



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Función transcripcional de las proteínas E2FA/B1;1
y E2FC de maíz**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

SAMANTHA ROMERO RODRÍGUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Profesor Jorge Manuel Vázquez Ramos

Vocal: Profesora Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Secretario: Profesor Francisco Javier Plasencia de la Parra

1er. Suplente: Profesor José Pedraza Chaverri

2do. Suplente: Profesora Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

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

Asesor del tema:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Supervisor técnico:

Biól. Víctor Allan Sánchez Camargo

Sustentante:

Samantha Romero Rodríguez

Agradecimientos

A los siguientes proyectos de financiamiento por el apoyo para la realización de los experimentos para este proyecto de tesis:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) A1-5-9076
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN205219
- Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9130 y 5000-9124

Al Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química, ya que a través del Subprograma 127 de Formación Básica en Investigación, me apoyó con una beca.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por mi formación académica y profesional. Es un orgullo para mí ser parte de esta casa de estudios y de esta Facultad que me han dado grandes enseñanzas y experiencias.

Al Dr. Jorge Vázquez, le agradezco por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y con su ejemplo motivarme a seguir el camino de la ciencia y la investigación. Gracias por sus críticas, apoyo y orientación en la realización de mi proyecto.

A la Dra. Aurora Lara y al Dr. Elpidio García, gracias por asegurarse de que siempre contara con las herramientas necesarias para desarrollar mi proyecto, además de apoyarme con sus críticas y consejos.

A la Dra. Adriana Mendoza y al Dr. Javier Plasencia, por el tiempo dedicado a la revisión esta tesis, por sus críticas, comentarios y sugerencias.

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 5 |
| Figuras y Tablas | 6 |
| Resumen | 7 |
| 1 Introducción | 8 |
| 1.1 El maíz..... | 8 |
| 1.2 Ciclo celular..... | 9 |
| 1.3 Regulación del ciclo celular..... | 11 |
| 1.4 Vía Rb/E2F- DP..... | 14 |
| 1.5 Familia de factores transcripcionales E2F..... | 16 |
| 1.5.1 Subgrupos de la familia E2F..... | 16 |
| 1.5.2 Motivos y dominios de los miembros de la familia E2F..... | 18 |
| 1.6 E2F en plantas..... | 19 |
| 2 Antecedentes | 21 |
| 3 Justificación | 24 |
| 4 Hipótesis | 24 |
| 5 Objetivos | 24 |
| 5.1 Objetivo general..... | 24 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 24 |
| 6 Metodología | 25 |
| 6.1 Clonación de los genes <i>ZmE2FA/B1;1</i> , <i>ZmE2FC</i> y sus deleciones de dominios..... | 25 |
| 6.1.1 Clonación de la fusión <i>E2FC WT- E2FA/B1;1^{C-TAD}</i> | 27 |
| 6.2 Ensayo de transactivación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 29 |
| 6.3 Ensayo de actividad de β - galactosidasa..... | 30 |
| 7 Resultados | 31 |
| 7.1 Clonación de <i>ZmE2FA/B1;1</i> , <i>ZmE2FC</i> y sus respectivas deleciones de dominios en vectores de expresión para levadura..... | 31 |
| 7.2 Determinación de la capacidad transcripcional de las proteínas E2F de maíz..... | 35 |
| 7.3 Ensayos de transactivación en levaduras..... | 36 |
| 7.3.1 Crecimiento en medios selectivos..... | 36 |
| 7.3.2 Ensayos de actividad de β - galactosidasa..... | 39 |
| 8 Discusión de resultados | 42 |
| 9 Conclusiones | 47 |
| 10 Bibliografía | 48 |
| 11 Apéndices | 56 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| AD | Dominio de activación |
| At | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| CAK | Cinasa activadora de CDK |
| CDK | Cinasa dependiente de ciclina |
| Cyc | Ciclina |
| DBD | Dominio de unión a DNA |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxinucleótidos trifosfato |
| DP | Socio de dimerización (Proteína de dimerización) |
| E2F | Factor de unión a promotor E2 de adenovirus |
| ICK | Inhibidores de CDK |
| IPTG | Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido |
| KRP | Proteína relacionada a Kip |
| LB | Luria- Bertani |
| nm | Nanómetros |
| ONPG | o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido |
| pb | Pares de bases |
| PCNA | Antígeno nuclear de proliferación celular |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RBR | Proteína relacionada a Rb |
| X- gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido |
| Zm | <i>Zea mays</i> |

Figuras y tablas

Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular

Figura 2. Regulación de la actividad de CDK

Figura 3. Modelo de activación de la vía E2F- Rb en la transición de la fase G1 a S

Figura 4. Representación esquemática de los subgrupos de factores de transcripción E2F

Figura 5. Estructura de los miembros de la familia E2F

Figura 6. Organización estructural de las proteínas de la familia E2F y DP de *Arabidopsis*

Figura 7. Árbol filogenético construido con las secuencias proteicas de E2F, DEL y DP de *Arabidopsis*, arroz y maíz

Figura 8. Estudio de la asociación de las proteínas E2F con la caja -4 del promotor de PCNA1 de maíz, ensayos de retardamiento electroforético (EMSA)

Figura 9. Esquema representativo de la PCR de fusión

Figura 10. Estructura esquemática de las proteínas E2F y sus respectivas mutantes clonadas

Figura 11. Verificación de las clonas positivas en el vector pEG202

Figura 12. Verificación de las clonas positivas de los genes *E2FA/B1;1 WT* y *E2FC WT* fusionados a un dominio de activación, en los vectores pDEST22 y pJG4-5, respectivamente

Figura 13. Modelo de transactivación

Figura 14. Transactivación en levaduras

Figura 15. Células transformadas con los vectores expresando un AD solo o fusionado a E2F

Figura 16. Actividad de β -galactosidasa en levaduras

Figura A1. Alineamiento de *E2FA/B1;1* y *E2FC*

Figura A2. Mapa del vector pEG202 para expresión en levaduras

Figura A3. Mapa del vector pJG4-5 para expresión en levadura

Figura A4. Mapa del vector pDEST22 para expresión en levadura

Figura A5. Mapa del vector reportero pSH18- 34 para expresión en levadura

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz

Tabla 2. Genes clonados en vectores de expresión para levadura

Tabla A1. *Primers* para la amplificación de la secuencia codificante (CDS) de *E2FA/B1;1*, *E2FC* y sus respectivas delecciones

Tabla A2. CDS amplificados y pares de *primers* utilizados

Resumen

El ciclo celular en eucariontes está controlado principalmente por proteínas reguladoras que incluyen ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDKs) funcionalmente conservadas entre levaduras, animales y plantas. En mamíferos, los blancos principales para los complejos Ciclina/CDK en la fase G1 son las proteínas de la familia “pocket”: p107, p130 y la proteína retinoblastoma (Rb), que regulan negativamente la transición G1/S a través de la interacción con el heterodímero de factores de transcripción E2F- DP. La familia E2F en células animales desempeña un papel importante en el control de la progresión del ciclo celular mediante la regulación de la expresión de conjuntos de genes implicados en la proliferación celular, el inicio de la replicación y síntesis de DNA.

Los estudios en *Arabidopsis thaliana* han revelado que la vía E2F- DP se encuentra conservada en plantas por medio de la presencia de seis proteínas E2F y dos DP, las cuales se han clasificado en subgrupos de acuerdo con su función de activación o represión de la transcripción. Actualmente, miembros de la familia E2F-DP han sido identificados en múltiples especies vegetales además de *Arabidopsis*, tales como zanahoria, tabaco, arroz y más recientemente en maíz. En el laboratorio se identificaron 12 secuencias proteicas de posibles genes de la familia de E2F de maíz, las cuales fueron alineadas con las de *Arabidopsis* y arroz, para construir un árbol filogenético y proponer un sistema de nomenclatura con base en la identidad o con la posición en el árbol. Sin embargo, la función de dichas proteínas de maíz era desconocida.

Con base a la similitud con los activadores y represores de *Arabidopsis*, para este proyecto se seleccionaron dos proteínas de maíz (E2FA/B1;1 y E2FC) con el objetivo de conocer su función transcripcional por medio de ensayos de transactivación en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Encontramos que la proteína E2FA/B1;1 funciona como un activador transcripcional, e identificamos una región de 40 aminoácidos en su secuencia que podría estar mediando esta función. En contraste, la proteína E2FC no fue capaz de activar la transcripción al menos en este sistema, sugiriéndonos que esta podría actuar como un represor transcripcional.

1 Introducción

1.1 El maíz

El maíz (*Zea mays*) junto con el arroz y el trigo es una de las plantas de cultivo más importante en el mundo, ya que representa una fuente de energía alimenticia fundamental para seres humanos y animales, además de ser una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se produce almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y combustible.

El maíz se originó en condiciones cálidas y estacionalmente secas de Mesoamérica, la evidencia arqueológica más reciente del maíz demuestra su presencia en la región del valle del río Balsas en México hace al menos 8700 años (Arendt & Zannini, 2013). Debido a la cercanía filogenética se cree que el ancestro silvestre del maíz es una planta llamada teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*), la manipulación selectiva de esta planta enfocada en la recolección de los granos, fue dando lugar a modificaciones en la estructura de la planta hasta dar origen a lo que hoy conocemos como maíz (Vela, 2011).

Es así como el maíz se convirtió en el cultivo alimenticio básico para algunas culturas que practicaban la agricultura sedentaria, desde las culturas maya y azteca de México, hasta la cultura Cahokia cerca de la actual St. Louis en el centro de los Estados Unidos. Desde América Central y América del Norte, los comerciantes de todo el mundo propagaron el maíz y lo convirtieron en un cultivo básico en gran parte de África y en otras regiones (Nafziger, 2016).

El maíz es una planta anual, monocotiledónea, diploide con 10 cromosomas y pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae), que incluye cultivos como el arroz, el trigo, la cebada, la caña de azúcar, el mijo y el sorgo (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz. Departamento de Agricultura, USA.

| | |
|----------------------|-----------------------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta –Plantas vasculares |
| Superdivisión | Spermatophyta- Plantas de semilla |
| División | Magnoliophyta- Plantas con flores |
| Clase | Liliopsida- Monocotiledóneas |
| Subclase | Commelinidae |
| Orden | Cyperales |
| Familia | Poaceae |
| Género | <i>Zea</i> |
| Especie | <i>Zea mays</i> |

Además de su importancia agronómica, el maíz ha sido un organismo modelo clave para la investigación básica durante casi un siglo. Dentro de los cereales, que incluyen otras especies de plantas, el maíz es el sistema genético más investigado. Varios atributos de la planta de maíz, que incluyen una vasta colección de cepas mutantes, grandes cromosomas heterocromáticos y colinealidad genética dentro de especies relacionadas, han posicionado a esta especie como una pieza central para la investigación genética, citogenética y genómica (Strable & Scanlon, 2009). Como organismo modelo, el maíz es objeto de investigaciones biológicas de gran alcance como la domesticación de plantas, la evolución del genoma, la fisiología del desarrollo, la epigenética, la resistencia a las plagas, la herencia cuantitativa, la genómica comparativa, y de diversos procesos celulares.

1.2 Ciclo celular

Diariamente se descubren nuevas especies, nuevos géneros e incluso nuevas familias de organismos eucariontes (Harashima, Dissmeyer & Schnittger, 2013). Para crecer y reproducirse, todas estas especies dependen de la progresión fiel de sus células a través de la división celular, lo que requiere del crecimiento en tamaño de las células, la duplicación de su DNA genómico y su posterior distribución exacta entre las dos células hijas que se están formando.

Estos procesos son coordinados durante el ciclo celular, el cual consta de cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M. Las fases G1, S y G2 juntas son denominadas interfase (Figura 1). En la fase G1 la célula se asegura de que existen las condiciones idóneas para poder dividirse y crecer. Después de alcanzar cierto tamaño, las células entran a la fase S, en la que tiene lugar la síntesis de DNA (replicación) para duplicar el material genético. Durante la fase G2, se verifica que la duplicación del DNA se realizó de forma completa y sin errores, y sólo entonces las células se preparan para la división celular. Finalmente, los cromosomas se separan durante la fase M (mitosis) y la célula se divide en dos células hijas cada una con una copia idéntica del material genético (Vázquez- Ramos & Sánchez, 2003).

La mitosis, a su vez, está dividida en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase-citocinesis. Al comienzo de la mitosis, durante la profase la cromatina se condensa para formar los cromosomas (cromátidas hermanas unidas por el centrómero). Cuando la envoltura nuclear se desmonta más tarde en la mitosis, los pares de cromátidas hermanas se unen al huso mitótico, en polos opuestos y, finalmente se alinean en el ecuador del huso durante la metafase. En la anafase las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos del huso. El huso se desmonta y los cromosomas segregados se

empaquetan en núcleos separados en la telofase. Durante la citocinesis se completa el programa de división celular con la formación de dos células hijas separadas por una membrana plasmática y, según la especie, una pared celular, de manera que cada célula hija hereda uno de los dos núcleos (Garza- Aguilar *et al.*, 2014; Alberts *et al.*, 2015).

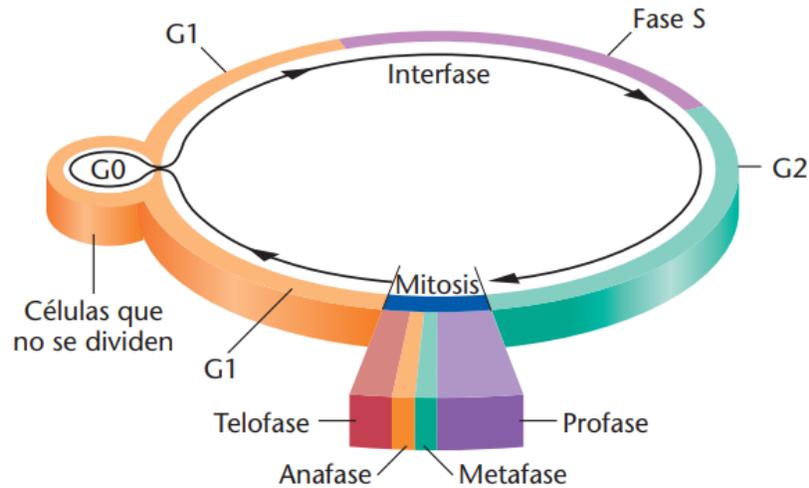


Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular. Klug, Cummings & Spencer, 2006.

Después de la división, las células regresan nuevamente a G1 y el ciclo celular se completa. Las fases deben proceder en el orden correcto, y una fase debe completarse antes de que pueda comenzar la siguiente fase. Para esto, es esencial que las diferentes fases del ciclo celular estén coordinadas con precisión (Vázquez- Ramos & Sánchez, 2003).

En la mayoría de las células eucariontes, la progresión a través del ciclo celular se controla en distintos puntos de control, los principales son tres. El primero es al final de G1 (punto de restricción), donde la célula se compromete con la duplicación de cromosomas. El segundo es la transición G2/M, donde el sistema de control desencadena los eventos mitóticos tempranos que conducen a la alineación cromosómica en el huso mitótico en la metafase. El tercero es la transición metafase a anafase, donde el sistema de control estimula la separación de las cromátidas hermanas, lo que lleva a la finalización de la mitosis y la citocinesis. El sistema de control bloquea la progresión a través de cada una de estas transiciones si detecta problemas dentro o fuera de la célula (Alberts *et al.*, 2015). Si el sistema de control detecta problemas en la finalización de la replicación del DNA, por ejemplo, mantendrá la célula en la transición G2/M hasta que se resuelvan esos problemas. De manera similar, si las condiciones extracelulares no son apropiadas para la proliferación

celular, el sistema de control bloquea la progresión, evitando así la división celular hasta que las condiciones sean favorables.

1.3 Regulación del ciclo celular

El ciclo celular está controlado por numerosos mecanismos que aseguran la correcta división celular. La transición de una fase a otra ocurre de manera ordenada y está regulada por diferentes proteínas. Las proteínas reguladoras clave son las cinasas dependientes de ciclina (CDK), una familia de cinasas que fosforilan residuos de serina y treonina, y sus proteínas de unión, ciclinas (Cyc), denominadas así por su regulación durante el ciclo (Morgan, 1997).

En *S. cerevisiae* y *S. pombe*, una CDK (Cdc28 y Cdc2, respectivamente), participa en el control del ciclo celular y es esencial para la proliferación de levaduras. En contraste en otros organismos hay familias de CDK de las cuales los miembros individuales desempeñan funciones distintas durante el ciclo celular, por ejemplo, las CDK1 y CDK2 controlan la mitosis en humanos, ratones, *Xenopus* y *Drosophila*, mientras que CDK4 y CDK6 se encargan de controlar la entrada a la fase S (Satyanarayana & Kaldis, 2009; Malumbres *et al.*, 2009).

En plantas, las CDKs se dividen en siete clases: A-G. De éstas, solamente las que pertenecen a los tipos A, B, D y F están vinculadas a mecanismos reguladores del ciclo celular (Umeda, Shimotohno, & Yamaguchi, 2005). La mayor parte del conocimiento actual sobre el control del ciclo celular en plantas proviene de la planta modelo *A. thaliana*. *Arabidopsis* tiene un homólogo de CDK1, llamado CDKA, la cual es esencial en las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular (Vandepoele *et al.*, 2002; Porceddu *et al.*, 2001).

Las plantas contienen un grupo exclusivo de CDKs, denominadas CDK del tipo B, que se dividen en dos subfamilias, CDKB1 y CDKB2. *Arabidopsis* contiene dos miembros en cada subfamilia CDKB, para un total de cuatro cinasas tipo B. Los estudios funcionales sugirieron funciones menores y específicas para el desarrollo por el subgrupo de CDKB1, mientras que los miembros del subgrupo CDKB2 parecen ser los principales reguladores de la mitosis (Andersen *et al.*, 2008; Boudolf *et al.*, 2004).

Las ciclinas se identificaron como proteínas que aumentan su concentración durante la interfase, alcanzan un pico en G2/M y desaparecen repentinamente antes de la telofase (Evans *et al.*, 1983), sin embargo, no todas oscilan (Dewitte & Murray, 2003). La unión de una ciclina con una CDK es normalmente un requisito previo para la actividad de CDK. La

mayoría de las ciclinas tienen una secuencia de 100 aminoácidos, la caja ciclina, que se requiere para unirse a CDK (De Veylder *et al.*, 1997), y una caja de destrucción que es susceptible a la ubiquitinación que conduce a la rápida destrucción proteolítica. Las ciclinas de la fase G1 tienen secuencias ricas en prolina, glutamato/aspartato, serina/treonina (PEST) en el C-terminal, que son marcadores de proteínas de corta duración. Hay 13 clases de ciclinas en animales (A – L y T) (Pines, 1995), pero solo siete en plantas: A, B, C, D, H, P y T, a las que pertenecen aproximadamente 60 genes. En el contexto del ciclo celular, se sabe más sobre las clases A, B y D (Francis, 2007).

Arabidopsis thaliana tiene al menos 32 ciclinas con un papel putativo en la progresión del ciclo celular, se han identificado 10 genes del tipo A, 11 del tipo B, 10 del tipo D y un gen del tipo H (Wang *et al.*, 2004). Se piensa que las ciclinas del tipo D regulan la transición G1/S, las ciclinas de tipo A el control de la fase S a la M y las ciclinas del tipo B, tanto la transición G2/M como el control de la fase M (Breyne & Zabeau, 2001; Mironov *et al.*, 1999; Potuschak & Doerner, 2001).

Otras proteínas importantes en el control del ciclo celular son aquellas que regulan la actividad de las CDK. Todas las CDK de eucariontes comparten una similitud estructural, el acceso al sitio activo de éstas permanece restringido por un bucle conocido como “bucle T” (T- loop). La fosforilación de un residuo de treonina conservado dentro del bucle induce un cambio conformacional para permitir la unión correcta del sustrato y el acceso al γ - fosfato del grupo del ATP unido. Por lo tanto, la fosforilación en la treonina- 160 o el residuo equivalente es esencial para la actividad de la CDK, esta fosforilación la realiza una cinasa activadora de CDK (CAK) (Morgan, 1997). Se conocen dos formas de CAK, una forma clasificada como CDKF, que puede sustituir la mutación de CAK en levaduras, y los complejos heterodiméricos que consisten en CDK7 y ciclina H en animales o sus homólogos CDKD/CycH en *Arabidopsis* (Umeda *et al.*, 1998).

Otra forma de regulación adicional de la actividad de CDK se produce por la fosforilación inhibitoria de los residuos treonina-14 y principalmente tirosina-15, que es catalizada por la cinasa WEE1, encontrada en maíz y *Arabidopsis* (Sorrell *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 1999). La activación de la CDK en levaduras y mamíferos ocurre por medio de una fosfatasa, CDC25. La búsqueda de un homólogo directo en plantas no ha sido exitosa, sin embargo, no se descarta la presencia de una proteína funcional equivalente en plantas.

1.4 Vía RB/ E2F- DP

La función coordinada de los genes del ciclo celular es esencial para la división y diferenciación celular en todos los organismos eucariontes, por ello la transcripción es uno de los principales niveles de regulación, controlando la disponibilidad de factores celulares específicos cuya acción coordinada es necesaria para una variedad de procesos como la progresión del ciclo celular.

Entre los diversos reguladores del ciclo celular, el factor de transcripción E2F y su socio de dimerización, DP, así como la proteína represora retinoblastoma (Rb) son elementos clave. El heterodímero E2F- DP controla la transcripción de una amplia gama de genes, incluidos genes implicados en la progresión del ciclo celular y la síntesis, replicación y reparación del DNA (Menges *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2002). Está bien establecido que E2F desempeña un papel crucial en la regulación de la transición de la fase G1 a S.

En mamíferos, los estímulos externos, como factores de crecimiento, hormonas, nutrientes y otras señales externas inducen la expresión de ciclinas del tipo D. Una vez inducidas, las ciclinas D se unen a CDK4 y CDK6, y promueven la transición de G0 (una fase en la que las células están en estado de reposo) a G1 para iniciar la fosforilación de las proteínas de la familia pocket (pRb, p107 y p130). Durante la fase G1 temprana, antes de que las células se comprometan a entrar en el ciclo celular, la proteína Rb secuestra al factor de transcripción E2F-DP; en G1 tardía la fosforilación de Rb catalizada por los complejos CycC/CDK libera la transcripción de los genes blanco tempranos de E2F (incluyendo CycE y CycA) de su represión por las proteínas Rb. Posteriormente, CDK2 controla la entrada y la progresión a través de la fase S en complejo con CycE y CycA completando la fosforilación de las proteínas Rb, formando así un circuito de retroalimentación positiva lo que lleva a una mayor activación de los genes blanco de E2F requeridos para la progresión del ciclo, culminando en la progresión de la fase S (Figura 3) (Sherr & Roberts, 1999; Dyson, 1998; Bertoli *et al.*, 2013).

Rb reprime la actividad de E2F al enmascarar físicamente su dominio de transactivación. Sin embargo, no sólo reprime su actividad de esta forma, sino también mediante el reclutamiento activo de factores de remodelación de la cromatina, vinculando la ruta E2F- Rb al control epigenético (Harbour & Dean, 2000; Trimarchi & Lees, 2002; Shen, 2002).

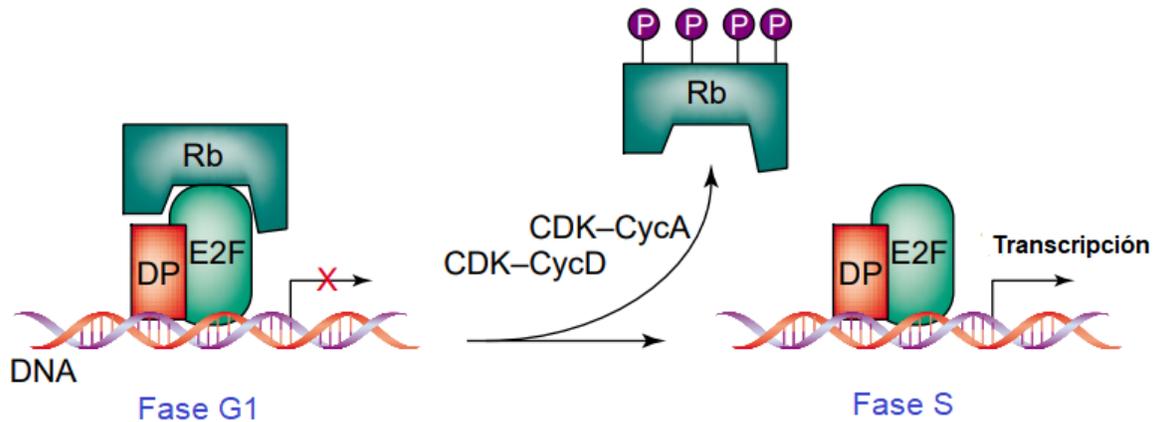


Figura 3. Modelo de activación de la vía E2F- Rb en la transición de la fase G1 a S. Durante G1 temprana, Rb hipofosforilado se une al heterodímero E2F- DP y, en consecuencia, inhibe la actividad transcripcional de E2F. Durante la fase G1 tardía y la fase S temprana, Rb es hiperfosforilada, primero por el complejo CDK-CycD y luego por complejos CDK-CycA/E, lo que resulta en la disociación de Rb del complejo E2F- DP, lo que promueve activamente la transcripción de los genes blanco de E2F, implicados en progresión del ciclo celular. Modificado de Shen, 2002.

Los miembros de la familia E2F activadores y represores (de los cuales se hablará más adelante) en conjunto con DP y las proteínas de la familia pocket se unen a los promotores de genes del ciclo celular en diferentes etapas para asegurar su correcta expresión (Henley & Dick, 2012; Dimova & Dyson, 2005). La asociación con DP incrementa la afinidad de E2F por el DNA, y es así como pueden funcionar como reguladores transcripcionales. Durante la fase G1 temprana, las proteínas E2F del subgrupo activador están unidas a los promotores de sus genes blanco e inhibidas por Rb, mientras que E2Fs del subgrupo represor se unen a p130 y p107 en los promotores para reprimir la transcripción. Cuando las proteínas de la familia pocket son fosforiladas por complejos Cyc/CDK durante la transición de fase G1 a S, se liberan los E2F represores y se reemplazan en los promotores por los E2F activadores (Helin, 1998; Gaubatz *et al.*, 2000; Bertoli *et al.*, 2013).

Muchos de los mecanismos moleculares subyacentes a la regulación de G1 están altamente conservados en eucariontes. En animales y plantas, E2F controla la expresión de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Sin embargo, en levaduras una proteína equivalente llamada SBF desempeña el mismo papel que E2F, pero estas dos proteínas no parecen compartir un ancestro común (Medina *et al.*, 2016).

De forma similar que en mamíferos, en levaduras, el complejo de G1 Cln3-Cdk1 inicia la transición mediante la fosforilación y la inactivación parcial de Whi5, un inhibidor del factor de transcripción SBF (Costanzo *et al.*, 2004; de Bruin *et al.*, 2004; Sidorova & Breeden, 1993). Esto permite la transcripción dependiente de SBF de las ciclinas de G1 CLN1 y CLN2 en sentido descendente, que también inactivan Whi5 para completar un circuito de retroalimentación positiva (Skotheim *et al.*, 2008). Ningún miembro del complejo de factor de transcripción SBF-Whi5 exhibe identidad de secuencia de aminoácidos o similitud estructural con ningún miembro del complejo E2F-Rb (Cross *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2013); a pesar de que no existe homología, la función bioquímica de los reguladores G1 como sus objetivos específicos están altamente conservadas.

1.5 Familia de factores transcripcionales E2F

Los factores de transcripción E2F se identificaron originalmente con estudios en adenovirus humano, con los cuales descubrieron a una proteína celular capaz de unirse y activar el promotor del gen E2 adenoviral, es así como fue denominada E2 FACTOR, (factor de unión a promotor E2 de adenovirus) (Helin *et al.*, 1992), posteriormente su socio de dimerización fue identificado (Helin *et al.*, 1993).

Estudios posteriores demostraron que E2F controla la transcripción de genes esenciales para la división celular (Dyson, 1998). Estos genes codifican proteínas reguladoras del ciclo celular (ciclina E, ciclina A, Cdc2, Cdc25, Rb y E2F1), enzimas que participan en la biosíntesis de nucleótidos (dihidrofolato reductasa, timidilato sintasa y timidina cinasa) y componentes principales de la maquinaria de replicación del DNA (Cdc6, ORC1, PCNA y MCM). Además, se ha identificado la participación de E2F en otros procesos biológicos como mitosis, reparación y recombinación del DNA, apoptosis, diferenciación y desarrollo (Stevaux & Dyson, 2002; Ren *et al.*, 2002; Bracken *et al.*, 2004; Dimova & Dyson, 2005; DeGregori & Johnson, 2006).

1.5.1 Subgrupos de la familia E2F

El primer miembro de la familia de genes E2F que se clonó fue *E2F1*. Otros miembros de la familia E2F se clonaron posteriormente mediante la homología con E2F1 o mediante la unión a proteínas relacionadas con Rb (Lees *et al.*, 1993; Sardet *et al.*, 1995; Trimarchi *et al.*, 1998). En mamíferos existen ocho genes miembros de la familia E2F (*E2F1- E2F8*), de los cuales el gen de E2F3 codifica para dos proteínas denominadas E2F3a y E2F3b (Leone *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000).

E2F1 a E2F6 requieren dimerización con una de las tres proteínas DP (DP1, DP2/3 o DP4) para formar factores de transcripción funcionales que se unen al DNA con alta afinidad (Bandara *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1996). La función del heterodímero E2F-DP está determinada principalmente por la subunidad E2F. La actividad transcripcional de E2F1-5 se regula a través de su asociación con Rb o las proteínas pocket, p107 y p130. E2F1, E2F2 y E2F3 se asocian principalmente con Rb cuando se encuentra en un estado hipofosforilado. E2F4 y E2F5 pueden asociarse con cada una de las tres proteínas pocket (Moberg, Starz & Lees, 1996; Gaubatz *et al.*, 2000).

Los miembros de la familia E2F se han dividido en varias subclases en función de sus propiedades reguladoras de la transcripción (Figura 4). E2F1, E2F2 y E2F3a se denominan E2Fs activadores porque activan transcripcionalmente los genes blanco de E2F. Esta subclase de E2Fs se expresa de una manera ciclo celular dependiente con niveles máximos en la fase G1 tardía y S temprana. Otra subclase, que incluye E2F3b, E2F4 y E2F5, se conocen como E2Fs represores porque su función principal parece ser reprimir la transcripción de los genes blanco de E2F cuando están en asociación con miembros de la familia Rb. Esta subclase se expresa constitutivamente, pero la represión transcripcional por estos factores ocurre principalmente en células en fase G1 inactivas y tempranas. E2F6, E2F7 y E2F8 también funcionan como represores transcripcionales de los genes blanco E2F, pero lo hacen independientemente de los miembros de la familia pocket (Christensen *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 2004; Di Stefano, Jensen, & Helin, 2003).

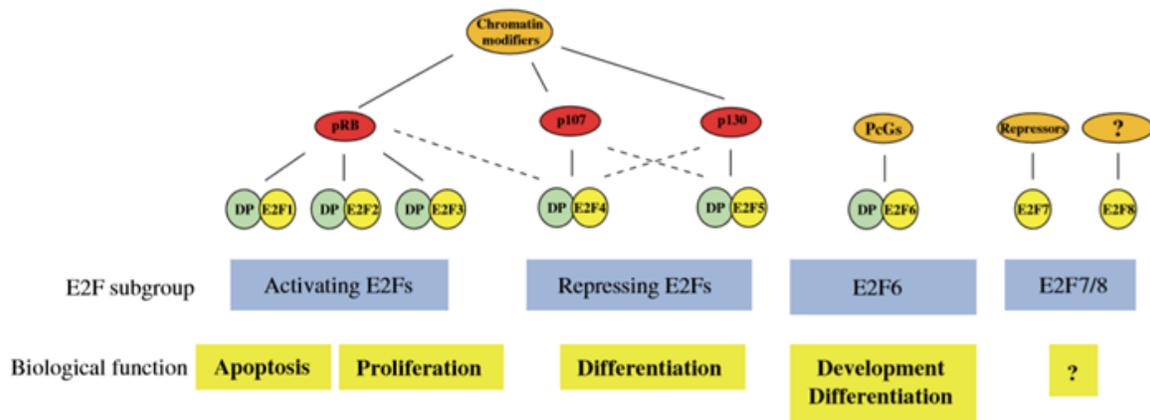


Figura 4. Representación esquemática de los subgrupos de factores de transcripción E2F. La familia E2F se divide en al menos cuatro subgrupos definidos por su regulación por proteínas *pocket* y modificadores de cromatina, y por su función fisiológica de activación o represión. Modificado de Attwooll, Denchi & Helin, 2004.

1.5.2 Motivos y dominios de los miembros de la familia E2F

El mayor grado de identidad entre los miembros de la familia E2F se encuentra en el dominio de unión a DNA (DBD), todos los miembros lo conservan, lo que es consistente con el descubrimiento de que cada uno se une a la secuencia consenso E2F. No obstante, hay evidencia acumulada de que diferentes miembros de la familia E2F se unen y regulan conjuntos distintos de genes blanco (DeGregori & Johnson, 2006).

E2F1- 5 poseen un dominio de transactivación, involucrado en la activación transcripcional de sus genes blanco. Dentro de este dominio hacia el extremo carboxilo conservan un motivo de aminoácidos por el cual pueden unirse a proteínas de la familia *pocket*.

Las proteínas E2F1-6 tienen un dominio de heterodimerización que les permite la interacción con DP. E2F7 y E2F8 no interaccionan con DP, y pueden unirse al DNA por sí mismos ya sea como homodímeros o heterodímeros ya que presentan dos dominios de unión a DNA separados, uno hacia su extremo N- terminal y otro hacia el C- terminal, ambos necesarios para la unión al sitio consenso de DNA (Di Stefano *et al.*, 2003). Finalmente, E2F1-6 poseen dos regiones que podrían estar implicadas en la dimerización con DP, una zona rica en leucinas (LZ) y otra conocida como *marked box* (MB) (Figura 5).

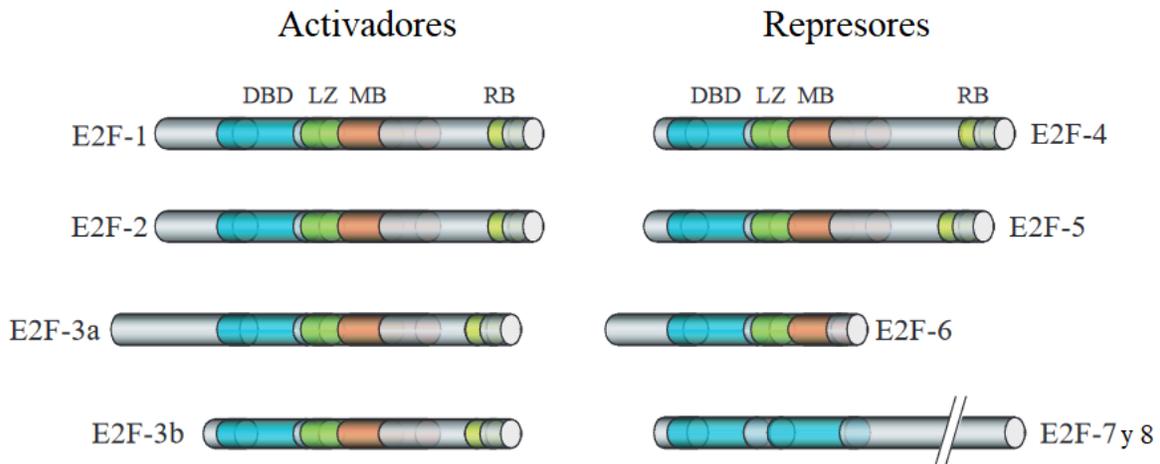


Figura 5. Estructura de los miembros de la familia E2F. E2F1-6 poseen un dominio de unión a DNA (DBD), se muestra en azul, y un dominio de dimerización con DP que incluye dos motivos: una secuencia de leucinas (LZ) en verde, y un marked box (MB) en naranja. E2F7 y 8 tienen dos DBD distintos (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano *et al.*, 2003). E2F1-5 poseen un dominio de transactivación dentro del cual hacia su C-terminal contiene un motivo que media la asociación con miembros de la familia *pocket* (RB). Modificado de Frolov & Dyson, 2004.

1.6 E2F en plantas

Uno de los componentes de la vía E2F- Rb, la proteína relacionada a Rb (RBR), y su gen, fueron identificados en plantas (Grafi *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996). Luego, E2F (Ramirez-Parra *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 1999) y su socio de dimerización DP (Magyar *et al.*, 2000; Ramirez-Parra *et al.*, 2000) fueron clonados. En conjunto, los estudios revelaron que la vía RBR- E2F- DP está conservada en plantas (Shen, 2002).

Las proteínas E2F y DP han sido identificadas en varias especies de plantas incluyendo trigo, tabaco, zanahoria, *Arabidopsis* y arroz (Albani *et al.*, 2000; Kosugi & Ohashi, 2002). *Arabidopsis* contiene ocho proteínas que pueden clasificarse por similitud de secuencia en los grupos E2F, DP y DEL (DP and E2F Like). Tres de éstas (E2Fa, b y c) contienen los dominios para la unión con el DNA, la dimerización con DP, la interacción con RBR y para la regulación transcripcional, así como un dominio de heterodimerización, y *marked box* (Mariconti *et al.*, 2002), una organización similar a las proteínas E2F1-E2F5 de animales. E2Fa y E2Fb presentan propiedades de activación transcripcional mientras que E2Fc tiene naturaleza represora.

Las proteínas AtDEL1, 2 y 3 forman un grupo con características únicas que no se han descrito en animales. Cada uno contiene dos dominios de unión a DNA de alta homología con las proteínas E2F y DP, y su función es independiente de DP, estas propiedades se comparten con los E2Fs de mamíferos E2F7 y E2F8, sin embargo, carecen de otras regiones conservadas. *Arabidopsis* contiene dos proteínas DP (DPa y DPb) que también están relacionadas estructuralmente con la proteína DP1 humana, comparten un dominio de unión al DNA y un dominio de dimerización (Figura 6).

El dominio de unión a DNA es el más conservado en la secuencia de aminoácidos entre todos los miembros de la familia E2F de plantas, así como entre las proteínas E2F animales. Los factores de transcripción E2F de humanos se unen al sitio de consenso, TTTSSCGS (S es un nucleótido G o C) (Black & Azizkhan-Clifford, 1999; Zheng *et al.*, 1999). Mientras que, en plantas, en *Arabidopsis* la secuencia reportada es ligeramente más larga TTTSSCGSS (Ramírez- Parra *et al.*, 2003)

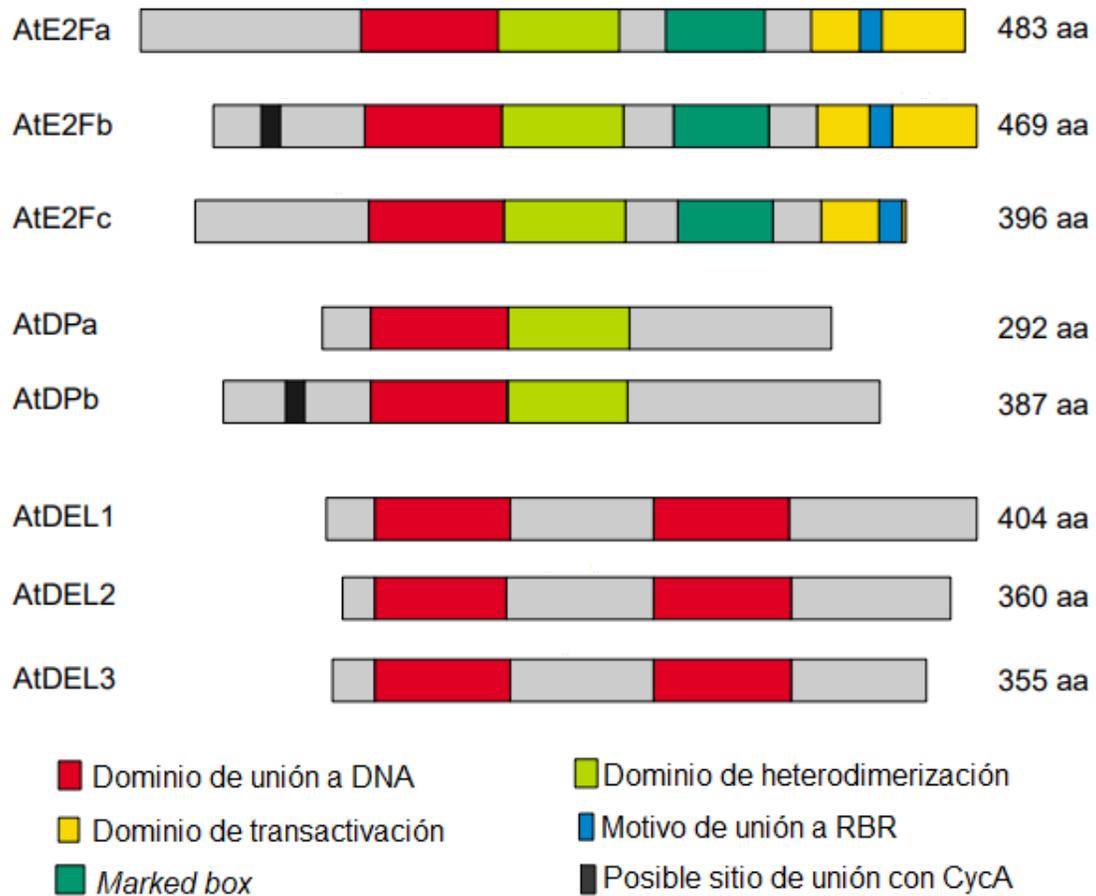


Figura 6. Organización estructural de las proteínas de la familia E2F y DP de *Arabidopsis*. Se muestran motivos y dominios presentes en los factores transcripcionales E2F- DP. Modificado de Shen, 2002.

2 Antecedentes

En el laboratorio se ha caracterizado previamente a la familia de factores transcripcionales E2F presentes en el genoma de maíz. Debido a que no se contaba con información disponible se realizó un análisis en busca de genes con homólogos tanto de humano, como de plantas. La búsqueda arrojó inicialmente 25 posibles secuencias E2F, sin embargo, análisis más detallados permitieron descartar formas de splicing alternativo o genes con regiones similares a E2F, quedando así un total de 12 posibles genes de la familia E2F. Los genes fueron nombrados por medio de un análisis filogenético en el que se estudiaron dos genomas de plantas cuyos miembros ya han sido reportados (*Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*) y siete especies adicionales (*Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera*, *Setaria italica*, *Brachypodium distachium*, *Sorghum bicolor* y *Zea mays*). Con las secuencias se construyeron árboles filogenéticos de arroz y *Arabidopsis* (Figura 7) y para cada subgrupo de la familia incluyendo a las 9 especies, se encontró que todos los miembros conservan aquellos dominios y motivos característicos de la familia (Sánchez-Camargo, en preparación).

Posteriormente, se probó la funcionalidad de los genes de maíz, estudiando los niveles de expresión en diferentes tejidos de la plántula como hoja, zona meristemática de la raíz, coleóptilo, y eje embrionario de semilla seca o embebida en agua por 6, 12, 18 y 24 horas. Bajo las condiciones de este estudio, se encontró que únicamente 9 de los 12 genes candidatos se expresan. Sin embargo, no se descarta la funcionalidad del resto de los genes (Sánchez- Camargo, en preparación).

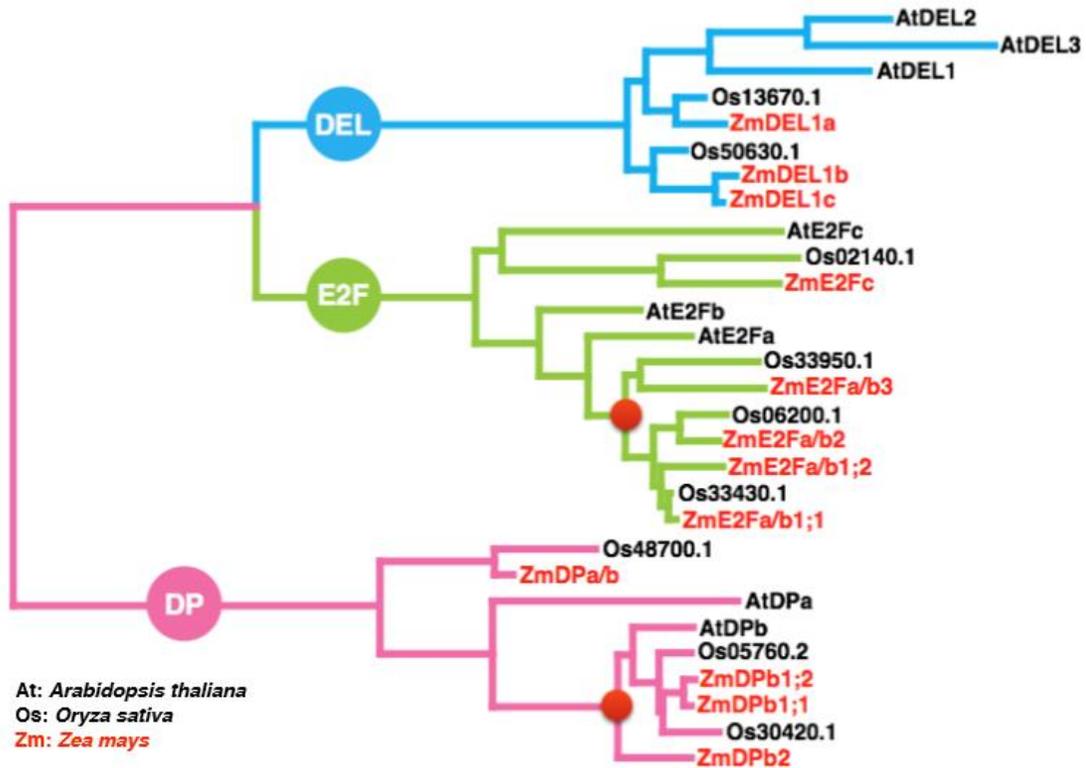


Figura 7. Árbol filogenético construido con las secuencias proteicas de E2F, DEL y DP de *Arabidopsis* (At), arroz (Os) y maíz (Zm). Se observa la formación de tres grupos correspondientes a E2F (verde), DEL (azul) y DP (rosa). Los círculos rojos denotan al grupo de las gramíneas. Sánchez- Camargo, en preparación.

Finalmente, tres candidatos fueron clonados y expresados en *E. coli*. Se decidió clonar dos miembros E2F típicos; ya que no se conocía su función. La posición en los árboles filogenéticos fue el criterio para seleccionar ambas proteínas, una de ellas con posible función de activador transcripcional, E2FA/B1;1, y otro con función represora, E2FC. También se eligió un miembro del subgrupo DP, DPB2 para utilizarlo como socio de dimerización para ambos E2F. Con las proteínas recombinantes producidas se demostró la formación de complejos E2FA/B1;1- DPB2 y E2FC- DPB2, así como la interacción de estos complejos con DNA de doble cadena. Se utilizó la caja -4 del promotor de PCNA1 de maíz, que conserva un sitio E2F idéntico al reportado por Ramírez- Parra y colaboradores (2003). La interacción de ambos E2F fue exitosa con esta caja, además, se demostró que es necesaria la presencia de ambas subunidades del heterodímero para que ocurra la asociación con afinidad al DNA (Figura 8). Se estudió también la interacción *in vitro* con otros sitios E2F en los promotores de genes de la maquinaria de replicación en maíz,

MCM3;1, RPA2 y PCNA1, demostrando que los distintos complejos E2F-DP muestran mayor o menor afinidad por ciertas secuencias de DNA. (Sánchez- Camargo, en preparación)

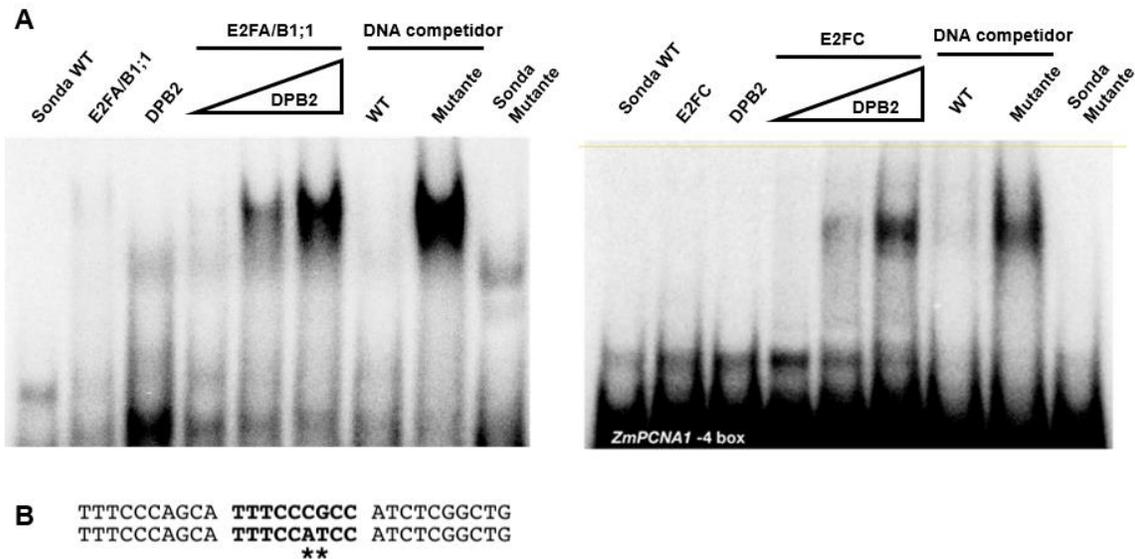


Figura 8. Estudio de la asociación de las proteínas E2F con la caja -4 del promotor de PCNA1 de maíz, ensayos de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA). **A)** Se incubaron 500 ng de las proteínas E2FA/B1;1 (panel izquierdo) y E2FC (panel derecho) solas o con cantidades crecientes de DPB2, con 5 fmol de sonda de doble cadena marcada radioactivamente. A los ensayos de competencia con las sondas frías se añadió a la reacción la sonda de DNA correspondiente en un exceso de 1000 veces. **B)** Sonda mutante, se indican con asteriscos los nucleótidos sustituidos en el motivo canónico. Sánchez- Camargo, en preparación.

3 Justificación

En el laboratorio se ha estudiado recientemente la presencia de la familia de factores transcripcionales E2F en el genoma de maíz, así como algunas características de la familia, como la expresión de sus genes, la interacción E2F-DP y la interacción de estos heterodímeros con los promotores de sus genes blanco. Sin embargo, la función transcripcional de estas proteínas permanece desconocida; aunque existe información filogenética que las relaciona con E2F de otras especies cuya función de activación o represión transcripcional ha sido reportada. Determinar la función de dichas proteínas aumentará el conocimiento acerca de la familia E2F, así como de la regulación transcripcional durante la transición de la fase G1/S y la progresión del ciclo celular en maíz.

4 Hipótesis

Con base en la identidad y posición en el árbol filogenético construido con las secuencias proteicas de maíz, *A. thaliana* y otras plantas, se infiere que la proteína ZmE2FA/B1;1 activará la transcripción, mientras que ZmE2FC no lo hará.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

-Determinar la función transcripcional de las proteínas E2FA/B1;1 y E2FC de maíz

5.2 Objetivos particulares

-Clonar el marco abierto de lectura de E2FA/B1;1 y E2FC en vectores de expresión para levadura

-Estudiar la capacidad transcripcional cualitativa y cuantitativa de las proteínas E2FA/B1;1 y E2FC mediante ensayos de transactivación en levadura

6 Metodología

Tabla 2. Genes clonados en vectores de expresión para levadura. Se enlistan los genes clonados en los diferentes vectores y sus respectivas delecciones. El gen 6 es un producto de la fusión de los genes marcados en gris. La estructura de las proteínas cuyos cDNAs fueron clonados se muestra en la figura 10.

| Construcciones en el vector pEG202 | | Construcciones en los vectores pDEST22 y pJG4-5 |
|------------------------------------|---|---|
| 1 | <i>E2FA/B1;1</i> WT (GRMZM2G041701) | 7 <i>E2FA/B1;1</i> WT |
| 2 | <i>E2FA/B1;1</i> ^N _{Δ313-462} | 8 <i>E2FC</i> WT |
| 3 | <i>E2FA/B1;1</i> ^C _{Δ1-313} | |
| 4 | <i>E2FC</i> WT (GRMZM2G050590) | |
| 5 | <i>E2FC</i> ^N _{Δ451-468} | |
| 6 | <i>E2FC</i> WT- <i>E2FA/B1;1</i> ^{C-TAD} | <i>E2FC</i> WT |
| | | <i>E2FA/B1;1</i> ^{C-TAD} |

6.1 Clonación de los genes *ZmE2FA/B1;1*, *ZmE2FC* y sus delecciones de dominios

Los marcos abiertos de lectura de los genes *ZmE2FA/B1;1* y *ZmE2FC* y sus respectivas delecciones de dominios se amplificaron por medio de PCR, utilizando como templado las construcciones pPAL7/*E2FA/B1;1* y pPAL7/*E2FC* respectivamente, previamente generadas en el laboratorio, con los *primers* diseñados en la región codificante de cada cDNA (Apéndice 2, tabla A1 y A2). La reacción de PCR se hizo con la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (BioRad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una fracción de cada producto de PCR fue monitoreada en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio, obteniendo una banda única en el tamaño esperado para cada gen. La fracción restante de cada producto de PCR fue purificada con el kit Expin PCR SV (GeneAll).

Los productos de PCR purificados fueron cuantificados y aproximadamente 1 µg de cada uno fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (Promega) y *NcoI* (Thermo Scientific), así como el vector de expresión para levadura pEG202 (donado por el laboratorio del Dr. Roberto Coria del Instituto de Fisiología Celular, UNAM) (Apéndice 3, figura A2), con el siguiente procedimiento: 30 minutos de incubación del DNA a 37°C con 1 U de la enzima 1

(*EcoRI*), después se le añadió 0.5 U más de enzima 1 y 1U de la enzima 2 (*NcoI*) y se incubaron 30 minutos, finalmente se le añadió 0.5U más de enzima 2 y se incubaron 30 minutos adicionales. Las digestiones (inserto y vector) fueron purificadas con el kit Expin PCR SV y cuantificadas. Después, se llevó a cabo la ligación con una proporción 3:1 (inserto: vector), con 50 ng de vector y la cantidad calculada para cada gen digerido. Para la reacción de ligación se utilizó la enzima T4 DNA Ligase (Promega), las reacciones fueron incubadas durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se incubó una fracción del producto de ligación (5 µl) con 100 µl de células *CaCl*₂-competentes de la cepa de *E. coli* XL10-Gold (Tet^R, Cm^R), en hielo durante 25 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se les dio un choque térmico a 42.5°C durante 30 segundos y nuevamente fueron incubadas en hielo por 5 minutos. Posteriormente se les agregó 1 ml de medio líquido LB, y se recuperaron durante 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, fueron centrifugadas a 12000 x g durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 100 µl de medio líquido LB y plaqueadas en cajas Petri con medio LB agar con ampicilina (50 µg/ml), cloranfenicol (25 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml).

Para la selección de colonias positivas, se inocularon 5 colonias candidatas de cada construcción en medio líquido LB con los antibióticos de selección (ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina), a 37°C en agitación durante toda la noche. Posteriormente se extrajo plásmido de las células con el kit Zippy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Se cuantificó el DNA, y se realizaron reacciones de PCR con los primers de cada gen y ensayos de doble restricción con las enzimas *EcoRI*/*NcoI*. Ambos experimentos se monitorearon en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

Finalmente, se secuenció el plásmido de una colonia positiva de cada construcción en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM, empleando un oligonucleótido sentido, complementario a una región del dominio de unión a DNA de LexA del vector pEG202 (permite verificar que el marco de lectura de la fusión traduccional sea correcto), y con el antisentido con el cual se amplificó cada gen (*ZmE2FA/B1;1*, *ZmE2FC* y sus deleciones), para corroborar la secuencia del inserto.

Para la clonación de los controles *ZmE2FA/B1;1* y *ZmE2FC* fusionados al dominio de activación de B42 en el vector pJG4-5 (donado por el laboratorio del Dr. Roberto Coria, del

Instituto de Fisiología Celular, UNAM) (Apéndice 3, figura A3), se siguió la metodología anterior empleando las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (Gibco).

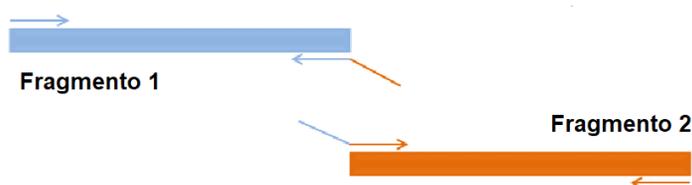
6.1.1 Clonación de la fusión *E2FC WT- E2FA/B1;1^{C-TAD}*

Para generar la fusión de *E2FC WT* con *E2FA/B1;1^{C-TAD}* se amplificaron los fragmentos por separado mediante PCR, con sus respectivos *primers*, de los cuales el *primer forward* de *E2FA/B1;1* y el *primer reverse* de *E2FC* permitieron posteriormente la fusión entre los dos genes, ya que estos son complementarios (Apéndice 2, tabla A1). El fragmento de *E2FA/B1;1* fue amplificado con un primer reverse (Tabla A1, *primer* número 11) que amplificó hasta la región 3' UTR, para facilitar la manipulación y purificación del fragmento.

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima iProofTM High- Fidelity PCR Kit, usando como templado pPAL7/*E2FA/B1;1* para el fragmento de *E2FA/B1;1^{C-TAD}*, y pPAL7/*E2FC* para amplificar a *E2FC WT*, siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Una fracción de las reacciones fue monitoreada en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio y el resto de cada reacción fue purificado por columna con el kit ExpinTM PCR SV.

Después se llevó a cabo una reacción de PCR para fusionar ambos fragmentos, con el siguiente procedimiento: en un tubo se preparó una mezcla de agua, buffer HF 5X (BioRad), 5 ng del fragmento de *E2FC WT* y 1 ng del fragmento *E2FA/B1;1^{C-TAD}* (cantidades calculadas para una proporción 1:2 dependiente del tamaño de cada fragmento), esta mezcla fue desnaturalizada a 98°C durante 2 minutos, posteriormente la reacción se mantuvo a una temperatura de 25°C durante 30 minutos para que los *primers* complementarios de cada fragmento se alinearan, después se agregó la enzima iProofTM High- Fidelity PCR Kit y dNTPs (0.2 mM), seguido de un paso de extensión a 72°C por 15 minutos. Finalmente, se agregaron los *primers* para amplificar el fragmento ya fusionado (*forward* *E2FC WT* y *reverse* *E2FA/B1;1 WT*) y se le dieron 35 ciclos de PCR. La figura 9 muestra un esquema de los pasos de una PCR de fusión.

PCR 1. Amplificación de fragmentos por separado



PCR 2. Fusión de fragmentos

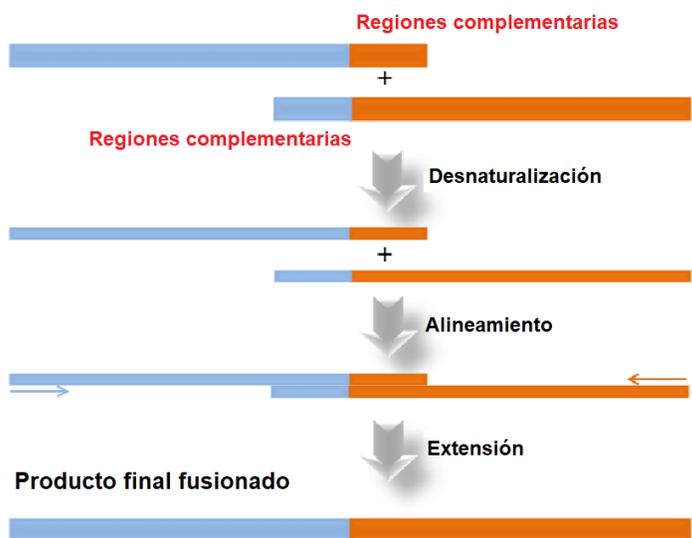


Figura 9. Esquema representativo de la PCR de fusión.

Una fracción de la reacción de fusión fue monitoreada en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. La fracción restante del producto fusionado fue purificada con el kit Expin PCR SV. El producto purificado fue adenilado con dATP (Invitrogen) 0.2 mM, Actaq polimerasa (ACTGene) y buffer 10X (ACTGene) en una reacción de 10 μ l, la cual se incubó a 70°C durante 30 minutos. El producto adenilado (2 μ l) se ligó al vector (50 ng) pGEM®-T Easy (Promega) (Apéndice 3, figura A6), siguiendo el protocolo del fabricante. En la reacción de ligación se utilizó la enzima T4 DNA Ligase, se dejó incubar a 4°C durante toda la noche. Con una fracción de la reacción de ligación (5 μ l) se transformaron bacterias CaCl₂-competentes de *E. coli* de la cepa XL1- Blue (Tet^R), siguiendo el protocolo de transformación antes mencionado. El plásmido pGEM- T easy confiere resistencia a ampicilina y tiene como reportero al gen *LacZ*, que en presencia de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) permite la selección de colonias blancas y azules, en donde las colonias blancas son posibles positivas. Después de la transformación, se plaqueó el pellet de células resuspendido en aproximadamente 100 μ l de medio líquido LB en una caja

Petri con agar LB con ampicilina (50 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), X- gal (40 µl) e IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) (40 µl). Se incubó durante toda la noche a 37°C.

Se seleccionaron 5 colonias blancas, candidatas positivas, y se cultivaron en medio líquido LB con los antibióticos de selección (ampicilina y tetraciclina), a 37°C en agitación durante toda la noche. Posteriormente se extrajo plásmido de las células con el kit Zippy™ Plasmid Miniprep Kit. El DNA se cuantificó y se realizaron reacciones de PCR con diferentes juegos de *primers* para comprobar la presencia del inserto. Las reacciones fueron monitoreadas en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio, obteniendo bandas en el tamaño esperado.

El plásmido de la clona positiva se utilizó como templado para subclonar en el vector pEG202, amplificando el inserto de la fusión con el par de *primers* con los sitios de las enzimas *EcoRI* y *NcoI* (Apéndice 2, tabla A1). Las restricciones y ligación del inserto con el vector, así como la transformación y selección de colonias positivas, se llevó a cabo siguiendo la metodología antes mencionada, con la cual se clonaron las demás construcciones.

Las clonas positivas de pGEM/E2FC WT-E2FA/B1;1^{C-TAD} y pEG202/E2FC WT-E2FA/B1;1^{C-TAD} fueron verificadas por secuenciación.

6.2 Ensayo de transactivación en *Saccharomyces cerevisiae*

Se realizó un pre-cultivo de células EGY48 (genotipo: *MATα, ura3, his3, trp1, LexAop (6x)::LEU2*) de *Saccharomyces cerevisiae* (donada por el laboratorio del Dr. Roberto Coria) en 5 ml de medio líquido YPD, inoculando una colonia y se incubó en agitación a 30°C durante toda la noche. Posteriormente, se inocularon 20 ml de medio líquido YPD con el 5% del pre-cultivo hasta obtener una DO₆₀₀ inicial de 0.2, y se incubó a 200 rpm, a 30°C durante aproximadamente 3 horas, hasta una DO₆₀₀ de 0.4-0.5.

Las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en 1 ml de H₂O, se transfirió el volumen de células a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 ml y se centrifugaron durante 30 segundos. Las células competentes se prepararon lavando el pellet con 1 ml de TE (Tris- EDTA) / LiOAc (acetato de litio) 1X (preparado en fresco a partir de TE pH 7.5 10X, y LiOAc 1M pH 7.5 10X), nuevamente se hizo pellet y se resuspendió en 200 µl de TE/LiOAc 1X.

En tubos de microcentrífuga se agregaron 50 μ l de las células competentes con aproximadamente 300 ng de plásmido (construcciones en pEG202) y 300 ng del plásmido reportero pSH18-34 (donado por el laboratorio del Dr. Roberto Coria) (Apéndice 3, figura A5), 50 μ g de DNA de espermatozoos de salmón y 300 μ l de PEG 40%/TE/LiOAc (preparado en fresco con 1 volumen de TE 10X, 1 volumen de LiOAc 10X y 8 volúmenes de PEG 3350 50%), se mezcló y se incubaron a 200 rpm, a 30°C durante 30 minutos. Posteriormente, se les agregó 40 μ l de DMSO y se les dio un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Finalmente, se hizo pellet de las células y se resuspendieron en 100 μ l de H₂O, se plaquearon en agar SD suplementado con triptófano y leucina (Sigma) y se incubaron durante 3 días a 30°C.

Para la selección de colonias positivas, se seleccionaron 20 colonias candidatas y se duplicaron en medio sólido SD suplementado con triptófano y leucina, y se incubaron a 30°C durante un día. Posteriormente, las 20 colonias fueron duplicadas en un medio sólido SD sin leucina.

6.3 Ensayo de actividad de β - galactosidasa

Se inoculó una colonia de cada construcción en 4 ml de medio selectivo SD líquido suplementado con triptófano y leucina, y se incubó a 30°C a 200 rpm durante 12-15 h. Después, se utilizó una proporción de este pre- cultivo para inocular 20 ml del mismo medio selectivo iniciando con una DO₆₀₀ de 0.2, y se incubó a 30°C, de 6- 8 h, a 200 rpm hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.7- 1. Una vez que las células llegaron a la densidad óptica adecuada, se centrifugaron 15 unidades de DO a 3500 rpm durante 5 minutos, posteriormente el pellet se lavó con 1 ml de agua, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 500 μ l de buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl y 1 mM MgSO₄, pH 7.0), y se agregaron a un tubo de microcentrífuga con 500 μ l de perlas de vidrio. Las células se lisaron agitando el tubo en vortex por 1 minuto, y después se incubaron 1 minuto en hielo, repitiendo esto 4 veces. Después de la lisis, se centrifugaron las células a 12000 rpm durante 2 minutos y se recuperó el sobrenadante (extracto proteico). Los extractos proteicos fueron cuantificados por el método de absorbancia a 280 nm.

Para el ensayo de actividad se mezcló en celdas de plástico 400 μ l de buffer Z, 100 μ l de ONPG (4 mg/ml), β - mercapto etanol (27 μ l/ 10 ml buffer Z) y 100 μ l del extracto proteico, siendo el tiempo inicial cuando este último fue agregado. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 30 minutos, después la reacción se detuvo con 250 μ l de Na₂CO₃ 1M. Finalmente, se midió la densidad óptica del producto de la reacción (o- nitrofenol) a una

longitud de onda de 420 nm. Para el blanco, se utilizó la misma mezcla de reacción, sustituyendo el extracto proteico por agua.

El cálculo de la actividad específica se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{mg} = 1000 * \frac{(Vol\ total)(DO_{420nm})}{(0.0045)(Vol\ valorado)(Tiempo)(Proteína)}$$

Vol total= Volumen total de reacción (0.850 ml)

DO_{420nm}= Densidad óptica del producto o-nitrofenol a 420 nm

0.0045= DO de una solución de o-nitrofenol a una concentración de 1 nmol/ ml

Vol valorado= Volumen de extracto proteico utilizado (0.1 ml)

Tiempo= Tiempo de reacción expresado en minutos

Proteína= Concentración del extracto proteico expresado en mg/ml

7 Resultados

7.1 Clonación de *ZmE2FA/B1;1*, *ZmE2FC* y sus respectivas delecciones de dominios en vectores de expresión para levadura

Se seleccionaron dos genes de la familia de E2F de maíz para clonar en vectores de expresión para levadura, con el objetivo de determinar la función transcripcional de las proteínas, *ZmE2FA/B1;1* que podría presentar función de activación de la transcripción y *ZmE2FC*, posible represor. Esta hipótesis se infirió con base en la posición que ocupan en árboles filogenéticos construidos con secuencias proteicas de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera*, *Setaria italica*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor* y *Zea mays*, en donde *ZmE2FA/B1;1* se posicionó en el clado de los activadores y *ZmE2FC* en el subgrupo de los represores.

La figura 10 muestra la estructura de dominios de las proteínas cuyos cDNAs fueron clonados. Se puede observar que las proteínas E2F poseen un dominio de unión al DNA en su amino terminal, y hacia el extremo carboxilo un dominio de transactivación dentro del

cual presentan una secuencia corta de aminoácidos de unión a RBR. Además, cuentan con otros elementos funcionales (zipper de leucinas y *marked box*) que podrían estar implicados en la dimerización con proteínas de la familia DP.

Para este proyecto, se generaron mutantes estratégicas de las proteínas E2F para evaluar su función. Se clonó la proteína E2FA/B1;1 *wild type* (WT), y las mutantes correspondientes a las regiones amino y carboxilo terminal, E2FA/B1;1^N_(Δ313-462) y E2FA/B1;1^C_(Δ1-313), respectivamente. También se clonó la proteína WT de E2FC y una mutante de ésta, a la que se le deletó la secuencia de aminoácidos correspondiente al motivo de unión a RBR, E2FC^N_(Δ461-468).

Como puede observarse en la figura 10, la proteína E2FC nativa termina en el motivo de unión a RBR, mientras que E2FA/B1;1 después de este motivo tiene un fragmento de 40 aminoácidos adicionales (Alineamiento más detallado en el apéndice 1, figura A1). Como ya se mencionó, E2FC podría tener función represora, de ahí surgió la pregunta de si esta función la adquirió al carecer de dicha región, es decir, que pudo perderlo durante la evolución de los genes de la familia y a partir de eso adquirir otra función. Por lo tanto, se decidió clonar una secuencia producto de la fusión del gen de E2FC WT con el fragmento de 120 pb del gen de E2FA/B1;1 que codifica los 40 aminoácidos finales de la proteína, dando como resultado una proteína de 508 aminoácidos, E2FC WT- E2FA/B1;1^{C-TAD}.

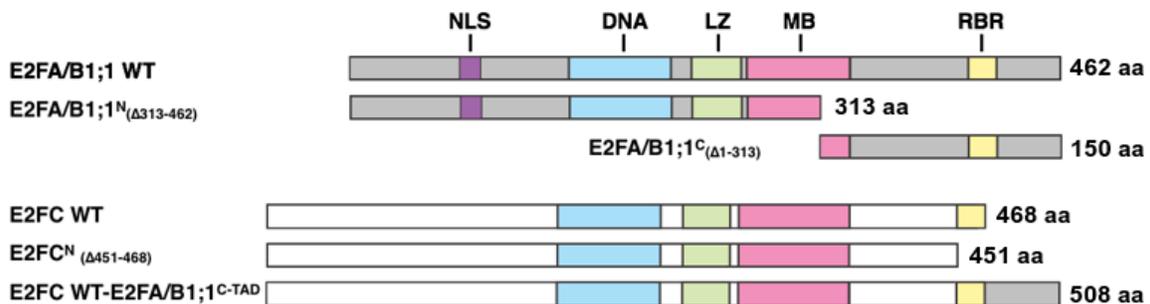


Figura 10. Estructura esquemática de las proteínas E2F y sus respectivas mutantes clonadas.

Se indican elementos funcionales. NLS, señal de localización nuclear; DNA, dominio de unión al DNA; LZ, zipper de leucinas; MB, *marked box*; RBR, motivo de unión a RBR.

Las construcciones anteriores fueron clonadas en el vector pEG202 (Figura A2, apéndice 3) para su expresión en levadura, el cual permite la fusión traduccional del dominio de unión a DNA (DBD) de LexA con el inserto.

Las clonas positivas de cada construcción fueron verificadas por medio de ensayos de restricción y reacciones de PCR. La figura 11, muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se monitorearon las colonias seleccionadas como positivas. En el primer carril, para cada construcción se muestra el plásmido extraído sin digerir, posteriormente digerido con las enzimas de restricción *EcoRI/NcoI*, con las cuales se llevó a cabo la clonación y finalmente la reacción de PCR con el par de *primers* correspondiente a cada construcción. Las colonias candidatas seleccionadas positivas fueron aquellas en las que, al ser digeridas con las enzimas de restricción, se observó un fragmento escindido del tamaño esperado para cada gen y en un tamaño similar al producto de PCR, lo que indica que el plásmido contiene el inserto de interés.

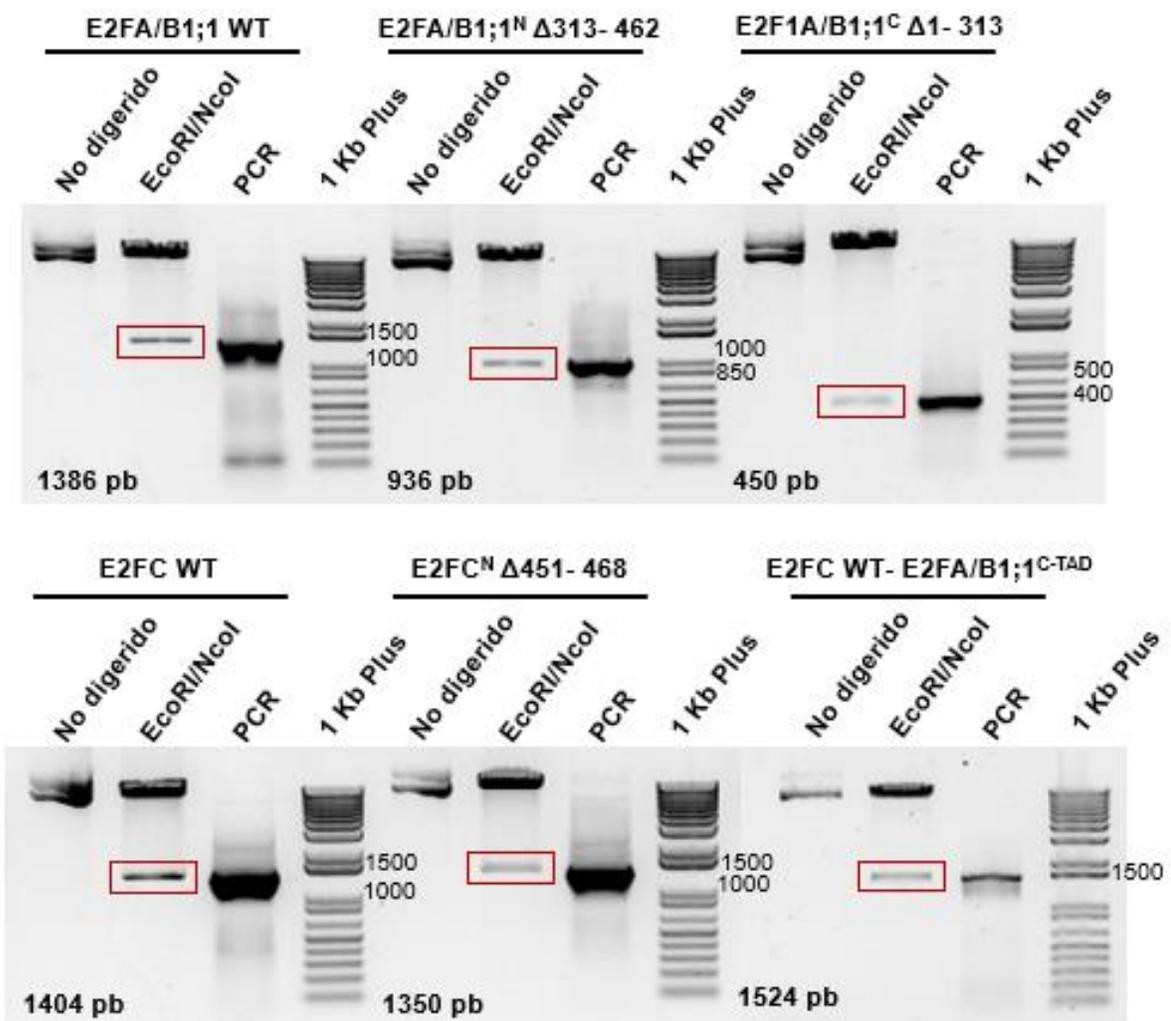


Figura 11. Verificación de las clonas positivas en el vector pEG202. Ensayos de restricción con las enzimas *EcoRI/NcoI*, y reacciones de PCR con los *primers* correspondientes a cada gen.

Además de las construcciones en el vector pEG202, se clonaron controles negativos de E2FA/B1;1 WT y E2FC WT fusionados con un dominio de activación. El gen de E2FC WT fue clonado en el vector pJG4-5, el cual permite la fusión traduccional del inserto con el dominio de activación de B42. La clona candidata positiva fue monitoreada en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, el cual se observa en la figura 12B. El primer carril corresponde al plásmido extraído sin digerir, el segundo al plásmido digerido con las enzimas EcoRI/XhoI y el tercero a la reacción de PCR con el par de *primers* correspondiente al gen. La clona fue confirmada como positiva ya que el fragmento escindido con las enzimas de restricción se observó en el tamaño esperado del gen, y similar al producto de PCR, indicando que el plásmido contiene el inserto deseado.

El gen *E2FA/B1;1* no pudo ser clonado en el vector pJG4-5, debido a que el sitio de clonación múltiple del vector cuenta con sólo dos sitios de restricción para clonar; los sitios *EcoRI* y *XhoI* (Figura A3, apéndice 3). Esta última enzima, *XhoI*, también tiene un sitio de corte en el gen de *E2FA/B1;1*, por lo tanto, era imposible clonar con este par de enzimas.

La construcción se sustituyó por otra previamente desarrollada en el laboratorio; pDEST22/*E2FA/B1;1* (Jorge Zamora Zaragoza, 2015). El vector pDEST22 (Figura A4, apéndice 3), al igual que el vector pJG4-5, permite la fusión proteica del inserto con el dominio de activación de un factor de transcripción, GAL4 en este caso. Esta construcción fue verificada con ensayos de restricción, con las enzimas *XhoI*, obteniendo bandas escindidas de 5334 pb, 1745 pb y 1493 pb, y con la enzima *HindIII* bandas de 5253 pb, 2532 pb y 787 pb, como se observa en la figura 12A, lo cual coincide con el análisis *in silico* del patrón de bandas elaborado con la herramienta “Virtual Cutter” del programa SerialCloner 2.6.1.

Todas las construcciones mencionadas además de ser verificadas con ensayos de restricción y/o reacciones de PCR, fueron secuenciadas. Con los resultados de secuenciación se corroboró la clonación exitosa del DNA, sin observar alteraciones en el marco de lectura de cada construcción ni en su secuencia.

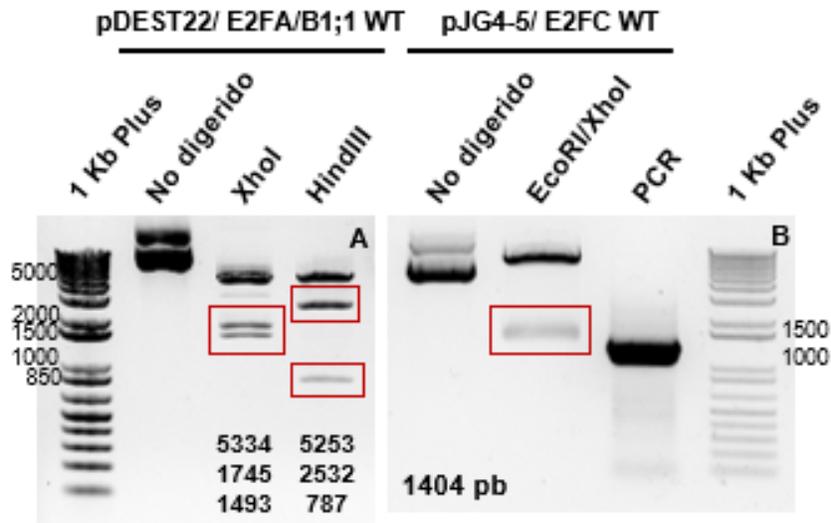


Figura 12. Verificación de las clonas positivas de los genes A) *E2FA/B1;1 WT* y B) *E2FC WT* fusionados a un dominio de activación, en los vectores pDEST22 y pJG4-5, respectivamente. A) Ensayos de restricción con las enzimas *XhoI* y *HindIII*. B) Ensayos de restricción con las enzimas *EcoRI/XhoI*, y reacción de PCR con el par de *primers* correspondientes al gen.

7.2 Determinación de la capacidad transcripcional de las proteínas E2F de maíz

Para determinar la capacidad transcripcional de las proteínas E2F, se utilizaron las construcciones de los plásmidos expresando la fusión LexA-E2F para transformar células de levadura con un sistema reportero dual que responde a la activación transcripcional a través de operadores LexA.

Se transformaron células de *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa EGY48 (*MAT α* , *ura3*, *his3*, *trp1*, *LexAop (6x)::LEU2*), en las que las secuencias activadoras río arriba del gen *LEU2* fueron remplazadas por seis operadores LexA. Además, las células se transformaron con el plásmido reportero pSH18-34, el cual también tiene operadores LexA (8op) río arriba del gen *LacZ*.

En la figura 13, se representa cómo funciona el sistema. La proteína quimérica LexA- E2F por medio del DBD de LexA reconoce y se une a los operadores LexA en los promotores del gen reportero cromosómico *LEU2* y a los promotores del gen reportero *LacZ* en el plásmido pSH18-34. Una vez que la proteína se encuentra unida al DNA, la maquinaria de transcripción es reclutada si E2F actúa como un activador transcripcional, por lo tanto, la

expresión de los genes reporteros es activada, lo cual está representado en el inciso A. En cambio, en la figura 12B se observa lo contrario; la expresión de la proteína quimérica entre E2F y un dominio de activación (AD), ya sea B42 o GAL4, no permite la activación de los genes reporteros, debido a que E2F no reconoce los operadores LexA en los promotores de estos, ya que no son sus genes blanco. Con esto se demuestra que no hay uniones inespecíficas al DNA por parte de E2F.

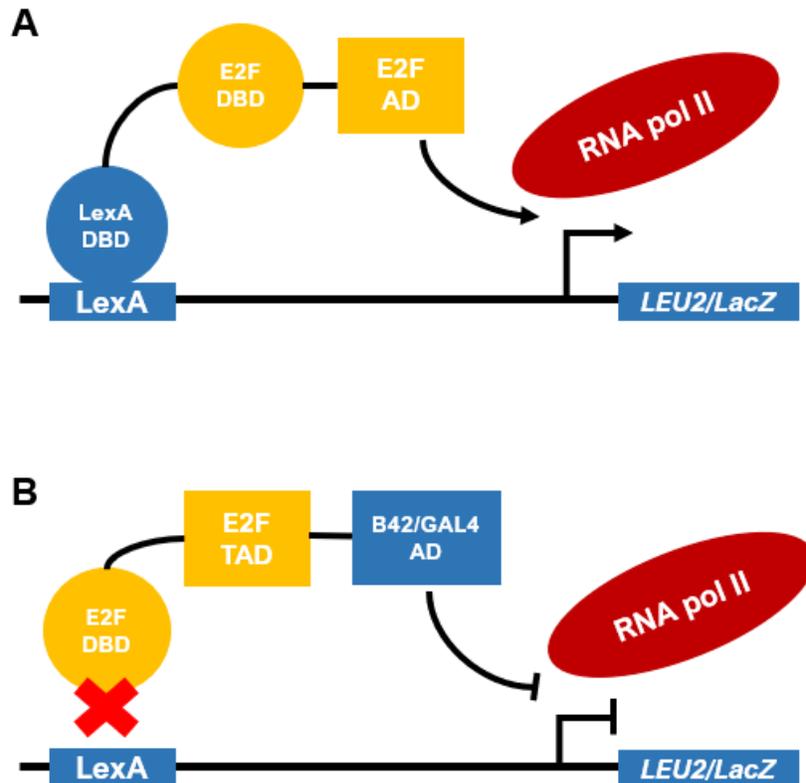


Figura 13. Modelo de transactivación. A) E2F fusionado al DBD de LexA activa la expresión de los genes reporteros. B) E2F fusionado a un dominio de activación, no es capaz de unirse a los promotores de los genes reporteros y activar su expresión.

7.3 Ensayos de transactivación en levaduras

7.3.1 Crecimiento en medios selectivos

Primero se estudió la capacidad transcripcional de las proteínas E2F con el gen reportero *LEU2* de forma cualitativa, evaluando el crecimiento de las levaduras transformadas con los plásmidos expresando el DBD de LexA sin proteína de fusión (vector vacío) o fusionado a E2F o sus delecciones. El gen *LEU2* codifica para una proteína intermediaria en la

biosíntesis de leucina, por lo tanto, las células EGY48 auxótrofas a leucina son capaces de crecer en un medio sin este aminoácido si E2F es capaz de activar la expresión de este gen.

En la figura 14 se puede observar que, las células transformadas con el vector pEG202 vacío no fueron capaces de crecer en el medio sin leucina; el dominio de unión a DNA de LexA tiene la capacidad de reconocer y unirse a los operadores en el promotor del gen *LEU2*, sin embargo, ya que carece de un dominio de transactivación, el gen reportero no se activó. Se sugiere que E2FA/B1;1 es un activador transcripcional, ya que las células transformadas con el vector que expresa esta proteína sí fueron capaces de crecer en el medio sin leucina.

Para determinar la región de E2FA/B1;1 que le permite activar la transcripción, se transformaron levaduras con las construcciones que fusionan a DBD LexA con la región amino (E2FA/B1;1^N_(Δ313-462)) o carboxilo terminal (E2FA/B1;1^C_(Δ1-313)) de la proteína. En la figura 14 se puede observar que, a pesar de que la tasa de crecimiento fue menor con respecto al control, las células transformadas con el vector que expresa el extremo carboxilo terminal sí fueron capaces de sobrevivir en el medio sin leucina, no siendo así con la región del amino terminal, lo que indica que en el carboxilo de E2FA/B1;1 se encuentra la secuencia de aminoácidos necesaria para activar la transcripción.

Las células transformadas con el plásmido que expresa a la proteína E2FC, así como las que fueron transformadas con la mutante de ésta, no fueron capaces de crecer en el medio sin leucina, sugiriendo que la proteína E2FC actúa como un represor o que es incapaz de activar la transcripción. Sin embargo, cuando las células se transformaron con la proteína de fusión E2FC WT-E2FA/B1;1^{C-TAD} fueron capaces de crecer en el medio sin leucina de la misma forma que las que fueron transformadas con la proteína E2FA/B1;1 WT, y de mejor manera que las células transformadas con la región del carboxilo terminal E2FA/B1;1^C_(Δ1-313). Los 40 aminoácidos de E2FA/B1;1 fusionados a E2FC fueron suficientes para activar la expresión del gen *LEU2* aun cuando E2FC WT se comporta como un “no activador”, lo que sugiere que dicha secuencia es importante para la activación de la transcripción.

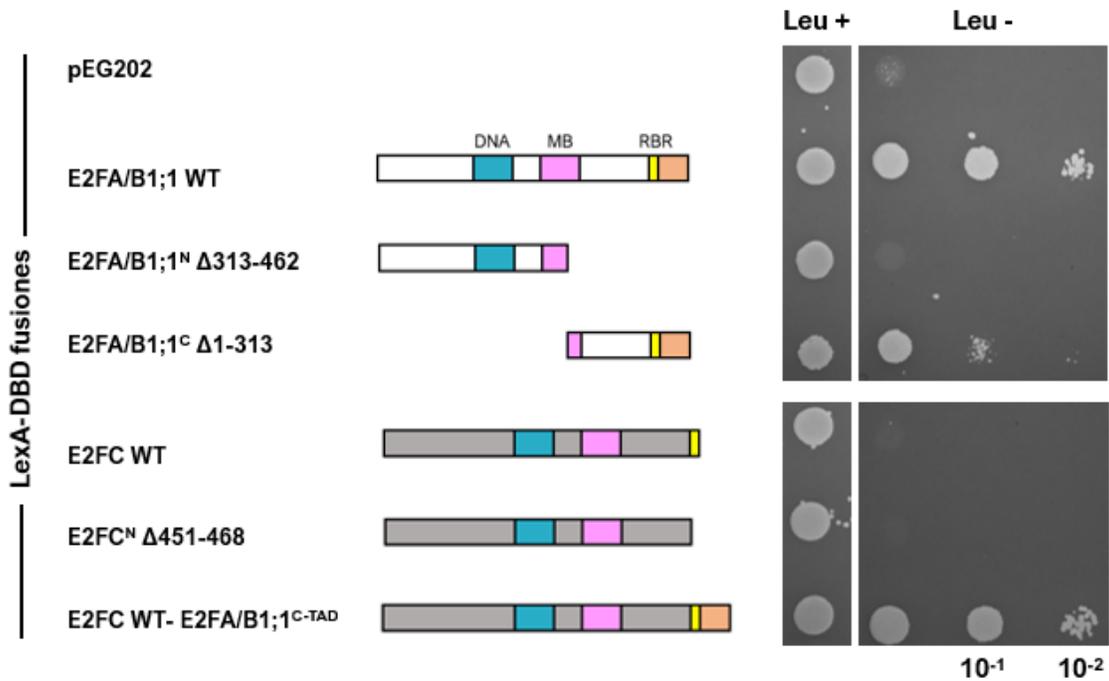


Figura 14. Transactivación en levaduras. Células EGY48 de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas con el plásmido expresando el DBD de LexA solo (vector) o fusionado a E2F o sus deleciones, plaqueadas en diluciones seriadas 10x en medio selectivo con o sin leucina.

Finalmente, como controles se transformaron células con los vectores expresando un dominio de activación (AD), ya sea B42 o GAL4, solo o fusionado a E2F (E2FA/B1;1 o E2FC); como puede observarse en la figura 15, en ningún caso las células fueron capaces de crecer en el medio sin leucina. En el caso de los vectores vacíos que expresan al AD, este dominio no tiene la capacidad de reconocer sitios en el DNA ni unirse a éste, por lo tanto, el gen reportero no fue activado. Con las fusiones de AD- E2FA/B1;1 y AD- E2FC, a pesar de que las proteínas E2F sí tienen capacidad de reconocer secuencias en el DNA y unirse a estas por medio de su propio DBD, no se activó el gen reportero ya que el gen *LEU2* no es blanco de E2F.

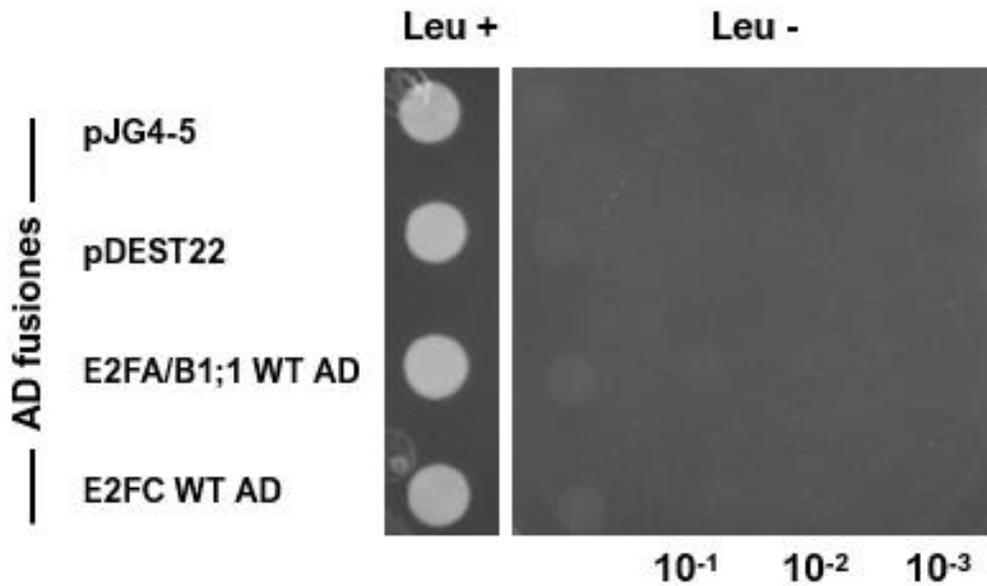


Figura 15. Células transformadas con los vectores expresando un AD solo o fusionado a E2F. Las células fueron plaqueadas en diluciones 10x seriadas en medios selectivos con o sin leucina.

7.3.2 Ensayos de actividad de β - galactosidasa

La potencia de transactivación de las proteínas E2F fue analizada cuantitativamente con el gen reportero *LacZ*, el cual codifica para la enzima β -galactosidasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de β -galactósidos en monosacáridos a través de la ruptura de un enlace glicosídico. Algunos de los sustratos de la enzima son la lactosa y el ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido); el ONPG bajo la acción de la β -galactosidasa se hidroliza en galactosa y o-nitrofenol, el cual es un cromóforo incoloro cuando está ligado a D-galactopiranosido, pero es amarillo en su forma libre (no ligada) a pH alcalino. La actividad de la enzima β -galactosidasa puede ser cuantificada midiendo la cantidad de sustrato convertido a o-nitrofenol a una longitud de onda de 420 nm. De esta manera se pudo determinar cuantitativamente la capacidad de las proteínas E2F para activar la expresión del gen *LacZ* y por consecuencia su traducción a β -galactosidasa y su actividad.

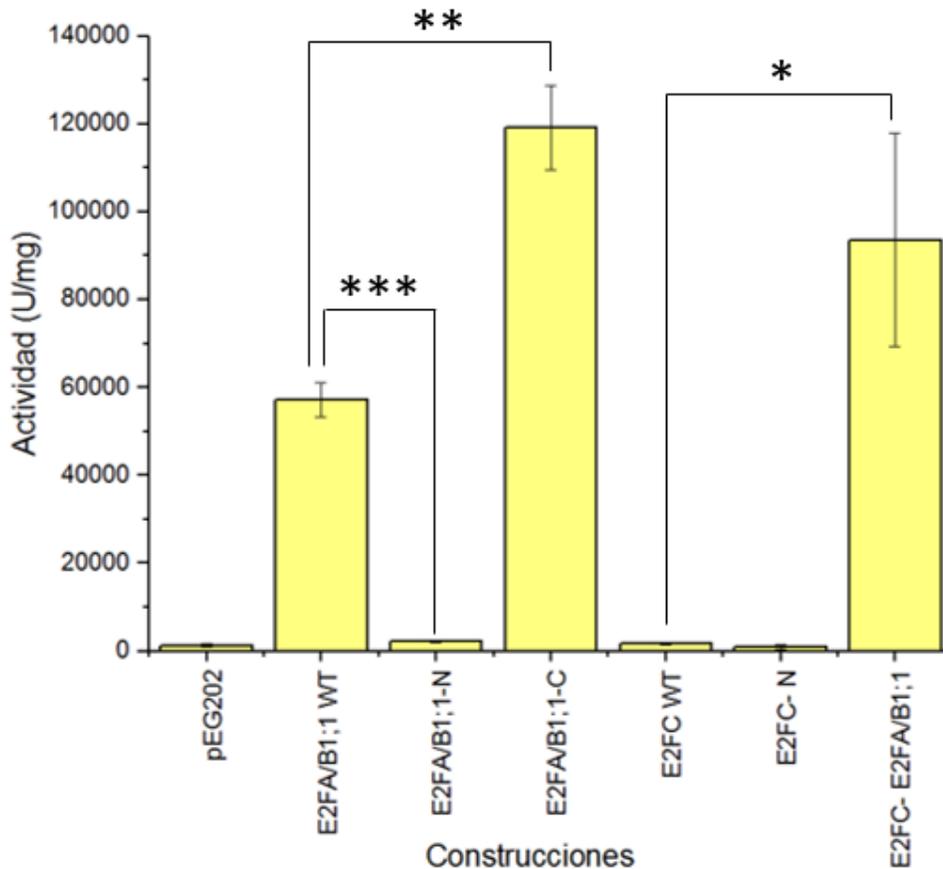


Figura 16. Actividad de β -galactosidasa en levaduras. Células EGY48 de *Saccharomyces cerevisiae* co- transformadas con el plásmido pEG202 expresando el DBD de LexA (pEG202) solo o fusionado a E2F o sus deleciones y con el plásmido reportero pSH18-34. \pm Error estándar; n=3; T- student; *P<0.05; **P<0.005; ***P<0.0005. Los nombres en la imagen corresponden a lo siguiente: E2FA/B1;1- N (Δ 313- 462), E2FA/B1;1- C (Δ 1-313), E2FC- N (Δ 451- 468) y E2FC- E2FA/B1;1 (E2FC WT- E2FA/B1;1^{C-TAD}).

La actividad de la enzima β -galactosidasa se evaluó co-transformando células de levadura con el plásmido expresando al DBD de LexA (vector vacío) o fusionado a E2F o sus mutantes y con el plásmido reportero pSH18-34, posteriormente se extrajo proteína y se ensayó la actividad de la enzima.

La figura 16 muestra la actividad de la enzima de tres réplicas biológicas por construcción. Se puede observar que el vector vacío no generó algún efecto de actividad, mientras que la proteína E2FA/B1;1 WT sí lo hizo, así como su región carboxilo terminal E2FA/B1;1^C(₁₋₃₁₃), que interesantemente generó un efecto de actividad mayor al de proteína WT, resultando estadísticamente significativo al comparar la actividad generada entre las dos

construcciones. De manera contraria, la construcción del amino terminal E2FA/B1;1^N₍₃₁₃₋₄₆₂₎ no generó actividad de la enzima en comparación con la proteína WT.

Al comparar los resultados de actividad con los resultados del crecimiento celular en ausencia de leucina en el medio de cultivo, se puede observar que las levaduras transformadas con la región del carboxilo terminal E2FA/B1;1^C₍₁₋₃₁₃₎ crecieron sólo hasta la primera dilución, es decir, que no crecieron óptimamente (Figura 14), sin embargo, la actividad de la enzima β -galactosidasa generada con esta región resultó ser la actividad con el mayor valor. A pesar de lo anterior, en ambos experimentos la región carboxilo fue suficiente para activar la expresión de los genes reporteros, contrario a lo que se observó con la región amino. Por lo tanto, se corroboró que es en el extremo carboxilo terminal donde se encuentra el dominio de transactivación, que le permite a E2FA/B1;1 ser una proteína con capacidad de activar la transcripción.

Con la proteína E2FC y con su mutante tampoco se vio actividad enzimática, proponiendo una vez más que la proteína pudiese ser inhibidora o no activadora de la transcripción con base en este resultado y lo que se observó en el crecimiento sin leucina. Finalmente, con la fusión E2FC WT- E2FA/B1;1^{C-TAD} sí se observó actividad de la enzima y esta resultó estadísticamente significativa al ser comparada con la actividad generada por E2FC, y lo contrario al ser comparada con la actividad de la proteína E2FA/B1;1, ya que a pesar de que la actividad con la fusión aparentemente fue mayor, no resultó ser estadísticamente diferente.

8 Discusión de resultados

El ciclo celular es uno de los procesos biológicos más estudiados debido a su importancia para el crecimiento y proliferación celular, así como para el desarrollo de organismos eucariontes; este procede a través de transiciones estrictamente reguladas para garantizar que los eventos específicos de cada fase se realicen de manera ordenada. El ciclo celular está controlado por una red reguladora cuyas características generales se conservan de levaduras a humanos (Bertoli *et al.*, 2013).

En plantas, la división celular y la subsecuente elongación son eventos celulares clave en su ciclo de vida (Inzé y De Veylder, 2006); esta división está regulada por señales nutricionales, hormonales, de desarrollo y ambientales en conjunto con la maquinaria molecular que controla el ciclo celular, de ahí que la comprensión de dicha maquinaria y sus componentes sea indispensable.

En los últimos años, el estudio del ciclo celular en las plantas ha progresado gracias a la identificación de genes que codifican ciclinas, CDKs, proteínas inhibidoras, etc. Estos hallazgos sugieren que, en plantas como en otros eucariontes, los complejos ciclina- CDK son reguladores clave del ciclo celular. Los diferentes complejos ciclina- CDK fosforilan a una gran cantidad de sustratos en los puntos de transición clave G1/S y G2/M, lo que desencadena la replicación del DNA y la mitosis respectivamente. Uno de los blancos de estos complejos es el represor transcripcional RBR durante G1 y G1/S. RBR se encuentra reprimiendo al heterodímero de factores transcripcionales E2F-DP impidiendo la transcripción de sus genes blanco. Cuando el ciclo celular avanza los complejos ciclina-CDK catalizan la hiperfosforilación de RBR, el cual libera al factor transcripcional, permitiendo la activación de dichos genes que incluyen ciclinas de la fase G1 y genes necesarios para el establecimiento y progresión de la fase S.

La identificación de homólogos de E2F y DP en plantas (Albani *et al.*, 2000; Ramirez-Parra y Gutierrez, 2000; Ramirez- Parra *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 1999), demostró que la vía está presente en plantas, y que además existe una alta conservación de los dominios entre E2F-DP de origen vegetal y animal, y muy probablemente controlen la expresión génica del ciclo celular durante la proliferación y diferenciación celular en plantas.

En el laboratorio se han estudiado a diferentes reguladores de las fases del ciclo celular, y más recientemente el control transcripcional que regula la fase G1- S, por medio de la

caracterización de la familia E2F- DP de maíz. Como se menciona en los antecedentes de este trabajo, se descubrió la presencia de doce genes de la familia E2F en el genoma de maíz, los cuales se expresan diferencialmente. Además, se clonaron las secuencias codificantes de E2FA/B1;1, E2FC y DPB2, y se demostró la interacción proteína- proteína E2F- DP, así como la interacción de estos heterodímeros con diferentes cajas E2F en los promotores de algunos de sus genes blanco (Sánchez- Camargo, en preparación). Con estos estudios podemos afirmar que las proteínas de la familia E2F se encuentran conservadas en maíz.

Así como en el laboratorio, otros estudios han examinado en detalle las diferencias en la expresión de los diferentes E2Fs, así como sus interacciones con DP, RBR y otras proteínas en plantas. Sin embargo, pocos estudios han examinado las propiedades de activación transcripcional de proteínas E2F individuales. Por lo tanto, para continuar con la caracterización de la familia de maíz, era de nuestro interés conocer la función transcripcional de las proteínas E2F, y demostrar que conservan su función como activadores o represores de la transcripción.

Para determinar la función transcripcional de las proteínas E2F, se seleccionaron dos miembros de la familia con base a la posición que ocupan en el árbol filogenético construido con las secuencias proteicas de los doce genes de maíz y con secuencias proteicas de la familia E2F de otras plantas. Con base en la similitud con los activadores E2FA y E2FB de *A. thaliana*, se propuso que el grupo de genes E2FA/B podría presentar características activadoras, por lo tanto, de este grupo se seleccionó a E2FA/B1;1 como un candidato activador. Del segundo grupo con secuencias relacionadas a AtE2FC con posible función represora, se seleccionó a E2FC como candidato represor.

Con el objetivo de conocer si E2FA/B1;1 y E2FC de maíz eran capaces o no de activar la transcripción, se montó un sistema reportero dual, en el cual por medio de la fusión traduccional de las proteínas E2F con el dominio de unión a DNA de LexA se determinó su función transcripcional por medio de la activación de dos genes reporteros con cajas LexA en sus promotores; *LEU2* y *LacZ*.

En los resultados se puede observar que la proteína E2FA/B1;1 funciona como un activador transcripcional, ya que tanto en el experimento de crecimiento en medios de cultivo sin leucina y en los ensayos de β - galactosidasa los genes reporteros *LEU2* y *LacZ* respectivamente, fueron activados cuando E2FA/B1;1 es expresada (Figuras 14 y 16).

En E2Fs de mamíferos, el dominio de activación transcripcional está localizado en la región del carboxilo terminal de las proteínas. En plantas, en el 2002 Kosugi *et al.*, demostraron por medio de ensayos de luciferasa que la forma trunca de AtE2Fa, la cual carece la región C-terminal correspondiente al dominio de transactivación en mamíferos, no tiene capacidad de activar la transcripción en células de tabaco, indicando la presencia del dominio de activación transcripcional en el carboxilo terminal tal como en los E2F de mamíferos. Para corroborar que lo anterior se cumple en maíz, se probaron las regiones correspondientes al amino y carboxilo terminal de E2FA/B1;1 en ambos experimentos, y se observó que al igual que en *A. thaliana* y en mamíferos, es en la región del C-terminal donde se encuentra localizado el dominio de transactivación, el cual le permite a la proteína activar la transcripción, en este caso de los genes reporteros (Figuras 14 y 16).

Por otro lado, la proteína E2FC no fue capaz de activar la transcripción de ninguno de los genes reporteros cuando ésta fue expresada, sugiriéndonos que podría tener función represora, complementando con esto los datos de expresión, en los que el gen *E2FC* se expresa en tejidos diferenciados (Sánchez- Camargo, en preparación), lo cual coincide con que E2FC participa en represión de algunos genes de proliferación y desarrollo en *A. thaliana* (del Pozo *et al.*, 2002). Con los experimentos realizados hasta ahora sólo podemos asumir como ya se mencionó, que E2FC no tiene capacidad de activar la transcripción; por medio de otros experimentos resultaría interesante corroborar que es un represor transcripcional, al competir por los promotores de sus genes blanco con E2Fs activadores, en este caso E2FA/B1;1, ya que se hipotetiza que tanto E2Fs activadores como represores compiten por los mismos sitios en los promotores de sus genes blanco durante la regulación de las diferentes olas transcripcionales del ciclo celular (Bertoli *et al.*, 2013). De igual forma en plantas, estas proteínas parecen interactuar con el motivo altamente conservado TTTSSCGSS (S siendo C o G). En el laboratorio, ya se ha demostrado que tanto E2FA/B1;1 como E2FC se unen a la misma secuencia en los promotores de algunos de sus genes blanco (Sánchez- Camargo, en preparación), sugiriéndonos que pueden competir.

Otro mecanismo de represión podría ser que E2FC actúe como un activador débil. Diversos estudios han demostrado que algunos E2F funcionan como activadores deficientes, por ejemplo, E2F5. Sin embargo, debido a esta ineficiencia al activar la transcripción e inducir la progresión del ciclo celular es considerado como un represor transcripcional (Pierce *et al.*, 1998; DeGregori *et al.*, 1997). Resultaría interesante, determinar en otro sistema si

E2FC actúa como un activador deficiente, o si simplemente no tiene la capacidad de activar la transcripción.

La construcción E2FC^N₍₄₅₁₋₄₆₈₎ fue diseñada con la intención de ser probada en plantas, con el objetivo de conocer más sobre la función “represora” de E2FC. El objetivo era determinar si la represión es intrínseca de la proteína, o cooperativa con la proteína RBR. Actualmente, existe evidencia de que Rb regula los genes que responden a E2F a través de dos mecanismos distintos. Primero, Rb se une a un motivo de 18 aminoácidos en el dominio de transactivación de E2F, bloqueando así su capacidad de reclutar a la maquinaria transcripcional. En segundo lugar, diversos estudios han demostrado que la proteína Rb es capaz de interactuar con remodeladores de la cromatina, ya sea para promover o reprimir la expresión de genes clave durante la transición de proliferación a diferenciación celular. Ya se ha demostrado que la proteína Rb es capaz de reprimir la transcripción por medio del reclutamiento de histona desacetilasas (HDACs) (Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998; Brehm *et al.*, 1998), mientras que, en plantas, la proteína RBR de *A. thaliana* interactúa con PCR2 (Complejo de represión Polycomb 2) para facilitar la diferenciación celular y las transiciones de desarrollo (Kuwabara & Gruissem, 2014). Lo anterior nos hace suponer que, sin su motivo de unión a RBR, E2FC sería incapaz de interactuar con dicha proteína, lo cual se vería reflejado en la represión génica, comprobando así la actividad cooperativa de E2FC-RBR y remodeladores de la cromatina para reprimir la transcripción. Sin embargo, esta construcción sólo pudo probarse en levaduras; en *S. cerevisiae* el análogo funcional de RBR, la proteína Whi5, no interactúa con E2F, sino con el análogo de esta proteína, SBF (Medina *et al.*, 2016), lo cual nos impide evaluar la interacción E2F- RBR, y, por lo tanto, el mecanismo de represión antes mencionado. Hasta ahora con el sistema de levaduras, sólo sabemos que por sí sola la proteína E2FC no es capaz de activar la transcripción y, por lo tanto, podría actuar como un represor por competencia en el DNA.

Con la hipótesis de que, durante la evolución de los genes de la familia, E2FC perdió una parte de su secuencia, provocando un cambio en su función transcripcional, se probó la construcción E2FC WT- E2FA/B1;1^{C-TAD}, en la cual se fusionó a la proteína E2FC completa con 40 aminoácidos del C- terminal de E2FA/B1;1, de los cuales carece E2FC (Figura A1, apéndice 1). Interesantemente al expresar esta fusión proteica, los genes reporteros fueron activados en niveles similares que con la proteína activadora E2FA/B1;1 WT.

Lo anterior nos sugiere que dicho fragmento de 40 aminoácidos es de importancia e indispensable para la activación de la transcripción. Con el fin de conocer más acerca de la

relevancia de esta pequeña secuencia de aminoácidos, se hizo una búsqueda BLAST con la secuencia proteica de los 40 aminoácidos de E2FA/B1;1 como criterio de búsqueda, y se encontró que es una secuencia conservada en proteínas de la familia E2F de gramíneas; especies como *Sorghum bicolor*, *Dichanthelium oligosanthes*, *Panicum miliaceum*, *Setaria italica*, *Oryza sativa* y *Brachypodium distachyon*, la conservan en sus secuencias de isoformas de proteínas E2FA/B con un E-Value < 0 e identidad mayor al 50%, posiblemente con función activadora, indicándonos que esta secuencia es de gran relevancia para desempeñar dicha función en este subgrupo de proteínas de la familia.

Numerosas secuencias de aminoácidos pueden funcionar como dominios de activación, aunque muchos dominios de activación tienen un porcentaje alto de aminoácidos particulares. Gal4, Gcn4 y la mayoría de los factores de transcripción de levadura tienen dominios de activación ricos en aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico). Estos dominios son capaces de estimular la transcripción en casi todos los tipos de células eucarióticas. Los dominios de activación de algunos factores de transcripción de *Drosophila* y mamíferos son ricos en glutamina, y algunos ricos en prolina; otros son ricos en aminoácidos relacionados a serina y treonina, los cuales tienen grupos hidroxilo. Sin embargo, algunos dominios de activación fuertes no son particularmente ricos en ningún aminoácido específico (Lodish *et al.*, 2000). Curiosamente al hacer un análisis de la composición y proporción de aminoácidos que componen el péptido de E2FA/B1;1 (40aa), los aminoácidos que abundan con mayor proporción son ácido aspártico (12.5%) y valina (12.5%), seguidos por ácido glutámico (10%), prolina (10%) y glutamina (10%), reafirmando que este pequeño péptido tiene en sus propiedades las características generales para ser un dominio de activación.

La familia de genes E2F ha sido estudiada ampliamente. Sin embargo, la historia evolutiva de estos genes todavía se comprende poco. En 2010, Cao *et al.* encontraron que al duplicarse el gen E2F ancestral produjo dos subgrupos de proteínas, el primero que comprende a los represores, y los activadores comprendidos en el segundo subgrupo. Descubrieron que los represores comparten más similitud de secuencia con la secuencia ancestral E2F predicha, y que también poseen tasas evolutivas significativamente más bajas y mayores presiones de selección negativa en comparación con los activadores, por ello, sugirieron que la función antigua de E2F podría vincularse principalmente con proteínas del subgrupo represor, mientras que las proteínas del subgrupo activador podrían contribuir más a la diversificación funcional en la vía E2F.

Con lo anterior, nuestra hipótesis acerca de que E2FC pudo adquirir la función de represión transcripcional por perder parte de su secuencia, no resulta muy sólida. Con los experimentos realizados hasta ahora sólo podemos decir que no tiene la capacidad de activar la transcripción, y sugerimos que esta incapacidad es debido a que carece de una región como los 40 aminoácidos de E2FA/B1;1 con la capacidad de activar fuertemente la transcripción. Sin embargo, no podemos asumir que perdió dicha secuencia durante la evolución.

Los experimentos realizados hasta ahora nos han permitido conocer más acerca de la familia de los factores de transcripción E2F de maíz, sobre todo, acerca de su función. Sin embargo, resultaría interesante conocer más sobre la función transcripcional de estas proteínas en un sistema que cuente con los demás elementos de la vía, ya que como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, E2F actúa en conjunto con otras proteínas como DP y RBR para desempeñar su función. Un sistema de plantas sería ideal para corroborar y completar la caracterización de esta familia de proteínas de maíz.

9 Conclusiones

Se demostró que E2FA/B1;1 de maíz funciona como un activador transcripcional, y que dicha función depende de una región de 40 aminoácidos en el carboxilo terminal de la proteína, la cual está conservada en la familia de las gramíneas.

Asimismo, se demostró que E2FC carece de la capacidad de activar la transcripción, sugiriendo que esta proteína actúa como un represor transcripcional, y esto se asocia a la falta de una región o secuencia que le permita ejercer la función como activador.

Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo se abren diferentes posibilidades de estudiar más aspectos acerca de la familia de factores de transcripción E2F de maíz con el fin de ampliar el conocimiento acerca de la regulación durante la transición G1/S del ciclo celular mediada por esta familia de factores transcripcionales.

10 Bibliografía

Ach, R. a, Durfee, T., Miller, a B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P. C., & Grissem, W. (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5077–5086.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of The Cell*. (6th ed.). New York, Garland Science.

Albani, D., Mariconti, L., Ricagno, S., Pitto, L., Moroni, C., Helin, K., & Cella, R. (2000). DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), 19258–19267.

Andersen, S. U., Buechek, S., Zhao, Z., Ljung, K., Novák, O., Busch, W., Schuster, C. & Lohmann, J. U. (2008). Requirement of B2-Type Cyclin-Dependent Kinases for Meristem Integrity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 20, 88–100.

Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). Maizes. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*, 67-115.

Attwooll, C., Denchi, E. L., & Helin, K. (2004). The E2F family: Specific functions and overlapping interests. *EMBO Journal*, 23, 4709–4716.

Bandara, L. R., Buck, V. M., Zamanian, M., Johnston, L. H., & La Thangue, N. B. (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *The EMBO Journal*, 12(11), 4317–4324.

Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528.

Black, A. R. y Azizkhan-Clifford, J. (1999) Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene*. 237, 281–302.

Boudolf, V., Barroco, R., Engler, J. D. A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inze, D. & Veylder, L. De. (2004). B1-Type Cyclin-Dependent Kinases Are Essential for the Formation of Stomatal Complexes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16, 945–955.

Bracken, A. P., Ciro, M., Cocito, A., & Helin, K. (2004). E2F target genes: Unraveling the biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(8), 409–417.

Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 391(6667), 597-601.

- Breyne, P. & Zabeau, M. (2001). Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr. Opin. Plant Biol*, 4, 136–42.
- Cao, L., Peng, B., Yao, L., Zhang, X., Sun, K., Yang, X., & Yu, L. (2010). The ancient function of RB-E2F Pathway: Insights from its evolutionary history. *Biology Direct*, 5, 1–21.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A. P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L. & Helin, K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5458–5470.
- Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., Millman, J. S., Schub. O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B. & Tyers M. (2004). Cdk activity antagonizes whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, 117, 899–913.
- Cross, F.R., Buchler, N.E. & Skotheim, J. M. (2011). Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366, 3532–3544.
- de Bruin, R. A. M., McDonald, W.H., Kalashnikova, T.I., Yates, J. & Wittenberg, C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor whi5. *Cell*, 117, 887–898.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L. & Nevins, J. R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Biochemistry*. 94, 7245–7250.
- del Pozo, J. C., Boniotti, M. B y Gutiérrez, C. (2002). Arabidopsis E2F_c functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell*. 14(12):3057-71.
- DeGregori, J., & Johnson, D. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Current Molecular Medicine*, 6, 739–748.
- De Veylder, L., Segers, G., Glab, N., Casteels, P., Montagu, M. Van, & Inze, D. (1997). The Arabidopsis Cks1^{At} protein binds the cyclin-dependent kinases. *FEBS Letters*, 412, 446–452.
- Dewitte, W., & Murray, J. A. H. (2003). *THE PLANT CELL CYCLE. Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 235–264.
- Dimova, D. K., & Dyson, N. J. (2005). The E2F transcriptional network : old acquaintances with new faces. *Oncogene*, 24, 2810–2826.
- Di Stefano, L., Jensen, M. R., & Helin, K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO Journal*, 22(23), 6289–6298.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes and Development*, 12(617), 2245–2262.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cyclin : A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division. *Cell*, 33, 389-396.

Francis, D. (2007). The plant cell cycle – 15 years on. *New phytologist*, 174, 261–278.

Frolov, M. V. & Dyson, N. J. (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB mediated repression. *Journal of Cell Science*, 117, 2173–2181.

Garza-Aguilar, S. M., Sánchez-Camargo, V. A., Godínez-Palma, S. K., & Lara-Núñez, A. (2014). Avances recientes en el estudio del Ciclo Celular en plantas. *Reb*, 32(2), 39–47.

Gaubatz, S., Lindeman, G. J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J. R., Livingston, D. M. & Rempel, R. E. (2000). E2F4 and E2F5 Play an Essential Role in Pocket Protein– Mediated G1 Control. *Molecular Cell*, 6, 729–735.

Godínez-Palma, S. K., Rosas-Bringas, F. R., Rosas-Bringas, O. G., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J. & Vázquez- Ramos, J. (2017). Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D–cyclin-dependent kinase complexes. *Journal of Experimental Botany*, 68(7), 1585–1597.

Grafi, G., Burnett, R. y Helentjaris, T. (1996). A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8962–8967.

Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, 23(7), 345–356.

Harbour, J. W., & Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *GENES & DEVELOPMENT*, (14), 2393–2409.

Hasan, M.M., Brocca, S., Sacco, E., Spinelli, M., Papaleo, E., Lambrugh, M., Alberghina, L. & Vanoni, M. (2013). A comparative study of whi5 and retinoblastoma proteins: From sequence and structure analysis to intracellular networks. *Frontiers in Physiology*, 4, 315.

He, Y., Armanious, M. K., Thomas, M. J., & Cress, W. D. (2000). Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene*, 19(30), 3422–3433.

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

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

Helin, K. (1998). Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 28–35.

Henley, S. A., & Dick, F. A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Division*, 7(10), 2-14.

Hydbring, P., Malumbres, M., & Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(5), 280–292.

Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Review of Genetics*, 40(1), 77–105.

Klug, W. S., Cummings, M. R. & Spencer, C. A. (2006). *Conceptos de Genética* (8ª ed.). Madrid, Pearson Educación S.A.

Kosugi, S., & Ohashi, Y. (2002). E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant Journal*, 29(1), 45–59.

Kosugi, S., & Ohashi, Y. (2002). Interaction of the Arabidopsis E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol*, 128(3), 833–843.

Kuwabara, A., & Grussem, W. (2014). Arabidopsis Retinoblastoma-related and Polycomb group proteins: Cooperation during plant cell differentiation and development. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2667–2676.

Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N. & Helin, K. (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), 7813–7825.

Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A. & Nevins, J. R. (2000). Identification of a Novel E2F3 Product Suggests a Mechanism for Determining Specificity of Repression by Rb Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 20(10), 3626–3632.

Logan, N., Delavaine, L., Graham, A., Reilly, C., Wilson, J., Brummelkamp, T. R., Hijmans, E. M., Bernards, R. & La Thangue, N. B. (2004). E2F-7: A distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene*, 23, 5138–5150.

Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D. & Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*, 391(6667), 601–605.

Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S., & Inzé, D. (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from Arabidopsis thaliana1. *FEBS Letters*, 486(1), 79–87.

- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L. H. & Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol*, 11(11), 1275–1276.
- Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R., & Albani, D. (2002). The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 9911–9919.
- Medina, E. M., Turner, J. J., Gordân, R., Skotheim, J. M., & Buchler, N. E. (2016). Punctuated evolution and transitional hybrid network in an ancestral cell cycle of fungi. *ELife*, 5, 1–23.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., & Murray, J. A. H. (2002). Cell Cycle-regulated Gene Expression in *Arabidopsis*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 277(44), 41987–42002.
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in higher plants—the nexus. *Plant Cell*, 11, 509–21
- Moberg, K., Starz, M. A., & Lees, J. A. (1996). E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Molecular and Cellular Biology*, 16(4), 1436–1449.
- Morgan, D. O. (1997). CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 261–291.
- Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, C.M., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. & Helin, K. (2000). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *GENES & DEVELOPMENT*, 15, 267–285.
- Nafziger, E. D. (2016). Maize Agronomy. Reference Module in Food Science. *Elsevier Ltd*. 2, 1-7.
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H., & Shinmyo, A. (1999). Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant Journal*, 18(3), 243–252.
- Pierce, A. M., Schneider-Broussard, R., Philhower, J. L., & Johnson, D. G. (1998). Differential activities of E2f family members: Unique functions in regulating transcription. *Molecular Carcinogenesis*, 22(3), 190–198.
- Pines J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research*, 66, 181–212.
- Piperno, D. R., Ranere, A. J., Holst, I., Iriarte, J., & Dickau, R. (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5019–5024.

- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J., Segers, G., Veylder, L. De, Barroco, R. D. P., Casteels, P., Montagu, M. V., Inzé, D. & Mironov, V. (2001). A Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Is Involved in the Control of G2/M Progression in Plants. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 276(39), 36354–36360.
- Ramirez-Parra, E., Fründt, C., & Gutierrez, C. (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33(4), 801–811.
- Ramirez-Parra, E., & Gutierrez, C. (2000). Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Letters*, 486(1), 73–78.
- Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M. B., & Gutierrez, C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Research*, 27(17), 3527–3533.
- Rauber, R., Cabreira, C., de Freitas, L. B., Turchetto-Zolet, A. C., & Margis-Pinheiro, M. (2016). *The evolutionary history of the E2F and DEL genes in Viridiplantae. Molecular Phylogenetics and Evolution*, 99, 225–234.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A. & Dynlacht, B. D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *GENES & DEVELOPMENT*, 16(2), 245–256.
- Rogers, K. T., Higgins, P. D., Milla, M. M., Phillips, R. S., & Horowitz, J. M. (1996). DP-2, a heterodimeric partner of E2F: identification and characterization of DP-2 proteins expressed in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7594–7599.
- Sardet, C., Vidal, M., Cobrinik, D., Geng, Y., Onufryk, C., Chen, A., & Weinberg, R. A. (1995). E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 2403–2407.
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), 2925–2939.
- Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., & Shinmyo, A. (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Letters*, 460(1), 117–122.
- Shen, W-H. (2002). The plant E2F- Rb pathway and epigenetic control. *TRENDS in Plant Science*, 7 (11), 505- 511.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1- phase progression, *GENES & DEVELOPMENT*, 13, 1501–1512.

Stevaux, O., & Dyson, N. J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current Opinion in Cell Biology*, 14, 684–691.

Strable, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(10), 1–10.

Sidorova, J. & Breeden, L. (1993). Analysis of the SWI4/SWI6 protein complex, which directs g1/s-specific transcription in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13, 1069–1077.

Skotheim, J. M., Di Talia, S., Siggia, E.D. & Cross, F. R. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature*, 454, 291–296.

Sorrell, D.A., Marchbank, A., Mc Mahon, K., Dickinson, J.R., Rogers, H.J. & Francis, D. (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 215, 518–22.

Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K. S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J. & Larkins, B.A. (1999). Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4180–85.

Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Andon, N., & Lees, J. A. (1998). E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2850–2855.

Trimarchi, J. M., & Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(1), 11–20.

Umeda, M., Bhalerao, R.P., Schell, J., Uchimiya, H. & Koncz C. (1998) A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5021–26.

Umeda, M., Shimotohno, A., & Yamaguchi, M. (2005). Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase- activating Kinases in Plants. *Plant Cell Physiol* ,46(9), 1437–1442.

Vandepoele, K., Raes, J., Veylder, L. De, Rouzé, P., Rombauts, S., & Inzé, D. (2002). Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* ,14, 903–916.

Vázquez-Ramos, J. M., & Sánchez, M. d. I. P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*, 13(2), 113–130.

Vela, E. El Maíz. *Arqueología Mexicana* 2011; 38: 10- 26.

Wang, G., Miskimins, R. & Miskimins, W. K. (1999). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is localized to the cytosol in Swiss/3T3 cells. *Oncogene*, 18, 5204–5210.

Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X. & Zhang, W. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *PlantPhysiol*, 135, 1084–1099.

Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Hannon, G.J. & Gutiérrez, C. (1996). Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *The EMBO Journal*, 15(18), 4900-4908.

Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C. O. y Pavletich, N. P. (1999). Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F–DP. *Genes Dev.* 13, 666–674.

11 Apéndices

Apéndice 1. Alineamiento de las secuencias proteicas de E2FA/B1;1 y E2FC

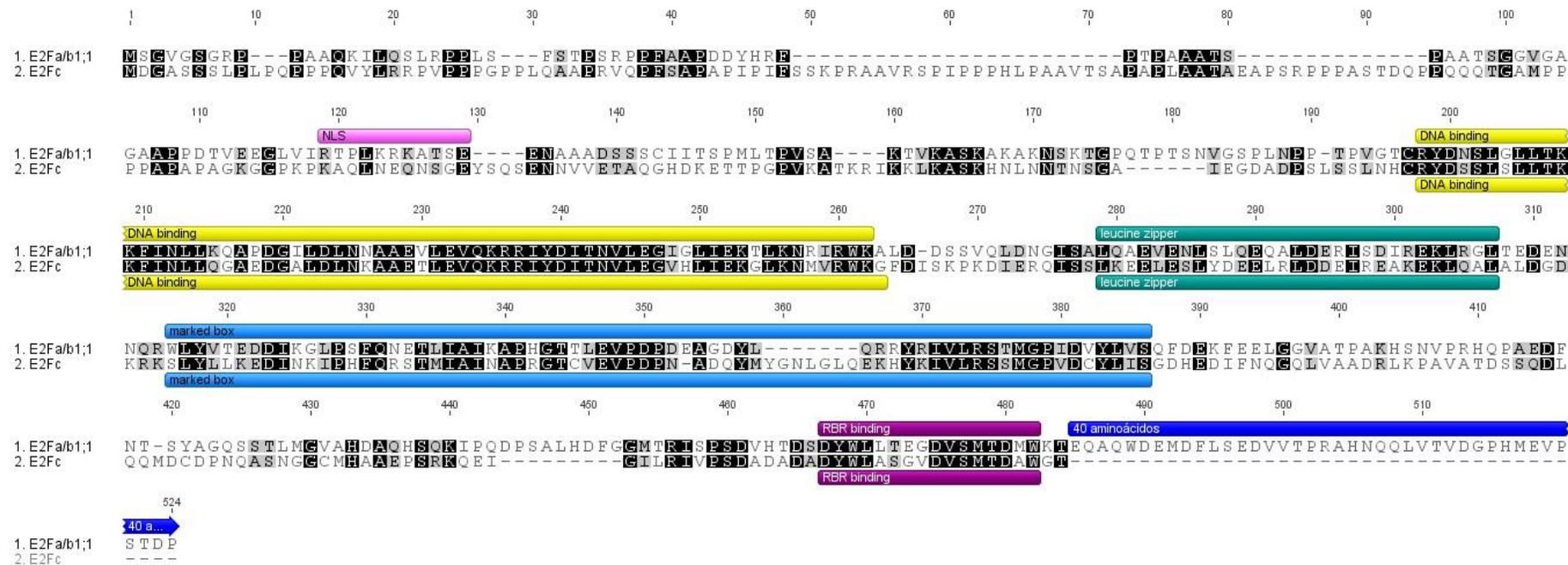


Figura A1. Alineamiento de E2FA/B1;1 y E2FC. Se indican elementos funcionales. NLS, señal de localización nuclear; *DNA binding*, dominio de unión a DNA; *leucine zipper*, *marked box*; *RBR binding*, motivo de unión a RBR.

Apéndice 2. *Primers* y temperaturas de alineamiento para la amplificación de CDS de las proteínas E2FA/B1;1 y E2FC

Tabla A1. *Primers* para la amplificación de la secuencia codificante (CDS) de E2FA/B1;1, E2FC y sus respectivas deleciones.

| | Nombre | Secuencia 5' > 3' | Clave IBt- año |
|----|-----------------------|---|----------------|
| 1 | FE2F1;1 WT EcoRI | TCT ATG AAT TCA TGT CGG GGG TCG GCA GCG G | 1240- 2017 |
| 2 | RE2F1;1 WT NcoI | TCG CCA TGG TTA TGG ATC TGT GCT TGG AAC CTC CAT | 1241- 2017 |
| 3 | RE2F1;1 NcoI Δ313-462 | TCG CCA TGG TTA TAA TAC AAT TCT ATA TCT CCT TTG G | 1243- 2017 |
| 4 | FE2F1;1 EcoRI Δ1-313 | TCT ATG AAT TCA GAA GTA CGA TGG GAC CAA TAG | 1242- 2017 |
| 5 | FE2FC WT EcoRI | TCT ATG AAT TCA TGG ACG GCG CCT CCT CCA G | 1244- 2017 |
| 6 | RE2FC WT NcoI | TCG CCA TGG TTA CGT GCC CCA AGC ATC TGT CAT A | 1245- 2017 |
| 7 | RE2FC Δ451-468 NcoI | TCG CCA TGG TTA AGC ATC AGC GTC GGC ATC T | 1246- 2017 |
| 8 | FE2FC-E2F1 TAD | GTA TGA CAG ATG CTT GGG GCA CGG AAC AAG CGC AGT GGG ATG AGA T | 1247- 2017 |
| 9 | RE2FC-E2F1 TAD | ATC TCA TCC CAC TGC GCT TGT TCC GTG CCC CAA GCA TCT GTC ATA C | 1248- 2017 |
| 10 | RE2FC WT XhoI | GTC TCT CGA GTT ACG TGC CCC AAG CAT CTG T | 367-2018 |
| 11 | RE2FA/B1;1 3'UTR | ATG CCC TGA CTA AAC TCC AGG TGA | 2809-2013 |

Tabla A2. CDS amplificados y pares de *primers* utilizados.

| CDS | Primer Forward | Primer Reverse | T _m (°C) |
|---|----------------------|-----------------------|---------------------|
| E2FA/B1;1 WT | FE2F1;1 WT EcoRI | RE2F1;1 WT NcoI | 62 |
| E2FA/B1;1 ^N ₍₃₁₃₋₄₆₂₎ | FE2F1;1 WT EcoRI | RE2F1;1 NcoI Δ313-462 | 59 |
| E2FA/B1;1 ^C ₍₁₋₃₁₃₎ | FE2F1;1 EcoRI Δ1-313 | RE2F1;1 WT NcoI | 58 |
| E2FC WT | FE2FC WT EcoRI | RE2FC WT NcoI | 62 |
| E2FC ^N ₍₄₅₁₋₄₆₈₎ | FE2FC WT EcoRI | RE2FC Δ451-468 NcoI | 62 |
| E2FC WT (para fusión) | FE2FC WT EcoRI | RE2FC-E2F1 TAD | 65 |
| E2FA/B1;1 ^{C-TAD} (para fusión) | FE2FC-E2F1 TAD | RE2F1;1 WT NcoI | 65 |
| E2FC WT- E2FA/B1;1 ^{C-TAD} | FE2FC WT EcoRI | RE2F1;1 WT NcoI | 60 |
| E2FC WT (pJG4-5) | FE2FC WT EcoRI | RE2FC WT XhoI | 59 |

Apéndice 3. Mapas de vectores utilizados para clonar las secuencias codificantes de E2FA/B1;1 y E2FC.

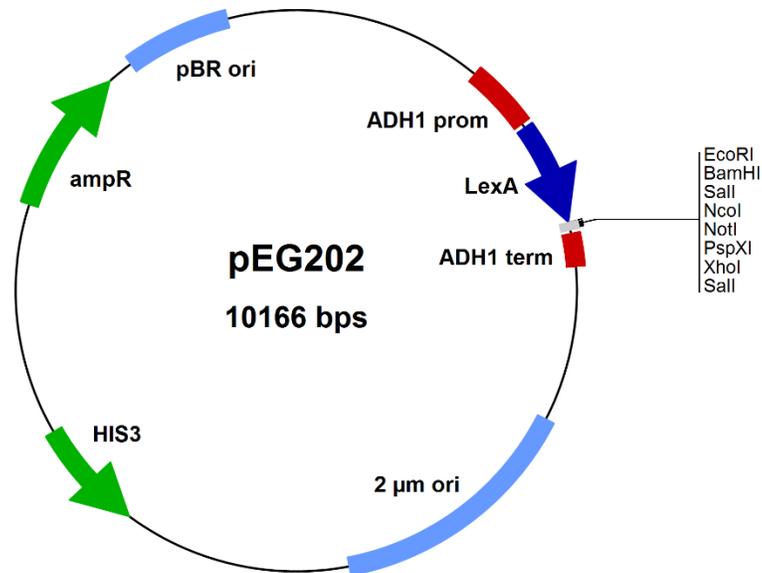


Figura A2. Mapa del vector pEG202 para expresión en levaduras. Se indica el promotor ADH1 (rojo), el dominio de unión a DNA de LexA (azul) y el sitio de clonación múltiple.

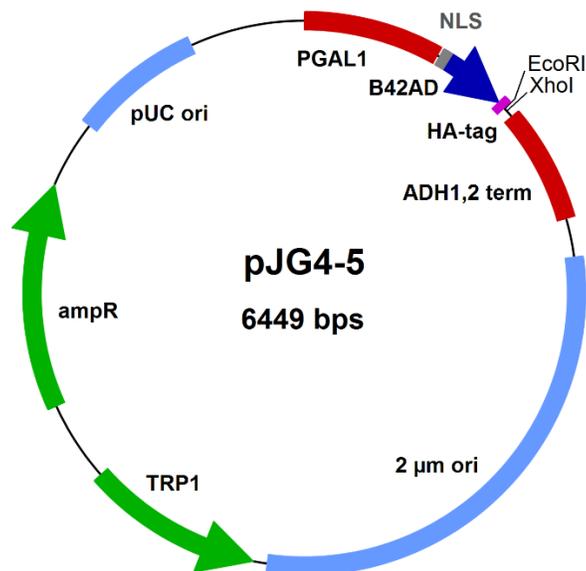


Figura A3. Mapa del vector pJG4-5 para expresión en levadura. Se indica el promotor GAL1 (rojo), el dominio de activación de B42 (azul) y el sitio de clonación múltiple.

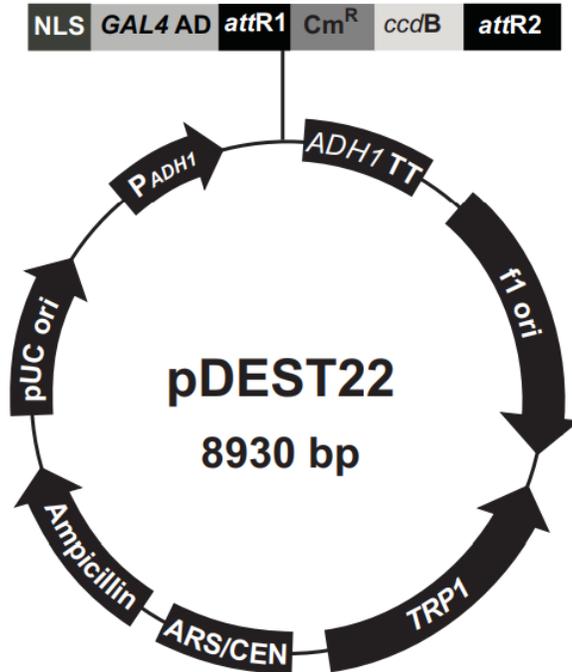


Figura A4. Mapa del vector pDEST22 para expresión en levadura. Se indica el promotor ADH1, el dominio de activación de GAL4 (gris) y los sitios attR para recombinar.

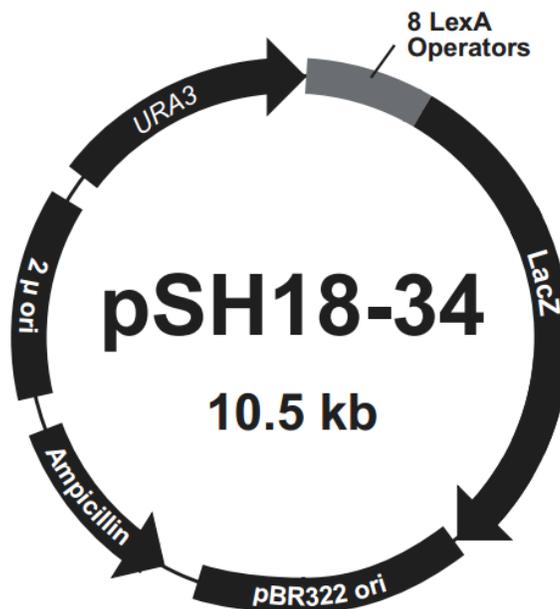


Figura A5. Mapa del vector reportero pSH18- 34 para expresión en levadura. Se indican los operadores LexA (gris), así como el gen de LacZ (negro).

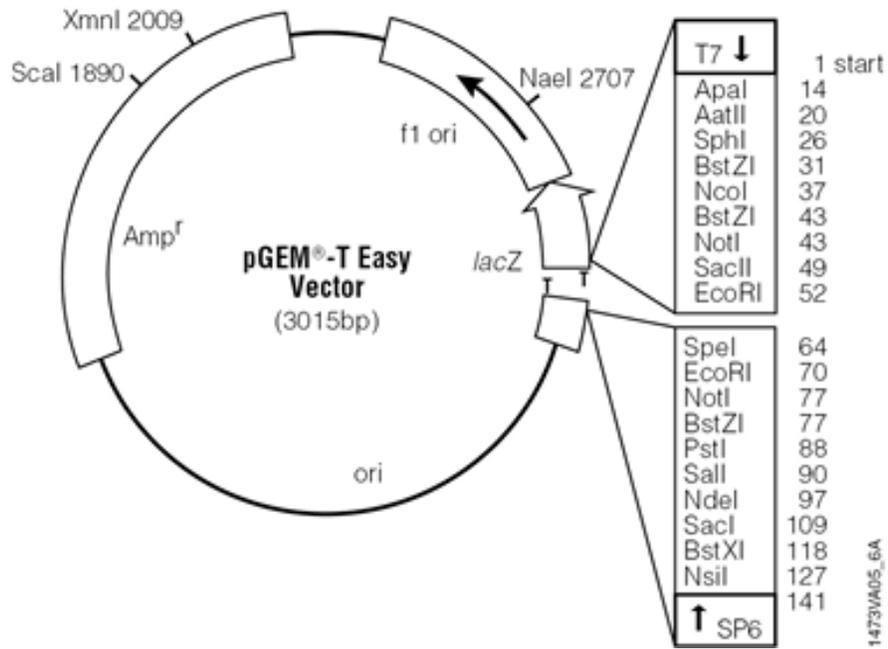


Figura A6. Mapa del vector pGEM- T Easy. Se muestra el sitio de clonación múltiple, así como el gen de *LacZ*.