225	2017	GAAGAGGTGGTTTTCTCGCGCTCGGTACG	-
MCM3 -2 BOX +	1224	2017	CGTACCGAGCGCGGAAAACACCTCTTC	+
MCM3 -1 BOX -	1227	2017	GGCGGCGCGTTTTGGCGGGAGTTGGCGC	-
MCM3 -1 BOX +	1226	2017	GCGCAACTCTCGCCAAAACGCGCCGCC	+
RPA2 -1-2-3 BOXES -	1229	2017	GAGCAACTGGCGGGAGAACGGGCAAAGCGCG GGAAATGAAACCTG	-
RPA2 -1-2-3 BOXES +	1228	2017	CAGGGTTTCATTTCTCGCGTTTTGCCCGTTCTCC GCCAGTTGCTC	+

Tabla suplementaria S5. Cebadores para ChIP-(q)PCR.

Primer	ID	Año	Secuencia 5'-3'	Amplicón (bp)	TM (°C)
FTSS PCNA1	N/A	2016	CCCAAACGACTCCCTATTAATCCC	208	58.9
RTSS PCNA1	N/A	2016	ATCGCCTCCAGGACCTTCTT		
FE2FBOX1.2_2 PCNA1	N/A	2016	AATCTTCCGGAGCAAGGAGCAT	126	58.9
RE2FBOX1.2_2 PCNA1	N/A	2016	GGGGATTAATAGGGAGTCGTTTGGG		
FE2Fbox3.4 PCNA1	N/A	2016	TGAGTGGAGGGAAGGGAGGAGGAG	118	58.9
RE2Fbox3.4 PCNA1	N/A	2016	GCGGTTTGGGAAAGGGCGGG		
epFwRPA TSS	7414	2016	GTTCTCCCGCCAGGTTGCTC	74	60.8
RTSS RPA2	N/A	2016	GATGCGATGCGATGCGAGGG		
epFwRPA-123	7412	2017	CCCACAGTCAGTCAGTCACTC	114	56.8
epRvRPA-123	7413	2017	CTCAAAGGAGCGGAGTCCTAT		
FTSS MCM3	N/A	2016	AACCACCTCTTCCAGCCACAC	216	58
RTSS MCM3	N/A	2016	CCATTGCCTCCTCGTTGATTTCC		
FE2Fbox1.2 MCM3	N/A	2016	AATAGTCAGCCAAGAGCCCAACGA	171	58
RE2Fbox1.2 MCM3	N/A	2016	AGGCGGGCGGATTTGGATTTG		
ActinM70Fw	8043	2017	TTTAAGGCTGCTGTACTGCTGTAGA	120	55
ActinM414 Rw	8044	2017	CACTTTCTGCTCATGGTTTAAGG		
H3K27me3_pos1_F	N/A	2016	CTATCTCCTTTCCCTCAACGTG	216	56.8
H3K27me3_pos1_R	N/A	2016	GAGATTCAGTTCGGAATCACC		
FpCYCD3.1a ChIP	9381	2017	AAGAGACGGATGGAGAGGCA	211	60.8
RpCYCD3.1a ChIP	9382	2017	GGAGCGAGAGAGAGAGAGTGA		

Tabla suplementaria S6. Información genómica de genes E2F/DP de distintas especies vegetales.

Espe- cie	Subtipo	ID	Sinónimo	Nombre	CDS (bp)	Proteína (aminoácidos)	Locus (pb)	Crom.	Inicio	Fin	Exones
<i>Arabidopsis thaliana</i>	E2F	AT2G36010.1	N/A	E2Fa/E2F3	1455	485	3642	2	15119542	15123184	13
	E2F	AT5G22220.2	N/A	E2Fb/E2F1	1407	469	3919	5	7360535	7364454	14
	E2F	AT1G47870.1	N/A	E2Fc/E2F2	1188	396	3015	1	17634757	17637772	13
	DEL	AT3G48160.1	N/A	DEL1/E2L3 /E2FE	1137	379	2768	3	17783331	17786099	10
	DEL	AT5G14960.1	N/A	DEL2/E2L1 /E2FD	1077	359	2446	5	4843948	4846394	10
	DEL	AT3G01330.1	N/A	DEL3/E2L2 /E2FF	1062	354	2456	3	124379	126835	11
	DP	AT5G02470.1	N/A	DPa/DP2	876	292	2542	5	542358	544900	10
	DP	AT5G03415.1	N/A	DPb/DP1	1155	385	3130	5	842289	845419	10
<i>Brachypodium distachium</i>	E2F	BRADI3G45130.1	BRADI_3G45130v3	E2Fa/b1	1398	466	5008	3	47049416	47054424	14
	E2F	BRADI4G42050.1	BRADI_4g42050v3	E2Fa/b2	1347	449	4667	4	46127841	46132508	14
	E2F	BRADI5G01920.1	BRADI_5G01920v3	E2Fc	1176	392	4235	5	1932678	1936913	13
	DEL	BRADI1G44520.1	BRADI_1g44520v3	DEL1a	1293	431	3061	1	42693887	42696948	10
	DEL	BRADI3G59740.1	BRADI_3G59740v3	DEL1b	1299	433	2959	3	58863485	58866444	9
	DP	BRADI1G74890.1	BRADI_1G74890v3	DPb1	1149	383	3950	1	71935218	71939168	9
	DP	BRADI2G46527.1	BRADI_2G46527v3	DPa/b	684	228	3054	2	46959149	46962203	8
	DP	BRADI3G27520.1	BRADI_3g27520v3	DPb2	1044	348	9548	3	28527149	28536697	9
<i>Oryza sativa</i>	E2F	LOC_Os02g33430.1	OS02T0537500-01	E2Fa/b1	1425	475	5108	2	19862331	19867439	14
	E2F	LOC_Os04g02140.1	OS04T0112200-00	E2Fc	1482	494	4694	4	705796	710490	13
	E2F	LOC_Os04g33950.1	OS04T0416100-01	E2Fa/b3	957	319	5731	4	20377617	20383348	12

	E2F	LOC_Os12g06200.1	OS12T0158800-01	E2Fa/b2	1338	446	5380	12	2938686	2944066	14
	DEL	LOC_Os02g50630.1	OS02T0739700-01	DEL1b	1323	441	3459	2	30918586	30922045	10
	DEL	LOC_Os06g13670.1	OS06T0245900-01	DEL1a	1275	425	5825	6	7583781	7589606	10
	DP	LOC_Os01g48700.1	OS01T0678700-01	DPa/b	882	294	3532	1	27923857	27927389	8
	DP	LOC_Os03g05760.1	BGOSGA011873	DPb1	1137	379	5468	3	2869358	2874826	9
	DP	LOC_Os10g30420.1	BGOSGA031841	DPb2	1038	346	4952	10	15741606	15746558	9
<i>Setaria italica</i>	E2F	Si017108m	SETIT_017108mg	E2Fa/b1	1407	469	4284	I	26444830	26449114	14
	E2F	Si010044m	SETIT_010044mg	E2Fa/b2	1386	462	4351	VII	33825163	33829514	14
	E2F	XM_004974947	SETIT_011009mg	E2Fc	1461	487	6429	VII	2040066	2051209	13
	DEL	Si006412m	SETIT_006412mg	DEL1a	1353	451	3024	IV	9994318	9997342	10
	DEL	Si019635m	SETIT_019635mg	DEL1c	1188	396	1885	I	37589455	37591340	9
	DP	Si036124m	SETIT_036124mg	DPb1	1152	384	4795	IX	56004148	56008943	9
	DP	Si036476m	SETIT_036476mg	DPb2	1020	340	5970	IX	18808940	18814910	9
	DP	Si003799m	SETIT_003799mg	DPa/b	708	236	3395	V	33165953	33169348	8
<i>Solanum lycopersicum</i>	E2F	Solyc01g007760	Solyc01g007760.3	E2Fa	1437	479	5103	1	1916300	1921403	14
	E2F	Solyc11g068800	Solyc11g068800.3	E2Fb	1347	449	4691	11	50504117	50508808	14
	E2F	Solyc06g074010	Solyc06g074010.3	E2Fb	1329	443	11450	6	42140223	42151673	14
	E2F	Solyc04g081350	Solyc04g081350.3	E2Fc	1191	397	6421	4	62955513	62961934	13
	DEL	Solyc03g113760	Solyc03g113760.3	DEL1	1155	385	3094	3	57871803	57874897	12
	DEL	Solyc02g087310	Solyc02g087310.3	DEL2/3	1122	374	4365	2	44330413	44334778	11
	DP	Solyc09g010670	Solyc09g010670.3	Dpa	585	195	5018	9	3990313	3995331	8
	DP	Solyc10g078430	Solyc10g078430.3	DPb	1062	354	8257	10	59571654	59579911	9

<i>Solanum tuberosum</i>	E2F	PGSC0003DMT400042347	N/A	E2Fa	1434	478	5143	1	3311893	3317036	14
	E2F	PGSC0003DMT400050515	N/A	E2Fb	1344	448	5442	11	40689908	40695350	14
	E2F	PGSC0003DMT400015188	N/A	E2Fb	1329	443	6258	6	54615550	54621808	14
	E2F	PGSC0003DMT400009682	N/A	E2Fc	1200	400	7303	4	70747783	70755086	13
	DEL	PGSC0003DMT400062861	N/A	DEL1	1158	386	4377	3	53632690	53637067	11
	DEL	PGSC0003DMT400003269	N/A	DEL2/3	1119	373	4489	2	46683704	46688193	11
	DP	PGSC0003DMT400021592	N/A	DPb	1068	356	7633	10	59228954	59236587	9
	DP	PGSC0003DMT400023036	N/A	DPa	780	260	7166	9	1924149	1931315	9
<i>Vitis vinifera</i>	E2F	VIT_08s0007g02510.t01	N/A	E2Fb	1398	466	5412	8	16621527	16626939	14
	E2F	VIT_06s0080g01110.t01	N/A	E2Fb	1338	446	9742	6	21269866	21279608	14
	E2F	VIT_18s0001g14110.t01	N/A	E2Fc	1347	449	6490	18	12151849	12158339	14
	DEL	VIT_17s0000g07630.t01	N/A	DEL1	1128	376	3408	17	8599804	8603212	11
	DEL	VIT_14s0066g02370.t01	N/A	DEL1	1116	372	5070	14	28573089	28578159	11
	DP	VIT_08s0040g01330.t01	N/A	DPb	1068	356	12349	8	12386803	12399152	10
	DP	VIT_08s0007g00170.t01	N/A	DPa	1134	378	6398	8	14541923	14548321	11
<i>Sorghum bicolor</i>	E2F	Sb04g021970.1	SORBI_3004G168300	E2Fa/b1	1269	423	3674	4	51191106	51194780	13
	E2F	Sb06g000890.1	SORBI_3006G008800	E2Fc	1050	350	3784	6	1269909	1273693	12
	E2F	Sb08g003670.1	SORBI_3008G042700	E2Fa/b2	1131	377	4313	8	4204769	4209082	13
	DEL	Sb04g028440.1	SORBI_3004G243900	DEL1c	1161	387	2774	4	58504603	58507377	10
	DEL	Sb10g008800.1	SORBI_3010G101100	DEL1a	1308	436	2947	10	9210838	9213785	9
	DP	Sb01g021000.1	SORBI_3001G237600	DPb2;1	1020	340	7363	1	24257218	24264581	9
	DP	Sb01g046810.1	SORBI_3001G501000	DPb1	1176	392	5546	1	69940535	69946081	9

	DP	Sb03g031130.1	SORBI_3003G256300	DPa/b	894	298	4495	3	59455619	59460114	8
	DP	Sb05g024630.1	SORBI_3005G189100	DPb2;2a	1002	334	6722	5	57871103	57877825	10
	DP	Sb09g000900.1	SORBI_3009G008000	DPb2;2b	879	293	7234	9	763210	770444	10
<i>Zea mays</i>	E2F	GRMZM2G041701	Zm00001d050664	E2Fa/b1;1	1386	462	4825	4	10954701 6	10955184 1	14
	E2F	AC233850.1_FGT005	N/A	E2Fa/b1;2	1437	479	3930	5	16987724 6	16988117 6	13
	E2F	GRMZM2G052515	Zm00001d023465	E2Fa/b2	1338	446	4693	10	6663939	6668632	14
	E2F	AC214168.3_FGT001	Zm00001d003755	E2Fa/b3	1101	367	9449	2	56298263	56307712	13
	E2F	GRMZM2G050590	Zm00001d004512	E2Fc	1404	468	5192	2	11322643 7	11323162 9	13
	DEL	GRMZM2G060000	Zm00001d037274	DEL1a	1278	426	2995	6	11530668 4	11530967 9	10
	DEL	GRMZM2G378665	Zm00001d017986	DEL1b	1350	450	3390	5	20584027 7	20584366 7	10
	DEL	GRMZM2G361659	Zm00001d052288	DEL1c	1332	444	3593	4	18290423 8	18290783 1	10
	DP	GRMZM2G462623	Zm00001d011597	DPa/b	852	284	5514	8	15040810 3	15041361 7	8
	DP	GRMZM2G063387	Zm00001d048412	DPb1;1	1161	387	4925	9	15294125 2	15294617 7	9
	DP	GRMZM2G086072	Zm00001d027709	DPb1;2	1158	386	7280	1	11479832	11487112	9
	DP	GRMZM2G139024	Zm00001d014132	DPb2	1023	341	37664	5	32444644	32482308	9

Tabla suplementaria S7. Información de los sitios E2F en las sondas de EMSA.

Sonda	Posición	Consenso cubierto	
		TTTSS <u>CG</u> SSa	WTTSSCSSb
pMCM3;1 -5 (Double box)	-558	TTTCC <u>CG</u> GC	TTTCCCGG
	-555	N/C	ATTGCCGG
pMCM3;1 -4	-428	N/C	TTTCCCC
pMCM3;1 -3	-233	N/C	TTTGCCCC
pMCM3;1 -2	-42	TTTC <u>GCG</u> CG	TTTCGCGC
pMCM3;1 -1	-1	TTTGG <u>CG</u> GG	TTTGGCGG
pPCNA1 -4	-195	TTTCC <u>CG</u> C	TTTCCCGC
pPCNA1 -3	-168	TTTCC <u>CG</u> C	TTTCCCGC
pPCNA1 -2	-27	TTTCC <u>CG</u> C	TTTCCCGC
pPCNA1 -1	-16	TTTC <u>GCG</u> GC	TTTCGCGG
pRPA2 -1-2-3	-72	TTTCC <u>CG</u> CG	TTTCCCGC
	-61	N/C	TTTGCCCG
	-51	N/C	TCTCCCGC
ConsTmE2F ^a	N/A	TTTCC <u>CG</u> C	
ConsE2Fmu ^a	N/A	TTCCATCC	
pCYCD3;1 ^{a,c}	-41	AGTGCTGCG	

N/C indica que no cubre el consenso.

a. Reportado por Ramírez-Parra *et al.* 2003. Dinucleótido CG necesario para la interacción con E2F se indica subrayado.

b. Consenso reportado por Vandepoele *et al.* 2005.

c. Región en *ZmCYCD3;1a* homóloga a la caja E2F en el promotor de *ZmCYCD3;1b*. La secuencia en *CycD3;1a* no cubre el consenso de E2F.

Tabla suplementaria S8. Cebadores empleados para anotar el locus ZmE2Fa/b3.

Primer	ID	Año	Secuencia 5'-3'	Amplicón (bp)	TM (°C)
Fex1	7272	2015	CGGAAGATCGTGAAGTCGCTACA	776*	62
RhAT	8458	2015	TCCGTATCCGTCCTTTCTAACT		
FhAT	7273	2015	AGTTAGAAACGGGACGGATACGGA	6236*	60

Rex2	8457	2015	TTGGTGC GTTCAGACTTTGGC		
FE2Fa/b3x	7435	2012	TGCTGAGTCAACCGGATGGAGTAT	1966*	56
RE2Fa/b3x	7436	2012	TTATGGAGCCATGCTTTGCC		
Fex1	7272	2015	CGGAAGATCGTGAAGTCGCTACA	339**	61
Rex2	8457	2015	TTGGTGC GTTCAGACTTTGGC		
FE2Fa/b3x	7435	2012	TGCTGAGTCAACCGGATGGAGTAT	820**	56
RE2Fa/b3x	7436	2012	TTATGGAGCCATGCTTTGCC		

* empleando gDNA como templado

** empleando cDNA como templado

Tabla suplementaria S9. Cebadores empleados para clonar las regiones inmunogénicas de E2F de maíz.

Primer	ID	Año	Secuencia 5'-3'	Plásmido	Amplicón (bp)	TM (°C)
Fw epitopE2F1;1	7361	2013	CACCATGTCGGGGGTCGGCAGC	pENTR-D Topo	232	60
Rv epitopE2F1;1	7362	2013	TTACCGTATGACCAGCCCCCTCCT			
Fw epitopE2FC	7363	2013	CACCATGGACGGCGCCTCCTC	pENTR-D Topo	250	61
Rv epitopE2FC	7364	2013	TTACTCCGCTGTGGCCGCCAGG			
ZmRbr1-Ct Fw	5868	2013	CACCGAAGACAAGAAGAATGCTAGTGG	pENTR-D Topo	457	60
ZmRbr1-Ct Rv	5869	2013	GGAGCACGGATCTGTGAGCTATATAC			

Anexo II

Lista de publicaciones derivadas de esta tesis

Sánchez-Camargo V. A. y Juárez-Díaz J. A. (2019) Ciclo celular durante la germinación. En: Guevara-Fefer P. (ed). *Un viaje alrededor de la semilla*. 153 pp. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Sánchez-Camargo V. A., Suárez-Espinoza C., Romero-Rodríguez S., Garza-Aguilar S. M., Stam M., García-Ramírez E., Lara-Núñez A. y Vázquez-Ramos J. M. (2020). Maize E2F transcription factors. Expression, association to promoters of S-phase genes and interaction with the RBR1 protein in chromatin during seed germination. *Plant Science*, 296, 110491.

Sánchez-Camargo V. A., Romero-Rodríguez S. y Vázquez-Ramos J. M. (2021) Non-canonical functions of the E2F/DP pathway with emphasis on plants. *Phyton*, 90(2), 307.