

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**“Análisis de la participación de los factores hTAF_n31
y hTAF_n80 en el mecanismo de activación
transcripcional mediada por el factor E2F-1”**

28 9877

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CHRISTIAN DAVID CUEVAS BENNETT

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE EFRAIN GARRIDO GUERRERO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres Alfonso y Barbara, por darme su amor, apoyo y comprensión a lo largo de mi vida y además por haberme dado la libertad de elegir mi carrera así como mi propio camino en la vida.

A mi hermano Esteban, por darme la motivación para hacer bien las cosas y desearme suerte en mis proyectos.

A mis abuelos, por confiar en que podía llegar hasta donde he llegado y por su apoyo de saber que puedo contar con ellos.

A Ingrid, por brindarme su amor y amistad durante los momentos que hemos compartido y por el apoyo que me dio cuando más lo necesitaba para salir adelante.

A Efraín, por ser asesor, maestro y amigo a lo largo de la tesis y por tenerme paciencia durante mi estancia en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia en general por la ayuda que me han brindado a lo largo de mi vida y por el apoyo que me permite continuar con mis anhelos y esperanzas.

A mis amigos, Ulrik, Armando y José quienes han estado conmigo desde la infancia y juntos hemos crecido para compartir nuestros logros sin olvidar nuestra amistad. A mis amigos de la carrera, Cuauhtémoc, Omar, Arturo, Marco Antonio y Ricardo quienes ayudaron a que la carrera no fuera solitaria ni tan pesada y por hacerme saber que puedo contar con su ayuda.

A Ingrid, cuya amistad y compañía valen mucho para mí y para decirte que cuentas conmigo al igual que cuento contigo.

A Efraín, por acceder a dirigir mi trabajo de tesis, confiar en que podía sacarla adelante y por brindarme su amistad.

A mis compañeros del laboratorio Pedro, Armando, Rubén, Cristina, Lilia y Emilio, quienes me brindaron su amistad además de enseñarme las técnicas usadas en el laboratorio que me servirían a mí posteriormente para realizar mi tesis.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Ciclo Celular	2
Puntos de Control y de Chequeo	2
Regulación de las CDK's por ciclinas y CAK	3
Regulación de los complejos ciclina-CDK por fosforilación	4
Regulación mediada por inhibidores de CDK	4
Regulación por la proteólisis de las ciclinas	4
Desregulación de los complejos ciclina-CDK en células cancerosas	5
Los puntos de control y de chequeo en la sucesión del ciclo celular	6
Inicio de síntesis del DNA	7
Actividad de los complejos ciclina tipo D-CDK	7
La familia INK4	8
El punto de chequeo G1-S	8
El punto de control de G1 a S	9
Replicación del DNA	10
El punto de chequeo en la fase G2	11
El punto de control de la fase G2 a M	11
El punto de chequeo entre la metafase y la anafase	12
La decisión de entrar a la fase S	12
La familia E2F	13
Relación entre pRB y E2F	14
Relación entre p53 y E2F	15
Regulación de E2F	17
Actividad transcripcional de E2F	18
Factores de transcripción	20

ANTECEDENTES	22
Interacción de E2F y p53 con MDM2	22
Homología entre E2F y p53	22
Interacción de p53 con hTAF _{II} 31	23
Interacción de E2F-1 con hTAF _{II} 31	23
Relación entre hTAF _{II} 31 y hTAF _{II} 80 en la transcripción	23
OBJETIVOS	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
Línea Celular C33A	26
Plásmidos	27
Preparación de bacterias competentes	27
Transformación de bacterias competentes	27
Purificación de los plásmidos	28
Cuantificación de DNA	29
Transfección por el método de CaPO ₄	29
Cosecha de las células	30
Cuantificación y normalización de las proteínas	30
Ensayo de luciferasa	30
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIÓN	51
GLOSARIO	52
BIBLIOGRAFÍA	55

RESUMEN

La proteína E2F-1 es un factor que regula diversos genes implicados en el crecimiento y en el control del ciclo celular por la presencia de sitios de unión para este factor en sus promotores. Aunque aún no es muy claro el mecanismo por el cual E2F-1 activa la transcripción, se sabe que su dominio transactivador es responsable y participa en el inicio de la síntesis del RNA asociándose con diversos factores de la maquinaria transcripcional basal. En este trabajo se demuestra que E2F-1 se asocia con los co-activadores hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80, y que dicha unión favorece la activación transcripcional. Por medio de estos resultados se puede describir un posible mecanismo de la activación transcripcional mediada por E2F-1.

INTRODUCCIÓN

Ciclo Celular

La división celular es un proceso en el cual se deben coordinar la replicación del DNA y la separación de los cromosomas para asegurar que el genoma se replique por completo, y que solo una copia sea heredada a cada célula hija correctamente. A todo este fenómeno se le conoce como el ciclo celular en donde una serie de eventos regulados dan por resultado la proliferación celular. El ciclo celular consta de una fase M (mitótica), una fase G1 (la primera brecha), la S (síntesis del DNA), la fase G2 (segunda brecha) y regresa a la fase M. Las fases entre dos mitosis (G1, S y G2) son conocidos de forma colectiva como la interfase. Las células quiescentes o en reposo, suspenden su ciclo celular después de la mitosis y poco antes de la síntesis del DNA, este estado de descanso se nombra G0 (Lodish et al., 1995).

Muchos de los eventos claves que permiten el progreso del ciclo celular son iniciados por una familia de protein-cinasas que conservan residuos de serina/treonina en su secuencia, las llamadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que se activan por medio de las ciclinas. Los complejos ciclina-CDK son modulados por otras proteincinasas, fosfatasa y por la unión específica con proteínas inhibidoras. La gran variedad de formas en que se pueden regular los complejos ciclina-CDK, permite que el ciclo celular responda tanto a señales externas de crecimiento como a internas generadas por el propio ciclo. La proliferación incontrolada de algunas células cancerosas se puede deber a defectos en el control de los complejos ciclina-CDK (Peters et al., 1997).

El cambio de una fase a otra en el ciclo celular esta regulada por los puntos de control que permiten: el compromiso de otra vuelta de síntesis del DNA (Fase M a G1), la iniciación de la replicación del DNA (fase G1 a S) y el inicio de la mitosis (fase G2 a M). Los puntos de control son regulados por los complejos ciclina-CDK permitiendo la sucesión del ciclo celular (Peters et al., 1997).

Puntos de Control y de Chequeo

Entre los puntos de control la célula es capaz de responder a condiciones adversas al arrestar su ciclo celular en varios puntos de chequeo. Bajo condiciones normales, los puntos de chequeo son silenciosos, pero señales específicas los activan deteniendo el ciclo celular, usualmente

modulado por los complejos ciclina-CDK. Los puntos de chequeo evitan fallas o daños en el DNA, la entrada a la mitosis con DNA sin replicar y el inicio de la anafase antes del alineamiento correcto de los cromosomas en el huso mitótico que causan muerte, aneuploidia o células mutantes. En organismos unicelulares, estas lesiones disminuyen la capacidad reproductora del organismo, en cambio en seres multicelulares la aneuploidia y las mutaciones pueden causar una proliferación descontrolada que origine cáncer. Las células utilizan tres mecanismos que aseguran la transmisión correcta de su información genética: mecanismos de reparación que corrigen errores espontáneos o ambientales causados al DNA y al alineamiento de los cromosomas, los mecanismos de retraso que detectan errores y arrestan el ciclo celular hasta completar la reparación e inducir la muerte a células dañadas como una forma de prevenir una progenie mutante. El término punto de chequeo se refiere al proceso de monitorear todos los eventos del ciclo celular como la replicación del DNA y la formación del huso, generando señales en respuesta a errores en estos procesos y deteniendo el ciclo celular en un punto determinado. El término también se aplica para otros controles que previenen la producción de células dañadas, que en lugar de repararlas, las destruye (Murray, 1994).

Regulación de las CDK's por ciclinas y CAK

Diferentes complejos ciclina-CDK permiten que la célula pase a través de los puntos de control más importantes del ciclo celular, en algunos está mejor definido su papel que en otros. En el caso de cdc2, es de las cinasas principales a lo largo del ciclo celular, CDK2 es necesaria para la transición de G1 a S, y para la fase S propiamente. CDK4 y CDK6 están involucradas en el punto de restricción, y CDK7 aparentemente tiene una doble acción, como una cinasa activadora de CDK (CAK) y como parte del complejo TF_H (factor transcripcional H). De forma concisa, podemos aclarar que la actividad proteincinasa de todas las CDK's es controlada de la misma manera; por la síntesis de ciclinas, por la unión con ciclinas, por la destrucción de ciclinas, por fosforilación y por la unión de inhibidores (Morgan, 1995).

La actividad de las CDK's se puede regular al controlar la cantidad de ciclina con la que se une. La mayoría de las CDK's están presentes de manera constante a lo largo del ciclo celular y deben unirse a una ciclina para ser activas. A diferencia de las CDK's, la transcripción de los genes de las ciclinas es dependiente del ciclo celular y de igual forma son degradadas en puntos precisos durante el ciclo celular (Pines, 1995). Un complejo ciclina-CDK adquiere su actividad cuando una CAK fosforila un residuo de treonina en la región conocida como vuelta T (T loop) que está conservada en las CDK's (Morgan, 1995 y Pines, 1995).

Regulación de los complejos ciclina-CDK por fosforilación y desfosforilación

Los complejos ciclina-CDK son regulados de forma negativa cuando se fosforilan los residuos en la región de unión a ATP. En el caso de cdc2 y CDK2 los residuos son tirosina 15 (Y15), un sitio de fosforilación conservado evolutivamente en todos los homólogos de cdc2, el otro es treonina 14 (T14), un sitio de fosforilación específico en células animales (Norbury, et al., 1991). Aún no se sabe con certeza si todos los complejos de ciclina-CDK son regulados por la fosforilación en T14/Y15, pero sin duda alguna es importante para la regulación de cdc2 (Peters et al., 1997). Hay indicios que muestran que después de daño en el DNA, se fosforila Y15 para regular a CDK4 y al complejo ciclinaE-CDK2 en el momento de iniciar la fase S (Terada, et al., 1995). La fosfatasa Y15 ha sido identificado en levaduras como el producto del gen cdc25. En los mamíferos hay una familia homóloga a cdc25 compuesta de al menos tres miembros, CDC25A, B y C, que actúan en diferentes etapas del ciclo celular. Se sugiere que CDC25A actúa en la transición de G1 a S, activando a ciclinaE-CDK2. De igual forma CDC25C activa al complejo ciclinaB-cdc2 en la transición de la fase G2 a M (Dunphy, 1994).

Regulación mediada por inhibidores de CDK

En células de mamífero se han descrito dos clases de proteínas que inhiben a los complejos ciclina-CDK. El primer grupo es el de las proteínas INK4, que se unen a la forma monomérica de CDK4 y CDK6. El grupo INK4 se conforma de las proteínas p15, p16, p18 y p19, de las cuales p16 está implicado como un importante supresor de tumores (Lundberg y Weinberg, 1999). La otra clase de inhibidores incluye a p21, p27 y p57, que presentan una homología significativa entre ellos en su extremo amino-terminal., que les permite unirse a una variedad de complejos ciclina-CDK. Estas proteínas a diferencia de las INK4 solo se une a los heterodímeros ciclina-CDK y se requiere más de una molécula del inhibidor para reprimir la actividad cinasa. El hecho de que el complejo ciclina-CDK puede mantener su actividad cinasa cuando solo tiene unida una proteína inhibidora le confiere un segundo papel de blanco para que otras proteínas se unan al complejo (Zhang, et al., 1994).

Regulación por la proteólisis de las ciclinas

Un aspecto llamativo sobre las ciclinas es que son destruidas a lo largo del ciclo celular, lo que consecuentemente inactiva a su CDK compañera y contribuye al progreso de una fase del ciclo celular a la siguiente. La degradación de las ciclinas involucra la proteólisis mediada por la ubiquitina que requiere de una enzima conjugada a la ubiquitina (UBC), usualmente en complejo con una ubiquitin-ligasa, para transferir a la ubiquitina al sustrato, las ciclinas son reconocidas por

ubiquitin-ligasa pero usualmente solo cuando están unidas a una CDK. Una vez que la ciclina se ha ubiquitinado, se degrada en el proteosoma 26S. Las ciclinas se pueden separar en dos tipos según como se destruyan; aquellas ciclinas cuya constitución es muy inestable y son degradadas a través del ciclo celular (ciclinas D y E), y aquellas que solo se degradan en un punto específico del ciclo celular (ciclinas A y B). Las ciclinas D y E son proteínas de muy poca duración ($t_{1/2}$ ~20min), por ello sus niveles de expresión están determinados principalmente por su tasa de transcripción. A diferencia de las ciclinas D y E, las ciclinas A y B son estables a lo largo de la mayor parte de la interfase, pero son degradadas rápidamente una vez iniciada la mitosis (Ciechanover, 1994).

Desregulación de los complejos ciclina-CDK en células cancerosas

En células cancerosas, los puntos de control y de chequeo se pueden desregular o abatir si un regulador positivo de las CDK es sobre-expresado o si se elimina un regulador negativo, casos de estas dos condiciones se han encontrado en tumores. Algunos tumores sobre-expresan cierto tipo de ciclinas, especialmente a las D. En otros tipos de tumores se han perdido proteínas inhibitoras. La regulación del ciclo celular también es esencial para los destinos alternativos de la célula (diferenciación, senescencia y meiosis). A causa de que algunos reguladores del ciclo celular tienen importancia en la diferenciación celular, su desregulación evidentemente se ve involucrado en la oncogénesis (Peters et al., 1997).

De todas las ciclinas, las de tipo D son las que actúan más como proto-oncogenes. La ciclina D1 se ubica en el cromosoma 11q 13 y originalmente se conocía como el proto-oncogén PRAD1 o BCL1. En los adenomas paratiroideos, la ciclina D1 esta sobre-expresado a causa de una inversión cromosomal inv(11) (p15;q13), tal que llega a ser controlado por los elementos regulatorios de la hormona paratiroidea localizados en el cromosoma 11p 15 (Sherr, 1993). La sobre-expresión de la ciclina D1 resulta en una lesión proliferativa porque los tumores son benignos y no invasivos. El locus de la ciclina D también se amplifica y es sobre-expresada en una amplia variedad de tumores incluyendo cáncer de mama, carcinoma faríngeo, y carcinomas de células escamosas (Sherr, 1993 y Peters et al., 1997).

Una de las formas por la cual se identificó a la ciclina A, fue como un sitio de integración del virus de hepatitis B (HBV) en un carcinoma hepatocelular. La integración se da en el primer intrón del gen, generando una proteína de fusión entre la proteína pre-S del HBV y la ciclina A, eliminando la región amino-terminal de la ciclina A en la cual se localiza el dominio que controla su

destrucción. Sin embargo aún no es claro si este evento es la causa del carcinoma y tampoco si el cambio ocasiona siempre una forma no degradable de la ciclina A (Wang, et al., 1990).

Los puntos de control y de chequeo en la sucesión del ciclo celular.

En la fase G1 la célula se decide por otra vuelta de replicación del DNA y mitosis, en lugar de otros destinos alternativos ya sea la quiescencia o la diferenciación que usualmente retiran a la célula del ciclo celular, mientras que en la fase G1 el crecimiento está acoplado a la proliferación. Es durante la fase G1 que se hace la decisión de iniciar el ciclo celular mitótico, pero es en un punto específico en el cual muchas de las influencias externas inducen a la célula a entrar al ciclo celular, y curiosamente, los componentes implicados en la regulación de esta decisión son los más cercanos involucrados en el cáncer (Lundberg y Weinberg, 1999). El momento cuando la célula se compromete a proliferar se llama el punto de restricción (R). R se define como el punto en el cual las células ya no requieren suero para continuar hacia la fase S. Se ha postulado que el punto R es regulado por complejos ciclina-CDK, tales como ciclina D o E, que son necesarias para pasar a través de R (Croy y Pardee, 1983). De manera alterna, si las señales recibidas durante este periodo no han sido propicias para el crecimiento, la célula puede regresar y reingresar en G0, la fase quiescente de la cual emergió anteriormente, o podría comprometerse a entrar a un estado de diferenciación (Lundberg y Weinberg, 1999).

Una vez que la célula decide dejar la fase G1 y entrar a S, el resto de la progresión del ciclo celular es automática y muy predecible. Para asegurarse, una serie de puntos de chequeo operan por lo restante del ciclo celular para asegurar que el programa de crecimiento y división a través de la mitosis se complete de forma adecuada. Los pasos realizados desde el principio de la fase S hasta el final de la mitosis se encuentran rígidamente programados y proceden en un tiempo pre-arreglado, al menos de que ocurra algún evento inesperado como una disrupción metabólica, daño en el DNA o fallas en el huso, que descontrolen la rutina. Por esta razón, se requieren de los puntos de chequeo que aseguran que la replicación del DNA en la fase S sea completada antes que las preparaciones para entrar a la fase M se lleven a cabo, para que, de haber daño en el genoma se arreste el ciclo celular hasta que el daño sea reparado, y que avance a través de la mitosis siendo detenido hasta que los husos se hayan ensamblado y alineado. Estos controles tienen en esencia funciones de mantenimiento para asegurar que todo el proceso se realice de manera eficiente y sin errores (Lundberg y Weinberg, 1999).

Inicio de síntesis del DNA

El factor transcripcional que está implicado en la estimulación de los genes de síntesis del DNA más cercano es E2F. El sitio consenso de unión a E2F se encuentra en muchos genes tales como el de la DNA polimerasa α , la timidina cinasa, la ribonucleótido reductasa y la dihidrofolato reductasa, al igual que en componentes del ciclo celular como son la ciclina A y ciclina E que son necesarios para la fase S (Verona, et al., 1997). Para que E2F pueda unirse al sitio consenso del promotor, debe formar un heterodímero con la proteína DP. La actividad de E2F es regulada por una familia supresora de tumores conformada por Retinoblastoma (pRB), p107 y p130 que presentan homología significativa entre sí en una región llamada el "bolsillo" ("pocket") (Weinberg, 1995).

Cuando las células entran en la fase G1, E2F-1 se libera de su asociación con pRB. Esto implica a E2F-1 en la transcripción de genes requeridos para la síntesis del DNA. Sin embargo, E2F-1 por sí solo no es suficiente para llevar la célula a la fase S. Por tanto, diferentes complejos de E2F controlan la transcripción de diferentes juegos de genes, desde aquellos necesarios para reingresar al ciclo de proliferación hasta aquellos requeridos para la síntesis del DNA (Peters et al., 1997).

Actividad de los complejos ciclina tipo D-CDK

La aparición de ciertos complejos ciclina-CDK se correlaciona con la transición a través del punto R, en particular, son los complejos ciclinaD-CDK4/CDK6 y ciclinaE-CDK2. Sin embargo, los dos tipos de ciclinas regulan diferentes aspectos de la fase G1, y es porque la actividad de las ciclinas D aparece antes que la actividad de las ciclinas E, lo que muestra una relación más cercana con F (Sherr, 1993).

Se conocen tres tipos de ciclina D, D1, D2 y D3, que muestran ser tejido específicas. La mayoría de las células contienen a la ciclina D3 y alguna otra ya sea ciclina D1 o ciclina D2 pero no a las tres. Las ciclinas D actúan como indicadores de la presencia de factores de crecimiento porque en ausencia de suero, la transcripción de ciclinas E se detiene y las anteriormente presentes, desaparecen con rapidez. Las ciclinas D tienen varias propiedades que las separa del resto de las ciclinas (ciclinas A, B1, B2 y E). Solo las ciclinas D presentan una secuencia L-X-C-X-E (leucina-cualquier aminoácido-cisteína-cualquier aminoácido-glutamato) que les permite unirse directamente a pRB (Dowdy et al., 1993). Las CDK4 y CDK6 solo se unen a la ciclina D, a diferencia de CDK2

que se puede unir a la ciclina D, ciclina A o ciclina E. Las CDKs 4 y 6 pueden unirse a la familia de proteínas inhibidoras INK4 (p15, p16, p18 y p19) (Sherr, 1993 y Peters et al., 1997).

La familia INK4

Los complejos ciclinaD-CDK son regulados negativamente por la familia de inhibidores INK4, curiosamente se ha visto que estas proteínas están desreguladas en células cancerosas. La proteína p16^{INK4A} se pierde con frecuencia en células transformadas. En ocasiones p16^{INK4A} se encuentra mutada de tal forma que se vuelve incapaz de inhibir la actividad del complejo ciclinaD-CDK (Peters et al., 1997).

No se han encontrado mutaciones tan frecuentes en los demás miembros de la familia INK4 en células transformadas. La proteína p15^{INK4B} forma parte de una ruta que causa arresto celular en respuesta al factor de crecimiento transformante β (TGF β). Una vez inducido p15^{INK4B}, bloquea la actividad de los complejos ciclinaD-CDK4/6, previniendo el avance a través del punto R en G1 medio/tardío. La ruta de TGF β está interrumpida en una variedad de tumores, en algunos no se expresan los receptores a TGF β , otros pueden expresar receptores mutantes y otros pueden expresar señales defectivas o ausentes de las proteínas *smad* que sirve de intermediario entre los receptores y los genes blanco (Lundberg y Weinberg, 1999).

El punto de chequeo G1-S

Durante la proliferación celular, es crucial que se replique el DNA sin daño alguno, porque la replicación de DNA dañado puede originar pérdida cromosomal o rearrreglo genómico. Por esta razón la célula cuenta con un punto de chequeo en la fase tardía G1, que se activa a causa del daño en el DNA. En este punto, se previene a las células de entrar a la fase S. La proteína p53 es requerida, ya que aumenta la estabilidad genética de la célula evitando la replicación del DNA dañado, esta es una de las formas en las que p53 funciona como supresor de tumores (Levine, 1997).

Un efector importante del arresto en G1 dependiente de p53 es el inhibidor de CDKs p21^{Waf1/Cip1}. Al parecer p21 es un inhibidor general de casi todos los complejos ciclina-CDK, pero su actividad es más eficiente en algunos complejos (ciclinaD-CDK4, ciclinaE-CDK2 y ciclinaA-CDK2), a diferencia de otros complejos en donde la inactivación no es tan notable (ciclinaB-cdc2). La inhibición de la actividad de las CDKs mediada por p21 es muy importante en cuanto a la progresión del ciclo celular se refiere y se cree que la ruta principal por la cual p21 regula el

crecimiento, es a través del control indirecto de la actividad de E2F (Delavaine y La Thangue, 1999). El gen de p21 tiene un sitio consenso de unión a p53 en su promotor, se activa cuando existe daño en el DNA y p53 incrementa los niveles de p21 para que pueda arrestar a la célula al inhibir a los complejos ciclinaD-CDK4 y ciclinaE-CDK2 principalmente. Altos niveles de p21 previenen a los complejos ciclina-CDK de fosforilar a la proteína pRB, la cual se mantiene hipofosforilada, por tanto se mantiene unida a E2F lo que causa el bloqueo de la transcripción de los genes regulados por E2F (Black y Azizkhan-Clifford, 1999). Una mutación en p53 le impide activar la transcripción de p21, esto explica porque el punto de chequeo G1-S es deficiente en muchas células tumorales y también explica porque hay tan poco p21 unido a los complejos ciclina-CDK en células transformadas (Levine, 1997). En p21 se han reconocido al menos dos dominios funcionales, uno de los cuales es responsable de la unión e inhibición de ciclina-CDK en el extremo amino-terminal, el otro se encuentra por la parte media del extremo carboxi-terminal que sirve para asociarse directamente con PCNA, la subunidad auxiliar de la DNA polimerasa δ (Delavaine y La Thangue, 1999).

Además de p21^{Waf1/Cip1}, hay al menos otros dos inhibidores de complejos ciclina-CDK que son p27^{KIP1} y p57^{KIP2}, las tres se relacionan por su secuencia en el dominio de unión e inhibición de ciclina-CDK. Al igual que p21, p27 es capaz de arrestar a las células en G1 aunque los niveles de p27 no aumenten por un estímulo en la transcripción, más bien p27 se encuentra de forma latente en el citoplasma a través de su asociación con un represor termolabil, que se libera por un tratamiento con TGF β o por el contacto de célula con célula. Las células transformadas usualmente no responden a la inhibición de contacto y la razón de esto puede ser por la cantidad de p27 o la forma en que se encuentra en estas células (Kato et al., 1994).

El punto de control de G1 a S

La evidencia más clara apunta a la ciclina E como el regulador primario de la iniciación de la fase S, por estudios realizados en *Drosophila* que tienen mutado el gen de la ciclina E. En estas moscas sus células se arrestan en G1 cuando sus reservas maternas de ciclina E se agotan, solo es posible inducir a las células a otra ronda de replicación del DNA por medio de la expresión ectópica de ciclina E (Knoblich et al., 1994).

La ciclinaE-CDK2 interactúa con E2F en la fase G1 tardía a través de la unión con p107. Sin embargo la cantidad de E2F que se une a ciclinaE-CDK2 es pequeña y su efecto sobre E2F aún no es claro (Peters et al., 1997).

La fase G1 puede acortarse ligeramente cuando se sobre-expresa a la ciclina E, que es una ligera evidencia corroborando que efectivamente la ciclina E puede ser determinante para la decisión de pasar de G1 a S. Sin embargo, no está claro si la actividad de la ciclinaE-CDK2 es regulada por la cantidad de ciclina y proteínas inhibitoras o si la fosforilación de Y15/T14 es también un factor significativo. La fosfatasa CDC25A aparentemente es necesaria para la entrada a la fase S, y puede activarse al fosforilarse. *In vitro*, CDC25A es un buen sustrato para la ciclinaE-CDK2 pero si puede ser su blanco *in vivo* aún no se ha confirmado. Sin embargo, hay una relación entre la presencia del complejo ciclinaE-CDK2 y CDC25A en la iniciación de la fase S (Dunphy, 1991).

Durante la fase S predomina el complejo ciclinaA-CDK2 mientras que el complejo ciclinaA-cdc2 aparece después en la fase G2. Esto indica que la ciclina A debe tener una participación importante en la replicación del DNA cuando se asocia con CDK2 y adquiere una función diferente cuando se une con cdc2 en G2 (Girard et al., 1991).

Replicación del DNA

La iniciación de la replicación del DNA es uno de los puntos del control que esta regulado con mayor cuidado en el ciclo celular. Es muy importante que las células repliquen cada parte de su genoma una vez por ciclo celular. El mecanismo por el cual una célula distingue entre DNA replicado y no replicado aún no es muy claro, pero hay información que lo conecta con el estado del origen de replicación y con cuales complejos ciclina-CDK se encuentran presentes en ese momento en la célula (Peters et al., 1997).

Se ha visto que los orígenes de replicación presentan unidos a ellos una estructura multiprotéica a lo largo del ciclo celular llamado complejo para el reconocimiento del origen (ORC). El ORC difiere entre los orígenes en G1 cuando son capaces de iniciar la síntesis del DNA pero aún no son activos, comparados con los de las fases S y G2 cuando se inicia la replicación del DNA. Esto nos habla de complejos de pre-replicación que se arman en los orígenes durante G1, que difieren en uno o más componentes comparado con aquellos que han iniciado la replicación (Liang et al., 1995).

La ruta p53-p21 proporciona un medio de arrestar células después de daño causado por rayos UV mientras se replica el DNA. Esto es porque p21 es capaz de unirse e inhibir a PCNA, que es requerido para la síntesis de la hebra guía en la replicación del DNA. Durante la reparación del

DNA después de una excisión, se requiere de PCNA que no es sensible a la inhibición mediada por p21, para que las células puedan reparar su DNA mientras que la replicación se encuentra bloqueada, esto nos podría establecer un modelo de un punto de chequeo en la fase S que involucra a p21 y a PCNA (Li et al., 1994).

El punto de chequeo en la fase G2

Algunos componentes de la maquinaria de la replicación del DNA, tal como la DNA polimerasa α y ϵ , también se cree que ayudan a generar una señal inhibitoria de la mitosis, que eventualmente desaparecerá cuando el último complejo de la replicación se desensamble una vez completada la síntesis del DNA (Navas et al., 1995). Algunos datos muestran que se puede causar arresto cuando se inhibe la fosforilación de Y15 en cdc2 por medio de una proteína inhibidora. Se piensa que esta proteína inhibidora podría ser algún miembro de la familia de p21, pero por el hecho de que ninguna de estas es muy eficiente en inhibir a la ciclinaB-cdc2, se cree que se trata de un inhibidor de cinasas mitóticas muy específico aún no identificado (Peters et al., 1997).

El punto de control de la fase G2 a M

La mitosis se inicia por la activación de una reserva de complejos ciclinaB-cdc2 que se han acumulado a lo largo de la fase G2. Hay un número de diferentes complejos ciclinaB-cdc2 en las células de mamífero, estas aparentemente actúan tanto como activadores río arriba de otras cinasas mitóticas y como cinasas internas que fosforilan a numerosos componentes del citoesqueleto para que sea posible reorganizar la estructura celular durante la mitosis (Peters et al., 1997).

Una de las principales formas de regular la actividad cinasa de la ciclinaB-cdc2 es a través la fosforilación de T14 y Y15 de cdc2. Cuando se mutan estos sitios por residuos que no son fosforilables la mitosis se desregula parcialmente cuando se introduce esta forma mutante de cdc2 en células de cultivo. Si ambos residuos se encuentran mutados la célula es incapaz de prevenir la activación de la cdc2 cinasa y causa que la célula entre en mitosis prematuramente (Peters et al., 1997). La cinasa T14 se encuentra asociada a la membrana y su actividad sobre ciclinaB-cdc2 es muy importante para su regulación. Y15 es fosforilado por *wee1* y *mik1* para mantener a la ciclinaB-cdc2 en un estado inactivo. Durante la mitosis la actividad cinasa de *wee1* y *mik1* disminuye cuando son fosforilados por diferentes protein cinasas. Al mismo tiempo que las fosfatasas T14 y Y15, CDC25C se activa al fosforilarse, lo que causa una retroalimentación positiva y cíclica entre la ciclinaB-cdc2 activa y CDC25C (Dunphy, 1994).

Las células de mamífero tienen dos tipos de ciclina B, la B1 y la B2. Se cree que puede haber otros tipos de ciclinas tipo B en mamíferos porque en nemátodos y en *Drosophila* hay ciclina B3, las ranas presentan cinco tipos de ciclina B. Los diferentes tipos de complejos ciclina B-cdc2 son activados e inactivados en el mismo punto del ciclo celular pero difieren en su localización celular lo que permite saber cual es su papel en la mitosis. La ciclina B2 es una proteína citoplásmica que se encuentra asociada casi en su totalidad al aparato de Golgi. Por ello la ciclina B2 se involucra cuando se desarma el aparato de Golgi y se inhibe el transporte de membranas durante la mitosis. La ciclina B2 se mantiene asociada con las vesículas membranales a lo largo de la mitosis, antes de ser degradada junto con las demás ciclinas B cuando las células inician la anafase. En contraste, la ciclina B1 está asociada con microtúbulos, pero en la mitosis se transporta hacia el núcleo antes del rompimiento de la envoltura nuclear. En la metafase la ciclina B1 se asocia fuertemente al aparato mitótico. La actividad cinasa de ciclina B-cdc2 cambia la estabilidad dinámica de los microtúbulos reorganizándolos para formar al huso mitótico (Peters et al., 1997).

El punto de chequeo entre la metafase y la anafase

Normalmente, una vez que los cromosomas están correctamente pareados en el plano de la metafase, la ciclina B es degradada y las células entran en la anafase. Cuando los cromosomas se alinean incorrectamente en la metafase o el huso está incompleto, se activa un punto de chequeo y las células se mantienen en metafase hasta que se repare el error. Este punto de chequeo se logra a través de la inhibición de la maquinaria proteolítica responsable de la degradación de la ciclina B que se encarga de unir a las cromátides hermanas. La alta actividad cinasa de la ciclina B-cdc2 conserva al huso y mantiene unidas a las cromátides hermanas, y por esto la célula se queda en la metafase. Una célula puede sentir los errores en el huso a través de la falta de tensión en los microtúbulos. Solo cuando todos los microtúbulos están bajo la misma tensión será cuando la célula comience la anafase. Incluso un solo cinetocoro mal alineado puede generar una señal positiva para inhibir la anafase, esto puede explicar porque las células pueden arrestarse en la metafase incluso si solo un cromosoma se retrasa al alinearse con los demás (Peters et al., 1997).

La decisión de entrar a la fase S

En las células eucariotas la decisión clave para determinar si debe o no dividirse es la decisión de entrar a la fase S. En la mayoría de los casos, una vez que la célula se compromete a entrar a la fase S, después de este punto la célula tiene que seguir su progreso a través del resto del ciclo celular hasta que complete la mitosis. Como se mencionó con anterioridad las células pueden detener el ciclo celular solo en un punto de la fase G1, el estado quiescente G0. Una vez que la célula

pasa por el punto R, se dice que la célula ha pasado por el *punto de no regreso* porque tiene que concluir el ciclo celular y no le es posible regresar a la fase G₀. Los genes que codifican para varias de las proteínas involucradas en la síntesis del DNA y desoxinucleótidos deben ser inducidos para que sea posible la transición de la fase G₁ a la S. El factor de transcripción E2F es requerido para la transcripción de algunos de estos genes (Lodish et al., 1995).

La familia E2F

E2F es un regulador transcripcional que tiene una participación fundamental en la proliferación celular, ya que muchos de los genes identificados que responden a E2F son componentes de la maquinaria de control del ciclo celular (ciclina E, ciclina A y cdc2) o relacionadas con la maquinaria de síntesis del DNA (dihidrofolato reductasa, timidina cinasa y DNA polimerasa α) (Verona et al., 1997). Estos genes presentan la secuencia TTT(C/G)(C/G)CGC en su promotor, que permite que E2F se una al DNA (Johnson y Schneider-Broussard, 1998).

Originalmente a E2F se le conoció como el Factor E2 porque se identificó como un factor celular activado por la proteína E1A y que estaba involucrado en la activación de promotor E2 del adenovirus (Lodish et al., 1995). En mamíferos, E2F es una familia conformada por seis miembros (E2F-1 a E2F-6) que pueden ser divididos en tres grupos según los dominios que presente cada una de las proteínas E2F (Cartwright et al., 1998). Todos los miembros presentan dominios de unión al DNA y de dimerización en su extremo amino-terminal, después de estos dominios le sigue una región conservada llamada la *caja marcada* la cual podría estar involucrada en la dimerización y en la unión al DNA. En todos los miembros excepto E2F-6, hay un dominio de transactivación en el extremo carboxi-terminal responsable de unirse a las proteínas supresoras de tumor relacionadas a retinoblastoma (pRB, p107 y p130). E2F-1, E2F-2 y E2F-3 difieren de E2F-4, E2F-5 y E2F-6 en que presentan un dominio amino-terminal anterior al dominio de unión al DNA que permite su asociación con la ciclina A, y E2F-6 se diferencia de los demás miembros en que carece del dominio transactivador. Los dos miembros de la familia DP (DP1 y DP2) presentan una ligera homología con E2F, especialmente en los dominios de unión al DNA y de dimerización. Por mecanismos de empalme alternativo DP2 puede presentar una extensión en su extremo carboxi-terminal, pero aún no se conoce su función (Black y Azizkhan-Clifford, 1999). Ambas proteínas DP pueden unirse a cualquiera de los seis miembros de E2F para formar heterodímeros que les permite unirse con una mayor afinidad al DNA ya que por separado la unión es muy débil y difícil de mantener (Helin, 1998, Black y Azizkhan-Clifford, 1999). La formación de heterodímeros DP con E2F también resulta en una unión sinérgica para unirse con pRB. DP es una proteína regulada durante el ciclo celular según su nivel de fosforilación. Durante la fase temprana del ciclo celular

DP se encuentra hipofosforilado a medida que progresa el ciclo celular aumenta su nivel de fosforilación lo que causa un incremento en la unión del heterodímero DP/E2F al DNA. El complejo ciclinaA-CDK2 es quien se encarga de fosforilar a DP en el transcurso del ciclo celular ya que E2F presenta su dominio de unión con la ciclina A que le permite reclutarla (Lam y La Thangue, 1994).

E2F es una proteína que se encuentra conservada evolutivamente y se encuentra en insectos al igual que en mamíferos. En las levaduras se han encontrado factores parecidos a E2F e incluso sitios de unión a E2F en el DNA (Black y Azizkhan-Clifford, 1999). En la planta del tabaco también se ha caracterizado una proteína homóloga a E2F denominada NtE2F. NtE2F presenta el dominio de unión al DNA, la *caja marcada* y el dominio de transactivación muy conservados con E2F en células de mamífero. NtE2F muestra una mayor homología con E2F-1, E2F-2 y E2F-3 que con los otros tres miembros aunque NtE2F carece de la región de unión potencial a ciclinas (Sekine et al., 1999). En *Drosophila* se han identificado dos miembros de la familia de E2F con diferentes propiedades transcripcionales: mientras que uno de estos factores activa diferentes genes, el otro los reprime (Sawado et al., 1998). En las aves al igual que otros vertebrados es posible encontrar miembros de la familia E2F pero los estudios se han enfocado principalmente a E2F-1 (Españel et al., 1998).

Relación entre pRB y E2F

La familia de inhibidores consiste de pRB y de las proteínas relacionadas p107 y p130. Los dominios conservados entre pRB, p107 y p130 se distribuyen a lo largo de las proteínas pero se encuentran principalmente en la región "pocket", consistente en su habilidad de unirse a diferentes proteínas entre las cuales está E2F y E1A. Las proteínas p107 y p130 están más relacionadas entre ellas que con pRB, debido a que presentan una región espaciadora que divide al "pocket". La región espaciadora de p107 y p130 les permite formar asociaciones estables con los complejos ciclinaA-CDK2 y ciclinaE-CDK2 (Peters et al., 1997).

Diferentes componentes del ciclo celular median la actividad de las proteínas "pocket". En el caso de pRB, presenta distintos sitios de fosforilación en residuos de serina o treonina. Las ciclinas de clase D son las que se implican más en la fosforilación de pRB, sin embargo, la ciclina A y la ciclina E también actúan sobre las proteínas "pocket" (Weinberg, 1995).

La proteína pRB se puede asociar con cada miembro de la familia E2F, excepto con E2F-5 y E2F-6, mientras que p107 se une E2F-4 exclusivamente y p130 se une tanto a E2F-4 como a E2F-5. La formación de complejos entre E2F y las proteínas "pocket" dependen del ciclo celular (Takahashi et al., 2000). Durante G0 y G1 temprano las proteínas "pocket" se encuentran hipofosforiladas y solo estas formas pueden interactuar con los miembros de la familia E2F. La unión de las proteínas "pocket" enmascara al dominio transactivador de E2F y por tanto bloquea su habilidad de activar la transcripción. Inicialmente la ciclinaA-CDK4/6 fosforila a pRB y posteriormente lo hace la ciclinaE-CDK2. Dado que estas son formas hiperfosforiladas de pRB ya no son capaces de unirse a E2F, liberándolo del complejo inhibitorio resultando en una acumulación de dímeros E2F/DP capaces de activar la transcripción en la fase media y tardía de G1 (Black y Azizkhan-Clifford, 1999). La fosforilación de las proteínas "pocket" es regulada por la actividad de los inhibidores de CDKs, que al mismo tiempo son regulados por diferentes señales de crecimiento. La inducción dependiente de p53 de p21^{WAF1/CIP1} evita que los complejos ciclina-CDK fosforilen a las proteínas "pocket", las cuales se mantienen hipofosforiladas, interactuando con E2F e inhibiendo la transcripción de los genes regulados por E2F. Otros inhibidores de CDKs que permiten que se mantenga la actividad de las proteínas "pocket" son las proteínas p16^{INK4A} y p15^{IN4B} que bloquean la acción de CDK4 y CDK6 (Lundberg y Weinberg, 1999).

El papel que tiene pRB en la regulación de la proliferación celular tiene una gran importancia por el hecho de que es blanco de los productos de genes de diferentes tipos de virus causantes de tumores. Principalmente el antígeno T grande del virus del simio 40 (SV40), el oncogen E7 del papiloma virus humano (HPV) y la proteína inmediata temprana E1A del adenovirus. Estas oncoproteínas interactúan con la región "pocket" de pRB e interrumpen su interacción con E2F, de esta forma se mantiene activa la transcripción mediada por E2F (Weinberg, 1995, Black y Azizkhan-Clifford, 1999).

Relación entre p53 y E2F

Mientras que la disfunción de pRB/ciclinaD/CDK4/p16 parece ser necesaria para la tumorigénesis, no es suficiente. La pérdida de la función de pRB usualmente lleva a la apoptosis dependiente de p53 en células con genomas dañados o mutados. Consecuentemente, mutaciones en p53 son observadas frecuentemente en conjunto con pRB (Müller y Helin, 2000). La primera evidencia de la cooperación entre p53 y pRB emergió de estudios de oncoproteínas que inactivan a ambas moléculas. La infección de las células con HPV es un caso en el que tanto p53 como pRB

quedan inactivadas. E6 es la oncoproteína de HPV que inactiva a p53 y junto con E7 que secuestra a pRB se sobreponen a la apoptosis e inducen a la generación de tumores (Lam y La Thangue, 1994).

Cuando hay una sobre-expresión de E2F tal que anula la represión que ejerce pRB, de alguna forma manda una señal que detecta p53 para que induzca a la célula a entrar a apoptosis. El mecanismo por el cual p53 monitorea los niveles de E2F aún no se conoce con claridad pero se cree que tiene que ver con la saturación de pRB con E2F y con la misma activación que induce E2F (Lam y La Thangue, 1994).

La principal función de p53 es la de actuar como un regulador negativo de la proliferación celular y de la transformación. p53 es un factor transcripcional con actividad de unión al DNA que puede activar o reprimir a los promotores. Cuando se causa daño en el DNA ocasiona que los niveles de p53 aumenten para estabilizar a la célula por medio del arresto del ciclo celular para reparar al DNA. Cuando el daño sobre el DNA sobrepasa a la habilidad de la célula para arreglarlo, es entonces cuando se inicia la apoptosis (Müller y Helin, 2000). El arresto celular mediado por p53 se da principalmente por la activación del inhibidor de CDK's p21 que se une a diferentes complejos ciclina-CDK (ciclinaD-CDK4, ciclinaE-CDK2, ciclinaA-CDK2 y ciclinaA-cdc2). Una molécula de p21 por complejo no inhibe a las CDK's, aparentemente actuando como un factor de ensamble, mientras que dos moléculas de p21 por complejo inhiben la actividad cinasa y bloquean el progreso del ciclo celular. Dos de los genes regulados por p53 que pueden influenciar la entrada a la ruta apoptótica son Bax e IGF-BP3. Bcl2 sobre-expresado puede unirse a p53 y bloquear la apoptosis. Bax se une a Bcl2 y permite que se induzca la apoptosis. Por otro lado la proteína IGF-BP3 bloquea la ruta de señalamiento del factor de crecimiento parecido a la insulina, impidiendo que se una a su receptor lo que aumenta la posibilidad de apoptosis en la célula (Levine, 1997).

MDM2 se considera una oncoproteína porque puede unirse al dominio transactivador de p53 y desregular su actividad transcripcional. La sobreexpresión de MDM2 conlleva a la degradación de p53, sin embargo p19^{ARF} puede evitar esta degradación al unirse al complejo MDM2/p53 e incluso mediar el arresto celular dependiente de p53 funcional. Mientras que p19 requiere de p53 para funcionar, p53 es independiente porque en células que carecen de p19 conservan su punto de chequeo mediado por p53 en respuesta a daño en el DNA. Curiosamente p19 aparentemente modula la actividad de p53 como parte de un punto de control en respuesta de señales oncogénicas hiperproliferativas, como se da en el caso de una sobreexpresión de E2F y ocasiona que se active la transcripción de p19 (Müller y Helin, 2000).

Regulación de E2F

La actividad de E2F está controlada por al menos seis diferentes mecanismos. Regulación de síntesis de E2F, degradación por la ruta del proteosoma, fosforilación de DP-1 por el complejo ciclinaA-CDK2 que se asocia a la pérdida de la actividad de unión al DNA, unión a las proteínas "pocket" y diferente localización subcelular (Müller y Helin, 2000).

De todos los miembros de la familia E2F, E2F-1 y E2F-4 son de las más inestables porque presentan una secuencia en su extremo carboxi-terminal que las hace blanco para la degradación mediada por el proteosoma. Sin embargo, la unión con las proteínas "pocket" estabiliza tanto a E2F-1 como E2F-4, alterando su vida media desde ~2hrs hasta >8hrs. Aparentemente la estabilización causada por las proteínas "pocket" se debe a que cuando se unen a E2F enmascaran el dominio de desestabilización. La unión de E2F con MDM2 aumenta las posibilidades de que E2F sea degradado de una forma similar como sucede con p53 (Black y Azizkhan-Clifford, 1999).

Como se mencionó anteriormente, E2F-1, E2F-2 y E2F-3 contienen un dominio que permite su unión con la ciclina A, lo que permite que la CDK2 asociada a la ciclina A desregule a E2F al fosforilar a DP-1. Esto da por resultado una inhibición de la actividad de unión al DNA posiblemente a causa de una desestabilización del heterodímero E2F/DP (Johnson y Schneider-Broussard, 1998).

Todas las proteínas "pocket" pueden regular la proliferación celular a través de su habilidad de asociarse con los factores E2F. La unión con las proteínas "pocket" inhibe la actividad transcripcional de E2F, porque bloquea su dominio transactivador y en algunos casos convierte a E2F en represores durante G₀ y G₁ temprano (Johnson y Schneider-Broussard, 1998). En G₁ medio, pRB es fosforilado en primera instancia por el complejo ciclinaD-CDK4/6 y después por el complejo ciclinaE-CDK2. Dado que estas formas hiperfosforiladas de pRB no pueden mantener su unión con E2F; E2F se libera del complejo inhibitor, resultando en una acumulación de E2F libre y conlleva a la activación de genes con sitios E2F en su promotor durante la fase G₁ media-tardía. La interacción de p107 y p130 con E2F es regulada de forma similar (Black y Azizkhan-Clifford, 1999). La presencia de los complejos E2F con las proteínas "pocket" varía a medida que la célula entra, atraviesa y sale del ciclo celular. En células quiescentes la mayor parte de la actividad de unión de E2F al DNA contiene a p130. Cuando las células entran al ciclo celular, el complejo p130 se pierde durante G₁ media a tardía. En la transición de la fase G₁ a la S se pueden detectar complejos p107-E2F-4 que a su vez pueden contener también a complejos ciclina A o E asociadas a

la CDK? Las ciclinas y CDK2 en estos complejos interactúan de forma indirecta con E2F-4 al unirse de manera estable al dominio espaciador de p107 (Johnson y Schneider-Broussard, 1998). La función de estos complejos p107-E2F-4-ciclinaA/E-CDK2 aún no es claro y es posible que no estén asociados directamente a la transcripción dado que se han encontrado en el citoplasma y se ha propuesto que están involucrados en la inhibición de la actividad cinasa asociada a ciclinas (Verona et al., 1997).

La localización subcelular de los diferentes miembros E2F está regulada de una forma dependiente al ciclo celular. Mientras que E2F-1, E2F-2 y E2F-3 son aparentemente exclusivos del núcleo, una porción significativa de E2F-4 y E2F-5 está presente en el citoplasma. En G0 y G1 temprano, E2F-4 y E2F-5 se encuentran en el núcleo al igual que en el citoplasma, sin embargo, en otras fases del ciclo celular son aparentemente exclusivos del citoplasma. Las diferencias en la localización nuclear son explicadas por la presencia de una señal de localización nuclear en el extremo amino-terminal de E2F-1, E2F-2 y E2F-3 pero que se encuentra ausente en E2F-4 y E2F-5. Se sugiere que la asociación de E2F-4 y E2F-5 con p107 y p130 podría ser la causa de su redistribución. También se ha revelado que la mayoría de los complejos E2F-p107 y E2F-p130 se encuentran en el citoplasma mientras que los complejos E2F-pRB son exclusivos del núcleo, lo que indica que la localización subcelular de E2F también depende en parte con cual proteína "pocket" se unió. La regulación de E2F por medio de la localización subcelular ofrece un sistema complementario dado que en el caso de E2F-1, E2F-2 y E2F-3, su interacción con los promotores es inhibida mediante su fosforilación por el complejo ciclinaA-CDK2, mientras que para E2F-4 y E2F-5 su regulación está dada por su secuestro hacia el citoplasma (Verona et al., 1997).

Todos los procesos regulatorios de E2F antes descritos participan en el control de la expresión de E2F dado que la transcripción de todos los miembros de la familia E2F depende de los sitios E2F en su promotor (Lam y La Thangue, 1994).

Actividad transcripcional de E2F

De manera general, se cree que las combinaciones específicas de los heterodímeros E2F/DP y las proteínas pRB pueden regular diferentes juegos de genes. Varios trabajos muestran a E2F-4 juega un papel prominente en la represión transcripcional de múltiples promotores durante G0 y G1 temprano. Más tarde en la fase G1 y en la fase S, E2F-1, E2F-2 y E2F-3 se unen a la mayoría de los promotores involucrados en la transición a la fase S y aquellos necesarios para la síntesis del DNA (Takahashi et al., 2000).

Está claro que la asociación de las proteínas "pocket" con los factores E2F no resulta únicamente en un complejo inactivo. Más bien, los complejos E2F-pRB, E2F-p107 y E2F-p130 pueden funcionar como represores transcripcionales activos (Johnson y Schneider-Broussard, 1998). La represión mediada por las proteínas "pocket" se logra por al menos dos mecanismos. La primera actividad represora de las proteínas "pocket" se debe a que pueden interactuar físicamente con la desacetilasa de histonas HDAC1. La HDAC1 fortalece la interacción entre el DNA con carga negativa y las histonas con carga positiva, de esta forma promoviendo la formación del nucleosoma que suprime la transcripción (Müller y Helin, 2000). El segundo mecanismo involucra a los factores transcripcionales PU.1 y NFκB que interactúan con pRB para bloquear la interacción de los factores de transcripción entre ellos E2F con los componentes de la maquinaria basal transcripcional (Black y Azizkhan-Clifford, 1999).

La razón por la cual E2F-4 funciona como represor en ciertos promotores durante G0 y G1 temprano se debe principalmente a su fuerte unión al promotor durante estas fases, lo cual ocasiona que los genes se encuentren transcripcionalmente silenciosos. Además durante G1 tardío y S, E2F-4 ya no se encuentra unido a los promotores cuando se induce la transcripción (Takahashi et al., 2000). Este comportamiento de E2F-4 también se relacionan con el hecho de que E2F-4 se localiza principalmente en el núcleo durante G0 y G1 temprano y que migra hacia el citoplasma en la fase S (Verona et al., 1997). Se sugiere que durante G0 y G1, E2F-4 se localiza en el núcleo en donde es capaz de unirse a los promotores y reclutar a p130. La unión de E2F-4-p130 con los promotores resulta en la represión a causa de las histona-desacetilasas (Takahashi et al., 2000).

A medida que la célula entra a G1 medio-tardío, E2F-4 rápidamente es reemplazado por E2F-1, E2F-2 y E2F-3. Esto se debe a que estas proteínas, particularmente E2F-1 y E2F-3 tienen un papel fundamental en la activación de la transcripción de diferentes genes durante la transición de la fase G1 a la S. Después de hacer estas observaciones es posible establecer un modelo de la actividad de E2F. Cuando pRB es fosforilado por los complejos ciclina-CDK se generan las formas libres de E2F (E2F-1, E2F-2 y E2F-3) que van a empezar a sustituir a los complejos E2F-4-p130 para poder activar la transcripción de los genes antes reprimidos (Takahashi et al., 2000).

E2F-6 como se mencionó anteriormente, difiere de los demás miembros E2F porque carece de los dominios de transactivación, unión a las proteínas "pocket" y unión a ciclina A. En otras regiones comparte homología significativa con las demás proteínas E2F principalmente en los dominios de dimerización y el de unión al DNA. Sin embargo, E2F-6 aparentemente contiene un

dominio represor de la transcripción localizado en el extremo carboxi-terminal. Aunque el mecanismo por el cual E2F-6 actúa no está bien establecido, se sabe que puede inhibir la activación de genes dependientes de E2F-1 a través de la competencia por el promotor. Dado que E2F-6 carece de los dominios que permiten la regulación del resto de las proteínas E2F, se sugiere que deben ser diferentes los mecanismos por los que se controlan los niveles de E2F-6 (Cartwright et al., 1998).

El dominio de transactivación de E2F es blanco para la represión mediada por pRB. Un análisis detallado de la estructura y función de este dominio indica que pRB se une a la secuencia que es esencial para la función activadora de E2F. Una mutación que afecta la unión de E2F con pRB, también ocasiona un decremento en la activación transcripcional de E2F. El hecho de que los residuos requeridos para la unión con la proteína de unión con la caja TATA (TBP) sean requeridos para la activación transcripcional mediada por E2F-1, sugiere la relevancia de esta interacción en el mecanismo. Sin embargo, se sabe que TBP no es suficiente para la transcripción, porque en un estudio se mostró que cuando el dominio transactivador de E2F presentaba diferentes mutaciones puntuales que no afectaban su unión con TBP, sí tenían efecto sobre la transactivación. Esto deja abierta la posibilidad de que E2F puede asociarse con otras proteínas involucradas en la transcripción como podría ser el TFIID en general o diferentes factores asociados a TBP (TAF's) específicos (Hagemeier et al., 1993).

Factores de transcripción

La holoenzima Pol II es un complejo pre-ensamblado que se compone de la enzima RNA polimerasa II y de varios factores de transcripción: TFIID, TFIIA, TFIIIB, TFIIIE, TFIIF, TFIIH y TFIIV. Entre estos, solo TFIID es capaz de unirse de forma sitio específica al DNA y se compone de la proteína TBP y entre ocho y diez TAF's (Lu y Levine, 1995). TBP es una proteína que reconoce y se une a la caja TATA, que es una secuencia específica de DNA localizada en el promotor de muchos genes eucariotas (Chang y Jaehning, 1997) y tiene un papel importante en la transcripción porque TBP ayuda a que la RNA polimerasa se acomode en el lugar correcto con respecto al sitio de inicio de síntesis del RNA mensajero (Struhl y Moqtaderi, 1998). Los TAF's son proteínas coactivadoras de la transcripción cuyo peso molecular varía desde los 20 hasta 250 Kd y ayudan a orientar y estabilizar a la maquinaria transcripcional basal (Albright y Tjian, 2000).

Los coactivadores TAF al igual que TBP son proteínas que se encuentran conservadas evolutivamente pero los que presentan mayor homología con los TAF's de las células de mamíferos son los TAF's de las levaduras y los de *Drosophila*. En las células de *Drosophila* fue en donde se

notó que tres de sus TAFs (dTAF_{II}40/42, dTAF_{II}60/62 y dTAF_{II}30α) tenían homología con las histonas H3, H4 y H2B (Hahn, 1998). Posteriormente se identificó en levaduras que el yTAF_{II}17 tenía homología con la histona H3, yTAF_{II}60 con H4 y yTAF_{II}68/62 con H2B. Finalmente se reportó que en las células de mamífero también existen TAF's con dominios similares a las histonas, que son hTAF_{II}31 homólogo a H3, hTAF_{II}80 homólogo a H4 y hTAF_{II}20 homólogo a H2B (Albright y Tjian, 2000). Los TAF's parecidos a las histonas H3-H4 forman una estructura tetramérica muy similar a la observada en el nucleosoma. Por esta razón se ha propuesto que la estructura ensamblada por los TAF's parecidos a las histonas H3 y H4 se pueden unir al TAF similar a H2B y en conjunto formar una estructura parecida al nucleosoma dentro del factor transcripcional TFIID (Berk, 1999).

ANTECEDENTES

Interacción de E2F y p53 con MDM2

MDM2 es una proteína celular que inhibe la actividad de p53 al unirse a su dominio amino-terminal y bloquear su actividad transcripcional. En condiciones normales p53 induce la transcripción del gen *mdm2*, por lo que la interacción entre p53 y MDM2 forma un ciclo de realimentación negativa en el cual ambos componentes limitan la actividad del uno al otro. En varios tipos de tumores MDM2 se encuentra amplificado, adquiriendo una capacidad oncogénica por enmascarar por completo la activación transcripcional de p53 (Martin et al., 1995).

La proteína MDM2 también puede establecer un contacto funcional con E2F, al unirse con su dominio de activación en su extremo carboxi-terminal. Sin embargo, a diferencia de su actividad represora sobre la actividad de p53, MDM2 estimula la capacidad de E2F para activar a otras proteínas (Martin et al., 1995). El mecanismo por el cual MDM2 estimula la actividad de E2F aún no es muy claro. Considerando que MDM2 tiene un dominio que activa la transcripción en las levaduras, se especula que MDM2 actúa como un co-activador para el dominio de activación de E2F. Sin embargo, también se cree que MDM2 pueda de alguna forma afectar las interacciones de E2F con otras proteínas que tengan influencia con su capacidad transactivadora (Black y Azizkhan-Clifford, 1999).

Homología entre E2F y p53

E2F y p53 pueden interactuar uno con el otro y esta interacción es capaz de inhibir la función transactivadora de ambos factores. La inhibición es mediada, al menos en parte, a través de la unión del extremo carboxi-terminal de E2F con el extremo amino-terminal de p53 (Black y Azizkhan-Clifford, 1999). Curiosamente, el dominio transactivador de E2F y el de p53 tienen un cierto grado de conservación (26% de identidad), que en ambos casos se sobrelapa con la región necesaria para unirse con MDM2. El péptido TFSGWLW (treonina, fenilalanina, serina, glicina, leucina y triptófano) es esencial para la unión con MDM2 y está particularmente bien conservado en E2F. La similitud de secuencia también se extiende a lo largo de la región de E2F y p53 necesaria para unirse a TBP, lo que indica que el parecido observado refleja la conservación de sitios para interactuar con otras proteínas (Martin et al., 1995).

Interacción de p53 con hTAF_{II}31

La proteína p53 activa la transcripción de genes blanco al unirse a una secuencia específica en el DNA e interactúa con la maquinaria transcripcional de la RNA polimerasa II. El dominio amino-terminal de p53 interactúa con hTAF_{II}31 uno de los componentes del complejo basal transcripcional TFIID. Este TAF ha sido identificado como una proteína crítica requerida para la activación mediada por p53. Se ha demostrado que hTAF_{II}31 interactúa con el dominio transactivador de p53. En solución p53 y hTAF_{II}31 se asocian e inmunoprecipitan cuando se utilizan anticuerpos monoclonales anti-p53. Cuando se mutan los residuos 14/19 o 22/23 del extremo amino-terminal de p53, se interrumpe la asociación con hTAF_{II}31 en solución. Estas mismas mutaciones reducen o eliminan la habilidad de p53 para actuar como un factor transcripcional. Se sabe que estas mutaciones no afectan a p53 en cuanto a su unión con el DNA y tampoco alteran su conformación estructural. Cabe mencionar que las mismas mutaciones que causan que p53 no se asocie con hTAF_{II}31, son las mismas responsables de que la proteína MDM2 no se pueda unir a p53 (Lu y Levine, 1995).

Interacción de E2F-1 con hTAF_{II}31

Dado que E2F activa diversos genes al unirse a un sitio consenso en el promotor al igual que lo hace p53, se cree que el mecanismo por el cual E2F recluta a la maquinaria basal transcripcional debe ser muy parecido al de p53 dada la homología que presentan ambos en su dominio transactivador (Martin et al., 1995). Se asume que el dominio transactivador de E2F-1 interactúa con al menos uno de los factores que componen al TFIID. Resultados no publicados obtenidos por el grupo dirigido por el Dr Weinmann, muestran que E2F-1 puede asociarse a hTAF_{II}31.

Relación entre hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 en la transcripción

Como se sabe TFIID es un factor de transcripción general que se une de forma estable a la caja TATA, sirviendo de pilar para que se una la RNA polimerasa II ensamblando así a un complejo de preiniciación funcional. Se compone de TBP y de ocho a diez TAF's (Albright y Tjian, 2000). La activación transcripcional requiere de los factores de transcripción y de varios coactivadores, lo que sugiere que deben haber diferentes asociaciones entre estas proteínas. Las interacciones que se conocen hasta el momento son las TAF-TAF que son necesarias para ensamblar al TFIID y las interacciones TAF-activador que se cree son importantes para activar la transcripción. Se sabe que hTAF_{II}80 presenta un dominio en su extremo amino-terminal que le permite unirse a hTAF_{II}20 y a hTAF_{II}31. Estos tres TAF's forman parte del TFIID y posiblemente juegan un papel crucial en la

activación de la transcripción. Esto sugiere que un TAF por sí solo no es capaz de inducir a la transcripción sino que es necesaria la participación conjunta de varios TAF's para poder activar a genes blanco (Hisatake, 1995).

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la participación de los factores hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 en la activación transcripcional inducida por el factor E2F-1.

Objetivos Particulares

- Estandarizar las condiciones de transfección para establecer la concentración de E2F-1 que induzca una mejor activación sobre su promotor.
- Analizar la interacción funcional entre E2F-1 y hTAF_{II}31.
- Analizar la interacción funcional entre E2F-1 y hTAF_{II}80.
- Evaluar el comportamiento conjunto de hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 con E2F-1.

activación de la transcripción. Esto sugiere que un TAF por sí solo no es capaz de inducir a la transcripción sino que es necesaria la participación conjunta de varios TAF's para poder activar a genes blanco (Hisatake, 1995).

OBJETIVOS

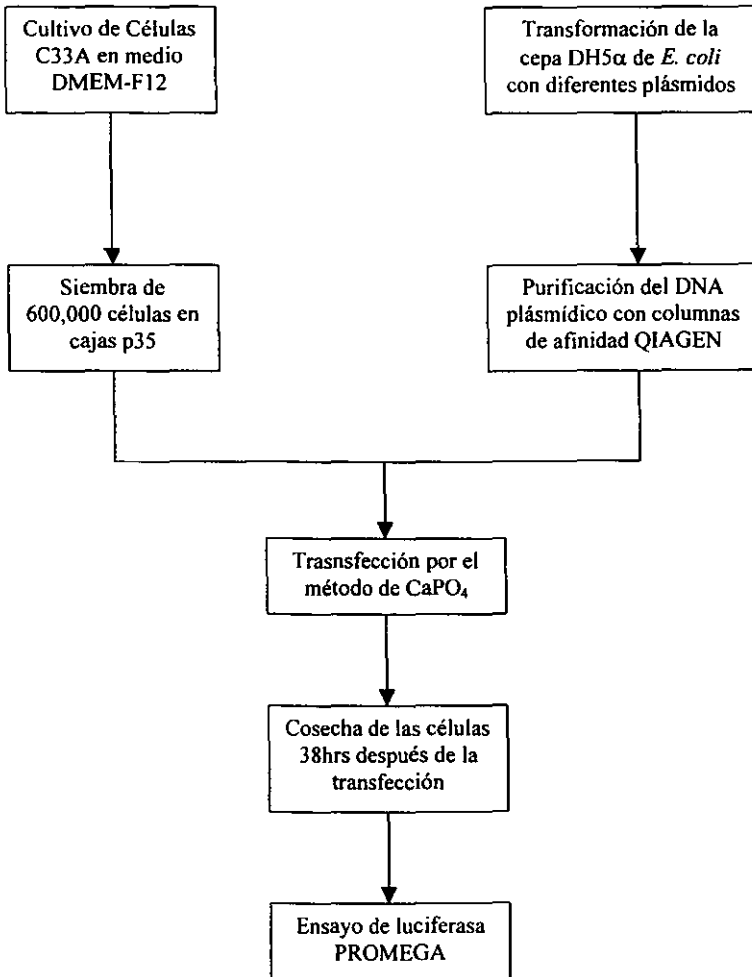
Objetivo General

Analizar la participación de los factores hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 en la activación transcripcional inducida por el factor E2F-1.

Objetivos Particulares

- Estandarizar las condiciones de transfección para establecer la concentración de E2F-1 que induzca una mejor activación sobre su promotor.
- Analizar la interacción funcional entre E2F-1 y hTAF_{II}31.
- Analizar la interacción funcional entre E2F-1 y hTAF_{II}80.
- Evaluar el comportamiento conjunto de hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 con E2F-1.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Línea Celular C33A

La línea C33A fue obtenida a partir de una biopsia de un carcinoma cervical, extraída de una mujer caucásica de 66 años de edad. La línea exhibe una morfología epitelial, presenta un crecimiento adherente formando una monocapa. Inicialmente, las células tienen un cariotipo hipohaploide, es decir que no todos sus cromosomas tienen su par correspondiente, y se ha observado que después de un cierto número de pasajes las células adquieren una inestabilidad cariotípica, por lo que se recomienda no utilizarlas después de pasajes altos (entre 90 y 100). C33A expresa al gen Rb, pero su proteína es de tamaño anormal; la expresión de p53 es elevada pero tiene una mutación puntual en el codón 273 que resulta en la sustitución de un aminoácido arginina por una cisteína. La presencia de DNA y RNA del virus de papiloma humano (HPV) es negativa en C33A (ATCC, 2000).

Las células C33A se crecen en cajas de cultivo p100 (100mm de diámetro, Corning) con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco y medio de cultivo F12 (DMEM-F12, Gibco-BRL) en una proporción 1:1, suplementado con antibióticos (penicilina 50U/ml y estreptomicina 100µg/ml), glutamina 2mM y suero de bovino neonato al 10% (NCS, Equitec).

El pasaje de las células C33A se realiza cuando la monocapa alcanza una confluencia del 90-100%, para ello se retira el medio y se lava la monocapa dos veces con 2ml de buffer de fosfatos salino (PBS; NaCl 137mM, KCl 3mM, Na₂PO₄ 2mM, y KH₂PO₄ 2mM a un pH de 7.4). Después de los lavados con PBS, se adiciona 1ml de tripsina 1x (diluida con PBS, Gibco) y se incuba de 3 a 5 min a 37°C, una vez transcurrido el tiempo, se le dan ligeros golpes a la caja de cultivo para facilitar la separación de las células. La tripsina se neutraliza con 4ml de medio de cultivo y se pasan las células a un tubo cónico de 15ml (Falcon) y se centrifugan a 1000rpm durante 3min. Se elimina el sobrenadante con vacío, se le agrega a la pastilla de células 5ml de PBS, se resuspende y se vuelve a centrifugar a 1000rpm durante 3min. Nuevamente se elimina el sobrenadante, las células se resuspenden en 5ml de DMEM-F12, se siembran a una proporción 1:5 en una caja p100 nueva con 10ml de medio de cultivo y se incuban a 37°C. Se recomienda cambiar el medio de cultivo de dos a tres veces por semana.

Plásmidos

Los plásmidos que serán utilizados son: pE2F-Luc que presenta en su promotor cuatro sitios para la unión de E2F-1 (TTTCGCGC), seguido del gen reportero de luciferasa. El plásmido pCMVE2F que codifica para la proteína E2F-1. Los plásmidos pCEP4TAF31 y pCFTAF80 que expresan a hTAF_{II}31 y a hTAF_{II}80. Y el plásmido pG4E2F que da origen a una proteína quimérica, donde el dominio amino-terminal es de la proteína Gal4 y el dominio carboxi-terminal es de E2F-1.

Preparación de bacterias competentes

La cepa DH5 α de la bacteria *Escherichia coli* es la que más se utiliza para mantener a los plásmidos. Antes de la transformación de las bacterias con algún plásmido, es necesario darle a las bacterias un tratamiento con iones de Ca⁺⁺ ó Mg⁺⁺ que las haga permeables y permita la entrada del DNA. Las bacterias se precultivan a 37°C durante la noche en medio SOB (Bacto-triptona 2%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.05% a un pH de 7.5) y en agitación constante a 200rpm. Posteriormente se inoculan 500 μ l del precultivo a 50ml de medio SOB en presencia de MgSO₄ 10mM, se vuelve a incubar a 37°C y en agitación constante hasta que las bacterias alcancen una densidad óptica de 0.5 a 550nm. Se transfiere el cultivo a tubos cónicos de 15ml y se refrigeran durante 10min. Se empastillan las bacterias a 2500rpm durante 12min a 4°C y se elimina totalmente el sobrenadante. Se resuspende la pastilla en 10ml del buffer RF1 (KAc 30mM, RbCl₂ 100mM, CaCl₂ 10mM, MnCl₂ 50mM y glicerol 15% a un pH de 5.8) y se incuba en hielo por 15min. Las bacterias se vuelven a centrifugar a 2500rpm durante 12min a 4°C, se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 4ml del buffer RF2 (MOPS 10mM, CaCl₂ 75mM, RbCl₂ 10mM y glicerol 15% a un pH de 5.0). Se incuba en hielo por 15min, se hacen alícuotas de 200 μ l en tubos eppendorf y se almacenan a -80°C (Maniatis et al., 1989).

Transformación de bacterias competentes

Las alícuotas de las bacterias competentes se sacan de -80°C y se dejan en hielo hasta que se descongele la suspensión celular. A los 200 μ l de bacterias se le adicionan de 1 a 10 μ g del plásmido, tratando de no agregar un volumen mayor a 20 μ l y se mezcla con cuidado. Se incuba en hielo durante 20min e inmediatamente después se les da a las bacterias un choque térmico a 42°C por 90seg. Se regresan las bacterias al hielo y se incuban por 2min. Después se adicionan 800 μ l de medio SOC (medio SOB suplementado con MgSO₄ 10mM y glucosa 20%) y se agita suavemente. Las bacterias se incuban a 37°C en agitación constante durante 45min. Una vez transcurrido el tiempo se siembran 50 μ l de las bacterias en una caja con agar-Luria que tenga el antibiótico

correspondiente (en el caso de los plásmidos mencionados anteriormente todos presentan el gen de resistencia a Ampicilina) y se incuban a 37°C durante la noche (Maniatis et al., 1989).

Purificación de los plásmidos

Con un asa de siembra se pica una colonia aislada de la caja de cultivo con las bacterias transformadas con algún plásmido, se cultiva en 5ml de medio Luria líquido con Ampicilina 100µg/ml para usarse como precultivo y se incuban a 37°C en agitación moderada durante 12hrs. Se toman 150µl del precultivo para sembrarlos en 100ml de medio Luria líquido con ampicilina 100µg/ml y se cultiva de 14 a 16hrs a 37°C en agitación constante (Maniatis et al., 1989).

Una vez transcurrido el tiempo, las bacterias se empastillan a 5000rpm por 10min a 4°C, se elimina por completo el sobrenadante y se resuspende la pastilla en 10ml del buffer P1 (Buffer de resuspensión; Tris-Cl 50mM, EDTA 10mM y RNasa A 100µg/ml a un pH de 8.0) sin dejar agregados de bacteria, después se agregan 10ml del buffer P2 (Buffer de lisis; NaOH 200mM y SDS 1%), se mezcla por inversión del tubo 4 o 6 veces con mucho cuidado y se incuban a temperatura ambiente (TA) por 5min, el pH alcalino que tiene el buffer sirve para desnaturalizar al DNA cromosomal de las bacterias sin que afecte al plásmido. Se neutraliza al buffer P2 con 10ml del buffer P3 enfriado (Buffer para neutralizar; Acetato de potasio 3.0M a un pH de 5.0), se mezcla completamente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces gentilmente y se incuban en hielo por 20min, durante este proceso se renaturaliza al DNA cromosomal, debido a la alta concentración del acetato de potasio el DNA se agrega formando una red insoluble, de igual forma causa la precipitación de los complejos proteína-SDS y del RNA de alto peso molecular degradado por la RNasa A. De esta forma la mayor parte de las tres macromoléculas contaminantes son co-precipitadas y fácilmente removidas cuando la muestra se centrifuga a 13000rpm durante 30min a 4°C para empastillarlas, de ser necesario se pasa el sobrenadante a un tubo limpio y se vuelve a centrifugar a las mismas condiciones para asegurar que se eliminan todos los desechos (Birnboim y Doly, 1979, Qiagen, 1999).

La columna de intercambio de aniones QIAGEN-tip 500 se equilibra con 10ml del buffer QBT (Buffer para equilibrar; NaCl 750mM, MOPS 50mM, isopropanol 15% y Triton X-100 0.15% a un pH de 7.0), no se debe permitir que la columna se seque. Una vez libre de desechos el sobrenadante con el plásmido se carga en la columna y se permite que drene por gravedad. Se lava la columna dos veces con 30ml del buffer OC (Buffer de lavado; NaCl 1.0M, MOPS 50mM c isopropanol 15% a un pH de 7.0), después se separa al plásmido de la columna con 15ml del buffer

QF (Buffer para eluir; NaCl 1.25mM, Tris-Cl 50mM e isopropanol 15% a un pH de 8.5) y se colecta el reflujo en un tubo limpio. El DNA se precipita con 10.5ml de alcohol isopropilico, se mezcla completamente y se centrifuga a 12rpm por 30min a 4°C. Se lava el DNA con 5ml de alcohol etílico al 70% y se centrifuga a 12000rpm por 15min a 4°C. La pastilla de DNA se seca y se resuspende en 600µl de agua bidestilada desionizada y estéril y se deja toda la noche. Se colecta el DNA en un tubo de microfuga limpio, se etiqueta y se almacena a 4°C (Qiagen, *plasmid hand book*, 1999).

Cuantificación de DNA

Para saber a que concentración se encuentra el plásmido que se aisló, se toman 5µl del plásmido y se diluye en 450µl de agua bidestilada desionizada y estéril. La lectura a 260nm permite calcular la concentración del ácido nucleico en la muestra. Una densidad óptica de "1" corresponde aproximadamente a 50µg/ml de DNA de doble cadena. Dado que no siempre se tiene una D.O. de uno, se calcula la concentración del plásmido usando la formula:

$$\frac{\text{Densidad óptica} \times 50 \times \text{factor de dilución}}{1000}$$

El rango de lectura entre las lecturas a 260nm y 280nm (D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Una preparación pura de DNA tiene un valor D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ de entre 1.8 y 2.0 (Maniatis et al., 1989).

Transfección por el método de CaPO₄

Para el ensayo se cuentan las células con una cámara de Neubauer y se siembran 600,000 células C33A en cajas de cultivo p35 (35mm de diámetro) de 24 a 26hrs antes de la transfección. El medio de cultivo de las células se debe de cambiar al menos una hora antes de que se realice la transfección, con el propósito de que el medio tenga un pH neutro que no interfiera con la precipitación de los cristales de CaPO₄. Se hace una mezcla del DNA usando el o los plásmidos que se quieran transfectar, se usa DNA de esperma de salmón por dos razones; la primera de ellas es para ajustar la concentración de DNA para que cada ensayo tenga la misma cantidad y segundo el DNA de esperma de salmón sirve como acarreador para facilitar la entrada de los plásmidos a la célula. La mezcla de DNA debe llevar CaCl₂ a una concentración final de 125mM y el resto de la solución se lleva a 125µl usando agua bidestilada desionizada y estéril. La solución del DNA se agrega al HeBs 2x (NaCl 275mM, KCl 10mM, Na₂HPO₄ 1.4mM dextrosa 10mM y Hepes 50mM a un pH de 7.05) muy despacio, adicionando una gota por gota y en constante agitación para asegurar que ambas se homogenicen adecuadamente (Van Der Eb y Graham, 1980).

El CaCl_2 causa la formación de precipitados de CaPO_4 por la presencia de iones fosfatos en el HeBs 2x. Los plásmidos y el DNA acarreador co-precipitan con el CaPO_4 , un proceso que se puede acrecentar incubando la solución por un minuto a 37°C , porque los precipitados consisten de un gran número de partículas muy pequeñas que cubren casi por completo la superficie de células individuales (Jordan et al., 1996). Dado que el CaPO_4 es tóxico para las células el exceso debe de ser eliminado, por ello de 12 a 14hrs después de la transfección a las células se les remueve el medio y se le dan dos lavados con PBS y se les adiciona medio fresco.

Cosecha de las células

Las células se cosechan antes de que transcurran 40hrs post-transfección para lo cual se le elimina el medio de cultivo y se lava dos veces la monocapa con PBS, se adicionan $175\mu\text{l}$ del buffer de lisis 1x (Promega) y se incuban a TA durante 15min y en agitación constante. El buffer de lisis no siempre desprende a todas las células de la caja y es necesario usar un fragmento de hule limpio para raspar el resto de la monocapa. Se toman $170\mu\text{l}$ del lisado dado que es un volumen pequeño, parte del buffer de lisis se evapora y no se recuperan los $175\mu\text{l}$ exactos. El volumen se pasa a un tubo de microfuga limpio, se agita ligeramente con vortex y se congela en hielo seco por 5min. El lisado se saca del hielo seco y se deja descongelar a TA, se agita ligeramente con vortex y se centrifuga a 12000rpm durante 5min a 4°C . Se recuperan $125\mu\text{l}$ del sobrenadante y se pasan a un tubo limpio.

Cuantificación y normalización de las proteínas

Se toman $5\mu\text{l}$ del extracto celular y se le agregan $45\mu\text{l}$ de agua bidestilada desionizada y estéril, después se le agregan $450\mu\text{l}$ del reactivo de Bradford 1x (azul brillante de Coomassie G-250 0.01%, etanol 4.7% y ácido fosfórico, Sigma), se mezcla bien la solución y se lee a 595nm . Cada ensayo se debe normalizar para asegurar que todos tengan la misma concentración, todas las densidades ópticas se dividen entre la densidad óptica menor (ft), el resultado se multiplica por 90 para después restarle 90 y el resultado (fx) son los μl que se tienen que agregar al extracto para que tenga la misma concentración que el extracto con la densidad óptica menor. La formula es la siguiente; $\text{D.O. mayor}/\text{D.O. menor} = \text{ft} \times 90 - 90 = \text{fx}$ (Maniatis et al., 1989).

Ensayo de luciferasa

Los genes reporteros se usan ampliamente en la biología celular y molecular para el estudio de las funciones de los genes y los eventos celulares relacionados. El gen que codifica para la

Luciferasa de la luciérnaga ha probado ser altamente eficiente para este propósito porque la actividad de la enzima es extremadamente sensible, rápida y sencillo de realizar. La luciferasa es una proteína monomérica (61kDa) que no requiere de procesamiento post-traducciona para su actividad enzimática y por ello puede funcionar como un reportero genético inmediatamente después de la traducción. La oxidación de la luciferina es catalizada por la luciferasa que lleva a la producción de un fotón. Bajo condiciones convencionales de reacción, la oxidación ocurre desde un intermediario de la enzima luciferil-AMP. Sin embargo la Coenzima A (CoA) también es un sustrato de la luciferasa. Por ello, en presencia de CoA, la oxidación ocurre en la forma de luciferil-CoA en lugar de luciferil-AMP con una actividad más favorable (Wood, 1990).

El ensayo de luciferasa se realiza en una placa blanca de 96 pozos, en cada pozo donde se va realizar una reacción se agregan 30µl del buffer de lisis 1x y 40µl del extracto de proteína normalizado. Se monta la placa en un luminómetro (Labsystems), se le adicionan 50µl del reactivo de luciferasa (luciferil-CoA, Promega) y se deja que el aparato haga las lecturas de la luminiscencia y los valores se registran en unidades relativas de luminiscencia (RLU).

RESULTADOS

La proteína E2F-1 es homóloga de p53 dado que su dominio transactivador presenta una conservación de secuencia cercana al 26%. Esta homología se observa en una región esencial para que tanto p53 como E2F-1 se puedan asociar con MDM2. La similitud en la secuencia también se extiende a las regiones de unión con TBP y pRB, sin embargo la conservación de la secuencia no es tan notoria en estas regiones (Fig. 1).

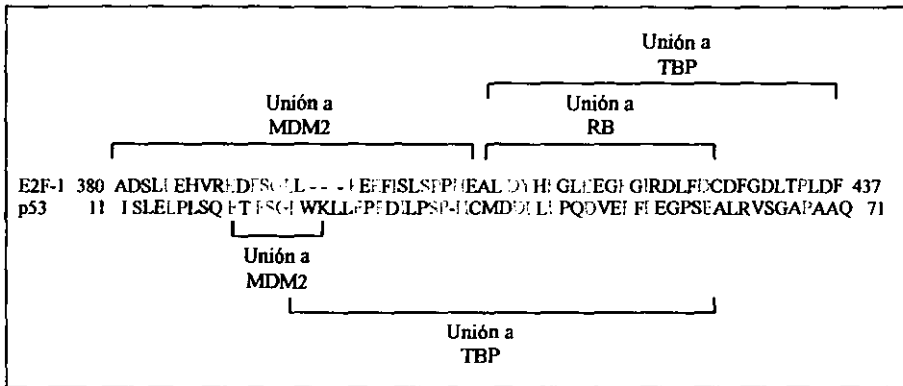


Fig. 1 Similitud de secuencia entre los dominios de activación de E2F-1 y p53. Los residuos homólogos están marcados en gris. Las líneas horizontales indican las regiones de E2F-1 requeridas para la unión con RB, TBP y MDM2 y las regiones de p53 necesarias para su asociación con MDM2 y TBP (Martin et al., 1995).

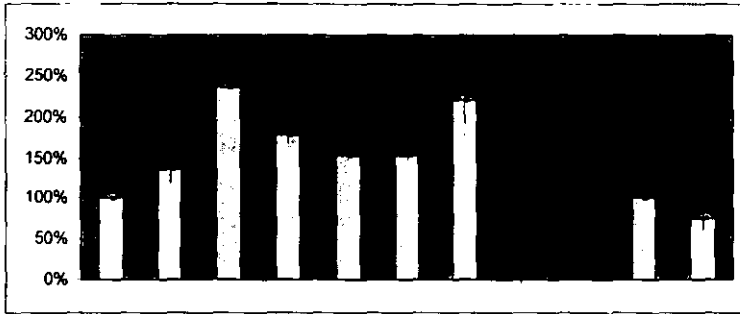
La proteína p53 interactúa con algunos factores de la maquinaria transcripcional basal conocidos como hTAF_n31 y hTAF_n80 para poder llevar a cabo su función de activador transcripcional. Se ha demostrado que algunas de estas interacciones involucran la región que conserva homología con la región transactivadora de E2F-1. Estas observaciones, permitieron generar la hipótesis de la posible interacción de E2F-1, con los mismos factores de la maquinaria transcripcional basal que utiliza p53 para activar la transcripción.

De esta manera, se inició la búsqueda de la posible interacción de E2F-1 con el factor hTAF_n31. Las proteínas E2F-1 y hTAF_n31, interactúan con una eficiencia comparable a aquella con la que lo hacen E2F-1 y pRB. Aunque el heterodímero E2F-1/DP1 también se asocia a hTAF_n31, esta unión es aparentemente menos eficiente que la unión con E2F-1 por sí solo (Fig. 1A y 1B).

copias del artículo). También se determinó que DPI no contribuye a la unión con hTAF_{II}31 porque cuando E2F-1 y DPI se usaron por separado para interactuar con hTAF_{II}31, la asociación sólo ocurrió en el caso de E2F-1.

La unión entre E2F-1 y hTAF_{II}31 es más estable que la unión entre p53 y hTAF_{II}31, ya que tratando los complejos E2F-1/ hTAF_{II}31 y p53/ hTAF_{II}31 con diferentes concentraciones de NaCl, el análisis por Western Blot mostró que a una concentración de 1.0M de NaCl, E2F-1 se mantiene unido con hTAF_{II}31, mientras que p53 comienza a disociarse de hTAF_{II}31 a una concentración 0.6M de NaCl.

El factor E2F-1 activa un promotor que contiene sitios de unión para este factor regulando al gen de la luciferasa (plásmido pE2F-Luc). Los resultados de las transfecciones indican la actividad del gen reportero por medio de la emisión de luz generada cuando reacciona la luciferasa con su sustrato luciferil-CoA. Dependiendo de su actividad será mayor o menor la emisión de luz. Dado que pE2F-Luc tiene un promotor artificial con cuatro sitios E2F, se debía demostrar que el plásmido pCMVE2F que expresa a la proteína E2F-1, era capaz de activar al gen reportero cuando se une a su promotor. Además, era necesario conocer la concentración óptima de E2F-1 que indujera la mejor activación del plásmido con la menor variación entre un ensayo y otro. Para analizar la actividad de ambos elementos se transfectó 1µg del plásmido pE2F-Luc para establecer la actividad basal del mismo. Posteriormente se adicionaron diferentes concentraciones de E2F-1 (desde 12.5ng hasta 500ng) y se observó que 25ng de E2F-1 no solo inducía una mayor actividad sino que además era constante su efecto sobre la actividad del gen reportero (Fig. 2). Después de obtener estos resultados, las demás transfecciones se realizaron usando 1µg del plásmido pE2F-Luc (actividad basal) y 25ng de E2F-1 (segunda basal). En otro ensayo se utilizó el plásmido pE2FM-Luc que tiene mutados los sitios E2F en el promotor, estas mutaciones son responsables de que E2F-1 no sea capaz de unirse al DNA y por ello tampoco pueda activar la transcripción (Fig. 2). Cabe mencionar que aunque la actividad basal de ambos plásmidos tanto pE2F-Luc y pE2FM-Luc está representado en porcentaje de activación, la actividad de pE2FM-Luc en unidades relativas de luminiscencia es de 20 a 30 veces menor que la actividad de pE2F-Luc.



E2F-Luc 1µg	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E2FM-Luc 1µg	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CMVE2F	-	12.5ng	25ng	50ng	100ng	250ng	500ng	-	25ng

Fig. 2 pCMVE2F activa la transcripción del promotor E2F-Luc pero no al plásmido E2FM-Luc. Se muestran diferentes concentraciones de E2F-1 donde 25ng inducen la mayor activación con una variación menor entre ensayos. En otro ensayo se transfectó al plásmido pE2FM-Luc que tiene mutados los sitios E2F, donde se observa que dichos sitios son necesarios para la activación mediada por E2F-1.

E2F-1 se une a hTAF_{II}31. Tomando en cuenta que hTAF_{II}31 se asocia a p53 y que dicha interacción es necesaria para la activación mediada por p53, se cree que hTAF_{II}31 pudiera asociarse de forma semejante con E2F-1. El siguiente resultado permitió establecer el efecto de hTAF_{II}31 sobre la actividad transcripcional de E2F-1. Al igual que en el ensayo anterior, primero se transfectó pE2F-Luc por si solo, después se le agregó E2F-1 y finalmente se adicionaron diferentes concentraciones de hTAF_{II}31 (desde 12.5ng hasta 100ng). Los resultados de este ensayo muestran que 25ng de hTAF_{II}31 causan un ligero incremento en la actividad del gen reportero. Sin embargo, al aumentar la concentración de hTAF_{II}31 la actividad disminuye gradualmente (Fig. 3).

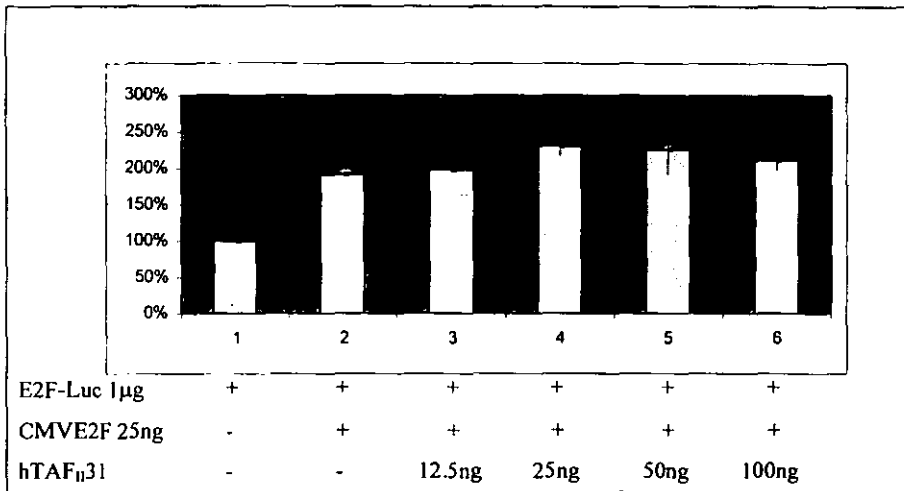


Fig. 3 hTAF_{II}31 coopera en la activación mediada por E2F-1. Al agregar diferentes concentraciones de hTAF_{II}31 es posible observar que la actividad del promotor tiene un ligero incremento con 25ng de hTAF_{II}31; sin embargo este fenómeno no es dosis-dependiente porque al aumentar la concentración de hTAF_{II}31 la actividad del promotor regresa a la activación inducida únicamente por E2F-1.

E2F-1 se asocia con hTAF_{II}80. Siendo TAF80 una proteína que también presenta homología con las histonas al igual que hTAF_{II}31, se decidió probar la posible interacción con hTAF_{II}80 y determinar el efecto que tiene esta asociación sobre la actividad de E2F-1. El ensayo se realizó igual que con hTAF_{II}31 y los resultados mostraron que hTAF_{II}80 interactúa con E2F-1 de forma similar que hTAF_{II}31 porque 25ng de hTAF_{II}80 también causan un ligero incremento en la actividad y cuando se aumenta su concentración, la actividad disminuye hasta alcanzar la actividad que induce solo E2F-1 sobre el gen reportero (Fig. 4). Después de obtener estos resultados se

decidió usar también 25ng de hTAF_{II}31 ó 25ng de hTAF_{II}80 cuando en el ensayo se requiriera una concentración constante de uno o del otro.

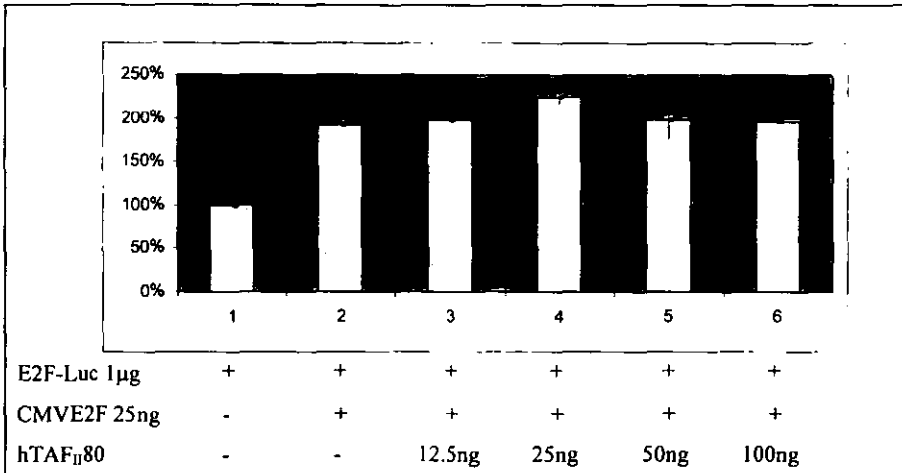


Fig.4 hTAF_{II}80 también coopera con E2F-1 en la activación transcripcional del promotor. De igual forma que hTAF_{II}31, 25ng de hTAF_{II}80 aumentan ligeramente la transcripción del gen reportero mediado por E2F-1.

El extremo carboxi-terminal de E2F-1 es responsable de la unión con hTAF_{II}31. Al transfectar E2F-1 y hTAF_{II}31 junto con pG4E2F, el cual expresa una proteína quimérica que consta del extremo amino-terminal de Gal 4 y del extremo carboxi-terminal de E2F-1, se observó que el extremo carboxi-terminal de E2F es la región involucrada en la interacción con TAF31. Aunque G4E2F puede asociarse con los factores de transcripción por presentar el extremo carboxilo de E2F-1, no es capaz de unirse al DNA y tampoco le es posible activar la transcripción. Por esta razón G4E2F compete con E2F-1 por hTAF_{II}31. El resultado de este ensayo muestra que hTAF_{II}31 se une al extremo carboxi-terminal de E2F-1 porque al aumentar la concentración de G4E2F tiende a suprimir la activación inducida por la cooperación de E2F-1 y hTAF_{II}31 (Fig. 5). hTAF_{II}80 también interactúa con el extremo carboxilo de E2F-1, porque al realizar un ensayo similar al anterior pero sustituyendo a hTAF_{II}31 por hTAF_{II}80 también se observó que G4E2F compete con E2F-1 por hTAF_{II}80 de forma similar a como sucede con hTAF_{II}31. Otra aportación que nos brinda este resultado es que G4E2F secuestra a hTAF_{II}80 por completo desde el primer momento que se introduce al sistema. La rapidez con la que actúa G4E2F indica que la afinidad que tiene E2F-1 por hTAF_{II}80 es menor que la que presenta por hTAF_{II}31 dado que en el ensayo anterior se requiere de

una mayor concentración de G4E2F en el sistema para que pueda secuestrar por completo a hTAF_{II}31 (Fig. 5).

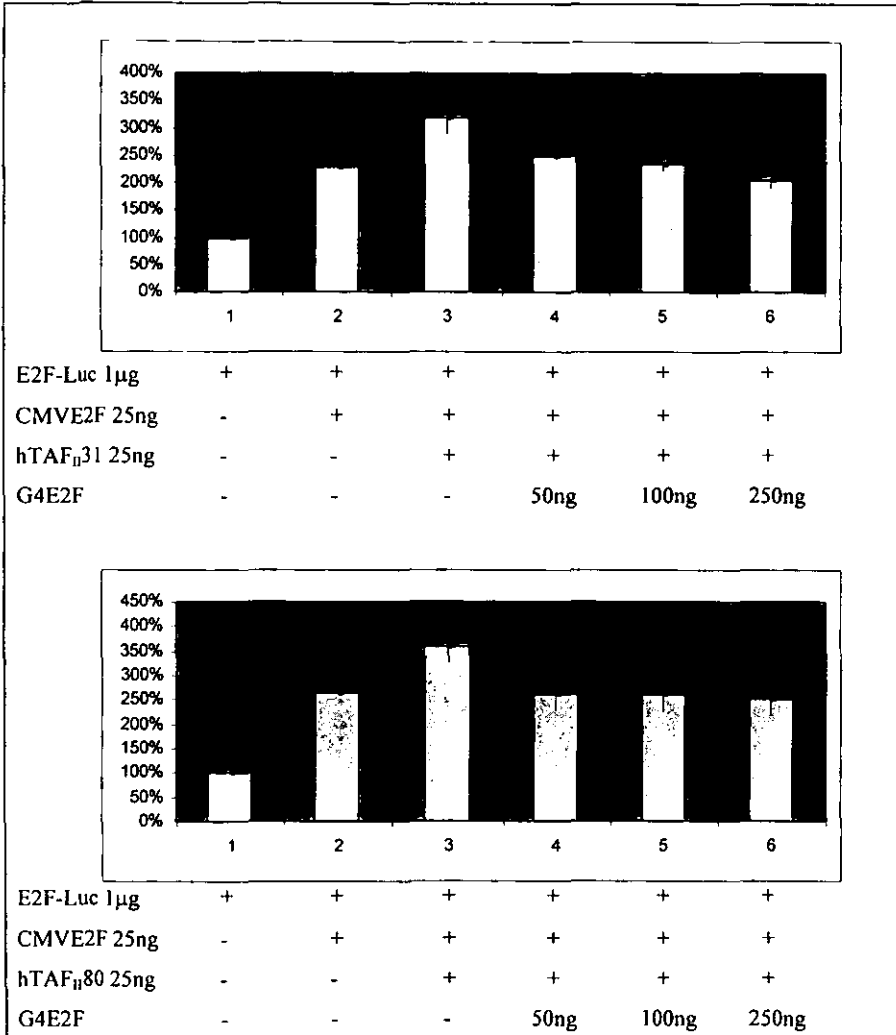


Fig. 5 El extremo carboxi-terminal de E2F-1 es responsable de la asociación con hTAF_{II}31 y con hTAF_{II}80. G4E2F compete con E2F-1 por los TAF's. En la gráfica superior se observa que G4E2F secuestra a hTAF_{II}31, por lo que la actividad del promotor tiende a reducirse. En la gráfica inferior es posible apreciar que no es necesario utilizar altas concentraciones de G4E2F para secuestrar a hTAF_{II}80, lo que sugiere que la afinidad de E2F-1 por hTAF_{II}80 es menor que por hTAF_{II}31.

hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 participan en conjunto durante la activación transcripcional mediada por E2F-1. Manteniendo constante la concentración de uno de los TAF's y variando la concentración del otro, pudo observarse la participación conjunta de ambos factores en la regulación mediada por E2F. En el primer ensayo se transfectaron 25ng de hTAF_{II}80 y se adicionaron concentraciones crecientes de hTAF_{II}31 (desde 12.5ng hasta 250ng). Lo interesante de este resultado fue que la actividad del gen reportero aumentó de forma dependiente a la concentración de hTAF_{II}31 lo que nos indica una cooperación de ambos TAF's en la actividad de E2F-1 (Fig. 6).

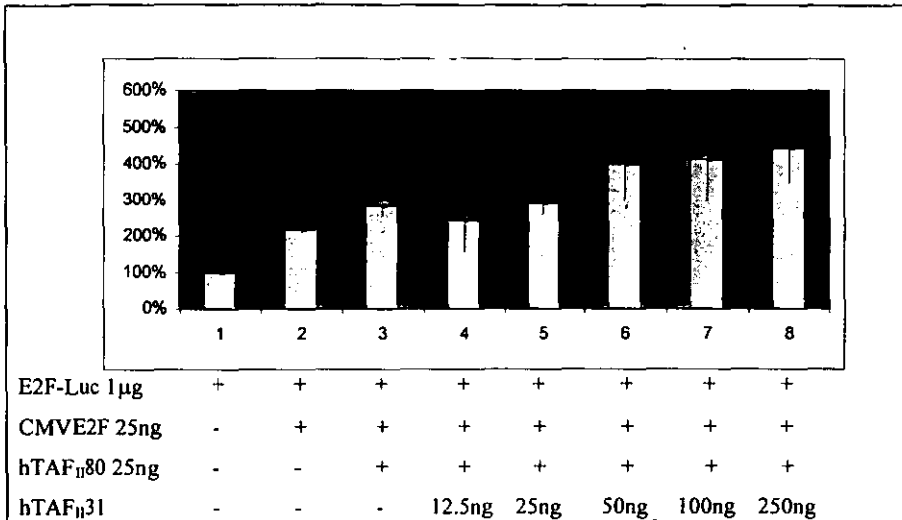


Fig. 6 hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 participan en la activación transcripcional del promotor mediada por E2F-1. hTAF_{II}80 incrementa ligeramente la actividad del gen reportero, al agregar a hTAF_{II}31 al sistema la actividad del promotor aumenta de forma dependiente a la concentración de hTAF_{II}31. Esto indica que se requieren ambos TAF's en el mecanismo de activación transcripcional mediado por E2F-1.

En bajas concentraciones hTAF_{II}80 participa en la activación transcripcional mediada por E2F-1 junto con hTAF_{II}31; en concentraciones mayores hTAF_{II}80 compete con E2F-1 por hTAF_{II}31. Este ensayo se hizo de forma inversa al anterior, hTAF_{II}31 se mantuvo constante y las concentraciones de hTAF_{II}80 se maneja a concentraciones crecientes. Inicialmente se esperaba un efecto de activación similar al anterior dado que hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 por separado se comportan de forma muy parecida cuando actúan junto con E2F-1. Sin embargo, cuando se variaron las concentraciones de hTAF_{II}80 se presentó un efecto de incremento hasta una concentración dada, después de la cual la actividad decae hasta llegar a la segunda basal (Fig. 7). Este comportamiento observado sugiere que hTAF_{II}80 puede estar compitiendo con E2F-1 por hTAF_{II}31 o tal vez después de cierta concentración, hTAF_{II}80 este saturando el sistema y por eso disminuye la actividad.

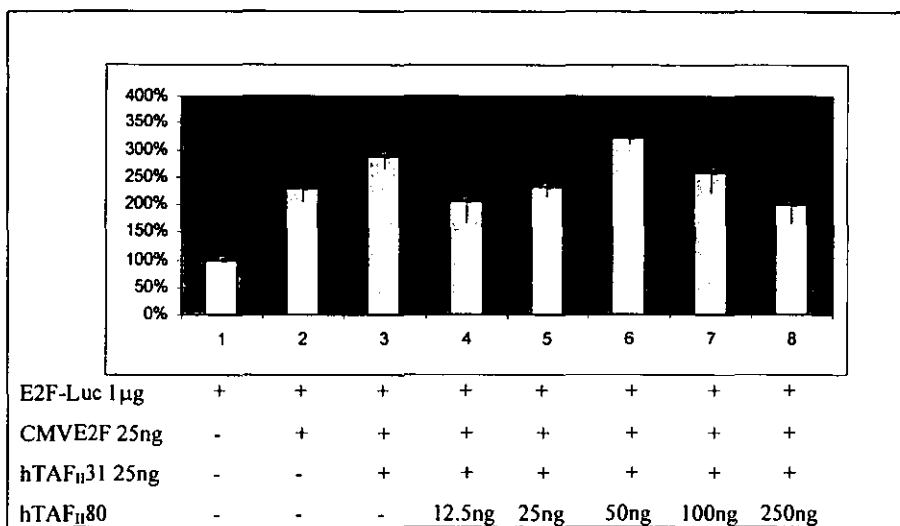


Fig. 7 Un exceso de hTAF_{II}80 compete con E2F-1 por hTAF_{II}31. La actividad de hTAF_{II}80 tiene un comportamiento activador hasta cierta concentración, en esta figura se muestra que 50ng de hTAF_{II}80 inducen una mayor actividad a la que provoca hTAF_{II}31. Al aumentar la concentración de hTAF_{II}80 la actividad del promotor se reduce debido a este aumento lo cual sugiere que altas concentraciones de hTAF_{II}80 secuestran a hTAF_{II}31 del sistema.

El extremo carboxi-terminal de E2F-1 se asocia al heterodímero formado por hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80. En este experimento se usaron concentraciones fijas de ambos TAF's (concentraciones cercanas al punto máximo de activación) para inducir la activación del promotor, para después agregar diferentes concentraciones del competidor G4E2F (250ng, 500ng y 1µg). Los resultados mostraron que al igual que en los ensayos de competencia anteriores, G4E2F compete con E2F-1 por el heterodímero hTAF_{II}31/ hTAF_{II}80 (Fig. 8).

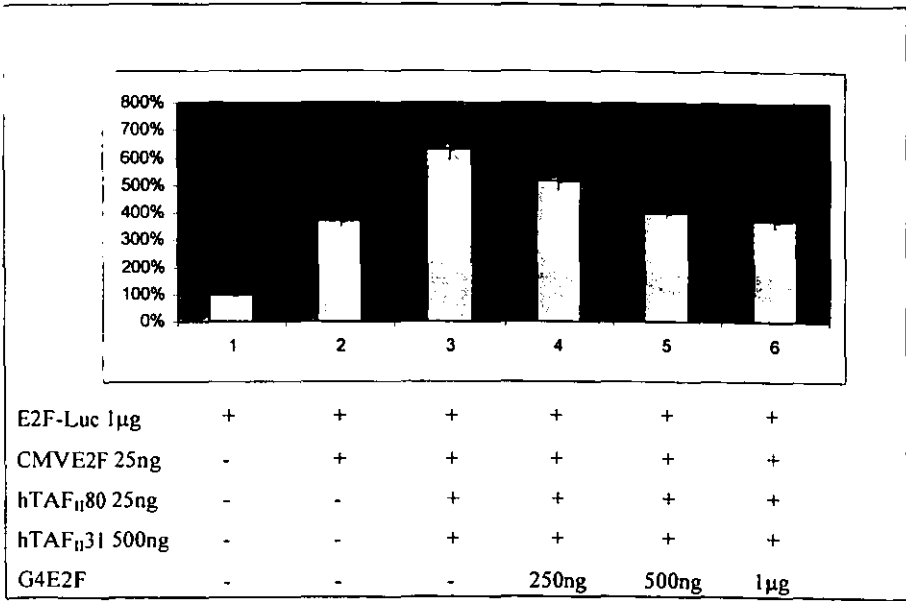


Fig. 8 El extremo carboxi-terminal de E2F-1 está involucrado en la unión con el heterodímero hTAF_{II}31/ hTAF_{II}80. En el momento en que se agrega al plásmido G4E2F, la actividad del gen reportero disminuye, cuando se duplica la concentración de G4E2F, la actividad vuelve a caer hasta llegar al nivel de activación inducido únicamente por E2F-1. Se observa que al volver a duplicar la concentración de G4E2F la actividad del gen reportero se mantiene, lo que puede significar que al transfectar a hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 se está generando un factor transcripcional capaz de iniciar la síntesis de RNA.

La activación del plásmido pE2F-Luc se debe a la interacción de E2F-1 con hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80. Para poder corroborar que la activación de E2F-Luc por E2F se debe a la interacción con los TAF's, se realizó un ensayo de transfección usando los parámetros en los cuales se obtenía un efecto de activación pero sustituyendo a pE2F-Luc por pE2FM-Luc. Dado que E2F-1 no se puede unir al promotor de este plásmido, trae como consecuencia que no se exprese el gen de la luciferasa. Los resultados de este ensayo nos muestran que efectivamente E2F-1 y los TAF's son necesarios para la actividad de la luciferasa dado que los valores están por debajo de la actividad basal (Fig. 9).

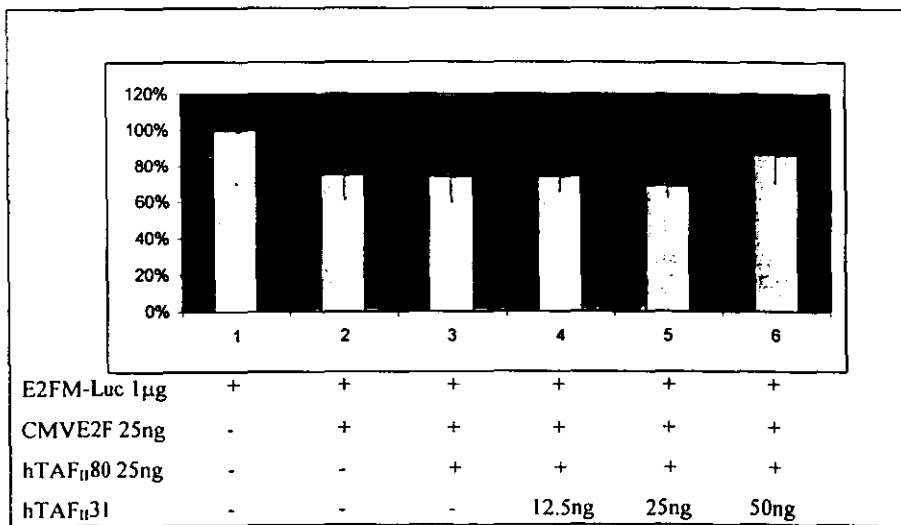


Fig. 9 La presencia del sitio E2F-1 es necesaria para la activación mediada por E2F y los TAF's. Este experimento sirve de control para mostrar que los resultados de los ensayos anteriores son dependientes de la presencia de sitios E2F-1 y de su asociación con los TAF's. En esta figura se observa que aún cuando están presentes todos los elementos necesarios para la activación del promotor, si E2F-1 no puede acarrear a los TAF's hacia el DNA y mantenerlos ahí no se iniciará la síntesis del RNA.

DISCUSIÓN

Existe una variedad de genes celulares que poseen en sus promotores sitios de unión para el factor E2F-1, como son los genes de las ciclinas A y E, el de la *cdc2*, el de B-myb, el de la dihidrofolato reductasa, el de la timidina cinasa, el de la DNA polimerasa α , e incluso el propio E2F-1 (Verona et al., 1997). Sin embargo, todos estos promotores además de poseer sitios de unión a E2F, contienen también secuencias para la unión de muchos otros factores reguladores de la transcripción (Lu y Levine, 1995 y Takahashi et al., 2000). Cuando se desea disectar el mecanismo de regulación de un factor transcripcional, si se utiliza un promotor complejo, existe una elevada probabilidad de que el efecto de todos estos factores pueda enmascarar la actividad de regulación de nuestro factor de interés (E2F-1, en nuestro caso). Por esta razón para el presente trabajo se decidió utilizar un promotor en el que de manera artificial se insertaron cuatro sitios de unión para el factor E2F-1 (TTTCGCGC), con la certeza de que el único regulador transcripcional que actuará sobre la construcción E2F-Luc será E2F-1 (Helin et al., 1993). Por otra parte, también se usó el plásmido pE2FM-Luc como control para asegurar que la activación del gen reportero se debía a la unión de E2F al promotor. El plásmido pE2FM-Luc tiene mutados los sitios E2F en donde se sustituyen dos nucleótidos (TTTCGCGC). Este cambio de bases provoca que E2F-1 no reconozca este sitio en el promotor y por tanto no sucede la activación transcripcional del mismo (Helin et al, 1993).

La actividad basal del promotor se obtiene introduciendo únicamente al plásmido pE2F-Luc a la célula. Se sabe que el plásmido se está transcribiendo y traduciendo porque es posible medir la actividad del gen reportero. Esta actividad se debe a que existen niveles endógenos de E2F-1, y que el factor reconoce los sitios E2F en el promotor, y una vez unido el factor recluta a la maquinaria basal transcripcional de la célula para iniciar la síntesis del RNA (Fig. 10).

El término segunda basal se aplica cuando se adiciona al sistema un plásmido que posee el cDNA para el factor E2F-1, permitiendo así la expresión de E2F-1. De esta forma, la actividad transcripcional del plásmido pE2F-Luc será regulada por los niveles endógenos (expresado normalmente por la célula) y del E2F-1 exógeno (aportados por el plásmido de expresión de E2F), razón por la cual la actividad del promotor se verá incrementada (Fig. 11). La activación del promotor no tiene un comportamiento dependiente de la cantidad del plásmido de expresión de E2F-1 que se transfecta. Ya que en la célula muchos de los genes con sitios E2F en sus promotores son reguladores del crecimiento y del ciclo celular y un exceso de E2F-1 puede desregular estos procesos y a su vez activar mecanismos alternativos para impedir que se ocasionen daños

irreparables en la célula (Black y Azizkhan-Clifford, 1999). Se sabe también que un exceso de E2F-1 es una señal interna de la célula que dispara la apoptosis dependiente de p53 (Verona, et al., 1997).

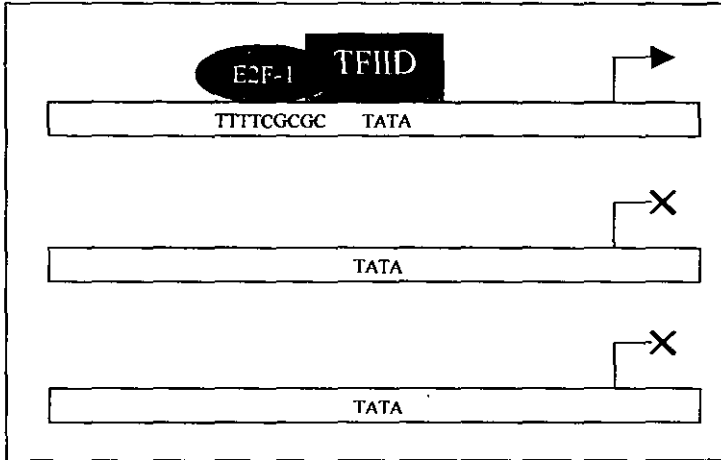


Fig. 10 Actividad basal del promotor. Aquí se esquematiza la forma en que las concentraciones endógenas de E2F-1 se unen para activar al promotor E2F-Luc.

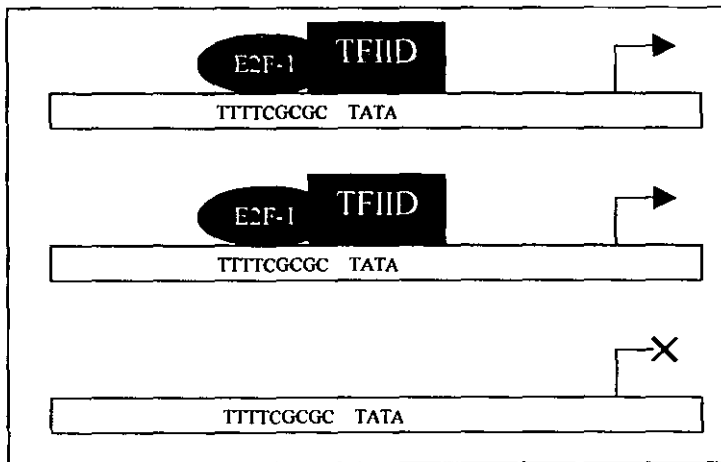


Fig. 11 Segunda Basal. La actividad del gen reportero aumenta al introducir E2F-1 exógeno a la célula que también activa al promotor.

Varias líneas de evidencias demuestran que hTAF_{II}31 interactúa con el dominio transactivador de p53 (Lu y Levine, 1995). Similitudes presentes en la región transactivadora de E2F-1 permitieron predecir la posible asociación entre hTAF_{II}31 y E2F-1. Ensayos *in vitro*

brindaron evidencias suficientes sobre la interacción física entre E2F-1 y hTAF_n31, mostrando además que dicho complejo es estable aun en presencia de altas concentraciones de NaCl (Garrido, et al., artículo en preparación). Los experimentos realizados en este trabajo prueban que E2F-1 y hTAF_n31 forman un complejo funcional que induce en el promotor una actividad transcripcional superior a la inducida únicamente por E2F-1 (Fig. 12).

La proteína hTAF_n80 contiene una región homóloga con la histona H4 así como hTAF_n31 tiene un dominio conservado de la histona H3, estas secuencias de tipo histona permiten que hTAF_n31 y hTAF_n80 formen heterodímeros (Hisatake, et al., 1995). A causa de esta relación entre ambos TAF's se decidió analizar también la manera en que hTAF_n80 podría participar en la activación transcripcional mediada por E2F-1. E2F-1 se asocia con hTAF_n80 de manera similar como sucede con hTAF_n31, ya que el complejo E2F-1/hTAF_n80 (formado por la co-transfección de ambos plásmidos de expresión), aumenta de forma notable la actividad del gen reportero (Fig. 12).

La interacción de hTAF_n31 con p53 se atribuye a los residuos TFSGWLW en el dominio transactivador (Lu y Levine, 1995), y se ha mostrado que este péptido también es responsable de la asociación de p53 con MDM2 (Martin, et al., 1995). La secuencia TFSGWLW en p53 tiene una participación muy importante en su unión a MDM2 y hTAF_n31, porque cuando son mutados los aminoácidos T y F se pierde por completo la afinidad de p53 por MDM2 y hTAF_n31. En el dominio transactivador de E2F-1 la secuencia con mayor similitud con p53 es el péptido DFSGLL que también está involucrado en la unión de E2F-1 con MDM2 (Martin, et al., 1995). A pesar de que no existen reportes de que el péptido DFSGLL esté involucrado en la asociación de E2F-1 con alguno de los TAF's, se sabe que el dominio transactivador de E2F-1 es indispensable para su actividad transcripcional, porque cuando se elimina o se bloquea este dominio, la habilidad de E2F-1 para activar la transcripción se suprime por completo (Hagemeyer, et al., 1993). El plásmido G4E2F codifica para el dominio carboxi-terminal (transactivador) de E2F-1 y el dominio de unión al DNA del factor transcripcional Gal4. Este plásmido al expresarse, permite que su producto funcione como un competidor en los ensayos de transfección. Estos ensayos muestran que hTAF_n31 al igual que hTAF_n80 se asocian al extremo carboxi-terminal de E2F-1 y es posible que sea el dominio transactivador de E2F-1 la región relacionada con esta interacción (Fig. 13).

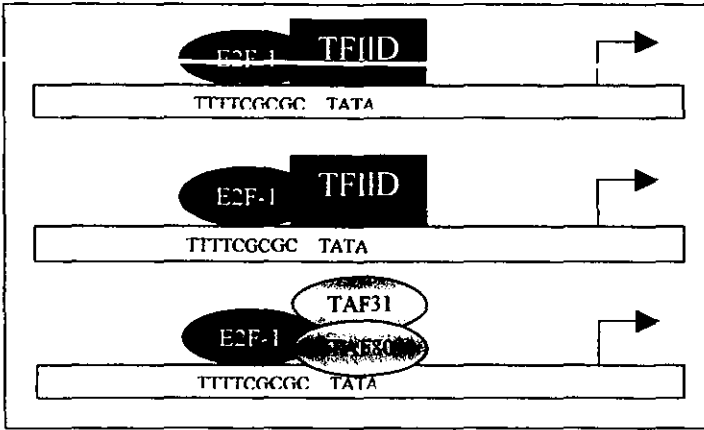


Fig. 12 Cooperación del hTAF₃₁ y hTAF₈₀ en la activación transcripcional. Se cree que cuando hTAF₃₁ y hTAF₈₀ son co-transfectados forman un complejo que sustituye a TFIIID y ocasiona un aumento en la actividad del promotor.

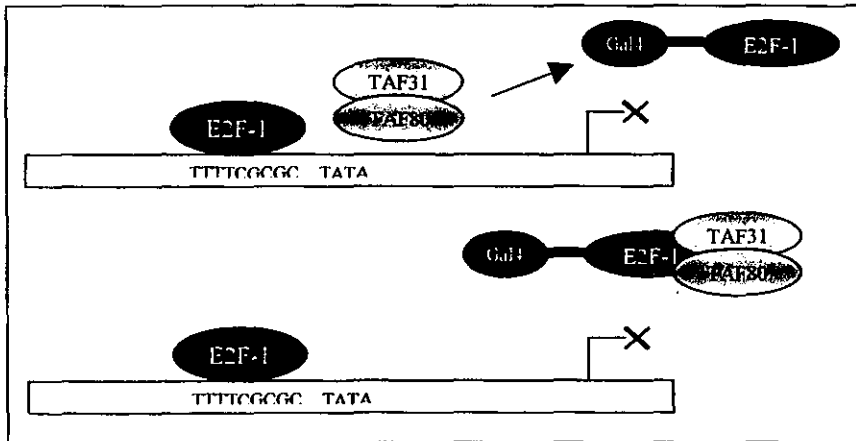


Fig. 13 hTAF₃₁ y hTAF₈₀ se unen al extremo carboxilo de E2F-1. La proteína quimérica Gal4E2F-1 compite con E2F-1 por hTAF₃₁ y hTAF₈₀ dado que no presenta el dominio de unión al DNA secuestra a los TAF's y no activa la transcripción.

El factor de transcripción TFIIID está formado por la proteína TBP y entre ocho y diez factores asociados (TAF's). Se ha mostrado también que las interacciones TAF-TAF son importantes para poder ensamblar al factor TFIIID (Albright y Tjian, 2000). Varios estudios sobre hTAF_n80, han indicado que presenta al menos tres dominios que le permiten interactuar con TBP y diferentes TAF's. El extremo amino-terminal de hTAF_n80 está involucrado en la unión con la región amino-terminal tanto de hTAF_n31 como de hTAF_n20. Es importante mencionar la relación de secuencia que existe entre el dominio amino-terminal de hTAF_n80 y la región globular de la histona H4, el extremo amino de hTAF_n31 y la región globular de la histona H3, y entre el dominio amino-terminal de hTAF_n20 y la región globular de la histona H2B, ya que se cree que la asociación entre hTAF_n80, hTAF_n31 y hTAF_n20 forma una estructura similar al complejo que ensamblan las histonas (complejo "histone-like") a través de interacciones paralelas a aquellas observadas en el nucleosoma (Hisatake et al., 1995). Esta interacción fue uno de los antecedentes más directos que nos llevaron a decidir usar a hTAF_n31 y hTAF_n80 junto con E2F-1, para analizar su actividad sobre el promotor.

La relación tan cercana que se presenta entre hTAF_n80 y hTAF_n31 puede ser la causa de que ambos TAF's participen en la activación transcripcional mediada por E2F-1. Particularmente, cuando se mantiene constante la concentración de hTAF_n80 y se incrementan los niveles de hTAF_n31, la actividad del promotor aumenta con respecto a la concentración de hTAF_n31 hasta un punto donde la actividad se mantiene constante aunque se introduzcan cantidades mayores de hTAF_n31 al sistema. La razón de que a mayor concentración de hTAF_n31 sea mayor la actividad del promotor, se puede deber a la fuerte afinidad que tiene hTAF_n31 por E2F-1, es posible que de alguna manera hTAF_n31 participe como proteína iniciadora del complejo transcripcional y con la ayuda de hTAF_n80 una vez asociados a E2F-1 sean capaces de acarrear otros factores de la maquinaria basal transcripcional hacia el promotor favoreciendo el inicio de la síntesis del RNA (Fig. 14).

Durante la síntesis del RNA se ha visto que la unión de hTAF_n31 con E2F-1 no es suficiente para inducir la transcripción del promotor porque requiere de la intervención de hTAF_n80 para la activación transcripcional. Sin embargo, como lo reportan los resultados, cuando se tiene un exceso de hTAF_n80 en el sistema la actividad del promotor disminuye considerablemente. Este comportamiento indica que el exceso de hTAF_n80 interfiere de alguna forma en la transcripción. Es posible que hTAF_n80 esté secuestrando a hTAF_n31 impidiendo que se asocie con E2F-1 a causa de una mayor afinidad por hTAF_n31, que la que tiene hTAF_n31 por E2F-1. Otra explicación para este

comportamiento puede ser que hTAF_n80 esté bloqueando al promotor impidiendo la unión de la maquinaria basal transcripcional con el promotor (Fig. 15).

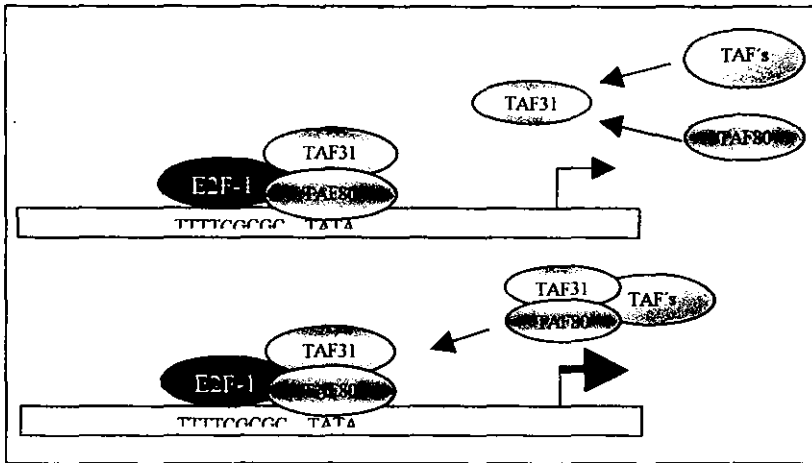


Fig. 14 hTAF_n31 presenta una participación importante en la activación transcripcional. Los resultados del trabajo sugieren que hTAF_n31 promueve la formación de un complejo transcripcional activo que requiere de hTAF_n80 para darle estabilidad.

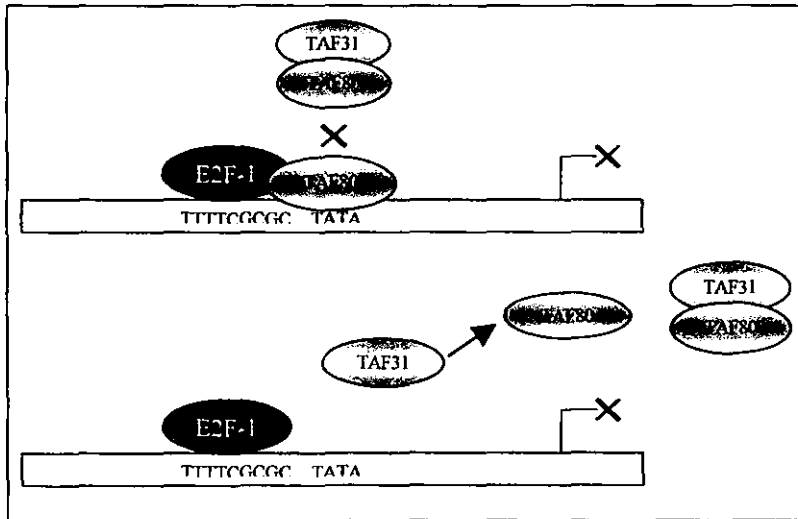


Fig. 15 En exceso hTAF_n80 reprime la transcripción. Se creó que hTAF_n80 tiene dos mecanismos para inhibir la transcripción: el primero plantea que el incremento de hTAF_n80 satura el sistema impidiendo que se unan los factores de transcripción al DNA, y el segundo sugiere que hTAF_n80 secuestra a hTAF_n31 al competir con E2F-1.

La transcripción de un promotor por medio de la RNA polimerasa II requiere del ensamble de varios factores de iniciación para formar al complejo de preiniciación que se compone de los factores generales de transcripción (GTF) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH y la RNA polimerasa II (la asociación entre los GTF y la RNA polimerasa II se conoce como la holoenzima Pol II). Experimentos *in vitro* han demostrado que la formación del complejo de pre-iniciación se logra a través de una serie de pasos sucesivos; sin embargo, otros ensayos coinciden en que el reclutamiento de la holoenzima Pol II *in vivo* se realiza a partir de un solo paso (Coulombe, 1999). Se pensaba que la formación de este complejo tenía como pilar a la proteína de unión secuencia-específica TBP exclusivamente. En la actualidad, se ha aislado y caracterizado un complejo multiprotéico que carece de TBP o un factor similar a TBP, pero se compuesto por varios TAF's y otras proteínas. Este complejo puede sustituir a TFIID en promotores que contienen a la caja TATA y a aquellos que carecen de la caja TATA. Este nuevo complejo se ha nombrado complejo contenedor de TAF's libre de TBP (TFTC) y los TAF's más importantes que lo componen son hTAF_n20, hTAF_n30, hTAF_n31, hTAF_n55, hTAF_n80, hTAF_n100 y hTAF_n135 (Wieczorek, et al., 1998). Cuando G4E2F secuestra al complejo formado por hTAF_n31 y hTAF_n80 la actividad del promotor se ve afectada disminuyendo, pero este decremento no iguala a la actividad basal, sino que se mantiene cercana al nivel de activación inducido por E2F-1. Es posible que hTAF_n31 y hTAF_n80 estén ensamblando un complejo independiente a TFIID que no tenga una afinidad tan fuerte con el promotor como TFIID, posiblemente porque el competidor al solo suprimir la actividad incrementada por la cooperación de hTAF_n31 y hTAF_n80 no secuestra a la maquinaria basal transcripcional de la célula que utiliza E2F-1 cuando actúa por sí solo.

El primer modelo de la síntesis del RNA planteaba que la holoenzima Pol II se unía sobre el promotor linearizado para iniciar la transcripción, hasta que surgió un problema en el modelo. La longitud del promotor va generalmente desde la base -60 hasta la +40 (30nm aproximadamente), y que la Pol II se acerca al promotor en diferentes regiones entre los nucleótidos -40 y +13. Esta región mide alrededor de 18nm de DNA y es más largo que la holoenzima (14nm). También se detectó al factor TFIIIF a lo largo del trayecto -56 a +34 del promotor (30nm). La única razón por la cual se podía explicar esto era si el promotor envolviera al complejo de pre-iniciación. Por medio de microscopía electrónica, se corroboraron estas hipótesis ya que las imágenes mostraron al DNA envolviendo al complejo, concluyendo que se requiere de 120 bases para poder envolver por completo a la holoenzima Pol II (Coulombe, 1999).

Algunos experimentos han revelado que el DNA del promotor se envuelve alrededor del factor TFIID formando una estructura muy similar al complejo que ensambla la holoenzima con el promotor. Ambas estructuras envueltas ocupan la misma región dentro del promotor, lo cual sugiere que ambos complejos no pueden co-existir. Se estipula que el promotor envuelve primero al factor TFIID y posteriormente lo sustituye por la holoenzima Pol II (Oelgeschlager, et al., 1996 y Coulombe, 1999).

Analizando estas observaciones y los resultados obtenidos en este trabajo es posible plantear un modelo donde se explique el fenómeno antes mencionado:

Durante la fase tardía G1, el complejo ciclinaD-CDK4/6 inicia la fosforilación de la proteína RB, subsecuentemente el complejo ciclinaE-CDK2 hiperfosforila a RB lo que causa la liberación de la proteína transactivadora E2F-1. E2F-1 libre se asocia con la proteína DP, formando un heterodimero que tiene mayor afinidad por los sitios E2F en los promotores celulares. Una vez unido el heterodimero al promotor, E2F-1 recluta al factor TFIID debido a la afinidad que presenta por hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 y TFIID a su vez se une a la caja TATA del promotor por medio de TBP. De forma alternativa, E2F-1 podría reclutar al complejo TFTC en lugar de TFIID dado que hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 también forman parte de esta estructura. E2F-1 puede ocasionar el doblamiento del DNA, aunque no se ha probado se cree que el dominio de la caja marcada es responsable de que el promotor envuelva a TFIID o a TFTC. Una vez envueltos los complejos formando una estructura semejante a la del nucleosoma, se comienza el acarreo de la holoenzima Pol II por medio de interacciones proteína-proteína. Dado que el factor TFIID y el complejo de pre-iniciación no pueden ocupar el mismo espacio dentro del promotor, se ha propuesto un modelo en donde se reemplaza a los TAF's por los factores generales de la transcripción junto con la RNA polimerasa II. De manera que cuando queda envuelta la holoenzima Pol II, es posible iniciar la síntesis del RNA.

Otros factores que pueden estar interviniendo en la activación transcripcional mediada por E2F-1 son p300 y CBP. CBP y p300, las cuales son proteínas co-activadoras transcripcionales muy relacionadas entre sí, que pueden estimular la actividad de diferentes factores de transcripción. Tanto CBP como p300 se unen a E2F-1 a través de un sitio en el dominio transactivador de E2F-1. Experimentos de co-expresión han revelado que CBP y p300 pueden aumentar la actividad transcripcional de E2F-1. Tanto CBP como p300 tienen una función de histona acetilasa y además pueden reclutar a la histona acetilasa P/CAF. La unión de CBP y p300 con E2F-1 y su habilidad de

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

acarrear proteínas con actividad histona-acetilasa, representa un importante mecanismo para contrarrestar la represión transcripcional ocasionada por la interacción E2F/RB que recluta histona-desacetilasas (Trouche, et al., 1996 y Lee, et al., 1998).

CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que el factor transcripcional E2F-1 interactúa con los co-activadores hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80, y que el extremo carboxi-terminal (dominio de activación transcripcional) de E2F-1 es la región responsable de dicha asociación.

También se muestra que la unión de E2F-1 con hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 es una interacción funcional, ya que la asociación de hTAF_{II}31 con hTAF_{II}80 coopera en la activación transcripcional mediada por E2F-1.

Los diferentes comportamientos que causan hTAF_{II}31 y hTAF_{II}80 cuando cooperan con E2F-1 en la activación transcripcional, permiten especular que E2F-1 presenta mayor afinidad por hTAF_{II}31 que por hTAF_{II}80 y que hTAF_{II}80 es más afín por hTAF_{II}31 que por E2F-1.

GLOSARIO

Adenosin 5'-trifosfato (ATP): Es un nucleótido que contiene dos enlaces fosfoanhidro de alta energía. Es la molécula que participa en la captura y transferencia de energía en todas las células.

Aparato de Golgi: Organelo celular compuesto de estructuras membranosas que se encarga de procesar y arreglar a las proteínas y lípidos destinadas a otros compartimentos celulares.

Apoptosis: Muerte celular programada.

Caja TATA: Secuencia consenso en la región del promotor de diferentes genes eucariotas en la que se unen factores generales de transcripción.

Carcinoma: Tumor maligno derivado de células epiteliales.

Ciclinas: Un grupo de proteínas relacionadas cuyos niveles varían dependiendo del ciclo celular y que son necesarias para activar a las CDK's.

Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs): Un grupo de protein-quinasas que requieren de las ciclinas para ser activadas y participan en el progreso del ciclo celular.

Cinetocoro: Una estructura proteica localizada cerca del centromero de los cromosomas y del cual se extienden microtubulos que participan en el movimiento cromosomal durante la anafase.

Cromátides Hermanas: El par de cromosomas homólogos formados en la fase S.

Cromosoma: Es la unidad estructural del material genético en eucariotas y se conforma de DNA de doble cadena y proteínas asociadas.

Diferenciación: Proceso que involucra cambios en la expresión de genes por el cual una célula precursora se convierte en un tipo de célula especializada.

Dimerización: Unión de dos proteínas que pueden ser iguales (homodímeros) o diferentes (heterodímeros).

DNA polimerasa: Enzima que se encarga de copiar la hebra guía del DNA.

Dominio: Región de una proteína que tiene una estructura terciaria independiente al resto de la molécula.

Drosophila: El género de la mosca de la fruta.

Eucariota: Célula que presenta un núcleo organizado.

Extremo amino-terminal: Es el extremo de la que tiene libre el grupo amino del primer aminoácido.

Extremo carboxi-terminal: Es el extremo de la que tiene libre el grupo carboxilo del último aminoácido.

Factores asociados a TBP (TAF's): Son proteínas co-activadoras que aparentemente estabilizan a los factores de transcripción por medio de su unión con TBP.

Fosfatasa: Enzima que separa grupos fosfato de las proteínas.

Fosforilación: Proceso en el cual una cinasa agrega grupos fosfato a las proteínas.

Gen: Unidad funcional y física de la herencia que lleva la información de una generación a otra.

Genoma: La información genética total de una célula u organismo.

Hebra guía: Es la cadena de DNA que sirve de templado para su replicación.

Histona: Un grupo de proteínas conservadas que se asocian a la cromatina para formar al nucleosoma.

Homología: Similitud de secuencia de una proteína o ácido nucleico que refleja un mismo origen evolutivo.

Huso Mitótico: Es el conjunto de microtubulos necesarios para la separación de los cromosomas durante la mitosis.

Inhibidor: Aquel factor que bloquea o interrumpe la función de otro.

Maquinaria basal transcripcional: Un grupo de proteínas necesarias para iniciar o regular la transcripción.

Meiosis: Un tipo especial de división celular compuesto de dos divisiones celulares sucesivas y una sola ronda de síntesis de DNA que da por resultado a cuatro células con la mitad de la información genética (células haploides).

Mitosis: Proceso por el cual una célula se divide para dar origen a dos células hijas genéticamente iguales.

Mutante: Una proteína o ácido nucleico que ha sufrido una variación en su secuencia y ocasiona un cambio o pérdida en su funcionamiento normal.

Nemátodo: Un grupo de gusanos que presentan su cuerpo redondeado.

Nucleosoma: Una pequeña unidad estructural de la cromatina que consta de un núcleo formado por varias histonas y está rodeado por un segmento de DNA.

Oncogén: El producto de un gen involucrado ya sea en la transformación celular o en la inducción del cáncer.

Péptido: Un polímero pequeño que usualmente contiene alrededor de 30 aminoácidos.

Plásmido: Una pequeña molécula de DNA circular extracromosomal capaz de replicarse y son usados comúnmente como vectores de clonación.

Procariota: Aquellas células que carecen de un núcleo estructurado.

Proliferación: Cuando una o un grupo de células son inducidos a crecer progresivamente.

Promotor: Una secuencia de DNA que determina el sitio de inicio de la transcripción del RNA.

Proteína de unión con la caja TATA (TBP): Proteína que forma parte de la maquinaria basal transcripcional que reconoce y se une a la caja TATA.

Proto-oncogén: Un gen normal cuya alteración puede promover la formación de tumores.

Quiescente: Cuando una célula ha salido del ciclo celular y se mantiene en G0.

Regulador: Factor que regula la expresión de un gen.

Replicación del DNA: Proceso por el cual se duplica una doble cadena de DNA.

RNA polimerasa II: Enzima que se encarga de sintetizar una cadena de RNA a partir de un templado de DNA.

Secuencia: El orden lineal de monómeros de las proteínas y ácidos nucleicos principalmente.

Senescencia: Término que se aplica a las células viejas.

Sobreexpresión: Cuando el producto de un gen se sintetiza por arriba de los niveles normales.

Transactivación: Aquellas proteínas que reconocen y activan secuencias en el DNA que codifican proteínas difusibles que controlan genes del mismo cromosoma o diferentes.

Transcripción: Proceso por el cual se sintetiza una cadena de RNA a partir de un templado de DNA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albright, S. R., y Tjian, R. (2000) TAF's revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*, 242, 1-13.
2. Berk, A. J. (1999) Activation of RNA polymerase II transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 330-335.
3. Birnboim, H. C., y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, (6) 1513-1523.
4. Black, A. R., y Azizkhan-Clifford, J. (1999) Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene*, 237, 281-302.
5. Cartwright, P., Müller, H., Wagener, C., Holm, K., y Helin, K. (1998) E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene*, 17, 611-623.
6. Chang, M., y Jaehning, J. A. (1997) A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Research*, 25, (24) 4861-4865.
7. Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79, 13-19.
8. Coulombe, B. (1999) DNA wrapping in transcription initiation by RNA polymerase II. *Biochem. Cell Biol.*, 77, 257-264.
9. Croy, R. G., y Pardee, A. B. (1983) Enhanced synthesis and stabilization of Mr 68,000 protein in transformed BALB/c-3T3 cells: Candidate for restriction point control of cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4699.
10. Delavaine, L., y La Thangue, N. B. (1999) Control of E2F activity by p21^{Waf1/cip1}. *Oncogene*, 18, 5381-5392.
11. Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., y Weinberg, R. A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, 73, 499-506.
12. Dumphy, W. G., y Kumagai, A. (1991) The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 67, 189-196.
13. Espanel, X., Le Cam, L., North, S., Sardet, C., Brun, G., y Gillet, G. (1998) Regulation of E2F-1 gene expression in avian cells. *Oncogene*, 17, 585-594.
14. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., y Lamb, N. J. C. (1991) Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67, 1169-1176.
15. Hagemeyer, C., Cook, A., y Kouzarides, T. (1993) The retinoblastoma protein binds E2F residues required for activation in vivo and TBP binding in vitro. *Nucleic Acids Research*, 21, (22) 4998-5004.

16. Hahn, S. (1998) The role of TAFs in RNA polymerase II transcription. *Cell*, 95, 570-582.
17. Helin, K., Wu, C., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dynlacht, B. D., Ngwu, C., y Harlow, E. (1993) Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 y DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev*, 7, 1850-1861.
18. Helin, K. (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 28-35.
19. Hisatake, K., Ohta, T., Takada, R., Guermah, M., Horkoshi, M., Nakatani, Y., y Roeder, R. G. (1995) Evolutionary consevation of human TATA-binding-polypeptide-associated factors TAF₃₁ and TAF₈₀ and interactions of TAF₈₀ with other TAFs and with general transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8195-8199.
20. Johnson, D. G., y Schneider-Broussard, R. (1998) Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience*, 3, 447-458.
21. Jordan, M., Schallhom, A., y Wurm, F. M. (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation, *Nucleic Acids Research*, 24, (4) 596-601.
22. Kato, J.-y., Matsuoka, M., Poyak, K., Massagué, J., y Sherr, C. J. (1994) Cyclin AMP- induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{KIP1}), of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cee*, 79, 487-495.
23. Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., y Lehner, C. F. (1994) Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell*, 77, 107-115.
24. Lam, E. W-F., y La Thangue, N. B. (1994) DP and E2F proteins: coordinating transcription with cell cycle progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 6, 859-866.
25. Lee, C. W., Sorensen, T. S., Shikama, N., y Lathangue, N. B. (1998) Functional interplay between p53 and E2F through co-activator p300. *Oncogene*, 16, 2695-2710.
26. Levine, A. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-331.
27. Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., y Stillman, B. (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, 369, 574-538.
28. Liang, C., Weireich, M., y Stillman, B. (1995) ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell*, 81, 667-675.
29. Lodish, H., Baltimore, D., Berk., Zipsky, S. L., Matsudaira, P., y Darnell, J. (1995) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc. 1344.
30. Lu, H., y Levine, A. (1995) Human TAF₃₁ protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5154-5158.

31. Lundberg, A. S., y Weinberg, R. A. (1999) Control of the cell cycle and apoptosis, *European Journal of Cancer*, 35, (14) 1886-1894
32. Maniatis, T., Fritsch, E. F., y Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545.
33. Martin, K., Trouche, D., Hagemeler, C., Sorensen, T. S., La Thangue, N. B., y Kouzarides, T. (1995) Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature*, 375, 691-694.
34. Morgan, D. O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, 374, 131-135.
35. Müller, H., y Helin, K. (2000) The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1470, M1-M12.
36. Murray, A. (1994) Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology*, 6, 872-876.
37. Navas, T. A., Zheng, Z., y Elledge, S. J. (1995) DNA polymerase ϵ links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell*, 74, 29-36.
38. Norbury, C., Blow, J., y Nurse, P. (1991) Regulatory phosphorylation of the p34^{cdc2} protein kinase in vertebrates. *EMBO J.*, 10, 3321-3330.
39. Oelgeschlager, T., Chiang, C. M., y Roeder, R. G. (1996) Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature*, 382, 735-738.
40. Peters, G., y Vousden, K. (1997) *Oncogenes and Tumor suppressors*. Oxford University Press, New York, 700.
41. Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem. J.*, 308, 697-706.
42. Sawado, T., Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Ohno, K., Sakaguchi, K., y Matsukage, A. (1998) dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 251, 409-415.
43. Sekine, M., Masaki, I., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., y Shinmyo, A. (1999) Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Letters*, 460, 117-122.
44. Sherr, C. J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73, 1059-1066.
45. Struhl, K., y Moqtaderi, Z. (1998) The TAFs in the HAT. *Cell*, 94, 1-4.
46. Takahashi, Y., Rayman, J. B., y Dynlacht, B. D. (2000) Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes & Development*, 14, 804-816.
47. Terada, Y., Tatsuka, M., Jinno, S., y Okoyama, H. (1995) Requirement for tyrosine phosphorylation of CDK4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature*, 376, 358-362.

48. Trouche, D., Cook, A., y Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator stimulates E2F1/DPI activity. *Nucleic Acids Res.* 24, 4130-4135.
49. Van Der Eb, A. J., y Graham, F. L. (1980) Assay of transforming activity of tumor virus DNA. *Methods in Enzimology*, 65, 826-839.
50. Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J., y Lees, J. A. (1997) E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Molecular and Cellular Biology*, 17, (12) 7268-7282.
51. Wang, J., Chenivresse, X., Henglein, G., y Bréchet, C. (1990) Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, 343, 555-563.
52. Weinberg, R. A. (1995) the retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323-330.
53. Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, W., y Tora, L. (1998) Function of TAF_{II}-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, 393, 187-191.
54. Wood, K.V. (1990) Luciferase assay system with reporter lysis buffer. *Promega Notes*. 28, 1-9.
55. Zhang, H., Hannon, G. J., y Beach, D. (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.*,