

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

FACTOR TRANSCRIPCIONAL E2F: EN PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS EN CULTIVOS DE *Coffea canephora*

**Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias
y Biotecnología de Plantas presenta:**

Juan Gualberto Colli Mull

**Centro de Investigación Científica de Yucatán,
A.C.**

Mérida, Yucatán, Mexico

2007



CONTENIDO

| | |
|---|------------|
| RECONOCIMIENTOS | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | iv |
| LISTA DE CUADROS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| | |
| CAPÍTULO I | |
| CONTROLANDO EL CICLO CELULAR EN LAS PLANTAS | 11 |
| 1.1 Resumen | 11 |
| 1.2 Introducción | 13 |
| 1.3 Factor transcripcional E2F | 14 |
| 1.4 La ruta E2F/RB en el control de la transición de G1 a S | 15 |
| 1.5 Genes regulados por E2F que participan en el ciclo celular | 18 |
| 1.6 E2F regula una variedad de genes funcionales, no sólo los relacionados al ciclo celular | 18 |
| 1.7 Referencias bibliográficas | 21 |
| OBJETIVO GENERAL | 22 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| CELL NECROSIS PATHWAY IN COFFEE CELL SUSPENSION CULTURE IS TRIGGER BY TWO INDEPENDENT SETS OF SIGNALS | 24 |
| 2.1 Abstract | 25 |
| 2.2 Introduction | 26 |
| 2.3 Materials and Methods | 28 |
| 2.4 Results: Necrosis in coffee cells depends upon auxin deprivation and excreted compounds from dead cells | 30 |
| 2.5 Effects of PCDM and 2,4-D deprivation on media conductivity and cell viability | 32 |
| 2.6 PCDM and 2,4-D deprivation cause a clear smearing of genomic DNA | 34 |
| 2.7 E2F expression in <i>Coffea</i> tissues | 36 |
| 2.8 PCDM and 2,4-D deprivation cause a E2F decrease | 38 |
| 2.9 Discussion | 39 |
| 2.9.1References | 42 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|----|
| DIRECT INTERACTION BETWEEN NC2 AND A SUBUNIT OF THE SRBS/MEDIATOR CO-ACTIVATOR | 47 |
| 3.1 Abstract | 48 |

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna y el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata a quienes agradezco el apoyo y la confianza que me brindaron durante la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (39731-z) y una beca de Doctorado (165120) para Juan Gualberto Colli Mull.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente,

Al Dr. Enrique Castaño de la Sema y al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata por su apoyo en la investigación y por haber confiado en mí.

A mi comité tutorial integrado por los doctores; Dr. Rubén Darío Flores, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dra. Consuelo García Rodríguez, Dr. César de los Santos Briones, Dra. Nancy Santana Buzzy, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Carlos de Jesús Fuentes Cerda y a la Dra. Caroline Burgeff D` Hondt, por sus valiosas sugerencias y la revisión crítica con la que enriquecieron este escrito.

Al Dr. José Luis Stephano Hornedo y a la Dra. Meredith Gould Chambers[†], por darme la oportunidad de estar con ustedes y enseñarme a ver la investigación y la ciencia de manera mas objetiva.

A la Q. I. Ángela Kú González por haber obtenido y promocionarme el material biológico para la realización de este trabajo.

A mi familia; por todo su amor, paciencia, apoyo incondicional y por estar siempre conmigo en todo momento, los amo.

A mis amigos del CICY; Manuel, Ileana, Ligia, Ángela, Anne, Jorge, Eliel, Gabriel, Fito, por ser buenos amigos, compañeros, por los momentos compartidos durante este tiempo, las idas a tomar dos y por tenderme la mano siempre que la necesité.

Al grupo del Dr. Enrique Castaño; Ángela, Analy, Diana, Rocío, Julia, José, Nina, Martha, Alma, Citali, Nadine, Paty y Laura, por todas las experiencias y los buenos momentos compartidos.

A mis amigos de la UABC; Haydee, Dante, Osmin, Paulo, Manuel, Oscar, Sharon, José, Roel y Pierick, por haberme brindado su amistad, ayuda y compartir buenos momentos en Ensenada.

A mis amigos de la UMDI campus Sisal; Rene, Cholo y Marco y Mao, gracias camaradas.

A todos mis profesores por hacerme ver el lado bueno y malo de la investigación, pero sobre todo por estar siempre dispuestos a enseñar.

Y a todos los que de alguna forma u otra ayudaron o estuvieron presentes durante la realización de este trabajo.

| | |
|--------|---|
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| FvSc | Fragmento variable de cadena sencilla |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |

una muerte celular por necrosis dependiente de la ausencia de 2,4-D, la cual se acompaña por una disminución de la presencia de E2F.

Por otra parte, la regulación de la transcripción depende de un apropiado control de las señales positivas y negativas para la expresión de los genes que participan en la regulación de la maquinaria transcripcional y los diferentes complejos proteicos. NC2, fue purificado inicialmente de los extractos de células en humanos con una actividad que inhibe la transcripción basal de promotores TATA, y se define como un represor general de la transcripción. Sin embargo, se ha descrito que NC2 puede llevar a cabo diferentes funciones *in vivo* e *in vitro*.

Nuestros experimentos muestran claramente que algunos miembros del complejo Mediador/SRB tales como MED23, MED21 y MED7, coprecipitan selectivamente con NC2 y no con los factores generales de la transcripción (TFIIB, TFIIH). Por otra parte las reacciones de transcripción *in vitro* con los extractos con NC2 abatido; ocasionaron una disminución de la transcripción alrededor del 89% comparado con otras fracciones cromatográficas o NC2 recombinante. Finalmente, al utilizar una columna de filtración en gel, logramos observar una interacción física entre MED21 y NC2.

Estos datos sugieren que la interacción de NC2 y MED21 ayuda a modular los niveles de transcripción por el complejo mediador/SRB.

observed when NC2 is depleted from nuclear extract. Finally, a change was observed in the mobility of detectable MED21 when incubated with NC2.

In summary, we found that NC2 and MED21 interact and help modulate the level of transcription by the SRB/Mediator complex.

desarrollarse a etapas adultas, aunque presentan anomalías morfológicas en ciertos órganos como las hojas y las flores (Kosugi & Ohashi, 2003). Además de que un miembro de la familia conocido como E2Fa, puede tener una función bimodal como un regulador positivo o negativo de la división celular (Steve *et al.*, 2004).

En total se han identificado 186 genes regulados por E2F en *Arabidopsis* y 104 en arroz, los cuales se han agrupado en ciertas categorías funcionales que incluyen: enzimas involucradas en la replicación, estructura de la cromatina, reparación del ADN, factores de transcripción, biogénesis de la pared celular y genes relacionados a defensa (Vandepoele *et al.*, 2005; Ramírez-Parra *et al.*, 2003).

Actualmente, se ha encontrado una relación de la familia de E2F con los procesos del avance del ciclo celular y la muerte celular a través de la expresión coordinada de genes involucrados en la regulación de la transición de la fase G1 a S, así como también con otros genes involucrados en la apoptosis (Stevens & La Thangue, 2003).

La muerte celular programada o PCD es un proceso fisiológico de muerte involucrado en la eliminación selectiva de células no deseadas (Ellis *et al.*, 1991). En plantas, esta muerte celular selectiva es necesaria para el crecimiento y la sobrevivencia; Puede ocurrir localmente o en varias regiones de la planta causando la supresión del suspensor, la formación de los lóbulos y perforaciones en las hojas, la formación del xilema y el desarrollo de los tricomas. También, ocurre durante la interacción con patógenos y por diferentes condiciones de estrés.

Recientes evidencias, sugieren que la muerte celular en sistemas vegetales, en algunos casos al menos, puede ser mecánicamente similar a la que ocurre en sistemas animales. Durante la PCD ocurren ciertos eventos, considerados como marcadores, entre los que se encuentran: la activación de proteasas de cisteína, la liberación del citocromo c, la ruptura de la membrana nuclear, el aumento en la síntesis de proteínas pro-apoptóticas como BAD y la fragmentación del ADN nuclear (Koukalova *et al.*, 1997; Baek *et al.*, 2004; Delorme *et al.*, 2000; Lam & del Pozo, 2000).

En particular, se ha observado que las proteínas 14-3-3 integran la actividad de E2F cuando ocurre un daño al ADN (Milton *et al.*, 2006). Es de importancia mencionar, que

- Ramírez-Parra E, Frundt C, Gutiérrez C. 2003. A genome-wide identification of E2F regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**:801-811.
- Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutiérrez C. 1999. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nuc. Ac. Res.* **27**:3527–3533.
- Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A. 1999. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* **460**:117–122.
- Steve SH, Liu J, Xie Z, O'Neill D, Dotson S. 2004. *Arabidopsis* E2Fa plays a bimodal role in regulating cell division and cell growth. *Plant Mol. Biol* **56**: 171-184.
- Stevens C, La Thangue NB. 2003. E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Biochem. Biophys.* **412**:157–169.
- Vandepoele K, Vlieghe K, Florquin K, Hennig L, Beemster GT, Gruissem W, de Peer Y, Inze D, De Veylder L. 2005. Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* **139**:316-328.
- Zhang Y, Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**:2343 – 2360

asociación con E2F, permitiendo así la activación de genes regulados por E2F. Cabe mencionar que la fase G₁ del ciclo celular generalmente representa el mayor punto de regulación de las fases restantes.

Una ruta análoga de E2F/pRb en la transición G₁-S del ciclo celular, que involucra la fosforilación de pRb por los complejos CDK/ciclina y la liberación de E2F, ha sido recientemente dilucidada en células vegetales y probablemente los mecanismos de su regulación sean comunes con sus contrapartes en humanos y otros eucariontes superiores (Figura 1.2). Aunque no se han encontrado homólogos de la ciclinas E en plantas, fundamentales en la transición G₁-S en animales, en este sentido, es interesante notar que las ciclinas tipo A o quizá algunas del tipo D, podrían participar en la regulación de la transición G₁-S y de G₂-M del ciclo celular (Wen-Hui, 2001).

Durante la fase G₁, la proteína Rb se encuentra en su forma activa (hipofosforilada) y puede unirse a activadores transcripcionales de la familia de E2F, resultando en la formación de un complejo que reprime la transcripción de genes clave para E2F y, consecuentemente, impide la progresión de la fase G₁/S. Conforme avanza la fase G₁, pRb es fosforilada secuencialmente por diferentes complejos CDKs/ciclinas, inactivándola y finalmente liberando a E2F para activar genes requeridos para el avance del ciclo celular (Figura 1.2).

1.5 GENES REGULADOS POR E2F QUE PARTICIPAN EN EL CICLO CELULAR

Los niveles de transcripción de E2F en plantas son generalmente bajos, sin embargo se ha demostrado en *Arabidopsis* que hay una expresión diferencial dependiendo del tejido. Por otra parte en suspensiones celulares parcialmente sincronizadas, los niveles de transcripción de E2F muestran un incremento en la transición de G₁ a S del ciclo celular (Ramírez-Parra *et al.*, 1999).

El control en la transición G₁-S generalmente representa el punto crucial en la división celular. En la fase G₁ del ciclo celular las células “deciden” si permanecen o salen del ciclo mitótico, a este punto de control se le ha llamado START en levaduras y punto de restricción (R) en animales. Aunque tales puntos no han sido definidos exactamente en plantas, la aplicación de inhibidores químicos hizo revelar un punto crucial de control en la fase G₁ en células de tabaco (Wen-Hiu, 2001).

En este sentido E2F juega un papel primordial en el control de genes requeridos para el avance del ciclo celular; entre estos genes se encuentran la ciclina A, histonas y genes involucrados en la síntesis de ADN como la ADN polimerasa α , la dihidrofolato reductasa, CDC6, ORC1, ORC3, RPA, MCM, al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la ribonucleótido reductasa y una subunidad de la polimerasa δ (Ramírez-Parra *et al.*, 2003).

1.6 E2F REGULA UNA VARIEDAD DE GENES FUNCIONALES, NO SÓLO LOS RELACIONADOS AL CICLO CELULAR

Evidencia reciente encontrada en la literatura ha demostrado que el complejo E2F/DP juega un papel importante para regular la expresión de genes no sólo en células que se encuentran en estados proliferativos, sino también durante la diferenciación, el desarrollo y en procesos de apoptosis (Müller *et al.*, 2001; Bracken *et al.*, 2004).

En la última década, debido al gran avance que se tiene en la investigación sobre la regulación del ciclo celular en las plantas, es posible comprender más a fondo la regulación de este proceso vital, donde los componentes principales son similares a

Ahora bien, no olvidemos que los resultados anteriores son solamente estudios preliminares utilizando aproximaciones genómicas para identificar genes regulados por E2F; por lo anterior, los estudios futuros podrían ser enfocados a genes específicos para demostrar la función de E2F en la regulación de su expresión.

A pesar de las grandes interrogantes que aun persisten sobre la regulación de la división celular en plantas, la evidencia actual permite concluir que las plantas utilizan mecanismos similares a los que se encuentran en animales en las vías que regulan la división celular. Es de esperarse sin embargo, que el rápido avance de la investigación en este campo de la ciencia arroje, en un futuro próximo, una visión más clara de la regulación del ciclo celular vegetal.

CAPÍTULO II

Running title: Coffee cell necrosis in suspension cultures

CELL NECROSIS PATHWAY IN COFFEE CELL SUSPENSION CULTURE IS TRIGGER BY TWO INDEPENDENT SETS OF SIGNALS.‡

Juan Gualberto Colli¹, Luis Carlos Rodríguez Zapata² and Enrique Castaño de la Serna^{1*}

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México.

2 Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México.

*Please Send Correspondence to:

E-mail; enriquec@cicy.mx

‡ **Nota:** Capítulo en preparación para enviar a J. Plant Growth Regulation.

2.1 ABSTRACT

Tissue culture of plant cells requires stable conditions for its continuous growth, alterations to such conditions can lead to expression of different compounds and physiological changes. *Coffea canephora* cell lines are prone to death upon alterations in the growing conditions. Here we determine that cell communication ligated with auxin deprivation induces cell death and expression of phenolic compounds as well as DNA fragmentation. These conditions also reduce the amount to the transcription factor E2F which has been linked to cell cycle as well as apoptosis.

Key words: E2F, cell cycle, programmed cell death, growth regulators.

2.3 MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

The suspension cell line of *Coffea canephora* was obtained from disrupted roots. The roots were originally obtained from seedling cultured *in vitro* in MS medium supplemented with 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 10 mg L⁻¹ thiamine, 25 mg L⁻¹ cysteine, 3% sucrose, 0.2% gelrite, 0.5 mg L⁻¹ kinetin and 0.1 mg L⁻¹ 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid at pH 5.8. The cell suspension was transferred to fresh medium every 14 days at a density of 0.5 g fresh weight/50 mL medium and maintained in the dark at 25°C and 100 RPM.

Analysis of DNA fragmentation

To determine whether DNA damage occurred, genomic DNA was extracted of cell suspension cultures previously described by Lin *et al.*, 2001, and run on 2% agarose gels.

Cell suspension cultures treatments

To induce different stress types, the suspension cultures were either maintained in 2,4-D deprivation medium, subjected to UV light for 3 h, treated with a medium containing compounds from previously death cells (PCDM), or by combining of 2,4-D deprivation medium, with 1 mL of PCDM per flask (50 mL), all with their corresponding controls. We evaluated growth rate (FW), cell viability and medium conductivity each third day along the culture cycle. To obtain PCDM, the 7 days-old suspension cultures were maintained without shaking for 24 h.

Protein extraction and Western blot analysis

Total proteins were extracted as described before (Magyar *et al.*, 1993) with some modifications: coffee cells were homogenized with a politron in extraction buffer (25 mM TRIS-HCl pH7.5; 15 mM MgCl₂; 15 mM EGTA; 15 mM p-nitrophenylphosphate; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 0.1 % Tween 20; 1mM sodium orthovanadate; 1mM PMSF)

PCDM contained high levels of proteins between 26 y 45 kDa and slight amount between 12 y 26 kDa that can be release in cells undergo death as well the alkaloids content was different when compared with control (Figure 1C, 1D).

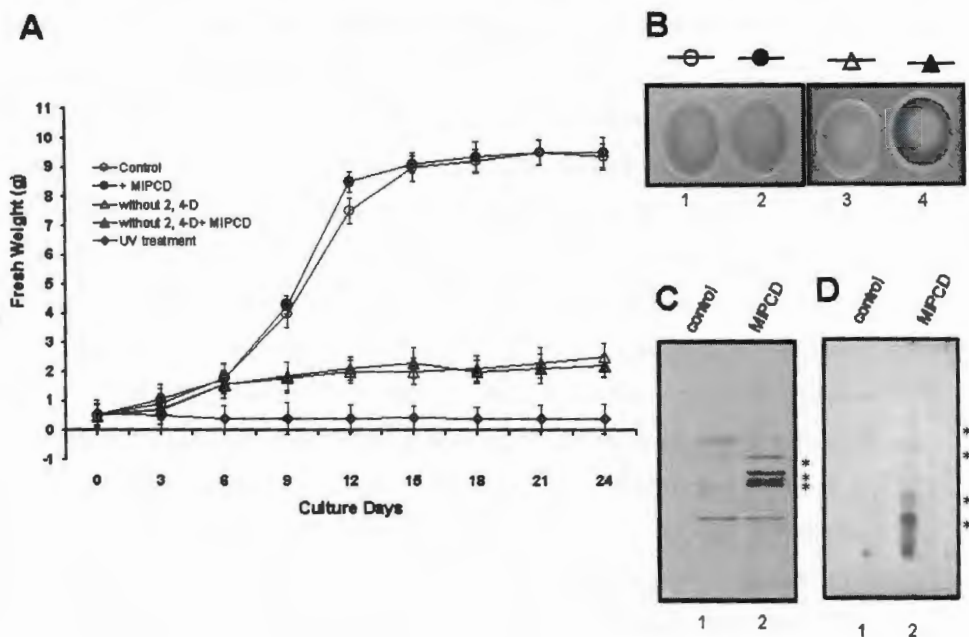


Fig. 2.1 Characterization of coffee cell suspension cultures under different stress conditions. (A) Fresh weight (g) of cells harvested each third day along culture cycle. (B) Changes in cell suspension cultures during cell death were observed after 15 old-days of culture. (C) Extracellular proteins of MPCD medium and control medium were resolved by SDS-PAGE 12% and silver staining. (D) TLC, total alkaloids were extracted of MPCD and control medium by alkaline method and separated on silica plaques using CHCl_3 : MeOH (9:1 v/v) system as the mobile phase.

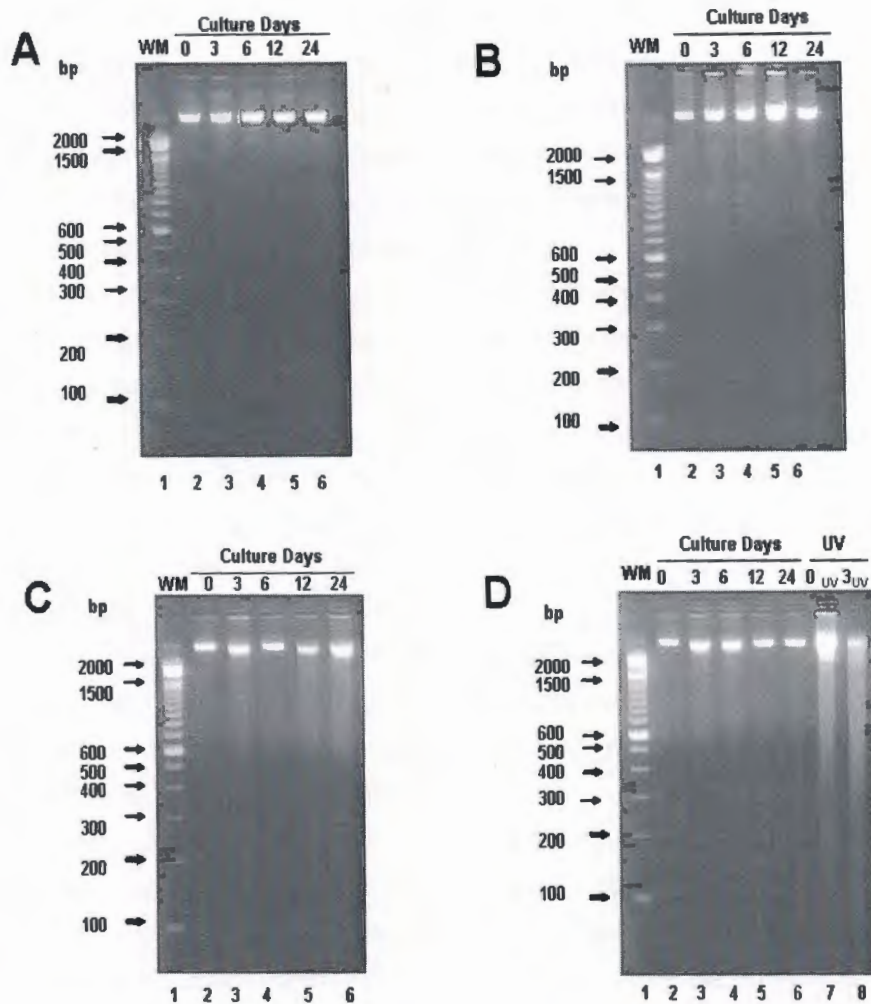


Fig. 2.3 DNA Fragmentation on coffee cells after different treatments. DNA was extracted from control cells (A) plus MPCD (b) cells deprivation of 2,4-D (C); 2,4-D deprivation plus MPCD (D) as well a UV light exposure (D lines 7-8) at 3, 6, 9 12 and 24 days after treatment. DNA was visualized in 2% agarose gels staining with ethidium bromide. The numbers to the left on the gels indicate number of base pairs.

2.8 PCDM and 2,4-D deprivation cause a E2F decrease

Finally we evaluated the levels of E2F during the different treatments. A clear decrease in E2F levels was apparent when PCDM was added as well as when cells were grown in the absence of 2,4-D. E2F was not detected when cells were grown in medium without 2,4-D and PCDM after 24 days as shown in Figure 5A.

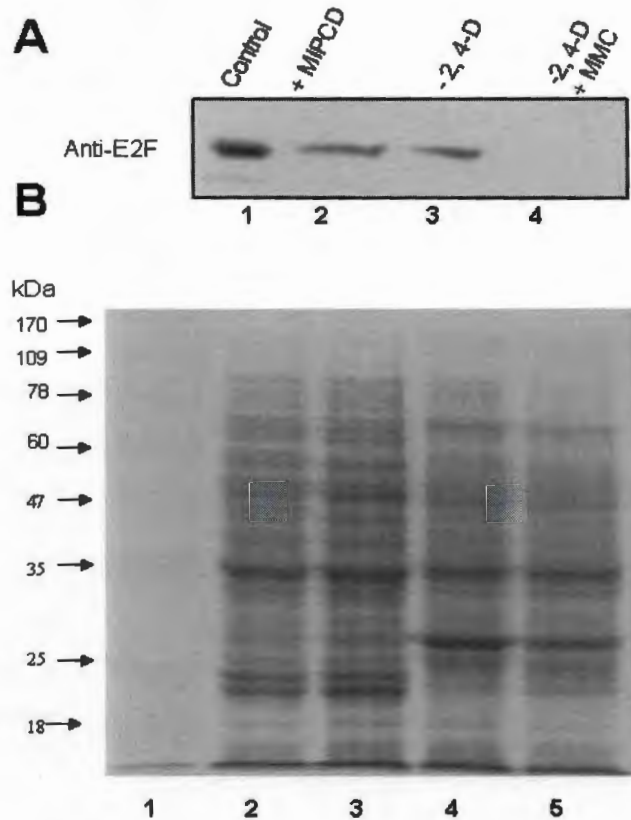


Fig. 2.5 Western blot analysis using antibodies specific for E2F1. (A) The endogenous E2F protein was detected by western blot analysis, (B) Total protein extract of control cells; more MPCD; 2,4-D deprivation medium and 2,4-D deprivation medium more PCDM were separated in denaturalizing poly-acrylamide gel.

Thus these results collectively indicate that a protein or metabolite in conjunction with treatments is capable to generate growth inhibition, influence the cell viability and suggests that E2F can be use as a marker during these events in cell suspension cultures of *Coffea canephora*.

2.9 DISCUSSION

In this study, we establish a *Coffea canephora* cell suspension culture system for studying the induced cell death in plants. In this report we provide evidence for specific growth changes induced with stress such as 2,4- D deprivation, addition of proteins and metabolites from a previous death cells medium (PCDM) and UV radiation as well as the effect on E2F in coffee suspension cultures under the different treatments.

We select cell suspension cultures of coffee for uniformity, accessibility and reduced complexity for studying cell death in plants (McCabe and Leaver, 2000). During the induction phase of program cell death (PCD) a wide range of extra or intracellular stimuli can manipulate whether o not a cell activates PCD (Vaux and Strasser, 1996). The process of PCD is apparently under control of complex hormonal interaction. The cytokinin, as an inductor of apoptosis when added at 13 μ M or higher concentration to plants and cell cultures and observed interaction in the PCD pathway induced by BAP and by ABA and 2,4-D, both hormones inhibit PCD induced by BAP (Carimi *et al.*, 2003). Our results demonstrated that 2,4-D deprivation cause a reduction of cell growth, changes in the conductivity medium, cell viability and DNA damage was detected, this is the first report show that 2,4-D deprivation can induce cell death but this event is separated to the oxidation and metabolite secretion typically produced during plant cell death. We also showed that conductivity diminished is proportional to the percentage of cell death measured by Evans Blue staining, indicating that cell death in a necessary consequence of the cultures failure to proliferate. The PCDM added have similar effects in coffee cells with an increase in cell death percentage. Gaham *et al.*, (2003), showed that cytokinin induction, but not auxin induction, of

apoptotic nuclear changes in epidermal and sub-epidermal cells in cotyledons of *Solanum aviculare* and *Lycopersicon esculentum*.

The death of cells upon biotic or abiotic stress can be necrotic or programmed, necrotic cell death is an uncontrolled event, while PCD is a well organized cell death event. When cells are killed by a necrotic heat treatment the DNA is not cleaved and does not separate in an agarose gel during electrophoresis, or, alternatively, at very high temperatures is destroyed by the heat rather than endonucleases and is visualized as a time-independent smear in an agarose gel (McCabe *et al.*, 1997). We observed that effects of treatments were not immediate, however can visualize a DNA smear along cell culture in 2, 4-D deprivation medium, as well as in the condition when PCDM was added. UV light caused a clear DNA damage after 3 hours of exposition. Although the induction of a 180 pb DNA ladder has been described in several plant species (Pennell and Lamb, 1997; Greenberg, 1996), this is not always the case, an PCD in many animal and plant cells does not involve the fragmentation of DNA into well separated oligonucleosome-sized pieces (Oberhammer *et al.*, 1993; Schwartzman and Cidlowski, 1993; Mittler and Lamb, 1996).

Furthermore the E2F family of transcription factors is inextricably linked with cell cycle progression and apoptosis, through co-ordinating the expression of a large body of genes involved in regulating the G1 to S phase transition, as well as other involved in apoptosis (Stevens and La Thangue, 2003). Among E2F family members, E2F1 is unique in its ability to trigger apoptosis (Hallstrom and Nevins, 2003; Moroni *et al.*, 2001) and is a DNA damage-responsive protein (Stevens *et al.*, 2003).

Previous experiments have suggested that, in addition to having a role in cell proliferation, E2F also plays a role in regulating apoptosis, differentiation and development (Phillips and Vousden, 2001; Stanelle *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001). In *Arabidopsis* both E2Fa and DPa were strongly expressed in the actively dividing tissues and the regions of mitotic cell division. E2Fa transcripts were also detected in the epidermis, cortex and leaves (De Veylder *et al.*, 2002). The major findings of our experiments are that E2F have a high level in tissues with different kind of cell division and differentiation, cell suspensions and somatic embryos (Figure 4A). Furthermore

E2F have a high DNA binding activity in different proliferative stage tissue (Figure 4C). These results confirm that E2F play a role in cell division and differentiation consistent with what has been reported (Ramirez-Parra *et al.*, 2003; Kosugi and Ohashi 2003).

As shown in figure 5, in control cells the level of E2F protein was higher than that observe in 2,4-D deprivation culture cells or PCDM addition with apparent DNA damage and induced cell death, suggesting a role of E2F during cell death in coffee cells. The lack of E2F when both conditions are present can be either a cause or effect for promotion of death and phenolization of the coffee cultures.

Further investigation are required to determine whether E2F transcription factor could directly be associated with DNA damage or by part of triggering signaling pathway for programmed cell death in plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Angela F. Ku González for her technical help. Dr. Castaño is partially funded by CONACYT Grant 39731-z., J. G. C. was supported by scholarships from CONACYT.

2.9.1 REFERENCES

- 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*. *J. Biol. Chem.* **275**:19258–19267.
- Baker CJ, Mock NM. 1994. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **39**:7–12.
- Cam H, Dynlacht BD. 2003. Emerging roles for E2F: Beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* **3**:311–316
- Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH. 1998. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**:124–125.
- Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Lo Schiavo F. 2003. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**:413–421.
- Da Silva EA, Toorop PE, Nijse J, Bewley JD, Hilhorst HW. 2005. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. *J. Exp. Bot.* **413**:1029–38.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Engler JA, Ormenese S, Maes S, Naudts M, Schueren VD, Jacquemard A, Engler G, Inze D. 2002. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* **21**:1360–1368.
- De Gregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. 1997. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**:7245–7250.
- Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R. 2001. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**:6957–6962.
- Dickman MB, Reed JC. 2003. Paradigms for programmed cell death in animals and plants. In: Gray J, ed. *When plant cells die*. Chapter 2, UK: Blackwell Publishing, 26–43.

- Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Develop.* **12**:2245-2262.
- Gahan PB, Wang L, Bowen ID, Winters C. 2003. Cytokinin-induced apoptotic nuclear changes in cotyledons of *Solanum aviculare* and *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **72**:237-245.
- Greenberg JT. 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**:12094-12097.
- Hallstrom TC, Nevins JR. 2003. Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**:10848-10853.
- Heath MC. 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Euro. J. Plant Path.* **104**:117-124.
- Keller CP, Volkenburgh EV. 1998. Evidence that auxin-induced growth of tobacco leaf tissues does not involve cell wall acidification. *Plant Physiol.* **118**:557-564.
- Kosugi S, Ohashi Y. 2003. Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner. *Plant Physiol.* **132**:2012-2022.
- Lavia P, Jansen-Dürr P. 1999. E2F target genes and cell cycle checkpoint control. *BioEssays* **21**:221-230.
- Li W, Dickman MB. 2004. Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotech. Lett.* **26**:87-95.
- Lin RC, Ding ZS, Li LB, Kuang TY. 2001. A rapid and efficient DNA miniprep suitable for screening transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **19**: 379a-379e.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Talloczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **4**:567-77.
- Magyar Z, Bakó L, Bogre L, Dedeoglu D, Kapros T, Dudits D. 1993. Active *cdc2* genes and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J.* **4**:151-161
- McCabe PF, Leaver CJ. 2000. Programmed cell death in cell cultures. *Plant Mol. Biol.* **44**:359-368.

- McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennell RI. 1997. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* **12**:267–280.
- Mittler R, Lam E. 1996. Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends Microbiol.* **4**:10–15.
- Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.* **3**:552–558.
- Müller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni C, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K. 2001. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* **15**:267–285.
- Nahle Z, Polakoff J, Ramana V, Davuluri ME, McCurrach MD, Jacobson MD, Narita M, Zhang MQ, Lazebnik Y, Bar-Sagi D, Lowe SW. 2002. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* **4**:859–864.
- Navarre DA, Wolpert T J. 1999. Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. *Plant Cell* **11**:237–249.
- Oberhammer F, Wilson J, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* **12**:3679–3684.
- Pennell RI, Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**:1157–1168.
- Phillips AC, Vousden KH. 2001. E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis* **6**:173–182.
- Ramirez-Parra E, Gutierrez C. 2000. Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBBS Lett.* **486**:73–78.
- Ramirez-Parra E, Frundt C, Gutierrez C. 2003. A genome-wide identification of E2F regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**:801–811.

- Ramirez-Parra E, López-Matas MA, Fründt C, Gutierrez C. 2004. Role of an atypical E2F transcription factor in the control of *Arabidopsis* cell growth and differentiation. *Plant Cell* **16**:2350–2363.
- Ramirez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutierrez C. 1999. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma- binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nuc. Ac. Res.* **27**:3527–3533.
- Ryerson DE, Heath MC. 1996. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* **8**:393–402.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. 1993 Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *End. Rev.* **14**:133–151.
- Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A. 1999. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* **460**:117–122.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A. 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**:431–444.
- Stanelle J, Stiewe T, Theseling CC, Peter M, Pützer BM. 2002. Gene expression change in response to E2F-1 activation. *Nucleic Acids Research* **8**:1859-1867.
- Stein JC, Hansen G. 1999. Mannose induces an endonucleases responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol.* **121**:71–80.
- Stevens C, La Thangue NB. 2003. E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Biochem. Biophys.* **412**:157–169.
- Stevens C, Smith L, La Thangue NB. 2003. Chk2 activates E2F1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**:401–409.
- Takahashi H, Chen Z, Du H, Liu Y, Klessig DF. 1997. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J.* **11**:993-1005.
- Vaux DL, Strasser A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**:2239–2244.

Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA. 1995. *In vivo* association of E2F and DP family proteins. *Mol. Cell Biol.* 15:2536–2546.

41

CAPÍTULO III

DIRECT INTERACTION BETWEEN NC2 AND A SUBUNIT OF THE SRBS/MEDIATOR CO-ACTIVATOR. ‡

Juan Gualberto Colli¹, Diana Guillén¹, Luis Carlos Rodríguez², Nadine Mobious¹,
Enrique Castaño^{1*}

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México

2 Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México

*Please Send Correspondence to:

e-mail: enriquec@cicy.mx

‡ **Nota:** Aceptado para su publicación en la Revista Asian J. Biochemistry

3.1 ABSTRACT

Transcriptional regulation depends on the appropriate set of positive and negative regulating signals in order to provide the correct gene expression. Studies in eukaryotic gene expression over the last few years have shown that SRBs/Mediator complex is involved in the proper activation of a variety of genes, while NC2 has been shown to be a general repressor of transcription. NC2 is a conserved transcriptional regulator that was originally identified as inhibitor of basal transcription. Here our initial results show that the repressor NC2 can interact directly with the Mediator in HeLa cells, this interaction provides a new set of interactions between positive and negative cofactors. Furthermore NC2 depletion from HeLa nuclear extract decrease activated transcription from the HIV-LTR1 promoter in vitro but addition of a complex NC2 fraction restores activated transcription. Further dissection showed that NC2 interacts directly with MED21 a subunit of the Mediator complex. The results shown may provide clues to the controversial role that NC2 has on active promoters.

Key words: Co-activator, repressor, Mediator, MED21, gene regulation

3.2 INTRODUCTION

Transcriptional activation and repression of class II genes has been the subject of intense study since the last three decades. During the early 90's, a repressing activity was found in HeLa nuclear extract that could selectively reduce basal transcription but did not affect the activated transcription. Consequently, this activity was named Negative Cofactor 2 (NC2) (Kim *et al.*, 1995). Soon after, protein Dr1 was found to be a general transcription repressor, particularly when it is associated to its partner DRAP1. In addition, NC2 was cloned and found to be the same as Dr1/Drap1 (Goppelt *et al.*, 1996). The recombinant proteins have been found to repress transcription *in vitro* by interacting with TBP thereby preventing TFIIB from forming a DNA-TBP-TFIIB complex. The result is the inhibition of the preinitiation complex formation while maintaining a DNA-TBP-NC2 complex (Goppelt *et al.*, 1996). TFIIA competes with NC2 for TBP and allows TFIIB to bind, which promotes binding from the rest of general transcription factors and RNA Pol II to the promoter and for transcription initiation to occur. In the early 90's several positive transcriptional activities were found, one particularly known as the Positive Cofactor 2 (Kretzschmar *et al.*, 1994). As it is known to stimulate GAL4-AH in an *in vitro* transcription assay, several studies have shown that the polypeptides involved in this activity belong to what has now been called the Mediator complex, depending on the conditions in which it has been purified. It has yielded different complexes such as TRAPS, CRSP, ARC, DRIP, Mediator, etc. For reviews, see several published articles (Kretzschmar *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 2001; Naar *et al.*, 2001; Bikle *et al.*, 2003; Bjorklund and Gustafsson, 2004). It is still not known if there are many complexes that share the same subunits or that only one function as a general cofactor for different activators with small differences, depending on the purification protocol involved to obtain them. It is accepted that these sets of polypeptides interact with the basal transcription machinery and the activators, providing the link between them and therefore a higher control and yield of transcription.

In yeast, activators have been shown to bind directly to the Srb-Mediator complex (Davis *et al.*, 2002), and genetic and biochemical studies have identified the Srb4 as a

target of the well-studied acidic activator Gal4 (Kamada *et al.*, 2001). Temperature-sensitive mutations Srb4 subunit can produce a rapid, general shutdown of mRNA synthesis, demonstrating that Srb4 is required for expression of most protein-encoding genes (Christova and Oelgeschlager, 2002). Because essentially all of the Srb proteins are tightly associated with the holoenzyme in yeast cells, the Srb-containing holoenzyme likely functions in transcription initiation at most class II promoters *in vivo*. The mutant genes that compensated for the absence of *SUC2* activator function included genes called *BUR* genes (*Bypass UAS Requirement*). The *bur6* mutant allele was found to be identical to *NCB1(NC2a)* indicates that a loss in NC2 function can compensate for the loss of an activator. These results point out to a delicate balance between positive and negative regulators of transcription which operate through the Ydr1-Bur6 (yeast NC2) repressor complex (Davis *et al.*, 2002).

Over the years the simple model of repression via NC2 has been challenged, as new data have suggested that NC2 may be found in active promoters. Such has been the case in HeLa cells where it has been found in active promoters (Kim *et al.*, 1995) in yeast cell analysis in genetic and biochemical studies (Creton *et al.*, 2002; Denko *et al.*, 2003). In *Drosophila*'s TATAless promoters were shown to be required as a general transcription factor (Willy *et al.*, 2000). We previously found NC2 to interact directly or indirectly with RNA pol IIO (Castano *et al.*, 2000).

Recent work has shown DR1 disassociated from DRAP1, depending on the conditions of cell growth and tissue (Ikeda *et al.*, 1998; Iratni *et al.*, 2002). Either could be due to different binding partners yet to be found, currently is known the interaction with AREB6 (Ikeda *et al.*, 1998) and FoxH1 (Iratni *et al.*, 2002). Until now, it has not been shown a clear physical connection between NC2 and the positive cofactors. These previous studies provide a correlation between the presences of both NC2 subunits and other proteins, but do not address the role of NC2 during activation. The question as to how does NC2 stimulates transcription remains unknown.

In this article we have reported a direct interaction between NC2 and MED21 (previously known as hSRB7). The interaction was verified by NC2 co-depletions in nuclear extract as well as with pure recombinant proteins. Furthermore we found that

upon removal of NC2 from HeLa nuclear extract the level of activated transcription in a cell free system is significantly reduced but addition of chromatographic fractions containing NC2 and the Mediator can restore transcriptional activation. This information together with the novel interaction between NC2 and MED21 suggest a balance of positive and negative transcriptional responses.

3.3 MATERIALS AND METHODS

Vectors

Vector pNC2 α -6HIS and pNC2 β -6HIS have previously been described [Kim *et al.*, 1995]. Vector pNC2 α -M2 was carried out by subcloning NC2 α with NdeI and Bam HI into pET11d-flag. The final co-expressing vector was carried out by subcloning NC2 α -M2 with Bgl II and Hind III in to pNC2 β -6HIS, in order to generate pNC2 β -6HIS/NC2 α -M2. Promoter Constructs. The pHIV-111/80 containing SP1 activation sites and pHIV-34/60 containing the core promoter has been described elsewhere (Castano *et al.*, 2000).

NC2 Expression the vectors were transformed in LysE bacteria and then allowed to grow to an OD of 0.1. Next, IPTG was added and incubated at 30 degrees (C) for 6 hours. Bacterially expressed M2:NC2 α - 6His:NC2 β and 6His:hSRB7 were purified on Ni²⁺- nitrilotriacetic acid resin under non denaturing conditions. M2:NC2 α - 6His:NC2 β were further purified over an M2 resin column in BC buffer (20 mM Tris·HCl, pH 7.9 at 4°C/20% glycerol/0.2 mM EDTA, pH 8.0/10 mM β -mercaptoethanol/0.5 mM PMSF) containing 0.1 M KCl.

Protein Extraction

Extracted and purified proteins were stored in BC buffer containing 0.1 M KCl. 15 liters of HeLa cells were used to prepare the nuclear extract (HeLa NE) as described previously (Dignam *et al.*, 1983) HeLa NE lacking NC2 was prepared by immunoaffinity chromatography on protein A-Sepharose CL4B (Amersham Pharmacia)

covalently crosslinked to polyclonal anti-NC2 β antibody. Immunodepletions were carried out in BC buffer containing 0.5 M KCl and 0.1% NP-40. 10 ml of HeLa Nuclear Extract was equilibrated with BC buffer containing 300 mM KCl. HeLa NE was clarified by centrifugation at 10,000g for 20 min and loaded into a Phosphocellulose P11 column (Whatman), previously equilibrated with the BC300. Once the entire volume is loaded, the column is washed with 3–5 column volumes (CVs) of BC 300. Elute the column with 3 CVs of BC buffer with 500 mM KCl. Twice dialyzed the eluted fraction with BC 100 was applied to the DEAE column previously equilibrated in BC 100. Collect protein fractions. Collected flow through fractions is directly pass over a CM sepharose column (Amersham Pharmacia) previously equilibrated with BC 100. CM sepharose column was washed 5 CVs of BC100. Elution was carried out with 5 CVs of BC 400. Pool fractions based on Abs_{280 nm}, colorimetric protein assay.

Immunoprecipitations

They were conducted as described earlier [Creton S et al., 2002]. In brief the protein A beads were crosslink with anti NC2 β , followed by incubation at 4 degrees for 2 hours with purified NC2. Next, removal of non-bound NC2 was completed by washing three times the pellet with BC buffer containing 0.3 M KCl and 0.1% NP-40, the NC2 beads were then incubated with purified MED21 for 2 hours at 4 degrees. The immunoprecipitations were carried out in BC buffer containing 0.3 M KCl and 0.1% NP-40. Moreover, size exclusion chromatography was carried out on FPLC with Superose 12 from Amersham Pharmacia, in a BC buffer containing 0.3 M KCl.

Western Blot Analysis

Untreated HeLa NE and NC2 β -depleted HeLa NE (NE[Δ NC2 β]). Equal amounts of NE protein (30 μ g) and 10 μ l of anti-NC2 β column eluate were subjected to 10% SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose, and analyzed with antibodies to the proteins indicated.

Farwestern

100 micrograms of rNC2 were label with ^{32}P γATP in 20 units of casein Kinase II for 1 hr at 30 degrees. Labelled rNC2 was purified by Ni^{2+} - nitrilotriacetic acid resin. The labelled NC2 was used to probe the re-natured blot from the eluted NC2 of the immunoaffinity chromatography. Re-naturation of the blot was carried out by incubating the membrane blot in 8 M urea TBST followed by a 4 M urea TBST and a subsequent 2 M urea TBST before a final wash in TBST, all incubations were carried out for 2 hr at room temperature. After the membrane had been re-natured incubations with the label NC2 were carried out at 4 degrees in TBST for 4 hours after several washes with TBST and Autoradiography analysis. The same membrane was also used for western blot analysis with anti-MED21.

***In Vitro* Transcription**

Standard 60-min *in vitro* transcription reactions were performed as described previously (Castano *et al.*, 2000). In brief a reaction mixture containing either nuclear extracts or purified transcription factors were mix with 100 ng of pTOG5ML in the presence of 0.5 mM NTP, 5 mM MgCl, 5mM DTT, in 20 mM HEPES KOH pH 8.4. in 20 μl final volume. The transcription reactions were incubated at 30°C for one hour. A control label DNA was added to the mixture. Products were extracted in phenol, ethanol-precipitated and used for primer extension reactions utilizing ^{32}P label primer as previously published (Ikeda *et al.*, 2002).

3.4 RESULTS

NC2 has been shown to be a general transcriptional repressor of class II genes and its biochemistry has been well-characterized. The structure and interactions with TBP have been formally proven by x-ray crystallography (Kamada *et al.*, 2001). However, in order to achieve further understanding of the function of this repressor, an immunodepletion from HeLa, nuclear extract with anti-NC2 β was carried out.

Surprisingly our experiments show that members of the SRB/Mediator complex co-precipitated selectively with NC2 as shown in Fig. 1. The lack of precipitation of general transcription factors suggested high specificity of the assay although several nonspecific proteins do bind to the resin. Together with the tight binding of the anti NC2 antibody make the system unsuitable for further protein purification. Nevertheless many possible interacting partners could be analyzed from this system. Four antibodies directed against the SRB/Med complex showed a positive signal in the co-elution with NC2, however only MED21 showed around a 50% co-depletion in the NC2 depleted extract, figure 1. Moreover as can be observed NC2 does not interact with general transcription factors such as TFIIB y TFIIH, etc. Pointing to a specific interaction between the MED21 and NC2, the lack of depletion of other Mediator components can be explain by the great amount MED21 found in the cells that is not bound to the other subunits.

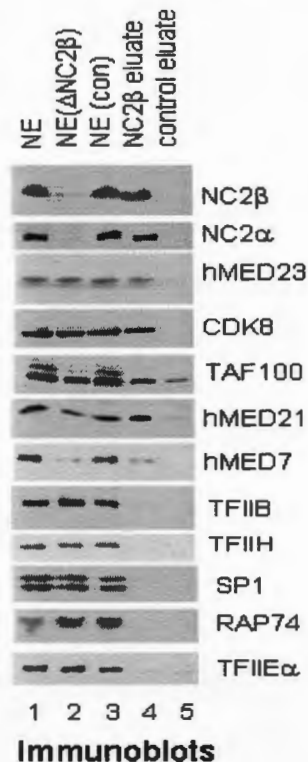


Fig. 3.1 Immunoblot analysis of HeLa NE, NC2 β depleted HeLa NE and the eluate from NC2 β Immunocolumn. Antibodies against NC2 α , NC2 β , hSUR2, hMED7, TFIIB, CDK8, TFIIH, TAF100, MED21 and were used to probe the membranes for their presence. Protein molecular weight markers were used for all cases (pm).

In order to evaluate the functional effect of NC2 depleted from nuclear extract. In vitro transcription reactions were carried out. As can be seen in figure 2A a 89% decrease in activated transcription is observed when NC2 β is depleted from nuclear extract, however the addition of the chromatographic fraction P11:05 containing NC2 and

Mediator complex can completely restore transcriptional activation this is not the case for other chromatographic fractions or recombinant NC2. This Suggest that NC2 is insufficient for the increase in transcriptional activation, indicating missing elements that were depleted from the nuclear extract. Different resins have been used in vane to try to further purify the activity as shown in figure 2B and 2C.

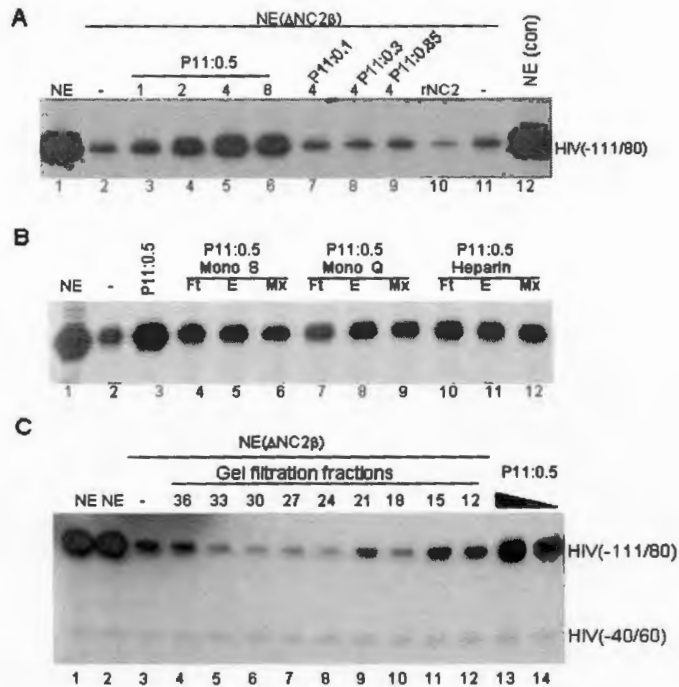


Fig. 3.2 NC2 depletions decrease activated transcription *in vitro*. (A) *In vitro* transcription With HeLa nuclear extract (NE), preimmune depleted nuclear extract (NE control), NC2 depleted nuclear extract (α NC2 β NE), Phosphocellulose 11 fractions from nuclear extract either at 0.1, 0.3, 0.5 or 0.85 M KCL correspond to P11:0.1,

P11:0.3, P11:0.5, P11:0.85 respectively. (B) In vitro transcription testing eluate fractions, flowthrough or mixing experiments from either Mono S, Mono Q or Heparin chromatographic resins utilizing P11:0.5 as the material source. (C) In vitro transcription testing the effect of size exclusion chromatography of the P11:0.5 fraction.

In order to define what other factor may be interacting with NC2, we labeled the NC2 complex with ^{32}P γ ATP and casein kinase II, Fig. 3a shows the autoradiography both labeled rNC2 subunits. A farwestern approach was carried on two different nuclear extracts to identify those proteins that interact with NC2. Several bands appeared but the main bands were found at 70, 50, 35, 30, 25 and 19 KDa as displayed in Fig. 3b. Was of particular interest as it showed a consistent decrease of a 19KDa band in depleted NC2 β extracts. Furthermore, a farwestern carried out on the NC2 eluate shows an interacting protein of 19KD as seen in lane 2 of figure 3C. Many of the bands are not due to nonspecific binding as the overall protein amount found in this region is low as seen in figure 3C lane 1. Lane 3 from figure 3C show an immunoblot analysis of the farwestern with anti-hMED21 showing that the 19 KDa band match the signal from the farwestern from lane 2. We thus tested the direct interaction of NC2 with MED21 since it showed a higher yield of co-precipitation from the immuno-depletion assay and had a molecular weight matching the 19 KDa interacting protein from the farwestern. To test for a possible interaction Immunoprecipitations were carried out with the purified proteins which showed a greater than 90% interaction of MED21 with NC2 complex but no binding was observed with NC2 β or the antibody bound to the beads as seen on Fig. 4a.

Finally, to further prove the interaction and avoid the use of antibodies in the assay, a gel filtration column was used to separate the non interacting proteins. A change was observe in the mobility of all detectable MED21 when it is incubated with NC2 to coincide with the peak of elution of NC2, thereby showing a physical interaction of MED21 with NC2 as shown in Fig. 4b.

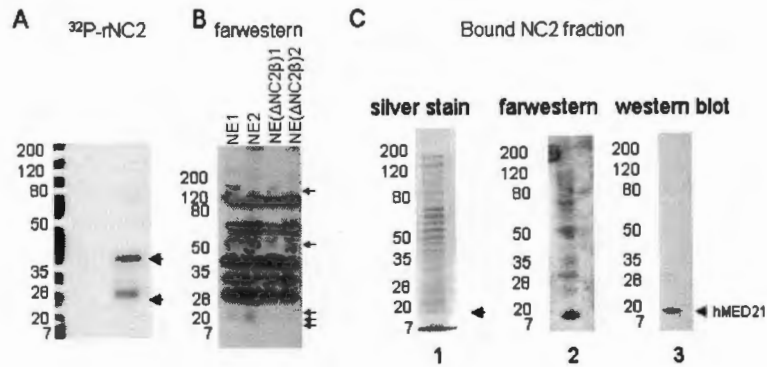


Fig. 3.3 Farwestern blot analysis. A, Autoradiograph of a 12% PAGE of Casein kinase II labelled and purified rNC2. B, Farwestern blot analysis of NC2 eluate from the immunoprecipitate with anti-NC2 β from HeLa NE, after renaturation. As described in materials and methods C. Immunoblot analysis from the membrane blot was carried out with anti-hSRB7.

3.5 DISCUSSION

NC2 (Dr1/Drp1) has long been known to be one of the main general transcriptional repressors in eukaryotic cells (Goppelt *et al.*, 1996; Yeung *et al.*, 1997). The interaction between NC2 and TBP has been demonstrated *in vitro*, showing its role as a repressor by preventing TBP interaction with TFIIB thereby blocking the formation of the pre-initiation complex (Geisberg *et al.*, 2001). Furthermore, plants NC2 show an inverted role in the transcriptional repression of the two subunits (Song *et al.*, 2002). However, recent literature has suggested that NC2 can be found dissociated and interacts with other polypeptides like AREB6 and FoxH1 (Ikeda *et al.*, 1998, Iratni *et al.*, 2002). One possibility is that the histone fold motive common to a few polypeptides may help them being interchangeable depending on the cellular response which modulates the transcriptional response.

NC2 has been shown in *Drosophila* TATAless promoters as a general transcription factor (Willy *et al.*, 2000) it still remains uncertain what is the effect of NC2 in human TATAless promoters. Moreover it has also been reported a dual activity of NC2 in yeast experiments (Gadbois *et al.*, 1997). It has been shown that in yeast cells the loss of NC2 function can compensate for a defect in the SRB4 component of the holoenzyme, together with previous evidence that SRB4 functions positively in activation at a global level in class II promoters it may reflect that NC2 interact with the holoenzyme in a balance activation and repression (Gadbois *et al.*, 2003). Furthermore NC2 alpha has been shown to interact with BTAF1 and this may lead to stimulation in its ATP-dependent association with TBP, thereby increasing its affinity to DNA (Klejman *et al.* 2004). Our results show that a different member of the SRB/mediator complex (MED21) physically interacts with NC2 in human extracts and purified proteins as seen in Figure 1 and 4.

However, there is little conservation on several portions of the sequence between human, yeast and *Drosophila* NC2. The function of NC2 in our *in vitro* transcription experiments show a positive role for this repressor, since its depletion from HeLa nuclear extract results in a ten fold decrease of activated transcription Figure 2. rNC2 was incapable of rescuing transcription activation and resulted in a further decrease of

transcription, consistent with other published reports (Kim *et al.*, 1995) but suggesting that other factors may be lost during the NC2 depletion. The addition of P11:0.5 fractions obtained from HeLa nuclear extract can rescue the lost transcriptional activity of the NC2 depleted extract. This fraction contains the majority of NC2 from nuclear extract, but its purification over resins does not yield further purification of the activity, surprisingly the activity was lost over a size exclusion chromatography, which points out to either to protein modifications (dephosphorylation, methylation, sumoylation, etc.) which may occur during the purification procedure that renders the complex inactive or dissociates it from other proteins. Also can be explain if weak binding of the large complex Mediator dissociates some components during the affinity purification rendering the left complexes inactive. Further advances in protein purification techniques as well as the creation of tag cell lines may be need it to answer this problem.

The precipitate from the immunodepletion and the farwestern blot show that NC2 can interact with several proteins (Figure 3). To confirm this finding, further work is necessary to elucidate all of the partners and condition under which this protein may be having a biological response. However the finding by Farwesterns of a 19 KDa protein that correspond by western blot to MED21, and the CO-IP and Gel filtration suggest a strong interaction, current yeast data suggest that *srb4* plays a regulatory role with yeast NC2 (Gadbois *et al.*, 1997).

In summary, we found in this research that NC2 and MED21 interact and help modulate the level of transcription by the *Srbs*/Mediator complex, or it may interact with some of the free portion of cellular MED21, which role is still to be defined.

Acknowledgements

We thank Arnold Berk for the anti-hSUR2 antibody and Yi Wei Jiang for anti-hMED7 antibody. We wish to thank Angela F. Ku for her technical help, T. Oelgeschlager group for their discussions and Luis Joel Figueroa from Accesolab for the contribution of reagents for this study. Dr. Castaño is partially funded by CONACYT grant 39731-z.

3.6 REFERENCES

- Bikle DD, Tu CL, Xie Z, Oda Y. 2004 Vitamin D regulated keratinocyte differentiation: role of coactivators. *J. Cell Biochem.* **88**:290-5.
- Bjorklund S, Gustafsson CM. 2004. The mediator complex. *Adv. Protein Chem.* **67**:43-65.
- Castano E, Gross P, Wang Z, Roeder RG, Oelgeschlager T. 2000. The C-terminal domain-phosphorylated IIO form of RNA polymerase II is associated with the transcription repressor NC2 (Dr1/DRAP1) and is required for transcription activation in human nuclear extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7184-7189.
- Christova R, Oelgeschlager T. 2002. Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin *in vivo*. *Nat. Cell Biol.* **4**:79-82.
- Creton S, Svejstrup JQ, Collart MA. 2002. The NC2 alpha and beta subunits play different roles *in vivo*. *Genes Dev.* **16**:3265-3276.
- Davis JA, Takagi Y, Kornberg RD, Asturias FA. 2002. Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol. Cell* **10**:409-15.
- Denko N, Wernke-Dollries K, Johnson AB, Hammond E, Chiang CM, Barton MC. 2003. Hypoxia actively represses transcription by inducing negative cofactor 2 (Dr1/DrAP1) and blocking preinitiation complex assembly. *J. Biol. Chem.* **278**:5744-5749.
- Dignam JD, Martin PL, Shastry BS, Roeder RG. 1983. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol.* **101**:582-98.
- Gadbois EL, Chao DM, Reese JC, Green MR, and Young RA. 1997. Functional antagonism between RNA polymerase II holoenzyme and global negative regulator NC2 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3145-3150.
- Geisberg JV, Holstege FC, Young RA, Struhl K. 2001. Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **21**:2736-2742.

- Goppelt A, Stelzer G, Lottspeich F, Meisterernst M. 1996. A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J.* **15**:3105-3116.
- Ikeda K, Halle JP, Stelzer G, Meisterernst M, Kawakami K. 1998. Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor AREB6. *Mol. Cell. Biol.* **18**:10-18.
- Iratni R, Yan YT, Chen C, Ding J, Zhang Y, Price SM, Reinberg D, Shen MM. 2002. Inhibition of excess nodal signaling during mouse gastrulation by the transcriptional corepressor DRAP1. *Science* **298**:1996-1999.
- Ito M, Roeder RG. 2001. The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**:127-134.
- Kamada K, Shu F, Chen H, Malik S, Stelzer G, Roeder RG, Meisterernst M, Burley SK. 2001. Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* **106**:71-81.
- Kim TK, Zhao Y, Ge H, Bernstein R, Roeder RG. 1995. TATA-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J. Biol. Chem.* **270**:10976-10981.
- Klejman MP, Pereira LA, van Zeeburg HJ, Gilfillan S, Meisterernst M, Timmers HT. 2004. NC2alpha interacts with BTAF1 and stimulates its ATP-dependent association with TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **22**:10072-10082.
- Kretzschmar M, Stelzer G, Roeder RG, Meisterernst M. 1994. RNA polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3927-3937.
- Naar AM, Lemon BD, Tjian R. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Ann. Rev. Biochem.* **70**: 475-501.
- Song W, Solimeo H, Rupert RA, Yadav NS, Zhu Q. 2002. Functional dissection of a Rice Dr1/DrAp1 transcriptional repression complex. *Plant Cell* **14**:181-195.
- Willy PJ, Kobayashi R, Kadonaga JT. 2000. A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* **290**:982-985.

Yeung K, Kim S, Reinberg D. 1997. Functional dissection of a human Dr1-DRAP1 repressor complex. *Mol. Cell. Biol.* 17:36-45.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La regulación de la expresión de los productos génicos involucrados en el ciclo celular, es un proceso esencial para la división y la diferenciación en los organismos eucariontes, incluyendo las plantas superiores (den Boer & Murray, 2000). Entre los diferentes productos génicos reguladores en el ciclo celular, el factor transcripcional E2F y la proteína retinoblastoma son componentes clave para este proceso y la pérdida de su regulación causa la formación de tumores en células animales (Harbour & Dean, 2000).

En el caso de las plantas, éstas poseen una ruta conservada en la regulación de la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular mediada por el factor transcripcional E2F. En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado ocho miembros de la familia de E2F, las cuales se han agrupado en tres clases en base a su estructura y propiedades bioquímicas (Trimarchi & Lees, 2002).

En cuanto a la participación de E2F en procesos de desarrollo y diferenciación, De Veylder *et al.*, en el 2002, determinaron que la expresión de dos miembros de la familia (E2F y DP) no sólo se encuentran restringidas a zonas con una elevada tasa de división celular, sino que también se encuentra en zonas diferenciadas como son la epidermis, la corteza, los hipócotilos y en tejido vascular. Nuestros resultados sugieren, que E2F se encuentra en tejidos que se dividen activamente como son las suspensiones celulares y los embriones somáticos. Es de notarse que también se encuentra en tejidos con diferente grado de diferenciación como son las hojas, los tallos y las raíces (Figura 2.4A). Es de notarse que los niveles de inmunodetección de E2F corresponden con los de su actividad de unión al ADN (Figura 2.4B), sugiriendo la posible participación de E2F en los procesos de diferenciación y división celular en *Coffea canephora*.

Todos los miembros de la familia de E2F descritos poseen el dominio conservado de unión al DNA, un dominio de dimerización, una caja de marcaje y un dominio de

transactivación. El ADN complementario (ADNc) de E2Fa y E2Fb codifica para proteínas de 485 y 469 aminoácidos (aa) con una masa molecular de 52.8 y 51.7 kDa respectivamente. El ADNc de E2Fc codifica para un producto de 396 aa con una masa molecular de 45.2 kDa. El ADNc para E2Fd y E2Fe codifican para productos de 359 y 379 aa con una masa molecular de 40.6 y 42.4 kDa. En contraste el cDNA de E2Ff codifica para un producto de 22.4 kDa (Mariconti *et al.*, 2002).

Como se puede observar en la Figura 2.4A, el anticuerpo cruza con una banda de alrededor de 55 kDa específicamente en los explantes de hoja, probablemente identificando una forma típica de algún miembro de la familia de E2F en los tejidos de hoja, la cual podría corresponder a E2Fa o E2Fb encontradas en *Arabidopsis*.

Para evaluar la presencia de E2F en procesos de muerte celular, seleccionamos las suspensiones celulares como un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la muerte celular programada (PCD) *in vitro* (Danon & Gallois, 1998; McCabe *et al.*, 1997; Delorme *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 1999). La PCD, se define como un proceso activo de muerte celular, el cual ocurre durante el desarrollo y en respuesta a cambios ambientales. En las plantas la PCD es un proceso esencial para el desarrollo y la sobrevivencia de las mismas (Greenber, 1996).

Como se puede observar en la Figura 2.1A, la ausencia del 2,4-D en el medio de cultivo ocasionó una disminución del peso fresco hasta un 80% comparado con el testigo; esta disminución del peso fresco fue acompañado por una disminución de la viabilidad celular hasta en 40% (Figura 2.2B) y un aumento en la conductividad del medio de cultivo (Figura 2.2A). No obstante, cuando las células fueron mantenidas en el medio sin el 2,4-D más la adición del medio de cultivo de las células sometidas previamente a muerte celular (PCDM), se logró observar un efecto más marcado en la viabilidad celular y la conductividad del medio de cultivo, es de notarse la presencia de cambios en la apariencia celular, como es el cambio de un color claro a un color oscuro (comparar línea 3 y 4 de la Figura 2.1B). Por otra parte la adición del medio PCDM a las suspensiones testigo no ocasionó cambios aparentes a los mismos parámetros evaluados anteriormente.

En las plantas, la PCD puede ser inducida por diferentes tipos de estrés biótico o abiótico, dicho proceso está aparentemente bajo el control de una compleja interacción hormonal. Por ejemplo, en cereales la PCD puede ser estimulada por la presencia de las giberelinas, mientras que el ABA bloquea este efecto y retarda la PCD (Pennel & Lamb, 1997). Recientemente, se demostró que las citocininas pueden inducir PCD cuando ésta se adiciona en altas concentraciones, y que por el contrario el ácido abscísico y el 2,4-D bloquean el efecto de la inducción de la PCD provocado por las citocininas (Carimi *et al.*, 2003). Nuestros resultados sugieren una primera evidencia de que la ausencia de la auxina 2,4-D en el medio de cultivo, puede inducir la muerte celular en las suspensiones celulares. Cabe mencionar que el tratamiento con luz ultravioleta por tres horas fue suficiente para ocasionar una completa inhibición del crecimiento celular ocasionada por la disminución de la viabilidad celular (Figuras 2.1A y 2.2B).

La PCD y, en particular, la apoptosis se caracterizan por ciertos marcadores morfológicos como son: la condensación de la cromatina, y el corte del ADN en sitios específicos, aunque generalmente las membranas se mantienen intactas. Sin embargo, la condensación de la cromatina y la escalera de ADN no siempre se encuentran en los procesos de PCD en las plantas. Como se puede observar en la Figura 2.3, los diferentes tratamientos a las suspensiones celulares ocasionaron un daño al ADN que se observa como una degradación del mismo; efecto que no se observa en el ADN aislado de las células testigo. En particular, se observa un daño evidente cuando las suspensiones celulares fueron mantenidas en el medio de cultivo sin el 2,4-D, cuando se adicionó el PCDM y con el tratamiento con la luz ultravioleta.

Con los resultados obtenidos, que incluyen una disminución en el crecimiento, una disminución en la viabilidad celular, un aparente daño al DNA y cambios en la fisiología de las células, se decidió evaluar la presencia de E2F bajo estos diferentes tratamientos. Los niveles de E2F disminuyen conforme avanza el ciclo de cultivo, lo cual corresponde con los niveles de división celular de las suspensiones (Anexo). Es de notarse que cuando las células fueron mantenidas en el medio sin el 2, 4-D se mantuvo la presencia de E2F durante el ciclo de cultivo, al igual que cuando se

adiciono el PCDM a excepción del día 24 que se pierde la presencia de E2F (Figura 2.5A), estos datos, sugieren una posible participación de E2F en los procesos de muerte en las suspensiones celulares de *Coffea canephora* en respuesta a un daño al ADN ocasionado por la ausencia de la auxina 2, 4-D. Probablemente activando genes relacionados en los procesos de muerte y por daño al ADN como ha sido sugerido anteriormente (Müller *et al.*, 2001; Milton *et al.*, 2006).

Es de importancia mencionar, que la familia de E2F, puede llevar a cabo ya sea la transcripción de genes relacionados a crecimiento y división celular así como también, la regulación de genes relacionados a desarrollo y muerte celular. Algunos miembros de la familia son capaces de reprimir la transcripción, dependiendo de las condiciones ambientales y el estado fisiológico en que se encuentren las células.

Otro factor transcripcional que se ha visto posee diferente actividad *in vivo*, es el conocido como NC2 (Dr1-Drap1). NC2 fue inicialmente identificado como un represor transcripcional de promotores TATA (Maldonado *et al.*, 1999). Recientemente Willy *et al.*, en el 2000, encontraron que NC2 es un factor transcripcional bifuncional, ya que posee actividad como represor en promotores TATA y como un factor general de transcripción en promotores TATA-less. No obstante, la habilidad de NC2 en seleccionar entre estos tipos de promotores, sugieren que NC2 puede actuar como un blanco importante de otros factores regulatorios.

Nuestros experimentos, demuestran claramente que algunos miembros del complejo SRB/mediador tales como: MED21, MED7 y MED23 co-precipitan selectivamente con NC2 (Figura 3.11) y no con los factores generales de la transcripción como TFIIB y TFIIF sugiriendo una interacción específica de NC2 con las proteínas del complejo SRB/mediador.

Por otra parte, en los estudios realizados no se ha logrado observar una activación de la transcripción basal por NC2 *in vitro*, excepto, en una ocasión en la que se encontró que NC2 incremento hasta dos veces la transcripción (Kim *et al.*, 1997). Como se puede observar en la Figura 3.2A, la ausencia de NC2 en el extracto nuclear ocasionó una disminución de la transcripción activada, la cual se vio recuperada cuando se adicionaron las fracciones cromatográficas que contienen a NC2 y el complejo

mediador. No así, para el caso de otras fracciones cromatográficas o NC2 recombinante, sugiriendo que NC2 por sí solo es insuficiente para incrementar la activación transcripcional.

Para identificar que factores podrían estar interactuando con NC2, realizamos un ensayo de farwestern, como se puede observar en la Figura 3.3B; bandas entre 70, 50, 35, 30, 20 y 19 kDa al parecer interactúan con NC2, es de llamar la atención la disminución de la banda de 19 kDa en los extractos carentes de NC2 β . Posteriormente, se realizó un farwestern nuevamente con la fracción de elución en la que se encontraba NC2, como se puede observar en la Figura 3.3C, existe una interacción de NC2 con una banda de 19 kDa, la cual al ser al ser inmunodetectado con anticuerpos contra hMED21 se puede observar una señal de alrededor de 19 kDa. Finalmente, cuando se incubaron NC2 con MDE21, se observó un cambio en la movilidad de MED21 sugiriendo una interacción física entre estas proteínas (Figura 3.4B). Cabe mencionar que los posibles blancos de NC2 para estimular la transcripción aun permanecen desconocidos.

Recientemente Cang & Prelich en 2002, investigaron el mecanismo básico de la función positiva de NC2 durante la transcripción. Ellos encontraron que NC2 estimula directamente la transcripción dependiente de un activador en los promotores TATA *in vivo* e *in vitro*, y este efecto estimulador es mediado por la interacción con TBP. Estos datos llevaron a la explicación y a la propuesta de un modelo sobre la regulación dual de TBP por NC2. Por otra parte, se ha observado un incremento en la actividad represora de NC2 en condiciones de estrés ocasionado por una disminución en la cantidad de oxígeno (Denko *et al.*, 2003). En estos experimentos, se observó que no se afectó la presencia de la ARN polimerasa II en su forma IIA (no fosforilada), sin embargo, se observó una disminución de la forma fosforilada (IIO), lo cual reveló una correlación de la pérdida de la ARN pol IIO y la represión de la transcripción. Conjuntamente, se visualizó un aumento en los niveles de proteína de NC2 en los extractos bajo las condiciones de hipoxia (Denko *et al.*, 2003). No obstante, se ha observado que la pérdida de la función de NC2, afecta la transcripción de genes que se requieren en la generación de la cascada de señalización de estrés (Geisberg *et*

, 2001). Alternativamente, las condiciones de estrés pueden resultar en una activación transitoria de NC2.

Una pregunta sin resolver en la biología de las plantas es; si las rutas conservadas de transducción de señales que llevan a la muerte celular, son ocasionadas por cambios metabólicos específicamente ordenados durante el desarrollo, estrés ambiental o durante el ataque de patógenos.

PCD, es uno de los eventos indispensables para el desarrollo de las plantas, como un mecanismo de defensa y para la arquitectura de las mismas (Pennell & Lamb, 1997). La relevancia de estudiar PCD en cultivos celulares, depende en como comparar los procesos que ocurren en condiciones *in vivo*. Los procesos de PCD *in vivo* e *in vitro* consisten de tres fases claramente identificables: una fase de inducción, donde la célula percibe la señal de muerte e inicia el proceso; una fase efectora, en la cual la célula realiza irrevocablemente la muerte y la activación de la maquinaria; la fase de degradación, donde la acción de la maquinaria de muerte, lleva en la generación de los marcadores morfológicos y bioquímicos del proceso de muerte celular (Green & Kroemer, 1998). Por lo tanto la dispersión del programa de muerte en condiciones *in vitro*, conlleva directamente a la comprensión de la regulación y el mecanismo del proceso de muerte durante el crecimiento y desarrollo *in vivo*.

En conjunto, los datos obtenidos en este trabajo proporcionan la pauta de que la regulación de la transcripción y los factores que participan en dicho evento, pueden variar a cabo funciones novedosas o modificar su actividad, sin olvidar que todo depende de los modelos biológicos seleccionados, las condiciones ambientales, ecológicas y genéticas y el momento espacio-temporal en que se lleve a cabo dicho proceso.

4.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cang Y, Prelich G. 2002. Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 12727–12732.
- Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Lo Schiavo F. 2003. Cytocinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**: 413-421.
- Danon A, Gallois P. 1998. UV-C radiation induces apoptoticlike changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **437**:131–136.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Engler JA, Ormenese S, Maes S, Naudts M, Schueren VD, Jacquemard A, Engler G, Inze D. 2002. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* **21**:1360–1368.
- Delorme VGR, Mc Cabe PF, Kim DJ, Leaver CJ. 2000. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.* **123**: 917–927.
- den Boer and Murray JA 2000. Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* **10**: 245-250.
- Denko N, Wernke-Dollries K, Johnson AB, Hammond E, Chiang CM, Barton CM. 2003. Hypoxia Actively Represses Transcription by Inducing Negative Cofactor 2 (Dr1/DrAP1) and Blocking Preinitiation Complex Assembly. *J. Biol. Chem.* **278**: 5744-5749.
- Geisberg JV, Holstege FC, Young RA, Struhl K. 2001. Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 2739-2742.
- Greenberg JT. 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:12094-12097.
- Green D, Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* **8**: 267–271.
- Harbour JW, Dean DC. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**: 2393-2409.

- Kim S, Na JG, Hampsey M, Reinberg D. 1997. The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 820–825.
- Maldonado E, Hampsey M, Reinberg D. 1999. Repression: targeting the heart of the matter. Cell **99**: 455–458.
- Mariconti L, Pellegrini B, Cantón R, Stevens R, Bergounioux C, Cella R, Albani D. 2002. The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. **227**: 9911-9919.
- McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennell RI. 1997. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. Plant J. **12**: 267–280.
- Milton AH, Khaire N, Ingram L, O'Donnell AJ, La Thangue NB. 2006. 14-3-3 proteins integrate E2F activity with the DNA damage response. EMBO J. 1-12.
- Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K. 2001. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation and apoptosis. Genes Dev. **15**: 267-285.
- Pennell RI, Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants. Plant Cell **9**: 1157–1168.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A. 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. Plant Cell **11**: 431–443.
- Trimarchi JM, Lees JA. 2002. Sibling rivalry in the e2f family. Nat. Rev. Cell Mol. Biol **3**: 11-20.
- Willy PJ, Kobayashi R, Kadonaga JT. 2000. A basal transcription factor that activates or represses transcription. Science **290**: 982-984.

CAPÍTULO V

5.1 PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos en la presente investigación, establecen un avance en el conocimiento de la regulación de la división celular por diferentes tipos de estrés y la participación de un elemento clave en dicho proceso; como lo es el factor transcripcional E2F y generan nuevas perspectivas para profundizar en el conocimiento en tales procesos.

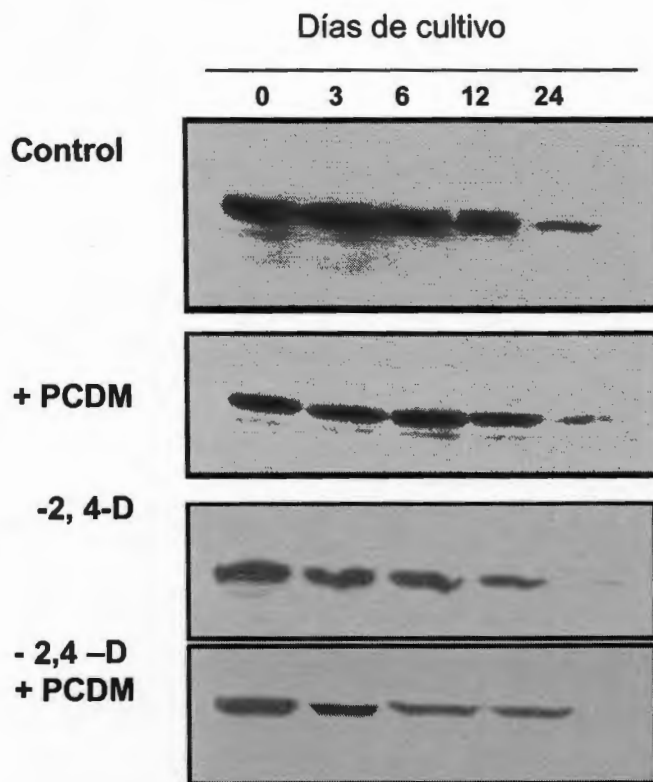
Uno de los primeros aspectos por comprobar sería si bajo estos tratamientos se pueden identificar algunos marcadores específicos de la muerte celular como son; la liberación del citocromo c al citoplasma, la activación de proteasas de cisteína, el aumento de la cantidad de proteínas relacionadas a la apoptosis como bcl-2, BAD y corroborar el daño aparente al ADN por medio de marcaje *in situ*.

Otro aspecto importante sería; corroborar si efectivamente E2F participa en la regulación de la expresión de los genes relacionados a la diferenciación y muerte celular; por medio del silenciamiento de E2F y determinar los niveles de expresión de estos genes por medio de ensayos de Northern-blot, y la identificación de las posibles proteínas que podrían estar involucradas en la estabilización de E2F en dichos eventos por medio de ensayos de inmunoprecipitación e hibridación *in situ*.

Uno de los aspectos más novedosos del trabajo por corroborar, sería la identificación de las proteínas por medio de secuenciación y de los metabolitos secundarios por HPCL que se encuentran en el medio PCDM que son capaces de activar la ruta de señalización que llevan a la muerte celular por necrosis en ausencia del 2,4-D.

Finalmente, la caracterización de la biblioteca de anticuerpos monoclonales contra E2F, sería de suma importancia para futuros experimentos relacionados a división celular, regulación transcripcional y muerte celular en los cultivos de *Coffea canephora*.

ANEXO



Inmunodetección de E2F. 25 μ g de los extractos proteicos totales, se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se electrotransferieron a una membrana de PVDF. Posteriormente la membrana se incubó con un anticuerpo contra E2F. La inmunodetección de E2F se realizó por medio del paquete comercial ECL Western Blotting Analysis (Amesham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

APÉNDICE

OBTENCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA E2F POR LA TÉCNICA DE DESPLIEGUE EN FAGOS

6.1 INTRODUCCIÓN

La tecnología de despliegue en fagos fue introducida en 1985 por Smith G, y es una técnica efectiva para la producción de diversos péptidos y proteínas (Barbas, 1993). Esta técnica, puede usarse además para el estudio de interacciones entre péptidos y ligandos, así como los posibles sitios de unión de los anticuerpos (Griffiths, 1993).

El despliegue en fagos, involucra la expresión de proteínas, incluyendo anticuerpos o péptidos en la superficie de los fagos filamentosos. Las secuencias de ADN de interés, son insertadas en una parte en el genoma del fago filamentosos, tales como las regiones que codifican para proteínas que son expresadas o desplegadas en la superficie de los fagos, lo cual origina como un producto de fusión en una de las proteínas de la cápside del fago.

Dos descubrimientos clave fueron esenciales para el desarrollo de la tecnología de despliegue en fagos para la producción de los anticuerpos: primero; la demostración de que el ADN insertado en el gene III (g3) del fago se expresa como una proteína de fusión y es desplegado en la superficie del fago y la segunda; la expresión completa de un fragmento funcional de un anticuerpo en el espacio periplasmático de *E. coli* (Better *et al.*, 1988).

El objetivo de este trabajo, fue obtener una biblioteca de anticuerpos monoclonales contra una parte de la región de unión al ADN de E2F, utilizando la tecnología de despliegue en fagos.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema biológico utilizado fueron las gallinas ponedoras White Legorn (2 kg), compradas en granjas locales. Las gallinas se mantuvieron en ciclos regulares de luz y oscuridad con alimento para gallinas ponedoras Nutrimex.

Inmunizaciones

Para las inmunizaciones se dispuso de 0.5 mL del péptido (300 µg) en amortiguador de fosfatos pH 7.4. el cual se mezcló con 0.5 mL de adyuvante completo o incompleto de Freund's con la ayuda de una jeringa de dos vías, hasta que se formó una hemulsificación. Posteriormente este hemulsificado se inyectó en la parte pectoral de la gallina. Las inmunizaciones se realizaron en tres ocasiones cada 10 días, antes de la primera inmunización se obtuvo el suero (preinmune) para ser usado como testigo. Posteriormente las gallinas se sacrificaron y se aisló el bazo para obtener el ARN.

RT-PCR y PCR

Después de obtener el título adecuado en la producción de anticuerpos, se procedió a sacrificar a la gallina. El ARN total se aisló del bazo de la gallina con el amortiguador comercial RNA STAT. La síntesis del ADNc se realizó con el paquete comercial SUPERSRIPT II de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La amplificación de las cadenas pesadas y ligeras y su unión por traslape y extensión se realizaron por PCR utilizando los siguientes cebadores:

Cebadores para la amplificación de la cadena pesada de los anticuerpos de gallina

CSCVHo-F(sentido)

5'- GTCAGTCCTCTAGATCTTCCGCCGTGACGTTGGACGAG- 3'

CSCG-B (antisentido)

5'- CTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGGAGGAGACGATGACTTCGGT- 3'

Cebadores para la amplificación de la cadena ligera de los anticuerpos de gallina

CSVK (sentido)

5'- GTGGCCCAGGCGGCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTC- 3'

CKJO-B (antisentido)

5'- GGAAGATCTAGAGGACTGACCTAGGACGGTGAGG- 3'

Cebadores para el traslape y extensión de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos de gallina

CSC-F (sentido)

5'- GAGGAGGAGGAGGAGGAGGTGGCCCTGACTCAG - 3'

CSG-B (antisentido)

5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCCACTTGGAGG – 3'

Para la amplificación de los productos, se utilizó un termociclador con el siguiente programa: 5 min a 94°C; 30 ciclos (30 seg 94°C, 30 seg 60°C, 90 seg 72°C), seguidos por 10 min de extensión a 72°C. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con una solución de bromuro de etidio. Para el PCR de traslape se utilizó el mismo programa anterior, utilizando como templado los productos amplificados de las cadenas pesadas y ligeras.

Purificación de los productos del PCR

Partiendo de 10 reacciones de PCR, se precipitó el ADN sintetizado en la reacción con 1/10 vol de 3M de acetato de potasio y 2.2 vol de etanol absoluto. Se incubó a -20 °C toda la noche y se centrifugó a 16 000 g por 30 min. Se Descartó el sobrenadante, se lavó el paquete con etanol al 70% y se resuspendió en 20 µL de agua estéril. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2%, se extrajo la banda de interés del gel, la cual se colocó en un sobre de parafilm para ser congelado a -80°C por 30 min, seguidamente se trituró el pedazo de gel con la parte plana de un tubo eppendorf, se transfirió el líquido a un tubo con filtro de 0.45 µm ultrafree-MC (Amicon) y se centrifugó a 3 mil g por 10 min, finalmente se recuperó el sobrenadante y precipitó el ADN nuevamente.

Digestión de los productos de PCR y del vector pCOMB3X

Para la digestión de los productos del PCR, se mezcló 10 µg de los productos, 360 u de la nucleasa *Sfi*1, 20 µL de amortiguador para la enzima y se agregó agua hasta un volumen final de 200 µl. Esta reacción se incubó por 5 h a 55°C. Posteriormente se precipitó el ADN de la mezcla. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2%, se extrajo la banda de interés y se procedió a la purificación de la misma manera mencionada anteriormente.

La digestión del vector pCOMB3X, se realizó de la misma manera que los productos del PCR, únicamente fueron variadas las concentraciones de ADN plasmídico (20 µg) y de *Sfi*1 (120u).

Ligación de los productos de la digestión y transformación

Para la ligación de los productos de la digestión (PCR y vector), se mezclaron 1.4 μg del vector, 700 ng del producto de PCR, 40 μL de amortiguador para la ligasa T4, T4 DNA ligasa y se alcanzó a un volumen final de 200 μL con agua estéril. La mezcla se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente los productos de la ligación se precipitaron y el paquete se resuspendió en un volumen de 15 μL de agua estéril. Seguidamente se transformaron por electroporación células XL1-blue con el producto de ligación y las células transformadas se seleccionaron en una medio LB sólido con carbencilina.

Amplificación de las células transformadas

A las células transformadas (100 μL), se les agregó 5 mL de medio de cultivo SOC y se incubó por 1 h a 37°C. Posteriormente se adicionó 10 mL de medio SB y 3 μL de carbencilina (100 mg/mL) más 30 μL de tetraciclina (5 mg/mL). Se incubó 1 h a 37°C a 250 rpm, seguidamente se le agregó 4.5 μL de carbencilina y se incubó nuevamente por 1 h a 37°C. Una vez terminada la incubación, se agregaron 2 mL de fago ayudador y se transfirió a un matraz de 500 mL más 183 mL de medio SB, 92.5 μL de carbencilina más 370 μL de tetraciclina. Se incubó por 2 horas a 300 rpm y a continuación se le agregaron 280 μL de kanamicina (50 mg/mL) y se incubó toda la noche a 37°C a 300 rpm.

Obtención de los fagos

Al día siguiente, se centrifugaron los 200 mL del cultivo a 3 mil g durante 30 min, se recuperó el sobrenadante y se depositó en un matraz nuevo, se le agregó 1 parte de la solución de PEG 5X (50 mL), se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 15 000 g a 4°C durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 2 mL de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en amortiguador de fosfatos, seguidamente se centrifugó a 16 000 g a 4°C por 10 min y el sobrenadante (fagos) se pasó a un nuevo tubo a través de un filtro de 0.2 µm y se almacenó a 4°C.

Rondas de selección y amplificación de los fagos que despliegan el fragmento variable de cadena sencilla (FvSc)

Para las rondas de selección de los fagos, primeramente se preparó una placa de ELISA con el péptido (50 µL) y se incubó toda la noche a 4°C. La placa se bloqueó con BSA al 3% durante 1 h a 37°C, posteriormente se descartó el sobrenadante y se agregó 50 µL de los fagos de la biblioteca recién preparada y nuevamente se incubó la placa durante 2 h a 37°C. Pasadas las 2 h de incubación, se descartó el sobrenadante y se lavó cinco veces con 150 µL de amortiguador de fosfatos, seguidamente los fagos se eluyeron con tripsina. Se recobró el sobrenadante y se infectó nuevamente células vírgenes de XL1-blue con una alícuota de los fagos para una nueva ronda de selección. La selección se realizó como se mencionó anteriormente, en total se realizaron tres rondas de selección y amplificación de los fagos.

Pruebas de ELISA con los fagos seleccionados que expresan FvSc contra E2F

Estas pruebas se llevaron a cabo para determinar cual es la ronda de selección en donde hay una cantidad mayor de fagos y una mejor afinidad contra el péptido. A la placa de Elisa que contiene el antígeno y ha sido bloqueada previamente con BSA al 3% se le agregaron los fagos de las 3 rondas de selección por separado, se incubó

por 2 h a 37°C. Se retiró el sobrenadante y se le adicionó un anticuerpo contra M13 conjugado a una peroxidasa en una dilución 1:5000 en amortiguador de fosfatos con BSA al 1%. Se incubó 1 h a 37°C, se descartó el sobrenadante y se lavó con agua destilada, seguidamente se incubó con el sustrato (H_2O_2 + ABTS 1X) hasta que se obtuvo un color azul (10-30 min). Finalmente la reacción se detuvo con una solución de SDS al 1% y se cuantificó en un lector de ELISA a 405 nm.

6.3 RESULTADOS

Para la obtención de la biblioteca de anticuerpos monoclonales contra E2F, se mandó a sintetizar el péptido HHHHHRSTLGPIDVYLVVSQF que corresponde a una parte de la región de unión al ADN de E2F en plantas. Para poder generar una mayor respuesta inmunogénica en las gallinas, se decidió acoplar el péptido a BSA, así como también a esferas de níquel-sefarosa, siguiendo el siguiente régimen de inmunizaciones:

Cuadro 6.1 régimen de inmunizaciones

| | Día 0 | Día 10 | Día 20 | Día 30 |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Antígeno | 300 mg | 300 mg | 300 mg | X |
| Adyuvante completo | 0.5 mL | X | X | X |
| Adyuvante incompleto | X | 0.5 mL | 0.5 mL | X |

Después de la tercera inmunización, se realizaron las pruebas de Elisa para verificar la respuesta inmunogénica de la gallina con respecto a nuestro péptido, como se puede observar en la Figura 1, cuando el péptido se acopló a BSA se generó una mayor producción de anticuerpos contra nuestro péptido en comparación con el que se acopló a las esferas de níquel-sefarosa.

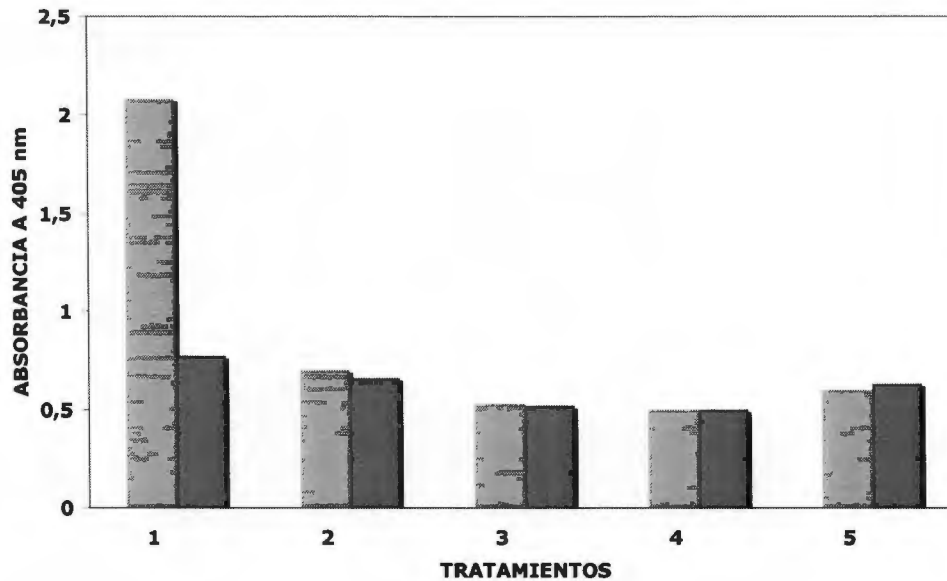


Fig. 6.1 Lecturas de las pruebas de ELISA después de la tercera ronda de inmunización. Barras 1; suero con el péptido acoplado a BSA (■) o con las esferas de níquel-sefarosa (■), barras 2; sueros preinmunes, barras 3; sin suero, barras 4; sin anticuerpo secundario y barras 5; sin el péptido.

Con los resultados de las pruebas de ELISA, lo siguiente fue sacrificar a las gallinas para obtener el bazo y continuar con la amplificación de las cadenas pesadas y ligeras. Una vez que se aisló el ARN total del bazo, se realizó la síntesis del ADNc, seguido de una reacción de PCR. Para la amplificación de los genes que codifican para la región variable del anticuerpo se requieren hacer dos reacciones de PCR por separado, una para la amplificación de la cadena pesada y ligera y una tercera reacción para vincular y extender las cadenas ligeras y pesadas.

Como se puede observar en la Figura 2 se logró la amplificación de dos bandas de aproximadamente 400 y 350 pares de bases (pb) que corresponden al tamaño esperado para las cadenas pesadas y ligeras respectivamente.

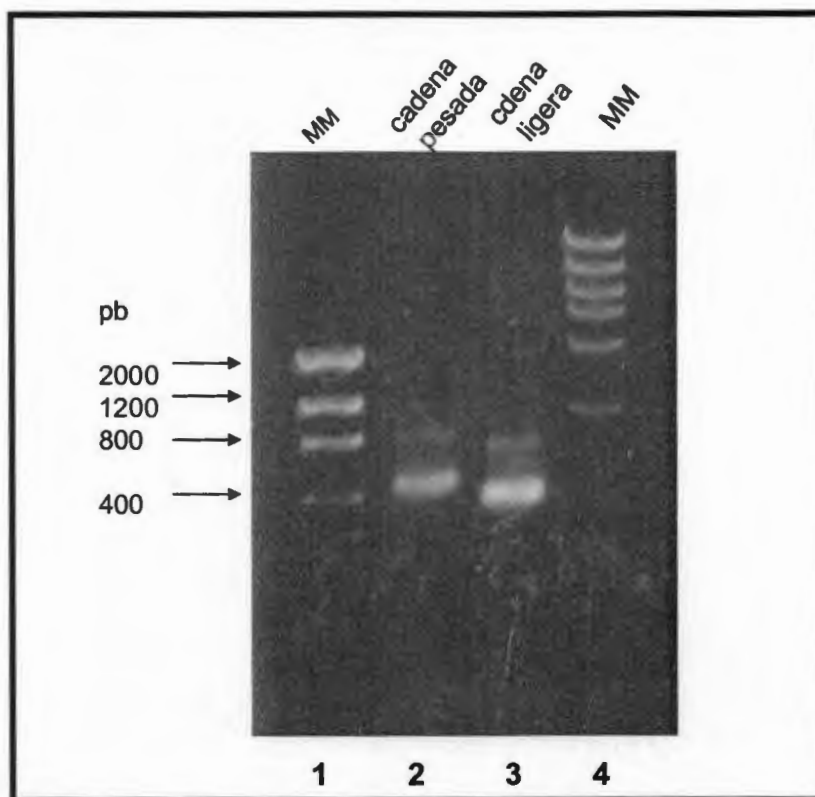


Fig. 6.2 Amplificación de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras. Carril 1, Marcador de masa molecular; Carril 2, Amplificación de la cadena pesada; Carril 3, amplificación de la cadena ligera y carril 4, marcador de masa molecular. Los productos de la reacción de PCR se separaron en un gel de agarosa teñido con

bromuro de etidio, las flechas y los números de la izquierda representan la masa molecular en pares de bases (pb.)

Posteriormente, para obtener suficiente cantidad del producto, se realizaron ocho reacciones para cada una (cadena pesada y cadena ligera) y se purificaron (ver Materiales y Métodos) para continuar con la tercera reacción de PCR para el traslape y la extensión de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras.

Como se puede observar en la Figura 3, utilizando como molde los productos amplificados de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se logró el traslape y la extensión de las cadenas, obteniendo un producto de alrededor de 750 pb que corresponde al tamaño esperado para el fragmento variable del anticuerpo.

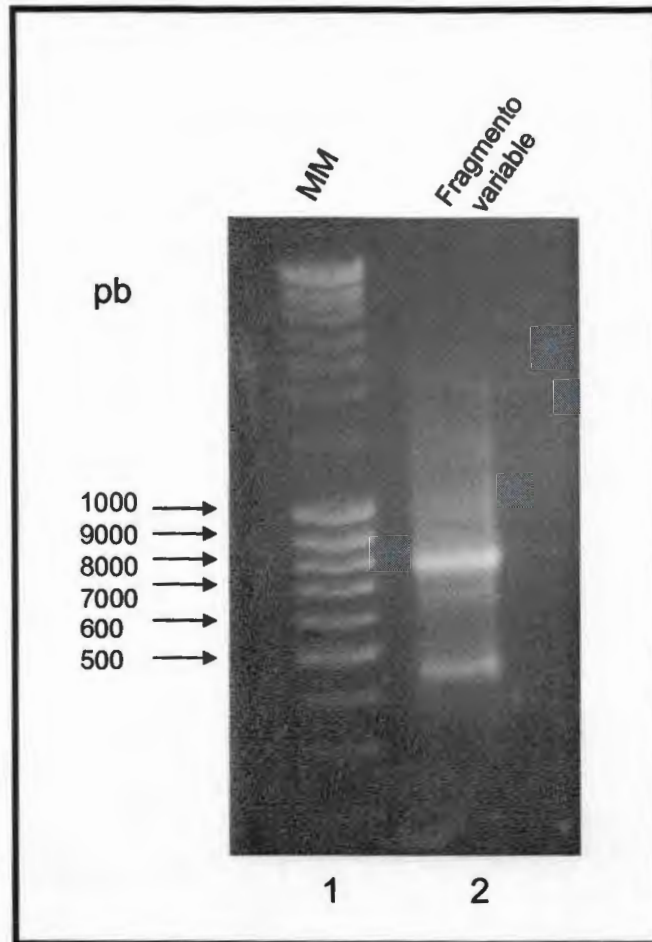


Fig. 6.3 Traslape y extensión de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras. Para el traslape y extensión de las cadenas se mezclaron 100 ng del producto de PCR para cadenas pesadas y ligeras y se desarrolló una PCR, los productos se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, Marcadores de masa molecular; carril 2, amplificación del fragmento variable. Las flechas y los números de la izquierda representan la masa molecular en pb.

Una vez que se logró el traslape y extensión de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, de igual manera se realizaron ocho reacciones de PCR para obtener un mayor cantidad del producto. Posteriormente, se purificó el fragmento amplificado y se realizó la digestión del fragmento y la del vector pcomb3x con *Sfi* 1 para llevar a cabo las pruebas de ligación.

Primeramente se realizaron varias pruebas de ligación a baja escala, antes de realizar la ligación a mayor escala y la transformación. Cuando se obtuvo un número de ufc/ μ g de DNA de 1×10^8 , se procedió a realizar la ligación a gran escala y todos los pasos siguientes que involucran, la amplificación de las células transformadas y las rondas de selección y amplificación de los fagos que despliegan el fragmento variable contra E2F (ver Materiales y Métodos).

Cuando se obtuvo la tercera ronda de selección de los fagos que despliegan el fragmento variable, se decidió realizar una prueba de Elisa contra el péptido de E2F y con esta misma tercera ronda de selección se infectaron células top10f' y se evaluó la afinidad del anticuerpo expresado contra E2F de 96 clonas infectadas. Como se puede observar en la Figura 6.4, los anticuerpos desplegados en los fagos presentan diferente grado de reconocimiento contra el péptido diseñado para E2F. Con base a estos resultados obtenidos, se seleccionaron las clonas que expresan los anticuerpos con un mayor reconocimiento hacia el péptido contra E2F.

Posteriormente, seleccionamos la clona 5 (Figura 6.4, carril 1*) para continuar con la expresión y purificación de los anticuerpos expresados en células top10f'. Como se puede observar en la Figura 6.5, se logró la purificación de los anticuerpos expresados en las células top10f' contra el péptido de E2F.

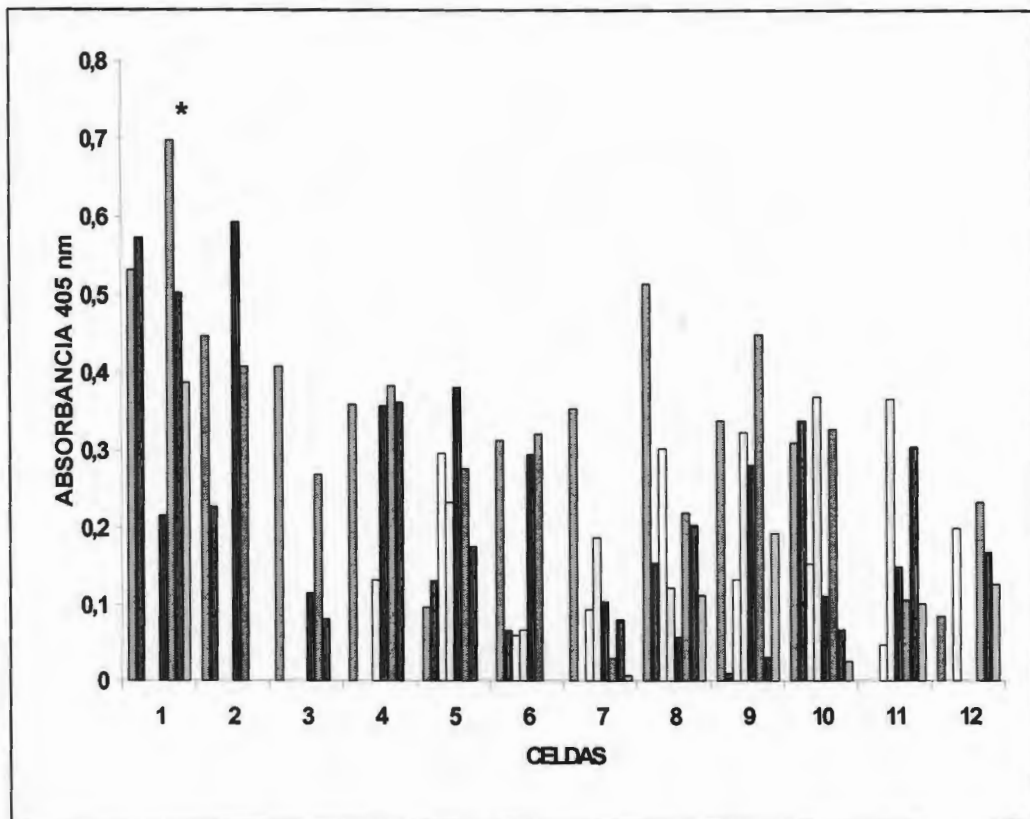


Fig. 6.4. Perfil de afinidad de los anticuerpos en células top 10f' infectadas con los fagos que despliegan el fragmento variable. Los niveles de reconociendo del fragmento variable se determinaron con una prueba de ELISA. Las barras representan las 96 clonas seleccionadas.

En base a todos los resultados obtenidos, podemos concluir que: se logró generar una librería de anticuerpos monoclonales específicos para el péptido de E2F que corresponde a una parte de la región de unión al ADN del factor de transcripción. Es de notarse que las clonas expresan los anticuerpos con diferentes grados de afinidad

por el péptido. Se logró la purificación de los anticuerpos expresados en células top10f'.

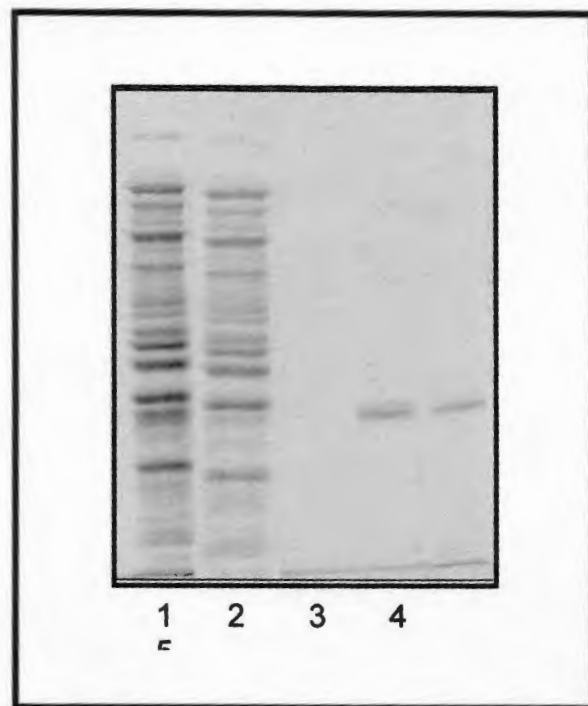


Fig. 6.5 Purificación de los anticuerpos expresados. Las células fueron incubadas en amortiguador de lisis. Posteriormente los extractos bacterianos fueron pasados a través de una columna de afinidad de agarosa-níquel. Los productos recuperados de la columna, fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12 % y tenido con una solución de azul de Coomassie. Carril 1, Extracto total; Carril 2, remanente; Carril 3, 4 y 5, 1^a, 2^a, y 3^a elución.

6.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbas CF. 1993. Recent advances in phage display. *Curr. Opin. Biotech.* **4**;526-530.

Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz DHA. 1988. *Escherichia coli* Secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**;1041-1043.

Griffiths AD. 1993. Production of human antibodies using bacteriophage. *Curr. Opin. Immunol.* **5**;263-267.

Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**;1315-1317.