



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Análisis de la capacidad de transactivación de los motivos 24 y 27 del  
carboxilo terminal de E2Fa/b1;1 de maíz”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestra en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:

**SAMANTHA ROMERO RODRÍGUEZ**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa Estela Navarro González

[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CDMX. Agosto, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

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

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
Dra. Rosa Estela Navarro González	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM

Al jurado asignado para la defensa del presente proyecto:

Dr. Sobeida Sánchez Nieto	PRESIDENTE
Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar	VOCAL
Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	VOCAL
Dra. Adriana Garay Arroyo	VOCAL
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	SECRETARIO

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por mi formación académica y profesional.

Al Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos por guiarme en este camino y siempre mostrar interés y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial conformado por la Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra y Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos por la orientación, supervisión y evaluación durante el desarrollo de mi proyecto.

A los miembros del jurado de grado, Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, Dr. Víctor Julián Váldez Rodríguez, Dra. Adriana Garay Arroyo y Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, por el tiempo dedicado a la revisión, así como sus aportaciones, comentarios e ideas que enriquecieron este manuscrito.

Al M en C. Mingyar Neftalí López Hernández, Biólogo Víctor Allan Sánchez Camargo (cuasi doctor) y Dr. Elpidio García Ramírez por sus críticas, aportaciones y apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto. Así como al Programa de Apoyo a Estudiantes del Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos nacionales.

Este proyecto de tesis fue realizado gracias al apoyo financiero de la UNAM, Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN-205219.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	2
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	5
Ciclo celular.....	5
Regulación del ciclo celular.....	6
Vía E2F-DP/Rb.....	10
Familia de factores de transcripción E2F.....	13
Motivos y dominios de los miembros de la familia E2F.....	15
E2F en plantas.....	17
<b>Antecedentes</b> .....	20
<b>Justificación</b> .....	24
<b>Hipótesis</b> .....	24
<b>Objetivos</b> .....	24
<b>Metodología</b> .....	25
Clonación en vectores de expresión para levadura.....	25
Clonación de pEG202/E2Fa/b1;1 <sup>N</sup> + 27.....	26
Clonación de pEG202/E2Fc- E2Fa/b1;1 24.....	27
Transfección y ensayo de transactivación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	29
Ensayos de actividad de $\beta$ -galactosidasa.....	30
<b>Resultados</b> .....	32
<b>Discusión</b> .....	39
<b>Conclusiones</b> .....	48
<b>Perspectivas</b> .....	49
<b>Referencias</b> .....	49
<b>Apéndices</b> .....	60

## ABREVIATURAS

---

<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CAK</b>	Cinasa activadora de CDK
<b>CDK</b>	Cinasa dependiente de ciclina
<b>Cyc</b>	Ciclina
<b>DBD</b>	Dominio de unión a DNA
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DP</b>	Proteína de dimerización
<b>E2F</b>	Factor de unión a promotor E2 de adenovirus
<b>HDACs</b>	Desacetilasas de histonas
<b>HMTases</b>	Metil-transferasas de histonas
<b>ICK</b>	Inhibidores de CDK
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>KRP</b>	Proteína relacionada a Kip
<b>LB</b>	Luria- Bertani
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ONPG</b>	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>RBR</b>	Proteína relacionada a Rb
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>YPD</b>	Extracto de levadura Peptona-Dextrosa

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### \* Índice de figuras y tablas

#### Figura Nombre de la figura

1	Representación esquemática del ciclo celular.
2	Regulación de la actividad de Cyc-CDK.
3	Modelo de activación de la vía E2F-Rb en la transición de la fase G1 a S.
4	Representación esquemática de los subgrupos de factores de transcripción E2F.
5	Estructura de los miembros de la familia E2F.
6	Organización estructural de las proteínas de la familia E2F y DP de maíz.
7	Filogenia y representación de motivos y dominios en las proteínas de la familia E2F.
8	Capacidad de transactivación de las proteínas E2Fa/b1;1 WT, E2Fc WT y sus respectivas variantes de dominios en levaduras.
9	Estructura esquemática de la proteína E2Fa/b1;1 y sus diferentes construcciones clonadas.
10	Capacidad de transactivación de diferentes versiones del amino y carboxilo terminal de E2Fa/b1;1 en levaduras.
11	Efecto de la delección del motivo 27 de E2Fa/b1;1 en la capacidad de transactivación en levaduras.
12	Efecto cuantitativo de la delección del motivo 27 de E2Fa/b1;1 en la capacidad de transactivación en levaduras.
13	Estructura esquemática de las construcciones E2Fa/b1;1 24 y E2Fc+24.

<b>14</b>	Comparación de la capacidad de transactivación de los motivos 27 y 24 de E2Fa/b1;1 en levaduras.
<b>15</b>	Efecto de la adición de los motivos 27 o 24 de E2Fa/b1;1 a E2Fc en la capacidad de transactivación en levaduras.
<b>Tabla</b>	<b>Nombre de la tabla</b>
<b>1</b>	Enzimas utilizadas en la clonación.

✱ **Índice de figuras y tablas anexas**

<b>Figura</b>	<b>Nombre de la figura</b>
<b>A1</b>	Secuencia del motivo 24 de E2Fa/b1;1.
<b>A2</b>	Secuencia del motivo 27 de E2Fa/b1;1.
<b>A3</b>	Verificación de clonas positivas.
<b>A4</b>	Verificación de E2Fc-24 en el vector pEG202.
<b>A5</b>	Mapa del vector pEG202 para expresión en levaduras.
<b>A6</b>	Mapa del vector pSH18-34 para expresión en levaduras.
<b>A7</b>	Modelo del ensayo de transactivación en levadura.
<b>Tabla</b>	<b>Nombre de la tabla</b>
<b>A1</b>	Oligonucleótidos para la amplificación y verificación de las diferentes secuencias de E2Fa/b1;1 clonadas.
<b>A2</b>	CDS amplificados y pares de oligonucleótidos utilizados.



## RESUMEN

En organismos eucariontes la familia de factores de transcripción E2F-DP desempeña un papel importante en el control de la progresión del ciclo celular. Estos factores transcripcionales regulan la expresión de diversos grupos de genes implicados en la proliferación celular, el inicio de la replicación y la síntesis del DNA, así como genes de procesos de diferenciación, desarrollo y apoptosis.

La vía E2F-DP fue primeramente estudiada y caracterizada en células animales y posteriormente se identificaron miembros de esta familia en múltiples especies vegetales como *Arabidopsis thaliana*, zanahoria, tabaco, arroz y maíz lo cual confirmó su conservación en plantas.

En el laboratorio anteriormente se identificaron 12 secuencias de genes codificantes para proteínas relacionadas con la familia E2F-DP en el genoma de maíz (*Zea mays* var B73, MaizeSequence, release 5b.60) (Schnable *et al.*, 2009). Dos proteínas de la familia, E2Fa/b1;1 y E2Fc fueron estudiadas mediante ensayos de transactivación en *Saccharomyces cerevisiae* y se encontró que la primera actúa como una proteína activadora de la transcripción, mientras que E2Fc no tiene esta capacidad. Aparentemente, el motivo denominado 27 es de importancia para que E2Fa/b1;1 desempeñe su función activadora, ya que E2Fc carece de este motivo. Experimentos en los cuales se fusionó el motivo 27 a E2Fc mostraron que le confiere la capacidad de activar la transcripción.

En el presente trabajo se hizo un análisis más detallado de la función del motivo 27, el cual mostró que, a pesar de ser importante en la función de E2Fa/b1;1 no es indispensable, ya que su eliminación no provocó la pérdida de actividad de la proteína. Por otro lado, se identificó otro motivo en el carboxilo de E2Fa/b1;1, denominado motivo 24, el cual también realiza una función importante en la activación transcripcional, ya que por sí solo fue capaz de activar la transcripción. Nuestros resultados sugieren que el carboxilo terminal de E2Fa/b1;1 alberga dos motivos, que en conjunto podrían estar participando en la regulación de la actividad de E2Fa/b1;1 como un factor de transcripción activador.

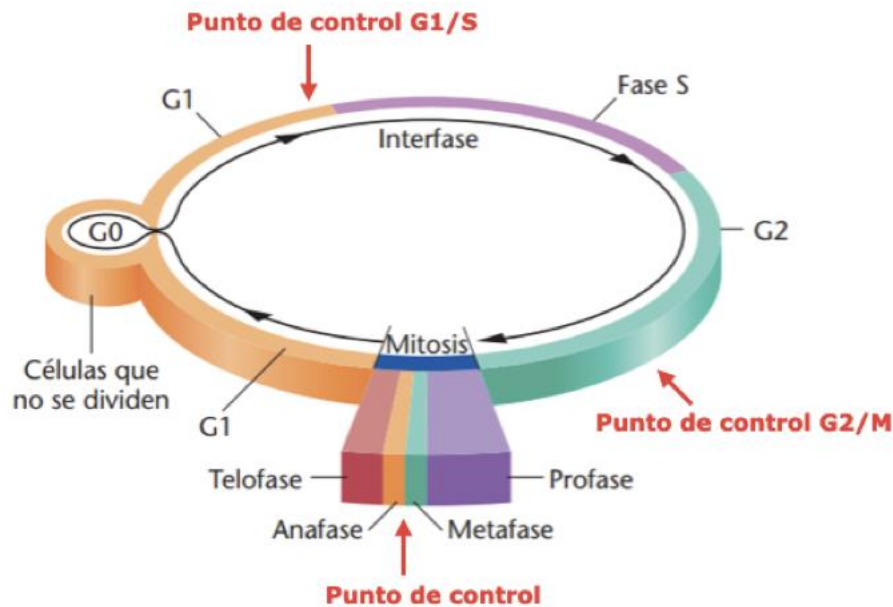
## INTRODUCCIÓN

### Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso biológico que participa en el desarrollo de los organismos, en el crecimiento y la proliferación de las células, así como en la regulación de la reparación del daño al DNA. Este proceso involucra a numerosas proteínas reguladoras que dirigen a la célula a través de una secuencia específica de eventos culminando en la segregación del material genético en dos células hijas (Schafer, 1998).

El ciclo celular eucariótico se divide en cuatro fases secuenciales: **G1** (gap 1), **S** (síntesis), **G2** (gap 2) y **M** (mitosis). Las fases G1, S y G2 juntas son denominadas interfase (Figura 1). En la fase G1 la célula aumenta su actividad metabólica, sus organelos se duplican y, por lo tanto, la célula suele aumentar su tamaño y en la fase S se replica el DNA. En la fase G2, las células también crecen y se verifica que la duplicación del DNA se complete sin errores, y sólo entonces las células pueden dividirse. Finalmente, en la fase M (subdividida, a su vez en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase) los cromosomas se separan y la célula se divide en dos células hijas cada una con una copia idéntica del material genético (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). La citocinesis, que estrictamente no forma parte del ciclo celular, generalmente sigue a la mitosis y completa el programa de división celular con la formación de dos células hijas separadas por una membrana plasmática y, según el reino, una pared celular (Harashima, Dissmeyer & Schnittger, 2013). Las células pueden entonces iniciar un nuevo ciclo. 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).

La progresión a través del ciclo celular se controla en distintos puntos siendo tres los principales: (1) la entrada a la fase S (transición G1/S), (2) la entrada a mitosis (transición G2/M) y (3) la salida de mitosis (transición de metafase a anafase (Figura 1) (Alberts *et al.*, 2015).



**Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular.** Se observan las fases del ciclo celular, G0 donde las células no se dividen, la interfase (G1, S y G2) y la fase M (mitosis). Además se muestran los puntos de control: G1/S, donde se monitorea el tamaño celular y la integridad del DNA; G2/M, donde se monitorea la síntesis y daño al DNA; y el punto de control en M, donde se verifica la formación del huso y la fijación a los cinetocoros. Modificado de Klug, Cummings & Spencer, 2006.

## Regulación del ciclo celular

La progresión de una fase del ciclo celular a otra ocurre de manera ordenada y está regulada por diversas proteínas. Los reguladores clave son las cinasas dependientes de ciclina (CDK); las CDKs son cinasas de serina y treonina, y su actividad depende de la asociación con su subunidad activadora, las proteínas ciclinas (Cyc) (Figura 2) (Morgan, 1997).

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y en la de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, los eventos del ciclo celular están regulados por una sola CDK (Cdc2 y Cdc28, respectivamente), las cuales son homólogas a la CDK1 de humanos (Morgan, 1997). Por el contrario, los mamíferos además de CDK1, poseen múltiples CDKs reguladoras del ciclo celular, cada una de las cuales es regulada por diferentes ciclinas (Bloom & Cross, 2007; Malumbres *et al.*, 2009).

Las plantas tienen diversas clases de CDKs, pero solo las de las clases A, B, D y F están relacionadas con la regulación del ciclo celular. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* la CDKA es ortóloga a CDK1 que tiene una función importante

en las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular (Vandepoele *et al.*, 2002; Porceddu *et al.*, 2001). Además, las plantas tienen una clase única de CDKs, llamadas CDKB, las cuales son muy importantes durante la regulación de la mitosis (Andersen *et al.*, 2008; Boudolf *et al.*, 2004).

La unión de las CDKs a las ciclinas es indispensable para su activación, ya que dirigen a las CDKs hacia el núcleo puesto que estas últimas tienen señales de localización nuclear, ausentes en las CDKs. Además, la unión Cyc-CDK proporciona especificidad hacia los diferentes sustratos.

Las ciclinas son llamadas así por su expresión cíclica durante el ciclo celular, la cual permite que las CDKs sean activadas en momentos específicos. La abundancia de las ciclinas está regulada por su síntesis y degradación, porque contienen secuencias PEST, un motivo proteico rico en prolina, ácido glutámico, serina y treonina, susceptible a la ubiquitinación y que conduce a la degradación de la proteína (Bloom & Cross, 2007; Schafer, 1998).

En mamíferos existen 13 clases de ciclinas de la A a la L, y las tipo T (Pines, 1995), mientras que en plantas sólo existen siete clases diferentes: A, B, C, D, H, P y T; siendo las clases A, B y D de las que se conoce más respecto a su participación en el ciclo celular (Francis, 2007). *A. thaliana* tiene al menos 32 ciclinas, clasificadas en diferentes grupos. Las que tienen una función fundamental en la regulación de la transición G1/S del ciclo celular son las ciclinas del tipo D, las ciclinas tipo A regulan el control de la fase S a la M, y las ciclinas B regulan la transición G2/M y el control de la mitosis (Mironov *et al.*, 1999; Breyne & Zabeau, 2001; Potuschak & Doerner, 2001). Sin embargo, se han reportado casos en lo que esto no siempre funciona así. Por ejemplo, en alfalfa se demostró que la ciclina A2 (CycA2) contribuye a la especificidad no sólo en la entrada a la fase S, sino que también durante la transición de G2 a M, también hay evidencia de que algunas ciclinas tipo D podrían participar en esta transición (Inzé & De Veylder, 2006).

Otra forma de regular a las CDKs, además de su unión a las ciclinas, es la regulación por fosforilaciones en residuos de treonina y tirosina; las CDKs tienen sitios de fosforilación para activación e inhibición. La fosforilación activadora de las CDKs

ocurre en un residuo conservado de treonina ( T160 para CDK2 de humano y T161 para Cdc2 de levadura). Este evento es catalizado por una cinasa activadora de CDK (CAK) (Figura 2) (Morgan, 1997). Existen dos formas de CAK, una denominada CDKF y otra denominada CDK7 que forma un complejo heterodimérico con ciclina H en mamíferos o sus homólogos CDKD/CycH en *Arabidopsis thaliana* (Umeda *et al.*, 1998).

Por otro lado, los residuos de treonina 14 y tirosina 15, ubicados en el sitio activo de las CDKs, son fosforilados previniendo así su actividad de cinasa. La fosforilación en la treonina 14 es principalmente catalizada por la proteína Myt1, la cual sólo está conservada en mamíferos (Parker & Piwnica-Worms, 1992). Por otro lado, la cinasa WEE1 se encarga de la fosforilación inhibitoria en el residuo de tirosina 15 de CDK1 en mamíferos; es importante mencionar que a excepción de CDK7, todas las secuencias de aminoácidos en las CDKs de humano (CDK1-CDK8) contienen un residuo de tirosina fosforilable en la posición 15 (Solomon & Kaldis, 1998). La proteína WEE1 fue descubierta en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Nurse, 1975), y posteriormente fue identificada en mamíferos y también en plantas como maíz y *Arabidopsis* (Sun *et al.*, 1999; Sorrell *et al.*, 2002). WEE1 fosforila a CDK1 tras la entrada del complejo Cyc-CDK al núcleo previniendo su actividad, hasta que la célula está lista para dividirse, momento en el que la fosfatasa CDC25 desfosforila a la CDK en la treonina 14 y tirosina 15, activándola (Figura 2). Esta activación ocurre en levaduras y mamíferos, sin embargo, en plantas aún se desconoce si existe una proteína homóloga a CDC25 (Devault *et al.*, 1991; Sebastian, Kakizuka & Hunter, 1993).

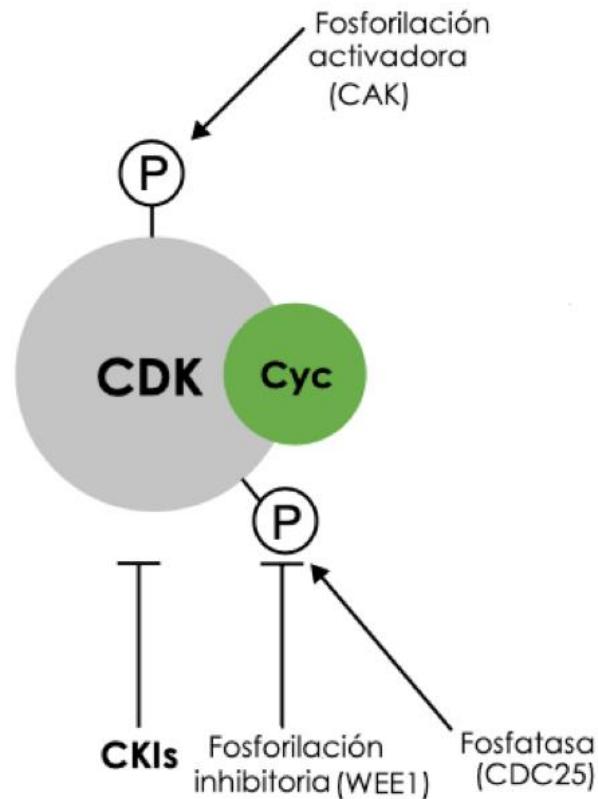
Otro mecanismo que regula la actividad de las CDKs es la unión de proteínas inhibitorias a los complejos Cyc-CDK; en mamíferos estas proteínas son conocidas como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) y promueven el arresto del ciclo celular en respuesta a señales intracelulares y extracelulares (Figura 2) (Hydbring, Malumbres, & Sicinski, 2016).

Las proteínas CKIs en mamíferos se dividen en dos familias: la familia INK4, compuesta por las proteínas p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup>, y la familia Cip/Kip, compuesta por p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>. Las proteínas de la primera clase

son exclusivas de la fase G1, e inhiben la actividad catalítica de CDK4 y CDK6 al unirse específicamente a éstas, compitiendo por el sitio de unión a ciclinas, lo que impide la formación de los complejos Cyc-CDK. Por otro lado, los miembros de la clase Cip/Kip son capaces de inhibir a diferentes complejos Cyc-CDK, ya sea uniéndose al sitio de unión a ATP de las CDKs u ocasionando un cambio conformacional en el sitio activo de las cinasas al formar complejos con éstas (Pavletich N. P., 1999; Sherr & Roberts, 1999; Quereda *et al.*, 2015).

En plantas existen las proteínas KRP (proteínas relacionadas a Kip), denominadas así debido a la similitud entre su dominio de inhibición de cinasa (KID) y el de las proteínas correspondientes de mamíferos. En *A. thaliana* se han identificado 7 genes y en maíz 8 que corresponden a KRPs, los cuales conservan el dominio KID; estas proteínas parecen unirse tanto a las CDKs como a las ciclinas, y al igual que en animales, tienen la capacidad de inhibir la actividad de cinasa de los complejos Cyc-CDK (Wang, Miskimins & Miskimins, 1999; De Veylder *et al.*, 2001; Godínez-Palma *et al.*, 2017).

Además de inhibir a los complejos Cyc-CDK, estas proteínas tienen otras funciones; se ha observado que p21, miembro de la familia Cip/Kip es capaz de asociarse con el factor de procesividad para la DNA polimerasa  $\delta$ , PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), en el mismo sitio que la DNA polimerasa impidiendo que lleve a cabo su función e inhibiendo la síntesis de DNA (Strzalka *et al.*, 2009). PCNA a su vez, es capaz de unirse a los complejos Cyc-CDK, tanto en mamíferos como en plantas, y aunque no se sabe con certeza la función de estas interacciones se especula que PCNA actúa como una plataforma para permitir que diferentes proteínas del ciclo celular se asocien y lleven a cabo su función (Xiong *et al.*, 1992; de la Paz-Sánchez *et al.*, 2002; Garza-Aguilar *et al.*, 2019).



**Figura 2. Regulación de la actividad de Cyc-CDK.** La CDK carece de actividad hasta que forma complejos con ciclinas (Cyc) y se activa por fosforilación por la cinasa activadora de CDK (CAK), mientras que se inactiva por una fosforilación inhibitoria catalizada por la cinasa WEE1, la misma fosforilación es retirada por la fosfatasa CDC25. Por otro lado, la actividad de la CDK puede inhibirse por la unión de proteínas inhibitorias como las CKIs (inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas). Modificado de Potuschak & Doerner, 2001.

### Vía E2F-DP/Rb

La transcripción es uno de los principales mecanismos regulados durante el ciclo celular, ya que por medio de ésta se coordina la expresión de factores celulares específicos cuya acción es necesaria para una correcta progresión del mismo.

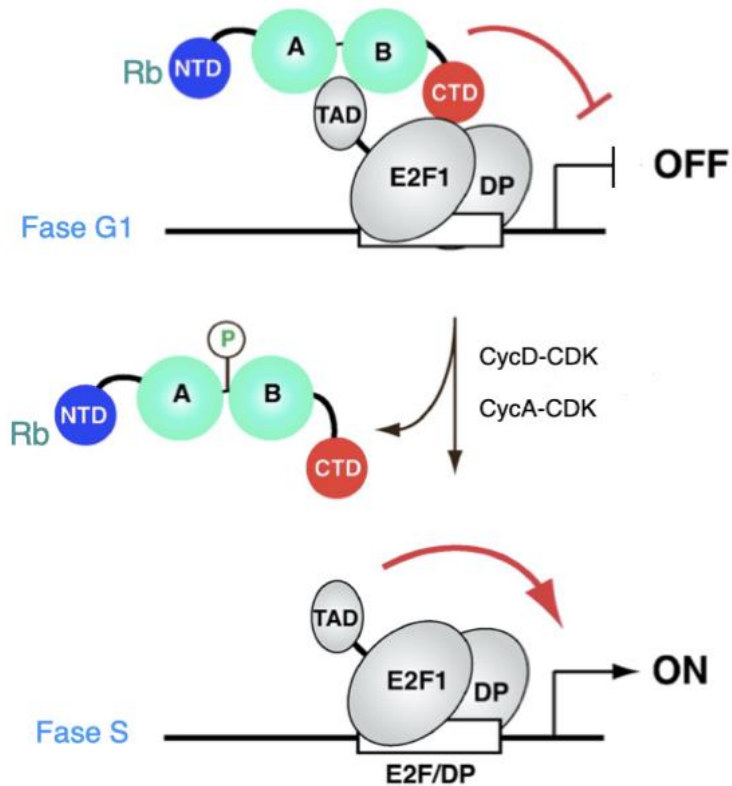
Dentro de los diversos reguladores del ciclo celular, los factores de transcripción E2F-DP, así como la proteína retinoblastoma (Rb) son elementos clave. El heterodímero E2F-DP controla la transcripción de una amplia gama de genes, incluidos aquellos implicados en la progresión del ciclo celular y la 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 del ciclo celular.

En mamíferos, los estímulos externos, como factores de crecimiento, hormonas, nutrientes y otras señales 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 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 CycD-CDK4/6 provoca la liberación del heterodímero E2F-DP de su represión por las proteínas Rb, ocasionando la transcripción de sus genes blanco, incluyendo CycE y CycA. 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) (Dyson, 1998; Sherr & Roberts, 1999; Bertoli, Skotheim & De Bruin, 2013).

Rb reprime la actividad del heterodímero E2F-DP al enmascarar físicamente el dominio de transactivación de E2F mediante su interacción con éste por medio de su dominio "*pocket*", y uniéndose por su carboxilo terminal al dominio *marked box* tanto de E2F como de DP (Figura 3) (Rubin *et al.*, 2005). Sin embargo, no sólo reprime su actividad de esta forma, sino también mediante el reclutamiento de factores de remodelación de la cromatina como desacetilasas de histonas (HDACs), algunas subunidades del complejo remodelador SWI/SNF, y metil transferasas de histonas del dominio SET (HMTases) (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 se une al heterodímero E2F-DP por medio de su dominio *pocket* (A y B en turquesa) y por su C- terminal (CTD en rojo), e inhibe la actividad transcripcional de E2F. Durante la fase G1 tardía y la fase S temprana, Rb es fosforilada, primero por el complejo CycD-CDK y luego por complejos CycA/E-CDK, lo que resulta en la disociación de Rb del complejo E2F-DP y promueve activamente la transcripción de los genes blanco de E2F, implicados en progresión del ciclo celular. Modificado de Sengupta & Henry, 2015.

Por otro lado, la asociación de E2F con su socio de dimerización, DP, incrementa la afinidad del factor de transcripción por el DNA, y es así como funciona como regulador transcripcional. Estos heterodímeros en conjunto con proteínas de la familia *pocket* (p130, p107 y pRb) se unen a los promotores de genes del ciclo celular en diferentes etapas para asegurar su correcta expresión (Dimova & Dyson, 2005; Henley & Dick, 2012). 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).

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 comparten un ancestro común (Medina *et al.*, 2016).

De forma similar a 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 (Sidorova & Breeden, 1993; Costanzo *et al.*, 2004; De Bruin *et al.*, 2004). Esto permite la transcripción dependiente de SBF de las ciclinas de G1 CLN1 y CLN2, que también inactivan a 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 algún 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 de G1 como sus objetivos específicos está altamente conservada. Interesantemente, E2F y SBF reconocen secuencias muy similares en el DNA (Thalmeier *et al.*, 1989; Badis *et al.*, 2008), además, existen estudios en los cuales se ha observado que las proteínas SBF pueden regular directamente la expresión de genes blanco de E2F a través de la unión al sitio E2F consenso en el DNA (Medina *et al.*, 2016).

### **Familia de factores de transcripción E2F**

Los factores de transcripción E2F se identificaron originalmente con estudios en adenovirus humano, en los cuales se descubrió 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, DP, 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).

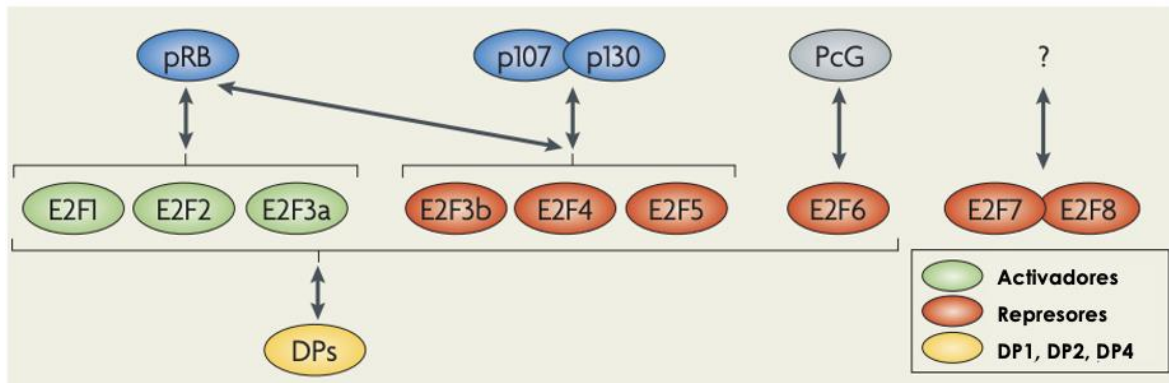
En mamíferos existen ocho genes de la familia E2F (E2F1-E2F8), de los cuales el gen E2F3 codifica para dos proteínas E2F3a y E2F3b, y el gen E2F7 para E2F7a y E2F7b (Leone *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Di Stefano, Jensen & Helin, 2003), y tres genes de la familia DP (DP1, DP2/3 y DP4) (Bandara *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1996; Milton *et al.*, 2006).

E2F1 a E2F6 requieren dimerización con una de las tres proteínas DP (Figura 4). Se ha observado que DP1 y DP2/3 incrementan la eficiencia de unión al DNA, así como el potencial de transactivación de E2F, mientras que DP4 parece interferir en la transcripción ya que posee algunas diferencias en su DBD y en su dominio de heterodimerización, ocasionando una interacción débil tanto con el DNA como con E2F (Scimè *et al.*, 2007). Además, existen diversas variantes de *splicing* de DP2/3 de las cuales no se sabe completamente su función en la regulación de la actividad de E2F (Ormondroyd, De la Luna & La Thangue, 1995).

La actividad transcripcional de E2F1-5 se regula a través de su asociación con las proteínas de la familia *pocket*. E2F1, E2F2 y E2F3 se asocian principalmente con Rb, E2F4 y E2F5 pueden asociarse con cada una de las tres proteínas *pocket* (Figura 4) (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 estimulan/encienden la expresión de los genes blanco de E2F. Esta subclase de E2Fs se expresa de una manera ciclo celular dependiente con niveles máximos en las fases 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 inactiva y/o temprana. 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*. Se ha observado que E2F6 interacciona con proteínas represoras del grupo Polycomb (PcG) de remodeladores de la cromatina sugiriendo que su función represora está mediada a través del reclutamiento de estos complejos (Trimarchi *et al.*, 2001; Di Stefano, Jensen & Helin, 2003; Logan *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005; Van den Heuvel & Dyson, 2008).



**Figura 4. Representación esquemática de los subgrupos de factores de transcripción E2F en mamíferos.** La familia E2F se divide en dos grupos definidos por su función fisiológica de activación o represión. La figura muestra las posibles interacciones de los E2F con las diferentes proteínas de la familia *pocket* (pRb, p107 y p130), así como su interacción con los diferentes DP y en el caso de E2F6 la unión con proteínas del grupo Polycomb (PcG). Modificado de Van den Heuvel & Dyson, 2008.

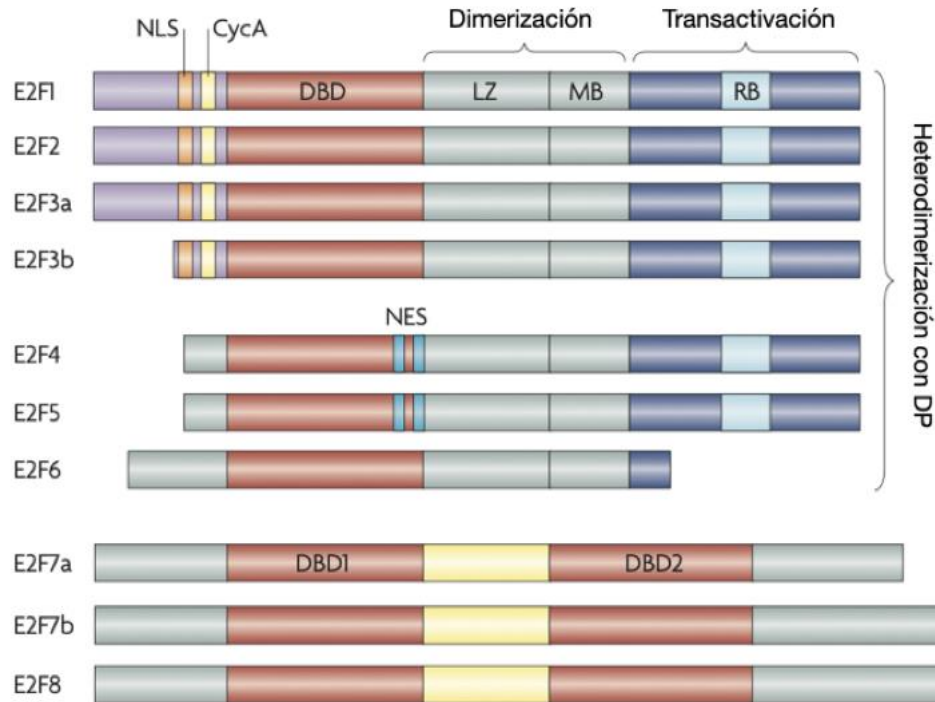
### Motivos y dominios de los miembros de la familia E2F

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 en mamíferos cada uno se une a la secuencia consenso TTTSSCGS (S es un nucleótido G o C) (Black & Azizkhan-Clifford, 1999; Zheng *et al.*, 1999). 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*.

Otra división en subgrupos dentro de la familia E2F es con base en su estructura. Las proteínas E2F1-6 son denominadas E2F típicos, debido a que poseen dos regiones que están implicadas en la dimerización con DP, una zona rica en leucinas (LZ) y otra conocida como marked box (MB). Mientras que, E2F7 y E2F8 se conocen como E2F atípicos, ya que no interaccionan con DP y pueden unirse al DNA por sí mismos ya sea como homodímeros o heterodímeros, puesto 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 (Figura 5) (Di Stefano, Jensen & Helin, 2003).



**Figura 5. Estructura de los miembros de la familia E2F de mamíferos.** E2F1-6 poseen un dominio de unión a DNA (DBD), color naranja, y un dominio de dimerización con DP que incluye dos motivos: una secuencia rica en leucinas (LZ) y un dominio *marked box* (MB), ambos en gris. E2F7 y 8 tienen dos DBD distintos. E2F1-5 poseen un dominio de transactivación (azul) dentro del cual hacia su C-terminal contiene un motivo que media la asociación con miembros de la familia *pocket* (RB). También se muestran señales de localización nuclear (NLS) y sitios de unión a ciclina A (Cyc) presentes en E2F1-E2F3, así como señales de exportación nuclear (NES) en E2F4 y 5. Modificado de Chen, Tsai & Leone, 2009.

## E2F en plantas

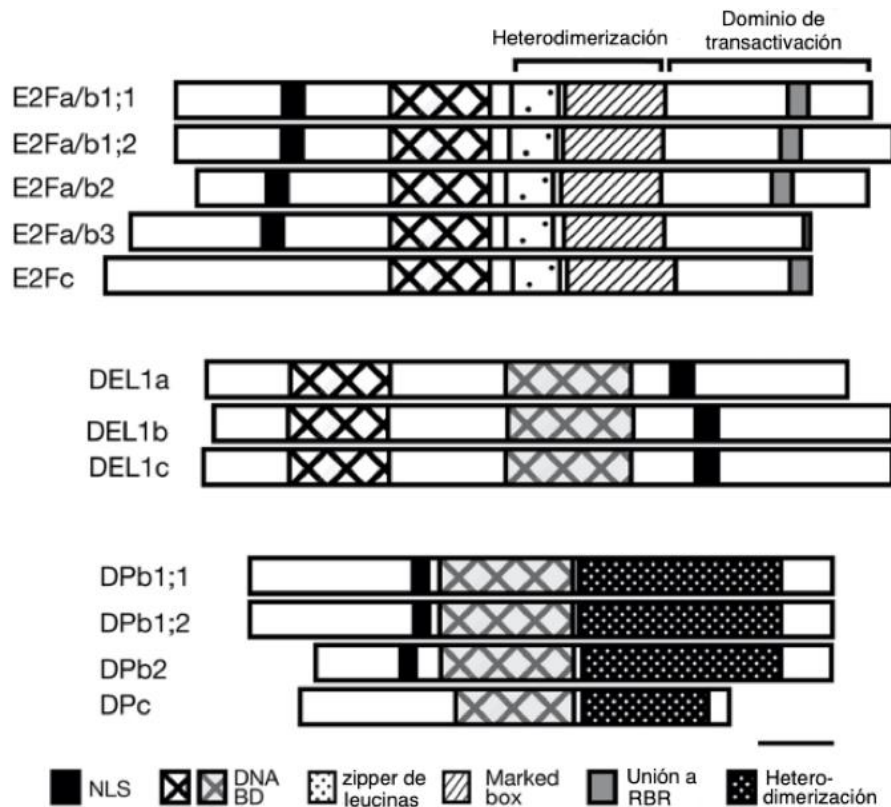
Diversos estudios han demostrado la presencia de la vía Rb/E2F-DP en plantas (Xie *et al.*, 1996; Ramirez-Parra *et al.*, 1999; Magyar *et al.*, 2000). Las proteínas E2F y DP han sido identificadas en diversas especies de plantas incluyendo trigo, tabaco, zanahoria, arroz, *Arabidopsis*, y maíz (Albani *et al.*, 2000; Kosugi & Ohashi, 2002; Sánchez-Camargo *et al.*, 2020).

*Arabidopsis thaliana* tiene tres proteínas E2F: E2Fa, E2Fb y E2Fc, las cuales contienen un dominio de unión a DNA, dominios para la dimerización con DP, y un dominio para la regulación transcripcional dentro del cual tienen un motivo para la

interacción con RBR (proteína relacionada a Rb, en plantas) (Mariconti *et al.*, 2002), presentando una organización similar a las proteínas de mamíferos E2F1-5. E2Fa y E2Fb presentan propiedades de activación transcripcional, mientras que E2Fc tiene naturaleza represora.

Por otro lado, *Arabidopsis* también conserva a los miembros atípicos de la familia E2F, las proteínas DEL (DP and E2F Like) 1, 2 y 3, las cuales 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. Finalmente, *Arabidopsis* contiene dos proteínas DP (DPa y DPb) que también están relacionadas estructuralmente con la proteína DP1 humana, ya que conservan un dominio de unión a DNA y un dominio de dimerización.

Recientemente se ha descrito a la familia de factores de transcripción E2F-DP en el genoma de maíz, donde se encontró la presencia de 12 genes relacionados a la familia E2F-DP; 5 genes codifican para proteínas E2F típicas, 4 de éstas fueron clasificadas en un grupo denominado a/b debido a la identidad en su secuencia con las proteínas E2Fa y E2Fb de *Arabidopsis*, y que incluye a las proteínas E2Fa/b1;1, E2Fa/b1;2, E2Fa/b2 y E2Fa/b3; se cree que estas actúan como activadores transcripcionales. Mientras que la quinta proteína típica, E2Fc, se encontró más relacionada con el represor AtE2Fc, por lo que se sugiere que actúa como represor. Otros 3 genes codifican para proteínas E2F atípicas (DEL), las cuales se agruparon sólidamente con AtDEL1, por lo que fueron nombradas DEL1a, DEL1b y DEL1c. Además, se identificaron 4 genes codificantes para proteínas DP, de las cuales 3 se agrupan con AtDPb, llamadas DPb1;1, DPb1;2 y DPb2, mientras que la cuarta no se agrupó con las DP de *Arabidopsis*, por lo que fue nombrada DPc, creando una categoría exclusiva de monocotiledóneas. Todos los miembros identificados conservan los dominios y motivos típicos de la familia E2F-DP (Figura 6) (Sánchez-Camargo *et al.*, 2020).



**Figura 6. Organización estructural de las proteínas de la familia E2F y DP de maíz.** Los E2F típicos tienen un dominio de unión a DNA (DNA BD), un dominio *marked box* y un *zipper* de leucinas, una señal de localización nuclear (NLS) y un motivo de unión a RBR dentro del dominio de transactivación, el cual se encuentra trunco en E2Fa/b3 debido a un codón de paro prematuro. Las proteínas atípicas tienen dos dominios de unión a DNA y NLS en el carboxilo terminal. El grupo de DP contiene dominios de unión al DNA, dominios de heterodimerización con E2F y NLS. Modificado de Sánchez-Camargo *et al.*, 2020.

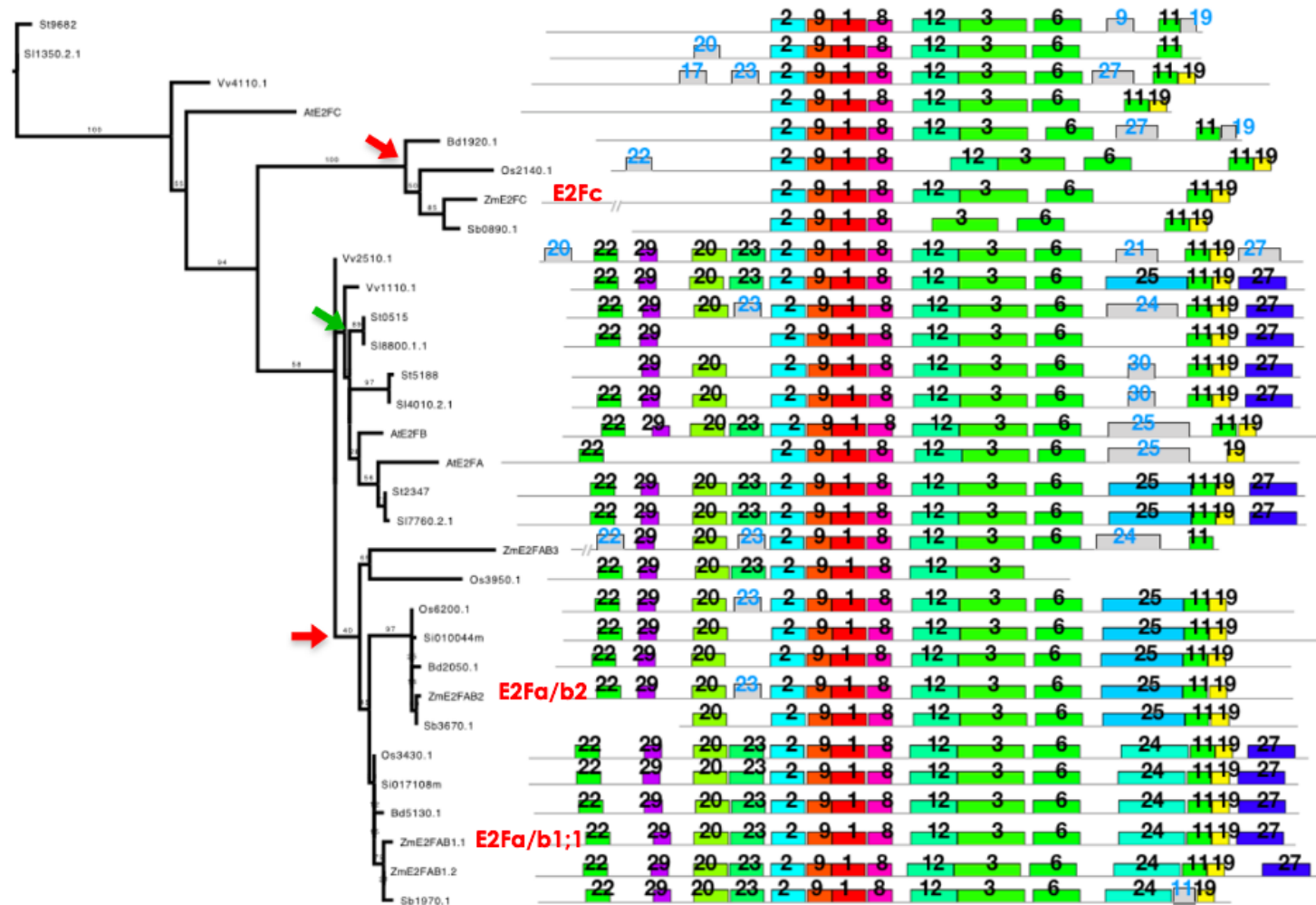


## ANTECEDENTES

En nuestro equipo de trabajo se ha estudiado la presencia de la familia de factores de transcripción E2F en el genoma de maíz. Después de comprobar la conservación de motivos y dominios de la familia, y de analizar los niveles de expresión de los 12 genes identificados, se clonaron dos miembros E2F típicos que fueron seleccionados con base en su posición en árboles filogenéticos: E2Fa/b1;1 con posible función activadora, y E2Fc como posible represor transcripcional (Figura 7).

Además, se clonó un gen de la familia DP como socio de dimerización, que codifica para la proteína DPb2. Con estas proteínas se comprobó la formación de complejos E2Fa/b1;1-DPb2 y E2Fc-DPb2, así como la asociación de estos con el DNA en los sitios E2F de los promotores de sus genes blanco, tales como *PCNA1*, *MCM3;1* y *RPA2*. Con estos estudios se demostró que es necesaria la presencia de ambas subunidades del heterodímero para que la unión con el DNA sea afín (Sánchez-Camargo *et al.*, 2020).

Un análisis de dominios y motivos conservados entre la familia E2F de maíz y E2Fs de otras familias de plantas se identificaron motivos presentes en ciertas proteínas, pero ausentes en otras (Sánchez-Camargo *et al.*, 2020). Por ejemplo, dentro de los 40 aminoácidos finales de la proteína E2Fa/b1;1 se conserva un motivo 27, mientras que E2Fc, carece de este motivo. Además, la proteína E2Fa/b2 está posicionada en el clado de los activadores, pero no cuenta con el motivo 27, sino con otro, motivo 25, el cual a su vez está ausente en E2Fa/b1;1 y en su lugar esta proteína cuenta con el motivo 24. Es importante mencionar que estos motivos se localizan hacia el final del carboxilo terminal de las proteínas, y que tanto el motivo 24, como el 25 se encuentran ausentes en E2Fc (Figura 7). Todo esto sugiere la importancia que podrían desempeñar estos motivos en la función transactivadora o no transactivadora de las proteínas E2F.

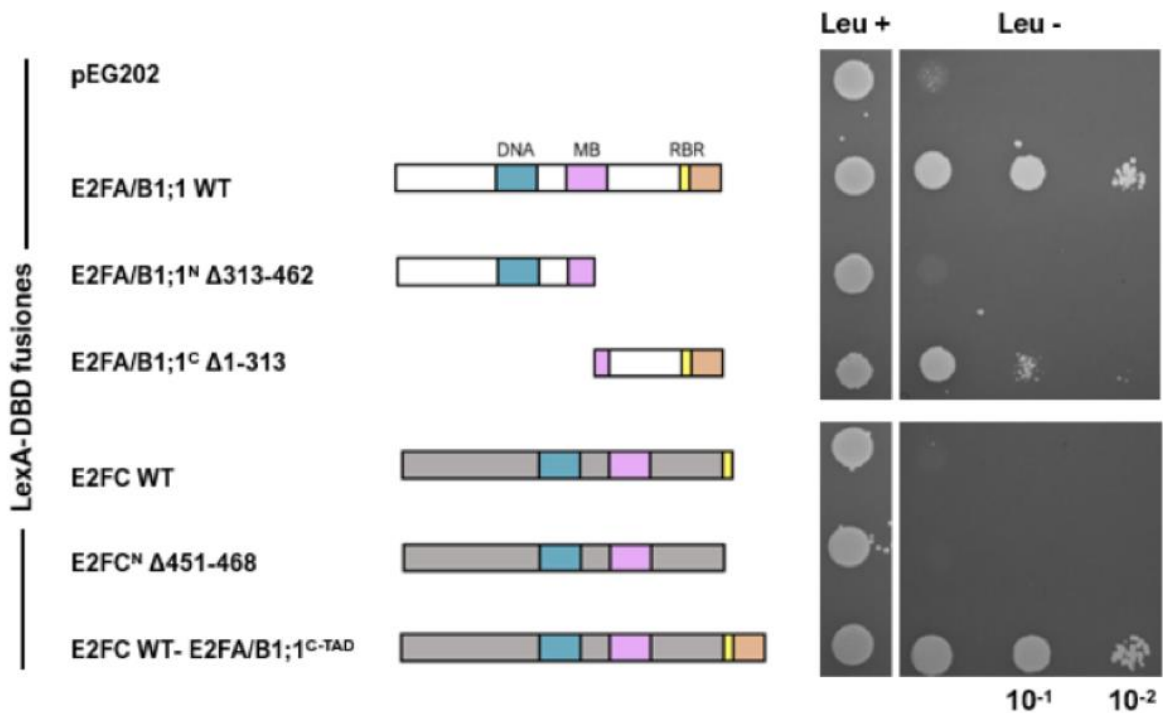


**Figura 7. Filogenia y representación de motivos y dominios en las proteínas de la familia E2F.** Se realizó la filogenia de los miembros de nueve especies vegetales: *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum tuberosum* (St), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Vitis vinifera* (Vv), *Zea mays* (Zm), *Brachipodium dystachion* (Bd), *Setaria italica* (Si), *Oryza sativa* (Os) y *Sorghum bicolor* (Sb), empleando regiones informativas de las proteínas. Se indica con flechas verdes clados formados por proteínas de especies dicotiledóneas o flechas rojas por proteínas de monocotiledóneas. Del lado derecho de cada secuencia se representa la estructura de dominios y motivos de cada proteína de los subgrupos E2F. Los recuadros grises son predicciones del motivo correspondiente con un E-value fuera del límite establecido. Se señalan en rojo E2Fc, E2Fa/b2 y E2Fa/b1;1. Modificado de Sánchez- Camargo *et al.*, 2020.

Con lo anterior en mente, se estudió la función transcripcional de las proteínas seleccionadas, y por medio de ensayos de transactivación en levadura se observó que E2Fa/b1;1 actúa como un activador transcripcional al encender la expresión de los genes reporteros, en contraste con la proteína E2Fc, la cual no fue capaz de activar dicha expresión, por lo que se sugiere que actúa como un represor de la transcripción (Figura 8) (Romero, 2019). Para conocer más acerca de la función de estas proteínas, se diseñaron mutantes en las cuales se deletaron ciertos motivos tanto para E2Fa/b1;1, como para E2Fc y se probaron en el sistema de transactivación en levaduras.

Se demostró que la actividad de transactivación de E2Fa/b1;1 está dada por su carboxilo terminal (E2Fa/b1;1<sup>C</sup> Δ1-313), y que la incapacidad de E2Fc para activar la transcripción es intrínseca de la proteína, ya que con la construcción E2Fc<sup>N</sup> Δ451-468, donde la proteína carece de su motivo de unión a RBR, sigue sin detectarse activación de los genes reporteros, sugiriendo que la represión por parte de E2Fc no sólo es por la formación del complejo E2Fc-RBR, sino que la proteína por sí misma no tiene la capacidad de actuar como un activador (Figura 8). Si bien, en este sistema no puede comprobarse la represión cooperativa entre E2Fc y RBR, ya que las levaduras carecen de esta última proteína, sí se puede observar que al menos E2Fc sin este dominio sigue comportándose de la misma forma.

Interesantemente, la fusión traduccional de la proteína E2Fc WT con el motivo 27 (correspondiente a los 40 aminoácidos finales de E2Fa/b1;1), ausente en E2Fc (E2Fc WT- E2Fa/b1;1<sup>C-TAD</sup>) fue capaz de activar la expresión de los genes reporteros, lo que indica que esta secuencia juega un papel importante durante la activación transcripcional (Figura 8) (Romero, 2019).



**Figura 8. Capacidad de transactivación de las proteínas E2Fa/b1;1 WT, E2Fc WT y sus respectivas variantes de dominios 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 en medio selectivo con o sin leucina. WT, wild type; E2FA/B1;1<sup>N</sup> Δ313-462, amino terminal; E2FA/B1;1<sup>C</sup> Δ1-313, carboxilo terminal; E2FC<sup>N</sup> Δ451-468, amino terminal; E2FC WT- E2FA/B1;1<sup>C-TAD</sup>, fusión entre los 40 aminoácidos de E2FA/B1;1 con E2FC WT. El crecimiento de las células se analizó mediante diluciones seriadas durante 3 días a 30°C. Romero, 2019.

Estos resultados en conjunto con los análisis filogenéticos sugieren que dentro de esta familia de factores de transcripción de maíz existen diferentes motivos y dominios que podrían estar regulando la actividad de estas proteínas. Por esta razón, conocer su función ayudaría a determinar si la ausencia o presencia de estos motivos en las diferentes proteínas E2F es un punto clave en el desempeño de su función como factores de transcripción activadores o represores.

## JUSTIFICACIÓN

En maíz la familia de factores transcripcionales E2F-DP se encuentra conservada, y en los últimos años nuestro grupo de investigación ha realizado estudios para caracterizarla. Hasta ahora, se ha estudiado la expresión de los genes de la familia, la interacción entre E2F y DP, la asociación de estos heterodímeros con los promotores de algunos de sus genes blanco, y más reciente la función transcripcional de estos factores de transcripción. Ahora se sabe que el carboxilo terminal de estas proteínas alberga motivos importantes para llevar a cabo su función. Conocer más a detalle la función que desempeñan ciertos motivos durante la activación transcripcional nos permitirá ampliar el conocimiento acerca del papel que desempeñan estas proteínas durante el ciclo celular en el maíz.

## HIPÓTESIS

La función transcripcional activadora de E2Fa/b1;1 estará determinada por los motivos 24 y 27 del carboxilo terminal de la proteína.

## OBJETIVO GENERAL

Establecer la importancia de los motivos 24 y 27 de E2Fa/b1;1 en su función como factor de transcripción activador en un sistema de transactivación en levadura.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- ✧ Estudiar la función transcripcional del motivo 27 de E2Fa/b1;1 mediante ensayos de transactivación en levadura
- ✧ Estudiar la función transcripcional de E2Fa/b1;1 sin el motivo 27 mediante ensayos de transactivación en levadura
- ✧ Estudiar el papel del motivo 24 en la función transcripcional de E2Fa/b1;1 mediante ensayos de transactivación en levadura

## METODOLOGÍA

### Clonación de E2Fa/b1;1 en vectores de expresión para levadura

Para generar las construcciones de E2Fa/b1;1, se amplificaron los fragmentos por medio de PCR utilizando como templado la construcción pPAL7/E2Fa/b1;1 (previamente generada en el laboratorio) con los oligonucleótidos diseñados para cada inserto (Tabla A1, ver apéndice 3). Las reacciones de PCR se hicieron con la enzima iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (BioRad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se corrió una fracción de cada producto de PCR en gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio y se obtuvo 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 así como el vector pEG202 de expresión para levadura (donado por el laboratorio del Dr. Roberto Coria del IFC, UNAM), fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes a cada inserto (Tabla 1). El procedimiento de digestión fue el siguiente: 30 minutos de incubación del DNA a 37°C con 1 U de la enzima 1, después se le añadió 0.5 U más de enzima 1 y 1 U de la enzima 2, y se incubaron 30 minutos, finalmente se le añadió 0.5 U más de la enzima 2 y se incubaron 30 minutos adicionales. Las digestiones (inserto y vector) fueron purificadas con el kit Expin PCR SV (GeneAll) y cuantificadas. Después, se llevó a cabo la ligación en 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.

**Tabla 1. Enzimas utilizadas en la clonación.** Se muestran los genes clonados en el vector pEG202 y las enzimas utilizadas para las dobles digestiones tanto del inserto como del vector.

Inserto	Enzimas	Inserto	Enzimas
1. E2Fa/b1;1 <sup>N</sup> (para fusionar)	<i>EcoR</i> y <i>NcoI</i>	5. E2Fa/b1;1 Δ27	<i>EcoRI</i> y <i>NcoI</i>
2. E2Fa/b1;1 27 (para fusionar)	<i>NcoI</i> y <i>NotI</i>	6. E2Fa/b1;1 24	<i>NcoI</i> y <i>XhoI</i>
3. E2Fa/b1;1 <sup>N</sup> + 27	<i>EcoRI</i> y <i>NotI</i>	7. E2Fc- E2Fa/b1;1 24	<i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i>
4. E2Fa/b1;1 27	<i>EcoRI</i> y <i>NcoI</i>		

Posteriormente se incubó una fracción del producto de ligación (5 µl) con 100 µl de células CaCl<sub>2</sub> competentes de la cepa de *E.coli* XL10-Gold, 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. A continuación 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 xg 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 (35 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml), y se incubaron toda la noche a 37°C.

Para la selección de colonias positivas, se llevaron a cabo reacciones de PCR en colonia con un oligonucleótido complementario al vector (Fw pEG202 sec) y otro complementario al inserto (oligonucleótido antisentido correspondiente a cada inserto), probando 10 colonias candidatas. De las colonias que resultaron positivas se seleccionaron dos candidatas para ser inoculadas 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 GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific). Se cuantificó el DNA, y se realizaron reacciones de PCR con los oligonucleótidos sentido y antisentido de cada gen y ensayos de doble restricción con las enzimas correspondientes. Ambos experimentos se monitorearon en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio. Finalmente, se seleccionó una sola colonia, y el inserto correspondiente fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de IBt de la UNAM, confirmando la correcta clonación.

### **Clonación de pEG202/E2Fa/b1;1<sup>N</sup> + 27**

Para fusionar el amino terminal de E2Fa/b1;1 (E2Fa/b1;1<sup>N</sup>) con el dominio 27 de E2Fa/b1;1 (E2Fa/b1;1 27) se amplificaron ambas secuencias por separado con los oligonucleótidos correspondientes. El oligonucleótido antisentido para E2Fa/b1;1<sup>N</sup> tiene en su secuencia un sitio de corte para la enzima *Nco*I, al igual que el oligonucleótido sentido de E2Fa/b1;1 27 de forma que al ser amplificados, ambos

genes tendrían un sitio para *NcoI* que posteriormente permitiría su fusión/ligación (ver tabla 1).

Después de ser amplificados, fueron digeridos con la enzima *NcoI* durante 1 h a 37°C, y posteriormente purificados por columna. Se utilizaron 100 ng de E2Fa/b1;1<sup>N</sup> y 300 ng de E2Fa/b1;1 27 para llevar a cabo la ligación de ambos fragmentos con la enzima T4 DNA Ligase (Promega). La reacción se incubó durante 3 h a temperatura ambiente, y posteriormente se utilizó una fracción de ésta como templado para una reacción de PCR para amplificar un mayor número de copias de la fusión ligada. El producto amplificado se purificó por columna y después fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *NotI* (ver tabla 1), con el protocolo antes mencionado. Posteriormente este producto fue ligado al vector pEG202 (previamente digerido) en una proporción 3:1 (inserto:vector), la reacción se incubó durante toda la noche a 4°C.

Finalmente, se transformaron células CaCl<sub>2</sub> competentes de *E.coli* de la cepa XL10-Gold con 5 µl de la reacción de ligación. El protocolo de transformación y selección de colonias fueron los anteriormente mencionados.

### **Clonación de la fusión pEG202/E2Fc-E2Fa/b1;1 24**

Para generar la fusión de E2Fc WT con E2Fa/b1;1 24 se amplificaron los fragmentos por separado mediante PCR, con sus respectivos oligonucleótidos, de los cuales el oligonucleótido sentido de E2Fa/b1;1 y el oligonucleótido antisentido de E2Fc permitieron posteriormente la fusión entre los dos genes, ya que estos son complementarios (Apéndice 3, tabla A1 y A2).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 100 µl con la enzima iProof™ High Fidelity Polymerase (BioRad), siguiendo las condiciones del fabricante. Se utilizó como templado pPAL7/E2Fa/b1;1 para el fragmento de E2Fa/b1;1 24, y pPAL7/E2Fc para amplificar E2Fc WT. Una fracción de las reacciones (aproximadamente 5 µl) fue monitoreada en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio. Después, el resto de cada reacción se cargó en un



gel de agarosa al 0.9 % y se corrió la electroforesis durante 40 minutos. Las bandas de interés fueron cortadas del gel y purificadas por columna con el kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, con los fragmentos purificados se llevó a cabo una reacción de PCR en 100  $\mu$ l para fusionarlos, siguiendo el procedimiento a continuación: en un tubo se preparó una mezcla de agua, buffer HF 5X (BioRad), 17.5 ng del fragmento de E2Fc WT y 3.5 ng del fragmento E2Fa/b1;1 24 (cantidades calculadas para una proporción 1:2 dependiente del tamaño de cada fragmento y del volumen de la reacción), 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 oligonucleótidos complementarios de cada fragmento se alinearan, después se agregó la enzima iProof™ (BioRad) y dNTPs (0.2 mM), seguido de un paso de extensión a 72°C por 15 minutos. Finalmente, se agregaron los oligonucleótidos para amplificar el fragmento ya fusionado (*Fw* E2Fc WT *EcoRI* y *Rv* 24 *XhoI*, ver apéndice 3) y se le dieron 35 ciclos regulares de PCR.

Una fracción de la reacción de fusión (aproximadamente 5  $\mu$ l) fue monitoreada en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, la reacción restante fue purificada por columna con el kit Expin PCR SV (GeneAII) y cuantificada. Después, aproximadamente 5  $\mu$ g de esta fusión (E2Fc-24) y el vector pEG202 fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* durante 3 h en reacciones de 50  $\mu$ l. Ambas reacciones fueron cargadas en un gel de agarosa al 0.9 % teñido con bromuro de etidio, y la electroforesis se corrió durante 40 minutos. Las bandas de interés fueron cortadas y purificadas con el kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific), y posteriormente cuantificadas.

Después se llevó a cabo la ligación con 50 ng del vector y la cantidad calculada de inserto para una proporción 5:1 (inserto:vector), utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Promega). La reacción se incubó durante 4 ciclos de 2 h a 22°C y 2 h a 4°C, y se inactivó la enzima a 65°C durante 20 minutos.

Finalmente, se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa XL10- Gold con 8 µl de la reacción de ligación y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42.5°C durante 30 segundos y nuevamente fueron incubadas en hielo durante 5 minutos. Después se les agregó 900 µl de medio SOC (precalentando a 37°C) y se dejaron recuperar las células durante 90 minutos a 37°C en agitación. Después de este tiempo, se centrifugaron las células a 12000 xg, se resuspendieron en 100 µl de medio SOC, se plaquearon en agar LB con ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron incubando toda la noche a 37°C.

Se seleccionaron 12 colonias candidatas positivas y se verificaron por medio de PCR en colonia con los oligonucleótidos Fw pEG202 sec y Rv pEG202 (ver apéndice 3), los cuales son complementarios al vector. Se obtuvieron tres posibles colonias positivas, de las cuales se extrajo plásmido y se verificaron con reacciones de PCR con los oligonucleótidos Fw E2FC WT *EcoRI* y Rv 24 *XhoI* (los cuales amplifican la fusión de interés) y con ensayos de doble restricción con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Las putativas clonas positivas fueron secuenciadas en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt, UNAM, y se seleccionó una de estas para los ensayos pertinentes.

### **Transfección y ensayo de transactivación en *Saccharomyces cerevisiae***

Se realizó un pre-cultivo de células EGY48 (genotipo: *MAT $\alpha$* , *ura3*, *his3*, *trp1*, *LexAop (6x)::LEU2*) de *Saccharomyces cerevisiae* (donada por el laboratorio del Dr. Roberto Coria) en 4 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.

El protocolo de preparación de células competentes y transformación se basó en el estudio de Gietz & Schiestl, 2007.

Las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos y se lavaron dos veces con 1 ml de H<sub>2</sub>O cada uno, después se resuspendieron en 500 µl de H<sub>2</sub>O, y se hicieron alícuotas de 100 µl de células en tubos de microcentrífuga. Cada alícuota se centrifugó durante 30 segundos y al botón se le adicionó una mezcla de componentes para su transfección, que contenía: 240 µl de PEG3350 (50 % p/v), 36 µl de acetato de litio 1M, 12.5 µl de DNA de esperma de salmón (8mg/ml) (previamente desnaturalizado) y 41.5 µl de una mezcla de H<sub>2</sub>O con los plásmidos correspondientes (400 ng de cada uno). Las células se resuspendieron en la mezcla anterior y se incubaron a 42°C por 40 minutos.

Finalmente se obtuvo el botón de las células y se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O, se plaquearon en agar SD suplementado con triptófano y leucina (Sigma) y se incubaron durante 3-4 días a 30°C.

Para los ensayos de transactivación, se seleccionaron aproximadamente 10 colonias y se replicaron primero en medio sólido SD suplementado con triptófano y leucina y se incubaron a 30°C durante un día. Posteriormente las mismas colonias fueron replicadas en un medio sólido SD suplementado únicamente con triptófano y se incubaron a 30°C durante un día. Las colonias capaces de crecer en los medios carentes de leucina corresponden a las colonias positivas.

### **Ensayos de actividad de β- galactosidasa**

Se inoculó una colonia de cada construcción en 4 ml de medio YPD líquido y se incubó a 30°C durante 12-15 h a 200 rpm. Se utilizó una porción de este pre-cultivo para inocular 20 ml de medio líquido YPD para iniciar con una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de aproximadamente 0.2, y se incubó a 30°C alrededor de 3h a 200 rpm hasta llegar a una DO<sub>600</sub> 0.7-1. Una vez que las células llegaron a la densidad óptica deseada, se centrifugaron 15 unidades de DO a 4000 rpm durante 5 minutos, posteriormente el botón se lavó con 1 ml de agua, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 500 µl de amortiguador Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl y 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0), y se agregaron a un tubo de microcentrífuga con aproximadamente 500 µl de perlas de vidrio. Las células se lisaron en ciclos de 1

minuto en vortex y 1 minuto de incubación en hielo, repitiendo esto 4 veces. Después, el lisado se centrifugó a 12000 rpm durante dos minutos y se recuperó el sobrenadante (extracto proteico). Los extractos fueron cuantificados por el método de Bradford.

Para la reacción de  $\beta$ - galactosidasa se agregó a celdas de plástico 400  $\mu$ l de amortiguador Z más  $\beta$ - mercaptoetanol (27  $\mu$ l/ 10 ml amortiguador Z) 100  $\mu$ l de extracto proteico y o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) (4 mg/ml). El tiempo inicial se tomó una vez que el ONPG fue agregado a la reacción. Las reacciones fueron incubadas a 30°C de 15-30 minutos (hasta que se observara un color amarillo en la reacción), después fueron detenidas con 250  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Finalmente, se leyó la densidad óptica del producto de la reacción (o- nitrofenol) a una longitud de onda de 420 nm. Para el blanco, se sustituyo el extracto proteico por amortiguador Z.

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<sub>420nm</sub>= 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

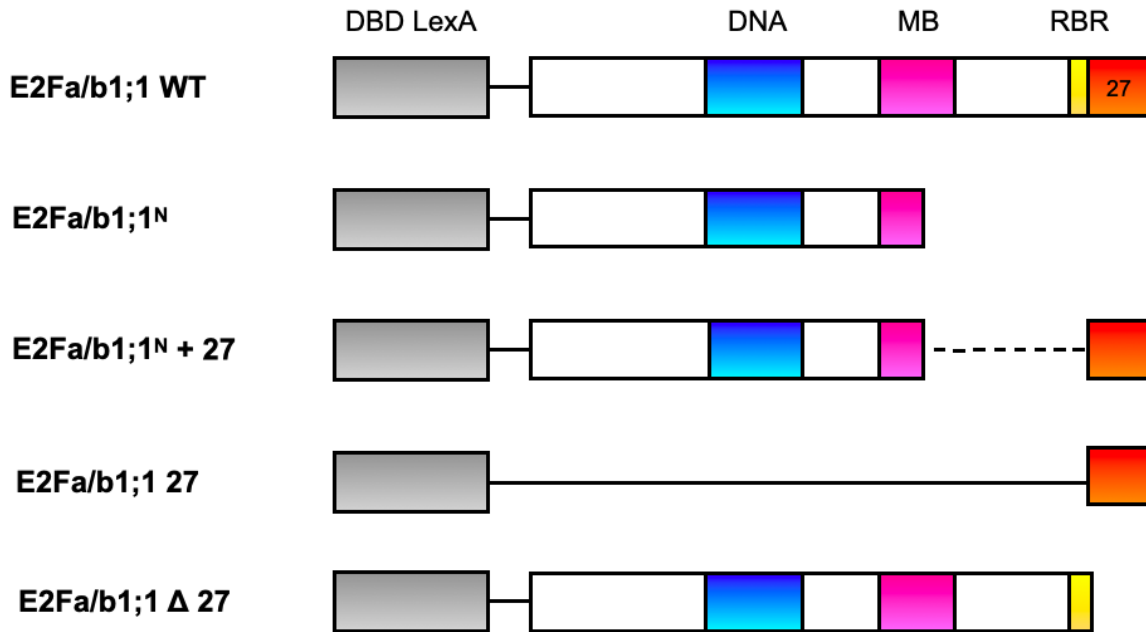
## RESULTADOS

### **El motivo 27 de E2Fa/b1;1 es suficiente para activar la transcripción, pero no indispensable para que la proteína funcione como un FT activador**

Los resultados reportados por Romero (2019) sugieren que el motivo 27, correspondiente a los 40 aminoácidos finales de E2Fa/b1;1 de maíz, es importante para que este factor de transcripción actúe como activador. Se observó que E2Fc, un FT sin la capacidad de transactivar, al ser fusionado con el motivo 27 adquirió la función de activador transcripcional, apoyando así la hipótesis de que este motivo es importante durante la activación de la transcripción.

Para abundar y conocer más acerca de la importancia de este motivo en la actividad de E2Fa/b1;1 se planearon mutaciones estratégicas de la proteína, las cuales se enfocaron en el carboxilo terminal de esta, así como en el motivo 27. En la Figura 9 se muestra una representación esquemática de los genes clonados en el vector de expresión para levadura pEG202, el cual permite la fusión traduccional del dominio de unión al DNA (DBD) de LexA con las diferentes construcciones de la proteína E2Fa/b1;1.

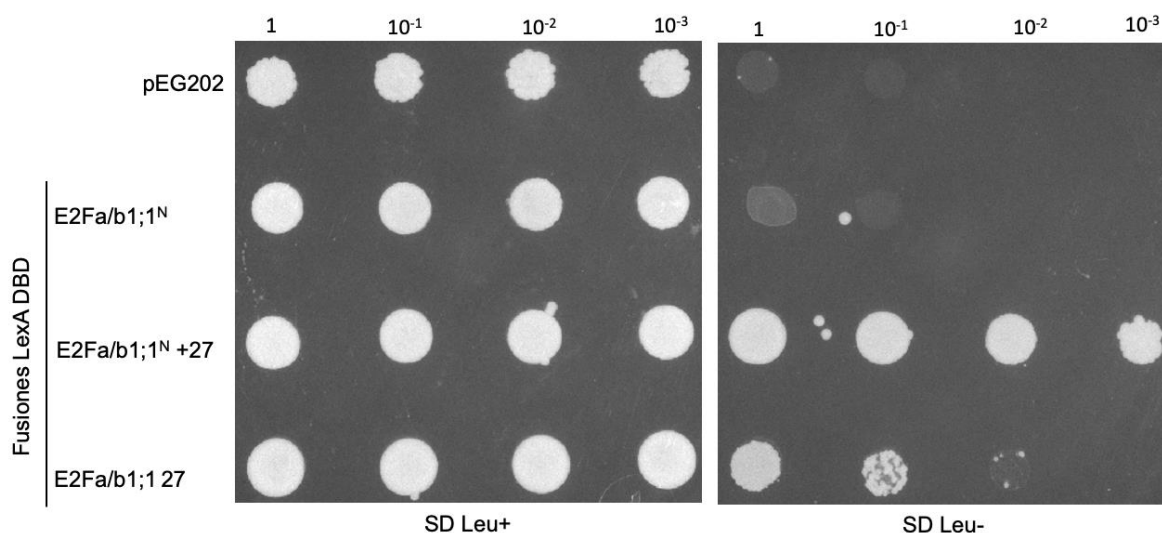
En primer lugar, en la Figura 9 se muestra a la proteína completa E2Fa/b1;1 WT y la eliminación que corresponde sólo a su amino terminal E2Fa/b1;1<sup>N</sup>; estas dos construcciones ya han sido estudiadas, y como ya se mencionó en los antecedentes, sabemos que la proteína WT funciona como activador transcripcional por medio de su carboxilo terminal, mientras que el amino terminal de la proteína no tiene esta capacidad, por esta razón, se fusionó el motivo 27 al amino terminal de E2Fa/b1;1 para corroborar que dicho motivo interviene en la activación de la transcripción (E2Fa/b1;1<sup>N</sup> + 27). También se clonó exclusivamente la secuencia codificante del motivo 27 fusionado al DBD de LexA, esperando que este fuera suficiente para activar la transcripción (E2Fa/b1;1 27). Por otro lado, se eliminó este motivo de la proteína E2Fa/b1;1 WT (E2Fa/b1;1  $\Delta$ 27), esperando que esta perdiera la función de activación transcripcional al carecer del motivo 27.



**Figura 9. Estructura esquemática de la proteína E2Fa/b1;1 y sus diferentes construcciones clonadas.** Se indican elementos funcionales. DNA (azul), dominio de unión al DNA; MB (magenta), marked box; RBR (amarillo), motivo de unión a RBR; DBD LexA (gris), dominio de unión al DNA de LexA.

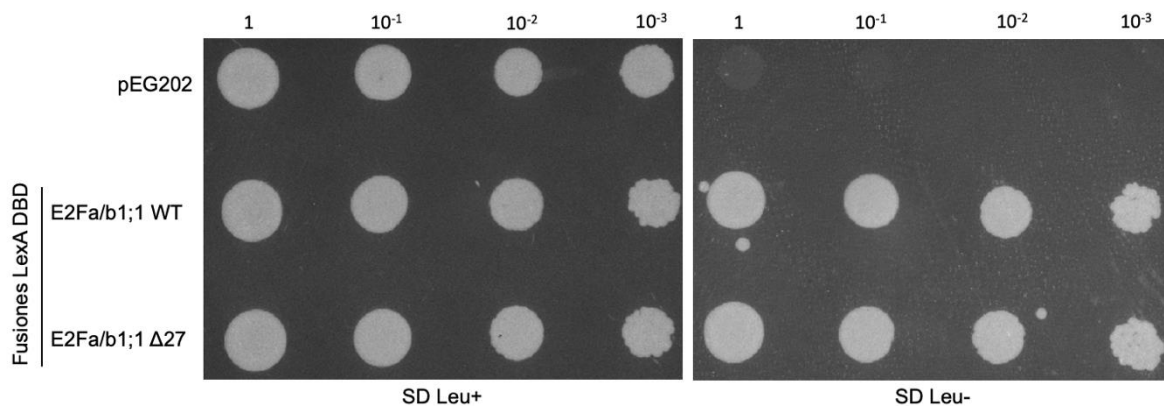
Para determinar la activación transcripcional mediada por las construcciones generadas se llevó a cabo un ensayo de transactivación en levadura. Se transfectaron células de *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa EGY48 (*MAT $\alpha$* , *ura3*, *his3*, *trp1*, *LexAop (6x)::LEU2*), en las que las secuencias activadoras río arriba del gen *LEU2* fueron remplazadas por seis operadores LexA. Además, las células se transfectaron con el plásmido reportero pSH18-34, el cual también tiene operadores LexA (8op) río arriba del gen *LacZ*. Por lo tanto, las proteínas clonadas (DBD LexA-E2F) son capaces de reconocer las secuencias en los promotores de los genes reporteros y dependen de la funcionalidad del dominio transactivador de las diferentes versiones de este para activar la transcripción de estos genes (Apéndice, Figura A7). Es así como la activación transcripcional puede estudiarse cualitativamente mediante el crecimiento en medios selectivos carentes de leucina, y cuantitativamente por medio de ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

En la Figura 10 se muestra el crecimiento de las células transfectadas con las primeras dos construcciones, E2Fa/b1;1<sup>N</sup> + 27 y E2Fa/b1;1 27. Interesantemente, las células transfectadas con el vector que expresa únicamente al motivo 27 de E2Fa/b1;1 fueron capaces de crecer en el medio SD sin leucina, demostrando que estos aminoácidos son suficientes para activar la transcripción, sin embargo, las células que expresan la fusión del amino terminal con el motivo 27 crecieron de mejor manera. Lo anterior sugirió que si bien este motivo 27 es suficiente para activar la expresión del gen reportero, el tamaño de la proteína es importante para que la transcripción sea eficiente; esto podría deberse a la conformación que el propio motivo adquiere en comparación a una proteína más grande, es decir, la estructura tridimensional podría ser importante para la interacción de E2Fa/b1;1 con otras proteínas mediadoras de la transcripción, por lo tanto, la conformación del motivo 27 podría estar ocasionando una interacción deficiente o menor con estas proteínas reguladoras de la transcripción.



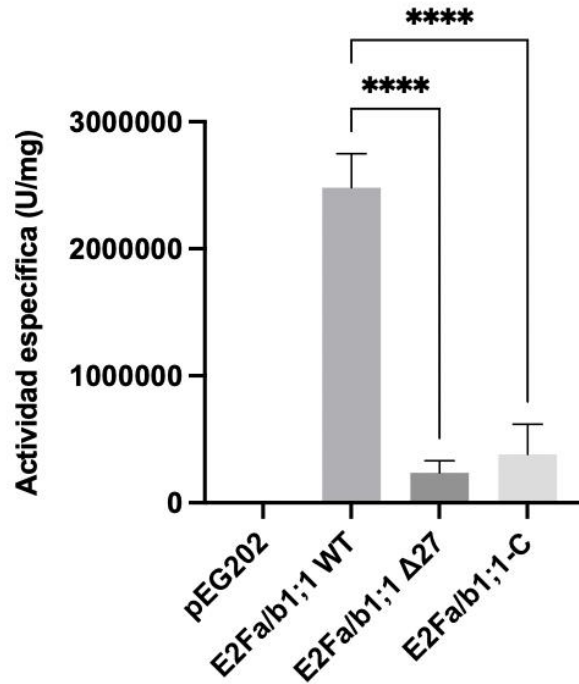
**Figura 10. Capacidad de transactivación de diferentes versiones del amino y carboxilo terminal de E2Fa/b1;1 en levaduras.** Células de *Saccharomyces cerevisiae* transfectadas con el vector pEG202 que expresa el DBD de LexA solo o fusionado a las construcciones de E2Fa/b1;1, plaqueadas en medio SD con y sin leucina en diluciones seriadas. El crecimiento de las células se analizó mediante diluciones seriadas durante 3 días a 30°C. Experimento representativo, n=3.

Para comprobar la importancia del motivo 27 en la actividad de E2Fa/b1;1 se transfectaron las células con el vector expresando la proteína sin este motivo, E2Fa/b1;1  $\Delta$ 27. Contrario a lo que se esperaba, las células fueron capaces de crecer en los medios carentes de leucina de la misma forma que las células que expresan la proteína completa (Figura 11). Estos resultados indican que el motivo 27 podría no ser indispensable para que E2Fa/b1;1 actúe como un activador transcripcional. Sin embargo, se realizaron ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 12) para tener una visión más certera de la capacidad transcripcional; en éstos se observó que la proteína E2Fa/b1;1  $\Delta$ 27 tiene una menor capacidad para activar la expresión del gen reportero significativamente menor a la proteína WT, sugiriendo que el motivo 27 es ciertamente importante. Si bien estos resultados cuantitativos muestran diferencias con los resultados cualitativos, es claro que la proteína E2Fa/b1;1 sin el motivo 27 sigue teniendo la función de activar la transcripción. Lo anterior sugiere que la región carboxilo terminal de la proteína contiene otros elementos que influyen en su desempeño como activador transcripcional.



**Figura 11. Efecto de la delección del motivo 27 de E2Fa/b1;1 en la capacidad de transactivación en levaduras.** Células de *Saccharomyces cerevisiae* transfectadas con el vector pEG202 que expresa al DBD de LexA solo o fusionado a las proteínas indicadas, plaqueadas en medio SD con y sin leucina en diluciones seriadas. El crecimiento de las células se analizó mediante diluciones seriadas durante 3 días a 30°C. Experimento representativo, n=3.





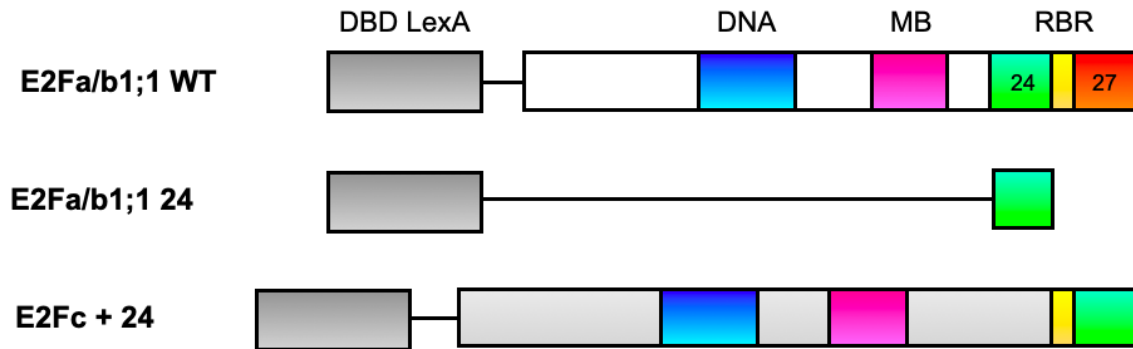
**Figura 12. Efecto cuantitativo de la delección del motivo 27 de E2Fa/b1;1 en la capacidad de transactivación en levaduras.** Ensayos de  $\beta$ -galactosidasa en células EGY48 de *Saccharomyces cerevisiae* co- transformadas con el plásmido pEG202 expresando el DBD de LexA (pEG202) solo o fusionado a E2F o sus delecciones y con el plásmido reportero pSH18-34.  $\pm$  Error estándar; n=3; T-student.

### **El motivo 24 de E2Fa/b1;1 es capaz de activar la transcripción**

El análisis *in silico* de Sánchez-Camargo *et al.*, 2020 acerca de motivos y dominios de E2F en diferentes organismos vegetales demostró que E2Fa/b1;1 de maíz además de contar con el motivo 27 en su carboxilo terminal, contiene otro motivo denominado 24, el cual está conservado en diferentes organismos, y que podría estar involucrado en su actividad transcripcional. Los datos previamente reportados y los resultados observados en el presente trabajo sugieren que el carboxilo terminal de E2Fa/b1;1 alberga motivos importantes que en conjunto son indispensables para desempeñar su función transcripcional activadora.

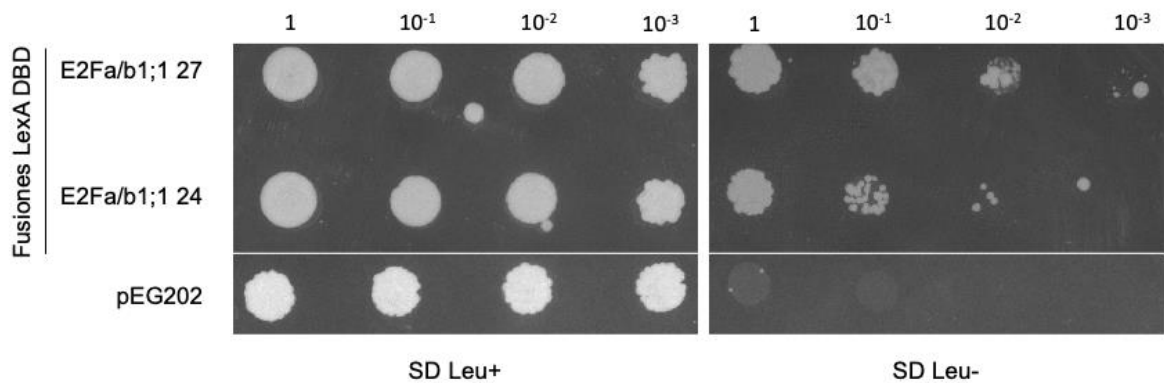
Por ello, se planteo conocer la función del motivo 24 como un posible motivo activador, por lo cual se clonó su secuencia codificante (E2Fa/b1;1 24) en el vector

pEG202, además de fusionarlo a la secuencia de E2Fc WT (E2Fc-24) (Figura 13) esperando encontrar resultados similares a los obtenidos con el motivo 27, si es que el motivo 24 también tiene alguna función como activador transcripcional.



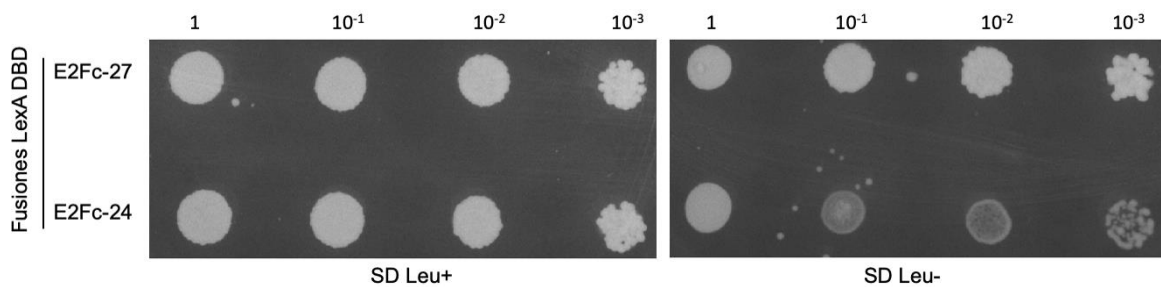
**Figura 13. Estructura esquemática de las construcciones E2Fa/b1;1 24 y E2Fc + 24.** Se indican elementos funcionales. DNA, dominio de unión al DNA; MB, marked box; RBR, motivo de unión a RBR.

Como se esperaba, el motivo 24 sí fue suficiente para activar la transcripción (Figura 14); en comparación con el motivo 27, las células transfectadas con el motivo 24 crecieron menos en el medio SD sin leucina, lo que podría indicar que si bien tiene la función activadora de la transcripción, esta es menor.



**Figura 14. Comparación de la capacidad de transactivación de los motivos 27 y 24 de E2Fa/b1;1 en levaduras.** Células de *Saccharomyces cerevisiae* transfectadas con el vector que expresa las proteínas indicadas, plaqueadas en medio SD con y sin leucina en diluciones seriadas. El crecimiento de las células se analizó mediante diluciones seriadas durante 3 días a 30°C. Experimento representativo, n=3.

Por otro lado, al fusionar al motivo 24 con E2Fc WT se observó que las células transfectadas con esta fusión fueron capaces de crecer en el medio SD selectivo, es decir, el motivo 24 fue suficiente para activar la transcripción aún cuando E2Fc WT es incapaz de hacerlo, similar a lo observado con la fusión E2Fc-27, pero en este caso también se observó que las células transformadas con la primera crecen mejor que con E2Fc-24 (Figura 15), corroborando que el motivo 27 tiene una mejor capacidad transactivadora que el motivo 24.



**Figura 15. Efecto de la adición de los motivos 27 o 24 de E2Fa/b1;1 a E2Fc en la capacidad de transactivación en levaduras.** Células de *Saccharomyces cerevisiae* transfectadas con el vector que expresa las proteínas indicadas, plaqueadas en medio SD con y sin leucina en diluciones seriadas. El crecimiento de las células se analizó mediante diluciones seriadas durante 3 días a 30°C. Experimento representativo, n=3.

En conjunto, estos resultados sugieren que tanto el motivo 27 como el motivo 24 tienen la función de activar la transcripción. Si bien se observó que E2Fa/b1;1 puede seguir transactivando sin el motivo 27, los resultados mostrados arriba evidencian su importancia, y todo parece indicar que ambos motivos estarían actuando en conjunto para llevar a cabo la activación transcripcional.

## DISCUSIÓN

Los factores de transcripción son proteínas que reconocen secuencias específicas en el DNA cooperando con otros cofactores formando complejos y regulando la expresión génica, estas proteínas tienen una función fundamental en los procesos biológicos en los eucariontes.

El marco molecular implicado en el inicio de la transcripción está formado por una multitud de factores celulares (Fietze & Farnham, 2011). Una comprensión profunda y exacta de la regulación transcripcional requiere un conocimiento detallado del conjunto estructural en el que los factores de transcripción y los corre reguladores construyen conjuntos proteicos que proporcionan control y especificidad a los programas transcripcionales. El conocimiento de los dominios proteicos que sirven como efectores biológicos para reclutar enzimas reguladoras de la transcripción y modificadoras de la cromatina es fundamental para entender como se establece un transcriptoma.

La familia de factores de transcripción E2F en células animales y vegetales desempeña una función trascendental 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. Las proteínas miembros de la familia se encuentran bien conservadas en diferentes especies de eucariontes y el maíz no es la excepción.

El descubrimiento de la presencia de la familia E2F en el genoma de maíz y su correspondiente caracterización nos ha permitido saber más sobre la función de estas proteínas como factores de transcripción. Ensayos de transactivación en levadura, demostraron que E2Fa/b1;1 de maíz tiene una función activadora de la transcripción, mientras que E2Fc no fue capaz de estimular la transcripción, sugiriendo que esta podría funcionar como un factor de transcripción represor. Ambas proteínas comparten entre ellas los motivos y dominios característicos de las proteínas E2F, sin embargo, es importante mencionar la presencia de una región de 40 aminoácidos hacia el carboxilo terminal de E2Fa/b1;1 denominada motivo 27

(Apéndice 1), el cual está ausente en la proteína E2Fc (Sánchez-Camargo *et al.*, 2020). Interesantemente, al fusionar este motivo de la proteína E2Fa/b1;1 a la proteína E2Fc, esta es capaz de activar la transcripción, sugiriendo que el motivo 27 de la proteína E2Fa/b1;1 juega un papel importante durante la regulación de la activación transcripcional (Romero, 2019).

Estos resultados nos llevaron a analizar con detalle la conformación de motivos y dominios de E2Fa/b1;1 de maíz y su importancia en la regulación transcripcional. En primer lugar, se hicieron ensayos de transactivación para determinar la función de solo el motivo 27 y se observó que por sí solo puede activar la transcripción (Figura 10), aunque no de la misma forma que la proteína completa (Figura 11), indicativo de que la estructura resultante de solo el motivo 27 no es del todo la adecuada para que se de una correcta activación transcripcional. Este motivo 27 consta de sólo 40 aminoácidos, por lo tanto, es probable que la conformación que adquiera es diferente a la conformación adquirida por la proteína completa. Al carecer del resto del carboxilo terminal de E2Fa/b1;1 o bien del resto de la proteína, el motivo 27 podría tener una menor capacidad para regular la activación transcripcional, quizá porque interacciona débilmente con otros reguladores como podrían ser factores de transcripción basales y proteínas de la maquinaria transcripcional, o bien porque no interacciona con todos los debidos, al ser una estructura pequeña la cual carece de ciertos elementos, impidiendo así la unión a estos factores reguladores, lo cual se ve reflejado en la escasa activación transcripcional en comparación con la activación por la proteína E2Fa/b1;1 completa (Figura 10, y Figura 11 ver WT).

A pesar de que la activación por parte del motivo 27 no es igual que con la proteína completa (Figura 11), la importancia de este durante la regulación de la activación transcripcional no se descarta. Es por ello que se estudió la función de E2Fa/b1;1 sin este motivo, observando que aún sin él la proteína sigue teniendo la capacidad de activar la transcripción de la misma forma que la proteína WT (Figura 11 y 12). En conjunto estos datos sugirieron que podrían existir otros elementos reguladores

en el carboxilo terminal de la proteína E2Fa/b1;1, los cuales podrían estar actuando en conjunto con el motivo 27 durante la regulación de la activación transcripcional.

Los análisis filogenéticos *in silico* realizados por Sánchez- Camargo *et al.*, (2020) mostraron la distribución de motivos y dominios de las proteínas E2F en diferentes organismos vegetales. Uno de los datos obtenidos más interesantes es la presencia del motivo 27 en proteínas de la familia *Poaceae*; proteínas E2F putativas activadoras de organismos como *Setaria italica*, *Oryza sativa*, *Brachipodium dystachion* y *Zea maize* cuentan con dicho motivo. Además, la mayoría de estos mismos miembros, incluyendo a E2Fa/b1;1 de maíz cuentan con otro motivo denominado 24 (presente solo en monocotiledóneas), y que en otros miembros de diferentes organismos ocupa la misma posición que el motivo 25, el cual se encuentra conservado en monocotiledóneas y semiconservado en dicotiledóneas como *Vitis vinifera*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*, en proteínas que putativamente son activadoras también. Lo más interesante es que las proteínas posicionadas en el clado de represores, ya sean monocotiledóneas o dicotiledóneas, entre ellas E2Fc de maíz, no cuentan con ninguno de los motivos antes mencionados (24, 25 y 27), lo que podría indicar la posible participación de éstos en la activación transcripcional (Ver Figura 7). Es importante mencionar que, la presencia de estos motivos en proteínas de otros organismos como mamíferos y levaduras no ha sido estudiado aún, lo cual hace novedoso el análisis por Sánchez-Camargo *et al.*, 2020, y los descubrimientos descritos en el presente trabajo.

La conservación de estos motivos en las proteínas de diferentes organismos vegetales indica la importancia que podrían tener durante la regulación de la expresión génica, además de que la función de los diferentes E2Fs como activadores o no activadores podría depender de la presencia o ausencia de estos motivos. Adicionalmente, estos resultados demostraron que además del motivo 27, existe otro motivo (motivo 24) en el carboxilo terminal de la proteína E2Fa/b1;1 que podría estar influyendo en su actividad como activador. La presencia del motivo 24 solo en especies monocotiledóneas sugiere que este es importante durante la

regulación transcripcional, por ello se decidió analizar la función de este motivo, situado también en el carboxilo terminal de E2Fa/b1;1.

Se observó que el motivo 24 por sí solo también es capaz de activar la transcripción, y que al ser fusionado a E2Fc le confiere la función de activar la transcripción, comportándose de una forma similar al motivo 27 (Figura 14 y 15). Sin embargo, en ambos casos se observó que el motivo 27 es dominante sobre el motivo 24, es decir, tanto la activación transcripcional por el motivo 27 por sí solo como la fusión E2Fc-27 es más fuerte que con el motivo 24. Sin embargo, esto no necesariamente quiere decir que el motivo 27 sea más importante que el 24, los resultados aquí mostrados apuntan a que ambos podrían estar actuando como dominios transactivadores y que entre estos habría una cooperatividad para que se lleve a cabo una eficiente activación transcripcional, mediando la interacción de E2Fa/b1;1 con diferentes reguladores transcripcionales, como factores de la maquinaria basal, RNA polimerasas o remodeladores de la cromatina.

Actualmente, el mecanismo exacto por el cual E2F actúa como activador transcripcional se desconoce, sin embargo, existen múltiples estudios en los que se han propuesto mecanismos con base a la interacción de los diferentes E2F con proteínas y complejos involucrados en la regulación genica.

En mamíferos se ha demostrado la unión directa de E2F1 con TBP (*TATA-binding protein*) por medio de su dominio de transactivación (Hagemeier *et al.*, 1993), y con otros factores de transcripción generales asociados a TBP como TFIIA, TFIIB y TFIIH (Fry, Slansky & Farnham, 1997; Lin *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1995). Por otro lado, también se ha observado la interacción de estos factores con enzimas remodeladoras de la cromatina; E2F1-3 son capaces de interaccionar directamente con acetil transferasas de histonas (HATs) como p300/CBP, PCAF/GNC5 y Tip60, las cuales catalizan la acetilación de lisinas en las histonas H3 y H4, y están asociadas con la activación transcripcional (Trouche, Cook & Kouzarides, 1996; Fry *et al.*, 1999; Taubert *et al.*, 2004).

Adicionalmente a la acetilación de histonas, la activación génica también está asociada con la tri-metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3). Esta es catalizada por metil transferasas de histonas de las familias MLL y SET (Nightingale *et al.*, 2007), y ya se ha demostrado la interacción directa entre E2F2, E2F4 y E2F6 con MLL, facilitando la metilación de H3K4 y la consecuente activación de genes del ciclo celular como ciclinas tipo E (Takeda *et al.*, 2006). Interesantemente, se ha demostrado que la proteína HCF-1 (*herpes simplex virus host cell factor-1*) está involucrada en este proceso, funcionando como una proteína de anclaje entre E2F y complejos multiproteicos represores y activadores dependiendo de la etapa del ciclo celular, por ejemplo, el complejo de G1/S contiene a E2F1 asociado con Ash2, un componente del complejo activador MLL (Tyagi *et al.*, 2007).

Otro grupo de proteínas con las que las proteínas E2F son capaces de interactuar y regular la transcripción son las del complejo MuvB (LIN9, LIN37, LIN52, LIN53 y LIN54), las cuales se unen a los promotores de sus genes blanco regulando un amplio conjunto de genes del ciclo celular al servir como una plataforma en el ensamblaje de factores de transcripción coactivadores y correpresores (Müller, Asthana & Rubin, 2022). El complejo MuvB coordina temporalmente la expresión de los genes necesarios para la síntesis de DNA, la formación del centromero, la división mitótica y la salida del ciclo celular, entre otros. Estas proteínas en conjunto con las proteínas DP y RB forman un complejo llamado *DREAM* (DP, RB-like, E2F y MuvB) (Sadasivam & DeCaprio, 2013). Este complejo en mamíferos reprime la mayoría de los genes regulados en el ciclo celular durante G0, cuando las células salen del ciclo celular y entran en quiescencia. Similar a otros eucariontes, las plantas comparten elementos conservados que controlan la expresión génica; en *Arabidopsis thaliana* se han identificado múltiples ortólogos de las proteínas MuvB, y además de formar complejos represores, también se han identificado proteínas co-activadoras como MYB3R4, ALY3 y TCX5, las cuales interactúan con el activador E2FB, así como con RBR1, DPA y DPB. En conjunto este complejo es requerido para la activación de genes del ciclo celular durante G2/M (Haga *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2015).



Todos estos mecanismos abren una amplia gama de posibilidades para sugerir la forma en la cual E2Fa/b1;1 podría actuar como activador transcripcional. Recientemente, en maíz se identificó la presencia de marcas de cromatina activa como la H3K4me3 y la acetilación de H3K9/K14 en los promotores de genes blanco de E2F, en los cuales previamente también se identificó un enriquecimiento de la proteína E2Fa/b1;1 (Sánchez-Camargo *et al.*, 2020). Lo anterior sugiere una posible relación y/o interacción entre E2Fa/b1;1 de maíz con la maquinaria remodeladora de la cromatina.

Sería interesante saber si existe alguna interacción directa entre esta proteína con algún co-activador transcripcional, y más interesante aún determinar qué parte de la proteína es la encargada de que se lleve a cabo esta interacción. Ya que es bien sabido que el dominio de transactivación de los E2Fs es la principal región reclutadora de reguladores transcripcionales, existe la posibilidad de que los motivos 24 y 27 albergados en el dominio de transactivación de E2Fa/b1;1 sean un punto clave para que se lleven a cabo estas interacciones; dado que los resultados demostraron que por sí solos funcionan como activadores de la transcripción, podría sugerirse que están actuando como dominios de transactivación.

El motivo 24 tiene un tamaño de 122 pb y el motivo 27 144 pb, ambos serían péptidos pequeños de 4 a 6 kDa, lo cual no sería un impedimento para que actúen como dominios transactivadores. Existen otros factores transcripcionales con dominios de transactivación pequeños, por ejemplo, aquellos que pertenecen al grupo del dominio de transactivación de 9 aminoácidos (9aaTAD), el cual es reconocido universalmente por la maquinaria de transcripción en eucariontes, dentro de dicho grupo se encuentran FTs como p53, Gal4, FOXO3, entre muchos otros (Piskacek *et al.*, 2016). Esto apoya la idea de que los motivos 24 y 27 podrían desempeñarse como dominios de transactivación.

Existe la posibilidad de que estos dos motivos actúen como dominios transactivadores independientes, actuando individualmente o en conjunto. Podría ser que por su parte el motivo 24 reclute sólo a un conjunto de proteínas, mientras que el motivo 27 a otras, o bien que ambos en conjunto recluten a otros complejos.

El factor de transcripción p53 en mamíferos, tiene en su amino terminal dos dominios de activación diferentes los cuales son capaces de interaccionar con factores de transcripción basales como TBP, TAF6, TAF9, TRAP80 y TFIID, y con remodeladores de la cromatina como p300/CBP y GNC5. Uno de estos dominios actúa en respuesta al daño en el DNA, mientras que ambos actúan en la activación de genes supresores de tumores (Raj & Attardi, 2017). Además, numerosos estudios han demostrado que la fosforilación de uno o varios residuos presentes en estos dos dominios de activación aumenta la afinidad de interacción con las diferentes proteínas mencionadas; diversas cinasas pueden fosforilar estos dominios, incluyendo a ATM, ATR, Ch2, MAPK, HIPK y varias CDKs (Jenkins *et al.*, 2012).

Esta situación podría ocurrir con E2Fa/b1;1, haciendo más interesante el posible mecanismo de activación, ya que cada uno de los motivos (24 y 27) podría estar regulando un conjunto de genes diferente, o bien ambos podrían estar colaborando en la activación de otro grupo de genes, los cuales podrían ser múltiples, ya que E2F está a cargo de la regulación de diferentes conjuntos de genes como aquellos relacionados con la progresión del ciclo celular y la replicación y reparación del DNA. Existe la posibilidad de que estos motivos en E2Fa/b1;1 alberguen sitios de importancia para la interacción con diferentes proteínas, así como posibles sitios de fosforilación que a su vez estén regulando estas interacciones.

La presencia de estos motivos en proteínas activadoras, y su ausencia en las proteínas represoras es también un indicio de su papel e importancia en la activación transcripcional. Además de la ausencia de motivos como 24 y 25 en las proteínas del clado represor (ver Figura 7), interesantemente las proteínas E2Fc en todas las especies analizadas se encuentran truncas al final del carboxilo terminal, en el límite del motivo de unión a RBR, careciendo por lo tanto del motivo 27 y sugiriendo que los E2F represores carecen del carácter activador ya que durante la evolución pudieron haber perdido esta región, y su forma de contrarrestar la actividad de los E2F activadores podría ser compitiendo por los sitios E2F en el DNA, o reclutando corepresores a los promotores de sus genes blanco por medio

de las proteínas RB; se ha observado que estas proteínas son capaces de interaccionar con múltiples proteínas remodeladoras de la cromatina que están involucradas en la represión genica, entre ellas, desacetilasas de histonas (HDACs), metil transferasas de histonas (HMTases) del grupo SET y proteínas del complejo BRM/BRG1 (Shen 2002).

Como ya se mencionó, los motivos y dominios de los factores de transcripción pueden mediar la activación o represión de genes, promoviendo la formación de cromatina activa o reprimida, interactuando con dominios y motivos de otros factores para formar plataformas que promueven el reclutamiento de proteínas correguladoras, o estimulando o inhibiendo la formación de complejos de pre-iniciación. Los dominios efectores pueden ser llevados al DNA de múltiples maneras, y el inicio de la transcripción puede desencadenarse de diferentes formas y depender de múltiples factores. Los resultados del presente trabajo son apenas un pequeño acercamiento a cómo podría regularse la activación transcripcional por parte de E2Fa/b1;1 de maíz; con el conocimiento sobre la presencia de estos dos posibles dominios activadores (24 y 27) en la proteína, se puede especular sobre diversos factores que influirían en el mecanismo, desde la conformación de estos motivos, hasta la extensa gama de reguladores con los cuales estos podrían estar interaccionando, además de la actividad que cada uno podría desempeñar ya sea individualmente y/o en conjunto.

Los resultados en maíz reportados hasta ahora han dado evidencia de funciones opuestas de las proteínas E2F: E2Fa/b1;1 se caracterizó como un activador transcripcional, mientras que E2Fc no tiene esta capacidad y la evidencia sugiere que es un represor transcripcional. En muchas especies vegetales las proteínas E2Fc terminan justo en su dominio de interacción con RBR, o bien tienen este dominio truncado, mientras que las proteínas activadoras tienen un motivo adicional después de este (Figura 7). E2Fc de maíz pudo haber perdido este motivo durante la evolución, y por tanto, su función transactivadora, convirtiéndose así en un represor que compete por los elementos de respuesta de E2F o que recluta a RBR a los sitios blanco de E2F.

Los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina asociada a E2F en semillas secas de maíz, indican que E2Fc y RBR1 se unen a los promotores de genes de fase S y después de la imbibición, estos son reemplazados por el activador E2Fa/b1;1, junto con un incremento en la expresión de los genes blanco (Sánchez-Carmargo *et al.*, 2020). En momentos posteriores a la germinación, cuando la primera ronda del ciclo celular ha terminado, RBR1, E2Fa/b1;1 y E2Fc pueden detectarse unidos a la cromatina, posiblemente formando complejos represores en el DNA. De esta manera, E2Fc-RBR1 podría prevenir el inicio del ciclo celular prematuro, y entonces RBR podría regular la función de E2Fa/b1;1 tanto para la reentrada al siguiente ciclo celular como para la salida a la diferenciación. La evidencia acumulada a lo largo de los años tiende a indicar que las semillas podrían poseer algún tipo de memoria bioquímica formada, entre otros factores, por la vía de señalización Cyc/CDK/KRP, los factores E2F/DP/RBR y el estado de la cromatina en los embriones. La correcta comunicación entre estas vías permitiría coordinar la germinación de las semillas y la primera ronda de ciclos celulares en el eje del embrión, siempre que las condiciones fisiológicas y ambientales sean favorables (Sánchez, Romero & Vázquez, 2021).

Es necesario comprender el papel de la familia E2F como núcleo de la regulación transcripcional del ciclo celular. Tanto la regulación de la vía E2F/RB como su función ilustran la gran complejidad en la coordinación de la proliferación, el crecimiento y el desarrollo. El conocimiento de la función de los E2F de maíz y el descubrimiento de los motivos 24 y 27 presentes en E2Fa/b1;1 son un punto clave y quizá el primer paso para los estudios que nos lleven a la comprensión del mecanismo transcripcional de estas proteínas.

## CONCLUSIONES

- \* El motivo 27 de E2Fa/b1;1 de maíz funciona como una región transactivadora al promover la expresión de los genes reporteros.
- \* El motivo 27 no es la única región necesaria para que E2Fa/b1;1 desempeñe su función.
- \* El motivo 24 es exclusivo de monocotiledóneas en el carboxilo terminal de E2Fa/b1;1.
- \* El motivo 24 fue capaz de funcionar como una región transactivadora, y al igual que el motivo 27 le confirió a E2Fc la función de activar la transcripción.

## PERSPECTIVAS

- \* Clonar al motivo 25 de *Arabidopsis thaliana*, el cual es proporcional al motivo 24 en dicotiledóneas, y determinar su función transactivadora.
- \* Hacer un modelo de la estructura proteica de E2Fa/b1;1 con y sin los motivos 24 y 27, así como el modelo individual de los motivos 24 y 27.
- \* Hacer un análisis filogenético más robusto de los motivos y dominios en la familia E2F en diferentes organismos, incluyendo mamíferos y otras especies vegetales.
- \* Analizar la secuencia de los motivos 24 y 27, buscando posibles regiones capaces de reclutar reguladores transcripcionales u otras proteínas.
- \* Analizar las posibles interacciones proteicas de E2Fa/b1;1 WT así como de sus motivos 24 y 27 con reguladores transcripcionales.

## REFERENCIAS

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.

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.

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

Badis, G., Chan, E., T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C., D., Gossett, A., J., Hasinoff, M., J., Warren, C., L., Gebbia, M., Talukder, S., Yang, A., Mnaimneh, S., Terterov, D., Coburn, D., Li Yeo, A., Yeo, Z., X., Clarke, N., D., Lieb, J., D., *et al.* (2008). A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell*, 32:878–887.

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.

Bloom, J. & Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews*, 8(2), 149–160.

Boudolf, V., Barroco, R., Engler, J. D. A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inze, D. & Veylder, L. (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.

Breyne, P. & Zabeau, M. (2001). Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr. Opin. Plant Biol*, 4,136–42.

Chen, H. Z., Tsai, S. Y. & Leone, G. (200). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*, 9, 785–797.

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., Breitzkreuz, 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., & Johnson, D. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Current Molecular Medicine*, 6, 739–748.

de la Paz-Sánchez M., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. & Vázquez-Ramos, J. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol Biol*, 50, 167–175.

Devault, A., Cavadore, J. C., Fesquet, D., Labbé, J. C., Lorca, T., Picard, A., Strausfeld, U. & Dorée, M. (1991). Concerted Roles of Cyclin A, cdc25+ Mitotic Inducer, and Type 2A Phosphatase in Activating the Cyclin B/cdc2 Protein Kinase at the G2/M Phase Transition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 56, 503-513.

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T. S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. & Inzé, D. (2001). Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13, 1653–1667.

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.

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

Frietze S. & Farnham P.J. (2011) Transcription Factor Effector Domains. In: Hughes T. (eds) *A Handbook of Transcription Factors. Subcellular Biochemistry*, 52, 261-277.

Fry, C. J., Slansky, J., E. & Farnham, P.J. (1997). Position-dependent transcriptional regulation of the murine dihydrofolate reductase promoter by the E2F transactivation domain. *Mol Cell Biol*, 17(4), 1966–1976.

Fry, C. J., Pearson, A., Malinowski, E., Bartley, S. M., Greenblatt, J. & Farnham, P. J. (1999). Activation of the murine dihydrofolate reductase promoter by E2F1: A requirement for CBP recruitment. *J Biol Chem*, 274(22), 15883–15891.

Garza-Aguilar, S., Axosco-Marín, J., Lara-Núñez, A., Guerrero-Molina, E. D., Lemus-Enciso, A. T., García-Ramírez, E. & Vázquez-Ramos, J. M. (2019). Proliferating cell nuclear antigen associates to protein complexes containing cyclins/cyclin dependent kinases susceptible of inhibition by KRPs during maize germination. *Plant Science*, 280, 297–304.

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.

Gietz, R. & Schiestl, R. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. (2007). *Nat Protoc*, 2, 31–34.



Godínez-Palma, S. K., Rosas-Bringas, F. R., Rosas-Bringas, O. G., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J. & Vázquez-Ramos, J. M. (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.

Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T., Nakamura, K., Jürgens, G. & Ito, M. (2011). Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/ M-specific genes in Arabidopsis. *Plant Physiol*, *157*, 706–717.

Hagemeyer, C., Bannister, A. J., Cook, A. & Kouzarides, T. (1993). The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *PNAS*, *90*(4), 1580–1584.

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., Lambrughì, 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. *Annu Rev Genet*, 40:77–105.

Jenkins, L., M., Durell, S., R., Mazur, S., J. & Appella, E. 2012. p53 N- terminal phosphorylation: A defining layer of complex regulation. *Carcinogenesis* 33, 1441–1449.

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

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Muller, S., Leviczky, T., Pettko-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J. H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bogre, L. & Ito, M. (2015). Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *The EMBO Journal*, 34(15), 1992–2007.

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.

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.

Lin, Y. S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D. & Green, M. R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature*, 353(6344), 569–571.

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.

Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S., & Inzé, D. (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *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., Grisse, W. & Murray, J. A. H. (2002). Cell Cycle-regulated Gene Expression in *Arabidopsis*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *277*(44), 41987–42002.

Milton, A., Luoto, K., Ingram, L., Munro, S., Logan, N., Graham, A. L., Brummelkamp, T. R., Hijmans, E. M., Bernards, R. & La Thangue, N. B. (2006). A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. *Oncogene* *25*, 3212–3218.

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, G., A., Asthana, A. & Rubin, S., M. (2022). Structure and function of MuvB complexes. *Oncogene*, *41*:2909-2919.

Nightingale, K. P., Gendrezig, S., White, D. A., Bradbury, C., Hollfelder, F. & Turner, B. M. (2007). Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation. *J Biol Chem*, *282*, 4408-4416.

Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* *256*, 547-551.

Ormondroyd, E., de la Luna, S. & La Thangue N. B. (1995). A new member of the DP family, DP-3, with distinct protein products suggests a regulatory role for alternative splicing in the cell cycle transcription factor DRTF1/E2F. *Oncogene*, 11(8), 1437-1446.

Parker L., L. & Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, 257(5078):1955–1957.

Parker L., L., Atherton-Fessler, S. & Piwnica-Worms, H. (1992). p107<sup>wee1</sup> is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34<sup>cdc2</sup> on tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 2917–2921.

Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk2s, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 287(5), 821–828.

Pines J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research*, 66, 181–212.

Piskacek, M., Havelka, M., Rezacova, M. & Knight, A. (2016). The 9aaTAD Transactivation Domains: From Gal4 to p53. *PLOS ONE*, 11(9), 1-16.

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.

Potuschak T. & Doerner P. (2001). Cell cycle controls: genome-wide analysis in Arabidopsis. *Cell biology*, 4(6), 501–506.

Quereda, V., Porlan, E., Cañamero, M., Dubus, P. & Malumbres, M. (2015). An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. *Cell Death Differ*, 23, 430–441.

Raj, N. & Attardi, L. D. (2016). The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1-18.

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.

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.

Roberts, S. G., Choy, B., Walker, S. S., Lin, Y. S. & Green M. R. (1995). A role for activator-mediated TFIIIB recruitment in diverse aspects of transcriptional regulation. *Curr Biol*, 5(5), 508–516.

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.

Romero Rodríguez, S. (2019). Función transcripcional de las proteínas E2FA/B1;1 y E2FC de maíz [Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM]. TESIUNAM.

Rubin, S. M., Gall, A. L., Zheng, N. & Pavletich, N. P. (2005). Structure of the Rb C-Terminal Domain Bound to E2F1-DP1: A Mechanism for Phosphorylation-Induced E2F Release. *Cell*, 123(6), 1093–1106.

Sadasivam, S. & DeCaprio, J. A. (2013) The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer*, 13, 585 – 595.

Sánchez-Camargo, V., A., Romero-Rodríguez, S. & Vázquez-Ramos, J., M. (2021). Non-Canonical Functions of the E2F/DP Pathway with Emphasis in Plants. *Phyton- International Journal of Experimental Botany*, 90(2), 307-330.

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

Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, 35(6), 461–478.

Scimè, A., Li, L., Ciavarrà, G. & Whyte, P. (2007). Cyclin D1/cdk4 can interact with E2F4/DP1 and disrupts its DNA-binding capacity. *Journal of Cellular Physiology*, 214(3), 568–581.

Sebastian, B., Kakizuka, A. & Hunter, T. (1993). Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3521–3524.

Sengupta, S. & Henry, R. W. (2015). Regulation of the retinoblastoma-E2F pathway by the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849, 1289-1297.

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.

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.

Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T. A., Minx, P., Reily, A. D., Courtney, L., Kruchowski, S. S., Tomlinson, C., Strong, C., Delehaunty, K., Fronick, C., Courtney, B., Rock, S. M., Belter, E., Du, F., Kim, K., Abbott, R. M., Cotton, M., Levy, A., Marchetto, P., Ochoa, K., Jackson, S. M., Gillam, B., Chen, W., Yan, L., Higginbotham, J., Cardenas, M., Waligorski, J., Applebaum, E., Phelps, L., Falcone, J., Kanchi, K., Thane, T., Scimone, A., Thane, N., Henke, J., Wang, T., Ruppert, J., Shah, N., Rotter, K., Hodges, J., Ingenthron, E., Cordes, M., Kohlberg, S., Sgro, J., Delgado, B., Mead, K., Chinwalla, A., Leonard, S., Crouse, K., Collura, K., Kudrna, D., Currie, J., He, R., Angelova, A., Rajasekar, S., Mueller, T., Lomeli, R., Scara, G., Ko, A., Delaney, K., Wissotski, M., Lopez, G., Campos, D., Braidotti, M., Ashley, E., Golser, W., Kim, H., Lee, S., Lin, J., Dujmic, Z., Kim, W., Talag, J., Zuccolo, A., Fan, C., Sebastian, A., Kramer, M., Spiegel, L., Nascimento, L., Zutavern, T., Miller, B., Ambroise, C., Muller, S., Spooner, W., Narechania, A., Ren, L., Wei, S., Kumari, S., Faga, B., Levy, M. J., McMahan, L., Van Buren, P., Vaughn, M. W., Ying, K., Yeh, C. T., Emrich, S. J., Jia, Y., Kalyanaraman, A., Hsia, A. P., Barbazuk, W. B., Baucom, R. S., Brutnell, T. P., Carpita, N. C., Chaparro, C., Chia, J. M., Deragon, J. M., Estill, J. C., Fu, Y., Jeddelloh, J. A., Han, Y., Lee, H., Li, P., Lisch, D. R., Liu, S., Liu, Z., Nagel, D. H., McCann, M. C., SanMiguel, P., Myers, A. M., Nettleton, D., Nguyen, J., Penning, B. W., Ponnala, L., Schneider, K.L., Schwartz, D. C., Sharma, A., Soderlund, C., Springer, N. M., Sun, Q., Wang, H., Waterman, M., Westerman, R., Wolfgruber, T. K., Yang, L., Yu, Y., Zhang, L., Zhou, S., Zhu, Q., Bennetzen, J. L., Dawe, R. K., Jiang, J., Jiang, N., Presting, G. G., Wessler, S. R., Aluru, S., Martienssen, R. A., Clifton, S. W., McCombie, W. R., Wing, R. A. y Wilson, R. K. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*. 326: 1112-1115.

- Solomon, M., J. & Kaldis, P. (1998). Regulation of cdks by phosphorylation. *Results and Problems in Cell Differentiation: Cell cycle control Springer*, pp. 79–109.
- 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.
- 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.
- Strzalka, W., Oyama, T., Tori, K. & Morikawa, K. (2009). Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. *Protein Science*, 18(5), 1072–1080.
- 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.
- Takeda, S., Chen, D. Y., Westergard, T. D., Fisher, J. K., Rubens, J. A., Sasagawa, S., Kan, J. T., Korsmeyer, S. J., Cheng, E. H. & Hsieh, J. J. (2006). Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev*, 20, 2397-2409.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S. R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H. M., Livingston, D. M. & Amati, B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol*, 24, 4546-4556.
- Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E., L. & Lipp, M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and transactivation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev*, 3:527–536.
- Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Wen, J. & Lees, J. A. (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *PNAS*, 98(4), 1519–1524.
- Trimarchi, J. M., & Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(1), 11–20.
- Trouche, D., Cook, A. & Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res*, 24(21), 4139–4145.

Tyagi, S., Chabes, A. L., Wysocka, J. & Herr, W. (2007). E2F activation of S- phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell*, 27, 107-119.

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.

Van den Heuvel, S. & Dyson, N. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 713–724.

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

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

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.

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.

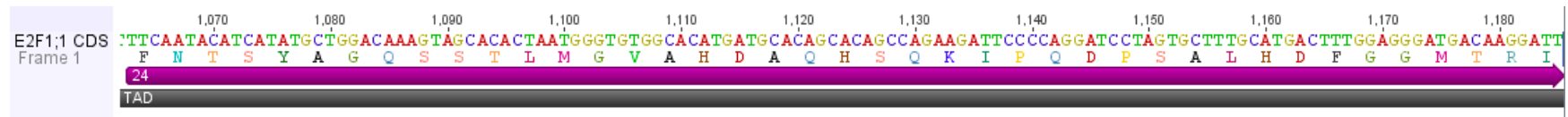
Xiong, Y., Zhang, H. & Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*, 71(3), 505–514.

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

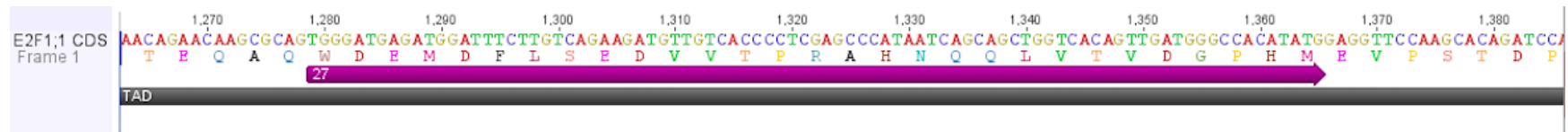


## APÉNDICES

### Apéndice 1. Secuencias proteicas de los motivos 24 y 27 de E2Fa/b1;1 de maíz

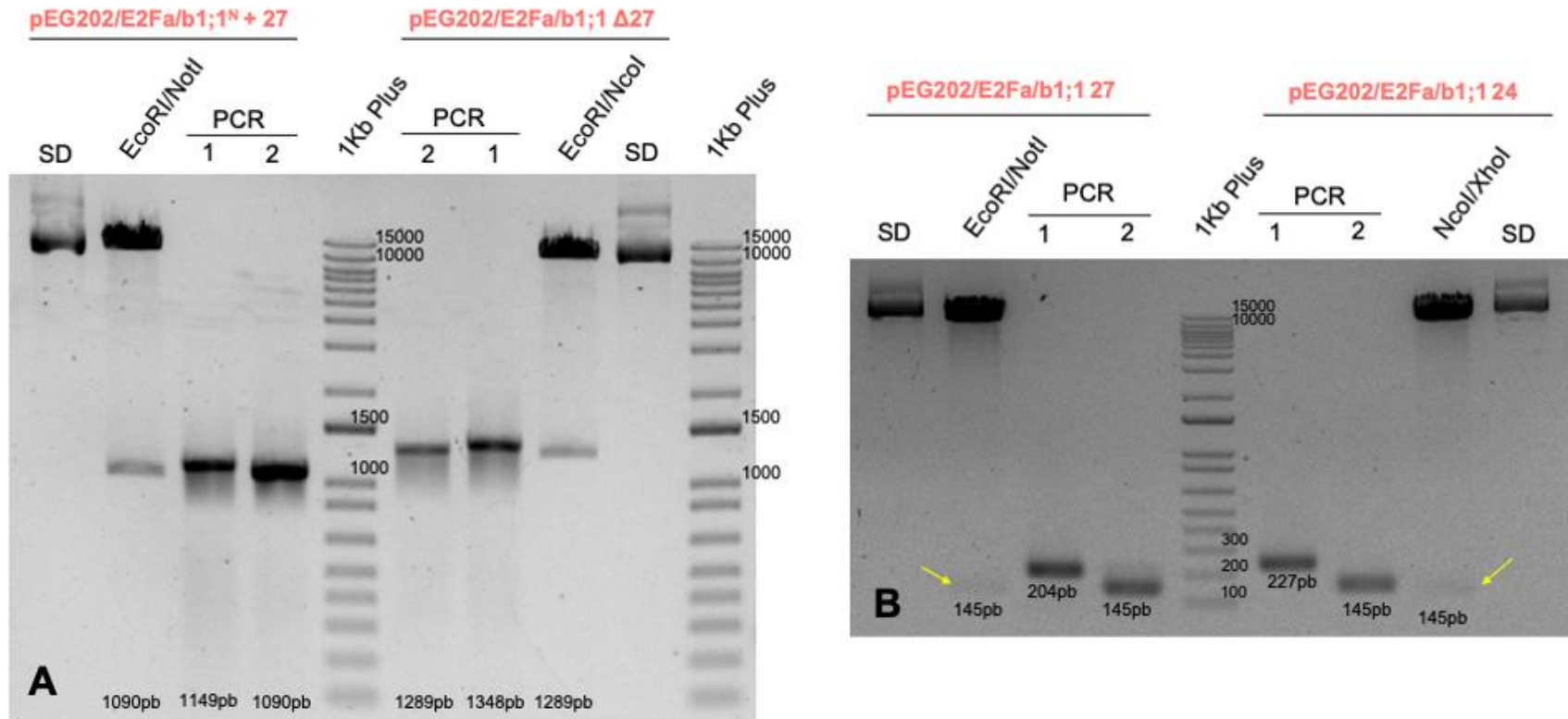


**Figura A1. Secuencia del motivo 24 de E2Fa/b1;1.** Se muestran los aminoácidos que conforman el motivo 24, indicados por la flecha morada. TAD, dominio de transactivación (en gris).



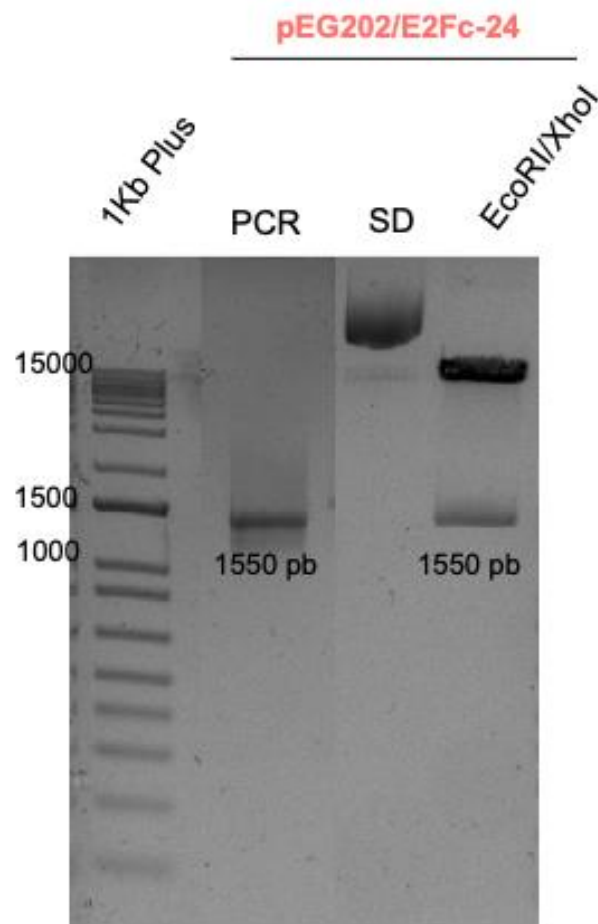
**Figura A2. Secuencia del motivo 27 de E2Fa/b1;1.** Se muestran los aminoácidos que conforman el motivo 27, indicados por la flecha morada. TAD, dominio de transactivación (en gris).

## Apéndice 2. Verificación de clonas en el vector de expresión para levadura pEG202



**Figura A3. Verificación de clonas positivas.** **A)** Verificación de E2Fa/b1;1<sup>N</sup> + 27 y E2Fa/b1;1 Δ27 en el vector pEG202. **B)** Verificación de E2Fa/b1;1 27 y E2Fa/b1;1 24 en el vector pEG202. SD, Plásmido sin digerir; PCR 1, producto de PCR usando el oligonucleótido sentido del vector y el antisentido del inserto; PCR 2, producto de PCR usando el oligonucleótido sentido y el antisentido del inserto.

**Apéndice 2. Verificación de clonas en el vector de expresión para levadura pEG202**



**Figura A4. Verificación de E2Fc-24 en el vector pEG202.** SD, Plásmido sin digerir; PCR, producto de PCR amplificado con el oligonucleótido sentido y antisentido del inserto.

### Apéndice 3. Oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los CDS (secuencias codificantes) de las proteínas clonadas

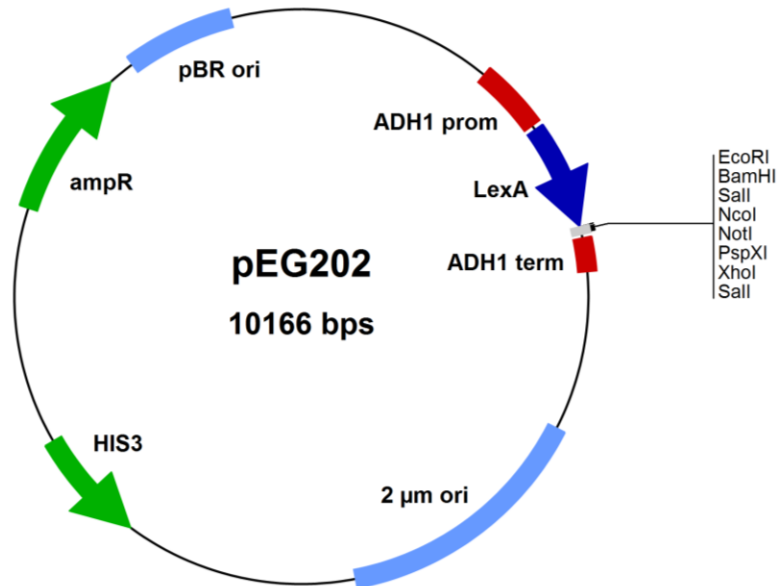
**Tabla A1. Oligonucleótidos para la amplificación y verificación de las diferentes secuencias de E2Fa/b1;1 clonadas.** Se muestra nombre, secuencia, clave y año de síntesis.

	Nombre	Secuencia 5' > 3'	Clave-año
1	FE2F1;1 WT EcoRI	TCT ATG AAT TCA TGT CGG GGG TCG GCA GCG G	1240- 2017
2	RE2F1;1 DC NcoI	TCG CCA TGG TAA TAC AAT TCT ATA TCT CCT TTG G	5163-2018
3	FE2F1;1 40 NcoI	ATC CCA TGG GAA CAA GCG CAG TGG GAT G A	5161-2018
4	RE2F1;1 40 NotI	ATC GCG GCC GCT TAT GGA TCT GTG CTT GGA ACC T	5162-2018
5	FE2F1;1 40 EcoRI	TCT ATG AAT TCG AAC AAG CGC AGT GGG ATG A	5160-2018
6	RE2F1;1 WT NcoI	TCG CCA TGG TTA TGG ATC TGT GCT TGG AAC CTC CAT	1241-2017
7	RE2F1 D40	TCG CCA TGG TTA TGT TTT CCA CAT AT	10380-2018
8	Fw 24 NcoI	CCGCCATGGTTCAATACATCATATGCT	H5143-2021
9	Rv 24 XhoI	TCGTCTCGAGTTAAATCCTTGTCATCCCT	H4144-2021
10	Fw Fusión c-24	TAGTATGACAGATGCTTGGGGCACGTTCAATACATCATATGCTGGACA	H5145-2021
11	Rv Fusión c-24	TGTCCAGCATATGATGTATTGAACGTGCCCAAGCATCTGTCATACTA	H5146-2021
12	FE2FC WT EcoRI	TCT ATG AAT TCA TGG ACG GCG CCT CCT CCA G	1244-2017
13	RE2FA/B1;1 3' UTR	ATG CCC TGA CTA AAC TCC AGG TGA	2809-2013
14	F pEG202 sec	TCG TCA GCA GAG CTT CAC CAT T	7996-2017
15	RvpEG202 sec	GAG TCA CTT TAA AAT TTG TAT ACA C	3486-2019

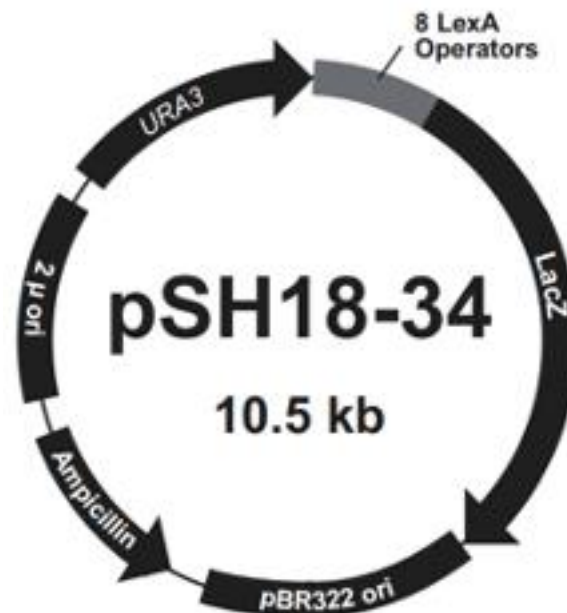
**Tabla A2. CDS amplificados y pares de oligonucleótidos utilizados.** Se muestra la temperatura utilizada para la amplificación de cada inserto.

CDS	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tm (°C)
E2Fa/b1;1 <sup>N</sup> (para fusión)	FE2F1;1 WT EcoRI	RE2F1;1 DC NcoI	59
E2Fa/b1;1 27 (para fusión)	FE2F1;1 40 NcoI	RE2F1;1 40 NotI	56
E2Fa/b1;1 27	FE2F1;1 40 EcoRI	RE2F1;1 WT NcoI	64
E2Fa/b1;1 Δ 27	FE2F1;1 WT EcoRI	RE2F1 D40	53
E2Fa/b1;1 24	Fw 24 NcoI	Rv 24 XhoI	51
E2Fc (para fusión)	FE2FC WT EcoRI	Rv Fusión c-24	55
E2Fa/b1;1 24 (para fusión)	Fw Fusión c-24	RE2FA/B1;1 3'UTR	52
E2Fc-24	FE2FC WT EcoRI	Rv 24 XhoI	61

**Apéndice 4. Mapas de vectores de expresión en levadura utilizados para clonar las secuencias codificantes**

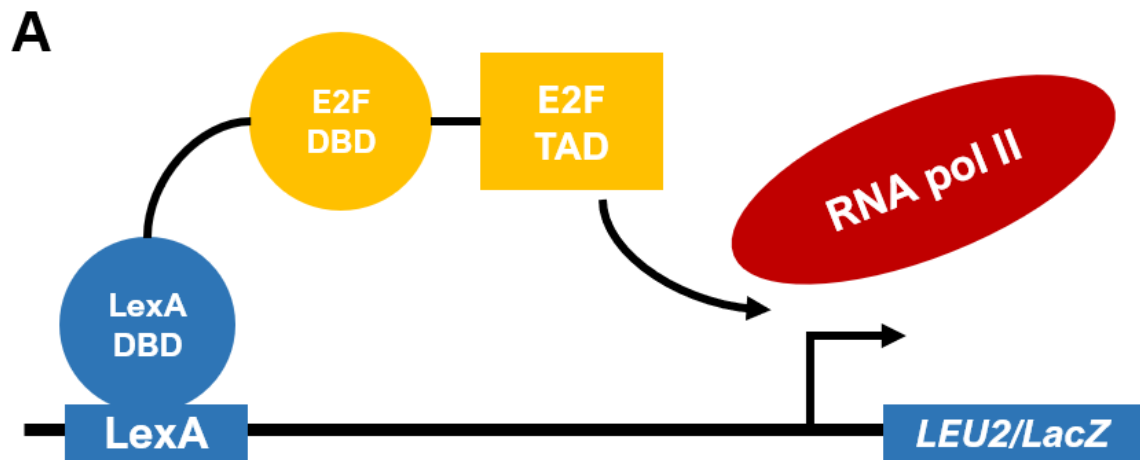


**Figura A5. Mapa del vector pEG202 para expresión en levaduras.** Se indica el promotor ADH1 (rojo), el dominio de unión a DNA de LexA (azul) y el sitio de clonación múltiple.



**Figura A6. Mapa del vector reportero pSH18- 34 para expresión en levadura.** Se indican los operadores LexA (gris), así como el gen de LacZ (negro).

## Apéndice 5. Modelo de transactivación en levaduras



**Figura A7. Modelo del ensayo de transactivación en levadura.** E2F (amarillo) fusionado al DBD de LexA (azul) activa la expresión de los genes reporteros al unirse al promotor de estos mismos.