

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR I DEL GEN DE  
LA GAMMA-GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA

ANA-AURELIA IGLESIAS IGLESIAS

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de Juliol de 2002 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Joaquín Timoneda Timoneda
- Dra. Dña. M<sup>a</sup>Dolores Bernal Membrilla
- Dra. Dña. M<sup>a</sup> Adelaida García Gimeno
- Dr. D. Pascual Sanz Bigorra
- Dr. D. Eulogio Valentín Gómez

Va ser dirigida per:  
Prof. Dr Julio Coloma Contreras

©Copyright: Servei de Publicacions  
Ana-Aurelia Iglesias Iglesias

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5596-2

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular*  
*FACULTAT DE FARMÀCIA*  
*UNIVERSITAT DE VALÈNCIA*

# **ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GAMMA-GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA**

Memoria que, para optar al grado de  
Doctora en Farmacia, presenta:

Ana-Aurelia Iglesias Iglesias

Dirigida por:

Dr. Julio Coloma Contreras

Valencia, a 27 de febrero 2002.



Dr. Julio Coloma Contreras, Profesor Titular del *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València*

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada:

**“ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GAMMA-GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA”**, que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. Ana-Aurelia Iglesias Iglesias, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que así conste a los efectos oportunos de la interesada, se expide la presente certificación

En Valencia, a 27 de febrero de 2002.



La autora ha disfrutado de una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) de la *Conselleria de Cultura, Educació i Ciència* de la *Generalitat Valenciana*.



A mi familia.

A la memoria de mi abuelo.



Agradezco al Dr. Julio Coloma Contreras la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral y de conocer de cerca ese mundo que es la Ciencia.

Otra persona a la que no puedo dejar de nombrar es a la Dra. M<sup>a</sup> Adelaida García Gimeno, a la cual debo agradecer el haber guiado mis primeros pasos en la investigación; gracias por tu buen humor, tu ejemplo de dedicación y de saber hacer.

También les doy las gracias al resto de compañeros, profesores y doctorandos, del *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular* de la *Facultat de Farmàcia*, sobre todo a aquellas personas sin cuya ayuda ni buenos consejos no podría “sobrevivir” un estudiante de doctorado e investigador en ciernes, y muy en especial a la gente que me ha ofrecido su amistad. No puedo dejar de mencionar a Concha, Joana y Joan, cuya valiosa ayuda es imprescindible en la labor de despacho y en el laboratorio.

Quiero dar las gracias al Dr. Peter B. Becker, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo de la EMBL de Heidelberg, pues fue verdaderamente una ocasión única de trabajar en un ambiente completamente distinto. También quiero mostrar mi agradecimiento al Dr. Edgar Bonte, por su extrema amabilidad y su paciencia a la hora de enseñarme los más pequeños detalles en el estudio de la cromatina; por sus buenos consejos y su simpatía. No puedo olvidar aquí al resto de compañeros del grupo del Dr. Becker, ni tampoco al resto de investigadores y estudiantes del programa de *Gene Expression*, entre ellos a Christine, sin cuya valiosa ayuda no hubiera podido resolver algunos problemas. Finalmente, muchísimas gracias a Josefa, por su amistad y por su inestimable ayuda en los peores momentos.

También quiero darle las gracias al Dr. Gérard Siest por haber permitido que trabajara en el *Centre du Médicament* y en especial al Dr. Athanase Visvikis y a la Dra. Maria Wellman-Rousseau, a quienes debo agradecer su interés por mi trabajo y su amabilidad. También quiero agradecer a Haline y a Martine Maître-Boubé su enorme paciencia a la hora de enseñarme y corregirme. Gracias, también, al resto de compañeros del laboratorio: por su ayuda, sus consejos, su alegría, su compañerismo y su amistad. Y especialmente a Antonia, por su amistad y por su infinita amabilidad.

Finalmente, no puedo olvidar en esta página de agradecimientos a mis amigos y familia: gracias por vuestra paciencia a la hora de escucharme, por vuestros consejos, por animarme en los peores momentos, por vuestra fidelidad, por compartir conmigo vuestra experiencia, por señalarme mis defectos y ayudarme a eliminarlos, por vuestro apoyo incondicional, ... GRACIAS A TODOS



# ÍNDICE



# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN.....	1
<b>A. GENERALIDADES.....</b>	<b>3</b>
1. FLUJO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA.....	3
2. EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS: NIVELES DE REGULACIÓN.....	4
2.1 Regulación durante la transcripción.....	4
2.2 Procesamiento del ARNm.....	5
2.3 Regulación durante la traducción.....	5
2.4 Otros puntos de regulación: matriz nuclear; membrana nuclear.....	6
2.5 Integración de los diferentes niveles de regulación.....	6
3. ELEMENTOS <i>CIS</i> : SECUENCIAS REGULADORAS Y ARQUITECTURA DE PROMOTORES.....	7
3.1 Secuencias reguladoras.....	9
3.1.1 Elementos reguladores positivos.....	9
3.1.2 Elementos reguladores negativos.....	10
3.1.3 Secuencias que influyen en la topología del ADN (relación topología / transcripción) y secuencias posicionadoras de nucleosomas.....	10
3.2 Arquitectura de promotores: promotores alternativos.....	11
4. ELEMENTOS <i>TRANS</i> : FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	12
4.1 Dominios estructurales; tipos y familias.....	13
4.2 Regulación de la actividad.....	14
4.2.1 A nivel transcripcional.....	15
4.2.2 A nivel de la traducción.....	15
4.2.3 Modificaciones post-traduccionales.....	16
4.2.3.1 Fosforilación.....	16
4.2.3.2 Glicosilación.....	18
4.2.3.3 Otras modificaciones.....	19
4.2.4 Otros niveles de regulación.....	20
5. INTERACCIONES ENTRE ELEMENTOS <i>CIS</i> Y <i>TRANS</i> : COMPLEJOS DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	20
6. METILACIÓN DEL ADN.....	22
6.1 Islas CpG.....	23
6.2 Proteínas que reconocen ADN metilado.....	24
6.3 La metilación como un proceso dinámico: desmetilación del ADN.....	24
6.4 Consecuencias de la metilación en la transcripción.....	24
7. CROMATINA.....	27
7.1 Estructura de la cromatina; eucromatina y heterocromatina.....	27
7.2 Cromatina y transcripción: nucleosomas en zonas reguladoras e interacciones entre factores de transcripción y nucleosomas.....	27
7.3 Cromatina y metilación.....	31
8. INTERÉS CLÍNICO DEL ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: DE LA DESREGULACIÓN A LA ENFERMEDAD.....	32
<b>B. LA GAMMA-GLUTAMILTRANSPEPTIDASA (GGT) .....</b>	<b>34</b>
1. IMPLICACIONES METABÓLICAS DE LA GGT.....	34

1.1 Papel fisiológico de la GGT.....	34
1.2 Distribución tisular.....	40
2. INTERÉS EN CLÍNICA.....	42
2.1 Patologías por alteración en la expresión de la GGT.....	42
2.2 Uso como marcador clínico de diversas patologías hepáticas, neoplasias y alcoholismo.....	42
3. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA GGT.....	44
3.1 La familia génica de la GGT humana.....	44
3.2 La GGT de ratón.....	45
3.3 La GGT de rata.....	46
4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GGT.....	50
5. GGT Y CÁNCER.....	52
6. CONSIDERACIONES FINALES.....	53
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	61
1.1 Cepas bacterianas.....	61
1.2 Líneas celulares.....	61
1.3 Insectos.....	61
1.4 Animales.....	61
2. VECTORES, SONDAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS.....	61
2.1 Vectores.....	61
2.2 Sondas.....	64
2.3 Oligonucleótidos.....	65
3. TÉCNICAS DE CLONAJE.....	68
3.1 Preparación de plásmidos recombinantes y purificación de insertos.....	68
3.2 Preparación de células competentes.....	68
3.3 Transformación de células competentes.....	69
3.4 MINIPREP: Aislamiento rápido de ADN plasmídico.....	69
3.5 MAXIPREP: Obtención de gran cantidad de plásmido puro.....	69
3.6 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	70
3.7 Digestión con enzimas de restricción y ligaciones.....	70
4. METILACIÓN DE CITOSINAS EN LOS DINUCLEÓTIDOS CpG.....	70
5. MARCAJE DE SONDAS Y DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	71
5.1 Marcaje de sondas en el extremo 5'.....	71
5.2 Marcaje de oligonucleótidos.....	72
6. MARCADORES G+A Y C+T.....	73
7. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES A PARTIR DE TEJIDOS.....	73
8. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES.....	74
9. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS: PURIFICACIÓN DE FACTORES NUCLEARES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	75
9.1 Preparación de la muestra.....	75
9.2 Preparación de columnas de Heparina-Sefarosa y de ADN-Sefarosa.....	75

9.3 Cromatografía a través de columnas de Heparina-Sefarosa y de ADN-Sefarosa.....	76
9.4 Preparación de columnas de afinidad con oligonucleótidos sintéticos como ligandos.....	76
9.5 Cromatografía a través de columnas de afinidad.....	78
10. CARACTERIZACIÓN DE INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA.....	78
10.1 Cambio de movilidad en gel (CMG) .....	78
10.2 Ensayos de protección a la digestión por nucleasas: DNasa I y EXO III.....	80
10.3 Entrecruzamiento por luz ultra-violeta (ELUV) .....	84
10.4 Interferencia por metilación.....	84
11. ESTUDIO DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE FACTORES NUCLEARES.....	87
11.1 Fosforilación de proteínas.....	87
11.2 Tratamiento con fosfatasa.....	87
11.3 Estudio de la glicosilación.....	87
12. CROMATINA: Ensamblaje en cromatina con extractos de embriones de <i>Drosophila</i> .....	88
12.1 Preparación de extractos de embriones tempranos de <i>Drosophila</i> .....	88
12.2 Titulación de extractos.....	89
12.3 Ensamblaje de cromatina; digestión con nucleasas; marcaje terminal.....	89
12.4 Marcador del plásmido.....	91
13. OBTENCIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES.....	91
14. TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES.....	91
15. OBTENCIÓN DE ARNm TOTALES. REACCIONES DE RT-PCR.....	92
15.1 Extracción de ARNm totales.....	92
15.2 Reacción de retrotranscripción (RT) .....	93
15.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	94
16. TRATAMIENTOS CON XENOBIÓTICOS.....	94
17. CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	95
17.1 Actividad $\beta$ -galactosidasa.....	95
17.2 Actividad GGT.....	95
17.3 Actividad luciferasa.....	96
18. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	
18.1 Método de Lowry.....	96
18.2 Absorbancia a 280 nm.....	96
18.3 Método de Bradford.....	97
19. TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i> .....	97
20. OBTENCIÓN DE ADN DE CÉLULAS EN CULTIVO.....	99
21. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y DE TRANSFERENCIA A MEMBRANAS.....	99
21.1 Electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 4%.....	99
21.2 Electroforesis en geles de secuencia.....	99
21.3 Electroforesis en geles de SDS/PA.....	99
21.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	100
21.5 Transferencia Western.....	100
21.6 Transferencia de complejos ADN-proteína.....	101
21.7 Transferencia Northern.....	101

## ANEXO I

1. MEDIOS DE CULTIVO, TAMPONES Y SOLUCIONES.....	103
2. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	105
3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS.....	105
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
1. PURIFICACIÓN DE FACTORES NUCLEARES CON ACTIVIDAD DE UNIÓN A LA SECUENCIA DIANA EN EL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GGT DE RATA.....	109
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES NUCLEARES PURIFICADOS.....	130
2.1 ELEMENTOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD DE UNIÓN.....	130
2.1.1 Interferencia por metilación con dimetilsulfato.....	130
2.1.2 Efecto de la metilación de la secuencia en la actividad de unión.....	132
2.1.3 Efecto de la fosforilación de las proteínas en la actividad de unión.....	134
2.2 DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES APARENTES (ELUV).....	137
2.3 INMUNOENSAYOS.....	139
2.3.1 Transferencias Western.....	139
2.3.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las muestras.....	140
2.3.3 <i>Supershift</i> .....	142
2.3.4 Transferencias de complejos ADN-proteína.....	146
2.4 MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES.....	151
2.4.1 Fosforilación-desfosforilación: detección con anticuerpos.....	151
2.4.2 Glicosilación.....	151
2.5 INTERACCIÓN CON CROMATINA.....	153
2.5.1 Estudio del factor GAGA.....	153
2.5.2 Estudio de las interacciones de los factores presentes en las fracciones cromatográficas con la cromatina.....	154
3. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GGT DE RATA.....	162
3.1 TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i> .....	162
3.2 EXPRESIÓN TRANSITORIA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE RATA.....	169
3.2.1 Actividad transcripcional.....	169
3.2.2 Efecto de la metilación.....	169
3.3 EFECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS EN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GGT DE RATA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE RATA.....	174
3.3.1 Actividad GGT en células cultivadas en presencia de GSH, dexametasona o SAM.....	174
3.3.2 Factores nucleares con actividad de unión a la secuencia diana presentes en extractos celulares de las líneas H5-6 y NRK.....	179
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>187</b>
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES NUCLEARES.....	189
ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GGT DE RATA.....	202
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>219</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>223</b>

# ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN / ARNs	Ácido ribonucleico/s
ARNhn	ARN heterogéneo nuclear
BSA	Albúmina de suero bovino
Cf	Competencia fría
CIP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
cfr.	confrontar, compárese
CMG	cambio de movilidad en gel
DMS	dimetilsulfato
DNasa I	dexosirribonucleasa I
DEPC	dietilpirocarbonato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELUV	entrecruzamiento por luz ultravioleta
Exo III	exonucleasa III
fig.	figura
FT / FTs	Factor transcripcional / factores transcripcionales
GGT	gamma-glutamyltranspeptidasa
PA	poliacrilamida
PK-A	Proteín-kinasa A
PM	Pesos moleculares
RNasa	Ribonucleasa
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecil sulfato sódico
vs.	versus
WGA	en inglés, lectina de germen de trigo



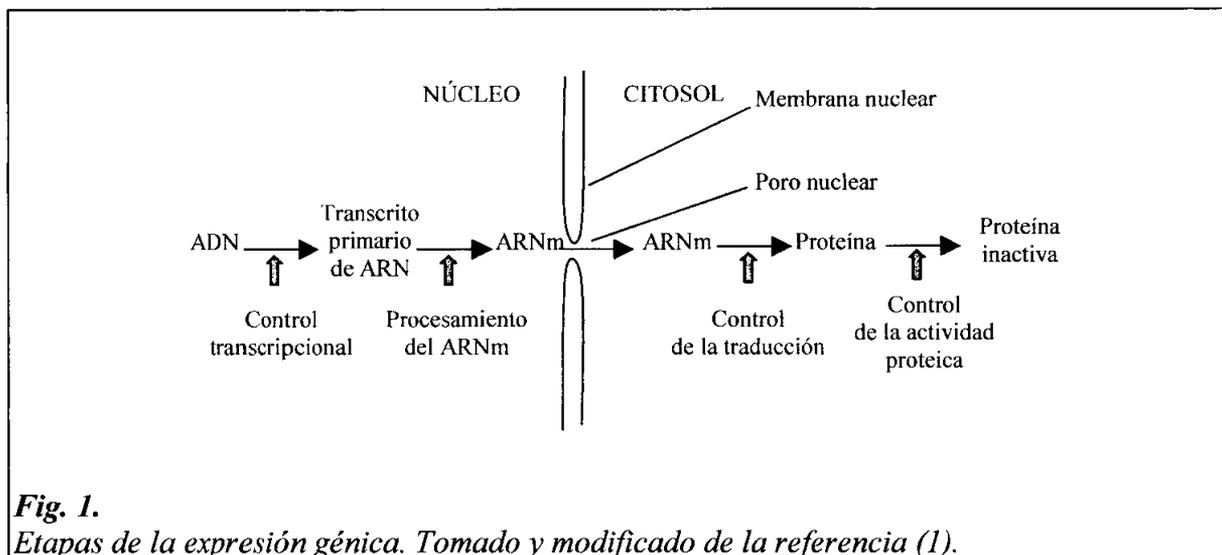
# **INTRODUCCIÓN**



# A. Generalidades

## 1. FLUJO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

El flujo de la información genética es, salvo excepciones, ADN → ARN → proteínas. A esta secuencia de etapas se la llama en conjunto expresión génica (1), y se podría esquematizar de la siguiente manera (fig. 1):



**Fig. 1.**  
*Etapas de la expresión génica. Tomado y modificado de la referencia (1).*

De estas etapas, la transcripción consiste en la generación de moléculas de ARN heterogéneo nuclear (ARNhn) a partir de la secuencia de ADN de la hebra codificadora. Estas moléculas de ARNhn o transcritos primarios sufren, a continuación, una serie de modificaciones en su estructura que llevan a la obtención de ARNms maduros. Estos ARNms maduros se exportan al citoplasma, en donde son traducidos a proteínas. En determinados casos, la transcripción del ADN da origen a moléculas de ARN que ya poseen una función propia en la célula; se trata de los ARNt, los ARNr y los ARN pequeños, éstos últimos forman parte de los “spliceosomas” además de estar implicados en diversos procesos celulares como el transporte de moléculas (1,2).

Cada una de estas etapas está sometida a un control o regulación, ya que la generación del producto de un gen se produce en respuesta a una señal metabólica, nutricional, de estrés, etc., siendo la transcripción el punto de control más importante, puesto que es el momento en el que la célula decide si expresa o no un gen concreto y la tasa de expresión o cantidad de ARNms que va a generar (3). Según Lodish et al. (3), hay que tener en cuenta que la finalidad de la regulación génica difiere entre organismos unicelulares y pluricelulares: en los primeros se produce, principalmente como adaptación a las condiciones cambiantes del medio; en los segundos, la regulación génica se produce en función de un programa de desarrollo, crecimiento y diferenciación, que está al servicio de la supervivencia del organismo pluricelular más que al servicio de las células individuales que constituyen ese organismo.

A continuación, se hace una breve descripción del proceso de expresión génica en eucariotas y de los distintos mecanismos de regulación a los que está sometido este proceso en los genes transcritos por la ARN-polimerasa II, haciendo más hincapié en aquellos puntos que se han estudiado experimentalmente en esta Tesis Doctoral.

## 2. EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS: NIVELES DE REGULACIÓN

El genoma de las células eucariotas posee toda la información necesaria para la expresión de las diferentes proteínas que necesita la célula a lo largo de su ciclo vital. Sin embargo, no todas las proteínas codificadas por los genes se expresan siempre, sino que, cada una de ellas se expresa en el momento y durante el tiempo adecuados. Esta situación se complica aún más en organismos pluricelulares: seres que, salvo algunos órdenes biológicos, están formados por multitud de células que presentan una diversidad de aspecto y de funciones, aún cuando todas poseen la misma información genética ya que derivan todas del mismo cigoto. Así pues, estas células deben expresar determinados grupos de genes, y no otros, durante el desarrollo y crecimiento del individuo; esta expresión diferencial de grupos de genes permite a las células adquirir y desempeñar funciones concretas y no de manera aislada, sino en el contexto de los diferentes tejidos y órganos. La fracción de genoma que una célula eucariota expresa en estas condiciones es una pequeñísima parte del total de información contenida en su núcleo.

Por supuesto, habrá proteínas que encontraremos en todas las células de un organismo, pues forman parte de los ciclos metabólicos generales, mientras que otras proteínas se expresarán de forma específica en un determinado tipo celular, en un momento preciso del desarrollo y crecimiento y/o en una situación fisiológica o patológica concretas. Por lo tanto, la célula debe disponer de unos mecanismos de regulación de los procesos nucleares lo suficientemente exquisitos y exactos como para que una proteína en concreto esté disponible cuando se necesite.

La regulación de la expresión de un gen concreto se puede realizar a distintos niveles:

- \* a nivel de la transcripción;
- \* durante el procesamiento de los ARNm's generados en la transcripción;
- \* a nivel de la traducción.
- \* en otros puntos de control, como son las interacciones del ADN con la matriz nuclear o el transporte a través de la membrana nuclear.

### 2.1 Regulación durante la transcripción

Las características fenotípicas de una célula, así como las acciones que realiza y sus propiedades, vienen condicionados por la diferente transcripción de los diversos genes que posee (3). La regulación a nivel del inicio de la transcripción se considera una de las principales formas de control de la expresión génica que poseen las células. Por “inicio de la transcripción” se entiende el ensamblaje de la maquinaria transcripcional, en concreto de la instalación de la ARN-polimerasa II en el promotor (4).

Esta regulación se debe a la acción de factores transcripcionales (FT) de diversa naturaleza y función (factores *trans*) y a la presencia de secuencias reguladoras de ADN

actuando en cis (compuestas, a su vez, de muchos elementos diana individuales reconocidos por estos FTs) (3). El efecto de la combinación de estos diferentes factores (elementos *cis* y factores *trans*) resulta en el aumento o disminución neto de la tasa de transcripción de un gen dado (5). Además, estas interacciones de los FT con sus secuencias consenso se pueden ver moduladas por la existencia de una serie de señales o situaciones metabólicas (3).

Tanto las secuencias *cis* como los factores *trans*, así como las interacciones entre ambos, se desarrollarán con más detalle en los siguientes apartados.

## **2.2 Procesamiento del ARNm**

El producto inicial de la transcripción se denomina pre-ARNm en eucariotas, ya que debe ser procesado antes de ser empleado por la célula como molde para la generación de una proteína. El procesamiento del ARNm tiene lugar en el núcleo e implica las etapas de introducción del “cap”, el corte y empalme y la edición. Previamente, y durante la etapa de terminación de la transcripción, el ARNm sufre ya una modificación en la que una endonucleasa corta de 10 a 30 nucleótidos de una secuencia específica situada en el extremo 3' y una polimerasa especial introduce una cola de poli(A), que puede tener una longitud de hasta 200 pb (2).

De todas las etapas de procesamiento, el corte y empalme (*splicing*) consiste en la eliminación de los intrones presentes en la molécula de pre-ARNm merced a la acción de los “spliceosomas”. Se habla de corte y empalme alternativos cuando se incluyen o excluyen ciertos exones durante este proceso de corte y empalme, en los diferentes tejidos o estados de desarrollo; esta situación permite que las células dispongan de una gran variedad de proteínas a partir de la transcripción de un sólo gen. Esta variedad se muestra en la estructura de la proteína, al poseer o no diferentes dominios, y se refleja en la actividad, funcionalidad, localización, vida media, etc. de las diferentes isoformas generadas. En este punto cabe señalar la existencia de promotores alternativos para un gen concreto, los cuales generan, por este proceso de corte y empalme alternativos, ARNms que, independientemente del corte y empalme que ocurra en la zona codificadora, difieren en su extremo 5'. En el subapartado 3.2 se tratará con más profundidad de la existencia de promotores alternativos y sus implicaciones en la expresión de un gen (2).

Finalmente, el ARNm procesado será exportado al citosol, en donde será traducido.

## **2.3 Regulación durante la traducción**

Secuencias presentes en las regiones 5' y 3' de los ARNms, así como las modificaciones en estas zonas, tienen un papel en la estabilidad, mecanismos de exploración o rastreo de los ribosomas y traducción de las moléculas de ARNm (6). Por ejemplo, en la región 3', la cola poli(A) parece influenciar la iniciación de eventos en la zona 5' (2). Otros fenómenos que pueden regular el proceso de traducción son la unión de proteínas a motivos cercanos al “cap” (2) o la presencia de marcos de lectura abiertos cortos, llamados SORFs (*short open reading frames*) (6).

## **2.4 Otros puntos de regulación: matriz nuclear; membrana nuclear**

La interacción del ADN con la matriz nuclear o el transporte a través de la membrana nuclear constituyen otros de los puntos susceptibles de regulación y que pueden afectar a la expresión de un gen concreto.

Respecto a la matriz nuclear, se trata de una estructura que incluye el armazón laminar que reviste la parte interna de la membrana nuclear y la red de fibras que parecen extenderse hacia el interior del núcleo (2). Cuando se realiza un tratamiento con un detergente específico (que elimina las histonas y otras proteínas, pero, que mantiene las uniones del ADN a la matriz nuclear) y se digiere el ADN con enzimas de restricción, se obtienen fragmentos específicos de ADN unidos a esta matriz, los cuales están separados a intervalos bastante grandes en el genoma y poseen las llamadas regiones de unión a la matriz (*MARs: matrix attachment regions*). Parece ser que grupos de genes que se expresan coordinadamente se encuentran agrupados entre MARs adyacentes, es decir, que se encuentran situados en lazos de ADN que se unen a la matriz por los MARs. Se ha propuesto que esta organización en lazos podría estar implicada en el control de la expresión de genes relacionados (2).

Entre las proteínas que se han encontrado formando parte de esta matriz nuclear están las topoisomerasas, las cuales se supone que podrían estar implicadas en cambios del superenrollamiento del ADN, quizás necesarios para procesos como la condensación de la cromatina, la replicación y la transcripción (2).

En cuanto a la membrana nuclear, los poros nucleares constituyen otro punto crítico a la hora de regular el metabolismo nuclear, no sólo porque los ARNm deben salir al citoplasma para ser traducidos, sino porque todas las proteínas implicadas en procesos nucleares son sintetizadas fuera del núcleo y deben entrar en él para desempeñar sus funciones. La membrana nuclear posee unas características de permeabilidad peculiares, de manera que determinadas moléculas pequeñas son capaces de atravesarla por difusión pasiva, mientras que otras requieren un transporte activo. Parece ser que las proteínas nucleares poseen una señal de localización nuclear, que es la que posibilitaría la unión con un receptor citoplasmático, seguido de la interacción con el poro nuclear y posterior translocación o entrada al núcleo. Diferentes vías de transducción de señales estarían implicadas en el acceso de los complejos proteína nuclear-receptor al poro (7).

Para el caso de los ARNm, se supone que todos salen por mecanismos de transporte activo. Se ha planteado, entre otras hipótesis, un posible papel de las estructuras “cap” en el transporte al citoplasma.

## **2.5 Integración de los diferentes niveles de regulación**

Hay que tener en cuenta que todos estos puntos de modulación de la actividad transcripcional actúan conjuntamente y no aisladamente, de manera que una señal intracelular desencadenada ante eventos extracelulares puede afectar a varios de estos procesos, o bien, la combinación de diferentes señales actúa sobre una misma etapa, llevando, en todos los casos, a la activación, represión, aumento o disminución de la expresión de un gen.

Así pues, en organismos eucariotas, la transcripción del ADN en ARNm está sometida a una compleja y precisa regulación, tanto durante el desarrollo como a lo largo de

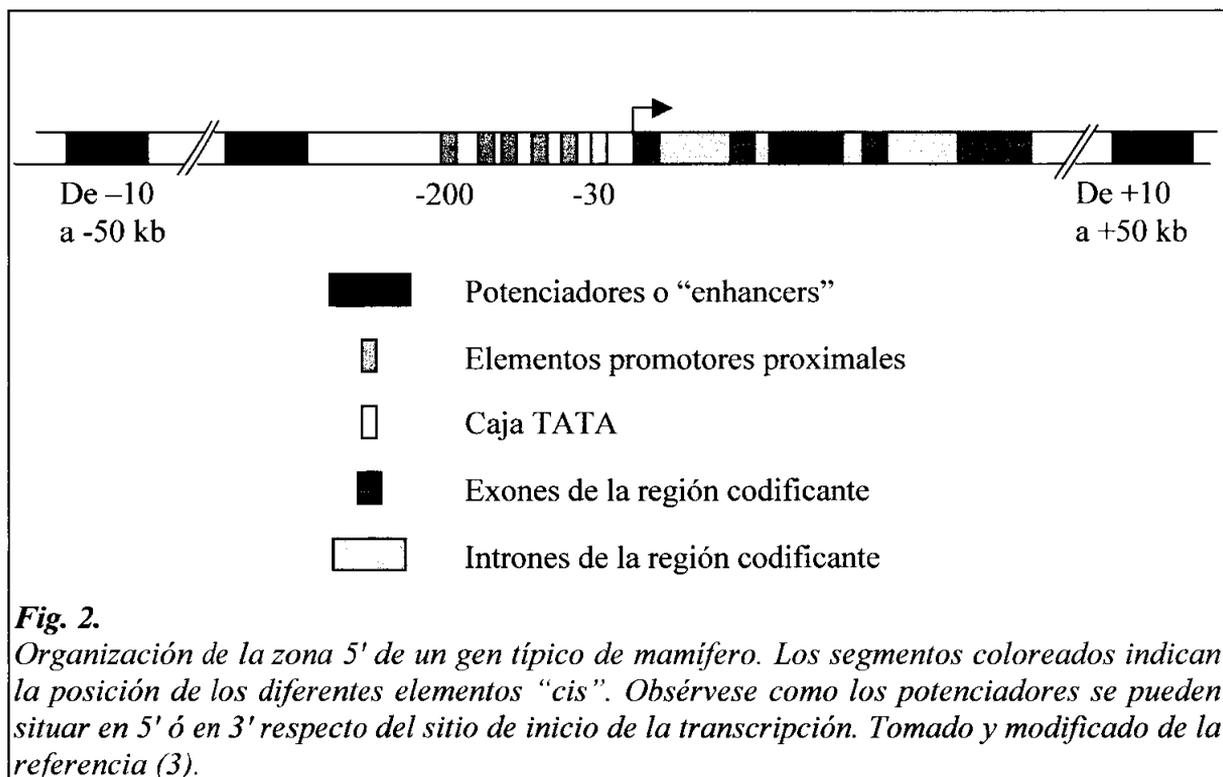
la etapa adulta. Esta regulación posibilita la generación y mantenimiento de diferentes tipos celulares que, a su vez, originan distintos tejidos y órganos que se interrelacionan entre sí y con el medio externo.

### 3. ELEMENTOS *CIS*: SECUENCIAS REGULADORAS Y ARQUITECTURA DE PROMOTORES

Como ya se ha indicado en el subapartado 2.1, uno de los factores implicados en el control de la transcripción son los elementos *cis* o secuencias nucleotídicas con actividad reguladora.

En general, se suele decir que la estructura básica de un gen consta de una región reguladora proximal o promotor y una región codificante. Además, se pueden encontrar secuencias reguladoras distales (potenciadoras o represoras), normalmente en posición 5', aunque también se han descrito en 3' al gen que regulan e incluso dentro de secuencias intrónicas.

En la figura 2 se muestra un posible esquema de una zona promotora con algunos de los elementos citados.



Schibler y Sierra definen los promotores como “secuencias de ADN que permiten a la ARN-polimerasa unirse e iniciar la polimerización de ribonucleótidos” (5), aunque consideran que los promotores eucarióticos para la ARN-polimerasa II no pueden ser

reconocidos por la ARN-polimerasa sin la presencia de otros factores transcripcionales auxiliares (8).

Los promotores eucariotas consisten en secuencias de ADN dispersas a lo largo del genoma, más o menos largas, las cuales son reconocidas por una gran variedad de proteínas que se unen al ADN y que regulan el proceso de la transcripción. A la hora de comprender la regulación específica de tejido y/o específica de tiempo o de fase del ciclo celular, interesa conocer:

**1)** qué secuencias *cis* (secuencias de ADN) y qué factores *trans* (factores de transcripción, FT) se requieren para la regulación de un gen concreto;

**2)** cómo una serie de interacciones ADN-proteína regulan la expresión de un gen específico de tejido; y

**3)** cómo estas interacciones concretas se integran en el conjunto de la regulación de la expresión génica durante el desarrollo (9). En este sentido hay que considerar que cada promotor es un caso único e individual, en el que el peso de cada uno de los mecanismos de regulación de la expresión tienen una mayor o menor importancia, de manera que la expresión de un gen concreto viene dada por la puesta en marcha de unos u otros mecanismos.

Los promotores eucarióticos están constituidos por un cierto número de elementos *cis*: elementos que unen FTs generales o ubícuos (cajas CCAAT o CG), secuencias reconocidas por FTs específicos de tejido o de etapa de desarrollo y elementos reguladores que se pueden considerar inducibles (como, por ejemplo, los elementos de respuesta a hormonas o a shock térmico) (5). Generalmente, estos elementos se encuentran situados cerca del lugar de inicio de la transcripción, más bien adyacentes a este sitio, por lo que se suelen denominar elementos proximales. Otras secuencias, como las secuencias potenciadoras o silenciadoras, pueden encontrarse a varias Kb de este punto de inicio de la transcripción, ejerciendo, por tanto, su efecto a una distancia considerable (10): son los denominados elementos distales.

Ayoubi y van de Ven señalan la existencia de tres posibles vías por las que un organismo puede controlar la expresión de un gen dado (11):

**1)** concentrar todos los elementos reguladores *cis* en una región promotora, los cuales responderían a diferentes estímulos;

**2)** duplicar el gen, generando copias que poseen cada una su propia región reguladora o promotora, de manera que cada uno respondería a diferentes señales; y

**3)** generar diferentes lugares de iniciación de la transcripción, cada uno de ellos con sus propias secuencias reguladoras en respuesta a distintas señales, es decir, múltiples promotores regulados de manera independiente.

Aunque un único promotor puede ser suficiente para la expresión de un gen, como ocurre en los denominados genes domésticos (12), realmente, la situación es bastante más compleja, de manera que podemos encontrar:

\* Varios genes bajo el control de un mismo promotor. Es el caso de los genes humanos (COL4A1 y COL4A2) y murinos de la molécula del colágeno IV (13): los genes se encuentran orientados cabeza-cabeza y se transcriben en orientaciones opuestas. Seguramente, el principal motivo de esta disposición sea la transcripción sincronizada y equilibrada de los productos de los genes afectados.

\* Un gen controlado por varios promotores. Se trataría de genes que han de expresarse de manera específica en un tejido, en un momento del ciclo celular o del desarrollo, o que responden a señales diferentes en la misma célula o a la misma señal en tipos celulares distintos, requiriendo diferentes combinaciones de FTs más o menos específicos y, por tanto, de una batería de secuencias reguladoras que, quizás, no podrían ser acomodadas en una misma región promotora. Otra explicación posible es evitar o minimizar los efectos de mutaciones en regiones promotoras, que podrían afectar de manera grave al desarrollo celular (11). En general, el resultado final es la obtención de ARNms que difieren en su región 5' no traducida o no codificante.

### **3.1 Secuencias reguladoras**

Lodish et al. consideran varios tipos de regiones reguladoras: aquellas que contienen caja TATA, las que poseen un elemento llamado Iniciador en lugar de caja TATA y genes que no poseen ninguno de estos dos elementos (3).

#### **3.1.1 Elementos reguladores positivos**

Se podrían definir como aquellas secuencias que activan o aumentan la transcripción del gen o genes que controlan. Como elementos promotores proximales (3) podemos citar:

\* La caja TATA. Es una secuencia situada en posición 5', a unos 30 pb del sitio de inicio de la transcripción (+1). Se le atribuye la capacidad de posicionar a la ARN-polimerasa II para que inicie la transcripción. Se ha observado que el primer nucleótido de la síntesis de ARN suele ser una A en el 50% de los casos.

\* El Iniciador. Es un elemento presente en muchos genes que carecen de caja TATA. La secuencia consenso propuesta para este elemento es: PyPyAN(T/A)PyPy, en donde Py representa una pirimidina (C o T) y N representa a cualquiera de las cuatro bases. También aquí se encuentra una A en el sitio +1 de inicio de la transcripción. Se ha relacionado la secuencia nucleotídica que rodea el lugar +1 con la fuerza promotora de la transcripción de la región considerada.

\* Las cajas CG. Consisten en secuencias de unos 20-50 pb ricas en CG y suelen denominarse "islas CG". Se sitúan a 100-200 pb del lugar de inicio de la transcripción de genes que carecen de caja TATA o Iniciador. Dada la baja frecuencia de los dinucleótidos CG en el genoma de vertebrados, se considera que la presencia de estas secuencias ricas en CG en posición 5' al lugar de inicio de la transcripción no es debida al azar.

Por otro lado, también existen elementos reguladores distales, alejados varias Kb (a veces, situados a 40 ó 50 Kb del promotor que controlan). Los llamados enhancers o potenciadores se pueden encontrar tanto en 5' al promotor que regulan, como en intrones o,

incluso, en 3' a la región codificante del gen. Generalmente suelen ser específicos de tipo celular y están compuestos de varios elementos que contribuyen a la actividad total del potenciador (3).

### **3.1.2 Elementos reguladores negativos**

No sólo encontramos secuencias reguladoras positivas de la tasa de transcripción, sino también secuencias que reprimen la transcripción. La represión transcripcional en eucariotas se consigue a través de los denominados “silenciadores”, de los cuales hay dos tipos: los elementos silenciadores y los elementos reguladores negativos. Los primeros son elementos que desencadenan mecanismos de represión activa independientemente de su posición; los elementos reguladores negativos son elementos dependientes de posición que dirigen mecanismos pasivos de represión. Pueden estar situados en 5' ó en 3', en intrones o en exones (4).

Aunque en algunos promotores los silenciadores sólo actúan a modo de interruptores de los potenciadores o parecen desempeñar un papel mínimo en los niveles de expresión, los silenciadores constituyen una parte intrínseca de los promotores y no hay que olvidar que la represión de la transcripción juega también un papel importante en la expresión espacial y temporal de los genes (4).

Hoy día se considera que son los silenciadores por sí mismos y su contexto dentro de un promotor dado, los que determinan el mecanismo de represión, más que los factores represores. Estos factores represores son una serie de FTs que interactúan con las secuencias silenciadoras. Parece ser que la mayoría de estos factores represores son, en realidad, FTs con doble función: es decir, que pueden actuar como activadores y como represores. Se han descrito varios mecanismos para explicar esta doble función: en unos casos parece deberse a la naturaleza de la secuencia de unión y de las secuencias del entorno; en otros casos esta doble actividad estaría en función de la concentración del FT considerado (4).

Los ejemplos de silenciadores son numerosos; uno de ellos son los USR (*upstream repression sequences*), secuencias de unión para represores transcripcionales específicos descritos en levaduras, los cuales ejercerían su acción sobre la expresión del gen que controlan de forma directa (por ejemplo, interfiriendo la unión de factores activadores) o indirecta (reclutando, por ejemplo, actividades histona-desacetilasa) (14).

En este apartado cabe citar también elementos reguladores como los *insulators*, represores que actúan a larga distancia bloqueando interacciones inadecuadas entre elementos *cis* y ciertos promotores (4).

### **3.1.3 Secuencias que influyen en la topología del ADN (relación topología / transcripción) y secuencias posicionadoras de nucleosomas**

Las secuencias de ADN no sólo están implicadas en la regulación de la expresión en cuanto a alineamientos de determinadas bases que son reconocidas por FTs, sino también en cuanto a su influencia en la topología de la doble hélice: la estructura tridimensional del ADN también juega un papel importante en la regulación de la transcripción. Recientemente,

Pedersen et al. (15) analizaron secuencias de promotores humanos para la ARN-polimerasa II mediante el modelo probabilístico de los HMMs (*hidden Markov models*) y encontraron que la capacidad de flexión del ADN en regiones situadas antes y después del lugar de inicio de la transcripción, dependía más de la estructura secuencial que de la composición nucleotídica, observando una diferencia en la frecuencia de distribución de determinados tripletes. Estos autores proponen una serie de modelos en los que secuencias o regiones muy flexibles posicionan nucleosomas en la zona situada por debajo del lugar de inicio de la transcripción, considerando también la posibilidad de interacciones de estas secuencias con factores como los hTAF<sub>II</sub>80, hTAF<sub>II</sub>31 y hTAF<sub>II</sub>20 (factores asociados a la proteína TBP), los cuales se asemejan estructuralmente a histonas. De esta manera, sugieren que los promotores pueden formar dos tipos de complejos estructuralmente similares: con histonas (por tanto, transcripcionalmente reprimidos) y con TFIID (potencialmente activos) (16). Esta idea se basaría en la descripción de FTs que son capaces de curvar o flexionar la doble hélice (17,18), además de los FTs con motivos estructurales similares a los de proteínas histonas (19).

Varios autores señalaron la existencia de secuencias más o menos fuertemente posicionadoras de nucleosomas. Se trata de secuencias que, por la curvatura intrínseca o por la flexibilidad que poseen, se incorporan preferentemente en nucleosomas, ya que cuesta menos energía enrollar estas secuencias de ADN en torno al octámero de histonas (21). También se ha observado que la elevada repetición de ciertos tripletes de nucleótidos crea zonas preferentes de ensamblamiento de nucleosomas, de manera que la eficiencia en la formación de estos nucleosomas aumenta conforme aumenta el tamaño de las repeticiones; además, la estructura de cromatina que se forma es especialmente estable (22).

Por otro lado, se han descrito secuencias de tipo microsatélite (STMS, *simple tandem repeat microsatellite*) en plantas y en *Drosophila* que atenúan la expresión génica (20).

### 3.2 Arquitectura de promotores: promotores alternativos

La presencia de promotores alternativos posibilita una gran flexibilidad a la hora de modular la expresión de un gen concreto, ya que influiría en (11):

1) La expresión temporal del gen. La existencia de diferentes promotores para un gen sería una de las formas de controlar, a lo largo del desarrollo y del crecimiento, la activación e inhibición de este gen en distintas células y en diferentes situaciones, momentos y magnitudes.

2) El nivel de expresión, cuando los promotores tienen diferente potencia o fuerza.

3) La especificidad de la expresión y la capacidad de respuesta a diferentes señales intra y/o extracelulares. Esto se conseguiría con promotores que contienen secuencias de unión para FTs diferentes y/o específicos de órgano, tejido o tipo celular.

4) La estabilidad del mensajero y la eficiencia de la traducción del mensajero. Se ha comprobado que diversas circunstancias generan problemas en la traducción o incluso llegan a inhibirla, como por ejemplo: la presencia de regiones 5' no traducidas muy largas (quizás con distintas estructuras secundarias), la presencia de exones líder ricos en GC (23) y la

existencia de codones de iniciación de la traducción y marcos de lectura abierta cortos (SORFs). En este último caso, la frecuencia de aparición de los codones AUG es baja (24), lo que hace suponer que no es fortuita y que, como ya se señaló en el apartado 2.3, debe tener alguna función en el control de la traducción.

5) La estructura de la región amino-terminal de la proteína codificada, generando diversas isoformas que presentarían variaciones en cuanto a su estructura, función, etc., es decir, en este caso la presencia de promotores alternativos generaría diversidad. Esto se produciría en aquellos promotores alternativos que contienen secuencias codificadoras.

Esta flexibilidad en el control de la expresión de un gen se produce tanto en organismos unicelulares (los cuales pueden adaptar, de esta manera, la expresión de un gen a las condiciones nutricionales del medio) como pluricelulares (en los que la existencia de promotores múltiples se asocia, generalmente, con genes específicos de tejido o de estado de desarrollo) (5). No sólo se obtiene una expresión cualitativamente diferencial, sino, también cuantitativamente distinta (5). En general, el producto final del gen no difiere de un tipo de ARNm a otro, es decir, la estructura primaria de la proteína no se ve afectada por el uso de sitios de inicio de la transcripción alternativos, ya que el codón de inicio de la traducción suele encontrarse en un exón común; sin embargo, también hay excepciones descritas a este respecto, como, por ejemplo, en el gen de la cadena ligera de la miosina (25,26) en donde se obtienen dos proteínas como resultado de un proceso de transcripción y corte y empalme diferenciales de un único *locus*.

Se han descrito diferentes modelos para explicar la generación de promotores alternativos múltiples a lo largo de la evolución (5):

- \* por mutaciones puntuales y/o pequeñas deleciones o inserciones delante o detrás del promotor inicial;
- \* adquisición de un segundo promotor por transposición, translocación o inversión;
- \* duplicación del promotor, seguida de diversificación; y
- \* deleción de una de las copias del gen.

#### 4. ELEMENTOS *TRANS*: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Por FT se entiende aquella proteína reguladora que, bien al interactuar con el ADN (uniéndose a elementos *cis*), o bien por interacciones proteína-proteína (en el caso de proteínas puente que interactúan con otras proteínas previamente unidas al ADN, participando en la formación de complejos proteicos transcripcionales), actúa sobre el proceso de transcripción, generalmente estimulándolo o activándolo (3). El conocimiento de la relación estructura/función y de las relaciones entre FTs y los genes que regulan puede permitir el entendimiento del conjunto de mecanismos moleculares que controlan la expresión de genes (9).

En eucariotas, los factores nucleares reguladores se unen a secuencias diana, tanto en 5' como en 3', que muchas veces están alejadas del lugar de inicio de la transcripción. Pueden unirse al ADN como monómeros, homodímeros o heterodímeros; en este último caso se aumenta considerablemente la capacidad reguladora al permitir la combinación de diversos dominios reguladores.

Los factores nucleares implicados en la transcripción de un gen se pueden clasificar en:

1) ARN-polimerasas, siendo la tipo II la responsable de la transcripción de todos los genes eucarióticos que codifican proteínas, además de la transcripción de cuatro ARNs pequeños implicados en el corte y empalme de ARNms. Las otras dos polimerasas transcriben los genes que codifican para el resto de ARNs pequeños (para muchos de los cuales se desconoce su función), los ARNr (pre-ARNr y el ARNr 5S) y los ARNt (3).

2) Factores transcripcionales generales, es decir, proteínas reguladoras implicadas en la formación del complejo de iniciación de la transcripción como: TBP (*TATA-binding protein*), los TAFs (*TBP-associated factors*), etc.. Otros FTs más o menos generales y necesarios para la iniciación de la transcripción son los llamados coactivadores, como CBP/p300.

3) Factores transcripcionales específicos, no sólo de genes, sino, incluso de tipo celular.

Los factores transcripcionales generales y los específicos se pueden clasificar según su actividad en represores, activadores y proteínas adaptadoras o puente.

Aunque muchos de los FTs implicados en el ensamblaje de la maquinaria transcripcional basal sólo poseen un papel estructural, de otros se sabe que poseen actividad enzimática. Esta actividad es necesaria para el inicio de la transcripción (4).

Los FTs son proteínas que, generalmente, emplean diferentes dominios para la unión al ADN y para la activación o represión de la transcripción. Como se desarrolla en el punto siguiente, según los motivos estructurales de unión al ADN se agrupan en varias familias.

#### **4.1 Dominios estructurales; tipos y familias**

Los FTs suelen clasificarse en base a los motivos estructurales que constituyen sus dominios de unión al ADN. En muchos casos, las interacciones entre las proteínas y el ADN implican la formación de numerosos contactos de tipo puente de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas; precisamente el hecho de que se produzcan en elevado número, hace que estas interacciones den lugar a uniones específicas y fuertes, a pesar de tratarse de enlaces débiles.

Las principales clases de FTs eucariotas en función de sus dominios estructurales son (3, 9):

\* Proteínas con homeodominios o hélice-vuelta-hélice: se trata de varias hélices  $\alpha$  conectadas por una corta cadena de aminoácidos. La hélice situada en el extremo contacta con el surco mayor del ADN, recibiendo el nombre de hélice de reconocimiento. Muchas de las proteínas que muestran este tipo de dominio forman dímeros. Las proteínas con homeodominios poseen una secuencia de unos 60 aminoácidos que está altamente conservada en los genes llamados homeóticos, los cuales juegan un papel crucial en el desarrollo de organismos eucariotas.

\* Dedos de zinc: estas proteínas contienen residuos del tipo cisteína e histidina coordinando un átomo de zinc, de modo que forman una estructura similar a un dedo que interacciona con el ADN. Dependiendo del número de residuos de cisteína implicados se han descrito tres clases: clase I o C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, clase II o C<sub>4</sub>, clase III o C<sub>6</sub>.

\* Proteínas con hélices aladas: se trata del dominio de unión descrito para la histona H5. Se ha encontrado en FTs como HNF3, el cual posee tres hélices  $\alpha$  en su extremo amino-terminal (una de las cuales interacciona con el surco mayor del ADN) junto con una lámina  $\beta$  (formada por tres segmentos  $\beta$ ), diversos bucles y un ión Mg<sup>2+</sup> coordinado que estabiliza la estructura. Generalmente, los FTs con este tipo de dominio se unen al ADN como monómeros (27).

\* Cremalleras de leucina: este tipo de dominio combina las dos funciones de unión al ADN y de dimerización. En este caso, dos hélices  $\alpha$ , una de cada monómero, se juntan originando una hélice enrollada, a modo de Y, que interacciona con el surco mayor del ADN. En este caso se pueden encontrar homo y heterodímeros. Un ejemplo lo tenemos en la proteína Gcn4 de levadura (3).

\* Hélice-bucle-hélice: consisten en dos hélices  $\alpha$  unidas por una corta secuencia en forma de bucle, cuya flexibilidad permite a las dos hélices empaquetarse la una contra la otra. Este tipo de dominio está implicado tanto en el establecimiento de contactos con el ADN como en la dimerización. También en este caso se pueden formar homo o heterodímeros. Como ejemplo podemos citar la proteína Max (3).

Hay muchas otras clases de dominios descritas, como *paired box*, *MADS box*, dominios tipo NF-1, etc. Estas clases se han agrupado en superclases y se han dividido en familias y subfamilias, dando lugar a una compleja clasificación de todos los FTs descritos hasta la fecha, (28).

## 4.2 Regulación de la actividad

La modulación o variación de la cantidad, actividad o localización celular de los FTs es una forma importante de control de la iniciación de la transcripción. Cambios en la síntesis y, por tanto, en los niveles totales de un FT dado en respuesta a señales intra o extracelulares (como por ejemplo, el ciclo celular o cambios en la disponibilidad de nutrientes, respectivamente) pueden ser una vía de regulación transcripcional. Sin embargo, autores como Tjian y Jackson (29) indican que la actividad de los FTs se puede controlar de una forma más rápida y, potencialmente, más versátil mediante modificaciones post-traduccionales: se han descrito varios ejemplos de cambios en la actividad transcripcional en ausencia de variaciones de la síntesis de proteínas. Estas modificaciones post-traduccionales pueden actuar: **1)** activando o reprimiendo la unión al ADN o las funciones transactivadoras de los FTs; **2)** afectando la estabilidad de la proteína; o **3)** dirigiendo al FT a una localización subcelular concreta.

En todos los casos, esta regulación se produciría en respuesta a señales de tipo extracelular como, por ejemplo, hormonas, iones, etc. que desencadenan la activación de diferentes vías de transducción de señales, las cuales integran la información recibida

traduciéndola en cambios del metabolismo celular. Estos mecanismos de transducción de señales

son variados y complejos, e incluyen: cascadas de fosforilación; cascadas proteolíticas; y sistemas de regulación mediante segundos mensajeros no proteicos, como fosfolípidos,  $Ca^{2+}$  y nucleótidos cíclicos (p. ej., AMPc) (30).

En resumen, los diferentes niveles o mecanismos de regulación de la actividad de los FT que se han descrito, son:

- \* transcripcionales;
- \* traduccionales; y
- \* post-traduccionales.

Además de otros mecanismos, citados en el punto 4.2.4.

En la figura 3 (siguiente página) se muestra un esquema de algunos de los mecanismos de control de la actividad de los FT nucleares.

A continuación, se describen brevemente los distintos tipos de regulación de la actividad de los FT, revisados y analizados por Calkhoven y Geert (31).

#### **4.2.1 A nivel transcripcional**

En primer lugar, hay que señalar que la variación en la tasa de transcripción de un FT en respuesta a diferentes estímulos, se refleja en un cambio en la cantidad total de ese factor y, en consecuencia, en su disponibilidad. En ciertos casos, algunos FTs parecen autorregular la expresión de sus propios genes.

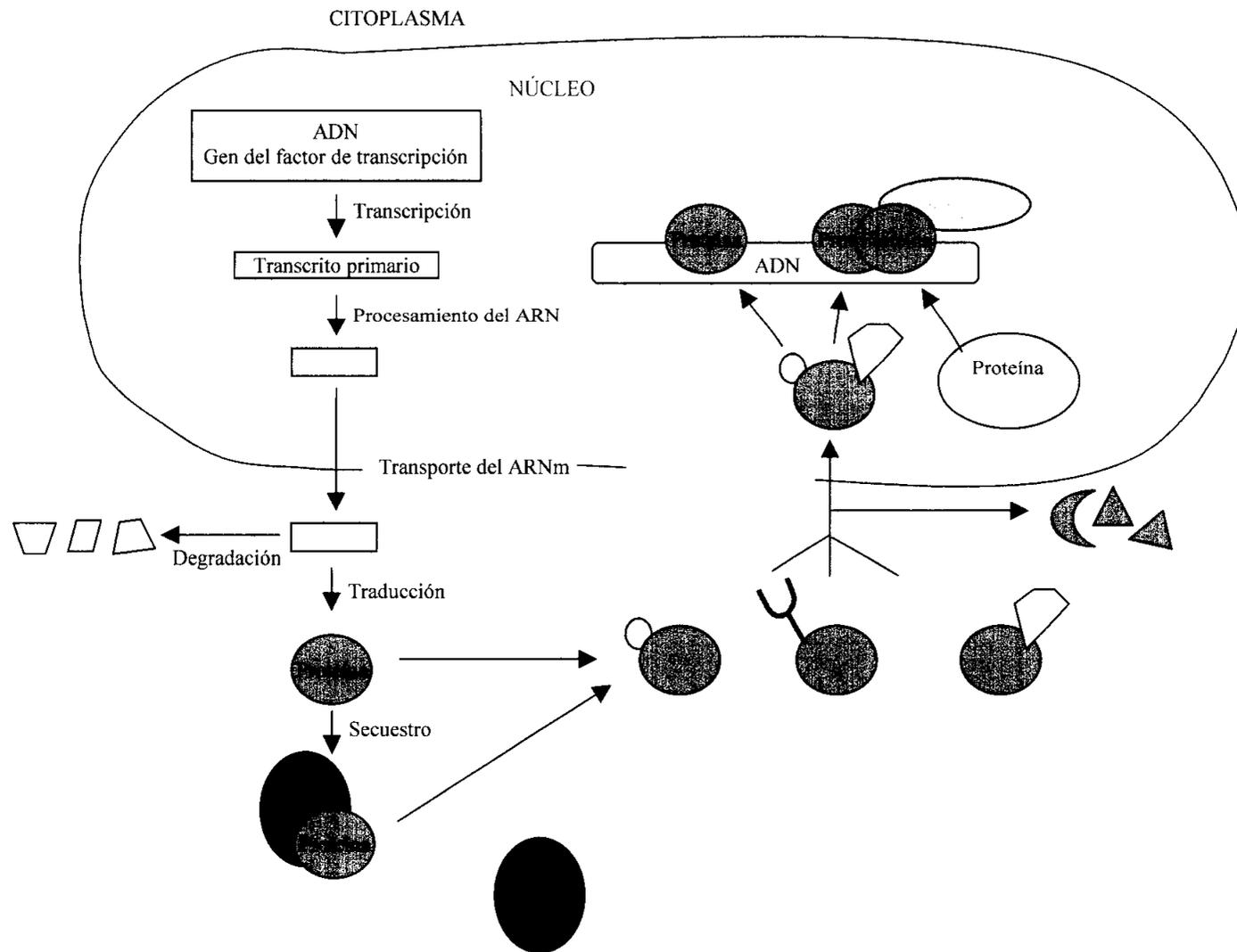
En segundo lugar, cabe citar el transporte al citoplasma y la velocidad de degradación del ARNm correspondiente, así como la generación de diferentes isoformas de un mismo FT por corte y empalme alternativos. En este último caso, se da lugar a familias de FTs que difieren en la presencia o ausencia de los diferentes dominios de unión al ADN, de transactivación, de dimerización, reguladores, etc. Un ejemplo de esta situación la encontramos en el factor CREB (30).

#### **4.2.2 A nivel de la traducción**

Se trata de otro punto importante de control. Generalmente, esta regulación se produce en dos momentos:

1) en la selección del ARNm por el complejo ribosomal; y

2) en la selección del punto de inicio de la traducción en la región 5' del mensajero. En este segundo caso, la elección de lugares de inicio alternativos puede generar isoformas funcionalmente diferentes.



**Fig. 3.** Regulación de la actividad de FT. Se indican algunos de los pasos esenciales en la síntesis, activación y actividad de los FTs. Tomado y modificado de la referencia 31.

Calkhoven y Geert señalan, en este nivel, la existencia de regiones 5' no traducidas ricas en secuencias CG y altamente estructuradas en el ADN que codifica muchas proteínas reguladoras, entre las cuales encontramos FTs (31).

### 4.2.3 Modificaciones post-traduccionales

Se consideran la fosforilación y la glicosilación como las principales modificaciones post-traduccionales.

#### 4.2.3.1 Fosforilación

Una de las vías de regulación de la actividad de los factores de transcripción consiste en la fosforilación-desfosforilación de estas proteínas, a veces en residuos muy concretos. Esta fosforilación viene mediada por quinasas, las cuales actúan en respuesta a señales extracelulares, de manera que, la actividad transcripcional en el núcleo está conectada o se produce como respuesta a cambios o eventos extracelulares.

Se ha observado la fosforilación *in vitro* de FTs por diferentes quinasas. Así, se han descrito diferentes tipos de quinasas celulares que tienen como sustrato factores transcripcionales, como por ejemplo, la proteín-quinasa CK2 (32,33), la proteín-quinasa dependiente de AMPc (PK-A) (34) o las MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (33,35).

La fosforilación de proteínas nucleares puede influir, bien en las capacidades de unión al ADN, de dimerización o de interacción proteína-proteína (por ejemplo, reclutamiento y asociación con coactivadores), bien en la translocación nuclear o en la misma actividad transcripcional del factor de transcripción (36,37). Uno de los ejemplos mejor conocido de alteración de la capacidad transactivadora es el de la proteína CREB, para la que se han descrito dos dominios: KID y Q2, que actúan sinérgicamente en *trans* y son necesarios en la inducción dependiente de la proteín-quinasa A (PK-A) de los genes activados por CREB (34). Otros ejemplos en los que se activa, induce o potencia la unión del factor de transcripción a su secuencia diana, son UBF (38) y Sp1 (39). Determinados factores transcripcionales bien caracterizados se ha visto que poseen una forma fosforilada nuclear y otra no fosforilada citoplasmática como, por ejemplo, Stat1 (40) o NGFI-A (41).

Por otro lado, los mecanismos de fosforilación-desfosforilación no sólo afectan a factores transcripcionales más o menos específicos, sino que, pueden afectar, al menos potencialmente, a cualquier proteína nuclear. Así, la misma ARN-polimerasa II sufre una extensa fosforilación en su dominio carboxi-terminal que se ha relacionado con la ruptura de interacciones implicadas en la asociación y orientación de la enzima en un promotor, permitiendo la liberación de ésta en la transición de la etapa de formación del complejo de iniciación a la etapa de elongación. Varios autores han descrito distintas quinasas implicadas en la modificación del dominio carboxi-terminal *in vivo*, lo cual podría reflejar la participación de diferentes quinasas según el promotor y/o las diferentes fases de la reacción de transcripción (42).

También se ha demostrado una relación entre la fosforilación de las proteínas histonas y no histonas de la cromatina y un correcto y estable espaciado de los nucleosomas, así

como la fosforilación de determinadas histonas y el grado de condensación de la cromatina (43).

#### 4.2.3.2 Glicosilación

Como indican Hart et al. (44), inicialmente, la existencia de proteínas glicosiladas en el nucleoplasma o en el citoplasma fue puesta en duda por diversas razones y, sobre todo, por ir en contra del modelo establecido, por el cual las proteínas glicosiladas se localizaban, casi exclusivamente, en la superficie celular o en compartimentos luminales. Más adelante se fue demostrando, mediante el uso de lectinas, la existencia de glicoproteínas en el citoplasma, en la cromatina, en membrana y matriz nucleares, así como de FTs glicosilados, encontrándose la potencial presencia de azúcares tan diversos como  $\alpha$ -D-glucosas,  $\alpha$ -D-manosas,  $\alpha$ -L-fucosas, D-galactosas, D-N-acetilglucosaminas, D-N-acetilgalactosaminas, etc.. Como ejemplos de proteínas glicosiladas podemos citar: factores transcripcionales de la ARN-polimerasa II, proteínas del poro nuclear, una fosfotirosín-fosfatasa y varias proteínas asociadas a la cromatina (42).

Las funciones potenciales de la glicosilación de FTs serían varias (29):

\* Actuar como ligandos para el reconocimiento por parte de otros componentes del aparato transcripcional (42). Por ejemplo, en la ARN-polimerasa II, se le puede suponer un papel regulador en el establecimiento de interacciones entre esta enzima y promotores a los que se ha unido un FT de tipo lectina.

\* Conferir estabilidad a la proteína, mediante modulación de su vida media y de la resistencia a la proteólisis. Se ha observado que el estado de glicosilación del factor Sp1 en células de músculo liso vascular cambia en función de las condiciones nutricionales del medio extracelular; en este caso, se ha correlacionado una baja glicosilación de este factor con su degradación proteolítica (45).

\* Participar en señales de localización nuclear. Se ha barajado la posibilidad de que esta modificación no tenga nada que ver con la actividad transcripcional de la ARN-polimerasa II o de FTs, sino que constituya una señal de localización nuclear.

\* Papel en el ensamblaje de complejos multiproteicos.

\* Antagonizar la acción de proteín-quinasas al enmascarar o bloquear los lugares de fosforilación. Se observó que, prácticamente, todas las proteínas que están glicosiladas son también fosfoproteínas. Esto sugiere que la glicosilación tendría un papel regulador en eventos celulares al controlar la fosforilación en los mismos sitios o en lugares cercanos. Así, Kelly et al. encontraron que la subunidad grande de la RNAPolimerasa II está glicosilada en su dominio carboxi-terminal, de manera que sólo detectaban los residuos glucídicos en la proteína que no estaba fosforilada, lo que les llevaba a pensar que la glicosilación y la fosforilación del dominio carboxi-terminal eran modificaciones excluyentes (42).

\* Participar en el transporte nucleocitoplasmático (en el caso de las proteínas del poro nuclear).

Jackson y Tjian señalan a la glicosilación como una modificación prevalente, que tendría un papel importante y conservado a lo largo de la evolución, encontrando que muchos FTs de la ARNpolimerasa II poseen este tipo de modificación, mientras que FTs de las ARNpolimerasas I y III no parecen estar glicosilados. También observaron que no todos los FTs de una familia están glicosilados, sino que esta modificación se da en determinados casos; esta situación podría indicar diferencias funcionales entre FTs dentro de una misma familia, siendo un punto a favor en el hecho de que esta modificación constituya una forma de control de la actividad transcripcional de FTs (29).

Estos autores también encontraron que el factor Sp1 presenta una capacidad de activación de la transcripción de 3 a 5 veces mayor cuando está glicosilado que cuando no lo está y que la unión de la lectina de germen de trigo (WGA) a los residuos de GlcNAc de este FT, inhibe la estimulación transcripcional del Sp1 de HeLa (29). Esto no quiere decir que los residuos de azúcar estén implicados necesariamente en la actividad transcripcional del FT, sino que, lo que puede estar ocurriendo es que estén cerca o en la misma región transactivadora. Estudios posteriores sugirieron que la mayoría de residuos glucídicos en Sp1 se encontraban en un dominio con importante actividad transactivadora (46).

Por otro lado, se ha observado que las proteínas glicosiladas reúnan una serie de características: forman complejos multiproteicos de manera específica y reversible en respuesta a señales celulares reguladoras o específicas de ciclo celular, se encuentran tanto en el citosol como en el núcleo y prácticamente, todas las que se conocen son también sustrato de quinasas. El hecho de que posean estas características comunes lleva a pensar que este tipo de modificación se produce en respuesta a señales celulares y de manera dinámica, como en el caso de la fosforilación; un hecho que apoyaría esto es la observación, por parte de Kelly et al. (42), de cambios en los patrones de glicosilación de proteínas nucleares durante las diferentes fases del ciclo celular, con un pico de glicosilación nuclear en los límites de las fases G1/S, que va seguido de una disminución en la mitosis. En estos casos se requerirían actividades de tipo N-acetilglucosaminidasa y N-acetilglucosaminil-transferasa.

#### **4.2.3.3 Otras modificaciones**

Los FTs, por el simple hecho de ser proteínas, son potenciales sustratos de reacciones como la ubiquitinación, la metilación, etc.. Estas reacciones introducen en la molécula diferentes grupos químicos que, como en el caso de la fosforilación o la glicosilación, podrían influir o modular la actividad, vida media, localización celular, etc. de la proteína modificada.

Una de las modificaciones recientemente descritas (47) consiste en la acetilación *in vitro* y/o *in vivo* de FT, como por ejemplo, GATA-1, p53 y EKLF. Se le supone un papel modulador de la actividad de proteínas que interaccionan con el ADN; dependiendo de la posición de los residuos de lisina acetilados específicamente en los dominios funcionales se ha observado un aumento o una disminución de la unión al ADN de algunos FTs acetilados. Resulta interesante el hecho de que algunas proteínas reguladoras como el coactivador CBP/p300 posean actividad acetil-transferasa, ya que da lugar a establecer un modelo de activación por el cual el reclutamiento de enzimas histona-acetiltransferasas por activadores unidos al ADN o la actividad acetil-transferasa de los propios coactivadores, provoquen una cascada de acetilaciones que afecte a las histonas (posiblemente relajando las uniones con el ADN por neutralización de la carga positiva de las colas amino-terminales) y a los FTs (en

los que se aumentaría o disminuiría su actividad), favoreciendo la expresión génica. Por otro lado, otros factores nucleares como proteínas puente y represores transcripcionales tienen actividad desacetilasa (48,49).

#### 4.2.4 Otros niveles de regulación

Podemos citar el transporte al núcleo (controlado por la presencia de señales de localización nuclear, las cuales pueden estar enmascaradas o no), unión de ligandos (como, por ejemplo, hormonas esteroideas, retinoides u hormonas tiroideas (3)), interacciones con otras proteínas (ya sea para formar homo o heterodímeros), proteólisis o el estado redox del medio intracelular, seguramente mediado por la homeostasis del estado redox de las células (principalmente del balance tiol-disulfido (50)). La presencia de otros FTs represores que se unen a secuencias que solapan las de FTs activadores constituye otra forma de regular la actividad de FTs positivos (3).

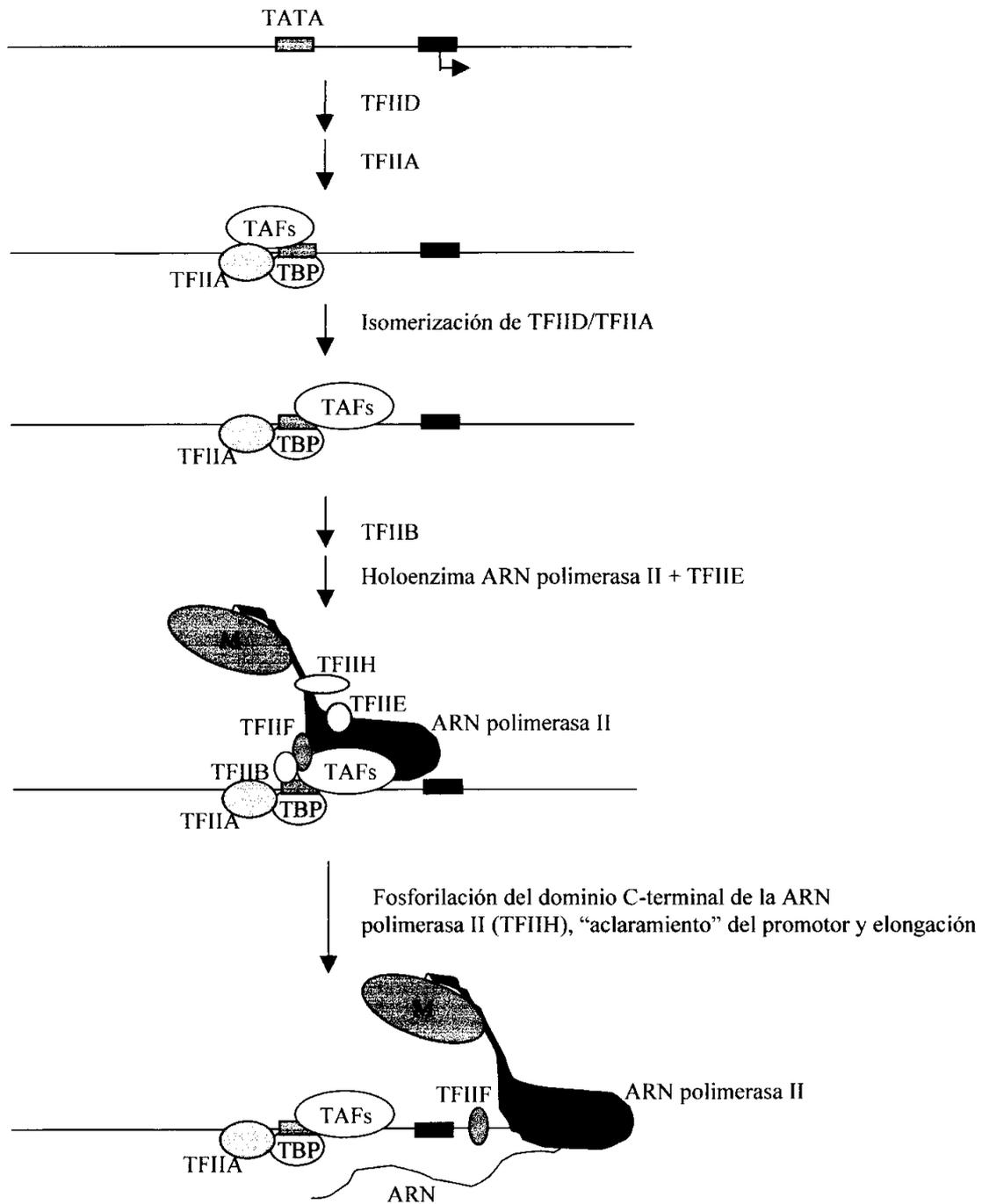
### 5. INTERACCIONES ENTRE ELEMENTOS *CIS* Y *TRANS*: COMPLEJOS DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Las interacciones entre elementos *cis* (secuencias de ADN) y *trans* (factores nucleares) provocarán la activación o represión de genes y las modificaciones de ambos tipos de elementos se traducirán en una modulación de esta activación o represión, como consecuencia de variaciones en las interacciones ADN-proteína y proteína-proteína. La expresión y represión de diferentes genes de una manera coordinada es la que va a generar diferentes tipos celulares.

La enzima clave en el inicio de la transcripción es la ARN-polimerasa. En eucariotas hay tres tipos de ARN-polimerasa; todas ellas son complejos grandes, de unos 500 kDa, formados por 8-14 subunidades. La ARN-polimerasa II es la responsable de sintetizar el ARN de la práctica totalidad de los genes que codifican proteínas; se localiza en el nucleoplasma y es responsable del 20-40% de la actividad ARN-polimerasa total (4). Esta ARN-polimerasa II genera una expresión diferencial de los genes que transcribe y depende completamente de FTs auxiliares. El complejo que forman los factores generales de la transcripción junto con la ARN-polimerasa II, unidos a una región promotora, se le denomina complejo de iniciación de la transcripción o maquinaria transcripcional basal (3,4). Algunos autores también llaman a este complejo “factores generales de la transcripción” (4).

La holoenzima ARN-polimerasa II es considerada por Kim et al. (55) como un complejo entre la polimerasa y el denominado mediador. Este complejo se establece a través de interacciones con el dominio carboxi-terminal de la enzima. Tanto la polimerasa como el mediador son complejos multiproteicos compuestos de diversas subunidades: la primera consta de la propia enzima (la cual se suele denominar “enzima núcleo”), FTs basales (como TFIIB, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) y otras proteínas, actualmente conocidas o no; a su vez, el mediador está constituido por las proteínas SRB (*suppressor of RNA polymerase B*), además de otras como SIN4, RGR1, GAL11 y ROX3.

En la figura 4 se señalan las sucesivas etapas que tienen lugar en la formación del complejo de iniciación de la transcripción.



**Fig. 4.** Formación del complejo de iniciación de la transcripción. Se indican las sucesivas etapas iniciales que tienen lugar durante la activación de la transcripción en un promotor eucariota típico, así como de los elementos cis y factores nucleares implicados en estas fases. “M” significa mediador. Tomado y modificado de la referencia (4).

Para Ogbourne et al., la TBP (*TATA-binding protein*) es la única proteína capaz de realizar contactos específicos con el ADN al unirse a la caja TATA; es la que inicia el ensamblaje del resto de FTs (4).

Otros autores han propuesto que el TFIID (complejo formado por la TBP y los TAFs, *TBP-associated factors*) se uniría primero a la caja TATA, pero que se producen otras interacciones con elementos adyacentes, contribuyendo a la unión de TFIID en ausencia de caja TATA (51); esta idea viene apoyada por la observación de que los TAFs son necesarios para la transcripción basal (aquella que se produce en ausencia de activadores) de los promotores sin caja TATA (52) y de que la TBP no es necesaria para la iniciación de la transcripción de estos promotores (16,53). Por otro lado, Kingston et al. consideran que la unión de TFIID y de la TBP a la caja TATA es un paso limitante durante la activación de la transcripción (54).

Lo que sí parece claro es que los FTs unidos a zonas promotoras proximales controlan la formación del complejo de iniciación y la velocidad a la que la ARN-polimerasa comienza a transcribir; esto se debe a interacciones de determinados TAFs con la TBP o con otros factores generales presentes en el complejo de iniciación. También, los FTs unidos a *enhancers* interaccionarían con el complejo de iniciación, mediante la formación de un bucle de ADN (3).

Respecto al TFIID, el TAF250 tiene actividad histona-acetil-transferasa por lo que el reclutamiento del TFIID en el promotor podría ser suficiente para completar la alteración de la cromatina en las proximidades del promotor (4).

Por otro lado, no hay que olvidar la presencia de FTs represores que actúan: **1)** uniéndose a secuencias que solapan las de FTs activadores, **2)** uniéndose a secuencias que se solapan con los sitios +1, **3)** reprimiendo la transcripción por sí mismos, sin interferir la unión de otros FTs activadores específicos o generales (como ejemplo podemos citar la proteína del tumor de Wilms (3)).

## **6. METILACIÓN DEL ADN**

Una modificación del ADN que tiene un papel relevante en la regulación de la transcripción es la metilación del ADN.

En el caso de procariotas, la metilación del ADN puede ocurrir en adeninas o citosinas. Sin embargo, el ADN de eucariotas sólo se metila en la posición N<sup>5</sup> de las citosinas, principalmente de aquéllas situadas en dinucleótidos CG (56).

Se ha demostrado que la metilación de estos residuos en el entorno de zonas promotoras y reguladoras se traduce en la modulación de la actividad transcripcional del gen situado bajo su control, al producir variaciones en los patrones de unión de factores nucleares al ADN (**4**). Inicialmente se le asignó un papel represivo de la transcripción, al correlacionarse, en la mayoría de casos, la metilación de zonas reguladoras con la ausencia de expresión o silenciamiento del gen que controlan; sin embargo, también se observó que una

disminución en la metilación del ADN llevaba a una represión transcripcional de los genes *Igf2* e *Igf2R* (57). Por lo tanto, la metilación genera una expresión diferencial.

Otra función asignada a la metilación es el constituir una señal para la maquinaria ensambladora de cromatina rica en histonas desacetiladas (58). Como veremos más adelante, se encontró una relación entre el estado de metilación del ADN y la formación de determinadas estructuras de cromatina; estudios como el de Kass et al. (57) llevaron a la conclusión de que la metilación del ADN puede llevar a la alteración de la estructura de la cromatina.

También se ha propuesto un papel de la metilación en los procesos de diferenciación y durante el desarrollo embrionario (58), de manera que la metilación del ADN es un proceso dinámico durante el desarrollo, al producirse sucesivas oleadas de metilación y desmetilación. En este sentido, se ha visto que el desarrollo embrionario normal de mamíferos depende de la metilación de citosinas. No se sabe muy bien como los genes activos son protegidos de la metilación, aunque se supone que, durante la replicación, determinadas proteínas se unen a genes transcripcionalmente activos, previniendo la metilación de éstos (3). Durante el desarrollo se producen una serie de eventos de metilación y desmetilación que llevan al establecimiento de unos patrones de metilación que se mantienen en las células diferenciadas (59).

También se ha destacado el papel de la metilación en la impronta genómica (proceso por el cual los alelos parentales del mismo gen se expresan en niveles o dosis diferentes) (60), puesto que la expresión anormal de *loci* marcados se ha relacionado, desde hace unos años, con ciertos desórdenes y enfermedades (61-63). Se ha observado que los patrones de metilación de células tumorales están alterados con respecto a los de células normales: hay una hipometilación global del genoma junto a una hipermetilación de determinadas regiones (64,65). Aunque se ha debatido la implicación directa de la metilación en los procesos de carcinogénesis, algunas evidencias indicarían una relación causal directa entre metilación y la génesis de tumores (66). De hecho, la alteración del estado de metilación de promotores de genes supresores de tumores se ha considerado como una de las vías de inactivación epigenética que promovería el desarrollo de tumores (67).

Otras situaciones en las que la metilación se supone que está implicada son el evitar la expresión de genes ectópicos (68) y la inactivación de uno de los cromosomas X (58).

## **6.1 Islas CpG**

En vertebrados, el 60-90% de los dinucleótidos CG y el 3-6% de todas las citosinas del genoma están metilados (58); la mayoría de CpG no metilados se encuentran en las islas CpG, generalmente situadas en promotores (69). Estas islas CpG están normalmente sin metilar en células somáticas, incluso cuando el gen que controlan no se expresa (70) y poseen las características estructurales de regiones transcripcionalmente activas: depleción de histona H1 e hiperacetilación de las histonas H4 y H3, además de ser sensibles a la digestión por nucleasas (71). Generalmente, suelen asociarse con genes domésticos (*housekeeping genes*) y con algunos genes específicos de tejido (72).

El resto de genoma que no forma “islas” (cerca del 98%) contiene CpGs dispersas (cerca de 1 por cada 100 pb) que están generalmente metiladas (73).

La metilación de dinucleótidos CpG se ha correlacionado con represión transcripcional, jugando un papel en la inactivación del cromosoma X y en la impronta genómica; también se ha observado un aumento de la metilación de las islas CpG con la edad y con el cultivo *in vitro* (66). Sin embargo, la metilación diferencial de sitios CpG no es un mecanismo universal para establecer o mantener patrones de actividad génica, ya que ciertos invertebrados llevan a cabo su programa de desarrollo sin emplear la metilación de dinucleótidos CpG (74).

## 6.2 Proteínas que reconocen ADN metilado

En los últimos años se han descrito una serie de proteínas que reconocen ADN metilado, uniéndose a él, entre las que podemos citar: MeCP1 (73,75), MDBP-1, MDBP-2 (76), MeCP2 (59) y la histona H1 (74).

## 6.3 La metilación como un proceso dinámico: desmetilación del ADN

La incorporación de grupos metilo al ADN tiene lugar por la transferencia de éstos desde moléculas donadoras, como el cofactor S-adenosilmetionina (SAM) a las citosinas de la doble hélice; esta reacción está catalizada por metilasas del ADN o ADN-metiltransferasas.

Hasta la fecha se han descrito tres tipos de ADN-metiltransferasas: DNMT1, DNMT2 y DNMT3, aunque no se ha podido demostrar que la DNMT2 tuviera realmente actividad metiltransferasa (66). Estas enzimas no sólo actuarían durante la replicación del ADN (DNMT1), sino también en los fenómenos de metilación *de novo* (66).

Inicialmente se propuso un modelo complejo de desmetilación que implicaba la participación de actividades enzimáticas de tipo glicosilasa, nucleasa, reparadora del ADN y ligasa (77)

Como indican Cervoni et al. (77), se han descrito dos tipos de desmetilación del ADN: una de tipo específico, que se produce en determinados sitios y que, generalmente, va ligada a la activación o expresión de genes concretos; y otra de tipo general, que afectaría al genoma entero y que se produce durante las primeras etapas del desarrollo, durante la diferenciación celular y en células cancerosas. Actualmente, se ha identificado y clonado una enzima con actividad desmetilasa del ADN que cataliza la eliminación de grupos metilo presentes en metil-citosinas (78). Se trata de una enzima que es capaz de actuar tanto sobre ADN metilado como hemimetilado y desmetila metilCpG en diferentes contextos; se trata de una enzima progresiva, es decir, una vez iniciada la desmetilación (siendo este inicio el paso crítico y que viene determinado por las propiedades de la secuencia) la reacción se desarrolla progresivamente. Estos autores explican de esta forma la desmetilación global del ADN, pero queda sin resolver la desmetilación específica de ciertas secuencias. Apuntan la posibilidad de que la interrelación entre factores locales, como la presencia de FTs, y la disponibilidad de las enzimas desmetilasas y metiltransferasas sea la responsable de la generación de un patrón de metilación determinado (79). De esta manera, la metilación del ADN sería un proceso dinámico, que se podría modular tras la mitosis (es decir, sin requerir la replicación del ADN) en respuesta a señales extracelulares.

## 6.4 Consecuencias de la metilación en la transcripción

Existen dos hipótesis acerca del papel de la metilación en la transcripción (80):

1) metilación específica de sitio: Doerfler et al. consideran que la metilación específica de algunos sitios CpG es el único requisito para la supresión de la expresión;

2) metilación específica de región: Murray et al. consideran que no todos los sitios CpG en un promotor han de estar necesariamente metilados: se trata de que haya una zona de ADN metilado de una longitud mínima.

La disminución en la tasa de transcripción del ADN metilado puede deberse a mecanismos directos, en los que la metilación de CpG(s) interfiere con el reconocimiento de secuencias diana por los correspondientes FTs, o a mecanismos indirectos, en los que proteínas represoras se asocian a secuencias que tienen CpGs metilados, impidiendo la unión de los FTs (75). Evidencias que apoyan el mecanismo indirecto son, por ejemplo, el que haya FTs insensibles a la metilación como el Sp1 (72) (aunque otros sí sean sensibles a esta modificación del ADN) y que no todos los FTs contienen CpGs en sus secuencias diana.

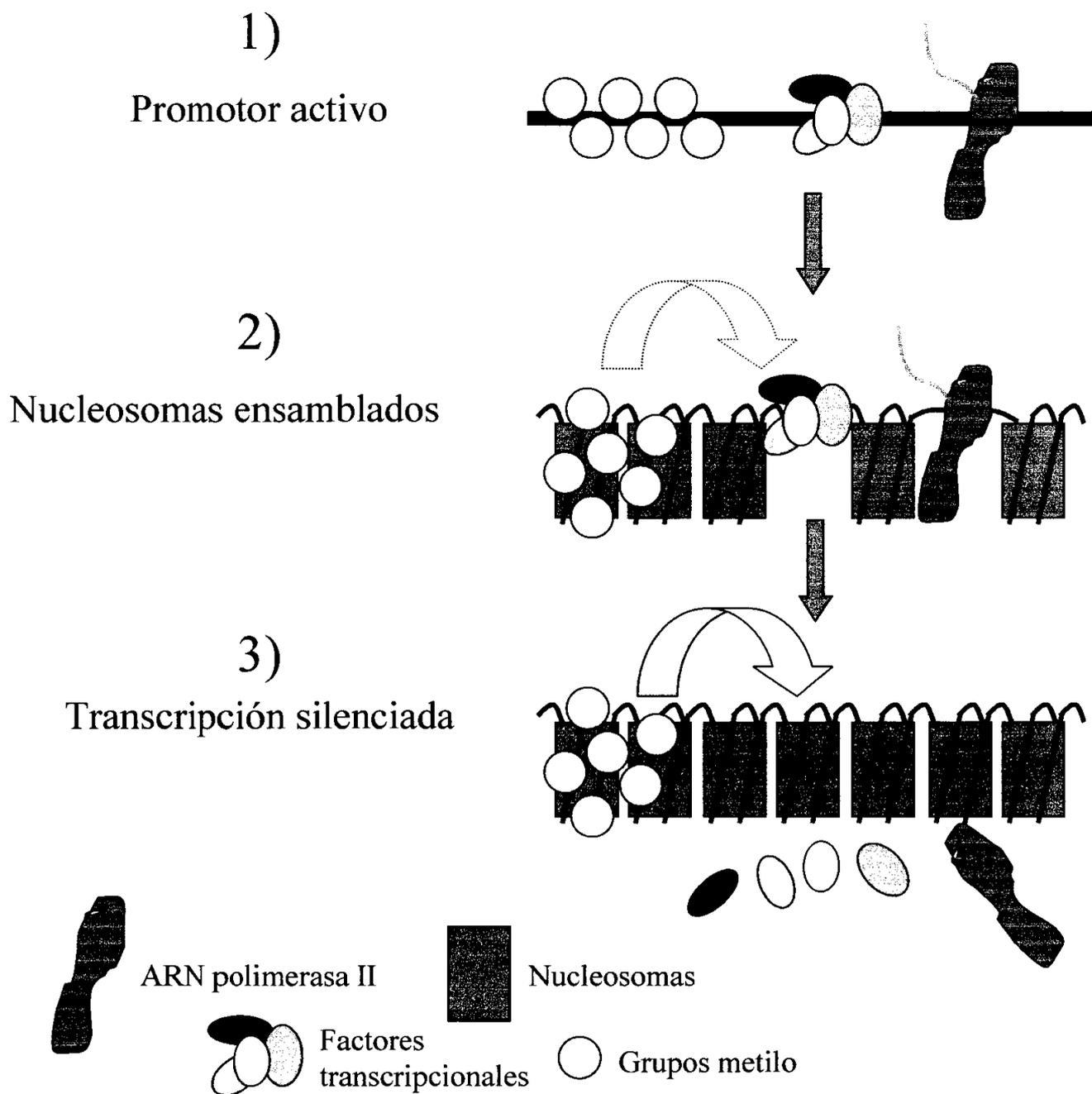
Otro hecho que apoya el mecanismo indirecto es el tiempo que tarda el ADN metilado transfectado en transcribirse, lo cual sugiere que ha de interactuar con proteínas nucleares (57). Además, Keshet et al. (81) observaron que tras transfectar moldes metilados y no metilados, los primeros presentaban una estructura de la cromatina resistente a nucleasas, seguramente debido a otros factores nucleares que se han unido.

Kass et al. (57) encontraron evidencias experimentales de que la represión de la transcripción de un molde de ADN metilado no se producía de manera directa, sino por un mecanismo indirecto por el cual se formarían complejos entre el ADN y proteínas, que reprimirían la transcripción. Estos autores apuntaban la posibilidad de que estos complejos contuvieran algo más que nucleosomas, ya que coactivadores capaces de activar la transcripción en presencia de nucleosomas no eran capaces de “contrarrestar” esta inhibición de la transcripción. También observaron que la metilación de una zona del ADN era suficiente para reprimir la actividad transcripcional de un promotor no metilado adyacente. En la figura 5 se muestra el modelo que proponen estos autores para explicar la relación de la metilación con el silenciamiento de genes.

Por otro lado, otros autores han observado que la 5-azacitidina e inhibidores de las enzimas histona-desacetilasas producen el mismo efecto, en el sentido de que restauran la actividad transcripcional de moldes metilados (69). De esta manera se proponen varios mecanismos de activación de la transcripción:

- 1) restaurando la acetilación de las histonas;
- 2) por desmetilación pasiva, debido a la unión de FTs que impedirían el mantenimiento de la metilación durante la replicación;
- 3) por desmetilación activa, llevada a cabo por enzimas desmetilasas (69).

Sin embargo, parece ser que genes silenciados por la metilación de islas CpG deben ser parcialmente desmetilados para ser reactivados por inhibidores de las histona-desacetilasas (82).



**Fig. 5.**

*Metilación y transcripción. Hipótesis de represión mediada por metilación del ADN.*

1) *Un molde de ADN metilado es activo transcripcionalmente al poco de haber sido transfectado.*

2) *Al poco tiempo se ensamblan nucleosomas y se pueden generar sitios hipersensibles a la DNasa I (SHD).*

3) *A la vez, se han ido desarrollando mecanismos represivos debidos a la metilación que acaban con la formación de una estructura nucleosomal estable: los SHD se pierden, la maquinaria transcripcional se elimina y se silencia la transcripción.*

*La línea azul oscuro representa al ADN y la línea azul claro al ARN.*

*Tomado y modificado de la referencia (57).*

## 7. CROMATINA

Hay que tener en cuenta que la interacción de la maquinaria transcripcional con los genes se da en un contexto en el cual el ADN no está libre, sino interaccionando con las proteínas estructurales (histonas principalmente) que provocan una disposición plegada y más o menos compacta del ADN, cuya unidad estructural básica es el nucleosoma (83).

### 7.1 Estructura de la cromatina; eucromatina y heterocromatina

Por cromatina se entiende la asociación del ADN con proteínas histonas y no histonas. Las unidades básicas son los nucleosomas, que están constituidos por un octámero de histonas (dos de cada uno de los tipos siguientes: H2A, H2B, H3 y H4) en torno a los cuales se enrollan 146 pb (84). Otra unidad estructural frecuentemente citada es el cromatosoma: unidades de 166 pb que contienen la partícula núcleo y el ADN espaciador con las histonas H1 ó H5. Se denomina nucleofilamento a la secuencia de partículas núcleo o *core* unidas por fragmentos de ADN de longitud variable (el llamado ADN espaciador o *linker DNA*), en los que podemos encontrar las histonas H1 y H5.

Como indican Björklund et al. (85), la estructura de la cromatina a una resolución de 2Å, muestra la presencia de casi 1000 moléculas de agua e iones, que estarían implicadas en la estructura del ADN y en las interacciones ADN-proteína. Se sugiere la posibilidad de que todos los nucleosomas adoptarían la misma conformación, independiente de la secuencia de ADN, y que la flexibilidad en las zonas en las que el ADN no contacta con las proteínas sería mayor que donde interaccionan. La presencia de moléculas de agua en el complejo modularía la disociación del octámero en tetrámeros y dímeros, en función de la concentración salina del medio, posiblemente permitiendo que casi la mitad del ADN en torno al nucleosoma se llegara a separar permitiendo la transcripción sin disociarse completamente del octámero. También señalan que la formación de estructuras de orden superior de la cromatina depende de cationes divalentes, ya que la estructura a 2Å indica la presencia de un catión manganeso coordinado octaédricamente entre dos partículas núcleo. También los extremos N-terminales de las histonas estarían implicados en interacciones de estructuras de orden superior, así como las histonas H1 y H5.

Esta estructura de la cromatina no es estática, sino dinámica, de manera que, en general, se distinguen dos estados: la heterocromatina, más compacta e inactiva transcripcionalmente, y la eucromatina, cuya estructura es más relajada, permitiendo la transcripción.

Se cree que los nucleosomas no afectan la etapa de elongación del ARNm, pero sí que podrían interferir en la formación del complejo de iniciación de la transcripción (86).

### 7.2 Cromatina y transcripción: nucleosomas en zonas reguladoras e interacciones entre factores de transcripción y nucleosomas

Para Hartzog y Winston (87) hay tres aspectos de las proteínas histonas relevantes en el control de la transcripción (entre otras funciones nucleares como la progresión del ciclo celular y el mantenimiento de la integridad del genoma): su estructura primaria, las modificaciones covalentes y las interacciones con FTs. Se ha observado que FTs como Sp1,

CTF-1 y OCT2 interactúan con la histona H3. También el posicionamiento de nucleosomas y la fuerza de las interacciones ADN-histonas estarían implicadas en el control transcripcional.

En cuanto a las modificaciones covalentes de las histonas hay que señalar que se han relacionado con cambios en la cromatina que tienen lugar durante la transcripción y la replicación (4,88). Se han postulado dos modelos para explicar el efecto de la acetilación de las histonas en la activación de la transcripción:

1) la neutralización de la carga positiva de las lisinas al acetilarse disminuye la afinidad del octámero por el ADN;

2) los grupos acetilo constituyen señales que desencadenan interacciones con otras proteínas reguladoras (89), quizás maquinarias remodeladoras.

Una de las piezas claves a la hora de iniciar la transcripción de un gen es cómo los FTs son capaces de reconocer y de unirse a sus secuencias diana cuando el ADN está empaquetado en cromatina. Beato y Eisfeld (90) indican la posibilidad de clasificar los factores en dos categorías: factores iniciadores (FI) y factores efectores (FE); los primeros serían capaces de unirse a sus secuencias diana cuando están situadas en ADN nucleosomal (es decir, en cromatina organizada regularmente) y de iniciar el remodelamiento de la cromatina y la transactivación, y los segundos serían aquellos que dependen de la acción previa de los FI o de una estructura nucleosomal preformada o pre-establecida que les permitiera acceder a sus secuencias diana. Parece ser que el número y extensión de los contactos ADN-proteína determinaría el que un FT perteneciera a una clase u otra. Además, la unión de un FT al ADN será más fácil si su secuencia está en la superficie del nucleosoma que si está orientada hacia el interior, y, en el caso de que esté en el ADN internucleosomal, dependerá de la presencia o ausencia de la histona H1 o de factores que condicionan el compactamiento de la cromatina. En estudios *in vivo*, se ha visto que FIs, como los receptores de hormonas esteroideas, generan la aparición de sitios hipersensibles a la DNasa I tras la inducción, que podrían ser debidos a la disrupción, desplegamiento o reordenación de los nucleosomas presentes. Los FEs se dividirían, a su vez, en aquellos que se pueden unir a nucleosomas alterados y aquellos que se unen a regiones libres de nucleosomas; la mayoría de FTs pertenecerían a esta segunda subclase, de manera que algunos podrían estar ya unidos de manera constitutiva a sus secuencias (unión que, seguramente, tendría lugar durante la replicación de la cromatina) para generar respuestas rápidas y otros se unirían a secuencias libres de nucleosomas generadas por la acción previa de otros factores.

Aunque inicialmente se consideró la cromatina como una estructura estática que reprimía la transcripción, hoy día se la considera como una organización dinámica, directamente implicada en la regulación de la expresión de los genes. Numerosas situaciones descritas por diversos autores correlacionan estructuras especiales de la cromatina con activación génica: la presencia de complejos multiproteicos que modulan la estructura de la cromatina (54); la existencia de sitios hipersensibles a la DNasa I (91); la acetilación de histonas (las posiciones acetiladas se mantienen invariables, prácticamente, en todos los organismos eucariotas), la cual se correlaciona con genes activos, mientras que las regiones de heterocromatina o de genes silenciados poseen una baja tasa de acetilación (89), etc.

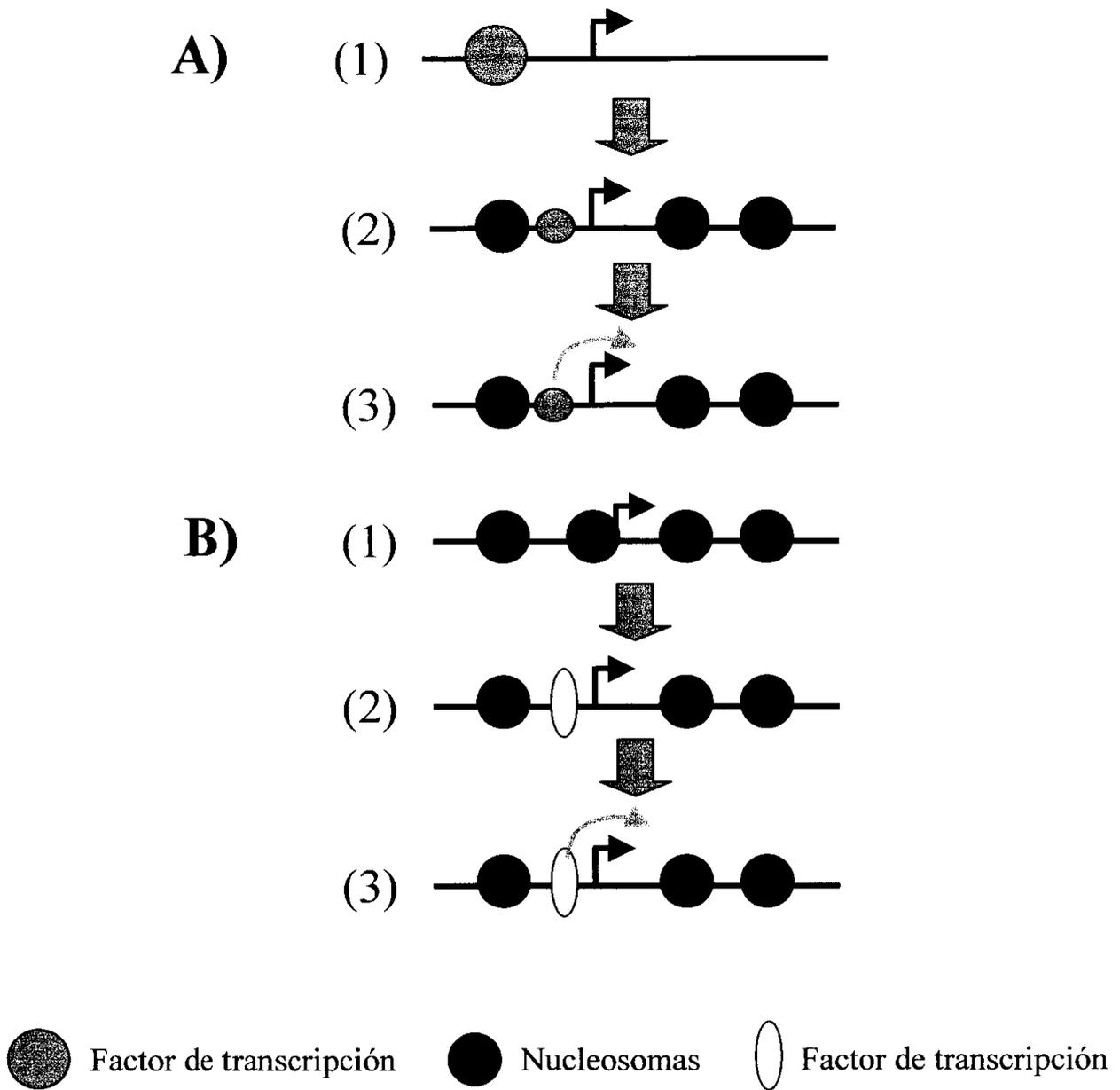
Los genes situados en estructuras de cromatina más accesibles suelen ser transcripcionalmente activos. Así, son más sensibles a la acción de enzimas como la DNasa I, generándose sitios hipersensibles allí donde hay FTs unidos al ADN. Comparando con el ADN desnudo, el ADN empaquetado en nucleosomas muestra, *in vitro*, una represión generalizada de la transcripción basal. Se ha sugerido que los nucleosomas en ciertos promotores sirven para evitar la transcripción en general, hasta que los FTs específicos apropiados estén disponibles para activar la transcripción (83). De ahí que se sugiera como una de las funciones de los nucleosomas, la represión de la transcripción en promotores no inducidos (3). Sin embargo, se ha observado que aquellos nucleosomas que se encuentran en regiones reguladoras, unas veces parecen estorbar la transcripción, mientras que otras parecen favorecerla o, simplemente, su presencia no parece tener ningún efecto: la presencia de nucleosomas no tiene por qué ser necesariamente una estructura represiva de la transcripción, sino que, en ciertos casos puede que la promueva al facilitar interacciones entre FTs que estarían alejados en la secuencia de ADN (83,91). Por ejemplo, en el gen de la vitelogenina de *Xenopus* (83), la organización del promotor en nucleosomas promueve o potencia la transcripción *in vitro*, seguramente al acercar elementos reguladores; otro ejemplo es el del gen *hsp26* de *Drosophila* (91).

Puesto que la activación de la transcripción puede realizarse de diferentes maneras, se han propuesto varios modelos (92). Un mecanismo propuesto es el de la antirrepresión (93), por el cual, un FT específico, por el simple hecho de unirse al ADN ejerce un efecto positivo sobre la iniciación de la transcripción, sin que haya una interacción directa entre él y la maquinaria transcripcional, ni una función activadora específica. En este mecanismo de la antirrepresión se necesita la unión previa del FT antes de la formación de cromatina, lo cual puede ocurrir en el lapso de tiempo entre la síntesis del ADN y el ensamblaje en cromatina (fig. 6A). Esto no implica, sin embargo, un inicio efectivo de la transcripción.

Otro modelo postula la remodelación de los nucleosomas (94): FTs se unirían a cromatina preformada provocando la reorganización de los nucleosomas y la activación de la transcripción (fig. 6B). En el caso de que la remodelación no lleve directamente a la iniciación de la transcripción, se habla de promotores potencialmente activos (*potentiated promoters*), ya que están en espera de que llegue una señal crítica que dispare o inicie la transcripción de los genes que controla. Cuando esta situación se da durante mucho tiempo, se habla de promotores pre-establecidos o preparados (*preset promoters*) (95).

Los mecanismos por los cuales la cromatina es remodelada pueden implicar movimientos o deslizamientos de nucleosomas o una desorganización transitoria, parcial o completa de la partícula núcleo (96).

Björklund et al. (85) apuntan la posibilidad de que diferentes tipos de factores y complejos mutliproteicos actuaran directamente sobre la cromatina, regulando la transcripción, ya sea sobre genes enteros o extensas regiones de la cromatina o bien, sobre nucleosomas concretos, sin que estas dos maneras de actuar sean excluyentes.



**Fig. 6.**

*Regulación transcripcional en la cromatina.*

**A)** *Proceso de antirrepresión: algunos promotores requieren la unión previa de factores transcripcionales (1) antes del ensamblaje de la cromatina (2) para poder ser activos transcripcionalmente (3).*

**B)** *Proceso de remodelación: en otros promotores, posteriormente al ensamblaje de la cromatina (1), los factores de transcripción pueden unirse al ADN provocando reordenamientos de los nucleosomas (2) que conllevan la activación transcripcional (3).*

*Tomado y modificado de la referencia (92).*

Algunos de los modelos propuestos para explicar como un FT es capaz de desencadenar un reordenamiento de nucleosomas son los siguientes (97):

\* El FT, empleando energía proporcionada por la hidrólisis de ATP, interactúa con la cromatina, reordenando los nucleosomas y uniéndose a su secuencia diana. Tsukiyama et al. observaron que el factor GAGA posee la capacidad de provocar la disrupción de nucleosomas, de manera dependiente de energía, en ensayos in vitro con el promotor hsp70 (94).

\* El FT interactúa con la cromatina sin provocar cambios o generando cambios muy pequeños, siendo otra actividad la que reorganiza la estructura de la cromatina en el promotor.

\* Una actividad nuclear se encarga de mantener la cromatina en una estructura tal, que el ADN está accesible a los FTs. Esta actividad o actividades emplearían ATP y constituirían complejos multiproteicos, como por ejemplo NURF (54) o CHRAC (98) en *Drosophila*. En mamíferos también se han descrito maquinarias remodeladoras de la cromatina, como los complejos asociados a BRG-1 o a hbrm (99). Este tipo de complejos contiene siempre una proteína de la familia de proteínas que unen ribonucleósidos trifosfato (99).

El remodelado de los nucleosomas puede suponer modificaciones transitorias de la estructura del nucleosoma (por ej., la acetilación o la disociación de algunas histonas del *core*) o disrupciones de los nucleosomas, generando regiones libres de nucleosomas (aunque, Beato y Eisfeld consideran que regiones libres de nucleosomas no son, necesariamente, regiones sin histonas (90)). Este último caso vendría avalado por observaciones como las de Almer et al. (100), que comprobaron que los nucleosomas situados en zonas promotoras “saltan” o se “desplazan” en aquellos genes en los que se activa la transcripción.

### **7.3 Cromatina y metilación**

Diversos autores han observado que el grado de metilación está relacionado con el empaquetamiento del ADN en nucleosomas (101). Parece ser que la metilación de determinadas secuencias nucleotídicas provoca la conversión de eucromatina en heterocromatina, con la consiguiente represión y silenciamiento del gen correspondiente (57). El silenciamiento de la transcripción por la metilación del ADN ocurre a nivel de la iniciación de la transcripción e incluye la eliminación de la maquinaria transcripcional de moldes activos. Esta represión de la transcripción ocurriría por mecanismos indirectos que incluirían el ensamblaje de complejos nucleoproteicos represivos, los cuales inhibirían la transcripción de manera más eficiente que los nucleosomas solos. La formación de estos complejos conllevaría un lapso de tiempo, durante el cual, los moldes metilados serían activos transcripcionalmente.

Diversos estudios realizados en este campo llevaron a la idea de que la metilación del ADN conduce a la modificación de la estructura de la cromatina (69). Varios experimentos apoyan la hipótesis de que proteínas que se unen específicamente al ADN metilado (como la MeCP2) unirían co-represores del tipo de mSin3A, los cuales contienen actividades enzimáticas histona-desacetilasa; la desacetilación de las histonas H3 y H4 conllevaría la

formación de una cromatina en la que la transcripción se vería inhibida. Esta situación se revertiría, bien por la desmetilación del ADN, o bien por la acetilación de las histonas. Un estudio reciente (82) indica que la metilación de islas CpG jugaría un papel dominante respecto de la desacetilación de histonas, seguramente por la participación de otros mecanismos no bien conocidos aún.

## **8. INTERÉS CLÍNICO DEL ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: DE LA DESREGULACIÓN A LA ENFERMEDAD**

Un sistema de control tan sumamente complejo y exquisito como el descrito, no está exento de sufrir alteraciones a pesar de todos los mecanismos de alerta y reparación que tenga. Estas alteraciones pueden ser transitorias o permanentes y pueden producir desde la simple alteración de la secuencia de aminoácidos de una proteína concreta hasta la expresión aberrante (por exceso o por defecto) de una proteína o de un grupo de proteínas. Esta situación puede pasar desapercibida, en el caso de que las proteínas afectadas sigan conservando su actividad, o provocar un cambio radical en el fenotipo de la célula afectada.

En la actualidad se conocen las bases moleculares de numerosas enfermedades de origen genético, es decir, debidas a una alteración en la expresión de determinados genes. Las posibilidades de error son muy variadas; por ejemplo, se ha descubierto la expansión de bloques de determinados tripletes dentro o cerca de las secuencias de varios genes asociados con patologías genéticas severas. Así, por ejemplo, en la región 3' del gen de la quinasa de la distrofia miotónica se han encontrado largas repeticiones de tripletes CTG en los enfermos y se ha demostrado que estas repeticiones forman nucleosomas inusualmente estables. Wang y Griffith sugieren, a partir de estas observaciones, un modelo en el cual la formación de nucleosomas anormalmente estables podría alterar la estructura local de la cromatina, inhibiendo el tránsito de los complejos transcripcionales y provocando la parada de las ADN-polimerasas y el “deslizamiento” del molde de ADN, produciéndose la expansión de las repeticiones de tripletes (22).

Otras patologías en las que se han encontrado expansiones de repeticiones de tripletes en las secuencias de los genes asociados son, por ejemplo, la enfermedad de Huntington (102), la ataxia espinocerebelar de tipo 1 (103) y en el gen FMR-1, responsable del síndrome del cromosoma X frágil (104).

Se ha propuesto que la metilación del ADN sería un factor importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, basándose en la observación de que las aberraciones genómicas se suelen asociar con una desmetilación global del ADN. En líneas celulares tumorales humanas de colon se encontró una relación entre un defecto en la capacidad de metilación del ADN, mecanismos de reparación y la presencia de reordenamientos cromosómicos. Recientemente, Vilain et al. (105) han encontrado también una relación entre desmetilación del ADN y reordenamientos cromosómicos en líneas celulares de cáncer de mama, sugiriendo que el grado de metilación del ADN se debería a un equilibrio entre las actividades metilasas y desmetilasas y que la desmetilación del ADN sería uno de los mecanismos implicados en el origen de la inestabilidad del genoma en estas líneas celulares.

Actualmente, se ha demostrado que la expresión de las enzimas DNMT1 y desmetilasa del ADN están alteradas en células cancerosas: se ha observado la sobreexpresión de las DNMT1 y DNMT3 en cáncer y la desregulación de desmetilasas (66). Kanai et al. (106) han apuntado que la reducción de la expresión de la desmetilasa estaría implicada en algún momento del desarrollo de un cáncer, aunque para ellos no estaría implicada en la progresión del tumor. Una baja tasa de expresión o de actividad de esta enzima podría provocar la hipermetilación de determinadas secuencias, lo que resultaría, por ejemplo, en una expresión reducida de genes supresores de tumores en los cánceres.

Las consecuencias de estos y otros errores en la maquinaria implicada en la expresión de genes son numerosas; así, podemos encontrar la ausencia total o parcial de una o varias proteínas o, por el contrario, la sobreexpresión o expresión inapropiada en el espacio (ectópica) y/o en el tiempo; alteraciones en la secuencia de aminoácidos que se traducen en alteraciones de la función de la proteína final; etc.. Estas situaciones pueden ocasionar el desarrollo de tumores o de patologías que van desde aquellas en las que no hay ninguna manifestación clínica de la enfermedad hasta aquellas otras más o menos graves e incluso fatales, pasando por alteraciones en las que el error sólo se manifiesta en determinadas situaciones fisiológicas o de estrés.

Por lo tanto, el estudio y conocimiento de los procesos de transcripción, maduración de los ARNms y traducción, así como de los mecanismos de control de la expresión de los genes (entre otros procesos nucleares y sin olvidar que las mitocondrias también poseen una pequeña fracción de la información genética de la célula), es fundamental para conocer y entender las causas desencadenantes de las patologías de origen genético y para el diseño de estrategias terapéuticas encaminadas a la corrección y reparación de los errores que han generado estas enfermedades.

El gen de la GGT de rata constituye, por su estructura y patrón de expresión, un buen modelo para el estudio de los mecanismos que regulan la transcripción.

## B. La gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT)

### 1. IMPLICACIONES METABÓLICAS DE LA GGT

La  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasa (GGT; (5-glutamyl)-péptido:aminoácido 5-glutamyl transferasa; E.C. 2.3.2.2.) es una enzima de membrana que cataliza la transferencia de un resto  $\gamma$ -glutamilo desde una molécula donora a una aceptora (107). El centro activo del enzima se encuentra orientado hacia la cara externa de la membrana (108). La enzima de riñón de rata es un heterodímero altamente glicosilado, que consta de dos subunidades, necesarias para la actividad enzimática (109): una subunidad grande de 50 kDa (110), con un segmento amino-terminal rico en aminoácidos hidrofóbicos que ancla la enzima a la membrana (110); y una subunidad pequeña de 30 kDa, que contiene el centro activo (111), unida de manera no covalente a la subunidad grande (112). La enzima activa se obtiene tanto por extracción con detergentes como con proteasas (112,113). Las dos subunidades vienen codificadas por un único ARNm que se traduce en un precursor polipeptídico (114). La glicosilación y la inserción en la membrana tienen lugar co- y post-traduccionalmente (114), mientras el corte proteolítico se produce en el retículo endoplásmico y/o en su localización final: la membrana plasmática (115). La composición de la parte glucídica difiere entre diversos tejidos e, incluso, a lo largo del desarrollo de un tejido concreto (116). También difiere el contenido de carbohidratos entre tejidos normales y cancerosos (117,118).

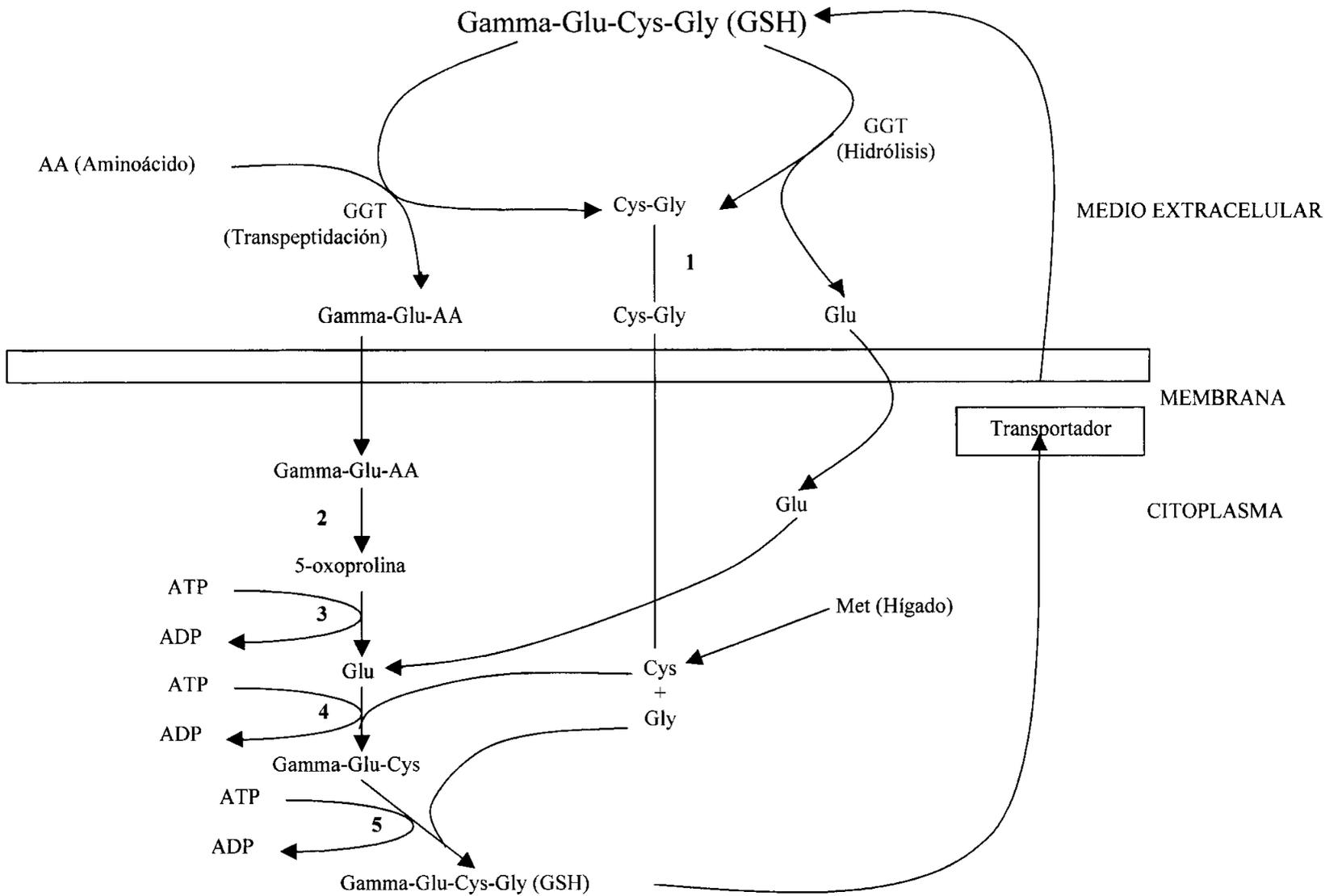
#### 1.1 Papel fisiológico de la GGT

La GGT se encuentra implicada en diferentes rutas metabólicas, tanto de compuestos fisiológicos endógenos, como de xenobióticos y carcinógenos (119,120); entre ellas podemos destacar las siguientes:

\* La captación de glutatión (GSH) por las células y la regulación del potencial redox intracelular. Muchos autores consideran que el principal papel metabólico lo desempeña en el ciclo del  $\gamma$ -glutamilo, que consiste en el transporte al medio extracelular del GSH, la degradación del GSH en sus aminoácidos constituyentes, la reabsorción de éstos y la posterior resíntesis de la molécula de GSH en el interior de la célula. La importancia de este ciclo reside en que las únicas células capaces de sintetizar cisteína son las hepáticas, por lo que el resto de células del organismo deben captar la cisteína de la sangre para cubrir sus necesidades. Como la cisteína libre en sangre se oxida rápidamente a cistina y ésta parece ser que entra en las células a través de un transportador poco eficaz (120), se supone que el GSH es la principal fuente de cisteína para las células. Este compuesto presenta más ventajas: se oxida más despacio que la cisteína y la cisteína que libera en la proximidad de las membranas celulares entra antes de que se oxide gracias a un transportador de aminoácidos ubicuo (121).

Como se observa en la figura 7 el GSH procedente del hígado (que es el principal productor de GSH (122)), llega hasta las células en donde puede entrar de dos maneras:

1) directamente a través de un transportador; esta vía supone sólo el 15% del GSH captado;



**Fig. 7.** Ciclo del  $\gamma$ -glutamilo. Los números indican las enzimas implicadas en esta ruta: dipeptidasa (1),  $\gamma$ -glutamyl-ciclotransferasa (2), 5-oxoprolinasa (3),  $\gamma$ -glutamyl-cistein-sintetasa (4), glutatión-sintetasa (5) (tomado y modificado de la referencia 120).

2) el GSH es rápidamente hidrolizado por los tejidos que tienen GGT y los aminoácidos son captados por la célula.

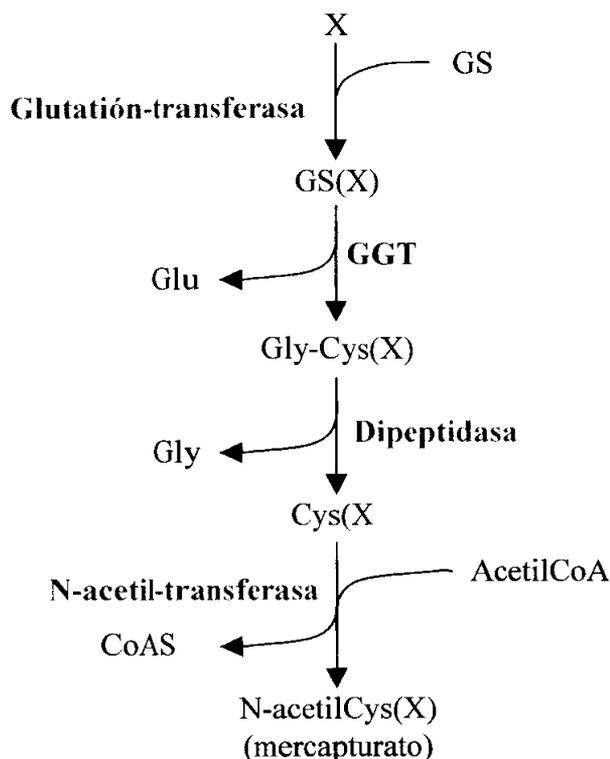
El GSH es, además, un compuesto que juega un papel importante en funciones biológicas como la síntesis y transporte de aminoácidos y péptidos, metabolismo de compuestos endógenos, metabolismo de drogas y sustancias tóxicas y está implicado en acciones antioxidantes (108).

En cuanto a su papel en la regulación del potencial redox de las células, puesto que la GGT es una enzima que favorece el suministro de precursores para la síntesis de GSH, su expresión se considera como parte de los mecanismos de defensa antioxidantes de las células. Sin embargo, también parece ser que su actividad se relaciona con la producción de peróxido de hidrógeno y con la disminución de los tioles proteicos en la superficie celular, debida a reacciones de S-tiolación. Se ha sugerido que la S-tiolación de las proteínas podría ser un mecanismo de protección de grupos tioles críticos, vulnerables al daño irreversible por agentes oxidantes. Esta hipótesis parece que explicaría el papel de la GGT en la resistencia a la radioterapia y a medicamentos oxidantes de células malignas proliferativas (123).

\* El transporte de aminoácidos ha sido considerado durante mucho tiempo como uno de los principales papeles de la GGT (124). Sin embargo, en pacientes con déficit de GGT y glutacionuria y en células cuya actividad GGT se ha inhibido completamente con acivicina se encuentra un transporte de aminoácidos normal. Esto hace suponer que la GGT sólo contribuiría a la entrada de ciertos aminoácidos y no sería un mecanismo vital (120). También podría estar implicada en el transporte de péptidos, en forma de  $\gamma$ -glutamil-péptidos, a través de las membranas celulares (125).

\* La detoxificación de xenobióticos de todo tipo, tanto los que han sido previamente conjugados con GSH como los no metabolizados o que forman complejos de coordinación con el GSH: drogas anticancerosas, carcinógenos, toxinas, tóxicos como el metilmercurio, etc.. A este respecto, se ha destacado el papel de la GGT en el metabolismo de los ácidos mercaptúricos: el GSH neutraliza sustancias tóxicas (generadas, principalmente, en la transformación de xenobióticos por el citocromo P450) conjugándose con ellas mediante glutatión-transferasas; estos conjugados sufren una serie de reacciones en diferentes tejidos (hígado, riñón, intestino) siendo la GGT la primera enzima implicada; como producto final de esta vía metabólica se obtienen los ácidos mercaptúricos, que serán eliminados (fig. 8).

En algunos casos, la GGT puede promover la toxicidad, no deseada, de algunos compuestos al favorecer su reabsorción (126).



**Fig. 8.**  
Reacciones de detoxificación con GSH y formación de ácidos mercaptúricos. Tomado y modificado de la referencia (120).

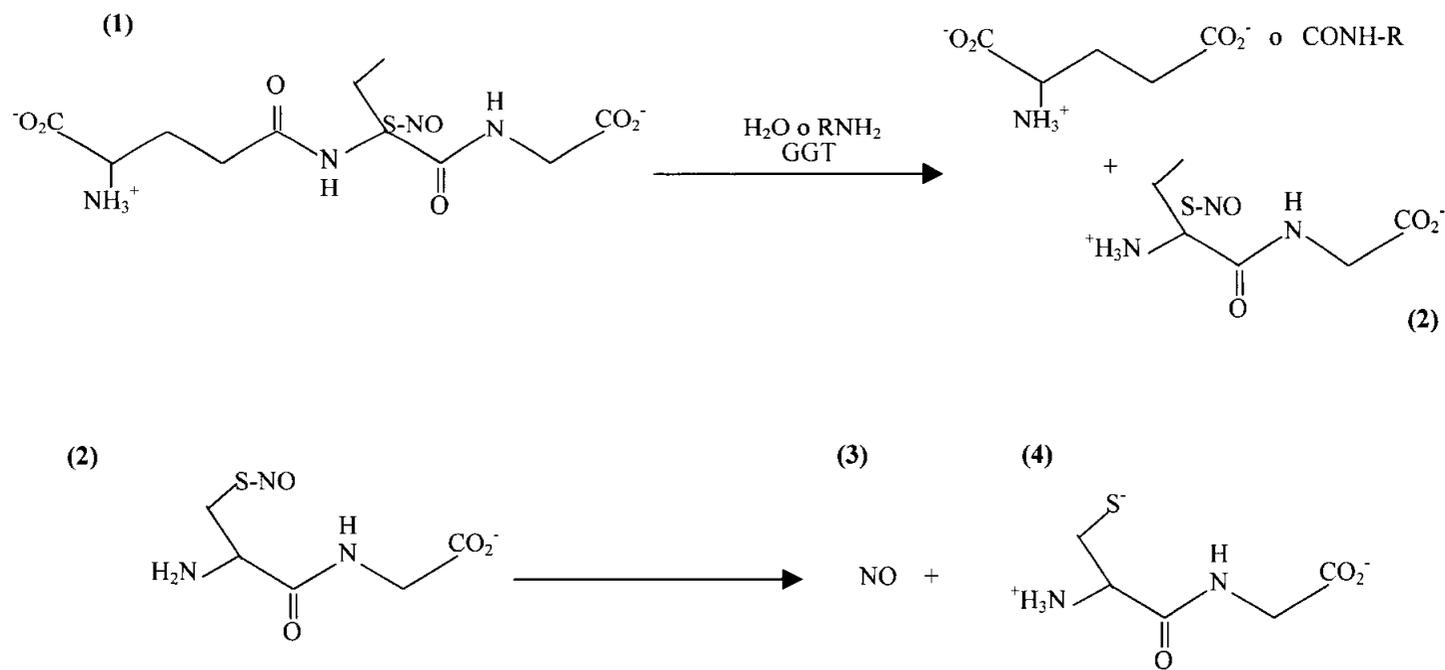
\* El metabolismo de hepoxilinas, prostaglandinas y leucotrienos, en donde estaría implicada, tanto en la activación como en la inactivación de estos mediadores (126):

1) se ha demostrado que la GGT degrada la hepoxilina A<sub>3</sub>-C y estaría implicada en el metabolismo de algunas prostaglandinas (127);

2) la GGT está implicada en la transformación del leucotrieno LTC<sub>4</sub> en LTD<sub>4</sub> (126). También interviene en la conversión del leucotrieno LTE<sub>4</sub> en LTF<sub>4</sub>.

Carter et al. identificaron, no hace mucho, una enzima denominada gamma-glutamil-leucotrienasa que convierte el leucotrieno LTC<sub>4</sub> en el LTD<sub>4</sub>, pero es incapaz de hidrolizar el GSH (128). Posteriormente, este grupo consideró a esta enzima y a la GGT como integrantes de una familia génica en el ratón: los ADNcs para estas enzimas muestran un 57% de identidad en cuanto a la secuencia nucleotídica se refiere, y la organización intrón-exón es similar para ambos genes, los cuales se encuentran próximos en el genoma. Como la GGT, se trata de una enzima presente en muchos y diversos tejidos del ratón (129).

\* Recientemente, se ha descrito una posible implicación de la GGT en el control de la respuesta celular a nitrosotioles fisiológicos, como el S-nitrosoglutación (GSNO) (130). Los linfocitos T poseen diferentes niveles de actividad GGT según el estado de activación o de diferenciación de estas células: la expresión de esta enzima aumenta con la activación de las células T, de manera que varía entre las diferentes subpoblaciones de células T. La expresión de esta enzima por estos linfocitos llevaría a la liberación (dependiente de la presencia de metales en el medio extracelular) de NO a partir del GSNO producido en una zona con inflamación (fig. 9).



**Fig. 9.**

Liberación de NO mediada por la GGT: el producto del metabolismo del GSNO (1) por la GGT es la S-nitrosocisteinilglicina (2), la cual se descompone rápidamente en óxido nítrico (3) y en sulfuro de cisteinilglicina (4) (tomado y modificado de la referencia 130).

Los efectos del NO sobre los linfocitos son variados; uno de ellos es la inhibición de la síntesis de ADN, actuando como citostático y controlando la proliferación de los linfocitos sin impedir la activación de las células T. También se ha señalado la posibilidad de que este NO liberado por la GGT a partir del GSNO actúe sobre otras células del entorno (130).

Recientemente, Jourdeuil et al. (131) consideran que la descomposición de sustancias como la S-nitrosocisteína y el GSNO se debe principalmente a reacciones de transnitrosación directa, dando como producto S-nitrosoalbúmina. Estos autores encontraron que la cantidad de S-nitrosocisteinilglicina formada por la acción de la GGT era mínima.

\* Esta enzima también se ha encontrado en numerosas bacterias. Chevalier et al. (132) han demostrado, por vez primera, la importancia fisiológica de la enzima bacteriana: en el caso de *H. pylori*, y mediante el estudio de mutantes que no expresan esta enzima, se ha señalado el papel de esta enzima en el establecimiento de la infección, ya que estos mutantes sin GGT, inoculados en ratones, eran incapaces de colonizar la mucosa gástrica de los animales infectados.

\* Últimamente se ha descrito la posible relación entre la GGT y los procesos de oxidación de LDL y de aterogénesis. Por un lado, se ha descrito una posible conexión existente entre los niveles intracelulares de GSH, la pérdida de formación de NO en hipercolesterolemia y las lipoproteínas modificadas. Moellering et al. (133), han sugerido que la acción antioxidante del NO sobre las células, se basaría en un mecanismo indirecto de regulación de los niveles intracelulares de GSH, a parte de los mecanismos directos conocidos; el NO induciría la síntesis de GSH a través de la vía que implica a la GCS ( $\gamma$ -glutamil-cisteín-sintetasa) y a la GGT. Por otro lado, parece ser que compuestos tóxicos provocan la oxidación de LDL mediante la reducción del catión hierro; en ensayos in vitro, GGT purificada potenciaba esta cadena de reacciones. Además, estudios histoquímicos demostraron la localización simultánea de LDL oxidado y cierto tipo de leucocitos que expresan GGT en ateromas humanos (134).

\* Lieberman et al. lograron obtener ratones deficientes en GGT con genotipos (+/-) y (-/-); ambos tipos de ejemplares eran viables, por lo que la deficiencia en GGT no generaba un fenotipo letal. Los ratones de genotipo (+/-) presentaban una actividad GGT que era la mitad de la de ratones sanos, mientras que en los ratones (-/-) no se detectaba actividad GGT.

Los ratones (-/-) parecían normales en el momento del nacimiento; sin embargo, presentaban un desarrollo más lento (a las seis semanas presentaban un peso que era la mitad del de ratones normales) y una serie de alteraciones como inmadurez sexual (con hipoplasia de órganos sexuales), cataratas y color del pelo distinto del de los animales sanos. Los niveles de GSH en plasma y orina eran 6 y 2500 veces superiores, respectivamente, a los de los ratones normales, mientras que los niveles de GSH en tejidos como hígado, páncreas y ojos y los niveles de cisteína en plasma eran bajos. También se observó una disminución discreta de los niveles de glicina, así como unos niveles de GOT y GPT entre 4-5 veces superiores a los de ratones sanos, ligera hipoglucemia y una discreta elevación del BUN (nitrógeno ureico en sangre) (135). Las mitocondrias de los hepatocitos aparecían hinchadas; los niveles de GSH en el interior de éstas estaban disminuídos en un 50% o más con respecto a los animales sanos y los niveles de nucleótidos de adenina también estaban disminuídos en un 40% o más. Esta disminución del GSH mitocondrial se producía a medida que progresaba la enfermedad

y se traducía en una alteración de la respiración mitocondrial. Paralelamente, se observó la falta de reservas de grasa y glucógeno en los hígados de estos ratones deficientes en GGT, posiblemente en un intento de obtener el ATP necesario a partir de otras vías metabólicas (136). En cuanto a la función inmunitaria se observó una menor respuesta de los linfocitos T frente a diversos estímulos; esta falta de respuesta estaría mediada por alteraciones en el procesamiento de los antígenos y en el aprovisionamiento de cisteína por las células T, debido a los bajos niveles de GSH. Parece que la respuesta mediada por células B no se afectaba (137). En general, estos ratones morían a las 10-18 semanas; en algunos ejemplares que sobrevivieron hasta nueve meses se observaron lesiones neurológicas (135).

La adición de un suplemento de N-acetilcisteína (NAC) a partir de las tres semanas provocaba una clara mejoría del estado de los animales: se recuperaba la tasa de crecimiento y el color del pelo y el porcentaje de animales afectados por cataratas era menor (135). También se restauraba el contenido en GSH de las mitocondrias hepáticas, lo cual mejoraba la función respiratoria, y las reservas de grasa y glucógeno (136).

## **1.2 Distribución tisular**

La GGT se encuentra extensamente distribuída entre los seres vivos: desde bacterias a eucariotas complejos, tanto en plantas como en animales (108).

En mamíferos se halla ampliamente distribuída, encontrándose principalmente en tejidos con función secretora o de absorción: túbulo contorneado distal renal, cuerpo ciliar, vesículas seminales, intestino delgado, próstata, hígado, páncreas, glándula mamaria, pulmón, epéndimo, plexo coroideo y endotelio cerebral vascular (126,138). También se ha encontrado en células mononucleares activadas, linfocitos T (presentando los niveles más altos las células T activadas) y células T-memoria (130). La tabla 1 muestra la localización de esta enzima en tejidos humanos sanos, detectada por inmunohistoquímica (tomado y modificado de (139)):

**Tabla 1.**

<b>Tejidos y órganos</b>	<b>Células inmunopositivas para la GGT</b>
Sistema urinario	Células del túbulo proximal renal, estroma del epitelio transicional de la vesícula.
Sistema respiratorio	Bronquios, macrófagos alveolares.
Tracto digestivo	Conductos salivares, glándulas de la mucosa antral, criptas y epitelio del duodeno e íleon, células estromales del colon, macrófagos del apéndice, conductos y canalículos biliares, superficie del epitelio de la vesícula biliar, células acinares y conductos pancreáticos.
Sistema reproductor	Células de Sertoli y de Leydig de los testículos; epitelio y secreciones del epidídimo y de la próstata; epitelio de la vesícula seminal; células del Leydig y del estroma de los ovarios; epitelio de las trompas de Falopio; epitelio proliferativo y secretor del endometrio y secreciones; glándulas del cuello uterino y secreciones; conductos de la mama.
Sistema inmune	Tejido conectivo en torno a las arteriolas en el bazo; macrófagos de los ganglios linfáticos.
Sistema endocrino	Endotelio capilar de las glándulas suprarrenales y paratiroides; epitelio folicular del tiroides.
Sistema nervioso	Endotelio capilar del cerebro y de la médula espinal.
Otros	Glándulas sudoríparas, amnios y corion placentarios, células amnióticas del cordón umbilical.
Tejidos fetales	Túbulos proximales del riñón, epitelio intestinal, canalículos biliares, conductos pancreáticos, epitelio cortical de la corteza suprarrenal.

## 2. INTERÉS EN CLÍNICA

### 2.1 Patologías por alteración en la expresión de la GGT

Hay muy pocos casos descritos de deficiencia en GGT (con niveles indetectables o cero de GGT en sangre, orina y células nucleadas). Estos pacientes presentaban elevada glutacionuria y diferentes grados de elevación del GSH en sangre (glutacionemia). En algunos de estos casos se presentaba además retraso mental y/o trastornos de la conducta. (126,140). En estos pacientes se observó también un cierto grado de cistinuria, así como una elevación en la eliminación urinaria de  $\gamma$ -glutamilcisteína; esta observación llevó a sugerir que el papel fisiológico de la GGT estaría asociado al metabolismo y/o al transporte de compuestos azufrados (141).

### 2.2 Uso como marcador clínico de diversas patologías hepáticas, neoplasias y alcoholismo

Su interés en clínica radica más en su utilidad como marcador de distintas patologías que como origen de enfermedades metabólicas. Aunque se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, la actividad GGT en plasma se suele atribuir a la isoenzima hepática (125). Aumentos de los niveles de esta enzima en plasma se relacionan con desórdenes hepáticos y con consumo crónico de alcohol, aunque también aparecen aumentos aislados de actividad GGT en enfermedades pancreáticas, hipotiroidismo y ciertas enfermedades neurológicas. Cabe destacar que se pueden detectar varias isoformas de la GGT en suero, aunque no se determinan en los análisis de rutina: una, de elevado peso molecular (presente en suero normal y en algunas patologías hepáticas y del árbol biliar); otra, de peso intermedio, que a su vez presenta dos fracciones (también relacionadas con patologías hepáticas y del árbol biliar); finalmente, una tercera forma de bajo peso molecular, cuya importancia se desconoce (142).

En cuanto a su relación con enfermedad hepática, la valoración de GGT no aporta mucha información a la ya obtenida de los valores de GOT y fosfatasa alcalina. Sin embargo, es interesante en el caso de una elevación sérica de fosfatasa alcalina dudosa ya que, si la GGT también está elevada, entonces la fosfatasa alcalina es de origen hepático (125).

La GGT, junto a la proteína unidora de retinol y la  $\gamma$ -carboxiprotrombina, se han empleado como marcadores séricos en estudios de crecimiento de tumores hepatocelulares, restablecimiento de hepatectomías parciales y regeneración de necrosis hepáticas parciales. Aunque la  $\alpha$ -fetoproteína se ha utilizado muchísimo más en clínica como marcador sérico de regeneración hepatocelular, se ha indicado el interés que tendría la medición de los valores de los otros tres marcadores, entre ellos la GGT, en la predicción del desenlace final en pacientes con necrosis hepática aguda. En concreto, la medida secuencial de marcadores séricos de necrosis junto con la de marcadores de regeneración ( $\alpha$ -fetoproteína y GGT, ya que los métodos de valoración de la proteína unidora de retinol y la  $\gamma$ -carboxiprotrombina no están disponibles en todos los laboratorios) permitiría conocer la evolución de la crisis y si se está o no restableciendo la función hepática (143).

Recientemente, se ha señalado el cociente GGT/ALT (alanina-transaminasa) como un parámetro predictivo válido del pronóstico para la respuesta virológica inicial de la hepatitis C crónica, en combinación con el genotipo de virus de la hepatitis C. La combinación de

estos dos parámetros parece que permite, de manera bastante fiable, discriminar entre pacientes que responden a la terapia con interferón- $\alpha$  de aquellos que no eliminan el virus de la circulación (144).

La relación de la GGT con consumo crónico de alcohol es bastante discutida. La utilización de la GGT como marcador de consumo crónico de alcohol en población general no es seguro, ya que pueden encontrarse falsos positivos (en individuos que toman sustancias que son inductoras enzimáticas) y falsos negativos (ya que, en individuos con consumo crónico de alcohol pero sin enfermedad hepática asociada, sólo cerca de la mitad presentan niveles altos de GGT y estos niveles descienden tras varias semanas de abstinencia). Sólo en pacientes con consumo crónico de alcohol y enfermedad hepática se detectan niveles elevados de GGT, seguramente debido a la inducción enzimática por el alcohol y a la enfermedad hepática; en estas personas los niveles de GGT tienden a mantenerse altos tras períodos de abstinencia. También hay que considerar que la elevación de GGT no se correlaciona con la cantidad de alcohol consumido ni con el tiempo de consumición, así como, tampoco con el grado de daño hepático (más bien indica inducción enzimática). De todas formas se considera que las elevaciones de GGT pueden ayudar al diagnóstico de enfermos que presentan cuadros de hepatitis pero niegan consumo de alcohol (125).

Su aparición en orina se debe, normalmente, a daño tubular renal, ya que se trata de una enzima que no se filtra en condiciones normales a nivel de glomérulo. Sin embargo, su utilización, junto con otros enzimas como la fosfatasa alcalina y la lactato deshidrogenasa, como marcador proteico de alto peso molecular de daño tubular renal está limitado debido a su inestabilidad en la orina y a la presencia de inhibidores enzimáticos (125).

Fisiológicamente, se observa, a veces, un aumento de la GGT plasmática en el último trimestre del embarazo. Sin embargo, en un pequeño porcentaje de mujeres esta tendencia es exagerada, llegando a desarrollar ictericia y/o prurito; estos síntomas desaparecen poco tiempo después del parto. A este síndrome se le ha denominado colestasis intrahepática del embarazo, y puede repetirse en posteriores embarazos o en exposición a estrógenos (125).

Igualmente es de interés como marcador de lesiones preneoplásicas y cáncer en estudios con animales (119). En humanos se detecta aumento de GGT en diversos tipos de cáncer (126). La presencia de isoformas de la GGT que poseen una parte glucídica diferente de la de la enzima normal en suero de pacientes con carcinomas hepatocelulares, ha hecho que se empleara como marcador en el diagnóstico de este tipo de cáncer (145). Sin embargo, otros autores consideran a la  $\alpha$ -fetoproteína como un marcador clínico de cáncer hepático más específico y sensible que la GGT (146, 147).

Recientemente, se ha identificado una diferencia en el tipo de ARNm presente en tejido hepático normal y canceroso: mientras que en carcinomas hepatocelulares predomina el ARNm identificado en células HepG2, en hígado normal o patológico, pero no canceroso, se detectan los ARNMs presentes en hígado fetal y/o placenta. Además, este cambio parece que ocurre en fases temprana o preneoplásicas, lo cual sería de interés en el diagnóstico de la enfermedad en sus inicios (145).

En farmacología clínica, la GGT sérica se ha usado como marcador de inducción enzimática por fármacos (108).

### 3. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA GGT

Dependiendo de la especie, la organización del gen varía. Así, en el hombre se han localizado *loci* génicos de la GGT en los cromosomas 18, 20 y 22: se trata, pues, de una familia multigénica de la cual sólo un gen se expresa de manera ubícuo y otros cuatro son tejido-específicos (148,149).

En el ratón y en la rata la situación es, aparentemente, más sencilla, pues la GGT se transcribe a partir de un único gen. Sin embargo, este gen se encuentra bajo el control de diversos promotores, los cuales dan lugar a la generación de ARNm's que poseen la misma secuencia codificadora pero difieren en sus extremos 5' no traducidos. La proteína codificada es muy similar, ya que las secuencias nucleotídicas predicen un 95% de identidad para los aminoácidos (150,126). En concreto, en el caso del ratón se han descrito, hasta la fecha, diversos ARNm's generados por la actividad de 7 promotores (151,152). En la rata, el único gen para la enzima se transcribe desde, al menos, cinco promotores diferentes, originando siete ARNm's que difieren en sus regiones 5' no traducidas (153-155).

Tanto en la rata como en el ratón, la transcripción desde estos promotores es específica de tejido y también varía durante el desarrollo, así como en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas (156,157).

A continuación se hará una breve descripción de los genes de la GGT en estas tres especies.

#### 3.1 La familia génica de la GGT humana

Esta familia está compuesta por siete genes, con un 92% de identidad (158). Ninguno de estos genes ha sido completamente descrito hasta la fecha, conociéndose, solamente, secuencias de la región codificante y, en parte, algunas secuencias de la región 5'; la homología de las secuencias de estos genes hace suponer que la duplicación génica ha sido reciente (159). Actualmente, se sabe que el gen 6 se expresa de forma ubícuo, transcribiéndose en tejidos como hígado fetal y adulto, hepatoma, placenta, riñón fetal y páncreas. A parte del gen 6, otros cuatro genes se expresan de forma específica en diversos tejidos: el gen 1 se expresa en placenta y sigmoide; el gen 2, en la sigmoide; el gen 3, en placenta, sigmoide y tiroides; y, finalmente, el gen 13 se encuentra en cerebro fetal, placenta, sigmoide y tiroides (126,148).

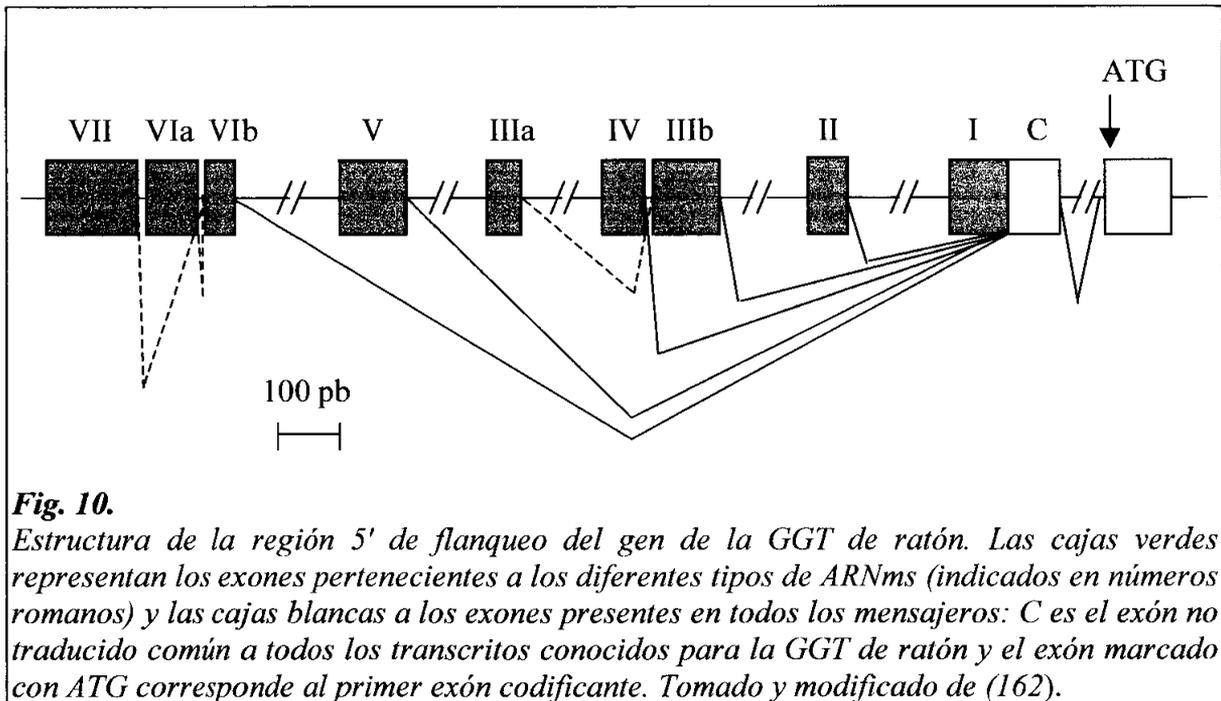
Se han identificado tres tipos de ARNm's en humanos: tipos I, II y III. De entre ellos, el tipo I sería originado por el gen 6 y se trata, en realidad, de un conjunto de ARNm's que se caracterizan por poseer un mismo marco de lectura abierto, con un 79% de homología con el ADNc de la GGT de rata; se cree que son los únicos mensajeros capaces de codificar para una enzima activa, ya que se carece de datos suficientes sobre los ARNm's de tipo II y III (159). Sus regiones 5' no son idénticas, sino que poseen exones comunes y otros específicos, seguramente debido a un corte y empalme alternativos; esto hace sospechar una situación similar a la del gen de la rata y el ratón, en la que se generan diferentes regiones 5' no traducidas a partir de distintos promotores.

También, se han identificado unos ARNm de tipo I cuyos ADNcs contienen una inserción de 22 pb en la región codificante (160). Este tipo de ARNm posee dos marcos de lectura abiertos, que generarían dos proteínas que no se han podido detectar hasta la fecha (159).

Finalmente, se ha encontrado en pulmón un ARNm de tipo I truncado, caracterizado por no tener la región 5' de los otros ARNm de tipo I, sino que presenta tres dominios que, parece ser, sufren un corte y empalme alternativos. De estos dominios, el situado en 3' tiene una secuencia idéntica a las 22 bases insertadas citadas más arriba. Este ARNm de tipo I daría lugar a una GGT truncada que sólo tiene la subunidad ligera y parte de la subunidad pesada y que no parece tener actividad. Este ARNm coexiste con otro idéntico a los de tipo I aislados previamente en hígado y placenta, pero con una región 5' particular (161).

### 3.2 La GGT de ratón

Se trata de un gen de copia simple bajo el control de, al menos, siete promotores (fig. 10), los cuales se extienden a lo largo de las 10 Kb inmediatamente anteriores al primer exón codificante (162).



**Fig. 10.**

*Estructura de la región 5' de flanqueo del gen de la GGT de ratón. Las cajas verdes representan los exones pertenecientes a los diferentes tipos de ARNm (indicados en números romanos) y las cajas blancas a los exones presentes en todos los mensajeros: C es el exón no traducido común a todos los transcritos conocidos para la GGT de ratón y el exón marcado con ATG corresponde al primer exón codificante. Tomado y modificado de (162).*

Estos promotores se expresan con diferente especificidad según el tejido o la etapa de desarrollo y se caracterizan por los elementos indicados en la tabla 2. Los ARNm que se generan codifican todos para la misma proteína y poseen un exón no traducido común a todos, además del o de los exones específicos de cada tipo. En la región codificante no se han detectado variantes por corte y empalme o lugares de poliadenilación alternativos (126).

**Tabla 2.**

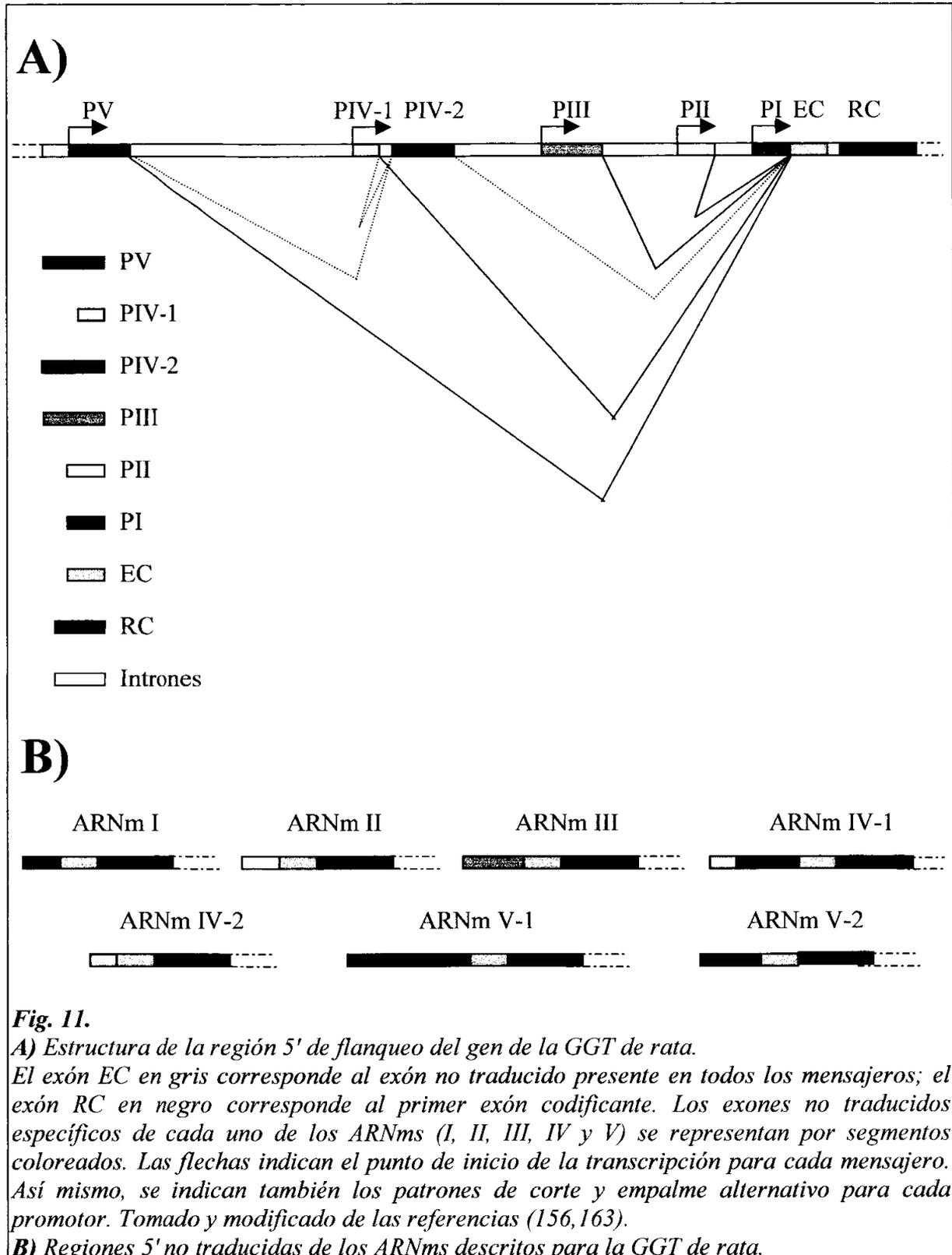
Promotor	Localización tisular	Características
I	riñón adulto y fetal intestino delgado cuerpo ciliar glándula mamaria	*Sin caja TATA ni Iniciador *Sitios de inicio de la transcripción múltiples a lo largo de 40-60 pb
II	riñón adulto y fetal epidídimo glándula mamaria	*Sin caja TATA ni Iniciador *Sitios de inicio de la transcripción múltiples a lo largo de 40-60 pb
III	riñón adulto y fetal hígado fetal páncreas glándula mamaria	*Secuencia rica en pirimidinas en torno a +1 *Sitio de inicio de la transcripción único
IV	riñón adulto y fetal epidídimo glándula mamaria	*Secuencia rica en pirimidinas en torno a +1 *Sitio de inicio de la transcripción único
V	riñón adulto y fetal intestino delgado vesículas seminales	*Contiene caja TATA *Sitio de inicio de la transcripción único
VI	riñón adulto y fetal intestino delgado pulmón páncreas glándula mamaria piel	*Sin caja TATA ni Iniciador *Sitios de inicio de la transcripción múltiples a lo largo de 40-60 pb
VII	intestino delgado	Sin caracterizar

### 3.3 La GGT de rata

Como se muestra en la figura 11A, la organización del gen en esta especie es similar a la del ratón: hay una única región codificante a la que preceden diversos promotores específicos de tejido, los cuales generan ARNms con diferentes regiones 5' no traducidas (fig. 11B).

Las regiones 5' y los exones no codificantes de los ARNms de tipo I y II presentan una elevada identidad con los de ratón, aunque los sitios de inicio de la transcripción son diferentes para el tipo II. El promotor III contiene secuencias homólogas a las del tipo IIIb de ratón, pero cada uno inicia la transcripción en lugares diferentes (en el ratón, en la región

situada más arriba del tipo IV, y en la rata, en una región que correspondería a la zona donde se sitúa el promotor IV de



ratón) (152,155).

Las características de estos promotores son las siguientes:

\* **Promotor I:** Genera un ARNm de 2,2 Kb (153) y se caracteriza por carecer de caja TATA y del elemento iniciador de la transcripción: ésta se inicia desde tres puntos distintos, muy próximos entre sí (164). Sin embargo, no se le considera como un gen doméstico, pues está sujeto a una regulación muy fuerte: prácticamente inactivo en hígado adulto frente a un elevado grado de expresión en las células del túbulo proximal del riñón. Esta tasa de expresión es inversamente proporcional al grado de metilación del gen (165). Esta secuencia promotora presenta una gran identidad con la región 5' del ARNm I de ratón (156).

Entre los posibles elementos *cis* detectados, cabe señalar la existencia de dos cajas CCAAT (en las posiciones -136 y -605), así como de un lugar de unión para el factor AP-2 (entre -13 y -6) (164).

Rajagopalan et al. (154) también clonaron este promotor, dando una secuencia que discrepa en algunas bases. Por este motivo, ellos describieron la presencia de dos sitios Sp1 a -101 y a -746, la secuencia a -450 similar a los potenciadores del SV40 y del virus del poliovirus y las cajas CCAAT a -136 y en torno a -600.

\* **Promotor II:** Este promotor posee una secuencia muy similar a la del ARNm II de ratón (156). Tiene una secuencia TAAT a -26, por lo que se le considera como un promotor con caja TATA, aunque el inicio de la transcripción se dé en varios sitios. Como secuencias reguladoras se han considerado varios elementos ATTG que podrían unir factores del tipo CTF, secuencias para AP-2 (-350), Sp1 (-80) y AP-1 (-47), además de un elemento de respuesta a glucocorticoides (-224) (166).

\* **Promotor III:** Da lugar a un ARNm de 2,4 Kb que se expresa en tumores de hígado de rata inducidos por carcinógenos y en células epiteliales de hígado de rata transformadas por el oncogen *ras* (155) que es, también, el más abundante en hígado fetal (126,167). Este ARNm III presenta una gran homología con el ARNm IV de ratón (156).

En su secuencia se observa un motivo invertido repetido capaz de formar una estructura estable, posiblemente reconocida por proteínas reguladoras (155).

Por otro lado, se ha indicado la existencia de una secuencia consenso para el elemento de respuesta a glucocorticoides, de la mitad de uno de estos elementos del receptor de glucocorticoides (en total, tres hexámeros situados entre -1418 y -1377), de una caja CCAAT (a -750), de un lugar de unión para AP-2 (-152), de un elemento de respuesta a antioxidantes (-28) y de dos secuencias que se solapan para los factores NF-1 y NF-Y (de -127 a -102) (155). Éstos últimos están implicados en la expresión de genes específicos de hígado.

El hecho de que la expresión de este mensajero decaiga en el hígado tras el nacimiento ha sugerido que la transcripción de este mensajero estaría bajo el control metabólico de los niveles intracelulares de cisteína o del estado redox de la célula. Una disminución similar del transcrito III se observa también en la glándula mamaria durante el destete (155).

\* **Promotor IV:** Da lugar a un pre-ARNm que origina, por corte y empalme alternativos, dos ARNm de 2,5 Kb (ARNmIV-1) y de 2,2 Kb (ARNmIV-2). Esta región reguladora muestra una gran homología con el ARNm VI de ratón (156).

Este promotor muestra una fuerte regulación específica de tejido y/o tipo celular, siendo, por ejemplo, mayoritario en el segmento inicial del epidídimo, en donde se hallaría regulado por andrógenos y otros factores específicos de tejido (168,169).

Se han descrito secuencias de unión para el factor PEA-3 (múltiples sitios a lo largo de la secuencia (156, 170)), una caja CCAAT (-79) y secuencias consenso para AP-1 (+17) y para Sp1 (adyacente al sitio PEA-3 situado a -22) (171), entre otros elementos.

\* **Promotor V:** Este promotor se encuentra situado a 10 Kb del sitio de inicio de la transcripción para el ARNm IV. Como en el caso anterior, también aquí se genera un transcrito primario que da lugar, por corte y empalme alternativos, a dos ARNm de 2,6 Kb (ARNmV-1) y 2,3 Kb (ARNmV-2). Este promotor parece expresarse solamente en células no diferenciadas de hepatoma, requiriendo la unión de la proteína AP-1 y del factor nuclear hepático HNF-3 (163). También hay una secuencia de unión para AP-2.

No se ha encontrado un promotor homólogo en el gen de la GGT del ratón.

Para Nomura et al. (163), el hecho de que este promotor se transcriba en dos líneas celulares desdiferenciadas, derivadas de dos hepatomas diferentes, y de que no se haya encontrado en otras líneas celulares diferenciadas, les permite justificar la teoría de la ontogénesis bloqueada: las células tumorales se derivan de células desdiferenciadas que se han desviado del programa de desarrollo normal. Se ha apuntado la posibilidad de que este promotor estuviera activo en las células precursoras del hígado antes de que se diferenciaran en los linajes celulares que originan los hepatocitos y las células biliares, basándose en la observación de la elevada actividad GGT que se detecta en los estadios más tempranos de la embriogénesis.

La tabla 3 muestra las principales características y localización tisular de los promotores de rata (159,163).

**Tabla 3.**

Promotor	Localización tisular	Características
I	riñón (173,155) pulmón fetal (172)	*Sin caja TATA ni Iniciador
II	riñón (173,155) epidídimo (168,169) pulmón fetal (172)	*Con caja TATA
III	riñón (173,155) hígado adulto (173) y fetal (155) epidídimo (168,169) vesículas seminales (153) pulmón adulto y fetal (172) glándula mamaria (lactancia)(155)	*Sin caja TATA *Dependiente de Iniciador
IV	hepatoma HTC (156) epidídimo (168,169) intestino delgado (156)	*Sin caja TATA ni Iniciador
V	hepatoma HTC (163) y H5 (163)	*Con caja TATA

#### 4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GGT

La GGT es una enzima ampliamente distribuída, presente en muchos tejidos. Sin embargo, y, sobre todo, en la rata y el ratón, en donde existe un único gen que codifica para una única proteína, resulta sorprendente la existencia de tantos promotores (126). La expresión de la GGT es específica de tejido y varía durante el desarrollo, durante la generación y la evolución de un cáncer, e, incluso, entre diferentes regiones dentro de un mismo tejido (169). Hay tejidos en los que se expresan todos (o casi todos) los promotores existentes en esa especie; por el contrario, y hasta la fecha, hay tejidos en los que sólo se expresan uno o dos de estos promotores (126). En el caso de los humanos forma parte de una familia multigénica y se sospecha que alguno de los genes mejor conocidos poseen también varios promotores.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la alteración en la expresión de la enzima o la generación de diferentes isoformas en función de estímulos de origen diverso (fármacos, estrés, etc.) o de situaciones fisiopatológicas concretas (durante el desarrollo embrionario, neoplasias, etc.).

Todos estos motivos han llevado a la descripción de diversos mecanismos de control de la expresión para esta enzima, en los cuales parecen estar implicados diversos factores transcripcionales y secuencias *cis*:

\* Los niveles de ARNm para la GGT de rata son elevados en hígado fetal y disminuyen en hígado adulto, mientras en tejido renal, la expresión de la GGT aumenta durante el desarrollo (174). Un aumento de la actividad GGT se ha observado también en hepatocarcinoma (119), mientras que una actividad baja se observa en cáncer de riñón o neoplasia del páncreas. Se suele entender mejor la disminución de la actividad GGT expresada en hígado tras el nacimiento, al asimilarla a la desaparición o disminución en la expresión de otras proteínas, como la  $\alpha$ -fetoproteína (126) o las cadenas  $\gamma$ ,  $\zeta$  y  $\epsilon$  de las hemoglobinas fetal y embrionaria (176).

Algunos autores indican la posibilidad de que su aumento en procesos carcinogénicos se deba a la aparición de clones celulares que expresan la enzima y el aumento, tras el nacimiento, de los niveles de enzima en riñón, al aumento en el número de células del túbulo que expresan esta actividad por unidad de peso de tejido (126).

\* Diversos autores han estudiado el estado de metilación del gen de la GGT de rata. Baik et al. han encontrado una progresiva metilación del gen, en el hígado, durante el desarrollo: en el hígado fetal, está parcialmente desmetilado y es activo; en el adulto, está altamente metilado; en el neonato, el estado de metilación sería intermedio. Sin embargo, en el análisis de tumores, no encontraron ninguna correlación entre el grado de metilación y la expresión del gen; además, el patrón de metilación del gen en tumores era diferente del de hígado fetal (176). Coloma et al. hallaron que la región 5' del promotor I estaba completamente metilada en hígado adulto, mientras que en riñón, en donde se expresa este promotor, está desmetilada (165). Posteriormente, Baik et al. determinaron que, en riñón, el patrón de metilación en el feto y en recién nacido es complejo; en el adulto, los sitios CpG de la región 5' están desmetilados, pero no todos (173). Estos resultados implican que, además de la metilación, deben haber otros factores implicados en la regulación de estos promotores en los tejidos estudiados.

\* Se ha señalado la posibilidad de que tal variedad de promotores tenga su importancia a nivel de la traducción, en tanto en cuanto se generan diferentes regiones 5' que pueden adoptar diferentes estructuras secundarias que se ha visto que pueden influenciar la traducción (23) o que pueden ser reconocidas por diferentes proteínas implicadas en la traducción.

Así, se ha descrito que el promotor III de rata genera una región 5' en el correspondiente ARNm capaz de formar una estructura en lazo (*stem loop*) que podría estar implicada en una regulación a nivel de la traducción (172). En la región 5' del ARNm de la GGT de HepG2 hay una estructura similar que funciona como un potenciador de la traducción, específico de tejido (177). En cambio, esta estructura no se presenta en los tipos I y II de rata (155).

\* La actividad GGT aumenta tras la administración de muy diversas sustancias, tales como drogas, carcinógenos, hormonas y etanol (177), lo cual implica una activación transcripcional en respuesta a sustancias exógenas y tóxicos.

\* En pulmón de rata, el oxígeno parece controlar la expresión de los promotores I, II y III: el promotor I, por un mecanismo no dependiente de proteínas unidoras de hemo y quizás mediado por un elemento de respuesta antioxidante (172); el promotor II, por un

mecanismo dependiente de una proteína unidora de hemo, que respondería a oxígeno; el promotor III, parece que se regularía por un elemento de respuesta al oxígeno. Por otro lado, el estrés oxidativo parece que también estaría implicado en una expresión diferencial del ARNm IV de la GGT de rata en el segmento inicial del epidídimo (178).

\* También se ha hablado en muchos casos de la posibilidad de FTs específicos de tejido, de célula o de estado de desarrollo que controlarían la expresión del gen de laGGT. Entre los muchos ejemplos que hay, podemos citar el promotor II de ratón, para el que se ha sugerido la implicación de FTs que actuarían potenciando o reprimiendo la transcripción (179). También los ARNm II, III y IV de rata se encuentran regulados por factores testiculares (169). Lan et al. han sugerido que la proteína PEA3 (*polyomavirus enhancer activator 3*), la cual también está regulada por factores testiculares, podría estar implicada en la activación específica de célula del promotor IV de la GGT de rata, seguramente en conjunción con otros factores específicos del epidídimo, así como de FTs como el Sp1 y, quizás también, factores de crecimiento y andrógenos (171).

Recientemente se ha descrito para la GGT humana un promotor intrónico, responsable de la generación de ARNms truncados de manera específica de tejido (180).

\* Otra posibilidad que se ha apuntado es que, según el promotor, la enzima generada desempeñe una función u otra, sea conocida o desconocida en la actualidad (126); en este sentido se ha sugerido que, en función del sustrato de la enzima presente en un momento dado, se generaría una señal a partir de uno de los promotores existentes, que desencadenaría la expresión de una GGT con una función concreta.

## 5. GGT Y CÁNCER

Según indican Hanigan y Pitot (119) la primera evidencia de una relación entre carcinogénesis y GGT fue hecha por Fiala et al. en 1972 (181). Desde entonces se ha encontrado una inducción de la GGT en tumores de diversa índole.

En ratas tratadas con agentes carcinogénicos, la GGT se induce tanto en las lesiones preneoplásicas como en tumores hepáticos; sin embargo, en ratones no se suele detectar esta enzima en tumores hepáticos. Lo mismo ocurre cuando se cultivan hepatocitos de ratón en las mismas condiciones en las que se induce la GGT en hepatocitos en cultivo de rata. Además, el ARNm que se encuentra en la rata en ambos casos (cultivo y tumores) es el de tipo III (182).

Se han sugerido diversas implicaciones de la GGT en los procesos tumorales. Diferentes observaciones (aumento de niveles de GGT en tejidos neoplásicos que poseen baja actividad GGT cuando son normales y viceversa) sugieren que el papel de la GGT en los procesos de generación de cánceres malignos es complejo y puede ser diferente según los tejidos (126).

Por un lado, se ha sugerido que la GGT otorga una ventaja a las células tumorales al permitirles adquirir niveles altos de GSH intracelular, necesarios para el crecimiento de las células (119). Esta observación se ha corroborado en los últimos años, al observar que tumores con células que expresan GGT tienen una ventaja selectiva de crecimiento *in vivo* en

comparación con células tumorales que no expresan la enzima, ya que, las primeras pueden utilizar el GSH del medio extracelular como una fuente secundaria de cisteína, superando la restricción al crecimiento que suponen los niveles séricos de cisteína (183). También se ha observado que, mientras en la mayoría de tejidos normales, la GGT se encuentra localizada en la superficie celular de conductos y glándulas (de manera que no tiene acceso al GSH del suero o del líquido intersticial), en las células tumorales, como no están polarizadas, expresan la enzima en toda su superficie, pudiendo catabolizar el GSH del líquido intersticial (184).

Por otro lado, también se ha apuntado la posibilidad de que el metabolismo del GSH mediado por la GGT podría desencadenar una serie de procesos que desembocarían en un daño oxidativo que contribuiría a la progresión de la enfermedad en focos preneoplásicos hepáticos (185).

Recientemente, se han correlacionado niveles elevados de actividad GGT y niveles elevados de GSH intracelular en células tumorales con resistencia a quimioterápicos (184). Estos autores, analizando la actividad GGT en muestras de tumores humanos de diverso origen (que no habían recibido tratamiento antes de la biopsia), encontraron que las células que eran positivas para la actividad GGT se encontraban, sobre todo, en carcinomas (concretamente, en cerca del 70% de este tipo de tumores). Entre los cánceres que eran negativos para la GGT encontraron mesoteliomas, melanomas, carcinomas de células basales y muchos sarcomas. El hecho de que la GGT se induzca en tumores de animales expuestos durante largos períodos a agentes tóxicos, lleva a estos autores a pensar en la posibilidad de que el aumento de la GGT en ciertos cánceres humanos se deba a la exposición a tóxicos desconocidos. Por otro lado, el conocimiento de aquellos tumores que expresan GGT puede ser de utilidad a la hora de determinar el papel de la GGT en la resistencia de algunos tumores a determinados fármacos quimioterápicos (184).

En cuanto a su uso como marcador tumoral, para Yao et al. (186) la alteración de los niveles séricos de GGT específica de hepatoma es un marcador de cáncer sensible para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular y la elevada expresión de GGT en el carcinoma hepatocelular podría estar relacionado con el grado de hipometilación de los sitios CCGG de los genes para la GGT. Sin embargo, los niveles de GGT sérica son independientes de la expresión de GGT del tumor; además, no hay relación entre la expresión de GGT y otros factores pronósticos (184).

## **6. CONSIDERACIONES FINALES**

Como se puede concluir de todo lo expuesto en los apartados anteriores, el gen de la GGT posee una estructura y una regulación complejas. En organismos como la rata y el ratón se han secuenciado múltiples promotores sometidos a una complicada regulación y en el hombre se han caracterizado diversos genes y pseudogenes, que constituyen una familia génica. En cuanto a la regulación, cada tejido expresa de modo diferencial los diversos promotores (en el caso de la rata y el ratón) o los diferentes genes (en el caso del hombre) descritos. Esta expresión diferencial se produce no sólo a lo largo del desarrollo fetal y de la etapa adulta, sino también en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, como por ejemplo el cáncer. Esta complejidad en estructura y regulación del gen de la GGT lo convierte en un buen modelo para el estudio de la expresión génica.

El análisis de la regulación de las diferentes regiones promotoras del gen de la GGT de rata es fundamental para comprender el papel de esta enzima, no sólo a nivel fisiológico, sino también en los procesos que desencadenan la aparición y el desarrollo de tumores. Este estudio no sólo permitiría el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la expresión-represión de los genes en diferentes situaciones fisio-patológicas, sino también la aplicación de ese conocimiento en el diseño de nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de aquellas enfermedades debidas a la alteración de los mecanismos fundamentales de regulación de la expresión génica.

## **OBJETIVOS**



En esta Tesis Doctoral se han estudiado los posibles mecanismos de regulación de la expresión del promotor I del gen de la GGT de rata a nivel de la transcripción, sin considerar otros puntos de regulación indicados en la introducción, como son la estructura y características de los ARNm's generados (eficiencia en la traducción, semivida de la molécula de ARNm, ...), el papel de la membrana nuclear en el control de la expresión del gen (en tanto en cuanto es la barrera que han de franquear las señales activadoras e inhibidoras de la transcripción y los ARNm's que van a ser traducidos) o el proceso de la traducción.

La estructura del gen de la GGT de rata, así como el patrón de expresión durante el desarrollo y en diferentes tejidos y órganos, ha favorecido la utilización de este gen como modelo de estudio en cuanto a los mecanismos de regulación de la transcripción.

Este estudio de la regulación del promotor I del gen de la GGT de rata se ha efectuado desde algunas de las diferentes aproximaciones experimentales existentes para el análisis de la expresión de promotores eucariotas a nivel de la transcripción.

Los objetivos propuestos fueron los siguientes:

**1) Detección y caracterización de factores de transcripción nucleares específicos** (187).

**2) Estudio *in vitro* de la actividad, expresión y regulación de diferentes zonas del promotor** con el fin de delimitar zonas reguladoras positivas o negativas en la región 5' de flanco del gen de la GGT de rata.

**3) Estudio de algunos de los niveles de regulación** en la transcripción:

\* Metilación de citosinas presentes en dinucleótidos 5'-CG-3' y su papel represor de la transcripción.

\* Modificaciones post-traduccionales (fosforilación, glicosilación) de los factores nucleares y su posible efecto en la regulación de la actividad transcripcional de estas proteínas.

\* Interacciones cromatina-factores nucleares, puesto que el ADN no se encuentra libre en el interior del núcleo celular, sino empaquetado en cromatina y es con ella con la que interactúan los diversos factores transcripcionales.

\* Respuesta de la célula a señales exógenas (exposición a diversas sustancias) a través de la alteración de la expresión del gen de la GGT.

**4) Implicación de todos los elementos estudiados en la regulación del gen de la GGT a nivel de la transcripción.**



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1 Cepas bacterianas

*E. coli*:

\* DH5 $\alpha$   $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169.

\* JM109 *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15].

### 1.2 Líneas celulares

\* NRK: ECACC 86032002; células derivadas de fibroblastos de riñón normal de rata (*Rattus norvegicus*).

\* H5-6: células derivadas de la línea H4-II-E-C3 (ECACC 85061112), la cual se deriva de las células de hepatoma Reuber 35.

La línea NRK fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% SBF y 1% Antibiótico/Antimicótico (Sigma). La línea H5-6 fue cultivada en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SBF, 1% Antibiótico/Antimicótico (Sigma), 1% de L-glutamina (Sigma). Ambas fueron cultivadas en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, en una estufa Heraeus, modelo B5061 EK/O<sub>2</sub> o en una estufa modelo IG 150 de Jouan.

### 1.3 Insectos

\* *Drosophila melanogaster*.

### 1.4 Animales

\* Ratas macho de la raza Wistar de 150-200 gr de peso.

\* Conejos macho albinos de la raza New Zeland, de 2-3 Kg de peso.

## 2. VECTORES, SONDAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

### 2.1 Vectores

Los diferentes plásmidos utilizados a lo largo de este trabajo son los descritos a continuación (fig. 12):

- pUC18/19: Empleados en las construcciones utilizadas en los ensayos de transcripción *in vitro* (apartado 19). En la figura 12 se muestra el pUC18; el pUC19 contiene el sitio de clonaje múltiple (SCM) en la orientación inversa.

- pTZ18/19R (Pharmacia): plásmidos originales en los que se encontraban los diferentes fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata empleados en este estudio. En la figura se muestra el pTZ18R; el pTZ19R contiene el SCM en la orientación inversa.

- pGL3-Control (Promega): Control positivo de expresión en los ensayos de transfección de líneas celulares (apartado 14).

- pGL3-Enhancer (Promega): Se empleó en los experimentos de transfección de líneas celulares como control negativo y como portador de los diferentes fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata (apartado 14).

- pCR<sup>TM</sup> II (Invitrogen): Empleado en la preparación de uno de los vectores utilizados en los ensayos de transfección de líneas celulares (apartado 2.2).

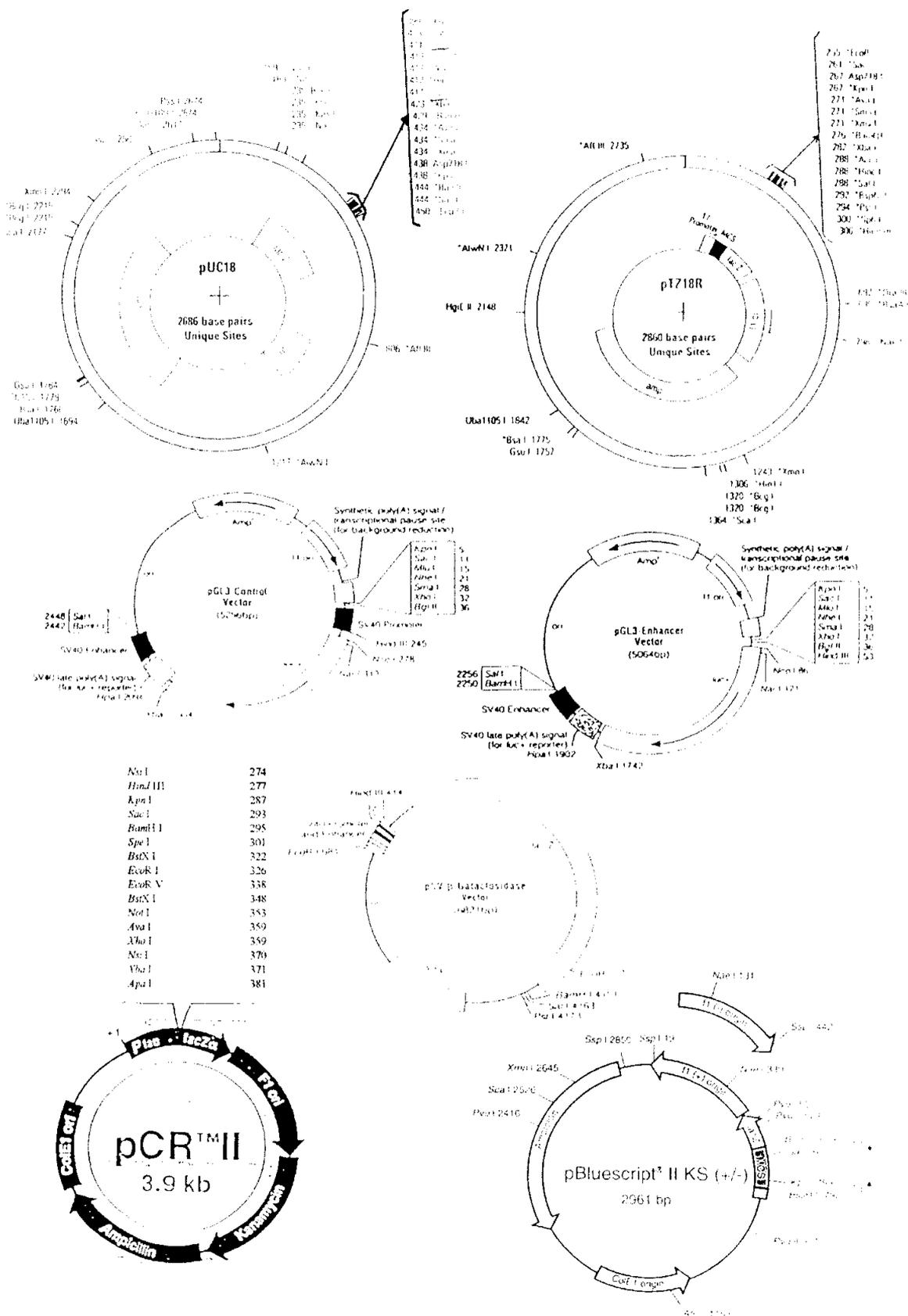
- p $\beta$ gal: Con el fin de tener una medida de la eficiencia de la transfección (apartado 14), se cotransfectaron las células con este plásmido, el cual posee el gen de la  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor SV-40.

- pBluescript<sup>®</sup> II KS (+/-) (Stratagene): empleado en los ensayos de ensamblaje de cromatina (apartado 12), este plásmido (derivado de pUC19) lleva insertadas diecinueve secuencias GAGA (188).

-  $\phi$ X174 (no se muestra en la figura 12): plásmido empleado en la titulación de los extractos de embriones tempranos de *Drosophila* y en las reacciones de ensamblaje de cromatina con estos extractos (apartado 12).

**Fig. 12.**

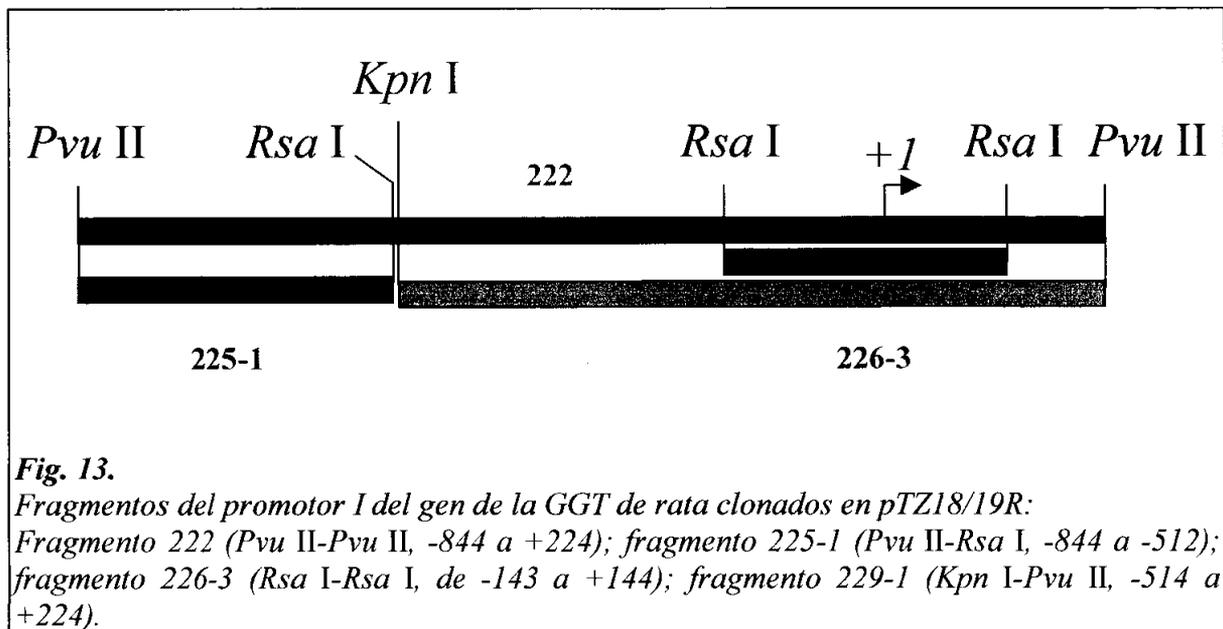
*Plásmidos utilizados a lo largo de este trabajo. Se indican las enzimas de restricción que cortan en los SCM de cada plásmido.*



<i>Nco</i> I	274
<i>Hind</i> III	277
<i>Apa</i> I	287
<i>Sac</i> I	293
<i>Bam</i> HI	295
<i>Spe</i> I	301
<i>Bst</i> XI	322
<i>Eco</i> KI	326
<i>Eco</i> RV	338
<i>Bst</i> XI	348
<i>Not</i> I	353
<i>Ava</i> I	359
<i>Xho</i> I	359
<i>Xba</i> I	370
<i>Xba</i> I	371
<i>Apa</i> I	381

## 2.2 Sondas

Se han empleado diferentes fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata clonados en los plásmidos pTZ18R y pTZ19R (fig. 11): sonda 229 insertada en el sitio *Kpn* I (pTZ18R-229), sondas 222, 225-1 y 226 insertadas en el sitio *Sma* I (pTZ19R-222, pTZ19R-225-1, pTZ19R-226) (fig. 13).



\* Para los experimentos de transcripción *in vitro*, los fragmentos originales clonados en los plásmidos pTZ18R o pTZ19R fueron subclonados en el vector pUC18, obteniéndose las construcciones: ABC (pUC18 con el fragmento 222) y A (pUC18 con el fragmento 226).

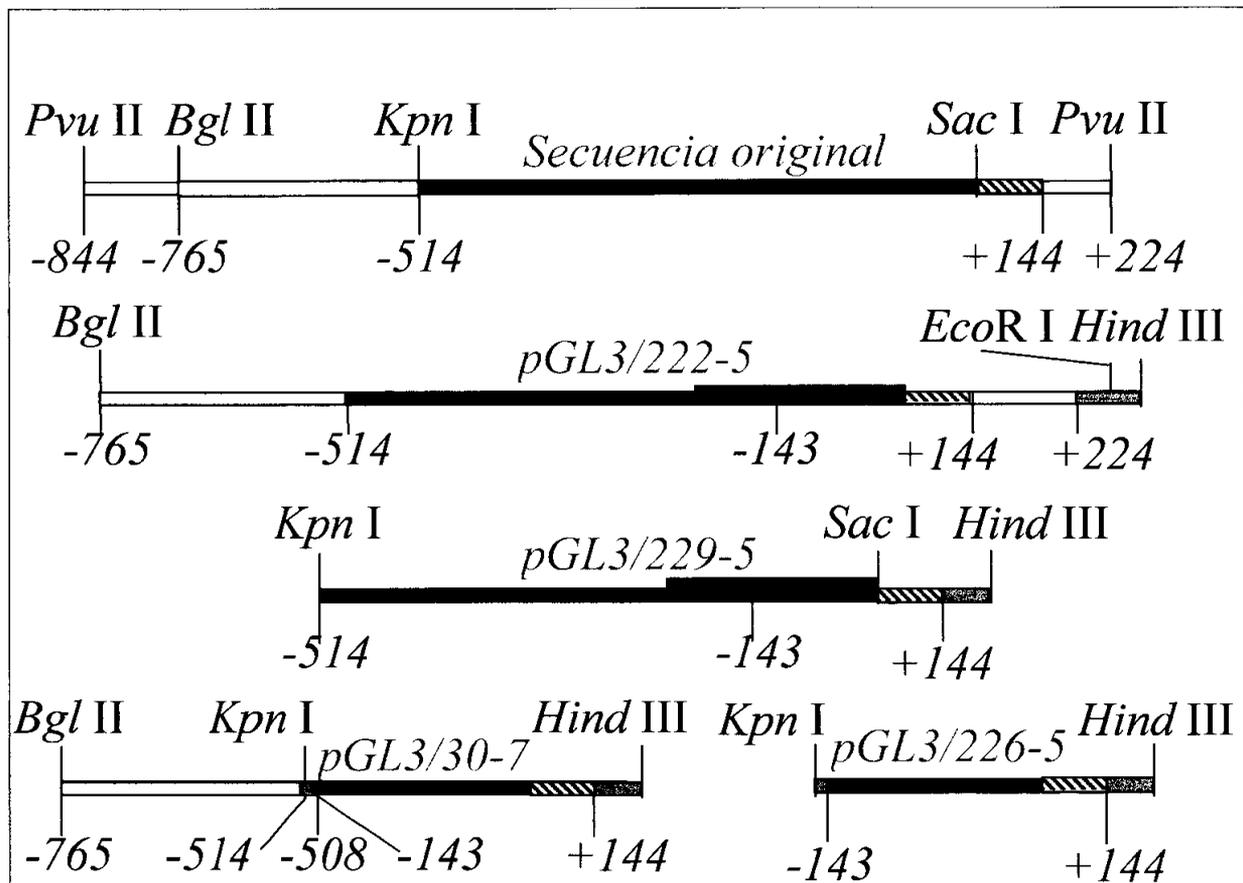
La construcción AC consistía en un promotor deleciónado que se obtuvo al insertar el fragmento 225-1 en 5' al fragmento 226-3, en pUC18. Para ello se digirió el fragmento 225-1 con *Sau*3A (eliminándose 83 pb del fragmento en 5') y se ligó con el fragmento 226-3. De esta forma, la secuencia que se extiende desde -765 a -514 pb se colocaba adyacente a la secuencia con el inicio de la transcripción (de -143 a +144 pb), con una inserción de 34 pb debida al SCM del pTZ19R, el plásmido en el que se encontraban originalmente clonados estos fragmentos.

\* Para los experimentos de transfección de líneas celulares, los fragmentos originales clonados en los plásmidos pTZ18R o pTZ19R (fig. 13) se subclonaron en el plásmido pGL3-Enhancer (fig. 14): el fragmento *Bgl* II-*Kpn* I, obtenido a partir del fragmento 222 (*Pvu* II-*Pvu* II) de 1074 pb, y el fragmento *Kpn* I-*Hind* III, obtenido a partir de la sonda 226/pTZ19R, se clonaron conjuntamente en el plásmido pGL3-Enhancer dando lugar a la construcción pGL3/30-7. En esta construcción quedan insertadas 6 pb del SCM del pTZ19R en 5' al fragmento *Kpn* I-*Hind* III, que son idénticas a la secuencia de bases de -514 a -508 en la zona de corte de *Kpn* I del fragmento de 1074 pb, de manera que la secuencia de -765 pb a -508 queda inmediatamente adyacente a la de -143 a +144. A partir de esta construcción, y por digestión con la enzima *Kpn* I, se obtuvo la construcción pGL3/226-5. Por digestión con *Kpn*

I/Sac I de pGL3/226-5 y ligado del fragmento *Kpn* I-Sac I, conseguido por digestión de pTZ18R-229, se logró la construcción pGL3/229-5.

Finalmente, para la obtención de pGL3/222-5, se subclonó en el vector pCR<sup>TM</sup> II el fragmento *Xba* I- *Eco*R I de pTZ19R-222; posteriormente, el fragmento *Bgl* II-*Hind* III, obtenido por digestión de esta construcción, se introdujo en el vector pGL3-Enhancer, dando lugar al plásmido pGL3/222-5.

\* En los experimentos de ensamblaje en cromatina, se empleó como sonda para la detección de los fragmentos de la transferencia Southern, el fragmento *Sca* I-*Xmn* I del plásmido pBluescript<sup>®</sup> II KS (+/-).



**Fig. 14.**

Construcciones del promotor I del gen de la GGT de rata en pGL3 empleadas en los ensayos de transfección. Se indican los sitios de restricción empleados en el clonaje. En verde se indican las secuencias correspondientes a los SCM de los plásmidos pTZ18/19R y pCR<sup>TM</sup>II.

### 2.3 Oligonucleótidos

\* Para los ensayos de caracterización de la actividad de unión (expuestos en el apartado 10) y para la preparación de las columnas de afinidad con oligonucleótidos

sintéticos como ligandos (apartado 9), se emplearon las parejas de oligonucleótidos complementarios JA/NJA, JA-1/NJA-1, JA-2/NJA-2 y JA-3/NJA-3 (tabla 4), cuyas secuencias corresponden a la secuencia diana para factores nucleares de tejido de rata, identificada previamente en este laboratorio mediante ensayos de protección a la DNasa I y a la Exo III (187). La situación de estos fragmentos en el promotor I del gen de la GGT de rata se muestra en la figura 15.

Así mismo, se diseñó una pareja de oligos mutados, JA-M/NJA-M, en la cual se habían sustituido determinadas C/G en la secuencia de la pareja de oligos JA/NJA por T/A.

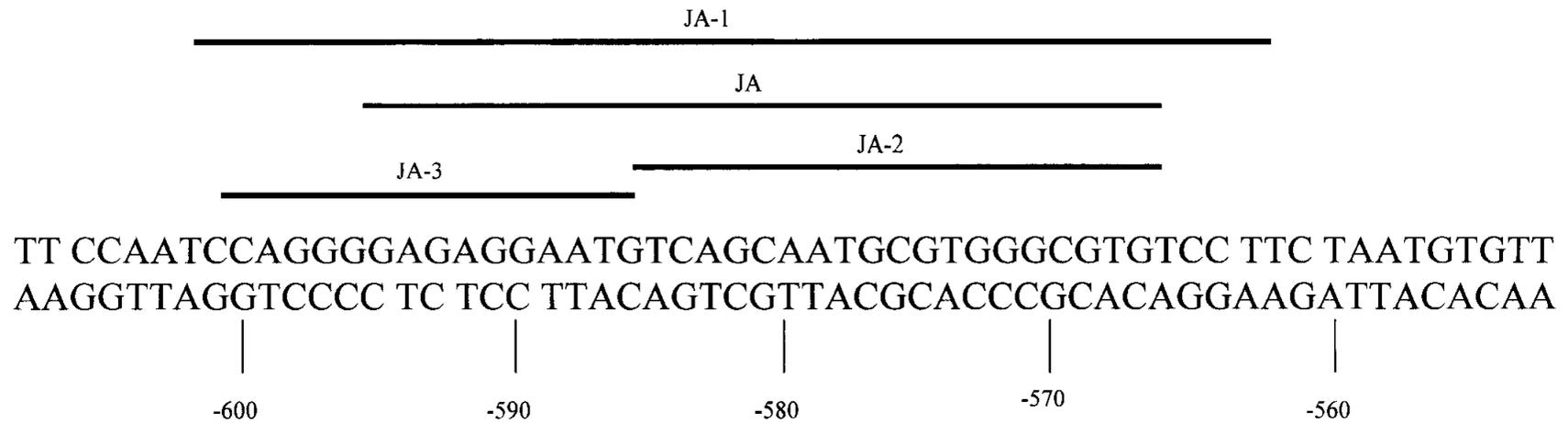
En la tabla 4 se indican sólo los oligos correspondientes a la hebra codificadora, a excepción de la pareja JA-M/NJA-M, para la cual se muestran ambas secuencias (en rojo se indican las bases modificadas en JA para obtener el oligo mutado JA-M y su complementario).

**Tabla 4.**

Nombre	Secuencia
JA	5'-GAG AGG AAT GTC AGC AAT GCG TGG GCG TGT-3'
JA-1	5'-CAG GGG AGA GGA ATG TCA GCA ATG CGT GGG CGT GTC CTT-3'
JA-2	5'-TCA GCA ATG CGT GGG CGT GT-3'
JA-3	5'-CAG GGG AGA GGA ATG T-3'
JAM NJAM	5'-TCA GCA ATG TGT GGG TGT GT-3' 5'-ACA CAC CCA CAC ATT GCT GA-3'
GGT-1	5'-TGC ATA CAT GGA GGC GGC TGG-3'
GGT-2	5'-CTG CTG CCA CCA GTG TTG ACC-3'
GGT-3	5'-ACC AGA ATA ACG GGC AGC AAG C-3'
GGT-4	5'-GGG CCC TAT GCA TCC ACG ATG-3'
GGT-5	5'-GGA AGA ATC TCG CTG CAC CGG-3'
GGT-6	5'-CGT TAG AGC AGG CTG GTA -3'
GGT-7	5'-CCA GCA CCA GAA ACC GAT TCT TCA T-3'

\* Para los experimentos de PCR se diseñaron los oligos GGT-1, GGT-2, GGT-3, GGT-4, GGT-5, GGT-6 y GGT-7 (tabla 4). Los oligos GGT-1, GGT-2, GGT-3, GGT-4 y GGT-5 se emplearon en mezclas equimoleculares con el oligo GGT-7 (situado en la región codificadora del gen) en las reacciones de RT-PCR. El oligonucleótido GGT-6 (común a todos los ARNm descritos de la GGT de rata) se utilizó en la detección de los productos amplificados por PCR y transferidos a una membrana de nylon. Su situación en la zona 5' del gen de la GGT de rata se muestra en la (fig.16).

\* Todos los oligos fueron sintetizados por MWG-Biotech (Boehringer Mannheim).



**Fig. 15.** Situación en el promotor I de los oligos empleados como ligandos de las columnas de alta afinidad y en los ensayos de caracterización de la actividad de unión.



**Fig. 16.** Situación de los oligos GGT empleados en los ensayos de RT-PCR. Las flechas indican la orientación de los oligos en sentido 5' → 3'.  
EC: exón común; RC: región codificante; blanco: intrones; PV: exón del promotor V; PIV-1 y PIV-2: exones descritos para el promotor IV; PIII: exón del promotor III; PII: exón del promotor II; PI: exón del promotor I.

### 3. TÉCNICAS DE CLONAJE

Para obtener las diversas construcciones utilizadas en los diferentes tipos de ensayos, se emplearon técnicas habituales en biología molecular, descritas brevemente a continuación:

#### 3.1 Preparación de plásmidos recombinantes y purificación de insertos

Por un lado se digería el plásmido que contenía el fragmento o inserto a estudiar del promotor I del gen de la GGT de rata, con las enzimas de restricción adecuadas en función de la orientación que tendrá dicho fragmento en el plásmido en el que se iba a subclonar. Los productos de la digestión se separaban en geles de agarosa al 0,8%, y, tras visualizar con bromuro de etidio, se purificaba el ADN: se cortaba la banda de gel, se troceaba, se distribuían los fragmentos de gel en tubos de microcentrífuga pequeños, agujereados en el fondo y rellenos de lana de vidrio y se congelaba en nitrógeno líquido (eventualmente, se emplearon “perlas de vidrio” y se dejaba durante 30 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). A continuación, se centrifugaba a 12.900 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$  (Biofuge 13, Heraeus o BR4i JOUAN, rotor AB2.14), recogiendo el ADN eluido de la agarosa en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Este ADN se extraía con fenol/cloroformo y se precipitaba con etanol y acetato sódico, siendo resuspendido en el volumen de TE adecuado.

Por otro lado, se linearizaba el plásmido en el que se iba a subclonar el fragmento purificado, con las mismas enzimas de restricción que se habían utilizado para obtener el inserto de ADN. Seguidamente, se desfosforilaba (apartado 5) en el caso de que los extremos fueran cohesivos para evitar su recircularización y se purificaba por separación de los productos de la digestión a través de geles de agarosa y posterior recuperación del ADN contenido en fragmentos de gel por centrifugación a través de lana de vidrio.

Una vez purificados el inserto y el plásmido, se ligaban con ADN ligasa T4 (EC 6.5.1.1., Boehringer Mannheim o Pharmacia) según las condiciones recomendadas por el suministrador correspondiente. Esta mezcla de ligación se empleaba directamente para transformar las células competentes.

#### 3.2 Preparación de células competentes

Se siguió el método descrito en la referencia 189:

Se creció la cepa de *E. Coli* en medio SOB durante toda la noche, a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se inocularon 100 ml de SOB con 1 ml de ese cultivo y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, aproximadamente. Cuando la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm fue de 0,5 unidades, se pasó el cultivo a tubos de centrifuga estériles, se dejaron 5 minutos en hielo y se centrifugaron a  $6000 \times g$  durante 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado de células se resuspendió en 35 ml de tampón de transformación I frío (30 mM acetato potásico pH 5,8; 100 mM RbCl; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 30 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 15% glicerol), se dejó 5 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó 10 minutos a  $6000 \times g$  durante 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se resuspendieron las células en 4 ml de tampón de transformación II frío (10 mM MOPS pH 6,5; 75 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM RbCl; 15% glicerol), se dejaron 15 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  y se hicieron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  que se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las células se mantenían viables durante dos-tres meses.

### **3.3 Transformación de células competentes**

Se transformaron las células según la técnica descrita en la referencia 189.

Se descongelaron las células competentes preparadas, incubándolas 15 minutos a 0°C. Se añadieron unos 100 ng de plásmido a 200 µl de células y se incubaron 30 minutos a 0°C; se realizó un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, seguido de 1-2 minutos a 0°C. Se añadieron 800 µl de SOB a las células transformadas, se transfirieron a tubos de vidrio y se incubaron a 37°C durante una hora y en agitación suave. Después se sembraron diferentes volúmenes de transformantes en placas de medio LB/ampicilina (con una concentración de antibiótico de 25 µg/ml de medio) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

### **3.4 MINIPREP: Aislamiento rápido de ADN plasmídico.**

Se empleó la modificación del método de la lisis alcalina (190,191).

Se sembraron 5 ml de LB/ampicilina con una colonia y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se centrifugaron 1,5 ml de cultivo durante un minuto. El precipitado de células se resuspendió en 100 µl de una solución 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8,0 y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de una solución 0,2 M NaOH, 1% SDS, mezclando por inversión el tubo varias veces, y se incubó en hielo 5 minutos. Se añadieron 150 µl de una solución 3 M acetato potásico, 5 M acético, se agitó brevemente y se dejó en hielo 5 minutos. Tras centrifugar a 15.000 x g durante 5 minutos y a 4°C, el sobrenadante se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol. Este precipitado se lavó con etanol al 75%, se secó y se disolvió en 30-50 µl de TE pH 8,0.

La detección de los clones positivos se realizó mediante digestiones con las enzimas de restricción apropiadas, en presencia de RNasa A (EC 3.1.27.5, Sigma), y posterior separación de los fragmentos obtenidos por electroforesis en geles de agarosa.

### **3.5 MAXIPREP: Obtención de gran cantidad de plásmido puro.**

Se sembraron 5 ml de medio LB/ampicilina y se hicieron crecer durante 6-8 horas, a 37°C. Con estos 5 ml de cultivo se inoculó 1 litro de LB/ampicilina que se incubó durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se recogieron las células a 8.000 rpm, 10 minutos, a 4°C, en un rotor GSA. El precipitado de células se resuspendió en 30 ml de una solución 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8,0 a temperatura ambiente. Se añadieron 60 ml de una solución 0,2 M NaOH, 1% SDS y se dejaron 5 minutos agitándose en hielo. Se añadieron 45 ml de una solución fría 3 M acetato potásico, 5 M acético, incubando 30 minutos en hielo, agitando de vez en cuando. Posteriormente, se centrifugaron durante 20 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C, en rotor GSA. Los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 0,6 volúmenes de isopropanol, incubando 15 minutos a temperatura ambiente y recogiendo a 10.000 rpm, 10 minutos, a 4°C, en rotor GSA. El precipitado se lavó con etanol al 75% y se disolvió en 10 ml de 50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, a los que se añadieron 20 µl de RNasa A de 10

mg/ml. La mezcla se incubó a 37°C, en agitación, durante una hora. El sobrenadante obtenido tras centrifugar a 10.000 rpm en rotor HB-4, durante 10 minutos a 4°C, se extrajo con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo. Después, se precipitó con 2 ml de 50% PEG y 1 ml de 5M NaCl, incubando en hielo 2 horas como mínimo. Se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 rpm en rotor HB-4 a 4°C. Se disolvió el precipitado en 15 ml de TE/NaCl 0,1 N, a los que se añadieron 750 µl de espermina 100 mM, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se centrifugaron a 15.000 rpm en rotor HB-4, 15 minutos a 4°C; se disolvieron en 5 ml de acetato sódico 0,6 M y 5 ml de agua y se precipitaron a -20°C con etanol. El precipitado de ADN se centrifugó a 10.000 rpm en rotor HB-4, 10 minutos a 4°C y se disolvió en 1 ó 2 ml de TE pH8,0.

Como en el caso de las minipreps, se comprobó que el plásmido amplificado era el correcto mediante digestión con enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa.

Eventualmente se emplearon los kits comerciales QIAGEN-tip 20 (25) y QIAfilter Plasmid Midi Kit (25) de QIAGEN®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.6 Cuantificación de ácidos nucleicos**

En todos los casos la concentración de ADN obtenido se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm y la pureza se obtuvo mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm y por electroforesis de pequeñas alícuotas en geles de agarosa.

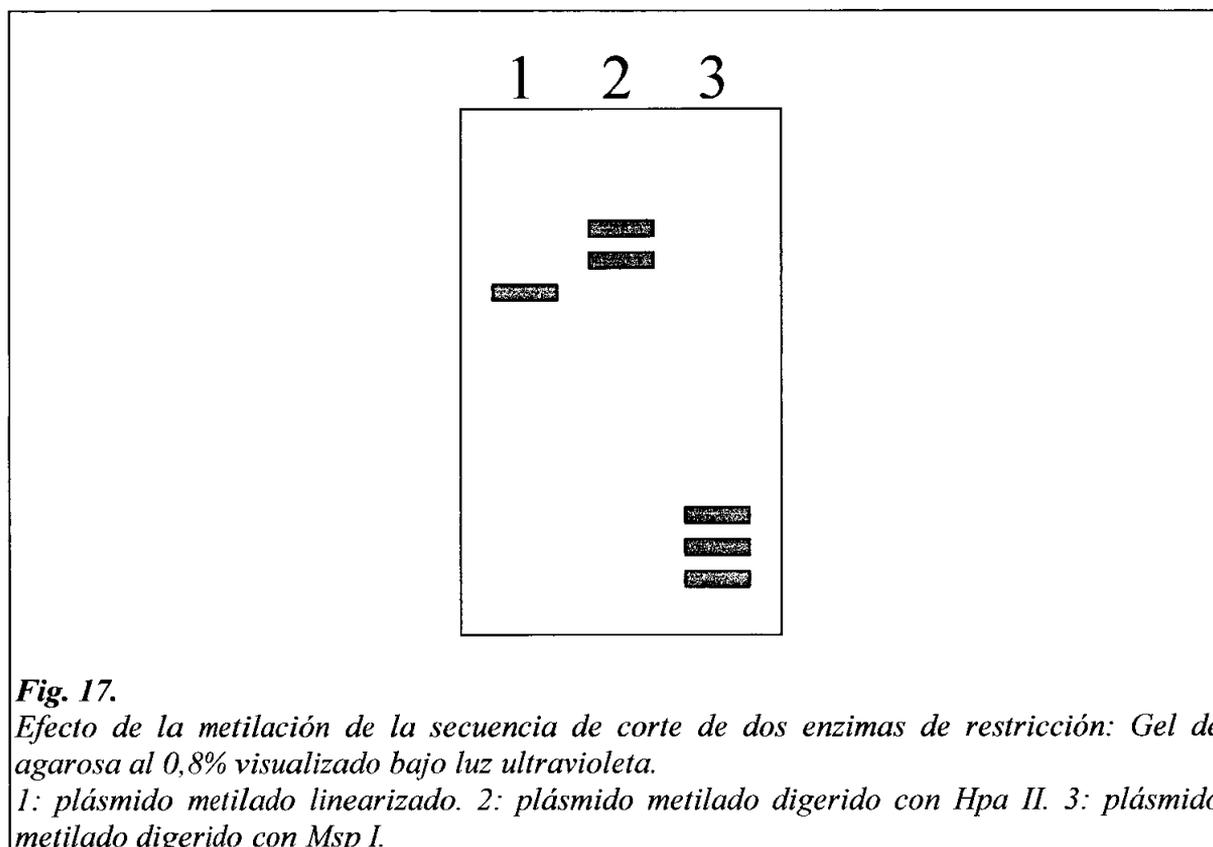
### **3.7 Digestión con enzimas de restricción y ligaciones**

Estas reacciones se realizaron según las condiciones recomendadas por el suministrador correspondiente en cada caso (Pharmacia Biotech, Boehringer Mannheim o Promega).

## **4. METILACIÓN DE CITOSINAS EN LOS DINUCLEÓTIDOS CpG**

Para aquellos experimentos en los que se pretendía estudiar el efecto de la metilación en la actividad de unión de los factores proteicos de interés, así como aquellos orientados al estudio de la funcionalidad de la región promotora, se metilaron los plásmidos que contenían las sondas o los oligonucleótidos con la metilasa Sss I (New England BioLabs, Inc) siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta enzima introduce grupos metilo, procedentes de la molécula donadora SAM, en las citosinas de dinucleótidos 5'-CG-3' de las dos hebras de un fragmento de ADN.

Con el objeto de verificar que la metilación de las sondas había sido completa, una vez finalizada la reacción, se tomaron dos alícuotas del volumen total de reacción y se digirieron con las enzimas de restricción *Hpa* II y *Msp* I (Boehringer Mannheim), según las instrucciones del fabricante. Estas enzimas reconocen y cortan la misma secuencia de ADN: 5'-CCGG-3', pero sólo la *Msp* I es capaz de cortar el ADN cuando las citosinas en posición 5' a las guaninas se encuentran metiladas: 5'-C<sup>m</sup>CGG-3' (fig. 17).



**Fig. 17.**

*Efecto de la metilación de la secuencia de corte de dos enzimas de restricción: Gel de agarosa al 0,8% visualizado bajo luz ultravioleta.*

*1: plásmido metilado linearizado. 2: plásmido metilado digerido con Hpa II. 3: plásmido metilado digerido con Msp I.*

## 5. MARCAJE DE SONDAS Y DE OLIGONUCLEÓTIDOS

### 5.1 Marcaje de sondas en el extremo 5'

#### PROTOCOLO A

Para obtener sondas con un único extremo marcado en 5', el plásmido que tenía clonada la secuencia de interés (metilado o sin metilar), se cortó con una enzima de restricción por el extremo 5' de la sonda a estudiar; posteriormente se desfosforiló, se marcó con fósforo radioactivo y se purificó la sonda ya marcada.

#### → Reacción de desfosforilación:

El plásmido conteniendo el fragmento 225-1 del promotor I del gen de la GGT de rata (fig. 2) se cortó con *Eco* RI o con *Taq* I. Una vez finalizada la digestión, se añadieron 50 µl de TE pH 8,0 y se extrajo con 100 µl de fenol/cloroformo. Se precipitó con acetato sódico y etanol. Se centrifugó 15 minutos a 4°C y se secó 15 minutos a vacío. Se disolvió en 45 µl de agua, se añadieron 5 µl de tampón de reacción 10X suministrado por la casa comercial y 2 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (EC 3.1.3.1, Boehringer Mannheim). Tras incubar a 37°C durante una hora, se inactivó la enzima añadiendo 40 µl de agua, 5 µl de SDS al 20%, 10 µl de tampón 1 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH8; 10 mM EDTA, y calentando a 65°C

durante 15 minutos. Seguidamente, se extrajo la muestra dos veces con fenol/cloroformo, se llevó hasta un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  con TE/NaCl 0,1 N y se precipitó a 0°C, durante 20 minutos, con 50  $\mu\text{l}$  de espermina 100 mM. Se centrifugó y se disolvió en acetato sódico 600 mM y agua, se precipitó con etanol y, el precipitado final se disolvió en TE.

→ Reacción de fosforilación:

1-3  $\mu\text{g}$  de ADN cortado y desfosforilado se mezclaron con 1  $\mu\text{l}$  de  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  (150  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ; ICN), 0,5  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción (0,5 M Tris pH 7,6; 0,1 M  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mM DTT; 1 mM espermina, 1 mM EDTA), 0,2  $\mu\text{l}$  de polinucleótido kinasa T4 (EC 2.7.1.78; 30 U/ $\mu\text{l}$ ; USB) y se completó el volumen con agua hasta 5  $\mu\text{l}$ . La reacción se incubó 30 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 15  $\mu\text{l}$  de TE y se precipitó a -20°C durante 30 min con 7,5 M acetato amónico y etanol. Se centrifugaron las muestras marcadas durante 15 minutos, a 4°C, se lavaron los precipitados con etanol al 75%, se secaron y se disolvieron en 10-20  $\mu\text{l}$  de TE.

Después, se realizó la segunda digestión con la enzima de restricción adecuada (*Hind* III, para el fragmento cortado con *EcoR* I, y *Rsa* I, para el fragmento cortado con *Taq* I), se añadieron 2-3  $\mu\text{l}$  de tampón Ficoll y se separaron los fragmentos a 170-180 V, en geles de poliacrilamida al 10% no desnaturizante, en presencia de tampón 1X TBE. Las bandas correspondientes a los fragmentos de interés se cortaron, extrajeron, precipitaron y disolvieron en un volumen adecuado de TE.

Estas sondas marcadas en sus extremos 5' se emplearon en los ensayos de caracterización de proteínas con actividad de unión al ADN.

## PROTOCOLO B

Para el estudio de la cromatina, las sondas empleadas en la detección de las transferencias Southern se marcaron por PCR: se realizó una reacción de PCR en las condiciones óptimas establecidas en el laboratorio del Dr. P. B. Becker, empleando  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$  y purificando la sonda *Sca* I-*Xmn* I marcada por centrifugación a través de una columna de Sephadex G-50 (Boehringer Mannheim).

### 5.2 Marcaje de oligonucleótidos

100-200 ng de oligonucleótido (anillado con su complementario o no) se marcaron con  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$  y polinucleótido-kinasa T4 en las mismas condiciones que las sondas y se purificaron a través de una columna Nensorb™ 20 (DuPont), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de oligonucleótidos de doble cadena, previamente al marcaje, se tomaron 10  $\mu\text{g}$  de cada hebra complementaria y se anillaron calentando las hebras a 88°C durante 3 minutos, en 100  $\mu\text{l}$  TE/NaCl 0,1 N y dejando que esta mezcla llegara a alcanzar la temperatura ambiente lentamente. A continuación, se precipitaron con etanol absoluto y acetato sódico, se centrifugaron a 12.900 rpm durante 15 minutos a 4°C (Biofuge 13) y se disolvieron en TE o agua a una concentración de 500 ng/ $\mu\text{l}$ . La electroforesis de una pequeña

muestra en un gel de agarosa 0,8% en TBE, permitía observar si los oligonucleótidos se habían anillado o no.

La actividad (cpm/ $\mu$ l) de las muestras se cuantificó con un contador de centelleo líquido Wallac 1410 (Farmacia).

## 6. MARCADORES G+A Y C+T

Para la preparación de marcadores G+A para geles de secuencia (192), se mezcló la sonda marcada con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, con 1-3  $\mu$ g de ADN de esperma de salmón sonificado y se completó el volumen con agua hasta 20  $\mu$ l. Se trató esta mezcla con 50  $\mu$ l de ácido fórmico, incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla se precipitó 15-30 minutos a -80°C con 200  $\mu$ l de 0,3 M acetato sódico pH 7,0; 20  $\mu$ g/ml ARNt de levadura y 750  $\mu$ l de etanol. El precipitado se lavó con etanol al 75%, se secó brevemente y se disolvió en 100  $\mu$ l de piperidina 1M, incubándose a 90°C durante dos horas. Se añadieron 100  $\mu$ l de agua y se extrajo dos veces con isobutanol. Finalmente, se precipitó con etanol, se secó y se disolvió en tampón de secuenciación a una concentración de 100.000 cpm/ $\mu$ l.

Para los marcadores C+T se siguió el mismo protocolo, pero la sonda de ADN marcada se trató con 30  $\mu$ l de hidracina, en lugar de tratarla con ácido fórmico.

## 7. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES A PARTIR DE TEJIDOS

Los extractos nucleares se elaboraron a partir de hígado o riñón de ratas adultas macho de la raza Wistar según el protocolo de Gorski et al. (193), con ligeras modificaciones.

Se procedió a la extracción del hígado o los riñones de ratas macho adultas de 150-180 gr de peso, las cuales habían sido anestesiadas con éter. Con el fin de eliminar toda la sangre posible, se cortaron las venas cava o renal, se extrajeron los órganos, se trocearon y se comprimieron entre papel absorbente. Los órganos troceados se homogeneizaron en un Potter, con 2,5 ml de tampón de homogeneización frío (10 mM HEPES-KOH pH 7,6; 15 mM KCl; 2 mM EDTA; 2 M sacarosa; 10% glicerol; 0,5 mM espermidina; 0,15 mM espermina; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 2  $\mu$ g/ml aprotinina; 0,5  $\mu$ g/ml benzamidina; 5  $\mu$ g/ml antipaína) por cada gramo de tejido. El homogenado de tejido hepático procedente de tres ratas o el renal procedente de diez ratas, se filtró, en frío, a través de ocho capas de gasa hidrófila estéril y se diluyó con tampón de homogeneización frío hasta un volumen final de 150 ml. Alícuotas de 25 ml de este homogenado se ultracentrifugaron a través de un colchón de 10 ml de tampón de homogeneización, a 24.000 rpm en el rotor SW 28 (Beckman), durante 45 minutos a 4°C. A continuación, se retiró el disco lipídico superior y el sobrenadante, dejando el precipitado nuclear limpio. Este precipitado de núcleos se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis frío (10 mM HEPES-KOH pH 7,6; 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 10% glicerol; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 2  $\mu$ g/ml aprotinina; 0,5  $\mu$ g/ml benzamidina; 5  $\mu$ g/ml antipaína), primero con una pipeta y después en un homogeneizador de vidrio; se determinó la concentración de ADN de la suspensión de núcleos midiendo la absorbancia a 260 nm de una muestra de la suspensión de núcleos

diluida 1:50 en SDS al 0,5% y se diluyó con tampón de lisis frío hasta una concentración final de ADN de 0,5 mg/ml. Seguidamente, se lisaron los núcleos por adición de 0,1 volúmenes de 4M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7,9, con agitación suave durante 30 minutos y en frío. El lisado obtenido se ultracentrifugó a 40.000 rpm, en rotor 70 Ti (Beckman), durante 90 minutos a 4°C. El precipitado de cromatina se eliminó y del sobrenadante se precipitaron las proteínas nucleares por adición, en frío y lentamente, de 0,3 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; tras incubarlo en hielo, durante 30 minutos, se centrifugó la muestra a 12.000 rpm, en rotor HB-4, durante 30 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se disolvió en 1,5 ml de tampón de diálisis frío (25 mM HEPES-KOH pH 7,6; 40 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 15% glicerol; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF) al que se añadieron los inhibidores de proteasas: 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina; 0,5  $\mu\text{g/ml}$  benzamidina y 5  $\mu\text{g/ml}$  antipaina. Este precipitado se dializó, durante tres horas en frío, frente a 500 ml de tampón de diálisis, renovando el tampón cada 90 minutos. Cuando la conductividad de la muestra fue adecuada (debía estar en torno a 100 mM en KCl), el dializado se centrifugó a 12.900 rpm (Biofuge 13), durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se alícuotó y congeló en nitrógeno líquido inmediatamente. Estas alícuotas se guardaron a -80°C hasta su uso.

## **8. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES**

El protocolo seguido fue el descrito en la referencia (194), basado en el protocolo original de Dignam et al. (195) con ligeras modificaciones:

Se sembraron células de la línea celular NRK en medio DMEM completo o células H5-6 en medio RPMI-1640 completo, en placas de 100 mm de diámetro y se cultivaron según las condiciones descritas en el apartado 1; cuando las células fueron confluentes, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron 3 veces con PBS frío y se recogieron en PBS. Se centrifugaron 10 minutos a 1850 x g a 4°C, y se midió el volumen celular. Se resuspendieron en un volumen de tampón A (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM KCl; 0,2 mM PMSF; 0,5 mM DTT) igual a 5 volúmenes celulares. Se repartieron en tubos grandes de microcentrífuga y se centrifugaron a 1850 x g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en 3 volúmenes celulares de tampón A; tras incubarlo en hielo 10 minutos, se agitaron hasta observar una lisis celular entre el 80-90 %. Se centrifugaron a 3300 x g, durante 15 minutos a 4°C. En esta etapa se guardaron tanto el precipitado como el sobrenadante, de los que se obtendrían el extracto nuclear y la fracción citoplasmática S-100, respectivamente:

### **1) Extracto nuclear:**

Se midió el volumen del precipitado de núcleos obtenido y se resuspendió en un volumen de tampón B (20 mM HEPES pH 7,9; 25 % glicerol; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,02 M KCl; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM PMSF; 0,5 mM DTT) igual a 1/2 del volumen nuclear. Gota a gota, se añadió el mismo volumen de tampón B con una concentración final de KCl 1,2 M. Se incubó la mezcla en hielo, con agitación, durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 25.000 x g, durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante constituyó el extracto nuclear.

## 2) Fracción S-100:

Al sobrenadante se le añadieron 0,11 volúmenes de tampón C (0,3 M HEPES pH 7,9 a 4°C; 1,4 M KCl; 0,03 M MgCl<sub>2</sub>) y se centrifugó durante una hora a 4°C y a 100.000 x g. El sobrenadante constituyó la fracción S-100.

Los sobrenadantes finales de cada una de estas etapas (1 y 2) se dializaron frente a 50 volúmenes de tampón de diálisis (20 mM HEPES pH 7,9; 20% glicerol; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM PMSF; 0,5 mM DTT) hasta llegar a una concentración de 100 mM en KCl (determinada por conductimetría). Se centrifugaron a 25.000 x g, durante 20 minutos a 4°C, se alicuotaron y se congelaron en nitrógeno líquido, guardándose a -80°C hasta su uso.

## 9. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS: PURIFICACIÓN DE FACTORES NUCLEARES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Los extractos crudos obtenidos a partir de hígado de rata se sometieron a diferentes etapas de purificación a través de columnas cromatográficas de afinidad (Heparina-Sefarosa; ADN-Sefarosa; de alta afinidad), con el objeto de detectar la presencia de factores nucleares implicados en la expresión del promotor I del gen de la GGT de rata.

### 9.1 Preparación de la muestra

Las muestras, ya fueran extractos hepáticos crudos o fracciones cromatográficas de pasos previos, se dializaron siempre frente a tampón de diálisis frío con inhibidores de proteasas (apartado 7) hasta una concentración de 100 mM en KCl (determinada por conductimetría), antes de pasarlas por cualquiera de las columnas cromatográficas utilizadas en el proceso de purificación.

En todos los casos, la elución de las proteínas retenidas se realizó mediante gradiente salino discontinuo, empleando el tampón H (25mM HEPES pH 7,6; 10% glicerol; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF) con distintas concentraciones de KCl: 0,25 M; 0,5 M y 2 M.

### 9.2 Preparación de columnas de Heparina-Sefarosa y de ADN-Sefarosa

\* Las columnas de Heparina-Sefarosa se prepararon a partir de Heparina-Sefarosa<sup>®</sup> CL-6B en polvo (Pharmacia) según las especificaciones dadas por el fabricante. En este tipo de columna, la Sefarosa es la matriz inerte que proporciona el soporte adecuado, mientras que la heparina, un glucosaminoglicano altamente sulfatado, retiene (debido a su carga neta negativa) a todas aquellas proteínas que tienen afinidad por el ADN.

\* En las columnas de ADN-Sefarosa, el ADN de timo de ternera, unido a la matriz de Sefarosa, es el ligando activo que va o no a retener las proteínas presentes en la muestra, con diferente afinidad en función de la fuerza iónica del medio, determinada por la concentración de KCl del tampón de elución (tampón H).

Se emplearon 1500 µg de ADN de timo de ternera sonicado y desnaturalizado, y 750 mg de Sefarosa®4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech).

La Sefarosa se lavó tres veces con 1 mM HCl, una vez con agua ultrapura y una vez con 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8. A continuación, se incubó la resina con el ADN de timo de ternera a temperatura ambiente y en agitación suave, durante toda la noche. Al día siguiente se pasó a una columna y se lavó con 20 ml de 100 mM NaCl; se incubó la columna, a temperatura ambiente durante varias horas, con 20 ml de 1 M etanolamina-HCl pH 8. Se lavó con 20-25 ml de cada una de las soluciones siguientes: 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8, 1 M KCl, H<sub>2</sub>O y un tampón 10 mM Tris-HCl pH 7,5/0,3 M NaCl/1 mM EDTA, guardándose a 4°C en esta solución, hasta su uso.

### **9.3 Cromatografía a través de columnas de Heparina-Sefarosa y de ADN-Sefarosa**

El proceso seguido fue el mismo para los dos tipos de columnas y constaba de las siguientes etapas:

- Equilibrado de la columna con tampón H 0,1 M en KCl.
- Introducción de la muestra.
- Recogida de las proteínas no retenidas por el lecho de la columna (fracciones denominadas FT en el texto) mediante lavado con tampón H 0,1 M en KCl.
- Elución por gradiente salino discontinuo de las proteínas retenidas en la columna. Para ello, se añadieron sucesivamente volúmenes de tampón H con unas concentraciones de KCl de 0,25 M, 0,5 M y 2 M, lavando la columna con la misma solución para la que se acababa de eluir un pico de proteína.
- Lavado final de la columna con tampón H 0,1 M en KCl
- Regeneración del lecho con un tampón ácido (0,1 M acetato sódico/ ácido acético pH 5,2; 0,5 M NaCl) y otro básico (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3; 0,5 M NaCl o bien 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M NaCl) y almacenaje de la columna a 4°C, hasta próximo uso, en tampón H 0,1 M en KCl y al 0,1% en azida sódica.

La elución de los lavados y fracciones se efectuó por gravedad o con ayuda de una bomba peristáltica.

### **9.4 Preparación de columnas de afinidad con oligonucleótidos sintéticos como ligandos**

En este tipo de columnas hemos unido un oligonucleótido sintético de doble cadena con la secuencia diana de los factores nucleares en estudio, a una matriz de Sefarosa, consiguiendo que el ligando o soporte activo de la columna sea mucho más específico que en los pasos precedentes.

Los oligos empleados fueron: JA-1, JA-2 ó JA-3, y sus complementarios NJA-1, NJA-2 y NJA-3, respectivamente, obteniéndose tres columnas de afinidad diferentes con cada una de estas parejas. Estas columnas se denominaron: columna de afinidad 1, columna de afinidad 2 y columna de afinidad 3, respectivamente.

El procedimiento seguido es el descrito en la referencia 196. Consta de dos etapas:

### → Polimerización de los oligonucleótidos:

Se incubaron 500 µg de oligonucleótidos sintéticos anillados en 150 µl de 0,3 M acetato sódico/10 mM acetato de magnesio pH 6,0, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añadieron 375 µl de etanol, se mezcló por inversión y se precipitaron a -20°C durante toda la noche. Se centrifugaron 30 minutos a 4°C y se secaron. Se disolvió el ADN en 167 µl de agua y 20 µl de tampón para la kinasa 10X; se añadieron 6 µl de ATP 100 mM y 100 U de polinucleótidokinasa T4, se mezcló y se incubó a 37°C durante dos horas. A continuación, se calentó la muestra a 65°C durante 15 minutos, finalizados los cuales se dejó que alcanzara la temperatura ambiente de forma gradual.

Se añadieron 25 µl de acetato sódico 3M, 25 µl de acetato de magnesio 100 mM pH 6,0 y 500 µl de etanol; se mezcló y se incubó a -20°C más de dos horas. El precipitado se centrifugó a 4°C, se secó, se disolvió en 172 µl de agua y 20 µl de tampón para la ligasa 10X, se añadieron 4 µl de ATP 100 mM y 10 U de ligasa T4 y se incubó a 12-16°C toda la noche.

Con el objeto de verificar si la polimerización ha sido correcta, se separó 1 µl de la mezcla en un gel de agarosa al 0,8%, debiéndose observar polímeros de una Kb o más. Una vez finalizada la ligación, la mezcla de reacción se extrajo con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo y se precipitó una hora a -20°C, con 100 µl de acetato amónico 7,5 M y 400 µl de etanol. Se disolvió el precipitado en 100 µl de agua y se precipitó dos veces con etanol/acetato sódico. Finalmente, disolvió en 50 µl de agua y se determinó la concentración por absorción a 260 nm.

### → Unión a la Sefarosa activada por bromuro de cianógeno.

Se emplearon 50 mg de Sefarosa<sup>®</sup>4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech) por cada 100 µg de ADN. La Sefarosa se lavó 3 veces con 5 ml de HCl 1 mM, una vez con agua y una vez con 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8,0. Todos estos lavados se efectuaron en frío.

Seguidamente, se añadió el ADN a la Sefarosa con un volumen de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 8,0 que permitiera que la mezcla se agitara bien. Se incubó toda la noche a 4°C y al día siguiente se pasó a la columna y se dejó eluir el 10 mM fosfato potásico pH 8,0. Se lavó esta columna con 5 ml de NaCl 100 mM, guardando el lavado, ya que contiene el ADN no incorporado a la resina.

A continuación, se incubó la columna, a temperatura ambiente durante varias horas, con 5 ml de etanolamina-HCl 1 M pH 8.

Finalmente, se lavó con 5-10 ml de las siguientes soluciones: 10 mM fosfato potásico pH 8,0; 1 M fosfato potásico pH 8,0; 1 M KCl; agua y con 10 mM Tris pH 7,5/0,3 M NaCl/1 mM EDTA y se guardó a 4°C hasta su uso.

## 9.5 Cromatografía a través de columnas de afinidad

Como en el caso de Heparina-Sefarosa y ADN-Sefarosa, el proceso seguido fue:

- Equilibrado con tampón H 0,1 M en KCl.
- Incubación de la resina con la muestra durante una hora, a 4°C y con agitación suave.
- Elución de la fracción no retenida (denominada FT) y de las proteínas retenidas bien, con un gradiente salino discontinuo, como el ya indicado para las otras columnas de afinidad.
- Lavado final con tampón H 0,1 M en KCl.
- Regeneración y almacenaje, en las mismas condiciones descritas para las columnas de Heparina-Sefarosa y ADN-Sefarosa.

En todas y cada una de las etapas del proceso, las fracciones se dializaron frente a tampón de diálisis (apartado 7) hasta una concentración final de KCl de 0,1 M (determinada por conductimetría), se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

Tanto los extractos crudos como las fracciones de columna, se sometieron a las siguientes determinaciones rutinarias: cuantificación de la concentración proteica (apartado 18); contaminación por ADN mediante electroforesis en geles de agarosa (sólo en las muestras procedentes de las columnas de Heparina-Sefarosa y ADN-Sefarosa); patrón proteico en geles de SDS/PA (plata y Coomassie).

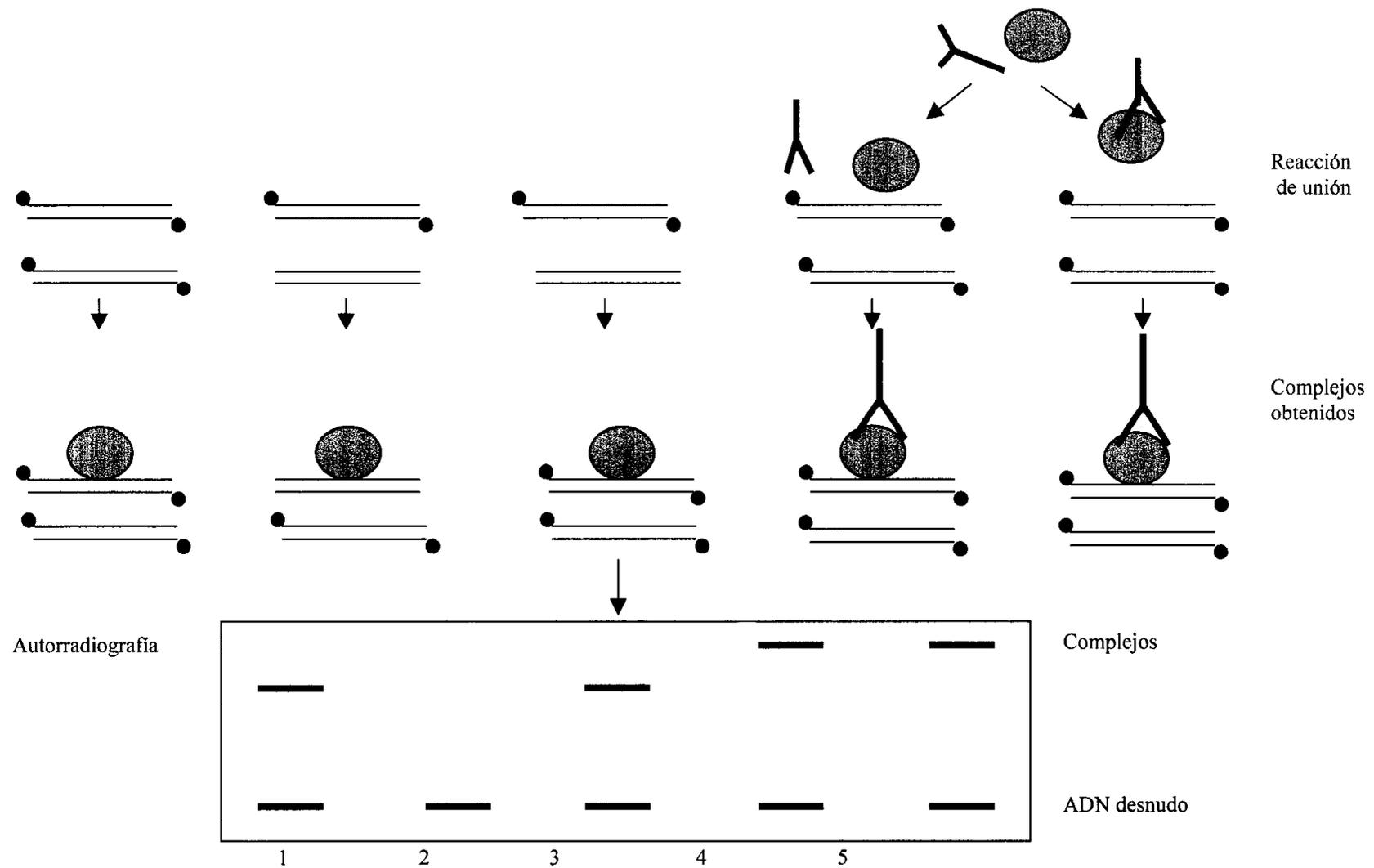
## **10. CARACTERIZACIÓN DE INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA**

### **10.1 Cambio de movilidad en gel (CMG)**

Mediante este ensayo se detecta la presencia de proteínas que se unen a un determinado fragmento de ADN: el complejo ADN-proteína ve retrasada su movilidad respecto al ADN desnudo (fragmento sin ninguna proteína unida) cuando ambos son sometidos a una electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 4% (197,198).

Se incubaron muestras de los extractos y fracciones cromatográficas en presencia de un exceso de sondas de la región 5' del promotor I del gen de la GGT de rata o de oligonucleótidos con la secuencia diana (apartado 2), metilados o sin metilar. Tanto las sondas como los oligos estaban marcados con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP. La reacción de unión se llevó a cabo a 25°C durante 30 minutos, en el siguiente medio de reacción: 100 mM KCl; 20 mM HEPES-KOH pH 7,6; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; EDTA 0,2 mM; 20% glicerol; 0,5 mM DTT, ajustando el volumen final a 20  $\mu$ l con agua y con una cantidad adecuada de ADN heterólogo (Poli(dI-dC) (Pharmacia Biotech), en el caso de emplear oligonucleótidos o ADN de *E. coli* cortado con *Hae* III, en el caso de las sondas). Una vez finalizada la reacción de unión, las muestras se resolvieron en minigeles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 4%, a 90V, durante una hora y a 4 °C (fig. 18: calle 1). Los geles se secaron a 80°C durante 30 minutos y se expusieron a -80°C durante toda la noche, en cassette con pantalla amplificadora y utilizando películas Kodak X-OMAT AR 5.

Para determinar la especificidad de la unión, se realizaron ensayos de competencia en los que se adicionó a la reacción un exceso molar (de 50 ng a 500 ng según la muestra) de sonda



**Fig. 18.**

*Cambio de movilidad en gel. Calle 1: reacción de unión normal; calle 2: reacción de unión en presencia de competencia fría; calle 3: reacción de unión en presencia de competencia cruzada; calle 4: ("supershift") reacción de unión en presencia de anticuerpos; calle 5: ("supershift") reacción de unión posterior a la incubación de las muestras (extractos o fracciones) con antisueños.*

u oligonucleótido sin marcar. Cuando la unión era específica, desaparecía la banda al emplear la misma sonda y no desaparecía al usar otro fragmento distinto sin la zona de unión reconocida por las proteínas presentes en el extracto (fig. 18: calles 2 y 3 respectivamente).

### **Anticuerpos y cambio de movilidad en gel (*supershift*)**

El *supershift* es una técnica que se basa en el hecho de que, si al complejo ADN-proteína se le une un anticuerpo específico de la proteína implicada en la unión, el retardo en la movilidad del complejo será mayor aún con respecto a la sonda de ADN libre y al complejo ADN-proteína sólo (199).

Por un lado, se realizaron reacciones de unión según las condiciones establecidas en el punto anterior en presencia de 1, 2 ó 3 µl de suero preinmune o sueros inmunes obtenidos contra las proteínas en estudio (apartado 13). Por otro lado, se incubaron los extractos y fracciones activas con 1-3 µl de antisuero preinmune o inmune durante 30 minutos a 25°C previamente a las reacciones de unión en las condiciones ya descritas. Los complejos obtenidos de ADN-proteína-anticuerpo y/o ADN-proteína se separaron en minigeles no desnaturizantes de poliacrilamida al 4%, a 90V, durante una hora a 4 °C (fig. 18: calles 4 y 5, respectivamente).

## **10.2 Ensayos de protección a la digestión por nucleasas: DNasa I Y EXO III**

### **DNasa I (de páncreas bovino; EC 3.1.21.1)**

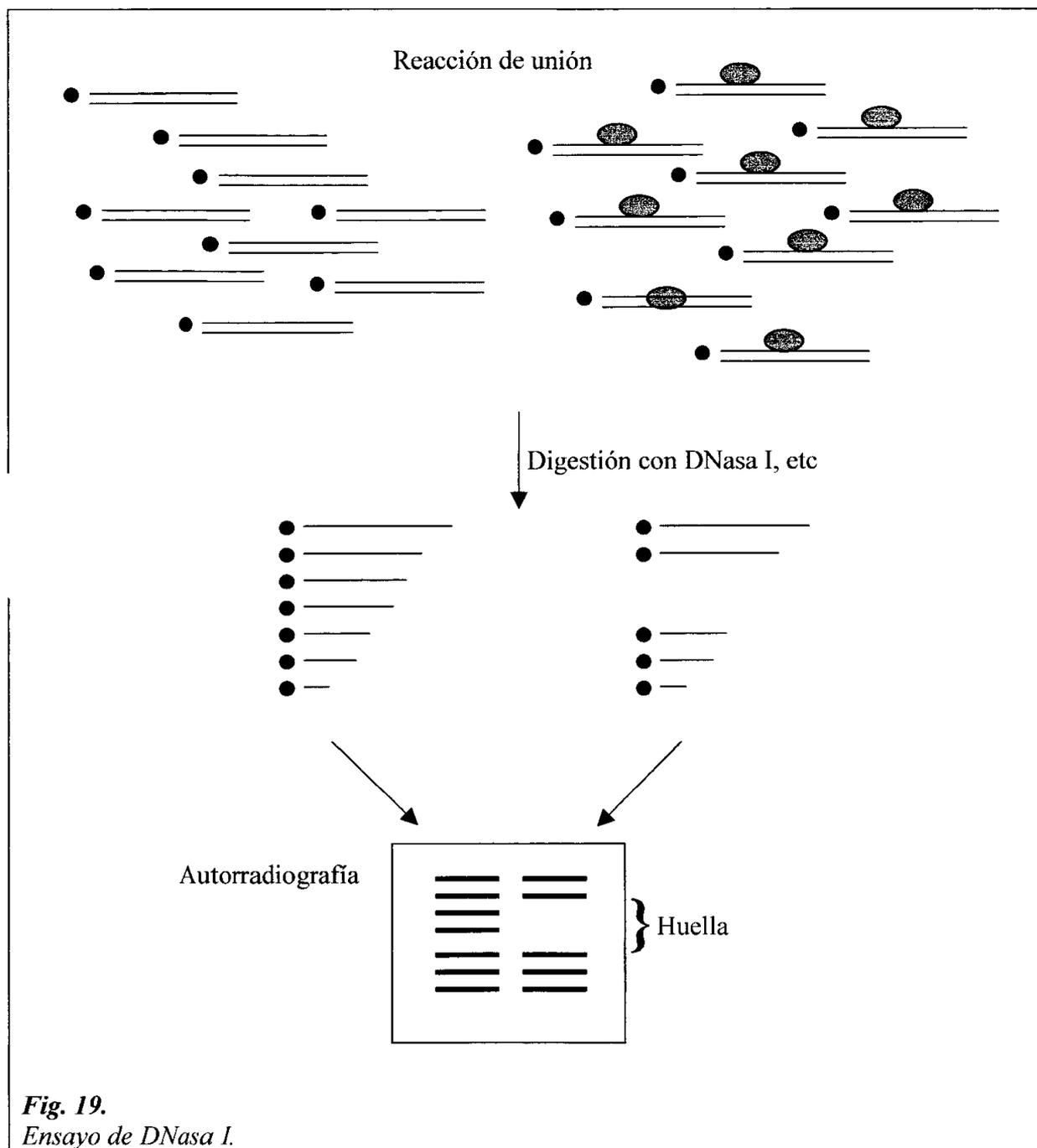
Esta enzima produce cortes al azar en el surco menor del ADN, cortando una de las dos hebras de la doble hélice. Si una sonda marcada se somete a una digestión limitada de manera que la frecuencia de corte sea tal que cada molécula de ADN sufra un sólo corte, lo que obtendremos será una escalera de fragmentos de distinto tamaño cuando el ADN se someta a una electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida.

Pero si antes de realizar esta digestión sometemos la sonda marcada a una reacción de unión con extractos nucleares y fracciones cromatográficas activas, los factores que se unan impedirán que la enzima corte el ADN en esa zona protegida. Esto se traducirá en la desaparición de una serie de bandas en la escalera de fragmentos, apareciendo un hueco característico debido a la unión específica de proteínas a una secuencia de ADN. Si en el mismo gel cargamos unas calles con marcadores G, C, T y A (apartado 6), podremos determinar la extensión de la zona de unión de la proteína presente en el extracto o fracción ensayados (fig. 19). El ensayo consta de dos etapas (200).

#### **→ Reacción de unión:**

2-5 µl de extracto crudo o fracción cromatográfica se incubaron durante 30 minutos, a 0-4°C en medio de reacción 25mM HEPES pH 7,6; 10% glicerol; 0,1 mM EDTA; 80 mM KCl; 10.000 cpm de sonda de ADN marcada en 5' y una cantidad variable de ADN heterólogo (ADN de *E. coli* cortado con *Hae* III) según la concentración proteica de la muestra, en un volumen final de reacción de 12,5 µl.

Se incluyó una reacción control en idénticas condiciones de reacción pero sin muestra de



**Fig. 19.**  
Ensayo de DNasa I.

proteína y con 200 ng de ADN de *E. coli* cortado con *Hae* III.

➔ Reacción de digestión de la DNasa I:

Inmediatamente después de finalizar la reacción de unión se añadieron a cada muestra 2 U de DNasa I (Boehringer Mannheim) diluída con un tampón 50 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,6; 15 mM MgCl<sub>2</sub> y 3 mM CaCl<sub>2</sub>, y se incubaron 30 segundos a 0°C. La reacción se paró con 25 µl de una solución 0,5% N-lauroilsarcosinato sódico, 10 mM EDTA pH 8,0 y 200 µg/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim; EC 3.4.21.64).

A continuación, las muestras se incubaron a 37°C durante una hora, se extrajeron con fenol/ cloroformo y se precipitó la fase acuosa con etanol a -20°C. El precipitado se secó y se disolvió en 5 µl de tampón de carga para geles de secuencia (98% formamida desionizada; 10 mM EDTA pH 8; 0,025% xilen-cianol FF; 0,025% azul de bromofenol).

Las muestras se resolvieron en geles de secuencia al 8%, a 45W, durante 2-3 horas. Tras secar el gel, se expuso a -80°C.

### **Exo III (de *E. coli* BE257/pSGR3; EC 3.1.11.2)**

La Exo III es una enzima que digiere fragmentos de doble hélice de ADN en dirección 3'→5'. Cuando una proteína se une a fragmentos de ADN, la Exo III encuentra una "barrera" a su digestión y genera un fragmento residual de ADN de un tamaño determinado; si utilizamos ADN marcado isotópicamente en 5', esta "barrera" (fragmento) se muestra en la autorradiografía como una banda que no aparece en el patrón de digestión de la sonda desnuda con esta enzima. Esta reacción de digestión se efectúa con las dos hebras (codificadora y no codificadora) obteniéndose los límites de la interacción ADN-proteína (fig. 20).

El experimento consiste en llevar a cabo la reacción de unión entre la sonda y las proteínas de la muestra; a continuación, dejar actuar la Exo III durante un tiempo determinado y, finalmente, resolver los fragmentos en un gel desnaturalizante de poliacrilamida. Introduciendo en una calle del mismo gel marcadores G+A, se determina la posición del límite de la zona de unión del factor proteico al ADN (201).

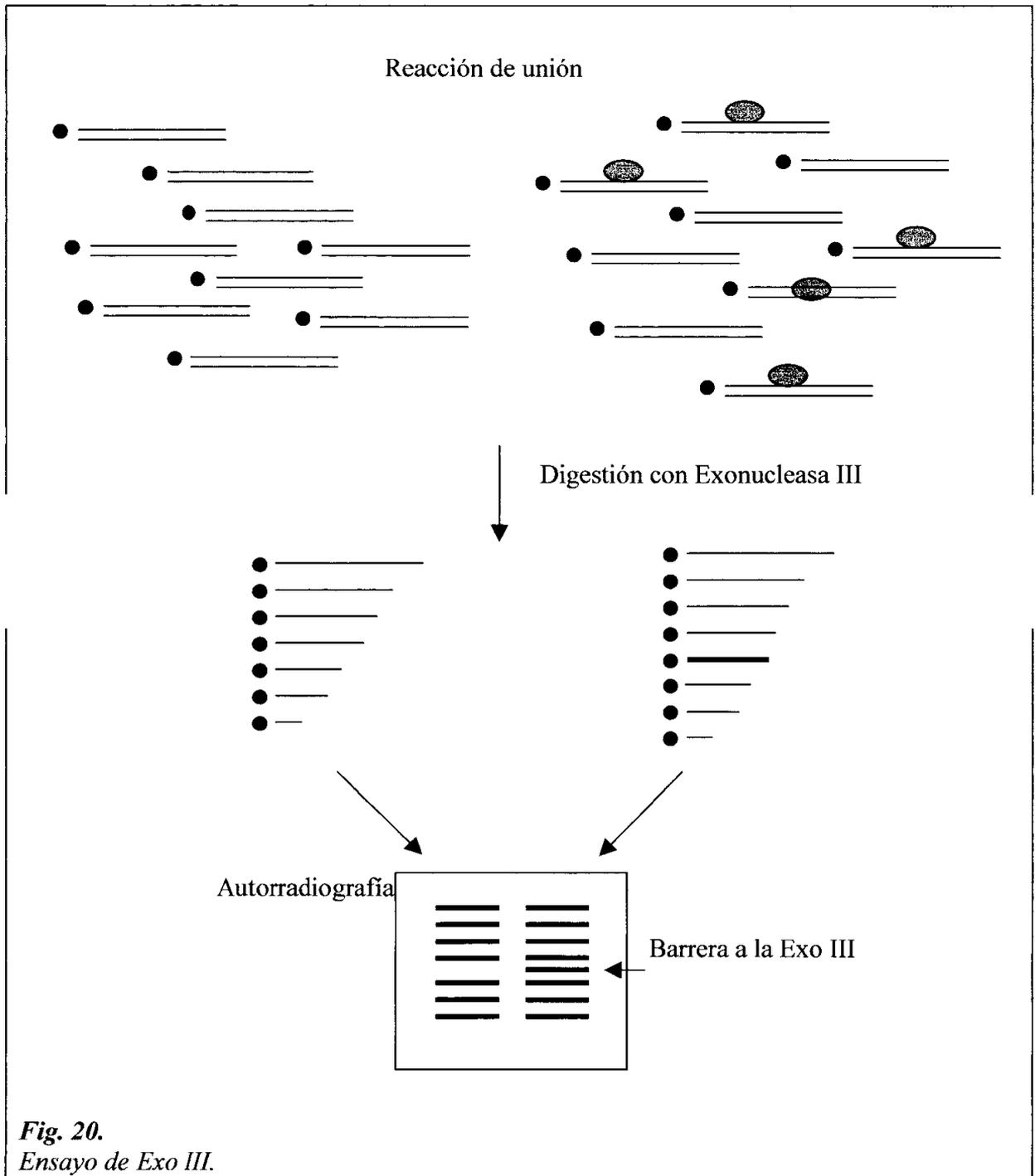
#### **→ Reacción de unión:**

2-3 µl de extracto crudo o fracción cromatográfica se incubaron durante 30 minutos a 25°C, en un volumen final de 12,5 µl, con 10.000 cpm de sonda de ADN marcada en 5'. El medio de reacción contenía 80 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 15 mM Tris pH 7,6; 2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5% glicerol; 20 ng/µl de ADN de *E. coli* cortado con *Hae* III; 20 ng/µl de hexámeros y 200 ng/µl de ARNt de levadura (Boehringer Mannheim).

#### **→ Digestión con Exonucleasa III:**

Una vez finalizada la reacción de unión, se añadieron 40 U de Exonucleasa III (Boehringer Mannheim) diluída con una solución 50 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,0 y 5 mM MgCl<sub>2</sub> y se digirieron las muestras a 30°C durante 10 minutos, parando la reacción con 25 µl de una solución 10 mM EDTA, 1% SDS, 200 ng/µl proteinasa K.

Seguidamente, se incubaron las muestras una hora a 37°C y se extrajeron con fenol/cloroformo. La fase acuosa se precipitó con etanol a -20°C, se secó y se disolvió el precipitado en tampón de carga para geles de secuencia, separándose los fragmentos en geles al 8%, a 45W, durante 2-3 horas. El gel seco se expuso a -80°C.



### **10.3 Entrecruzamiento por luz ultra-violeta (ELUV)**

Esta técnica permite conocer el peso molecular aparente de una proteína presente en un complejo ADN/proteína. En este ensayo se utilizó únicamente oligonucleótido marcado (202).

Se realizó una reacción de unión en las condiciones descritas en el apartado 10.1, pero sobre una placa de microtitulación sin tratar (Sterilin), a temperatura ambiente (20-25°C), durante 30 minutos. A continuación, se irradió la placa con luz ultravioleta de una longitud de onda de 254 nm durante 60 minutos, en un UV-Crosslinker UVC-508 (Ultra-Lum Inc.), situando la placa sobre hielo/agua para evitar el calentamiento y evaporación de las muestras. Seguidamente, se añadieron 20 µl de tampón de carga 2X para geles de SDS/PA a cada muestra y se separaron en geles SDS/PA al 10 ó al 15%, efectuando la electroforesis a 67 V para el gel de concentración y a 200 V para el gel de separación. Finalizada la electroforesis, se secó el gel a 80°C y se expuso a -80°C durante la noche. Tras revelar, se cortó el frente del gel, que contenía el oligonucleótido libre, y se reexpuso durante una semana a -80°C.

El peso molecular aparente de una proteína implicada en un complejo ADN/proteína se obtiene por diferencia entre el peso molecular del complejo, calculado a partir de la autorradiografía del gel, y el peso molecular del oligonucleótido empleado.

### **10.4 Interferencia por metilación**

Con este tipo de ensayos se determinan las G implicadas en la unión de una proteína al ADN (203). Esta técnica se basa en la capacidad del dimetilsulfato (DMS) para metilar los residuos de guanina y hacer que el fragmento de ADN así tratado sea susceptible de ser cortado por la piperidina en estas guaninas modificadas.

El tratamiento con DMS de una sonda de ADN marcada isotópicamente se realiza de tal manera que se metile una guanina por molécula. A continuación, este ADN parcialmente metilado se emplea en reacciones de unión con proteínas nucleares, en las condiciones descritas en el apartado 10.1; aquellas moléculas de ADN que posean guaninas metiladas que se encuentren en la secuencia de unión del factor en estudio, no formarán complejos ADN-proteína. Tras efectuar un cambio de movilidad de las reacciones de unión, se aíslan las bandas que contienen el ADN libre y los complejos ADN-proteína. El ADN purificado a partir de estas bandas se trata con piperidina y los fragmentos obtenidos se resuelven en un gel de secuencia. Puesto que las moléculas de ADN con guaninas metiladas en la secuencia de unión son incapaces de formar complejos con las proteínas durante la reacción de unión, esta población de moléculas sólo se encontrará presente en la banda de ADN libre y estará ausente en la banda de ADN del complejo ADN-proteína; por tanto, los fragmentos que generen estas moléculas de ADN en la digestión con piperidina darán lugar a una serie de bandas que aparecerán sólo en la calle del gel de secuencia correspondiente al ADN libre y no aparecerán en la calle del gel de secuencia que corresponde al ADN del complejo con la proteína (fig. 21).

El experimento consta de las siguientes etapas:

→ Reacción de metilación limitada:

Se tomaron 100.000 cpm de sonda marcada en 5' en un volumen final de 10  $\mu$ l. Se añadieron 0,5 ml de DMS (Sigma) y 200  $\mu$ l de tampón 50 mM cacodilato sódico pH 8,0 / 1mM EDTA. Se incubaron 1 minuto a temperatura ambiente y se paró la reacción con 40  $\mu$ l de una solución 1,5 M acetato sódico pH 7,0 / 1 M  $\beta$ -mercaptoetanol. Se precipitaron con etanol, durante, al menos, una hora a -20°C, se centrifugaron a 12.900 rpm (Biofuge 13), durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 200  $\mu$ l de etanol al 75%, se secó y se disolvió en el volumen adecuado de TE.

→ Reacción de unión:

La sonda así tratada se empleó en una reacción de unión como las descritas en el apartado 10.1, empleando la fracción cromatográfica activa H2. Los complejos ADN-proteína obtenidos se separaron en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4%. Este gel se expuso en húmedo, a 4°C, durante toda la noche. Al día siguiente, se cortaron las porciones de gel que contenían los complejos ADN-proteína y el ADN libre.

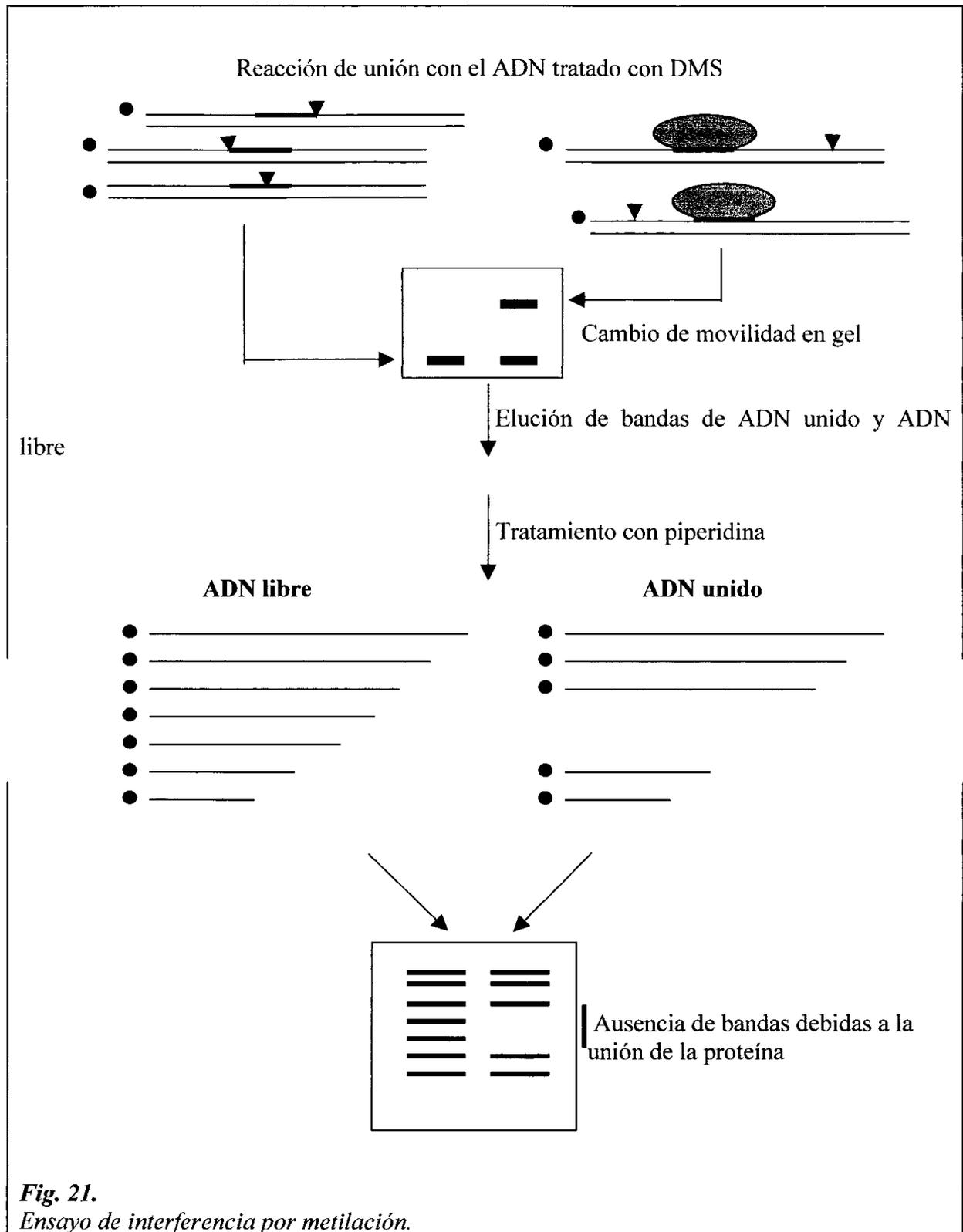
→ Electroelución:

El ADN de los complejos y el ADN libre se recuperó mediante electroelución en tampón TBE sobre papel DEAE-celulosa, proceso que se llevó a cabo a 100V, durante 3 horas.

El ADN del papel se eluyó calentándolo a 65°C, durante 30 minutos, en 200  $\mu$ l de una solución 10 mM Tris-HCl pH 7,9; 1 M NaCl; 1 mM EDTA, repitiendo esta operación una vez más. El volumen total obtenido se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol a -80°C, durante 30 minutos, en presencia de 0,5  $\mu$ l de ARNt de levadura 10 mg/ml. Se centrifugó, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se secó.

→ Digestión de purinas y separación de los fragmentos obtenidos en gel de secuencia:

El precipitado de la etapa anterior se disolvió en 90  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se le añadieron 10  $\mu$ l de piperidina (Sigma). Se incubó a 90°C durante 1 hora y 30 minutos. Se añadieron 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se extrajo 2 veces con isobutanol. Se precipitó con etanol a -20°C. El precipitado se secó y se disolvió en 5  $\mu$ l de tampón para geles de secuencia. Se cuantificaron las cpm de cada muestra con un contador de centelleo líquido Wallac 1410 (Pharmacia): ADN tratado con DMS, ADN libre electroeluido y ADN complejo electroeluido, cargándose la misma cantidad de cpm en cada calle de un gel de secuencia al 8% de acrilamida. Se separaron los fragmentos a 45 W, durante 2-3 horas. Finalizada la electroforesis, el gel se secó y se expuso a -80°C.



## 11. ESTUDIO DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE FACTORES NUCLEARES

### 11.1 Fosforilación de proteínas

Las proteínas fosforiladas se emplearon en ensayos de unión al ADN y para detección con antisueros:

5-10  $\mu$ l de muestra proteica se trataron con 0,1  $\mu$ l de proteína-kinasa AMP-cíclico dependiente (PKA) de corazón bovino (72 U/ $\mu$ l, Promega) y 0,5  $\mu$ l de ATP 100 mM, durante 30 minutos a temperatura ambiente (2  $\mu$ l de enzima y 10 minutos para las muestras que se iban a emplear en CMG).

Paralelamente, y como control de la reacción de fosforilación, se marcaron las proteínas con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP: 20  $\mu$ l de muestra (extracto o fracción cromatográfica) se incubaron con 2  $\mu$ l de una solución de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP con una actividad específica de 175 Ci/mmol, y con 0,1  $\mu$ l de PKA, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la reacción, las muestras se precipitaron con 50% TCA frío y se resolvieron las mismas cpm de cada muestra en un gel de SDS/PA al 10 ó al 15%.

### 11.2 Tratamiento con fosfatasas

Se empleó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (EC 3.1.3.1, Boehringer Mannheim), la cual no sólo desfosforila ácidos nucleicos sino que también desfosforila muchas fosfoproteínas de manera no específica. Además, a diferencia de las fosfatasas ácidas actúa en condiciones que permiten desfosforilar proteínas sin desnaturalizarlas (194).

En las condiciones de los ensayos se puede ver si la proteína está o no fosforilada (en el caso de que este cambio conlleve un cambio en la movilidad electroforética de la proteína) y el efecto en la funcionalidad o en la regulación de la proteína desfosforilada.

5-10  $\mu$ l de muestra proteica se trataron con 5 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (EC 3.1.3.1, Boehringer Mannheim) en presencia de tampón de reacción 10X suministrado por la casa comercial, durante 30 minutos a 30°C. Una vez acabada la reacción, se añadió un volumen de tampón de carga 2X para muestras de geles de SDS/PA o de geles de PA, se hirvieron 5 minutos y se resolvieron en geles de PA al 10% con o sin SDS. Acabada la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa según el protocolo descrito en el apartado 21, detectándose con los anticuerpos policlonales obtenidos contra las proteínas en estudio.

### 11.3 Estudio de la glicosilación

Con el fin de estudiar si las proteínas purificadas estaban glicosiladas, se realizó la detección de proteínas transferidas a membrana con Concanavalina A y lectina de germen de trigo (WGA). La primera es una proteína hemoaglutinante que se une específicamente a polisacáridos que contienen residuos de  $\alpha$ -D-glucosa o  $\alpha$ -D-manosa; la segunda, se une específicamente a residuos N-acetil-glucosaminil.

5-10 µl de extracto crudo o fracción se separaron en un gel de SDS/PA al 10%. El gel se transfirió como se describe en el apartado 21.5. Finalizada la transferencia, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie y la membrana se sometió a la detección de la parte glucídica de las proteínas transferidas, empleando lectina de germen de trigo o el sistema Concanavalina A/peroxidasa. El protocolo de detección con la Concanavalina A consistió en lavar la membrana durante 30 minutos en PBS/0,3% Tween20. A continuación, se incubó 45 minutos con agitación suave, en PBS/0,3% Tween20 con 0,1 mg/ml Concanavalina A (tipo IV; Sigma). Se lavó tres veces, durante 5 minutos cada vez, con PBS/0,3% Tween20 y se incubó una hora en PBS/0,3% Tween20/0,1 mg/ml peroxidasa (tipo VI-A; EC 1.11.1.7.; Sigma). Se lavó otras tres veces con PBS/0,3% Tween20 y se reveló con una solución de 0,3mg/ml de DAB en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5 / 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En el caso de la detección con lectina de germen de trigo, se bloqueó la membrana con PBS/0,1% Tween20/5% BSA durante una hora. Se incubó durante una hora y media en PBS/0,1% Tween20 con 1 µl de WGA-peroxidasa por ml de tampón. A continuación se lavó tres veces con PBS/0,1% Tween20/1 M NaCl, una vez con PBS y se reveló con la solución de DAB.

Ambas detecciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

## **12. CROMATINA: Ensamblaje en cromatina con extractos de embriones de *Drosophila*.**

Esta técnica permite obtener cromatina ensamblada de una manera más fisiológica que por el método de la diálisis salina (204). Con esta cromatina se puede estudiar, no sólo si los nucleosomas se sitúan de una manera preferente sobre una secuencia concreta, sino también, como interaccionan factores nucleares con ella.

### **12.1 Preparación de extractos de embriones tempranos de *Drosophila***

Se recogieron embriones tempranos o preblastodérmicos de *Drosophila* (con una edad de 0 a 90 minutos) sobre placas con agar/zumo de manzana y pasta de levadura. Seguidamente, se lavaron con agua, recogéndolos sobre un cedazo. Se lavaron con tampón de lavado frío (0,7 % NaCl, 0,04 % Triton X-100), dejándolos sedimentar en frío, en una probeta. Cuando se hubo obtenido una cantidad adecuada de embriones, se decantó el tampón de lavado y se añadió tampón de lavado a temperatura ambiente, dejando de nuevo que los embriones sedimentaran a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se ajustó el volumen a 200 ml con tampón de lavado; se añadieron 60 ml de hipoclorito sódico al 13 % y se agitó durante 2,5 minutos con objeto de eliminar el corion de los embriones. Transcurrido este tiempo, se pasaron los embriones al cedazo otra vez, se lavaron con agua a temperatura ambiente, se pasaron a una probeta y se dejaron sedimentar otra vez en tampón de lavado. Se eliminó el sobrenadante, el cual contenía los coriones flotando, y se dejaron sedimentar, primero en NaCl al 0,7 % y, después, en tampón de extracción frío (10 mM HEPES pH 7,6; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EGTA; 10 % glicerol; 10 mM β-glicerofosfato; 1mM DTT; 0,2 mM PMSF). A partir de este momento todas las manipulaciones se efectuaron en frío. Tras eliminar el sobrenadante, se pasaron a un homogeneizador de cristal con 30 ml de tampón de extracción 3,33 mM DTT, 0,67 mM PMSF, y se dejaron sedimentar. Se eliminó el

sobrenadante dejando unos 2 ml, y se homogeneizaron con ayuda de un homogeneizador con pistilo de teflón. A continuación, se añadió  $MgCl_2$  hasta una concentración final de 5 mM y se centrifugó a 10.000 rpm, a 4°C, en rotor HB-4. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de ultracentrífuga, evitando tomar la capa superior lipídica. Se centrifugó a 45.000 rpm, durante dos horas, a 4°C, en un rotor SW55.1 (Beckman). El sobrenadante transparente (que constituía el extracto de embriones tempranos de *Drosophila*) se recogió por punción en las paredes laterales del tubo y se congeló en nitrógeno líquido en alícuotas de 500  $\mu$ l cada una.

Antes de utilizar estos extractos, se optimizaron las reacciones titulándolos.

## 12.2 Titulación de extractos

Se realizó una titulación de los extractos de embriones de *Drosophila*, con el objetivo de conocer la cantidad óptima de extracto a emplear en las reacciones de ensamblaje en cromatina. Para ello, se tomaron 500 ng de plásmido  $\phi X174$  y se incubaron durante 6 horas a 26°C en presencia de 7  $\mu$ l de medio de reacción 30 mM ATP; 300 mM creatín-fosfato; 30 mM  $MgCl_2$ ; 10 ng/ $\mu$ l creatín-fosfokinasa y 10 mM DTT, con diferentes cantidades de extracto de embriones de *Drosophila*, en un volumen final de 70  $\mu$ l, ajustado con tampón EX50 (10 mM HEPES pH 7,6; 50 mM KCl; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,5 mM EGTA; 10% glicerol; 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato; 1 mM DTT; 0,2 mM PMSF). A continuación, se añaden 93  $\mu$ l de EX50, 5  $\mu$ l de  $CaCl_2$  100 mM y 2  $\mu$ l de MNasa 50U/ $\mu$ l (nucleasa de estafilococo; EC 3.1.31.1), y se incubaron a temperatura ambiente, tomando a intervalos de 30, 60 y 120 segundos alícuotas de 55  $\mu$ l, a las que se añaden 20  $\mu$ l de una solución 2,5% N-lauroilsarcosinato sódico/100 mM EDTA. Estas muestras se trataron a 37°C, durante 30 minutos con 10 mg/ml RNasa I y toda la noche a 37°C con 10 mg/ml proteinasa K y 2% SDS. Al día siguiente se añadieron 120  $\mu$ l de TE y 1  $\mu$ l de glucógeno (Boehringer Mannheim), se precipitaron con acetato amónico, se lavaron con etanol al 70%, se secaron al aire y se redisolviéron en tampón de carga (10% glicerol, 1 mM EDTA, 0,06 Naranja G), resolviéndose los fragmentos (junto a una escalera de 123 pb marcada radiactivamente, usada como patrón) en un gel de agarosa al 1,3% en tampón Tris/glicina.

## 12.3 Ensamblaje de cromatina; digestión con nucleasas; marcaje terminal

Una vez obtenidos los extractos, se ensamblaron 100 ng del plásmido que llevaba las secuencias reguladoras de interés con una cantidad óptima de extracto en presencia de 400 ng de ADN de  $\phi X174$ , medio de reacción 10X (30 mM ATP; 300 mM creatín-fosfato; 30 mM  $MgCl_2$ ; 10 ng/ $\mu$ l creatín-fosfokinasa y 10 mM DTT), en presencia o ausencia del factor transcripcional o nuclear que reconoce las secuencias insertadas en el plásmido en estudio, completando el volumen hasta 70  $\mu$ l con EX50. La reacción se incubó a 26°C durante 6 horas. Pasado este tiempo, se procedió a hacer las digestiones con DNasa I o MNasa: la primera permite detectar la presencia o ausencia de sitios hipersensibles a esta enzima, mientras que la MNasa nos indica el posicionamiento de nucleosomas en la secuencia (205).

### → Digestión con DNasa I (EC 3.1.21.1):

Se añadieron 40  $\mu$ l de EX50 a la reacción de ensamblaje y se hicieron alícuotas de 20  $\mu$ l. A cada una de estas alícuotas se les añadieron 30  $\mu$ l de una solución 5 mM  $CaCl_2$  con

diferentes cantidades de DNasa I (0, 0,002, 0,004, 0,006, 0,008 unidades para el ADN desnudo y 0, 2, 4, 6 y 8 unidades para el ADN ensamblado). Se incubaron durante dos minutos a temperatura ambiente y se pararon con 15  $\mu$ l de una solución 2,5% sarcosilo / 100 mM EDTA. A continuación, se trataron con RNasa y con proteinasa K, en presencia de SDS, como ya se ha descrito para las muestras de la titulación de extractos.

#### → Digestión con MNasa:

A 70  $\mu$ l de reacción de ensamblaje se les añadieron 93  $\mu$ l de EX50, 5  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y 2  $\mu$ l de MNasa de 2,5 U/ $\mu$ l para las muestras de cromatina y de 0,1 U/ $\mu$ l para las muestras de ADN desnudo. Se tomaron alícuotas de 55  $\mu$ l de esta mezcla a los 30, 45 y 60 segundos y se pararon con 20  $\mu$ l de 2,5 % sarcosilo/100 mM EDTA. A continuación, las muestras se trataron con RNasa y SDS/proteinasa K.

En ambos tipos de digestiones, al día siguiente, se añadieron TE y glucógeno a las muestras, se extrajeron con fenol/cloroformo y con cloroformo y se precipitaron como ya se ha descrito para la titulación de extractos.

La cromatina se caracterizó por la técnica de marcaje terminal indirecto (206,207): el ADN se digirió con las enzimas de restricción adecuadas, y según las condiciones indicadas por el fabricante (en nuestro caso se empleó la enzima *Sca* I tanto para los plásmidos con los cassettes GAGA como para los plásmidos con los fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata), se precipitó de nuevo y el precipitado se disolvió en tampón de carga para geles de agarosa y los fragmentos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,3% ó 0,8%, en tampón Tris/glicina. Se cargaron también un marcador del plásmido (apartado 12.4) y una escalera de 123 pb marcada radiactivamente.

Finalizada la electroforesis, se desnaturalizó el gel con una solución de 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl, durante 40 minutos, con un cambio. Se neutralizó con 1 M Tris-HCl pH 7,5/1,5 M NaCl también 40 minutos, con un cambio, y se transfirió a una membrana de nylon GeneScreen (NEN Research Products) con SSC X10, durante toda la noche (208). La membrana se lavó con tampón fosfato (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2; 1 mM EDTA) y se secó durante 30 minutos, a 80°C en un horno de vacío. El ADN se fijó con luz UV de 254 nm, empleando una energía de 1200  $\mu$ J en un "crosslinker" (Stratalinker).

Esta membrana se humedeció en tampón fosfato y se introdujo en un tubo de hibridación, incubándose con la solución de prehibridación (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2; 1% BSA; 7% SDS; 10 mM EDTA) en un horno de hibridación, a 50°C durante 45 minutos. Después, se renovó esta solución, incluyendo la sonda marcada *Sca* I-*Xmn* I desnaturalizada a 95°C durante 5 minutos (apartado 5), y se hibridó durante toda la noche a 50°C. Al día siguiente, se lavó la membrana varias veces con tampón de lavado (20 mM fosfato sódico pH 7,2; 1 mM EDTA; 1% SDS; 150 mM NaCl) a 50° C. Los resultados se visualizaron por autorradiografía, exponiendo a temperatura ambiente.

#### **12.4 Marcador del plásmido**

Para tener el marcador del plásmido y conocer la posición de la secuencia de interés en la película, se digirieron 100 ng del plásmido empleado en los ensayos de ensamblaje en

cromatina, con una enzima de restricción que cortara cerca del lugar de inserción de las secuencias en estudio (cassettes GAGA o fragmentos de la zona 5' de flanqueo del promotor i de la GGT de rata) y con otra enzima que cortara en el límite de la sonda *Sca I-Xmn I* empleada en el marcaje terminal indirecto. Así pues, los enzimas de restricción empleados en cada caso fueron: *Sca I/EcoR I* para el cassette GAGA 19X o *Sca I/Kpn I* para los fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata.

### **13. OBTENCIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES**

La fracción cromatográfica con actividad de unión XX, obtenida a partir de la columna de afinidad 2 (apartado 9.4), se inyectó a conejos de raza New Zeland de 2-3 kg de peso, con el fin de obtener antisuecos contra los factores en estudio. Se siguió el protocolo descrito por Ausubel et al. (194). Previamente a la inmunización, se efectuó una extracción de sangre, por punción en la arteria de la oreja, obteniéndose de 2 a 4 ml de suero preinmune.

Se inyectaron 0,5 mg, aproximadamente, de proteína total presente en la fracción cromatográfica XX, mezclados v/v con adyuvante completo de Freund (Sigma). Esta inmunización, y todas las posteriores, se llevaron a cabo mediante varios pinchazos subcutáneos en la zona del lomo.

10-15 días después de esta inyección, se realizó una segunda inmunización con unos 0,5 mg de proteína mezclada v/v con adyuvante incompleto de Freund (Sigma).

15 días más tarde, se efectuó una extracción sanguínea por punción en la arteria de la oreja, obteniéndose de 5 a 7 ml de suero.

Pasadas dos semanas se administró al animal una segunda dosis de recuerdo de proteína con adyuvante incompleto de Freund, y a los 15 días se llevó a cabo una tercera extracción de sangre, consiguiendo unos 6 ml de suero.

Tanto el suero preinmune como los inmunes se obtuvieron dejando la sangre extraída a temperatura ambiente durante varias horas y centrifugándola después a 3.000 rpm, durante 30 minutos a 4°C en rotor HB-4.

### **14. TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES**

Se empleó la técnica de la lipofección, la cual consiste en la introducción de material genético exógeno en una célula mediante la incorporación de este ADN exógeno en liposomas formados a partir de una mezcla 3:1 (p/p) del lípido policationico DOSPA y del lípido neutro DOPE en agua (Life-Technologies, Inc).

Se sembraron diferente número de células (tabla 5) en placas de 24 pocillos (Costar®). Estas células se cultivaron con el medio adecuado y en las condiciones descritas en el apartado 1. 24 horas después, se retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces las células con medio sin suplementar y se añadió el medio de transfección durante 45 minutos a

temperatura ambiente; este medio de transfección se obtenía por mezcla e incubación de las soluciones siguientes (condiciones para tres pocillos):

\* 100µl de medio + 5µl de lipofectamina;

\* 100µl de medio + 0,2 µg de pβgal (control de la eficiencia de la transfección) + 1,5µg de ADN (ya sea el ADN a estudiar, ya sean los controles positivo o negativo).

Las células se incubaron en este medio de transfección el máximo tiempo posible sin que se despegaran o murieran (en la tabla 5 se indican las condiciones de transfección). Pasado este tiempo, se sustituyó el medio de transfección por medio completo, el cual se renovó a las 24 horas. 36-40 horas después de la transfección, se lavaron dos veces las células con tampón PBS frío, se resuspendieron en 500µl/pocillo de tampón de lisis 1X (Promega) y se guardaron en hielo. En estos lisados celulares se cuantificaron las actividades luciferasa y β-galactosidasa (apartado 17). Cada transfección se realizó por triplicado.

**Tabla 5.**

<b>Línea celular</b>	NRK	H5-6
<b>Medio</b>	DMEM	RPMI 1640
<b>Células/pocillo</b>	150.000	200.000
<b>Tiempo de transfección</b>	5 h	4 h 30 min.

## **15. OBTENCIÓN DE ARNm TOTALES. REACCIONES DE RT-PCR**

### **15.1 Extracción de ARNms totales**

El protocolo seguido (209) consistió en cultivar células NRK o H5-6 en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Costar®). Cuando presentaron confluencia, se recogieron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Se añadió 1 ml de una solución 4 M isotiocianato de guanidinio/25 mM citrato sódico pH 7/0,5% sarcosilo/0,1 M β-mercaptoetanol, a cada tubo. Se añadieron 0,1 ml de acetato sódico 2 M, 1 ml de fenol/agua y 0,2 ml de cloroformo. Se mezcló por inversión 10-15 segundos, se incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm (BR4i JOUAN; rotor AB2.14), durante 20 minutos y a 4°C. La fase acuosa se reextrajo con fenol/cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó. El sobrenadante se precipitó con 1 ml de isopropanol. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se disolvió en agua libre de RNasas. La concentración y pureza de ARN total obtenido se determinó por las absorbancias a 260 y 280 nm y la ausencia de contaminación por ADN de la muestra, por electroforesis.

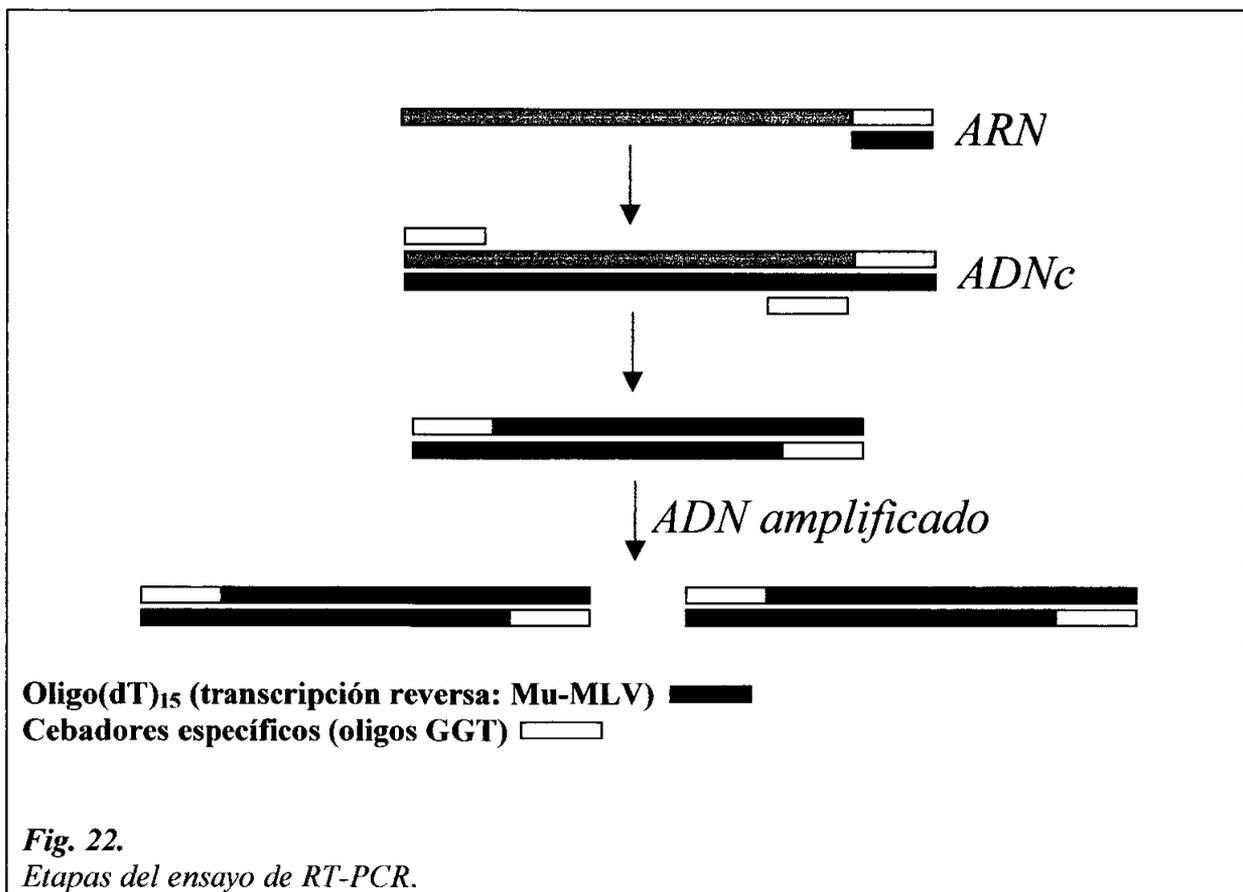
Eventualmente se obtuvieron los ARNs totales con los reactivos RNA Stat-60™ (Tel-Test) o TRIzol™ (GIBCO BRL/Life Technologies), siguiendo las especificaciones de cada fabricante.

## 15.2 Reacción de retrotranscripción (RT)

Estos ensayos se realizaron empleando la retrotranscriptasa M-MLV (Promega) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

2-5  $\mu\text{g}$  de ARNm total se mezclaron con 2  $\mu\text{M}$  de polidT y se incubaron, en un termociclador, a 65°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción 5X suministrado por la casa comercial, 5  $\mu\text{l}$  dNTP 10 mM, 40 U de inhibidor de ribonucleasas RNasin® (Promega), 0,5  $\mu\text{l}$  BSA 10 mg / ml (Promega), 200 U de retrotranscriptasa M-MLV y agua libre de RNasas para un volumen final de reacción de 50  $\mu\text{l}$ ; las reacciones se incubaron en un termociclador a 37°C durante 90 minutos, se pasaron a hielo 2-3 minutos y se calentaron a 90°C durante 2 minutos.

Los productos de las reacciones se emplearon directamente en las reacciones de PCR (fig. 22).



### 15.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se ensayaron varias condiciones para obtener las bandas deseadas eliminando en lo posible las bandas inespecíficas: se emplearon diversas cantidades de mezcla de reacción de retrotranscripción, distintas temperaturas de hibridación y diferentes cantidades de  $MgCl_2$ .

Como enzima se empleó la Taq polimerasa de Eurogentec.

5  $\mu$ l de mezcla de reacción de retrotranscripción se incubaron, en un termociclador, con 5  $\mu$ l de tampón de reacción 1,5 mM en  $MgCl_2$  y 1,5  $\mu$ l de dNTP 10 mM, 1  $\mu$ l de una mezcla 50  $\mu$ M de los oligos específicos del tipo de ARNm de la GGT que se quería amplificar (apartado 2.3), 2 U de EUROtaq ADN-polimerasa y agua hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. Las condiciones de la reacción fueron: 6 minutos a 96°C; 2 minutos a 75°C; 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C; finalmente, 10 minutos a 72°C.

10  $\mu$ l de las muestras de ADN amplificado se separaron en un gel de agarosa al 1,5% en TBE. El gel se desnaturalizó durante una hora a temperatura ambiente, en una solución 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl. Se neutralizó durante una hora a temperatura ambiente con 1 M Tris-HCl pH 7,5/1,5 M NaCl. El gel así tratado, se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond™-N, Amersham) según el método descrito por Southern (208), durante toda la noche, en presencia de SSC 10X. Al día siguiente, se lavó la membrana con SSC 2X, se fijó durante 5 minutos con luz UV (150.000  $\mu$ J) y se introdujo en una bolsa de plástico. Se incubó con la solución de prehibridación (SSC 6X, 10% solución de Denhardt, 0,1 % SDS) durante 2-3 horas a 55°C. Se renovó la solución y se añadió el oligo GGT-6 marcado a una concentración final de 1-2 pmoles y se incubó toda la noche a 55°C. A la mañana siguiente, se lavó la membrana: dos veces, 5 minutos cada vez a temperatura ambiente, con SSC 1X/0,1% SDS; un lavado con SSC 1X/0,1% SDS de 20 minutos, a 55°C; un lavado con SSC 0,2X/0,1% SDS de 20 minutos, a 55°C; un lavado con SSC 2X de 5 minutos a temperatura ambiente. Esta membrana se expuso durante toda la noche.

## 16. TRATAMIENTOS CON XENOBIÓTICOS

Con el fin de estudiar el efecto en la expresión de la GGT de algunas sustancias, se cultivó la línea celular NRK en medio DMEM completo con 0,001 g/l de glutatión reducido (GSH, Sigma) y la línea celular H5-6 en medio RPMI-1640 completo en presencia de  $10^{-4}$  M dexametasona o 1 mM S-adenosilmetionina (SAM; sal de p-toluensulfonato, Sigma).

Se sembraron 300.000-500.000 células por placa de 60/15 mm (Greiner Labortechnik) en medio completo; a las 24 horas, se les cambió el medio por medio suplementado con una de las sustancias más arriba citadas; este medio suplementado se renovó cada 24 horas, durante 5-6 días.

Las placas que se iban retirando, se lavaban tres veces con PBS y se guardaban a -20°C. Una vez reunidas todas las placas, las células se recogieron en tampón 25 mM Tris-HCl pH 8/ 0,1 % Tritón X-100. Las actividades GGT y GOT se determinaron como se

describe en el apartado 17, la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (apartado 18) y los resultados finales se expresaron en mU/mg de proteína.

## 17. CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 17.1 Actividad $\beta$ -galactosidasa

Esta actividad nos permite determinar la eficiencia de la transfección, al cotransfectar células eucariotas con el plásmido p $\beta$ -galactosidasa y el plásmido que contiene el fragmento cuya actividad promotora se pretende estudiar. De esta manera se normalizan los resultados de actividad luciferasa frente a los de  $\beta$ -galactosidasa.

Con el fin de cuantificar esta actividad en las células transfectadas, se siguió el método indicado en *Protocols and Applications Guide* (tercera edición; Promega Corporation (1996)), basado en el descrito por Rosenthal (210). 50  $\mu$ l de lisado celular se mezclaron con 50  $\mu$ l de tampón de reacción (200 mM de fosfato sódico pH 7,3; 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,33 mg/ml o-nitrofenil- $\beta$ -Dgalactopiranosido) y se incubaron 15-20 minutos a 37°C en una placa de 96 pocillos Microtest III™ no tratada de Falcon. La reacción se paró con 150  $\mu$ l de carbonato sódico 1M. La absorbancia se determinó en un lector de microplacas Dynatech MR 5000, a una longitud de onda de 415 nm. Los resultados se expresaron en U por ml de lisado.

### 17.2 Actividad GGT

Se determinó la tasa de actividad GGT en las líneas celulares empleadas en los experimentos de transfección (apartado 14) y tratamiento con diferentes xenobióticos (apartado 16).

Inicialmente, se determinó la actividad de las líneas celulares empleadas según el método empleado en el *Centre du Médicament* (211). Para ello, se cultivaron 400.000 células/pocillo (diámetro del pocillo= 35mm) con el medio adecuado. 48 horas después, se lavaron las células con tampón PBS y se recogieron en 500  $\mu$ l de tampón 25 mM Tris pH 8 /0,1% Triton X-100. La actividad GGT en estos extractos celulares se determinó por un ensayo colorimétrico a punto final, empleando L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 6 mM como sustrato y glicilglicina 150 mM como aceptor, en tampón 100 mM Tris-HCl pH 8,25. A 50  $\mu$ l de muestra se añadieron 50  $\mu$ l de sustrato y 500  $\mu$ l de tampón de reacción para la GGT; se incubó la reacción a 37°C durante una hora y se paró adicionando 600  $\mu$ l de 10% acético. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm frente a un blanco de reactivos.

El método cinético empleado en nuestro laboratorio (212), consiste en la utilización de 4,3 mM L- $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilida como sustrato, realizándose la reacción en presencia de 80 mM glicilglicina, en tampón 0,4 M Tris-HCl pH 8,2. De 5 a 100  $\mu$ l de muestra se mezclaron con la cantidad adecuada de reactivo en un volumen final de 1 ml y se efectuó la medida de la variación de la absorbancia por minuto en un intervalo de 120-180 segundos, a

una longitud de onda de 405 nm y a temperatura ambiente (25°C) o incubando las muestras durante 60 minutos a 37°C. Los resultados se expresaron en mU/mg de proteína.

### 17.3 Actividad luciferasa

Esta actividad enzimática es la que nos permitió conocer la actividad promotora de los diferentes fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata en los experimentos de transfección a líneas eucariotas.

Para ello, 10 µl de lisado celular se mezclaron con 100 µl de sustrato comercial para la enzima (Luciferase Assay System, Promega); inmediatamente, la emisión de fotones se cuantificó en un luminómetro Lumac Biocounter® M-2010.

La actividad luciferasa obtenida se expresa normalizada frente a la actividad β-galactosidasa como cpm por U de actividad β-galactosidasa (cpm/U).

## 18. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas se realizó, generalmente, por el método de Lowry. En aquellos casos en los que se disponía de poca muestra, se emplearon los métodos de medida de la absorbancia a 280 nm y de Bradford.

### 18.1 Método de Lowry

Basándonos en el método descrito por Lowry y cols. (213), el protocolo seguido fue:

\* Preparación extemporánea de la solución ABC, constituida por:

1 volumen de 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 0,1 N NaOH  
0,01 volúmenes de 2% tartrato de sodio y potasio  
0,01 volúmenes de 1% CuSO<sub>4</sub>

\* A 200 µl de muestra o de patrón de BSA 0,1 mg/ml se añadieron 1 ml de la solución ABC, se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 40 µl de Folin-Ciocalteu (Panreac) y se incubaron 30 minutos en oscuridad. Se efectuó la medida de la absorbancia a 600 nm frente a un blanco de H<sub>2</sub>O.

### 18.2 Absorbancia a 280 nm

Este método de cuantificación de proteínas se basa en la absorción de luz ultravioleta por los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas de una muestra. Se realizó para efectuar el seguimiento de los fraccionamientos cromatográficos.

Debido a que la presencia de ácidos nucleicos puede interferir, se mide también la absorbancia a 260 nm y se calcula la concentración de proteínas como:  $\text{mg/ml} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$ . Esta estimación es válida para una relación de absorbancias tal que:  $A_{280}/A_{260} < 0,6$  (194).

### 18.3 Método de Bradford

Eventualmente y para aquellas muestras de las que se disponía de poco volumen, se empleó el método de Bradford (214), basado en el cambio de absorbancia que experimenta una solución ácida de Azul de Coomassie G-250 cuando éste se une a proteínas. En una placa de microtitulación se pipetearon 10  $\mu$ l de muestra o de patrón de BSA, se añadieron 200  $\mu$ l del reactivo de Coomassie (0,125 mg/ml Azul brillante de Coomassie; 6,25% etanol; 12,5% ácido ortofosfórico de una riqueza del 85%) y se efectuó la lectura a 620 nm en un lector de placas Multiskan MCC/340 P, versión 2.33.

### 19. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Para estudiar el papel de las distintas secuencias de la región de flaqueo 5' en la actividad transcripcional del promotor I se empleó la técnica de extensión del cebador (215); a continuación se describen las diferentes etapas de que consta el procedimiento y las condiciones estándar (fig. 23):

#### → Transcripción *in vitro*:

Las condiciones estándar iniciales, a partir de las cuales se puso a punto el ensayo, fueron las siguientes: 500 ng de diferentes moldes clonados en los plásmidos pUC18 ó pUC19 se incubaron con 5  $\mu$ l de extracto nuclear en un tampón que contenía 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 0,5 mM DTT; 25 mM HEPES-KOH pH 7,6; 0,05 mM EDTA; ATP, GTP, CTP y UTP 0,5 mM cada uno y 4 U de RNasin, en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla se incubaba durante 30 minutos, a 25°C. Las condiciones finalmente establecidas, tras optimizar cada una de las variables implicadas en la reacción, fueron: 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25° C, 30 minutos de transcripción y 60 minutos de extensión, 4  $\mu$ l de extracto nuclear y 500 ng de molde.

La reacción se detenía añadiendo 100  $\mu$ l de una solución que contenía 20 mM EDTA; 0,2 M NaCl; 1% SDS y ARN de levadura 0,25 mg/ml.

Posteriormente se añadían 5  $\mu$ l de una solución de Proteinasa K 2,5 mg/ml, se incubaba durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadían 300  $\mu$ l de acetato sódico 0,3 M y se extraía dos veces con fenol/cloroformo.

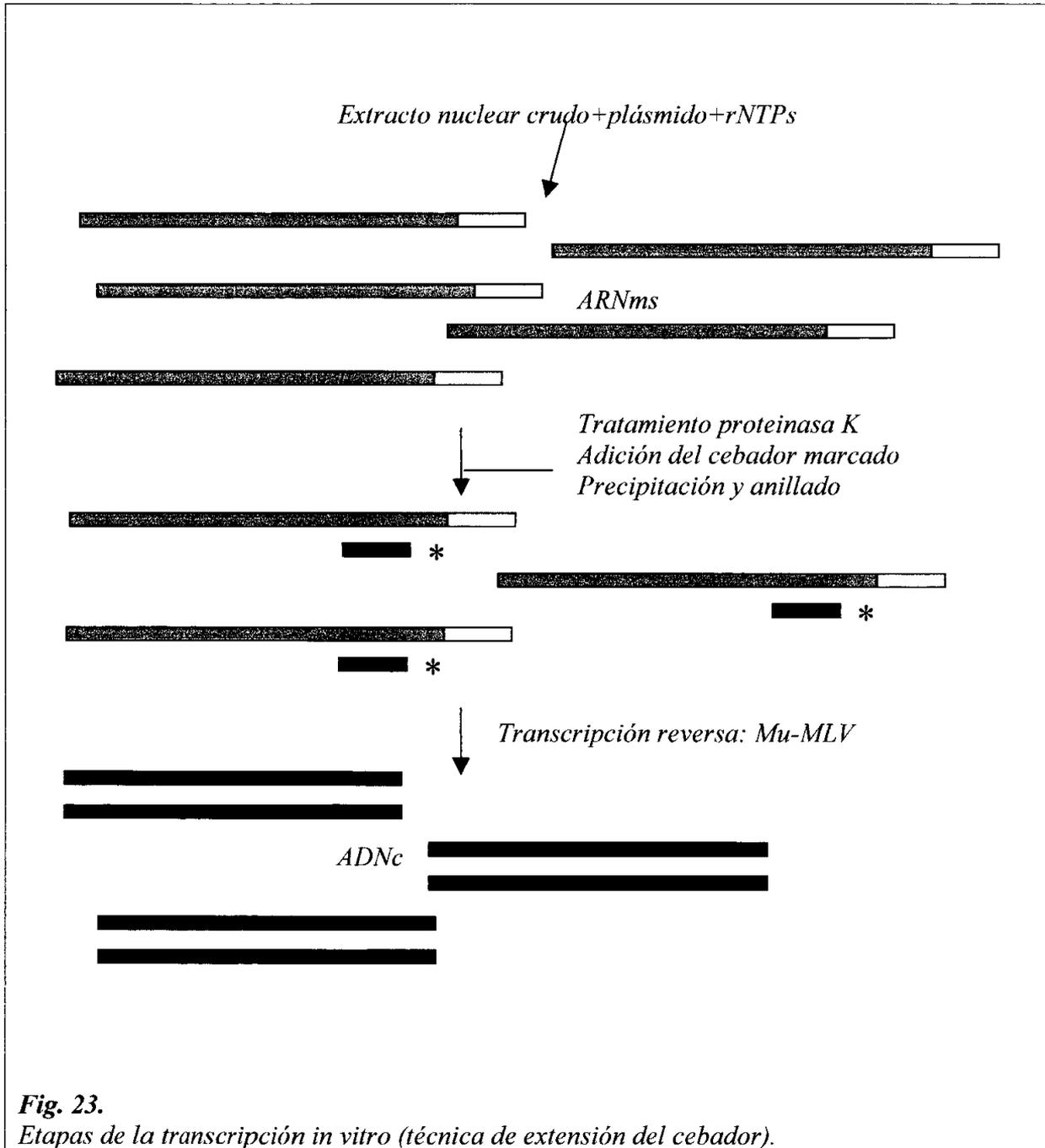
#### → Hibridación:

El cebador utilizado era un oligonucleótido de 17 bases de secuencia. A la solución se le añadían 100.000 cpm de este cebador marcado en 5' y la mezcla se precipitaba con 1 ml de etanol al 100%. El precipitado se disolvía en 100  $\mu$ l de acetato sódico 0,3 M y se repetía la precipitación. Finalmente, el precipitado se lavaba con etanol 70% y se secaba a vacío.

#### → Extensión del cebador:

El precipitado se disolvía en 100 µl de una solución que contenía 2 µl de tampón 2X para retrotranscriptasa AMV facilitado por el proveedor; 1 mM de cada uno de los dNTPs; 6 mM pirofosfato sódico y 2 U de retrotranscriptasa AMV (Promega). La reacción se desarrollaba durante una hora a 42°C; posteriormente se añadían 100 µl de etanol absoluto y el precipitado se secaba y se disolvía en 10 µl de tampón de muestra para geles de secuencia.

Las muestras se separaban en un gel de secuencia que se secaba y se exponía a -80°C.



**Fig. 23.**  
Etapas de la transcripción in vitro (técnica de extensión del cebador).

En los experimentos con antisueros contra los factores de transcripción, el extracto nuclear se incubaba con 1  $\mu$ l de antisuero o suero preinmune durante una hora a 0°C. se añadían a continuación 2  $\mu$ l de una suspensión de proteína A-Sepharosa y se centrifugaba durante un minuto a 14.000 rpm. El sobrenadante se utilizaba en la reacción de transcripción. En la reacción control el extracto se incubaba con 1  $\mu$ l de tampón de transcripción.

## **20. OBTENCIÓN DE ADN DE CÉLULAS EN CULTIVO**

Se siguió el procedimiento descrito por Maniatis et al. (216):

Se cultivaron células NRK o H5-6 hasta confluencia, en placas de 60/15 mm (Greiner Labortechnik), en las condiciones descritas en el apartado 1.2. Tras 5 días de cultivo, se lavaron dos veces las células con PBS frío y se recogieron en PBS frío empleando un rascador; se transfirieron a un tubo y se centrifugaron a 1500 x g durante 10 minutos a 4°C. Se resuspendieron en 5-10 volúmenes de PBS frío y se volvieron a centrifugar. Se resuspendieron las células en TE pH 8,0 a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml, se pasaron a un matraz erlenmeyer y se les añadieron 10 ml de tampón de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA pH 8,0; 20  $\mu$ g/ml RNasa A y 0,5% SDS) por cada ml de suspensión celular, incubándose a 37°C durante una hora como mínimo. A continuación, se añadió proteinasa K a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml y se incubó la muestra durante tres horas a 50°C. Al finalizar esta incubación, se extrajo tres veces con fenol. Finalmente, se precipitó la fase acuosa con 0,27 volúmenes de acetato amónico 7,5 M y 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se centrifugó a 5000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó dos veces con etanol al 75%, se secó y se disolvió en un volumen adecuado de TE pH 8,0. La concentración y pureza fueron determinadas mediante la medida de la absorbancia a 260-280 nm.

## **21. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y DE TRANSFERENCIA A MEMBRANAS**

### **21.1 Electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 4%**

Consisten en minigeles (10x8x0,1 cm) de acrilamida al 4% no desnaturalizantes, de alta fuerza iónica (50 mM Tris-HCl, 380 mM glicina, 2 mM EDTA, 1,33mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 % glicerol). La electroforesis se efectuaba en tampón de alta fuerza iónica, 2mM en MgCl<sub>2</sub>. Eventualmente, se emplearon minigeles de acrilamida al 4% de baja fuerza iónica, que se preparaban en tampón TBE 0,5X/1,33mM MgCl<sub>2</sub> y que se sometían a electroforesis en presencia de 0,5X TBE, 2mM en MgCl<sub>2</sub>.

En ambos casos la mezcla se filtraba y desgasificaba a través de un filtro de nitrocelulosa. Los minigeles se precorrían durante una hora a 90 V a 4°C; como las muestras (reacciones de unión ADN/proteína) carecían de colorante, se cargaban un par de pocillos con tampón de reacción con azul de bromofenol.

### **21.2 Electroforesis en geles de secuencia**

Se prepararon geles de acrilamida al 8% en tampón TBE y en condiciones desnaturalizantes (7M urea) para los experimentos de DNasa I, Exo III e interferencia por DMS, realizando la electroforesis a 45W, en 1X TBE, durante 2,5-3,5 horas.

### **21.3 Electroforesis en geles de SDS/PA**

Se emplearon geles de separación al 10% ó al 15% y geles de concentración al 5%. La separación de las muestras se efectuó en presencia de tampón SDS/Tris/glicina, a 100V en el caso de minigeles (10x8x0,1 cm) y a 100-200V para geles de separación grandes (18x20x0,1 cm).

La mezcla del gel de concentración consistía en 5% acrilamida, 145 mM Tris-HCl pH6,8; 0,1% SDS; el gel de separación consistía en la concentración de acrilamida deseada en tampón 375 mM Tris-HCl pH8,7; 0,1% SDS.

### **21.4 Electroforesis en geles de agarosa**

Se distinguen geles para ADN y para ARN; tanto para unos como para otros, se empleó agarosa de baja electroendósmosis (Bio Rad):

\* geles de diferentes porcentajes de agarosa en 0,5X TBE, 1X Tris/gly o 1X TAE para muestras de ADN a las que se les adicionaba tampón de carga para muestras de ADN 5X; las electroforesis se realizaban a 50-100V.

\* geles de agarosa desnaturalizantes: consisten en geles de agarosa al 1,8 % en 1X tampón de electroforesis con formaldehído (216) para muestras de ARN. Estas muestras se preparaban añadiendo 2 µl de 5X tampón de electroforesis (0,1 M MOPS pH 7; 40 mM acetato sódico; 5 mM EDTA pH 8), 3,5 µl de formaldehído y 10 µl de formamida desionizada a 4,5 µl de muestra de ARN; se calentaban durante 15 minutos a 65°C, se pasaban a hielo y se les añadía 10X tampón de carga para muestras de ARN (Anexo I). El gel se recorría durante 5 minutos a 5V y la separación se efectuaba a 70-90 V.

Los ácidos nucleicos se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y posterior observación con luz ultravioleta.

### **21.5 Transferencia Western**

Esta técnica se basa en la elución electroforética de las proteínas presentes en un gel mediante el empleo de corriente eléctrica (217). Tras realizar una electroforesis en geles de SDS/PA al 10 o al 15 %, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Protran<sup>®</sup> BA85, Schleicher & Schuell) . Para ello, se empleó la técnica de transferencia semi-seca descrita por Kyhse-Andersen (218), empleando un aparato de transferencia semi-seca Trans-Blot<sup>®</sup> SD (Bio Rad).

Se equilibraba el gel en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina; 20% metanol) durante 30 minutos. A continuación, se colocaron de manera secuencial, 3 hojas de papel Whatmann 3MM sobre el ánodo del aparato de transferencia, encima se colocó la membrana, el gel y, finalmente, otras tres hojas de papel Whatmann

3MM; tanto las hojas de papel Whatmann 3MM, como la membrana se humedecieron previamente en tampón de transferencia. La transferencia se realizó durante 15 minutos a 15 V. Finalizada la transferencia, el gel se tiñó con azul de Coomassie y se secó a 80°C sobre papel Whatmann 3MM. La membrana se bloqueó con PBS/0,3% Tween20/2% BSA, durante 30 minutos, y se incubó 1 hora con una dilución 1/50 ó 1/100 del antisuero de conejo obtenido contra las proteínas en estudio (apartado 13). Seguidamente, se lavó 3-4 veces con PBS/0,3% Tween20 y se incubó 30 minutos con un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo (Sigma ImmunoChemicals). Se lavó 3-4 veces con PBS/0,3% Tween20 y se incubó 30 minutos con 15 ml de PAP (complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa, Sigma ImmunoChemicals). Tras lavar 3-4 veces con PBS/0,3% Tween20, se reveló con 30 ml de una solución de 0,3mg/ml de DAB en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5 / 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parando la reacción con H<sub>2</sub>O y dejando secar la membrana al aire. Todas las manipulaciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

### **21.6 Transferencia de complejos ADN-proteína**

Esta técnica consistió en la combinación de un cambio de movilidad en gel (CMG) o un ensayo de entrecruzamiento por luz UV (ELUV) con una transferencia a membrana seguida de inmunodetección.

Se realizó la reacción de unión entre oligonucleótidos y proteínas presentes en extractos nucleares o en fracciones cromatográficas en las condiciones ya descritas en el apartado 10 para los ensayos de CMG y ELUV. A continuación, los complejos ADN-proteína formados se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 4% para los CMG o en geles de SDS/PA para los ensayos de ELUV.

Una vez finalizada la electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa según el protocolo descrito en el apartado 21.5.

Eventualmente, se irradió la membrana con luz ultravioleta durante 5 minutos, empleando una energía de 150.000 µJ, después de la transferencia y antes del bloqueo.

### **21.7 Transferencia Northern**

Muestras de 20 µg de ARN total extraído según los protocolos descritos en el apartado 15.1, de células H5-6 cultivadas durante 6 días en presencia de dexametasona 10<sup>-4</sup> M o de SAM 1 mM, se desnaturalizaron y se separaron en un gel de agarosa desnaturalizante tal y como se describe en el apartado 21.4.

Tras la electroforesis, el gel se lavó con agua-DEPC y se trató con un exceso de 50 mM NaOH / 150 mM NaCl durante 45 minutos a temperatura ambiente, neutralizándolo a continuación con 0,1 M Tris pH 7,5 durante un tiempo similar. Finalmente, el gel se equilibró durante una hora en SSC 20X y se transfirió a una membrana de nylon con la misma solución durante toda la noche.

Finalizada la transferencia, la membrana se lavó con SSC 6X y se secó a 80°C, a vacío, durante dos horas. Este filtro se hibridó durante toda la noche, a 42°C, en una solución que contenía 50% formamida; solución de Denhardt 5X; SSC 6X; 0,1% SDS; 0,1 mg/ml de

ADN de esperma de salmón desnaturalizado y  $10^6$  cpm/ml de una sonda (marcada mediante la técnica del "*random primer*" (Boehringer)) complementaria a la región codificadora del ARNm de la GGT (219).

Al día siguiente, la membrana se lavó a temperatura ambiente con SSC 2X / 0,5% SDS dos veces durante 15 minutos y con SSC 1X / 0,2% SDS a 55°C durante una hora y se expuso a -80°C durante toda la noche, en cassette con pantalla amplificadora y utilizando películas Kodak X-OMAT AR 5.

Como control de la cantidad de ARN cargado en el gel, la membrana se lavó con 0,1% SDS a 100°C durante 15 minutos y se hibridó en las condiciones descritas anteriormente con una sonda complementaria al ARNr 28S.

# Anexo I

## 1. MEDIOS DE CULTIVO, TAMPONES Y SOLUCIONES<sup>(\*)</sup>

### \* Agua-DEPC

0,1 % DEPC; agitar durante 10-12 horas y autoclavar.

### \* Medio LB

Bacto-triptona	10 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l

Ajustar el pH a 7,5 y autoclavar.

### \* Medio SOB

Bacto-triptona	20 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	0,5 g/l

Ajustar el pH a 7,5, autoclavar y añadir, de manera extemporánea 20 ml de MgSO<sub>4</sub> por cada litro de medio.

### \* Tampón PBS, pH 7,3

KCl	2,7 mM
NaCl	137 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,3 mM

### \* Solución de Denhardt 50X

Ficoll 400	10mg/ml
Polivinilpirrolidona	10mg/ml
BSA	10mg/ml

Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas a -20°C.

### \* Solución SSC 20X

NaCl	3 M
Na <sub>3</sub> citrato·2H <sub>2</sub> O	0,3 M

Ajustar el pH a 7 y autoclavar.

### \* Tampón TAE, pH 8,5

Tris-acetato	40 mM
EDTA pH 8,0	2 mM

<sup>(\*)</sup> Ref. 216.

\* Tampón de carga para geles de agarosa  
- muestras de ADN 5X:

glicerol	25%
azul de bromofenol	0,25%
xilen-cianol FF	0,25%

- muestras de ARN 10X:

glicerol	50%
EDTA pH 8	1mM
azul de bromofenol	0,25%
xilen-cianol FF	0,25%

Se prepara en agua-DEPC.

\* Tampón de carga 2X para geles de SDS/PA

$\beta$ -mercaptoetanol	5%
SDS	4%
Tris pH 6,8	100 mM
glicerol	20%
azul de bromofenol	0,5%

† Tampón Ficoll

Ficoll	30%
EDTA pH 7,8	100 mM
azul de bromofenol	0,02%
xilen-cianol	0,02%

\* Tampón SDS/Tris/glicina

Tris base	50 mM
Glicina	380 mM
SDS	0,5%

\* Tampón Tris/glicina, 5X

Tris base	250 mM
Glicina	1,92 M

\* Tampón TBE

Tris base	89 mM
Ácido bórico	89 mM
EDTA pH 8	2 mM

\* Tampón TE, pH 8

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

## 2. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- DNA Strider™ 1.0: programa empleado para obtener los mapas de restricción del fragmento 222 del promotor I del gen de la GGT de rata (220).

- Biolinx: para la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

- Scion-Image: programa que permite analizar la densidad óptica de las bandas de ADN, proteínas o complejos ADN-proteína de imágenes de geles y membranas.

- Paquete de programas GCG y base de datos TFDB: empleados en la búsqueda de elementos reguladores en el fragmento 222 del promotor I del gen de la GGT de rata y de similitudes entre esta secuencia y otras secuencias de ADN.

### **3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS**

Prueba *t* de Student.



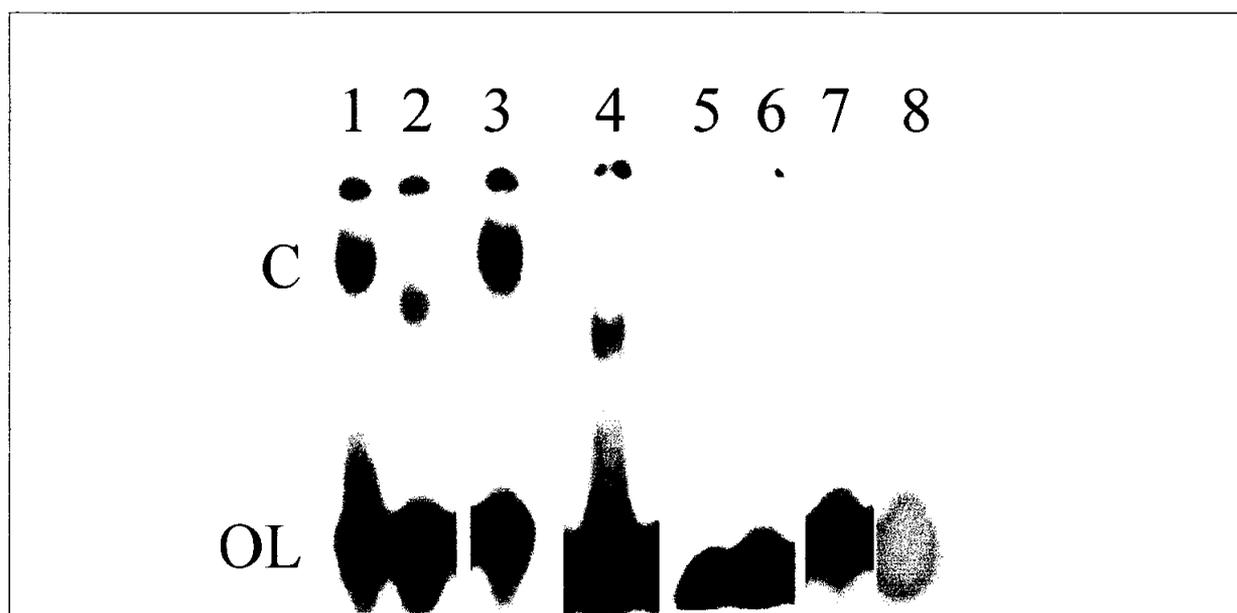
## **RESULTADOS**



## 1. PURIFICACIÓN DE FACTORES NUCLEARES CON ACTIVIDAD DE UNIÓN A LA SECUENCIA DIANA EN EL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GGT DE RATA.

A partir de 24 ratas macho de la raza Wistar, divididas en lotes de 6 ratas, se obtuvieron unos 3-5 ml de extracto hepático, con una concentración de proteínas de 19 mg/ml, aproximadamente. Los extractos crudos así obtenidos se mezclaron y se dializaron hasta una concentración final de KCl de 100 mM, obteniendo lo que llamamos mezcla dializada (M).

En ensayos de CMG siempre se obtenía un complejo ADN-proteína con el oligo JA/NJA-2 que era específico, pues desaparecía con la competencia fría del oligo JA/NJA-2, pero no desaparecía al emplear la competencia fría del oligo JA/NJA-3 (fig. 24, calles 1, 2 y 3, respectivamente). Al utilizar el oligo JA/NJA-3 se obtenía un complejo ADN-proteína con una movilidad diferente, que también era específico (fig. 24, calles 4 y 6, respectivamente). Con la secuencia mutada del oligonucleótido JAM/NJAM los extractos hepáticos no daban complejos ADN-proteína claramente definidos (fig. 24, calles 7 y 8).



**Fig. 24.**

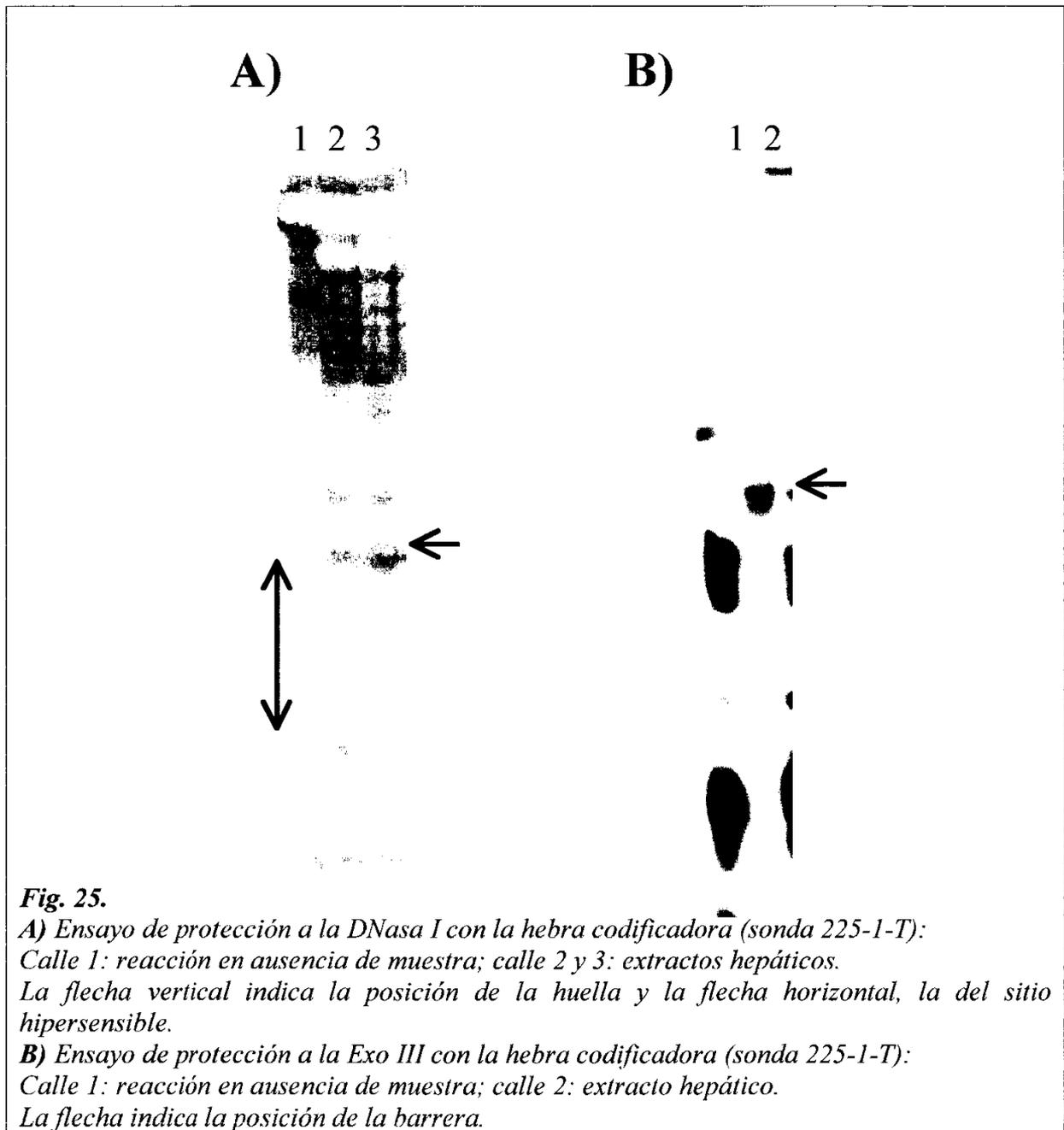
*A) Ensayo de CMG: los extractos hepáticos fueron incubados con los oligos JA/NJA-2, JA/NJA-3 y JAM/NJAM:*

*Calle 1: oligo JA/NJA-2 marcado; calle 2: oligo JA/NJA-2 marcado y su competencia fría; calle 3: oligo JA/NJA-2 marcado y competencia fría del oligo JA/NJA-3; calle 4: oligo JA/NJA-3 marcado; calle 5: reacción en ausencia de muestra; calles 6: oligo JA/NJA-3 marcado y su competencia fría; calle 7: oligo JAM/NJAM y su competencia fría; calle 8: oligo JAM/NJAM.*

*C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.*

Mediante las técnicas de protección a la digestión con DNasa I y con Exo III se pusieron de manifiesto los límites de la secuencia de ADN a la que se unían las proteínas

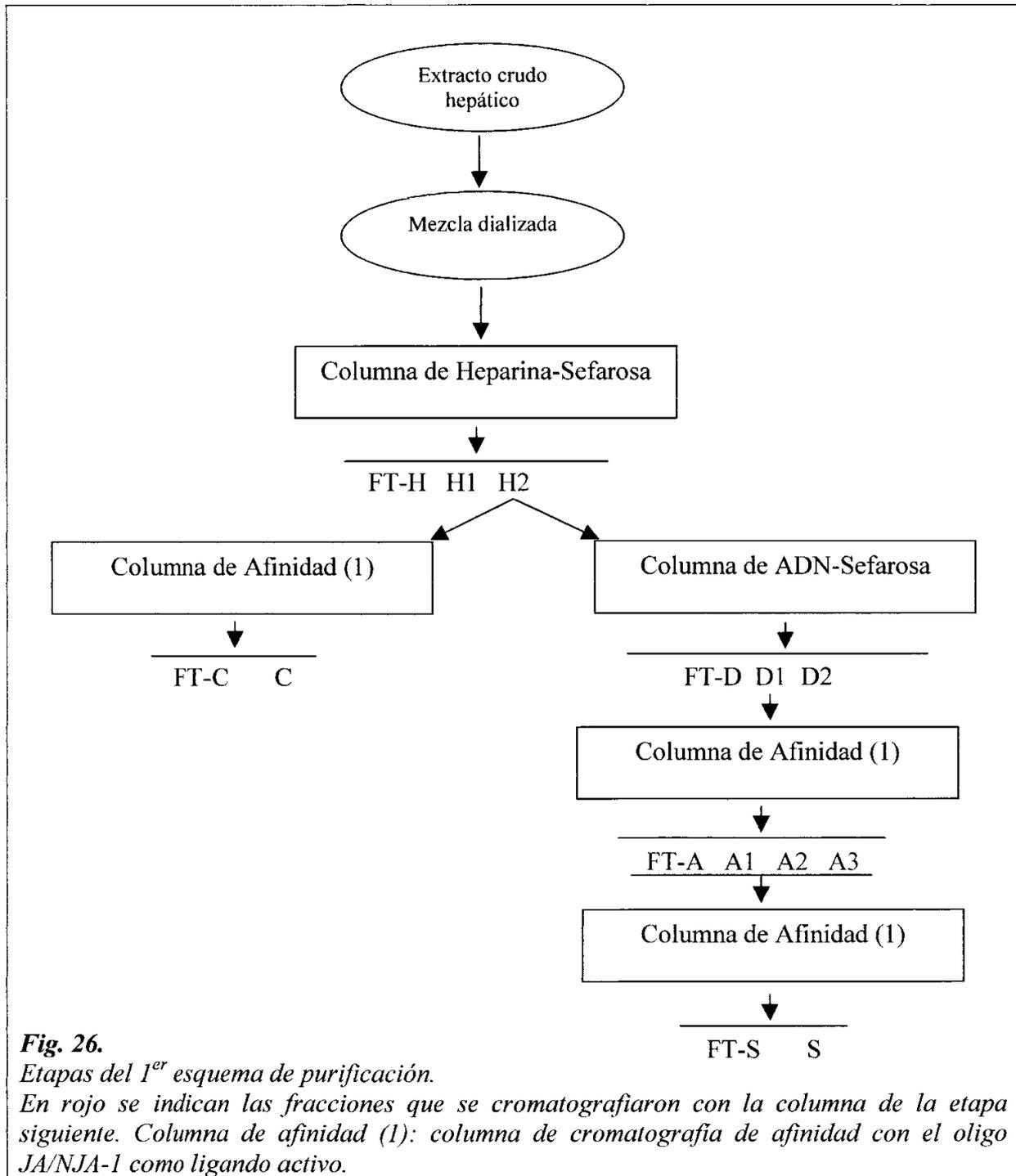
implicadas: en los ensayos de protección a la DNasa I (fig. 25A), los extractos nucleares producían una huella que se extendía desde la posición -595 hasta la posición -566 en la hebra codificadora; en los experimentos de protección a la Exo III se obtuvo una intensa barrera en la posición -566 de la hebra codificadora (fig. 25B).



La mezcla dializada de extractos nucleares se fraccionó a través de diversas columnas de cromatografía, realizando el seguimiento de la purificación mediante ensayos de CMG y ensayos de protección a la digestión por enzimas (Exo III y DNasa I). A continuación se describen los dos esquemas de fraccionamiento cromatográfico llevados a cabo.

1<sup>er</sup> esquema de purificación:

Como se observa en la figura 26, este esquema de fraccionamiento constaba de varias etapas. La mezcla de extractos hepáticos se fraccionó a través de una columna de Heparina-Sefarosa mediante un gradiente salino discontinuo de KCl, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9 de *Material y Métodos* y empleando el tampón H con la concentración de KCl



**Fig. 26.**

*Etapas del 1<sup>er</sup> esquema de purificación.*

*En rojo se indican las fracciones que se cromatografiaron con la columna de la etapa siguiente. Columna de afinidad (1): columna de cromatografía de afinidad con el oligo JA/NJA-1 como ligando activo.*

requerida para cada etapa. La fracción no retenida se denominó FT-H; las fracciones eluidas a 250 mM, 500 mM y 2M se llamaron H1, H2 y H3, respectivamente (fig. 27A). Estas fracciones se dializaron hasta 100 mM en KCl.

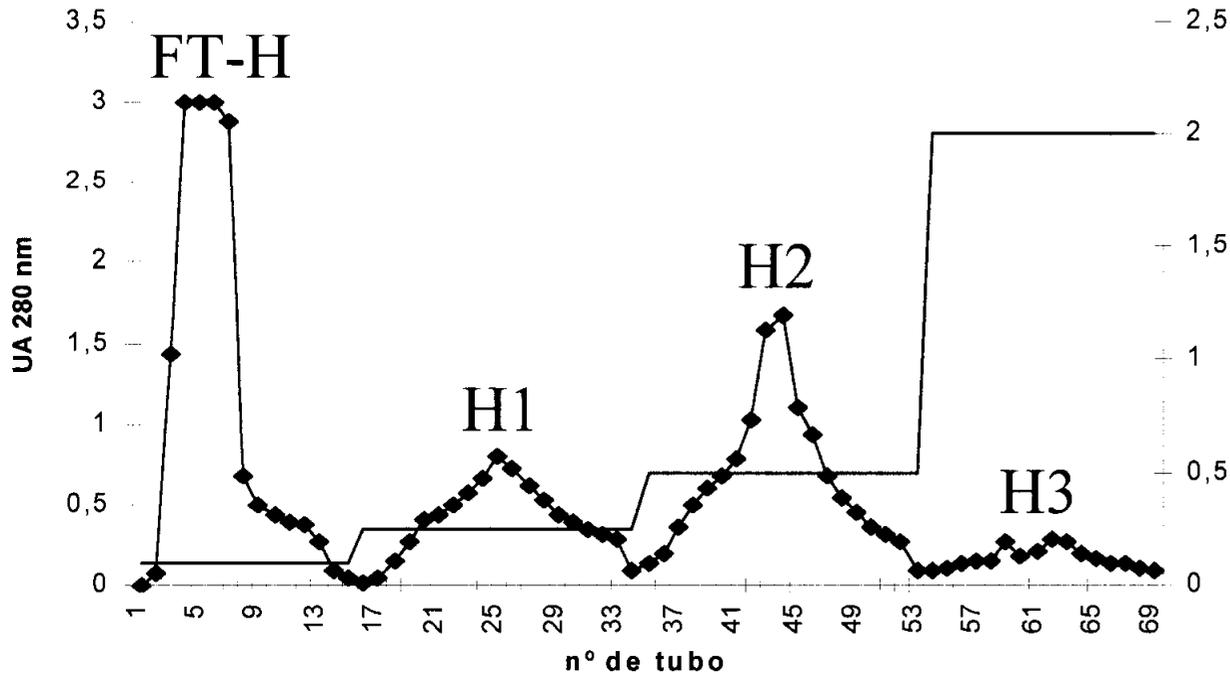
En la figura 27B se puede observar que la fracción H2 originó complejos ADN-proteína en ensayos de CMG en los que las muestras fueron incubadas en presencia del oligonucleótido JA/NJA-2.

El complejo observado para la fracción H2 en las calles 4 y 5 de la figura 27C era diferente del obtenido con el factor Sp1 (calles 2 y 3, fig. 27C), para el cual existe una caja CG degenerada en la posición -573 (por lo tanto, presente en la secuencia del oligonucleótido JA/NJA-2), por lo que se descartó la posibilidad de que el factor con actividad de unión en las muestras activas fuera el Sp1, corroborando observaciones previas obtenidas con ensayos de protección a la DNasa I (221).

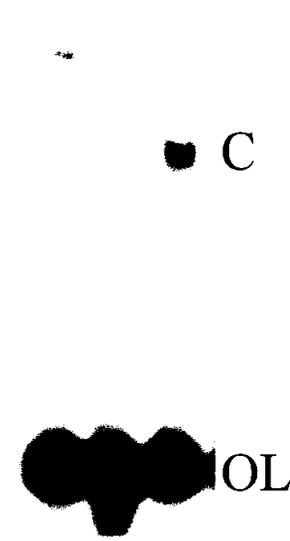
La fracción activa de esta cromatografía (H2) se sometió a una segunda purificación a través de una columna de ADN-Sefarosa en presencia de NP-40 al 0,1%. La fracción no retenida se denominó FT-D. Como en el caso anterior, se efectuó una elución de las proteínas retenidas empleando un gradiente salino discontinuo, denominando D1 a la fracción eluida a 250 mM, D2 a la eluida a 500 mM y D3 a la fracción eluida a 2M. Igualmente, las fracciones fueron dializadas hasta 100 mM en KCl (fig. 28A). Se comprobó que las fracciones activas eran D1 y D2 (fig. 28B), aunque la fracción D1 estaba más enriquecida en proteína activa y se obtenía mejor el complejo ADN-proteína, por lo que se decidió proseguir la purificación con esta fracción (fig. 28C). Como se observa en la figura 29, los complejos ADN-proteína obtenidos con la fracción H2 y D1 eran específicos, pues desaparecían al efectuar la reacción de unión en presencia de la competencia fría del oligo.

La fracción activa D1 del segundo paso se pasó a través de una columna de afinidad con el oligonucleótido JA/NJA-1 unido a la matriz de Sefarosa, efectuando la elución a 250 mM (A1), 500 mM (A2) y 2 M en KCl (A3); a la fracción no retenida se la denominó FT-A (fig. 30A).

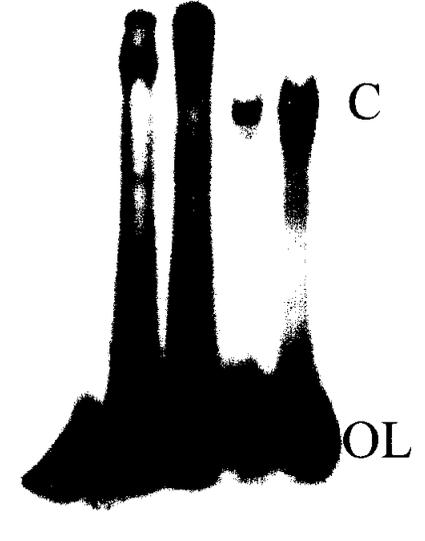
Como se observa en la figura 30B la actividad de unión se perdía, por lo que se reunieron los volúmenes de estas fracciones, se dializaron hasta 100 mM en KCl y se sometieron a un segundo paso de purificación a través de esta columna de afinidad, llevando a cabo una única elución a 2M en KCl; de esta manera se pretendía recuperar la actividad de unión. Las fracciones obtenidas se denominaron FT-S (fracción no retenida) y S (fig. 31A). En la fracción S se obtenía un complejo que presentaba una movilidad diferente de la del complejo obtenido con la fracción H2 y que desaparecía tanto en presencia de ADN heterólogo (calle 5, fig. 31B) como con la competencia fría del oligo (calle 6, fig. 31B), por lo que se consideró que era inespecífico. Para determinar si la columna de afinidad era responsable de la pérdida de actividad de las proteínas purificadas, se cromatografió directamente un determinado volumen de la fracción H2 (1 ml) a través de la columna de afinidad en presencia de NP-40 al 0,1% y realizando una única elución a 2M. Las fracciones obtenidas se llamaron FT-C y C (fig. 31C). Para la fracción C se obtuvo un complejo similar en movilidad al obtenido con la fracción H2, aunque parecía que parte de la actividad se hubiera eluido en el FT-C (debido a la saturación de los puntos activos de la columna por exceso de muestra) (fig. 31D).

**A)****B)**

1 2 3

**C)**

1 2 3 4 5

**Fig. 27.**

**A)** Perfil de elución de la columna de Heparina-Sefarosa.

La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

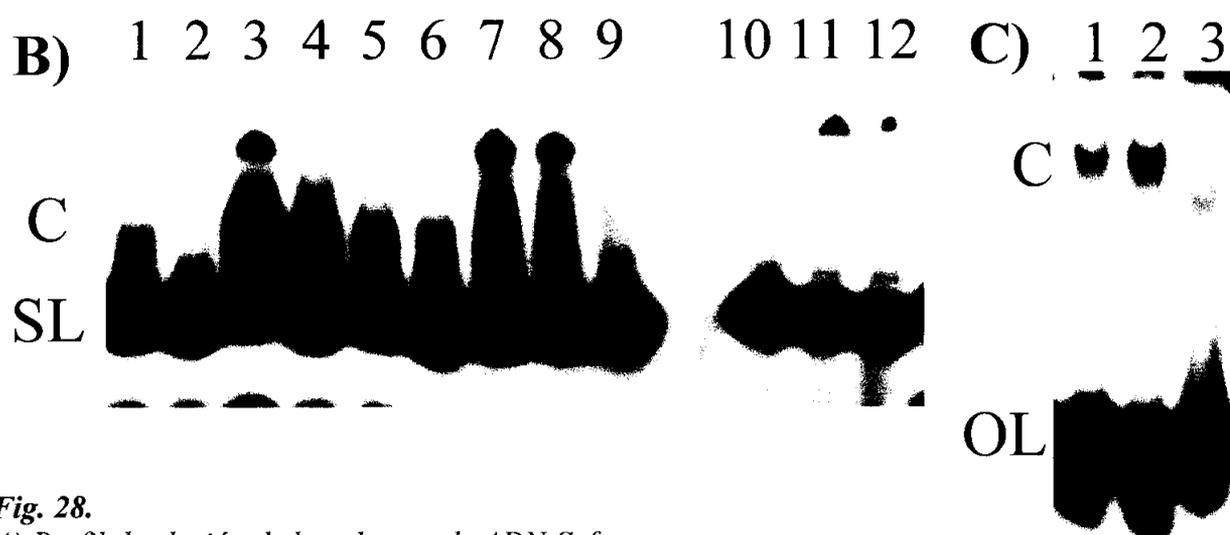
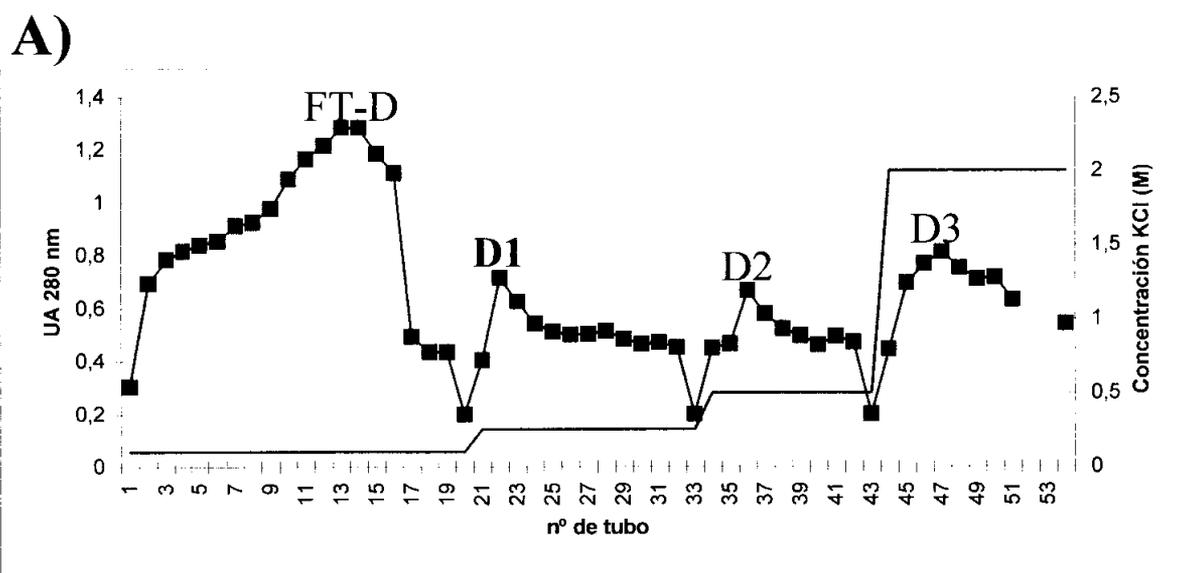
**B)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de Heparina-Sefarosa incubadas con el oligo JA/NJA-2:

Calle 1: FT-H; calle 2: H1; calle 3: H2.

**C)** Ensayo de CMG: Sp1 (Promega) y fracción H2 fueron incubadas con el oligo JA/NJA-2:

Calle 1: reacción en ausencia de muestra. calle 2: 1  $\mu$ l Sp1; calle 3: 3  $\mu$ l Sp1; calle 4: 3  $\mu$ l H2; calle 5: 5  $\mu$ l H2.

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.



**Fig. 28.**

**A)** Perfil de elución de la columna de ADN-Sefarosa.

La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

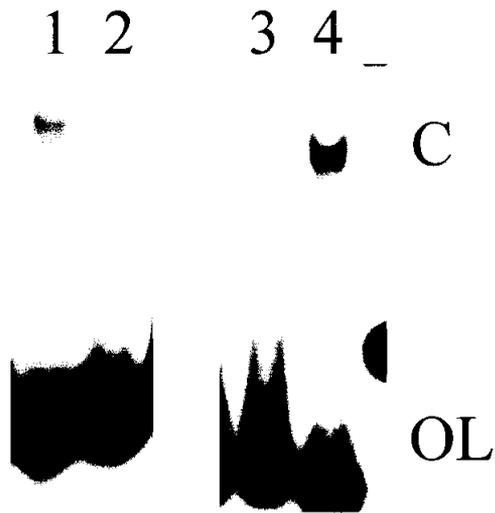
**B)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de ADN-Sefarosa incubadas con la sonda 225-1-T:

Calle 1: FT-D; calles 2-6: tubos n° 21-25, correspondientes a la fracción D1; calles 7-9: tubos n° 36-38, correspondientes a la fracción D2; calles 10-12: tubos n° 46-48, correspondientes a la fracción D3.

**C)** Ensayo de CMG con el oligo JA/NJA-2:

Calle 1: fracción H2; calle 2: fracción D1; calle 3: fracción D2.

C: complejo ADN-proteína; SL: sonda libre.



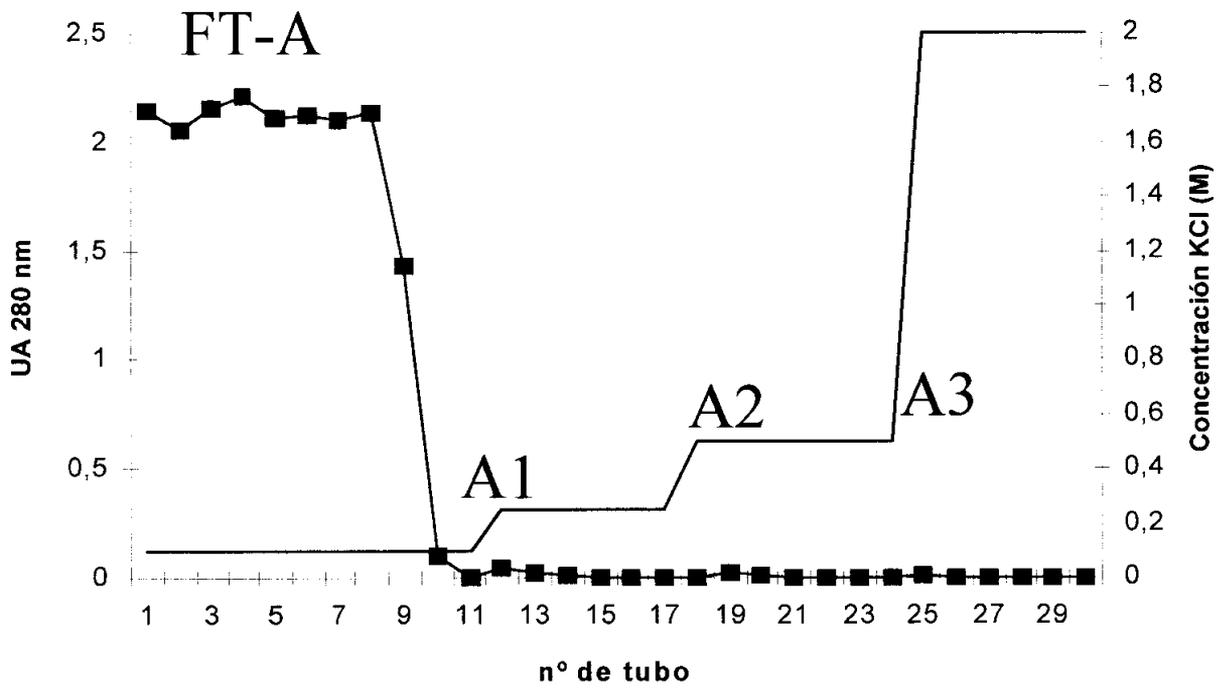
**Fig. 29.**

*Ensayo de CMG con el oligo JA/NJA-2:*

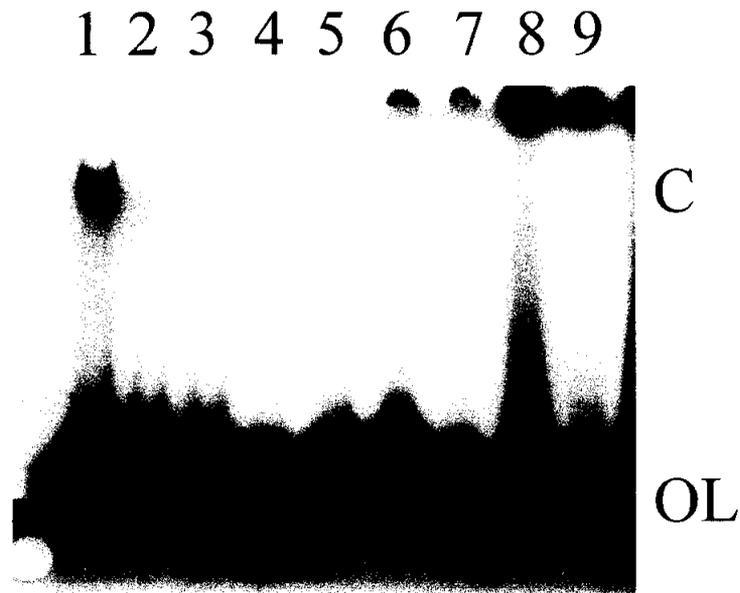
*Calle 1: fracción H2; calle 2: fracción H2 y competencia fría del oligo JA/NJA-2; calle 3: fracción D1 y competencia del oligo JA/NJA-2; calle 4: fracción D1.*

*C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.*

**A)**



**B)**



**Fig. 30.**

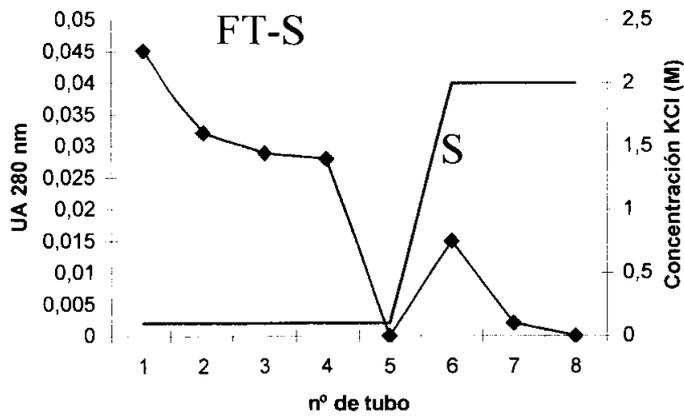
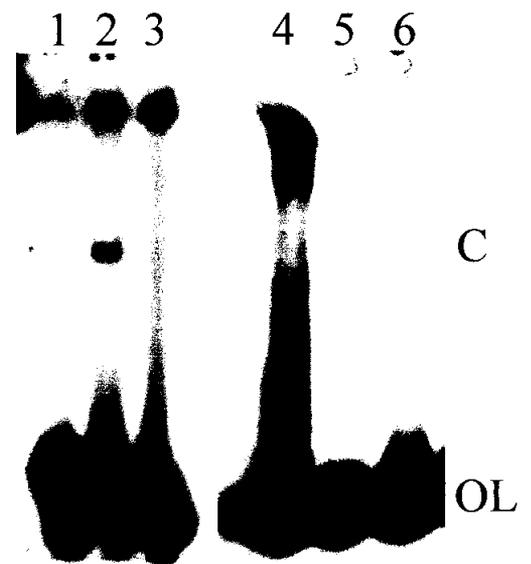
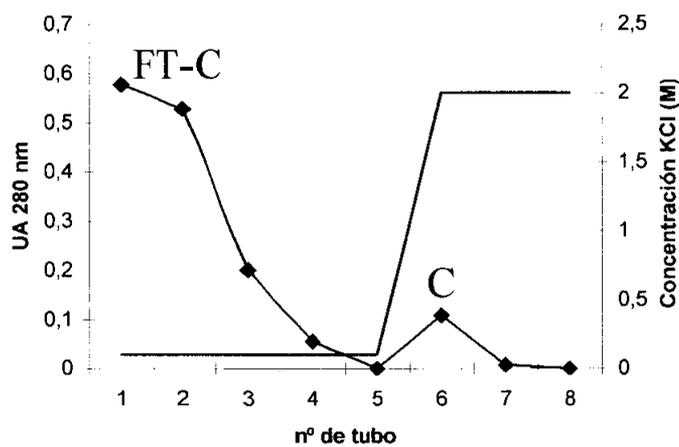
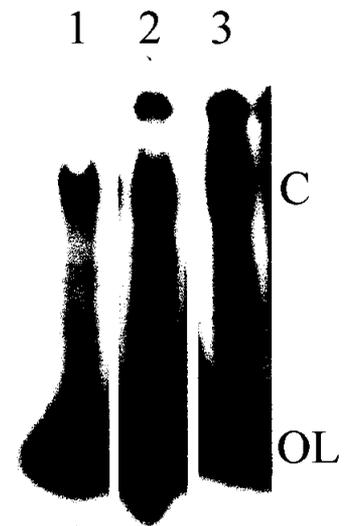
**A)** Perfil de elución de la columna de afinidad con el oligo JA/NJA-1.

La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

**B)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad incubadas con el oligo JA/NJA-2:

Calle 1: DI; calles 2-3: FT-A con diferentes cantidades de poli(dIdC); calle 4: tubo n° 12 de la fracción A1; calle 5: tubo n° 13 de la fracción A1; calle 6: tubo n° 19 de la fracción A2; calle 7: tubo n° 20 de la fracción A2; calle 8: tubo n° 25 de la fracción A3; calle 9: tubo n° 26 de la fracción A3.

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.

**A)****B)****C)****D)****Fig. 31.**

**A) y C)** Perfiles de elución de la columna de afinidad con el oligo JA/NJA-1: fracciones FT-S y S (A) y fracciones FT-C y C (C).

La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

**B)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad (FT-S y S) incubadas con el oligo JA/NJA-2:

Calle 1: FT-S; calle 2: 7 µl de fracción S; calle 3: reacción en ausencia de muestra; calle 4: 9 µl de fracción S; calle 5: 9 µl de fracción S y 500 ng de poli(dIdC); calle 6: 9 µl de fracción S con 500 ng de competencia JA/NJA-2 fría.

**D)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad (FT-C y C) incubadas con el oligo JA/NJA-2:

Calle 1: H2; calle 2: C; calle 3: FT-C.

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.

Los ensayos de protección a la digestión por DNasa I y de la barrera a la Exo III de cada una de las fracciones activas obtenidas a lo largo de este proceso de separación cromatográfica, pusieron de manifiesto la presencia o ausencia de sitios hipersensibles, huellas y barreras. Se observó la presencia de barrera a la Exo III en extractos hepáticos y en las fracciones FT-H, H2, FT-D, D1 y D2 (ver las calles correspondientes en la figura 32A); sin embargo no se obtuvo barrera a la Exo III en ninguna de las fracciones procedentes de las purificaciones a través de la columna de afinidad (fracciones de las series A (fig. 32B), S y C).

En los ensayos de protección a la DNasa I se observó la presencia de sitio hipersensible y huella en la fracción H2 (fig. 32C, calle 2) y la presencia de sitio hipersensible en las fracciones D1 y D2 (fig. 32C, calles 3 y 4, respectivamente); sin embargo no se obtuvo ni huella ni sitio hipersensible en las fracciones de la serie A de la columna de afinidad. Para la fracción C se observó la aparición del sitio hipersensible y de la huella (fig. 32D, calle 5), pero en la fracción S no se detectó ninguna señal (fig. 32D, calle 3).

Los resultados expuestos mostraban que, durante el fraccionamiento a través de la columna de afinidad posterior a la cromatografía con la columna de ADN-Sefarosa, se perdía la actividad de unión a la secuencia diana. Tras comprobar que no se había quedado retenida ninguna proteína en la columna mediante un lavado con NaSCN 3M, se decidió modificar este esquema de fraccionamiento cromatográfico.

**Fig. 32.**

**A)** Ensayo de protección a la Exo III con la hebra codificadora (sonda 225-1-T):

Calle 1: reacción en ausencia de muestra; calle 2: extracto hepático; calle 3: FT-H; calle 4: H1; calle 5 H2; calle 6: H3; calle 7: FT-D; calle 8: D1; calle 9: D2; calle 10: D3.

La flecha indica la posición de la barrera.

**B)** Ensayo de protección a la Exo III con la hebra codificadora (sonda 225-1-T):

Calle 1: reacción en ausencia de muestra; calle 2: FT-A; calle 3: tubo nº 12 de la fracción A1; calle 4: tubo nº 13 de la fracción A1; calle 5: tubo nº 19 de la fracción A2; calle 6: tubo nº 20 de la fracción A2; calle 7: tubo nº 25 de la fracción A3; calle 8: tubo nº 26 de la fracción A3.

La flecha indica la posición en la que se encontraría la barrera.

**C)** Ensayo de protección a la DNasa I con la hebra codificadora (sonda 225-1-T):

Calle 1: reacción en ausencia de muestra; calle 2: H2; calle 3: D1; calle 4: D2; calle 5: D3.

La flecha vertical indica la posición de la huella y la flecha horizontal, la del sitio hipersensible.

**D)** Ensayo de protección a la DNasa I con la hebra codificadora (sonda 225-1-T):

Calle 1: reacción en ausencia de muestra; calle 2: FT-S; calle 3: S; calle 4: FT-C; calle 5: C; calle 6: H2.

La flecha vertical indica la posición de la huella y la flecha horizontal, la del sitio hipersensible.

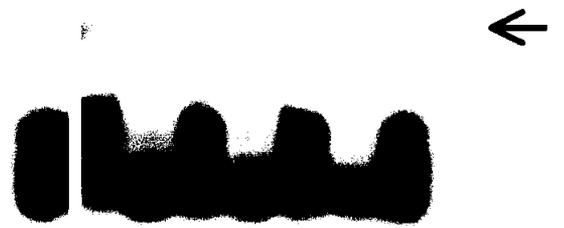
**A)**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



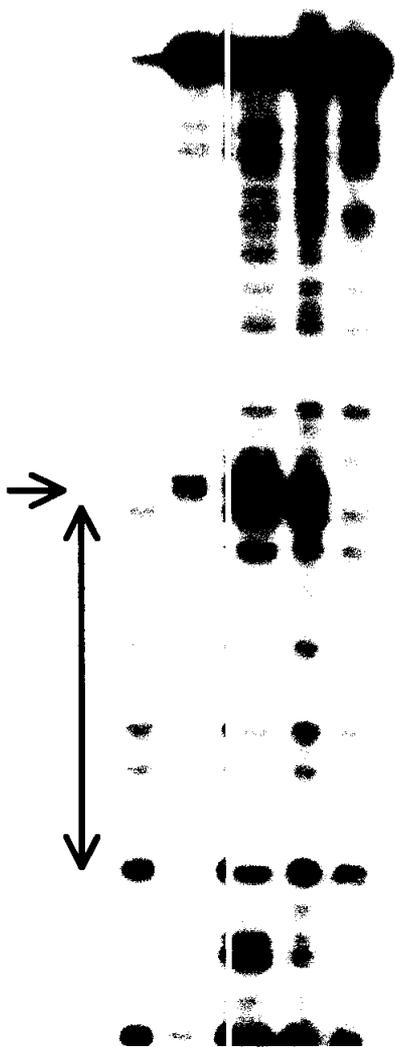
**B)**

1 2 3 4 5 6 7 8



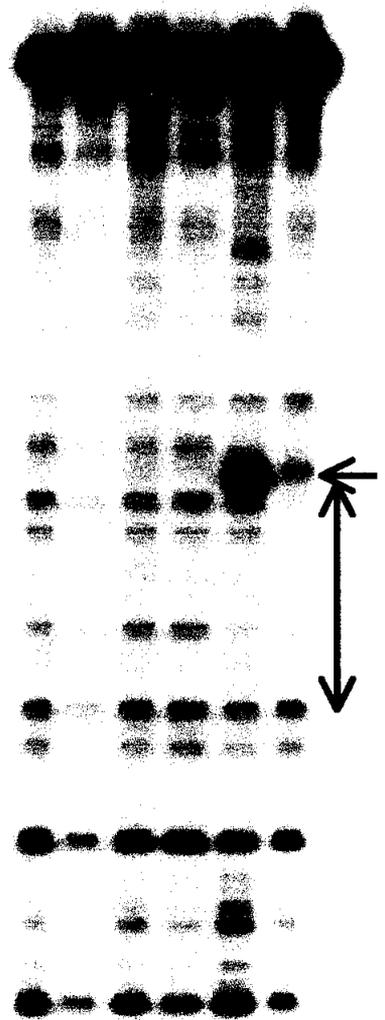
**C)**

1 2 3 4 5



**D)**

1 2 3 4 5 6



## 2º esquema de purificación:

Como se indica en la figura 33, se eliminó la etapa de purificación a través de la columna de ADN-Sefarosa y se realizaron múltiples pasos a través de la columna de afinidad, con el fin de concentrar y enriquecer la muestra.

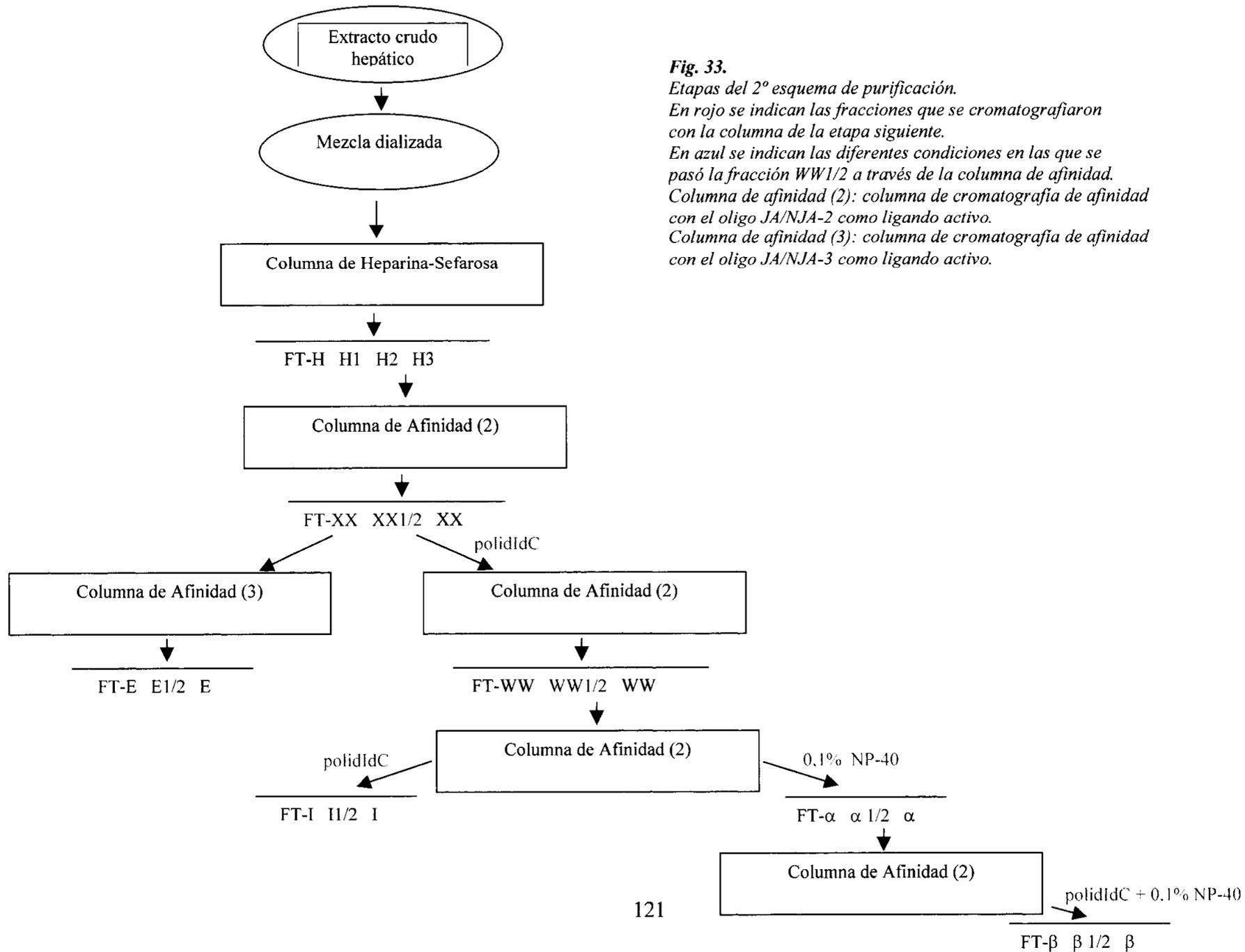
La mezcla dializada se fraccionó a través de la columna de Heparina-Sefarosa; como en el primer esquema, la elución se realizó mediante un gradiente salino discontinuo. A la fracción no retenida se la llamó FT-H y a las restantes, eluidas a diferente concentración salina: H1, H2 y H3. La fracción activa, H2, se cromatografió a través de una columna de afinidad, pero, con el fin de que la cromatografía fuera más específica aún, se empleó el oligonucleótido JA/NJA-2 como ligando activo en lugar del oligo JA/NJA-1; en este caso se efectuó una elución a 500 mM (XX1/2) y a 2M (XX) de KCl (fig. 34A). La actividad de unión al oligo JA/NJA-2 y a la sonda 225-1-T se detectó, mayoritariamente, en las fracciones unidas; en la fracción no retenida se observaba algo de actividad de unión debido a la saturación de la columna (figs. 34B y C).

El análisis de la fracción XX mediante geles de SDS/PA (fig. 34D) reveló la presencia de sólo cuatro bandas con pesos moleculares de 100, 70, 41 y 38 kDa, mientras que en la fracción XX1/2 el patrón de bandas fue más complejo.

La fracción no retenida de esta última columna, FT-XX, se fraccionó a través de una columna de afinidad con el oligo JA/NJA-3, como se indica en la figura 34E; así se obtuvieron las fracciones FT-E, E1/2 y E, encontrándose una actividad de unión en la fracción E1/2 que se consideró diferente a la presente en la fracción H2, pues se unía a una secuencia distinta (fig. 34F).

Se intentó separar la actividad de unión presente en la fracción XX1/2, de otras proteínas que copurificaban, mediante la incubación de la muestra con la resina de la columna de afinidad en presencia de poli(dIdC). A las fracciones obtenidas se las denominó: FT-WW, WW1/2 y WW (fig. 35A). El correspondiente ensayo de CMG mostró la presencia de actividad de unión a la secuencia diana en la fracción WW1/2 (fig. 35B); debido a que el análisis mediante geles de SDS/PA aún era bastante complejo (fig. 35C, calle3), esta fracción se volvió a someter a un segundo paso por la columna de afinidad en presencia de poli(dIdC), obteniéndose la serie I (fig. 36A), o en presencia de NP-40 al 0,1%, obteniéndose la serie  $\alpha$  (fig. 36C). El poli(dIdC) y el NP-40 se emplearon para eliminar las uniones inespecíficas de otras proteínas presentes en las muestras.

Ensayos de CMG evidenciaron que la actividad de unión a la secuencia en estudio se encontraba en la fracción I1/2 (fig. 36B, calle 2) de la serie I; en cuanto a la serie  $\alpha$ , la actividad de unión también se detectó en la fracción  $\alpha$ 1/2 (fig. 36D, calle 5) aunque la mayor parte de proteína se encontraba en la fracción FT- $\alpha$  (compárese, en la figura 36C, la absorbancia a 280 nm obtenida para la fracción FT- $\alpha$  con la absorbancia obtenida para las fracciones  $\alpha$  y  $\alpha$ 1/2).



**Fig. 34.**

**A)** Perfil de elución de la columna de afinidad con el oligo JA/NJA-2.

La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

**B)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad incubadas con el oligo JA/NJA-2:

Calle 1: reacción en ausencia de muestra; calle 2: FT-XX; calle 3: XX1/2; calle 4: XX.

**C)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad incubadas con la sonda 225-1-T:

Calles 1-2: H2 con 1000 y 500 ng, respectivamente, de ADN heterólogo; calles 3-4: FT-XX con 1000 y 500 ng, respectivamente, de ADN heterólogo; calles 5-6: XX1/2 con 1000 y 500 ng, respectivamente, de ADN heterólogo; calle 7: XX con 500 ng de ADN heterólogo.

Fracciones de la columna de afinidad incubadas con el oligo JA/NJA-2:

Calle 8: XX; calle 9: XX con competencia fría del oligo; calle 10: XX1/2; calle 11: XX1/2 con competencia fría del oligo.

**D)** Gel de SDS/PA al 15% teñido con plata:

Calle 1: FT-XX; calle 2: XX1/2; calle 3: XX; PM: patrón de pesos moleculares en kDa.

**E)** Perfil de elución de la columna con el oligo JA/NJA-3.

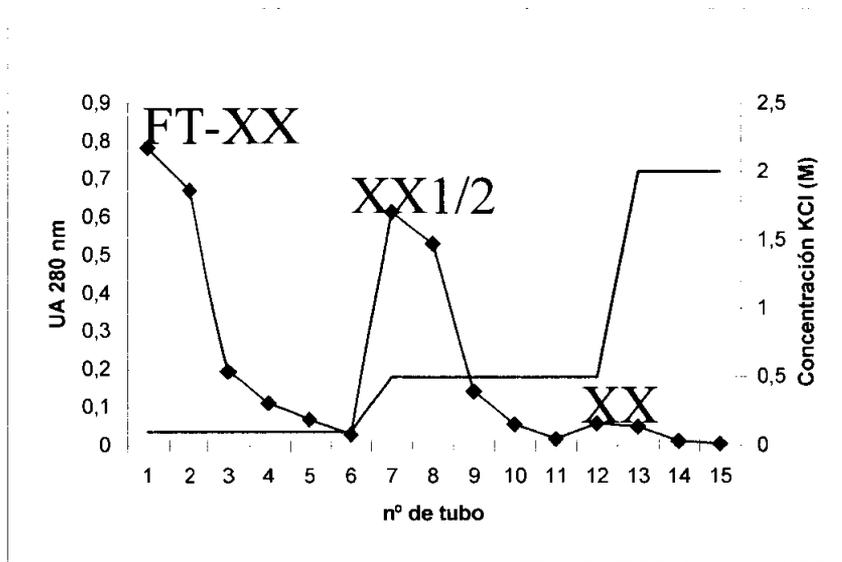
La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

**F)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad incubadas con el oligo JA/NJA-3.

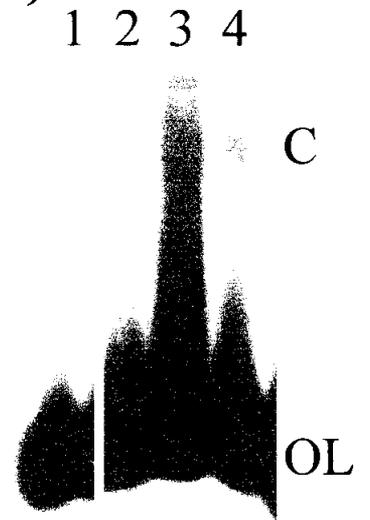
Calle 1: FT-E; calle 2: E1/2; calle 3: E.

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre; SL: sonda libre.

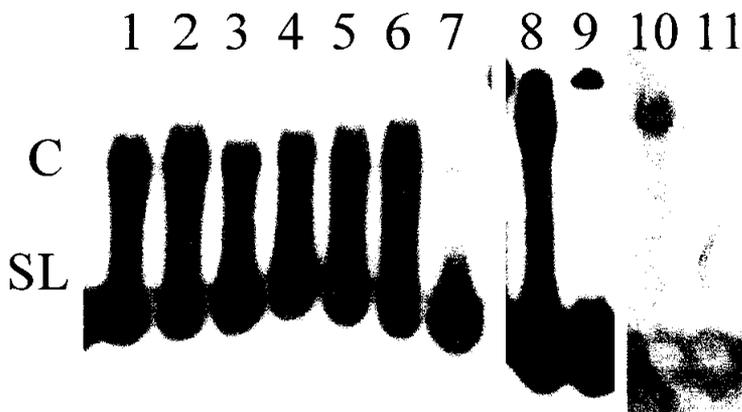
**A)**



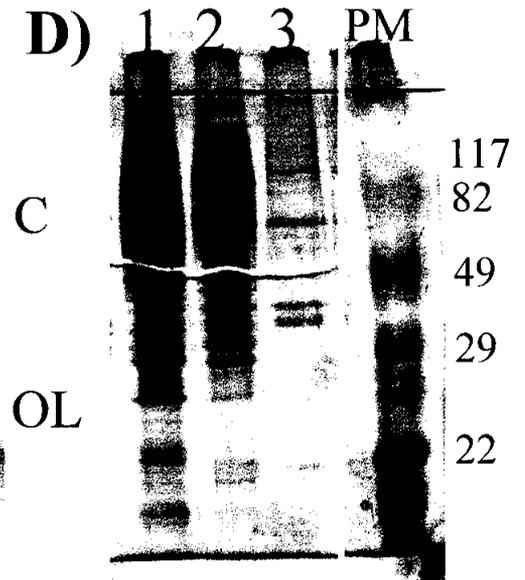
**B)**



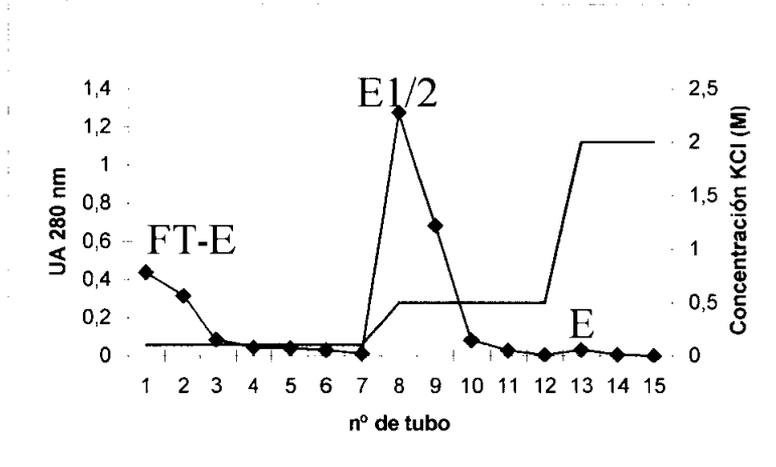
**C)**



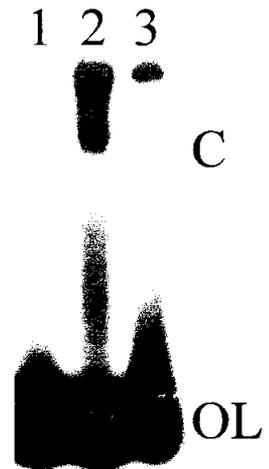
**D)**



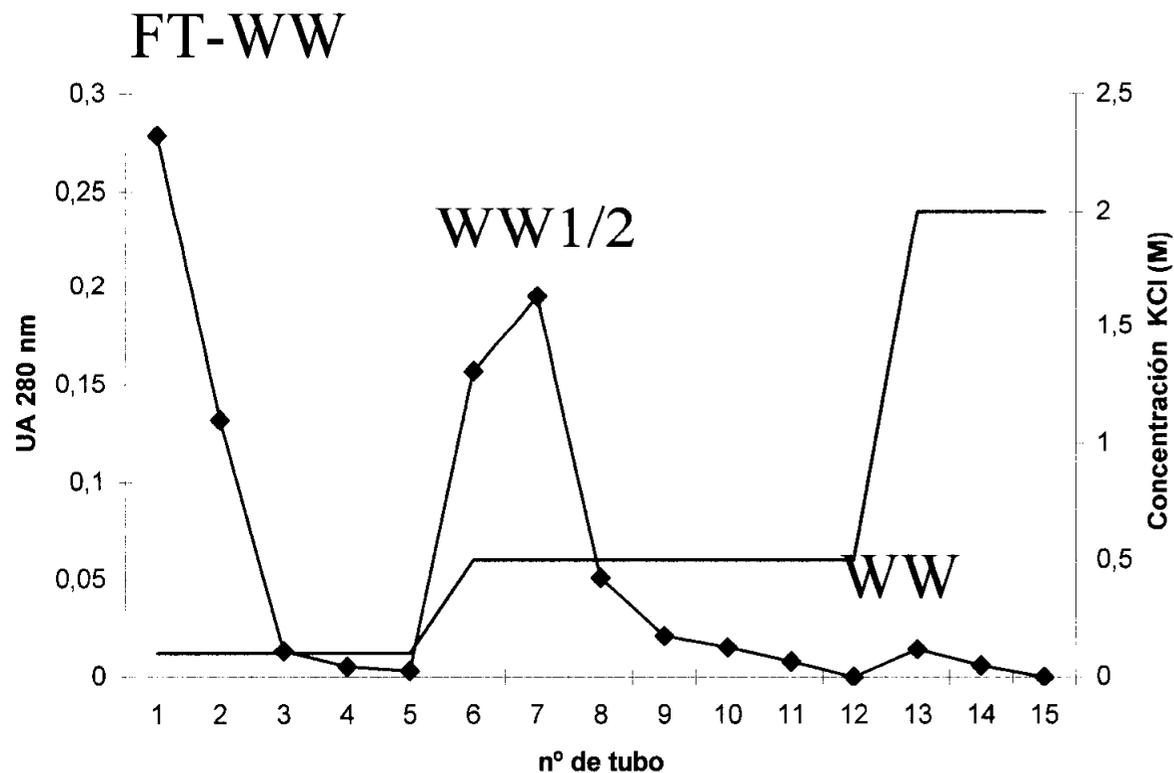
**E)**



**F)**



A)



B)



C)

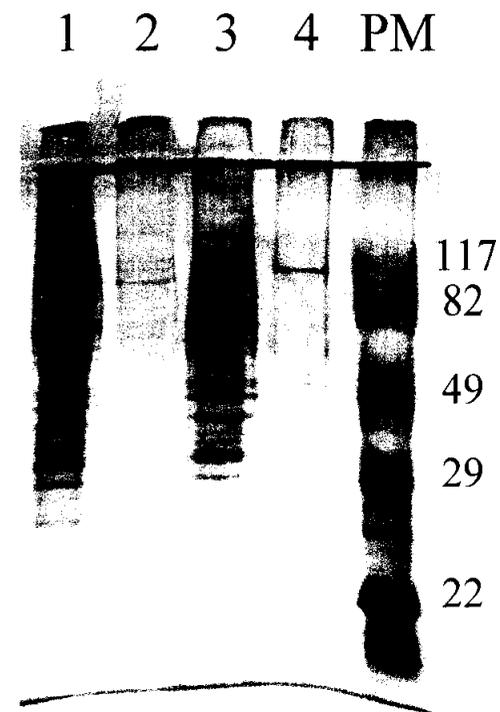


Fig. 35.

A) Perfil de elución de la columna de afinidad en presencia de poli(dIdC).

La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

B) Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad incubadas con el oligo JA/NJA-2.

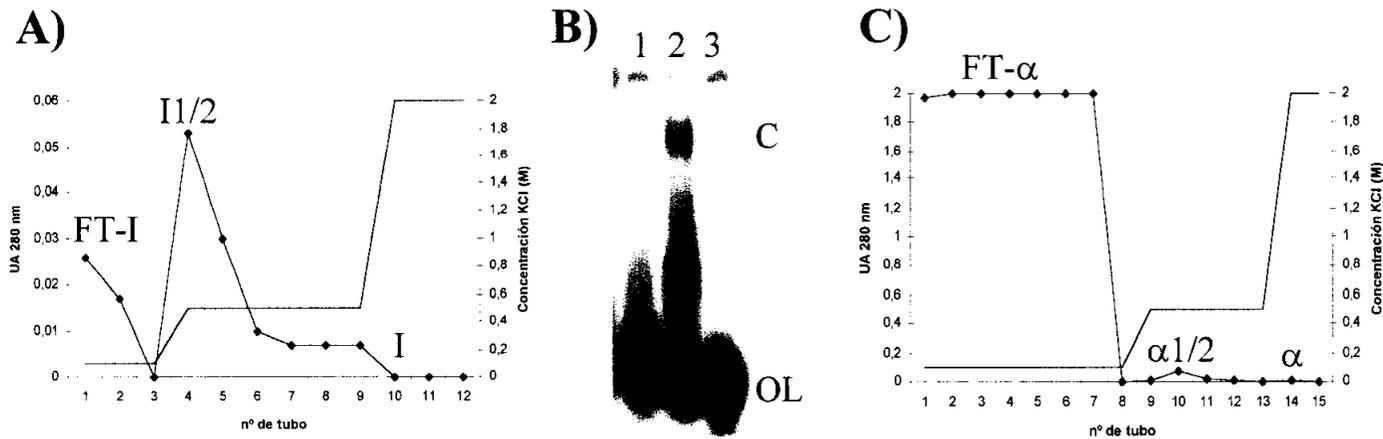
Calle 1: FT-WW; calle 2: WW1/2; calle 3: WW.

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.

C) Gel de SDS/PA al 15% teñido con plata.

Calle 1: 8XX1/2; calle 2: FT-WW; calle 3: WW1/2; calle 4: WW.

PM: patrón de pesos moleculares en kDa.



**Fig. 36.**

**A)** Perfil de elución de la columna de afinidad en presencia de poli(dIdC).

La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

**B)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad incubadas con el oligo JA/NJA-2.

Calle 1: FT-I; calle 2: I1/2; calle 3: I.

**C)** Perfil de elución de la columna en presencia de NP-40.

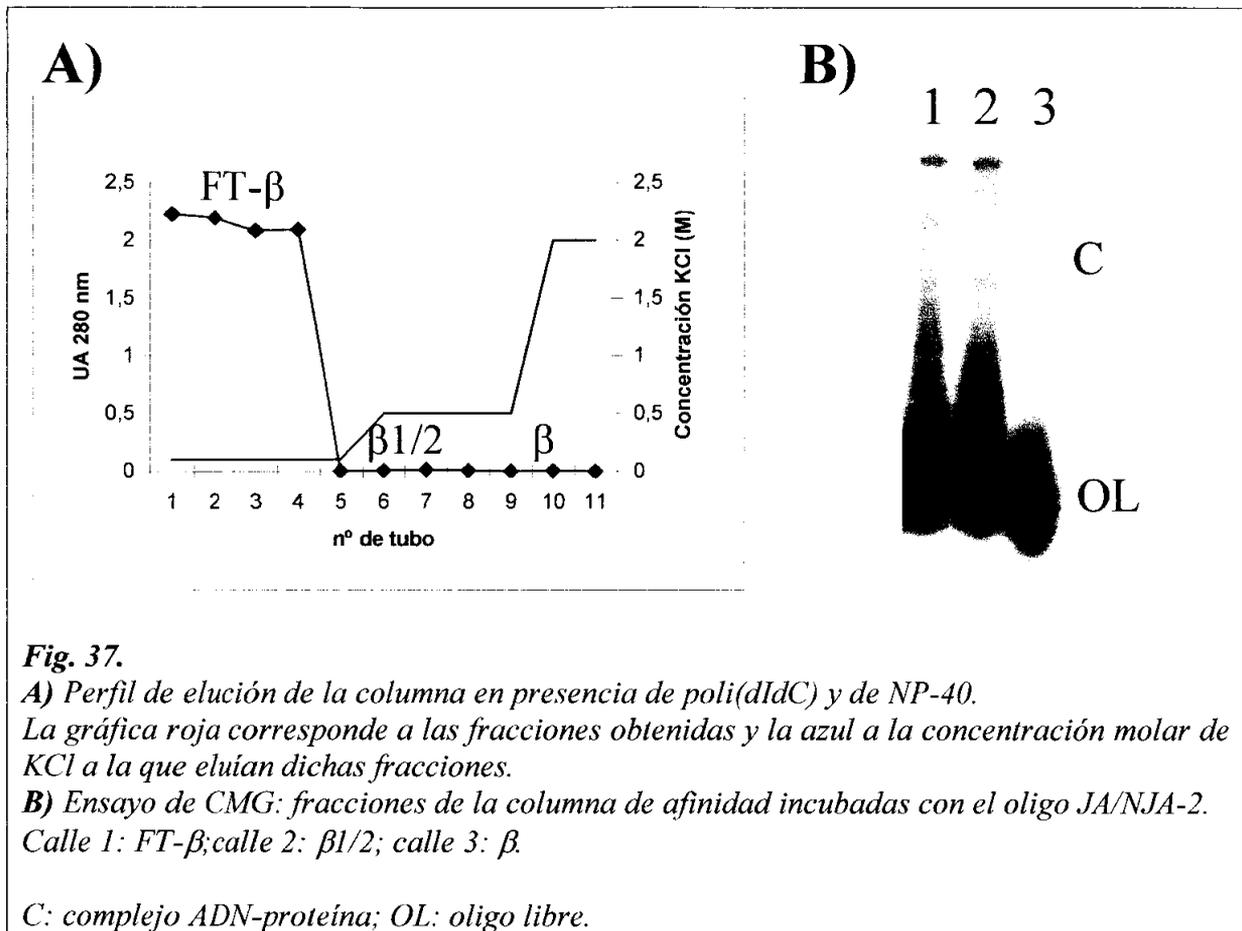
La gráfica roja corresponde a las fracciones obtenidas y la azul a la concentración molar de KCl a la que eluían dichas fracciones.

**D)** Ensayo de CMG: fracciones de la columna de afinidad incubadas con el oligo JA/NJA-2. El número de tubo que se cita, se corresponde con el del perfil de elución de la figura 12E:

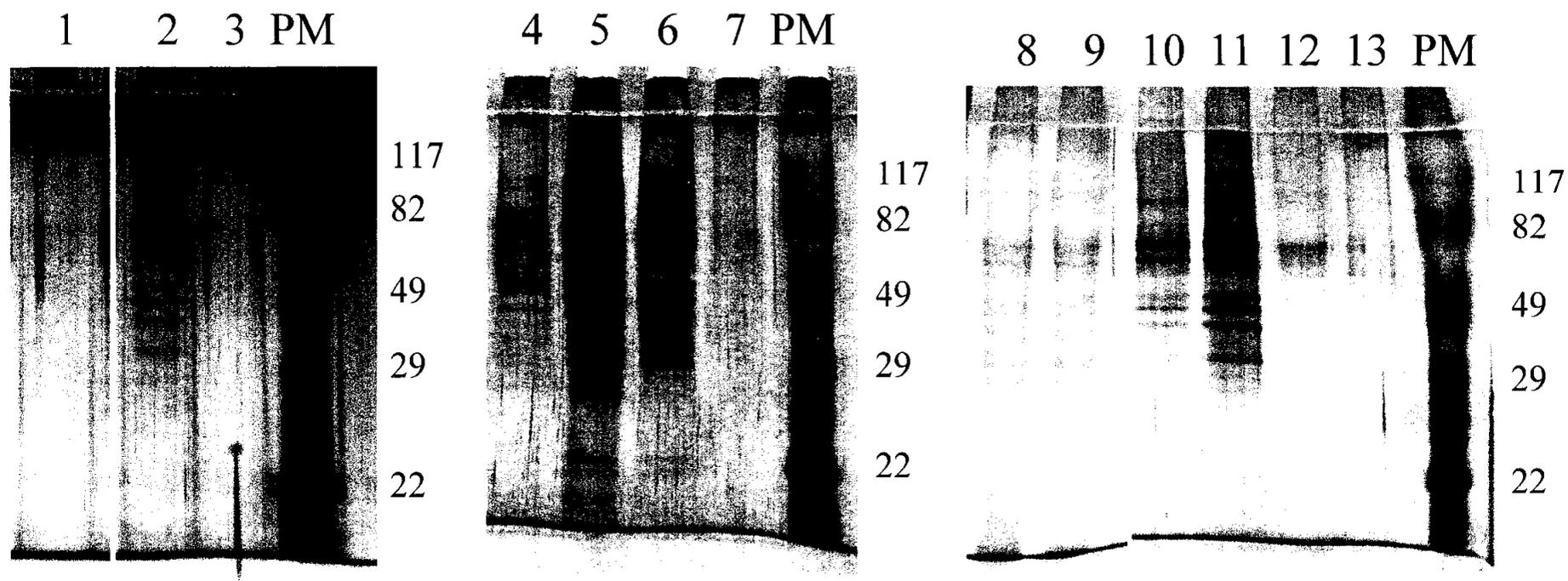
Calle 1: oligo libre; calle 2: tubo nº 1 FT-α; calle 3: tubo nº 2 FT-α; calle 4: tubo nº 3 FT-α; calle 5: α1/2; calle 6: α.

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.

La fracción  $\alpha 1/2$  se volvió a pasar una vez más por la columna de afinidad en presencia de NP-40 0,1% y de poli(dIdC), originando la serie  $\beta$  (fig. 37A). La obtención de complejos ADN-proteína no fue muy clara por pérdida de la actividad, como se muestra en la figura 37B.



El análisis de las diferentes fracciones mediante geles de SDS/PA teñidos con plata mostró la presencia de bandas mayoritarias de proteínas con pesos moleculares de 73, 64, 51, 46, 41 y 32 kDa para la fracción  $\beta 1/2$  (calle 11, fig. 38) y de 74 kDa para la fracción I1/2 (calle 2, fig. 38).



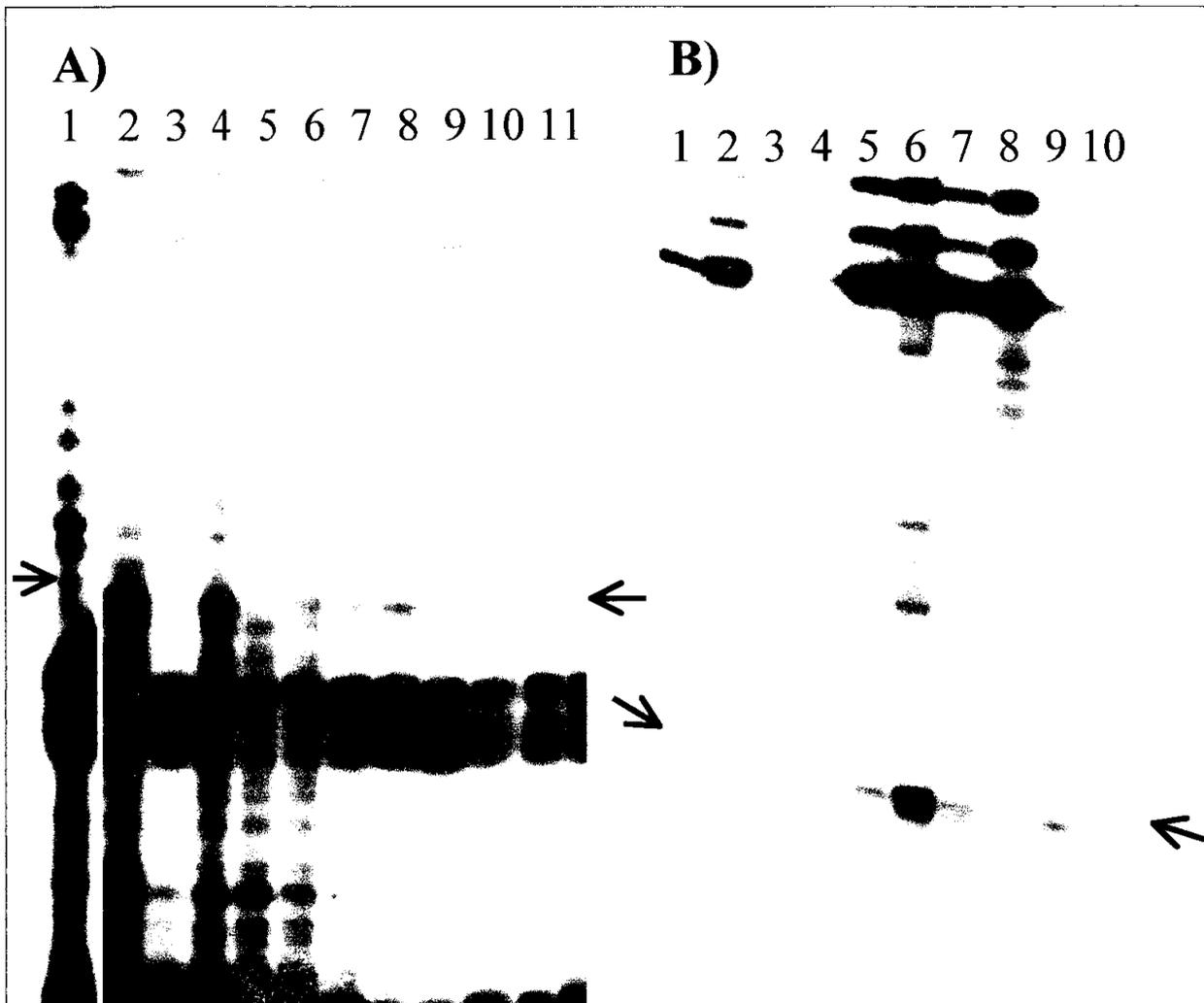
**Fig. 38.**

Geles de SDS/PA al 15% teñidos con plata. El número de tubo que se cita, se corresponde con el del perfil de elución de la figura 13C (para las muestras de la serie  $\alpha$ ) y 14A (para las muestras de la serie  $\beta$ ):

Calle 1: FT-1; calle 2: 11/2; calle 3: 1; calle 4: FT- $\alpha$ ; calle 5: tubo n° 9  $\alpha$ 1/2; calle 6: tubo n° 10  $\alpha$ 1/2; calle 7:  $\alpha$ ; calle 8: tubo n° 1 FT- $\beta$ ; calle 9: tubo n° 2 FT- $\beta$ ; calle 10: tubo n° 6  $\beta$ 1/2; calle 11: tubo n° 7  $\beta$ 1/2; calle 12: tubo n° 8  $\beta$ 1/2; calle 13:  $\beta$ .

PM: patrón de pesos moleculares en kDa.

En cuanto a los ensayos de protección a la digestión por Exo III, se observó la presencia de barrera en las fracciones FT-XX, XX1/2 y XX (compárense las calles 6, 7 y 8 con la calle 4 en la figura 39A), pero no se observó en ninguna de las fracciones de la serie WW: FT-WW, WW1/2 y WW (compárense las calles 9, 10 y 11 con la calle 4 en la figura 39A). En el ensayo de protección a la acción de la DNasa I se detectó la presencia del sitio hipersensible a la DNasa I en las fracciones FT-XX, XX1/2, XX y WW1/2 (compárense las calles 5, 6, 7 y 9 con la calle 4 en la figura 39B). No se observó ni barrera a la Exo III ni huella y/o sitio hipersensible a la DNasa I para las fracciones de las series I,  $\alpha$  y  $\beta$ .



**Fig. 39.**

**A)** Ensayo de protección a la Exo III con la hebra codificadora (sonda 225-1-T):

Calle 1: reacción en ausencia de muestra; calle 2: FT-H; calle 3: H1; calle 4: H2; calle 5: H3; calle 6: FT-XX; calle 7: XX1/2; calle 8: XX; calle 9: FT-WW; calle 10: WW1/2; calle 11: WW.

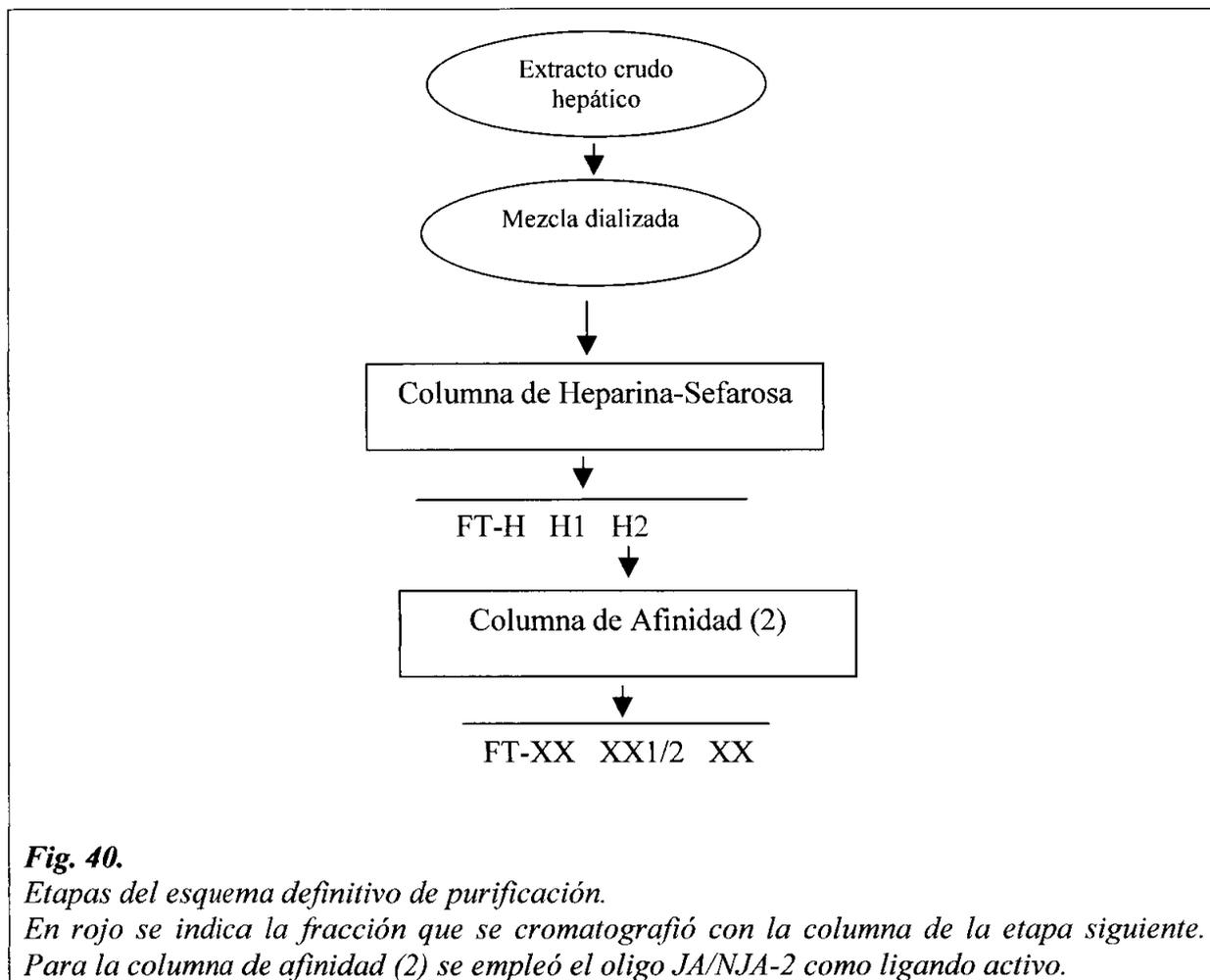
La flecha indica la posición de la barrera.

**B)** Ensayo de protección a la DNasa I con la hebra codificadora (sonda 225-1-T):

Calle 1: reacción en ausencia de muestra; calle 2: FT-H; calle 3: H1; calle 4: H2; calle 5: FT-XX; calle 6: XX1/2; calle 7: XX; calle 8: FT-WW; calle 9: WW1/2; calle 10: WW.

La flecha indica la posición del sitio hipersensible.

Estos resultados nos decidieron a considerar como esquema definitivo de purificación, el indicado en la figura 40 y como fracción activa más pura a la XX:



**Fig. 40.**

*Etapas del esquema definitivo de purificación.*

*En rojo se indica la fracción que se cromatografió con la columna de la etapa siguiente.*

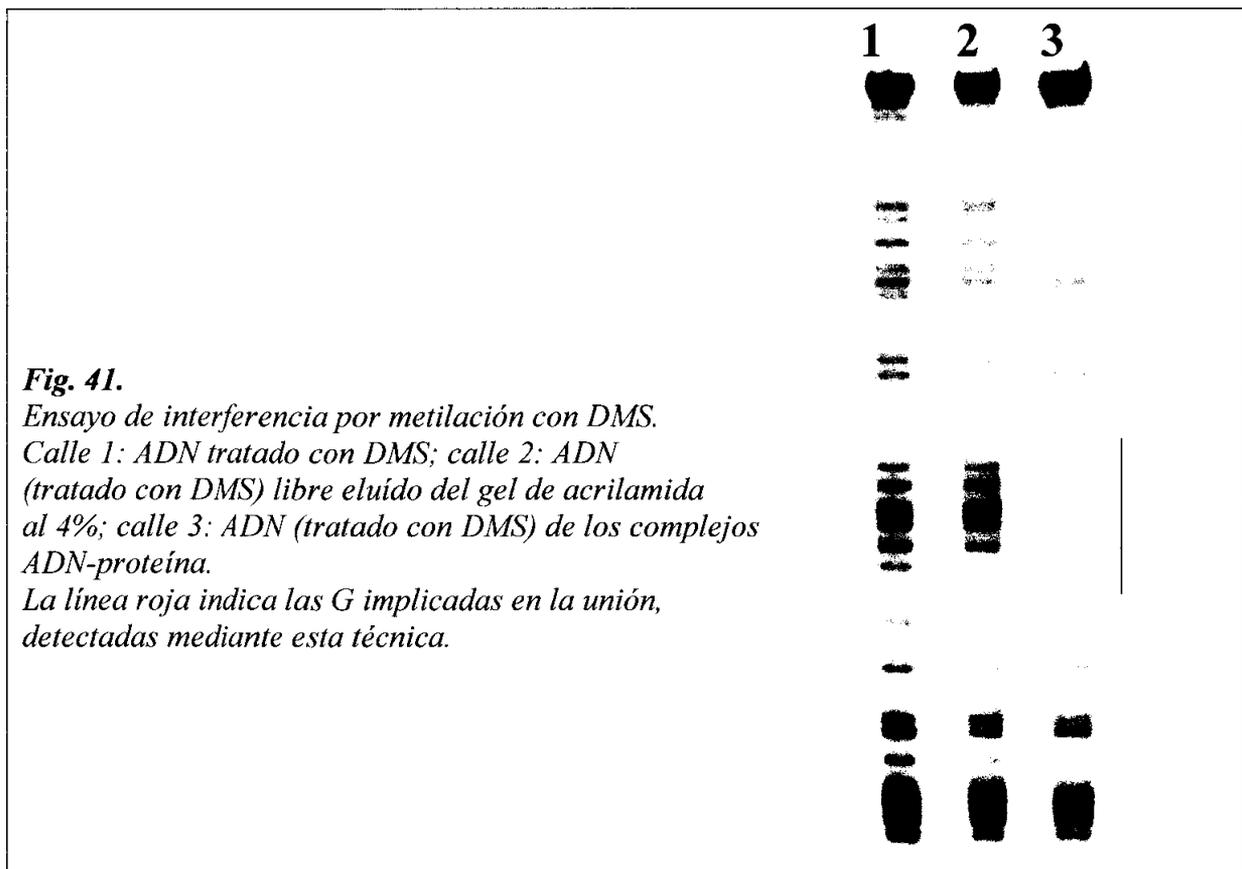
*Para la columna de afinidad (2) se empleó el oligo JA/NJA-2 como ligando activo.*

## 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES NUCLEARES PURIFICADOS.

### 2.1 ELEMENTOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD DE UNIÓN

#### 2.1.1 Interferencia por metilación con dimetilsulfato

El ensayo de interferencia por metilación con DMS permite conocer las guanosinas implicadas en la unión de una proteína a una secuencia de ADN. Como ya se describió en el apartado 10.4 de *Material y Métodos*, se realizó una reacción de unión entre las proteínas presentes en una fracción cromatográfica activa (la fracción H2) y el fragmento 225-1 marcado en la hebra codificadora (denominado como sonda 225-1-T) y tratado con DMS. Tras realizar una electroforesis de estas muestras en un gel de acrilamida al 4%, se purificaba el ADN de los complejos ADN-proteína y el ADN libre, no unido a proteínas; el ADN así obtenido se trataba con piperidina, resolviendo los fragmentos en un gel de secuencia. La calle del gel de secuencia correspondiente al ADN libre estaría enriquecida en aquellas moléculas de ADN cuyas guanosinas situadas en la secuencia diana estuvieran modificadas por el DMS, puesto que las moléculas de ADN con guanosinas metiladas en la secuencia de unión son incapaces de formar complejos con las proteínas durante la reacción de unión. Como muestra la figura 41, cuando se comparaba el patrón de bandas obtenido para el ADN de los complejos y el ADN libre se observó la desaparición de siete bandas correspondientes a las guanosinas situadas entre -560 y -580 pb, es decir, en la secuencia de unión detectada en este fragmento del promotor I del gen de la GGT de rata:





### 2.1.2 Efecto de la metilación de la secuencia en la actividad de unión

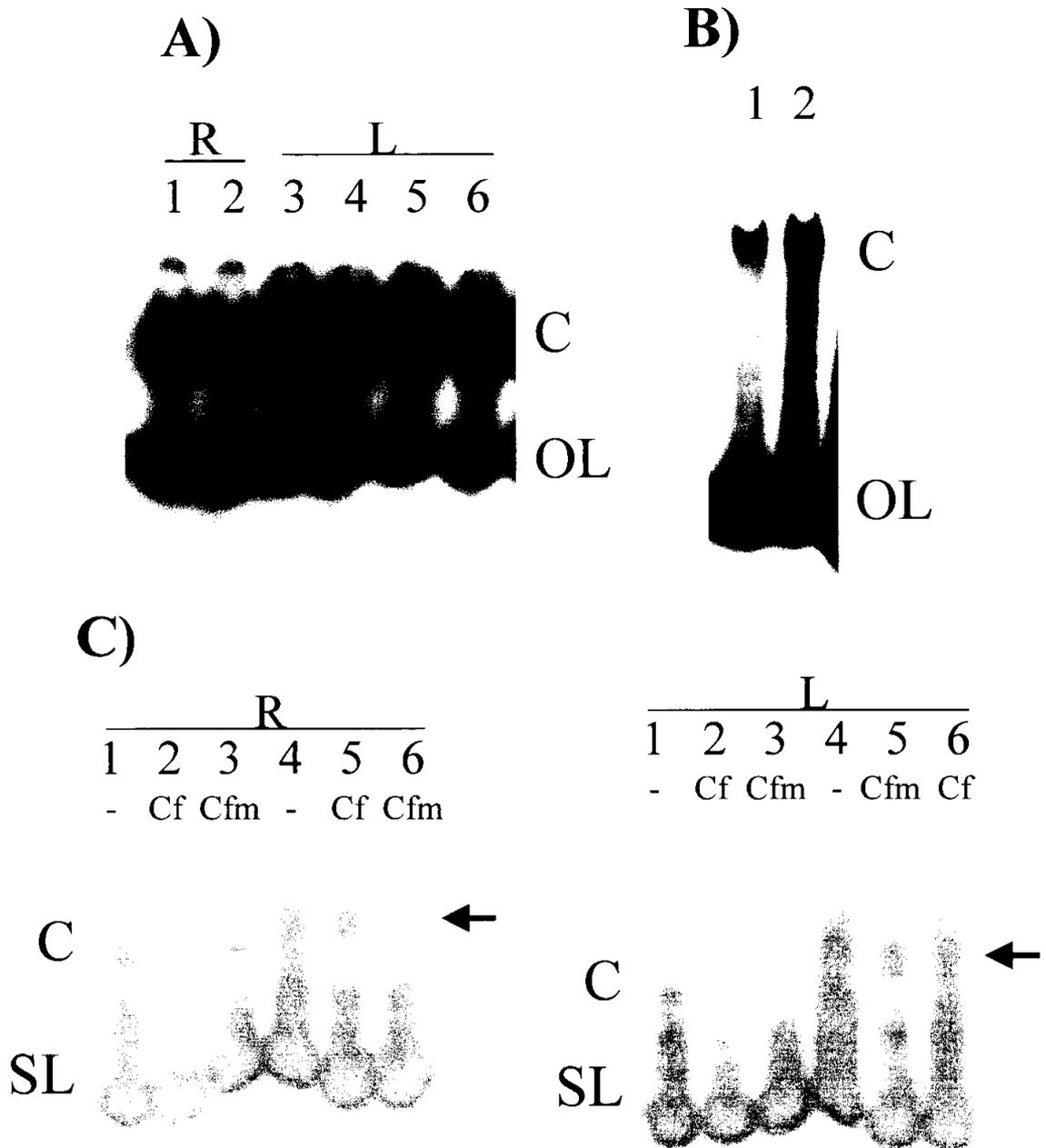
La metilación de las citosinas de dinucleótidos CG en secuencias reguladoras puede provocar la represión de la transcripción del gen que está bajo su control. Por este motivo se estudió el efecto de la metilación del ADN en la actividad de los factores presentes en los extractos crudos nucleares y en las fracciones cromatográficas con actividad de unión (H2).

Cuando se comparó el patrón de bandas obtenido al incubar extractos hepáticos y renales con oligonucleótidos con la secuencia diana metilados y sin metilar, no se observó una clara disminución en la formación de los complejos ADN-proteína obtenidos (fig. 43A). El mismo resultado se obtuvo al emplear la fracción H2 (fig. 43B).

Al incubar extractos renales (R en la figura 43C) con la sonda 225-1 no metilada (calle 1), la competencia de la sonda fría no metilada (calle 2) provocó la disminución en la intensidad de las bandas esperadas, mientras que la competencia de la sonda fría metilada no parecía competir (calle 3). Cuando se incubaron estos extractos renales con la sonda metilada se observó un patrón de bandas diferente al obtenido con la sonda sin metilar, observándose unos complejos ADN-proteína de menor movilidad (flecha en la figura 43C). En esta ocasión fue la competencia fría metilada la que compitió mejor, provocando una clara disminución en la intensidad de las bandas de los complejos obtenidos (comparar calles 5 y 6 en la figura 43C).

Con los extractos hepáticos (L en la figura 43C) se realizaron los mismos ensayos descritos para los extractos renales. Los resultados obtenidos fueron idénticos: el patrón de complejos ADN-proteína obtenido con la sonda no metilada fue diferente del obtenido con la sonda metilada y las competencias de sonda fría no metilada y metilada provocaron la disminución de la intensidad de las bandas obtenidas con las sondas marcadas no metilada y metilada, respectivamente.

En resumen, estos resultados pusieron de manifiesto que la interacción con el ADN de los factores en estudio presentes en los extractos hepáticos y renales, se producía de diferente modo en función del estado de metilación de éste (puesto que se obtenían complejos de distinta movilidad). Las competencias permitieron comprobar que los complejos obtenidos eran específicos, ya que la competencia de la sonda fría metilada competía con la sonda marcada metilada y la sonda fría no metilada competía con la sonda marcada no metilada.



**Fig. 43.**

**A)** Ensayo de CMG: extractos renales (R) y hepáticos (L) se incubaron con oligo JA/NJA sin metilar (1, 3 y 5) y metilado (calles: 2, 4 y 6).

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.

**B)** Ensayo de CMG: la fracción H2 se incubó con oligo JA/NJA-2 sin metilar (calle: 1) y metilado (calle: 2).

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.

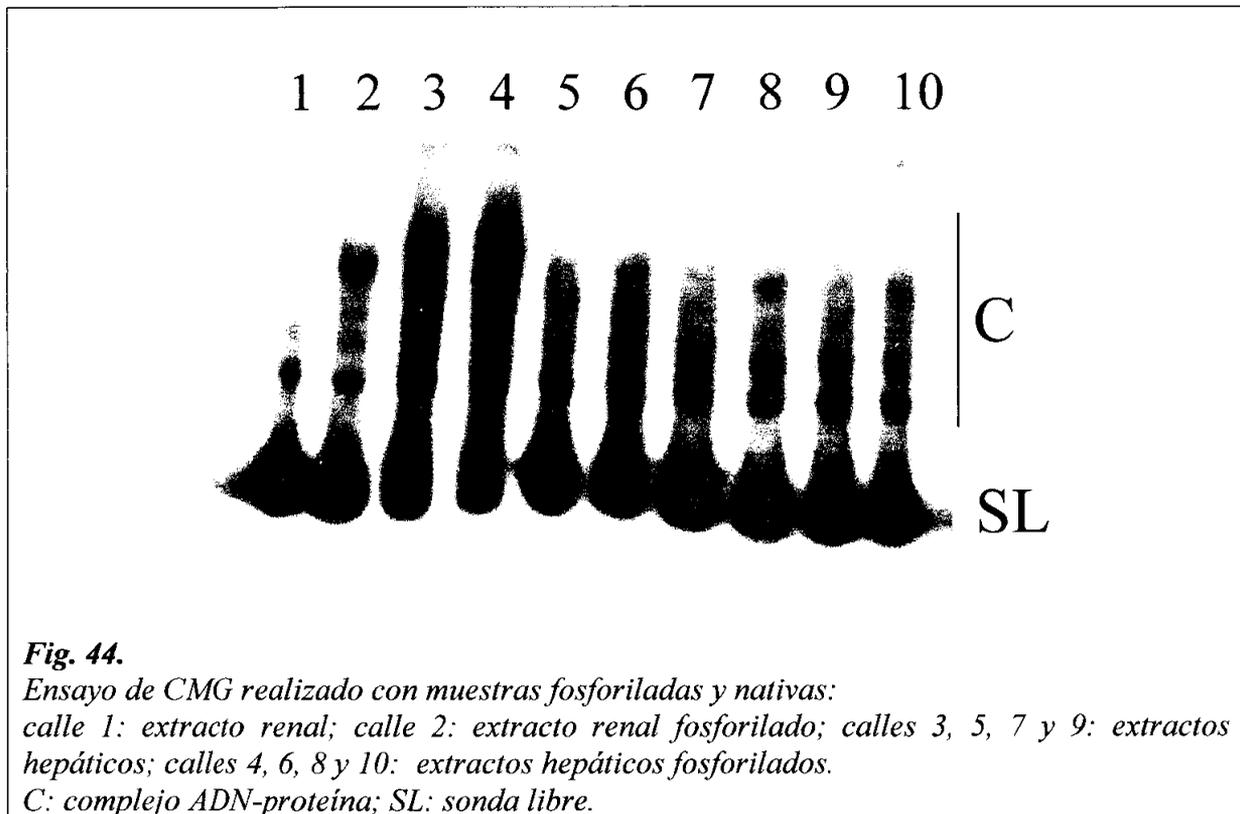
**C)** Ensayo de CMG: extractos renales (R) y hepáticos (L) se incubaron con sonda 225-1-T no metilada (1, 2 y 3) y metilada (calles: 4, 5 y 6), en presencia de competencia fría metilada (Cfm) o sin metilar (Cf).

C: complejo ADN-proteína; SL: sonda libre.

La flecha indica la posición de los complejos de menor movilidad de las calles 4, 5 y 6.

### 2.1.3 Efecto de la fosforilación de las proteínas en la actividad de unión

Con el fin de estudiar el efecto que tiene en la actividad de unión la introducción de grupos fosfato en las proteínas en estudio, se llevaron a cabo reacciones de fosforilación, para las cuales se empleó ATP y la proteína-kinasa A (PK-A), una enzima capaz de introducir grupos fosfato en residuos de serina y treonina, y considerada por muchos autores como una kinasa inespecífica. Finalizada la reacción de fosforilación, las muestras se incubaban con el fragmento 225-1-T marcado, en las condiciones de los ensayos de CMG, y los complejos obtenidos eran separados mediante electroforesis. Los resultados mostraron (fig. 44) que la fosforilación de las proteínas no afectaba a la formación de los complejos ADN-proteína.

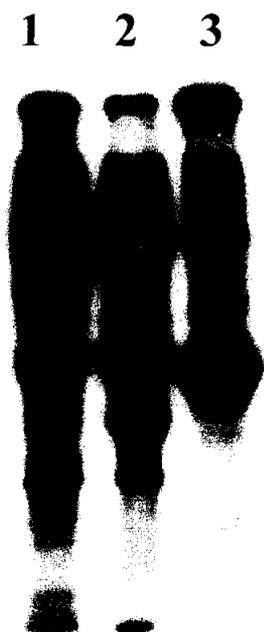
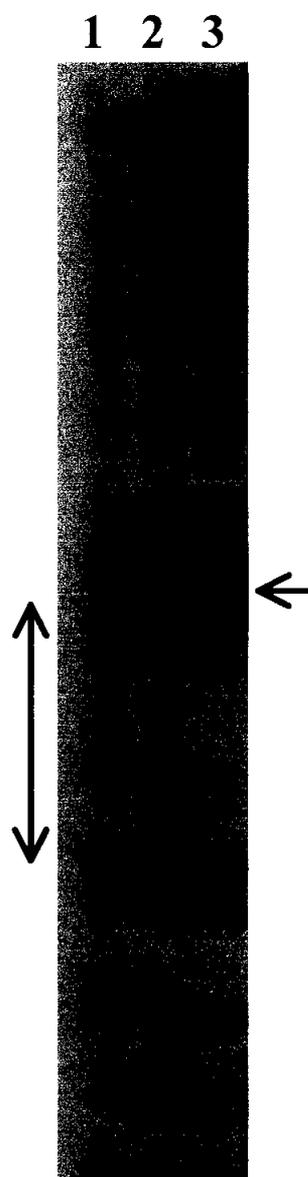


En los ensayos de protección a la digestión por enzimas, no se observaron diferencias significativas en la obtención de la huella y del sitio hipersensible, entre las muestras fosforiladas y las no fosforiladas en el caso de la DNasa I (fig. 45).

Para verificar la efectividad de la reacción se utilizó  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$  en reacciones de fosforilación con la PK-A y se separaron las proteínas marcadas en un gel de SDS/PA. La autorradiografía ponía de manifiesto el complejo patrón de proteínas fosforiladas en las muestras, encontrándose bandas con pesos moleculares de 98, 51 y 27 kDa en la fracción H2 y de 55 y 49 kDa en la fracción XX1/2 (fig. 46). Como control se fosforiló factor Sp1, el cual dio bandas similares a las obtenidas por otros autores (222).

**Fig. 45.**

*Ensayo de protección a la digestión con DNasa I realizado con muestras fosforiladas y nativas:  
calle 1: digestión control en ausencia de muestra;  
calle 2: fracción H2 fosforilada; calle 3: fracción H2 sin fosforilar.  
La flecha vertical indica la posición de la huella y la flecha horizontal, la del sitio hipersensible.*

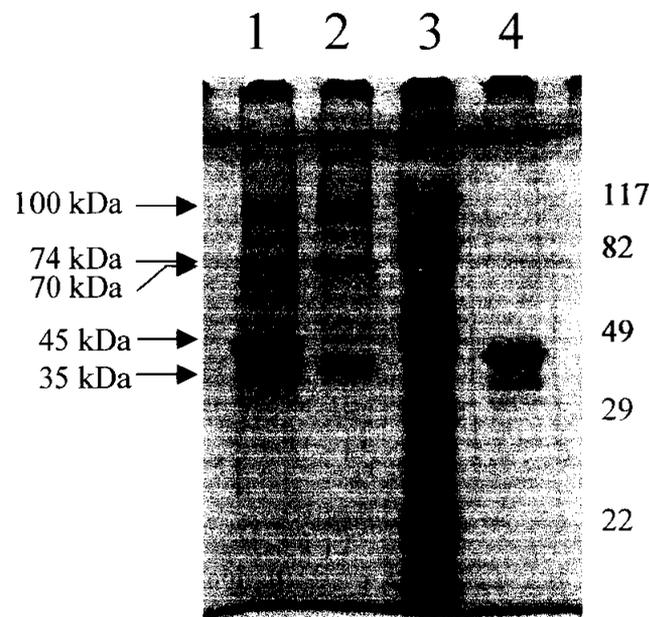


**Fig. 46.**

*Ensayo de fosforilación de proteínas con  $\gamma$ - $P^{32}$ -ATP y PK-A: autorradiografía del gel de SDS/PA correspondiente.  
calle 1: fracción H2; calle 2: fracción XX1/2;  
calle 3: Sp1.*

La fracción cromatográfica XX permitió analizar mejor qué bandas de la tinción con plata se correspondían con bandas marcadas de la autorradiografía, debido a que, al ser más pura, el patrón de bandas era menos complejo. Como se puede observar en la figura 47, el patrón de la proteína fosforilada era igual al de la proteína nativa, apreciándose solamente un cambio en la movilidad de las bandas originadas por la PK-A, la cual se autofosforilaba originando unas bandas de 35 y 45 kDa (calle 1).

Para esta fracción XX sólo parecía coincidir una banda minoritaria de 74 kDa, situada sobre la banda de 70 kDa, de la tinción de plata con otra de 73 kDa de proteína fosforilada cuando se superponían el gel y su autorradiografía (no se muestra en la figura). Este resultado implica que las proteínas correspondientes a las cuatro bandas presentes en la tinción de plata del gel de SDS/PA para la fracción XX no se fosforilaban, a excepción de una banda muy minoritaria de 73-74 kDa.



**Fig. 47.**

*Fosforilación, con  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$  y PK-A, de proteínas presentes en la fracción XX y posterior electroforesis en gel de SDS/PA. Tinción con plata:*

*Calle 1: XX fosforilada; calle 2: XX sin fosforilar (nativa); calle 3: patrón de pesos moleculares (a la derecha se indican sus masas en kDa); calle 4: PK-A.*

*A la derecha se indica las masas en kDa de los patrones de pesos moleculares (PM).*

## 2.2 DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES APARENTES (ELUV)

Mediante el ensayo de entrecruzamiento con luz ultra-violeta (ELUV) se pudieron determinar los pesos moleculares aproximados de los factores proteicos presentes en las fracciones cromatográficas activas que se unieron al oligo JA/NJA-2 (fig. 48). Teniendo en cuenta que el peso molecular del oligo empleado es de 12,2 kDa, se detectaron proteínas con pesos aparentes de:

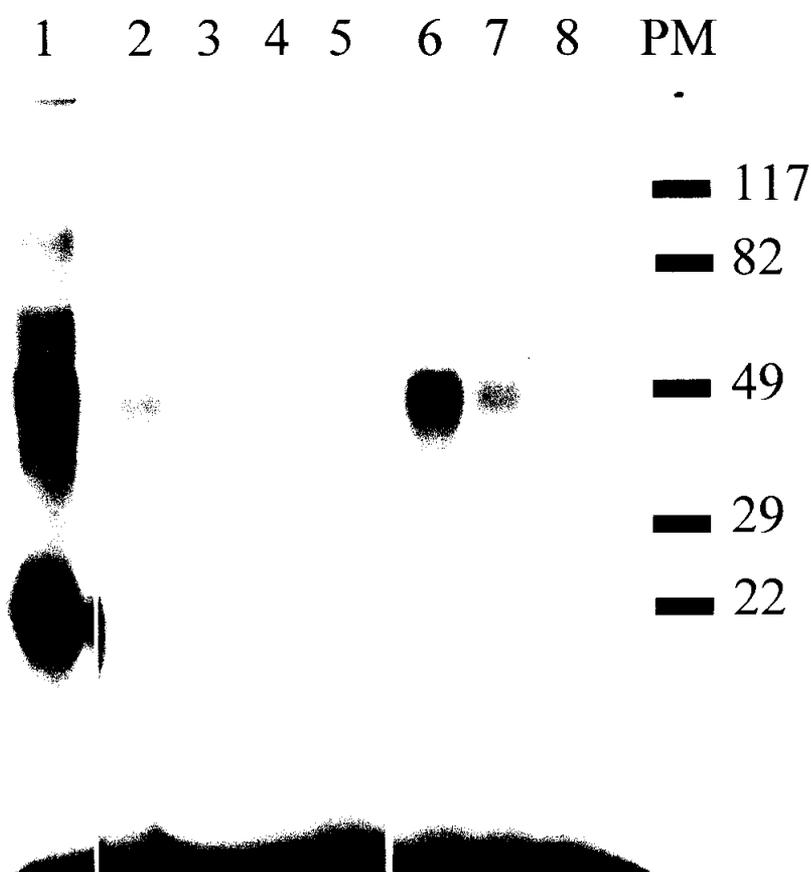
\* 80-90 kDa, 65-70 kDa, 40-45 kDa, 30-35 kDa y 8-10 kDa en el extracto crudo (calle 1);

\* 80-90 kDa, 40-45 kDa y 30-35 kDa en las fracciones H2 y XX1/2 (calles 2 y 6, respectivamente).

En la figura 48 se puede apreciar como las competencias frías del oligonucleótido JA/NJA-2 (calle 3) y sus hebras por separado (calles 4 y 5) provocaban una disminución de la intensidad de la señal de los complejos ADN-proteína, especialmente del de proteínas de 80-90 kDa. Esta atenuación de la señal fue más marcada cuando se empleó la hebra no codificadora (calle 5), con la que desaparecían tanto los complejos con proteínas de 80-90 kDa como aquellos con proteínas de 40 y 30 kDa.

Para la muestra XX1/2 se observó el mismo efecto con la competencia del oligo frío (cfr. calles 6 y 7), aunque menos marcado debido, probablemente, al mayor enriquecimiento de la muestra.

En la fracción XX no se veían complejos en torno a 70-80 kDa, 40-45 kDa y/o 30-35 kDa, a pesar de que en los ensayos de CMG se observaban complejos ADN-proteína (cfr. fig. 48, calle 8 vs. fig. 34B, calle 4) y en los ensayos de protección a la digestión por Exo III y DNasa I se observaban la barrera y el sitio hipersensible, respectivamente (ver figs. 39A, calle 8, y 39B, calle 7).



**Fig. 48.**

*Ensayo de ELUV: gel de SDS/PA al 15%. Como competencia fría se emplearon 250 ng de oligonucleótido JA/NJA-2 o de cada una de sus hebras.*

*Calle 1: extracto hepático; calle 2: H2; calle 3: H2 con competencia fría del oligo JA/NJA-2; calle 4: H2 con competencia fría de la hebra codificadora; calle 5: H2 con competencia fría de la hebra no codificadora; calle 6: XXI/2; calle 7: XXI/2 con competencia fría del oligo JA/NJA-2; calle 8: XX.*

*A la derecha se indica la posición de los patrones de pesos moleculares (PM) y sus masas en kDa. Los pesos moleculares aparentes indicados en el texto para las proteínas implicadas en los complejos ADN-proteína se han obtenido por diferencia entre el peso molecular del complejo (obtenido a partir de la autorradiografía y con los patrones PM) y el peso molecular del oligonucleótido empleado (12,2 kDa).*

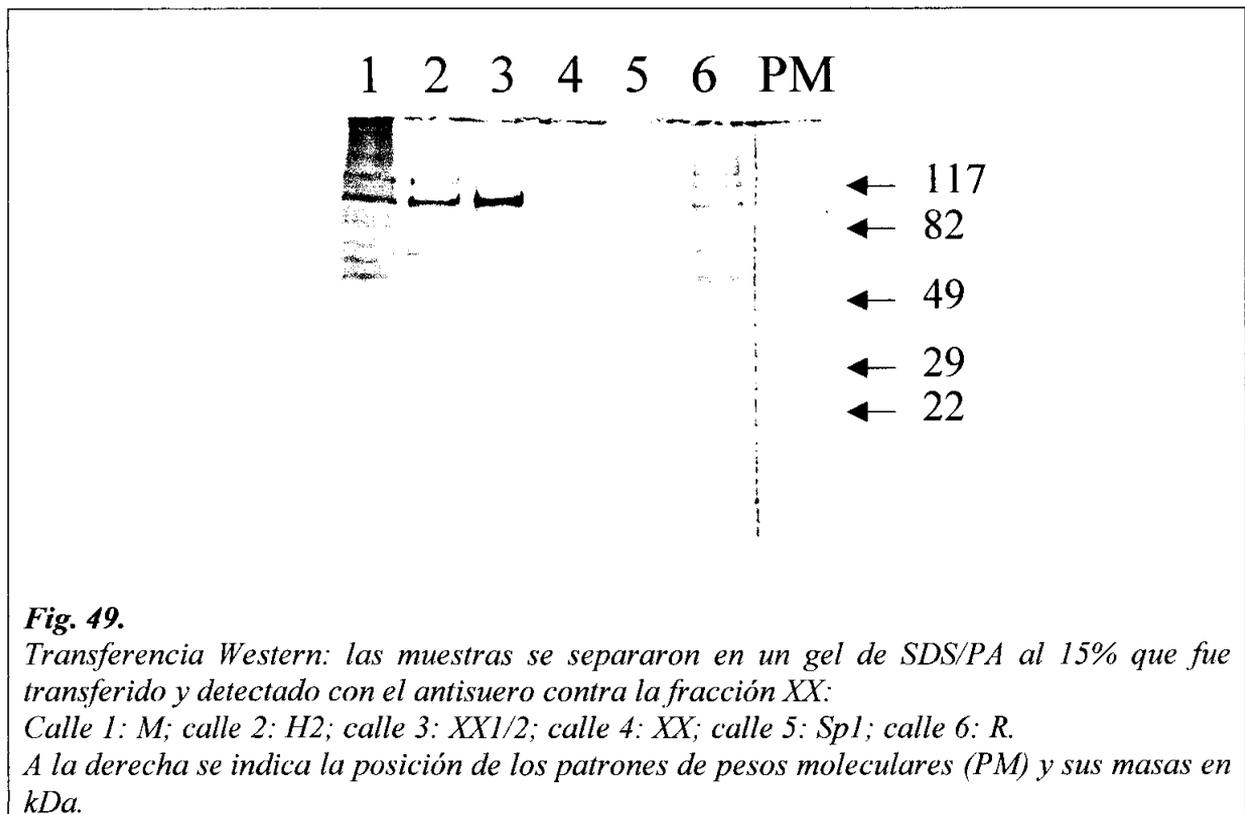
## 2.3 INMUNOENSAYOS

Las proteínas presentes en las muestras se separaron en geles de SDS/PA, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un antisuero. Los anticuerpos empleados en estos ensayos se obtuvieron utilizando como antígeno la fracción XX, procedente de la columna de afinidad con el oligo JA/NJA-2 como ligando activo (ver figura 40).

### 2.3.1 Transferencias Western

Las proteínas presentes en los extractos nucleares hepáticos (M), en extracto renal (R) y en las sucesivas fracciones cromatográficas con actividad de unión a la secuencia diana, mostraron bandas de 100 y 67 kDa, reconocidas específicamente por el antisuero obtenido contra la fracción XX (fig. 49). La banda de 38 kDa apareció un poco más tarde y el resto de bandas que se pueden apreciar en algunas muestras aparecieron a tiempos largos de revelado (30 minutos a temperatura ambiente). Estas bandas de fondo se debieron a la elevada concentración proteica de las muestras menos puras y a la gran reactividad cruzada que suelen mostrar los anticuerpos policlonales contra factores de transcripción.

En las muestras H2 y XX1/2 se detectó la banda de 100 kDa y también se pudieron apreciar bandas en torno a 70 kDa (calles 2 y 3, fig. 49); estas bandas también se observan en los extractos hepáticos (calle 1, fig. 49). En la fracción XX se detectó la de 70 kDa y apenas se veía la banda a 100 kDa (calle 4, fig 49).



**Fig. 49.**

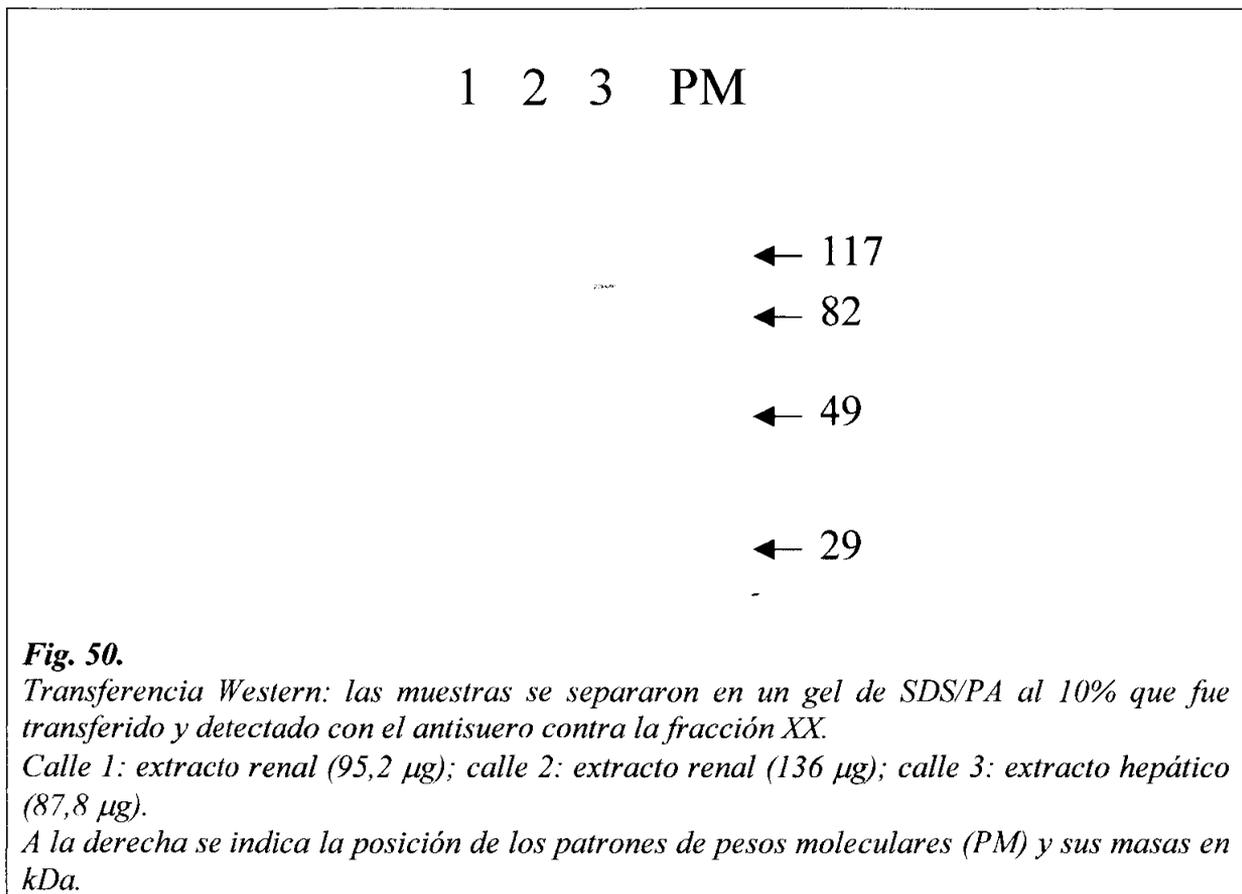
*Transferencia Western: las muestras se separaron en un gel de SDS/PA al 15% que fue transferido y detectado con el antisuero contra la fracción XX:*

*Calle 1: M; calle 2: H2; calle 3: XX1/2; calle 4: XX; calle 5: Sp1; calle 6: R.*

*A la derecha se indica la posición de los patrones de pesos moleculares (PM) y sus masas en kDa.*

En ensayos previos (221) se detectó que el factor Sp1 era capaz de unirse a la secuencia CG degenerada situada en -573. Por este motivo se decidió estudiar si los anticuerpos obtenidos contra la fracción XX (antisuero anti-XX) eran capaces de reaccionar con este factor. Como se puede apreciar en la calle 5 de la figura 49, el factor Sp1 no fue detectado por los anticuerpos obtenidos contra las proteínas de la fracción cromatográfica XX.

Cuando se realizó una transferencia Western de extractos renales y hepáticos, separando la misma cantidad de proteína (fig. 50, calles 1 y 3), se observaba una pequeña diferencia en el patrón de proteínas reconocido: en el extracto hepático se veían las bandas de: 100, 98, 67, 46 y 42 kDa; y en extracto renal sólo se veían las de: 100, 98 y 67 kDa; las de alrededor de 40 kDa no se apreciaban prácticamente. En extracto renal se veía una banda a 79 kDa, que en la mezcla dializada de extractos hepáticos no se veía.



**Fig. 50.**

*Transferencia Western: las muestras se separaron en un gel de SDS/PA al 10% que fue transferido y detectado con el antisuero contra la fracción XX.*

*Calle 1: extracto renal (95,2 µg); calle 2: extracto renal (136 µg); calle 3: extracto hepático (87,8 µg).*

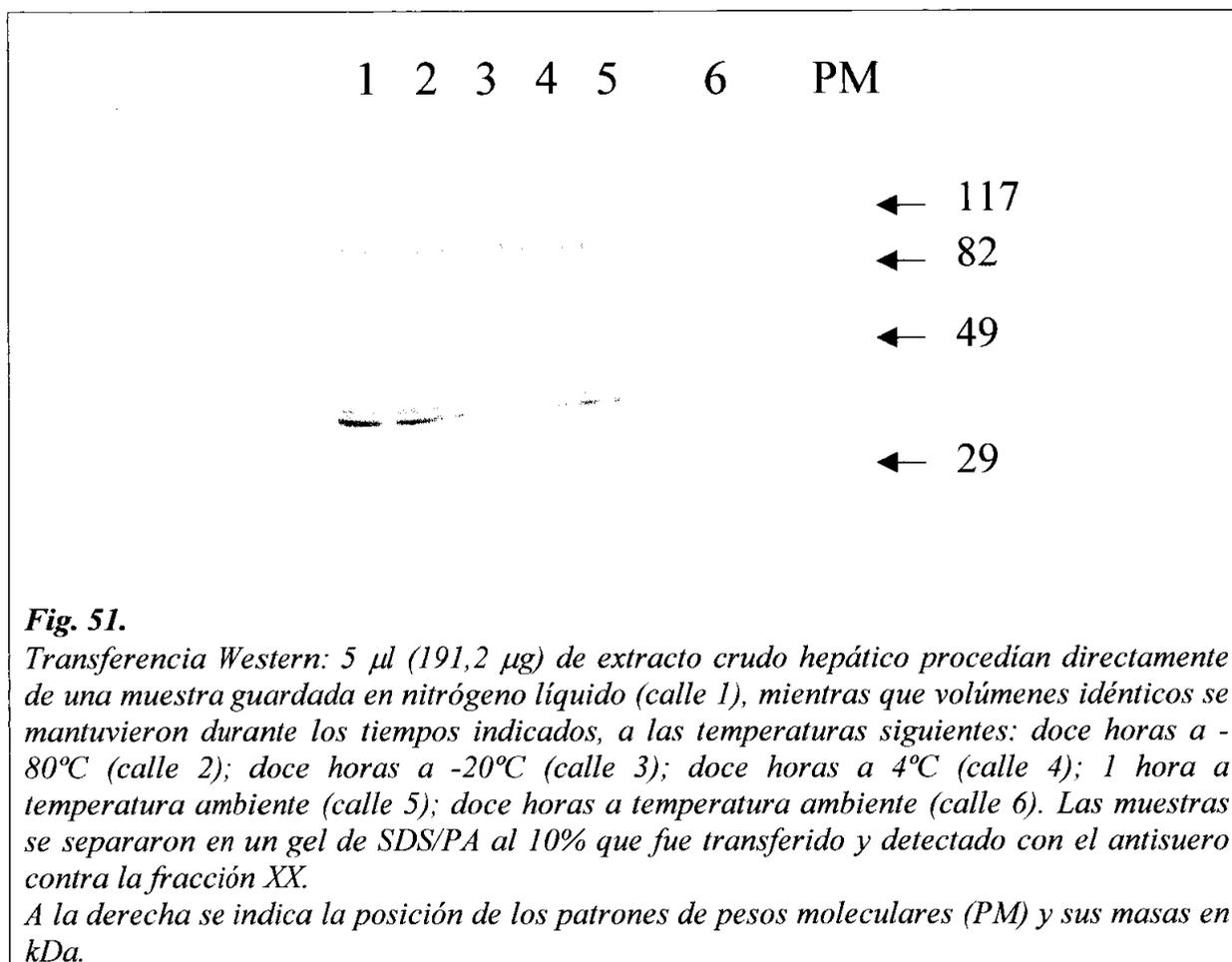
*A la derecha se indica la posición de los patrones de pesos moleculares (PM) y sus masas en kDa.*

### 2.3.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las muestras

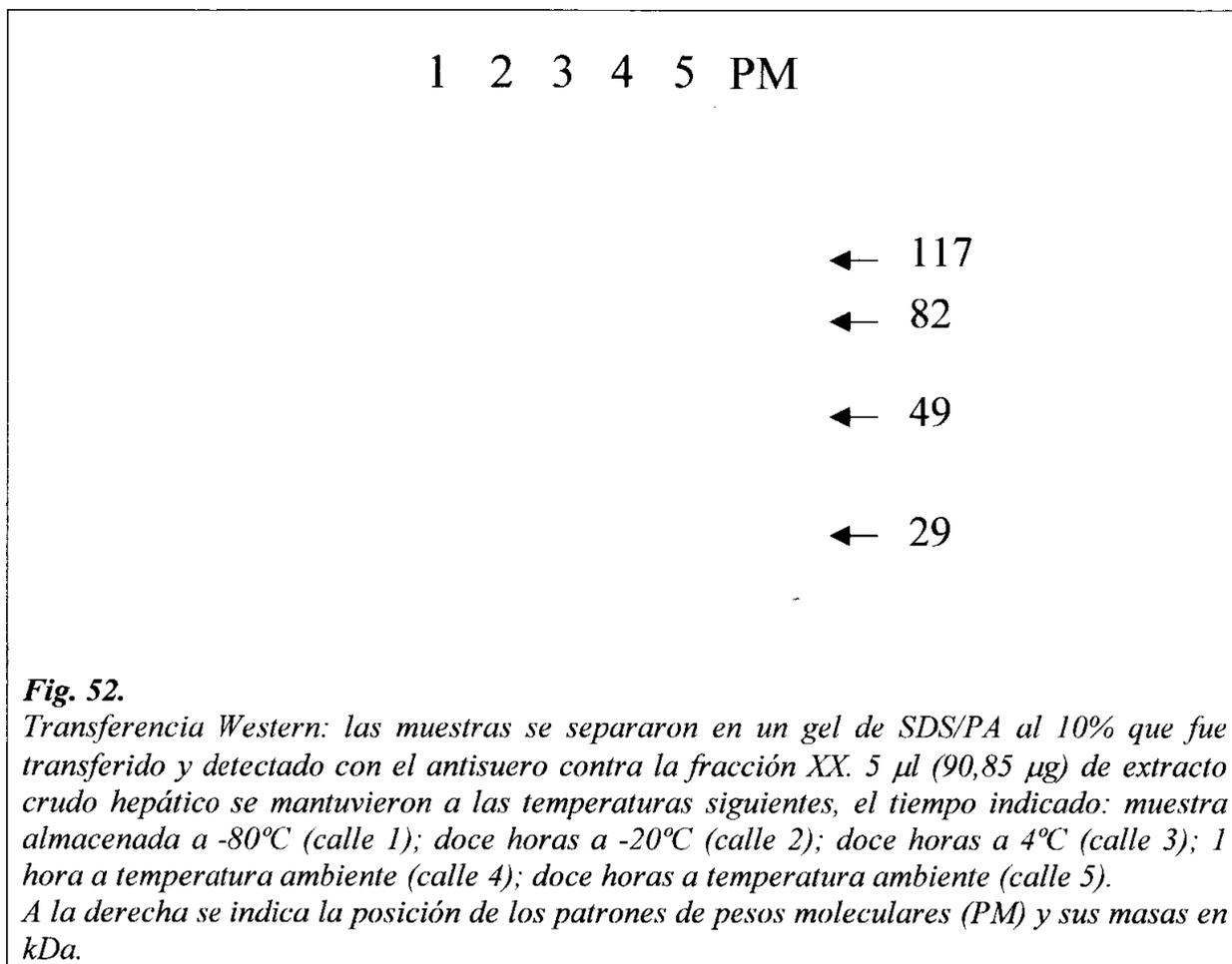
A lo largo de la purificación, las diferentes fracciones cromatográficas con actividad de unión a los oligonucleótidos con la secuencia diana perdían actividad, a la vez que se observaba en algunas muestras un aumento en bandas de bajo peso molecular. Con el objeto de estudiar si esta inactivación era debida a una proteólisis por efecto de la temperatura, se incubaron extractos a diferentes temperaturas; estas muestras eran después resueltas en geles

de SDS/PAGE y transferidas a membranas para ser reconocidas por los anticuerpos obtenidos contra la fracción XX.

Como se aprecia en la figura 51, en todas las calles se observaron bandas de pesos moleculares aparentes de 100, 98, 67, 46 y 42 kDa. Por lo tanto, parecía que la temperatura no producía una hidrólisis. Sin embargo, cuando se incubó esta muestra durante doce horas a temperatura ambiente (calle 6), se observó la desaparición de la banda superior de 100 kDa de peso molecular aparente, mientras que las bandas de 98 y 67 kDa parecían no verse afectadas.



Cuando se realizó el mismo ensayo empleando extractos hepáticos viejos conservados a -80°C durante cuatro años, se observó una mayor sensibilidad a la temperatura (fig. 52): al haber incubado la muestra durante doce horas a temperatura ambiente, desaparecían las bandas superiores en torno a 100 kDa y aumentaba una banda con un peso molecular aparente de 60 kDa (calle 5, fig. 52). Este efecto no se veía en el ensayo anterior, realizado con un extracto más reciente (fig. 51).



### 2.3.3 Supershift

Si a un complejo ADN-proteína se le une un anticuerpo específico de la proteína implicada en la unión, el complejo final ADN-proteína-anticuerpo tendrá una movilidad menor (*supershift*) a la del complejo ADN-proteína cuando ambos se separan mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida.

Como se puede apreciar en las figuras 53A y B, cuando se incubó la fracción H2 con los anticuerpos obtenidos contra las proteínas de la fracción XX no se obtuvo *supershift*, tanto en la incubación efectuada antes de realizar la reacción de unión (fig. 53A) con el oligo JA/NJA-2, como cuando se incubaron las proteínas con los anticuerpos durante (fig. 53B) la reacción de unión.

Los resultados también mostraron que en la reacción en la que se había preincubado la fracción H2 con el antisuero antes de realizar la reacción de unión (fig. 53A, calles 2, 3, 6 y 7), los complejos ADN-proteína daban una señal más intensa en la autorradiografía que aquellos en los que se había incubado con los anticuerpos durante la reacción de unión (fig. 53B, calles 2, 3, 6 y 7). Por otro lado, la reacción control (reacción de unión en ausencia de antisuero: figs. 53A y B, calle 1) presentaba un complejo menor cuando la fracción H2 se había preincubado respecto de aquélla en la que se había añadido la fracción directamente a

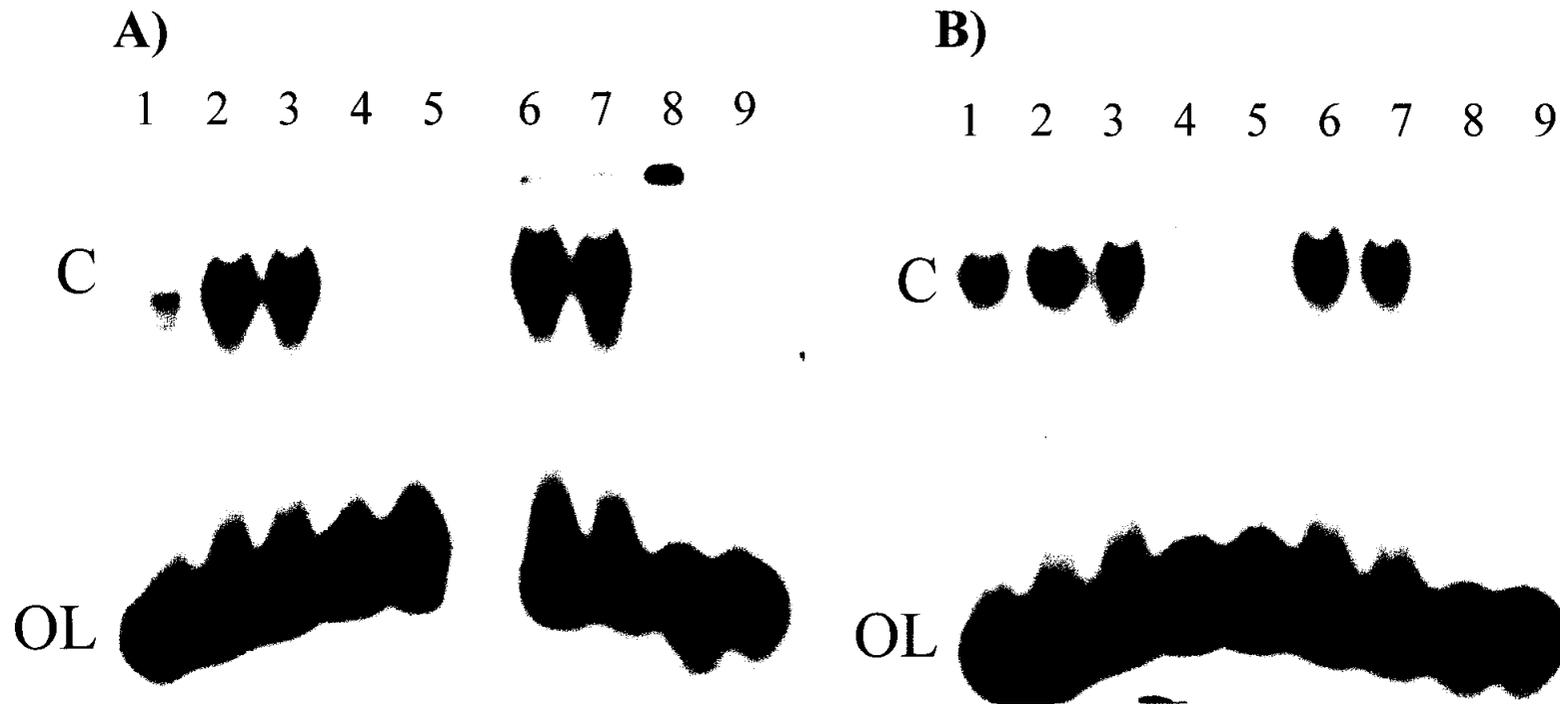
la reacción de unión, lo cual sugería una posible pérdida de actividad debido a que la muestra permanecía más tiempo a 25°C.

No aparecían complejos con el oligonucleótido debidos a componentes del suero (fig. 53A y B, calles 4 y 8).

Con el fin de averiguar si la ausencia de *supershift* se debía a que el anticuerpo se separaba del complejo ADN-proteína debido a la alta fuerza iónica del tampón empleado en la electroforesis, se realizó el mismo ensayo descrito más arriba, pero separando los complejos en geles de baja fuerza iónica (fig. 54). En este caso se empleó extracto nuclear hepático.

Tampoco en este caso se observó *supershift*. Los complejos obtenidos en presencia del suero preinmune y del antisuero eran iguales. La presencia de competencias frías (fig. 54A y B, calles 4 y 8) produjo el mismo efecto que en reacciones de unión en ausencia de antisueros (fig. 54C): la intensidad de la señal del complejo ADN-proteína disminuyó, lo que ponía de manifiesto la especificidad de la unión de las proteínas al complejo. La banda de mayor movilidad que se observaba en este caso (fig. 54, calles 4 y 8) no se debía a la presencia de suero ya que también se veía en ensayos de CMG normales en presencia de competencia fría (fig. 54C, calle 2): esta banda se debe a la unión inespecífica de otras proteínas presentes en el extracto.

La ausencia de *supershift* puede deberse a que las proteínas tienen más afinidad por el ADN que por los anticuerpos y a que el epitopo se encuentra implicado en la unión de las proteínas al ADN o a que queda enmascarado en el complejo ADN-proteína.

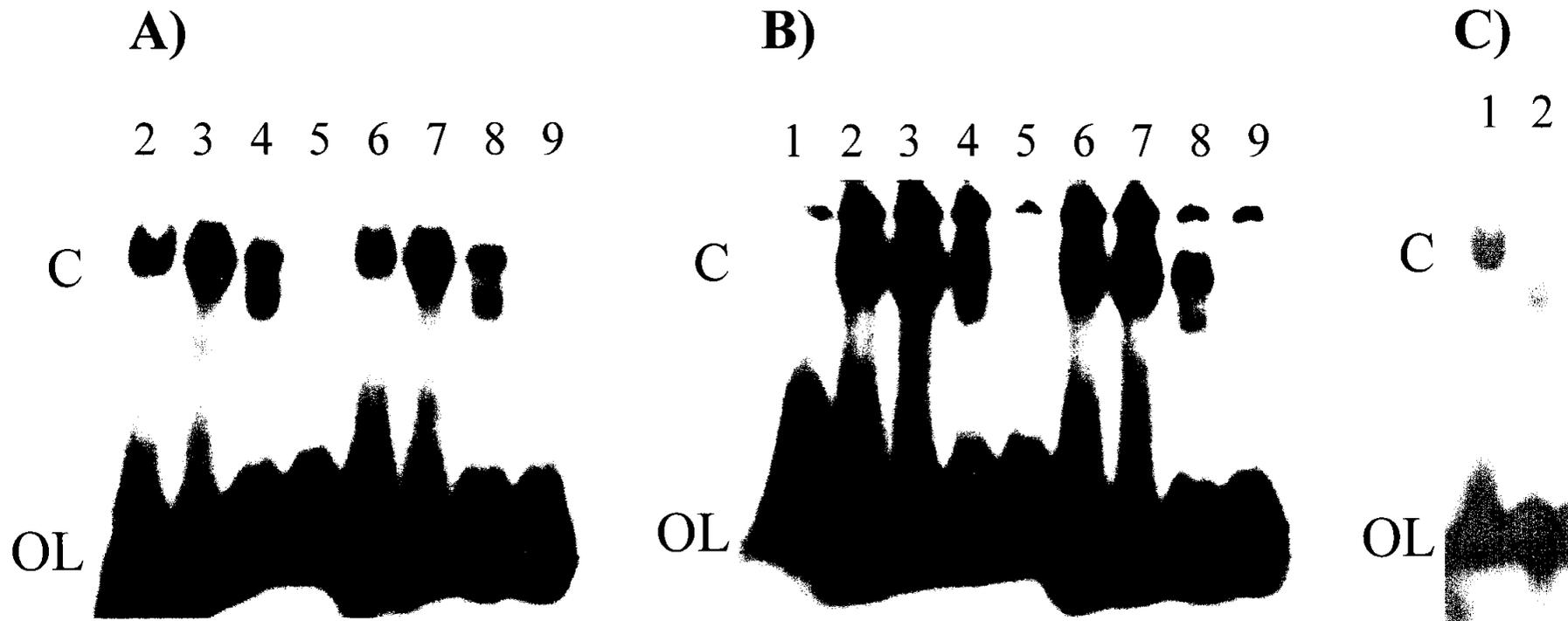


**Fig. 53.**

*Autorradiografía del ensayo de Supershift: 3  $\mu$ l (2,16  $\mu$ g) de fracción H2 se incubó en presencia de antisuero contra la fracción XX antes (A) y durante (B) las reacciones de unión con el oligo JA/NJA-2. Las muestras se separaron en un gel de acrilamida al 4%.*

*Calle 1: reacción control (reacción de unión en ausencia de antisuero); calle 2: reacción de unión en presencia de 1  $\mu$ l de suero preinmune; calle 3: reacción de unión en presencia de 1  $\mu$ l del antisuero; calle 4: blanco de antisuero; calles 5 y 9: blanco de reactivos (oligo libre); calle 6: reacción de unión en presencia de 2  $\mu$ l de antisuero preinmune; calle 7: reacción de unión en presencia de 2  $\mu$ l del antisuero; calle 8: blanco de antisuero.*

*C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.*



**Fig. 54.**

*Autorradiografía del ensayo de Supershift: 1  $\mu$ l (38,24  $\mu$ g) de extracto hepático se incubó en presencia de antisuero contra la fracción XX antes (A) y durante (B) las reacciones de unión con el oligo JA/NJA-2. Las muestras se separaron en un gel de acrilamida al 4% de baja fuerza iónica.*

*Calle 1: oligo libre (sólo en (B)); calles 2 y 6: reacción control (reacción de unión en ausencia de antisuero); calle 3: reacción de unión en presencia de 3  $\mu$ l de suero preinmune; calle 4: reacción de unión con competencia fría (500 ng de oligo JA/NJA-2 frío) y en presencia de 3  $\mu$ l de suero preinmune; calle 5: blanco de suero preinmune; calle 7: reacción de unión en presencia de 3  $\mu$ l de antisuero; calle 8: reacción de unión con competencia fría (500 ng de oligo JA/NJA-2 frío) y en presencia de 3  $\mu$ l de antisuero; calle 9: blanco de antisuero.*

*C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.*

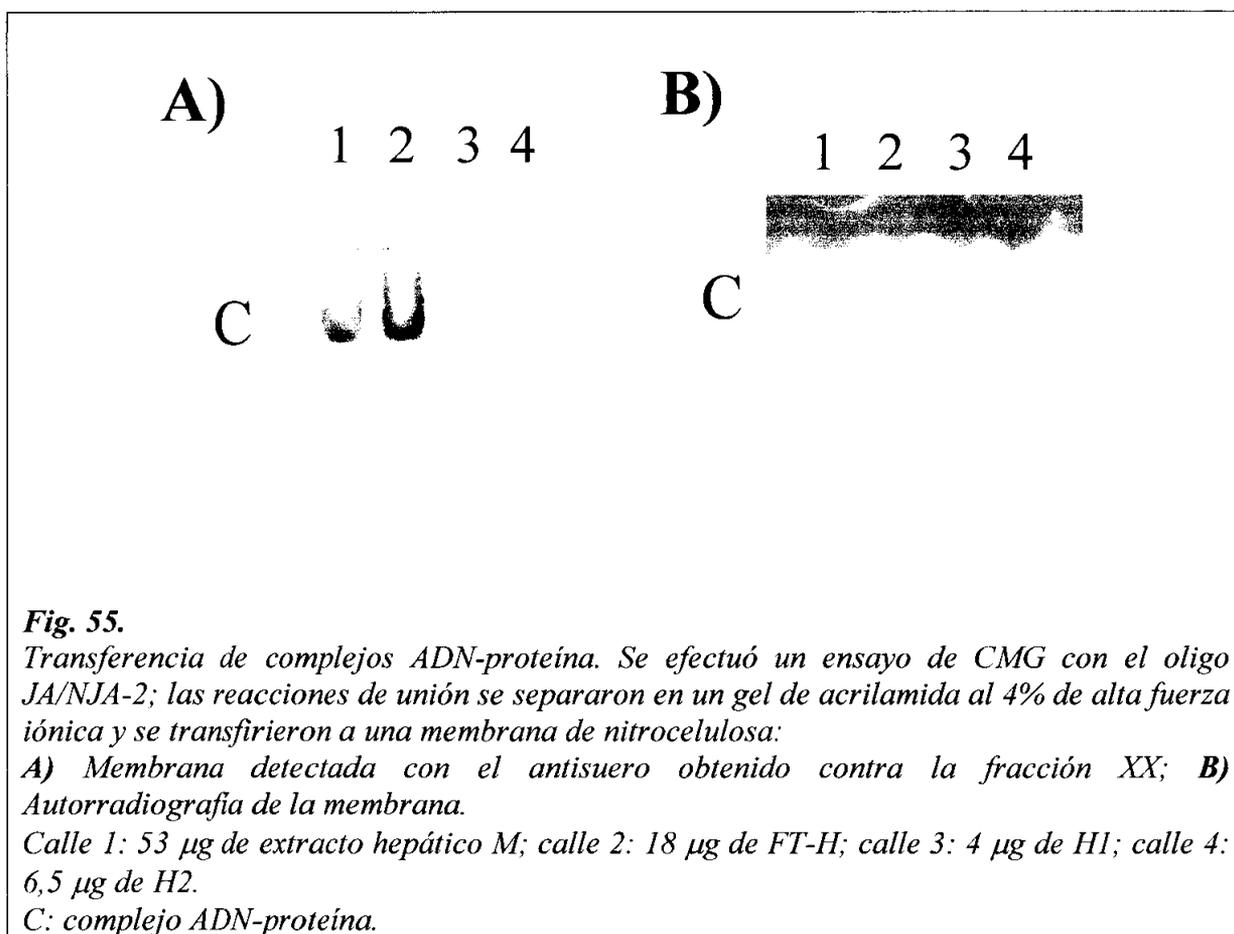
*C) Autorradiografía de CMG: se efectuó una reacción de unión con 1  $\mu$ l (38,24  $\mu$ g) de extracto hepático que se incubó con el oligo JA/NJA-2 marcado en ausencia (calle 1) o presencia (calle 2) de 500 ng de oligo JA/NJA-2 frío, según el protocolo descrito en Material y Métodos; las reacciones de unión se separaron en un gel de acrilamida al 4% de alta fuerza iónica.*

*C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.*

### 2.3.4 Transferencias de complejos ADN-proteína

Para determinar si los anticuerpos reconocían a las proteínas implicadas en los complejos ADN-proteína, se realizaron ensayos de CMG en las condiciones descritas en *Material y Métodos*, empleando el oligo JA/NJA-2 marcado, separando los complejos en geles de acrilamida al 4%, transfiriéndolos a membranas de nitrocelulosa y detectándolos con los antisueros anti-XX.

Como se puede observar en la figura 55A los anticuerpos reaccionaron con proteínas presentes en el extracto hepático M y en la fracción FT-H (calles 1 y 2, respectivamente), pero no se obtuvo señal con las proteínas presentes en las fracciones H1 y H2 (calles 3 y 4, respectivamente).



Por el contrario, en la autorradiografía de la membrana (fig. 55B) se observaba una señal, en la misma posición, para las muestras M y H2. Para FTH sólo se veía una pequeña señal, mientras que para H1 no se observaba nada. Al superponer la autorradiografía a su membrana se correspondían las señales. Parece que, cuando el ADN está presente, hay alguna interferencia en el reconocimiento de la proteína de la fracción H2 por los anticuerpos: como ya se ha apuntado al exponer los resultados de los ensayos de *supershift*, la proteína parece tener más afinidad por el ADN que por los anticuerpos. La detección, con anticuerpos, de proteínas en la fracción FT-H y en el extracto hepático M puede ser debida a la formación de

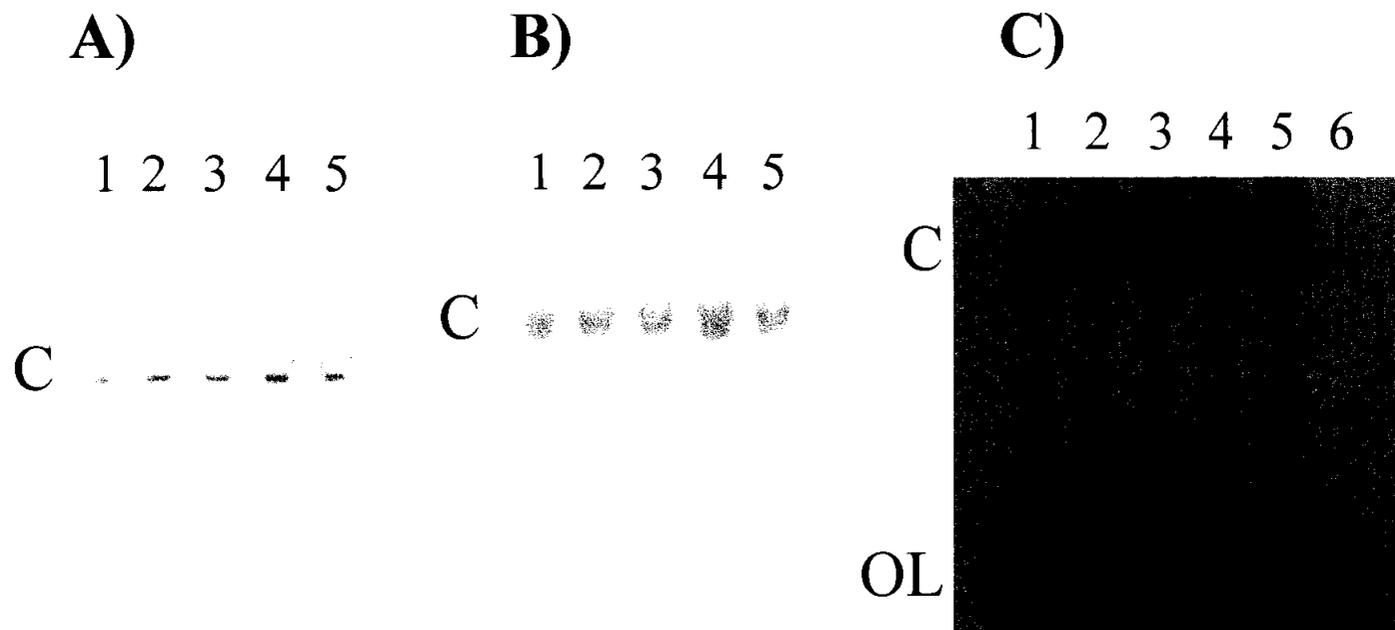
heterodímeros en los que quede expuesto un epítipo que sea reconocido por los anticuerpos anti-XX (no hay que olvidar que la reactividad cruzada en la detección de factores transcripcionales con anticuerpos es muy alta).

Al realizar una gradación de la cantidad de proteína (empleando como muestra el extracto hepático), se observó que en la membrana aumentaba la señal detectada al aumentar la cantidad de proteína (fig. 56A). Sin embargo, la señal que se obtuvo en la correspondiente autorradiografía (fig. 56B) dio valores prácticamente iguales para todas las calles cuando se cuantificó por densitometría; esto era debido a la saturación de la película, ya que, cuando se realizó un ensayo control de un CMG que no se transfirió, se observó que al aumentar la cantidad de proteína, aumentaba la fracción de complejo (fig. 56C).

Cuando se hizo un ensayo similar, pero manteniendo constante la cantidad de extracto y variando la cantidad de oligo, se observó que en la membrana (calles 2-6, fig. 57A), al disminuir la cantidad de oligo se atenuaba la señal. En la autorradiografía de esta membrana (calles 2-6, fig. 57B) se obtenía un resultado similar. En ensayos de CMG realizados en estas mismas condiciones, pero que no fueron transferidos, se observó que al disminuir la cantidad de oligo, se obtenía menos complejo (fig. 57C). Estos hechos parecen indicar que la proteína libre se movía con el frente del gel en las condiciones en que se realizó la electroforesis: en las calles 7, 8 y 9 no se observaba proteína en la membrana (fig. 57A) debido a que, por el tamaño del poro del gel (los CMG se desarrollan en geles al 4% no desnaturalizantes), la proteína se movía con el frente debido a que no se movía como una varilla (como el oligo), sino como un glóbulo (en la figura no se observa el frente, ya que se dejaba que la electroforesis transcurriera hasta que el ADN libre alcanzara el borde del gel).

En la autorradiografía no se observaba complejo ADN-proteína en aquellas calles para las cuales la cantidad de oligo presente en la reacción no era suficiente para formar el complejo ADN-proteína (fig. 57B).

Se efectuó un ensayo de ELUV con el fin de determinar si los anticuerpos eran capaces de reconocer a las proteínas implicadas en los complejos ADN-proteína cuando las uniones entre las proteínas y el ADN se habían fijado con luz UV. En las condiciones en que se realiza la electroforesis (un gel de SDS/PA, a diferencia de los ensayos de las figuras 55 a 57) era posible detectar también las proteínas libres, no implicadas en los complejos ADN-proteína. Como se observa en la figura 58 (calles 2-5), en la membrana no se detectó ninguna banda a 100 kDa en ninguna de las muestras del ELUV (previamente, en el punto 2.3.1. se había descrito la obtención de una banda a 100 kDa en los extractos crudos y en las fracciones H2 y XX1/2): se detectó una banda mayoritaria de 67 kDa en las calles 2, 3 y 5, y otras de menor intensidad a 80, 57 y 30 kDa (pesos moleculares sin restar el peso del oligo JA/NJA-2; los pesos de estas bandas al restar el oligonucleótido fueron de 54 para la banda mayoritaria y de 67, 44 y 17 kDa; fig. 58A). La autorradiografía de la membrana mostró los complejos que se detectaban habitualmente (ver figura 48), pero ninguna de estas bandas coincidía con las observadas en la membrana, a excepción de la de 67 kDa que coincidía con la de 70 kDa observada para el extracto crudo en la autorradiografía. Como se puede observar en la calle 6, en la fracción H2 mantenida a temperatura ambiente (25-30°C) tampoco se observa la banda de 100kDa, mientras que en fracción H2 cargada en el gel directamente desde su almacenaje a -80°C (la práctica habitual en los ensayos de Western) se detecta la banda de 100 kDa (calle 7, fig.58).



**Fig. 56.**

*Transferencia de complejos ADN-proteína. Se efectuó un ensayo de CMG con el oligo JA/NJA-2; las reacciones de unión se separaron en un gel de acrilamida al 4% de alta fuerza iónica y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa:*

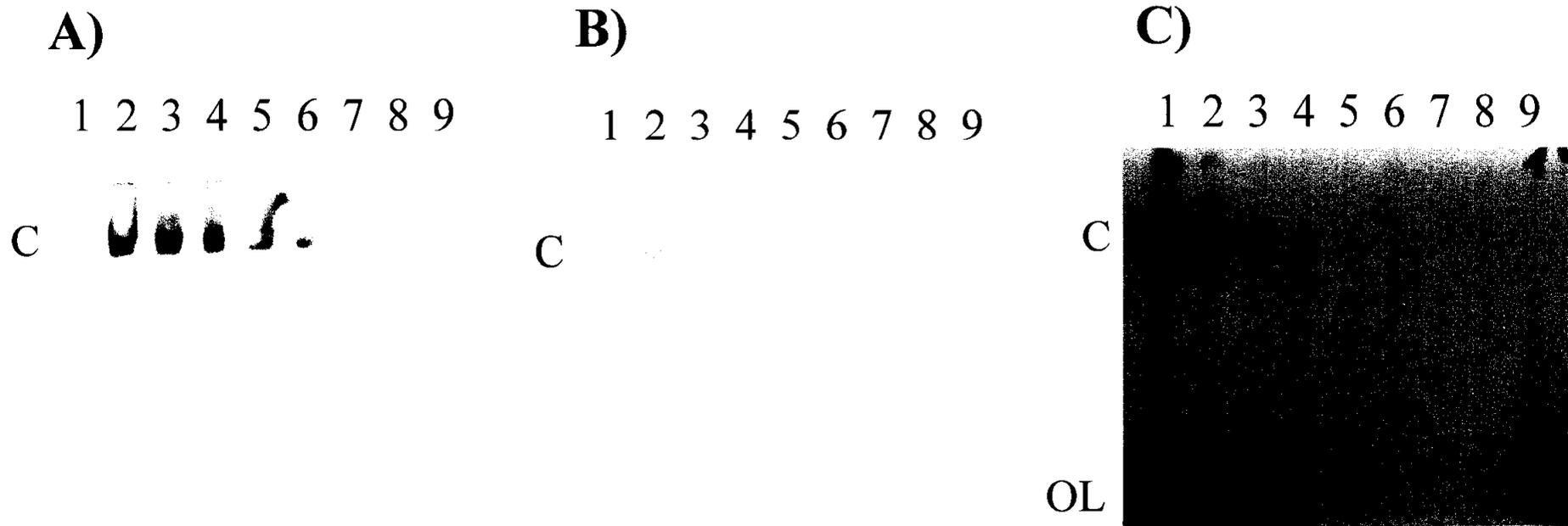
*A) Membrana detectada con el antisuero obtenido contra la fracción XX; B) Autorradiografía de la membrana.*

*Calles 1-5: reacción de unión con cantidades crecientes de extracto hepático (0,5  $\mu$ l; 0,75  $\mu$ l; 1  $\mu$ l; 1,5  $\mu$ l; 2  $\mu$ l, respectivamente).*

*C) Autorradiografía de CMG no transferido.*

*Calles 1-5: reacción de unión con cantidades crecientes de extracto hepático (0,5  $\mu$ l; 0,75  $\mu$ l; 1  $\mu$ l; 1,5  $\mu$ l; 2  $\mu$ l, respectivamente); calle 6: reacción en ausencia de muestra.*

*C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.*



**Fig. 57.**

*Transferencia de complejos ADN-proteína. Se efectuó un ensayo de CMG con el oligo JA/NJA-2; las reacciones de unión se separaron en un gel de acrilamida al 4% de alta fuerza iónica y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa;*

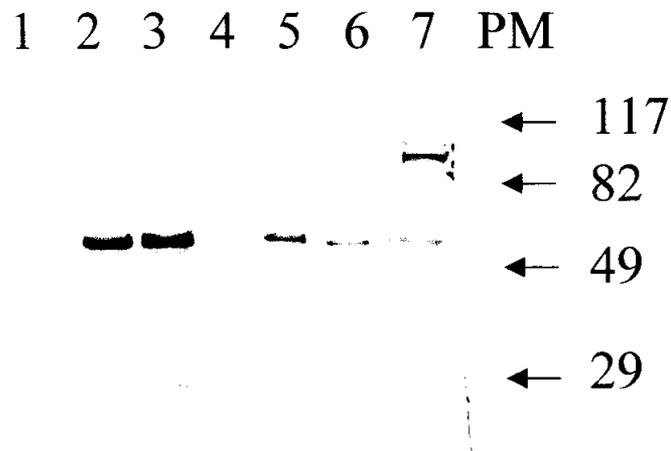
*A) Membrana detectada con el antisuero obtenido contra la fracción XX; B) Autorradiografía de la membrana.*

*Calle 1: reacción en ausencia de muestra.; calles 2-9: reacción de unión de extracto hepático con cantidades decrecientes de oligo marcado (10  $\mu$ l; 7  $\mu$ l; 5  $\mu$ l; 3  $\mu$ l; 2  $\mu$ l; 1  $\mu$ l; 0,5  $\mu$ l; 0  $\mu$ l, respectivamente).*

*C) Autorradiografía de CMG no transferido.*

*Calles 1-8: reacción de unión con cantidades decrecientes de oligo marcado (10  $\mu$ l; 7  $\mu$ l; 5  $\mu$ l; 3  $\mu$ l; 2  $\mu$ l; 1  $\mu$ l; 0,5  $\mu$ l; 0  $\mu$ l, respectivamente); calle 9: reacción en ausencia de muestra.*

*C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.*



**Fig. 58.**

*Transferencia de complejos ADN-proteína. Se efectuó un ensayo de ELUV según el protocolo descrito en Material y Métodos; las reacciones de unión se separaron en un minigel de SDS/PA al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que fue detectada con el antisuero obtenido contra la fracción XX.*

*Calle 1: oligo libre; calle 2: 3  $\mu$ l de extracto hepático M; calle 3: 9  $\mu$ l de FT-H; calle 4: 9  $\mu$ l de H1; calle 5: 9  $\mu$ l de H2; calle 6: 9  $\mu$ l de H2 mantenida 30 minutos a temperatura ambiente; calle 7: 9  $\mu$ l de H2 cargada directamente desde su almacenaje a  $-80^{\circ}\text{C}$ .*

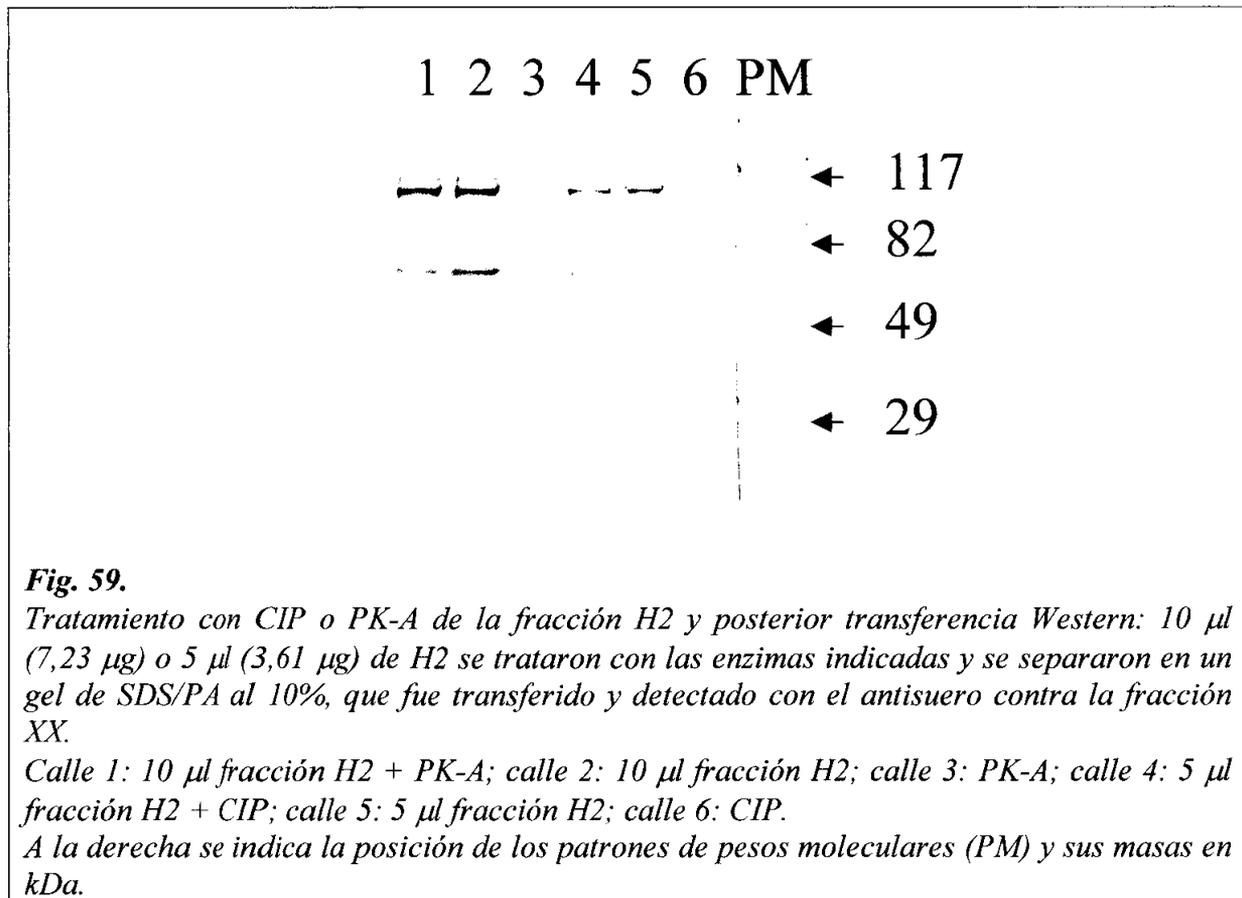
*C: complejo ADN-proteína.*

## 2.4 MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

Los factores transcripcionales ven regulada su actividad por modificaciones post-traduccionales. De entre ellas destaca la fosforilación, aunque, en los últimos años, también se ha empezado a conocer el papel de la glicosilación en la modulación de la actividad y el metabolismo de factores nucleares.

### 2.4.1 Fosforilación-desfosforilación: detección con anticuerpos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de la fosforilación descrito en el apartado 2.1.3, se llevó a cabo el tratamiento de la fracción H2 con PK-A (fig. 59, calle 1) o con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) (fig. 59, calle 4), la separación de las proteínas en geles de SDS/PA y el posterior reconocimiento con los anticuerpos obtenidos contra la fracción XX. Este ensayo no puso de manifiesto cambios en la movilidad de ninguna de las proteínas de 100 y 70 kDa detectadas en esta fracción H2, por lo que se consideró que ni se fosforilaban con la PK-A ni estaban fosforiladas. Como ya se vio en el apartado 2.1.3., las proteínas que se fosforilaban con el  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$  eran minoritarias, a excepción de una banda de 73 kDa.

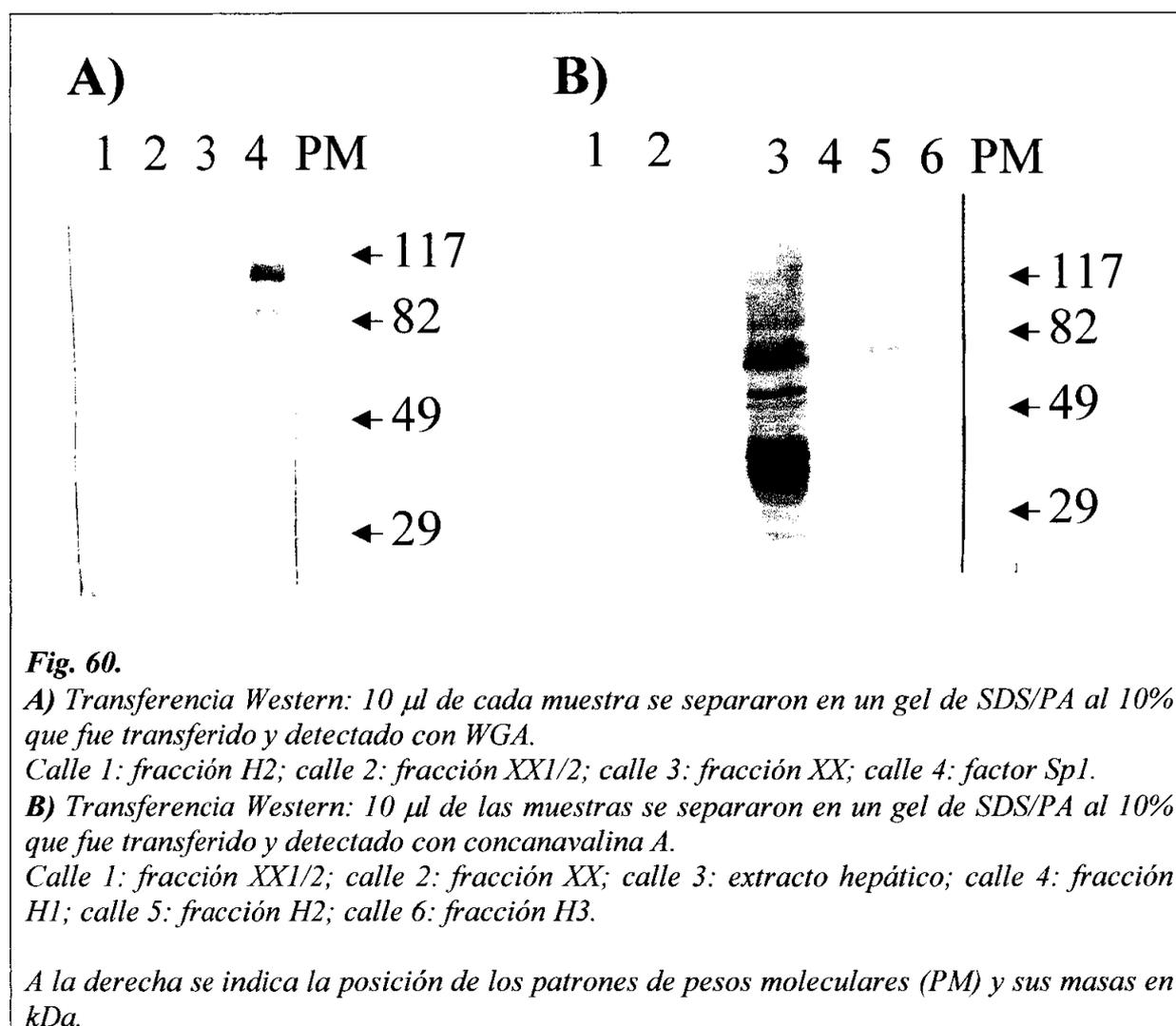


### 2.4.2 Glicosilación

Para comprobar si estos factores transcripcionales estaban glicosilados, se realizó una transferencia Western seguida de una detección con las lectinas WGA y concanavalina A marcadas con peroxidasa.

Con la WGA se detectaron proteínas glicosiladas con PM aparentes de 117, 93, 88 y 65 kDa en la fracción H2 (fig. 60A, calle 1), mientras que en la fracción purificada XX1/2 se detectaron proteínas glicosiladas con pesos moleculares de 95 y 70 kDa (fig. 60A, calle 2). Sin embargo, en la fracción XX no reaccionó ninguna proteína de la muestra con la WGA (fig. 60A, calle 3). La fracción H2, al ser una fracción poco pura, no proporcionaba resultados definitivos; en cambio, la banda de 70 kDa detectada en la fracción XX1/2 se corresponde en peso con las de 70 kDa detectadas en las fracciones XX1/2 y XX en los ensayos de Western (ver figura 49). En este ensayo, el factor Sp1, utilizado como control positivo, produjo bandas correspondientes a 95 y 80 kDa (fig. 60A, calle 4).

Con la concanavalina A se detectaron proteínas glicosiladas con PM aparentes de 98, 70, 50 y 37,5 kDa en la fracción H2 (fig. 60B, calle 5), pero no reaccionó ninguna proteína en las fracciones XX1/2 y XX (fig. 60B, calles 1 y 2).



## 2.5 INTERACCIÓN CON CROMATINA

El ADN se encuentra en el núcleo de las células interaccionando no sólo con factores nucleares y enzimas diversas, sino también con proteínas estructurales como son las histonas. Para estudiar este tipo de interacciones con la cromatina se realizaron ensayos de reconstitución de la cromatina empleando extractos de embriones de *Drosophila*, un método de reconstitución en condiciones fisiológicas.

La cromatina se ensambló empleando plásmidos con diferentes fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata (concretamente, los fragmentos 225-1 y 222) en presencia o ausencia de fracciones proteicas con actividad de unión procedentes de la columna de afinidad con el oligonucleótido JA/NJA-2 como ligando activo (fracciones cromatográficas XX1/2 y XX); el objetivo era ver si las proteínas se unían a la secuencia diana empaquetada en cromatina y si, al unirse, producían un cambio en la cromatina de la zona. También se estudió si habían diferencias en la formación de la cromatina cuando se empleaba ADN metilado.

A modo de control de la técnica, se comparó este estudio con otro de factor GAGA recombinante (FGA), utilizando plásmidos que llevaban un número determinado de cajas GAGA (la secuencia diana de este factor).

### 2.5.1 Estudio del factor GAGA

Se estudió el efecto que podían tener 19 cajas GAGA en tándem (X19 GAGA) sobre el posicionamiento de los nucleosomas. Mientras el ADN desnudo (es decir, no ensamblado en cromatina) es digerido preferentemente por la MNasa en la secuencia X19 GAGA (fig. 61, calles N), el ADN ensamblado en cromatina, tanto en ausencia como en presencia del FGA, es protegido de la digestión de la enzima (fig. 61, calles A y F; barra en la figura); esto se debe a la presencia de nucleosomas situados sobre la secuencia con 19 cajas GAGA. El hecho de que la MNasa presente preferencia por la secuencia de las cajas GAGA se debe a que esta enzima, aunque efectúa cortes al azar, posee una cierta especificidad, no por secuencias concretas de bases sino, por determinadas agrupaciones de bases que generan peculiaridades estructurales.

En el caso de las muestras ensambladas en presencia del FGA se observa que el límite inferior de la zona aparece definido por un banda que delimita mejor la zona protegida (fig. 61, calles F; flecha en la figura).

La digestión con DNasa I de esta construcción X19 GAGA demostró que la DNasa I no digería con especial preferencia ninguna secuencia del ADN desnudo (fig. 62, calles N), pero en las muestras ensambladas en cromatina se observó una digestión preferente de la región de las cajas GAGA (fig. 62, calles A): estos resultados indican que el origen de estos sitios hipersensibles a la digestión por la DNasa I no se deben a una peculiaridad estructural de la secuencia del ADN, sino a una peculiaridad de la cromatina: es decir, es la estructura de cromatina formada sobre esa secuencia la que hace que esa región sea especialmente accesible a la acción de la DNasa I.

Cuando el ensamblaje en cromatina se realizó en presencia de FGA se observó que esa región aparecía protegida frente a la digestión por la DNasa I (barra en la figura 62, calles FE y FL): la presencia del FGA en la reacción de formación de la cromatina protegía de la posterior acción de la DNasa I.

Con el fin de ver si era un efecto debido a un desplazamiento o a un afianzamiento de los nucleosomas por el FGA, se decidió tratar el ADN desnudo con DNasa I o MNasa en presencia o ausencia del FGA. En la digestión con DNasa I, la muestra con FGA se digirió totalmente (fig. 63A, calles NF), habiéndose empleado las mismas unidades de enzima para ambos tipos de reacciones; en la digestión con MNasa se obtuvo un patrón idéntico en ambos casos: la enzima era capaz de digerir la secuencia con las cajas GAGA tanto en presencia como en ausencia del FGA, por lo que, el FGA por sí solo no protegía de la digestión (fig. 63B, comparar calles N y NF).

De todo ello se puede deducir que el FGA, en las condiciones de estos ensayos, no provocaba un desplazamiento de los nucleosomas sino, más bien, un afianzamiento de éstos sobre la secuencia de unión.

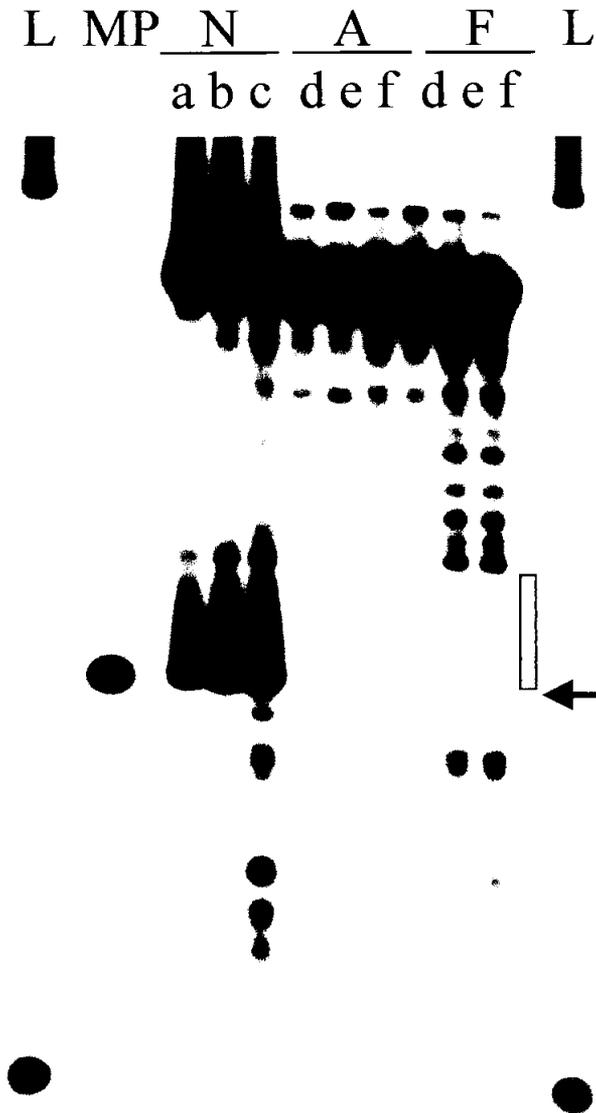
### **2.5.2 Estudio de las interacciones de los factores presentes en las fracciones cromatográficas con la cromatina**

Cuando se examinó cómo se empaquetaban los nucleosomas sobre una construcción con el fragmento 222 no metilado, se observó que el ADN ensamblado no mostraba unas preferencias de corte definidas con respecto al desnudo cuando se digerían ambos con DNasa I (comparar calles N y A, muestras de ADN no metilado (NM) en la figura 64). El sitio hipersensible a la DNasa I (flecha en la figura 64) que se observaba se situaba en secuencias del plásmido y no del fragmento.

En cuanto a la misma construcción metilada, tampoco se observó un patrón diferente entre las muestras de ADN desnudo y las de ADN ensamblado (comparar calles N y A, muestras de ADN metilado (M) en la figura 64) ni se detectó ningún sitio hipersensible a la DNasa I en la región del inserto.

La misma construcción con el fragmento 222 sin metilar y metilada no mostró un posicionamiento definido de los nucleosomas al ser sometida a la digestión con MNasa: es decir, no parece que en esta región promotora haya ninguna secuencia que posicione fuertemente a los nucleosomas (comparar calles N y A en la figura 65). La metilación no afectaba tampoco a la distribución de los nucleosomas, ya que entre ADN desnudo metilado y no metilado no habían diferencias (comparar calles N del ADN sin metilar (NM) con calles N del ADN metilado (M) en la figura 65).

Cuando las reacciones de ensamblaje de cromatina sobre el fragmento 222 sin metilar y metilado (fig. 65) se incubaron con las fracciones cromatográficas de la columna de afinidad JA/NJA-2 (5 y 10  $\mu$ l de XX; 10  $\mu$ l de XX1/2), no se observó ninguna diferencia en el patrón de corte de la MNasa con respecto a las muestras de ADN ensamblado en ausencia de estas fracciones cromatográficas (comparar A con 1, 2 y 3 en la figura 65). En todo caso, se observó que las muestras con la fracción XX1/2 (3 en la figura 65) estaban menos digeridas por la MNasa que las muestras con las fracciones XX (1 y 2 en la figura 65).



**Fig. 61.**

*Plásmido X19 GAGA. Digestión con MNasa y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 1,3%).*

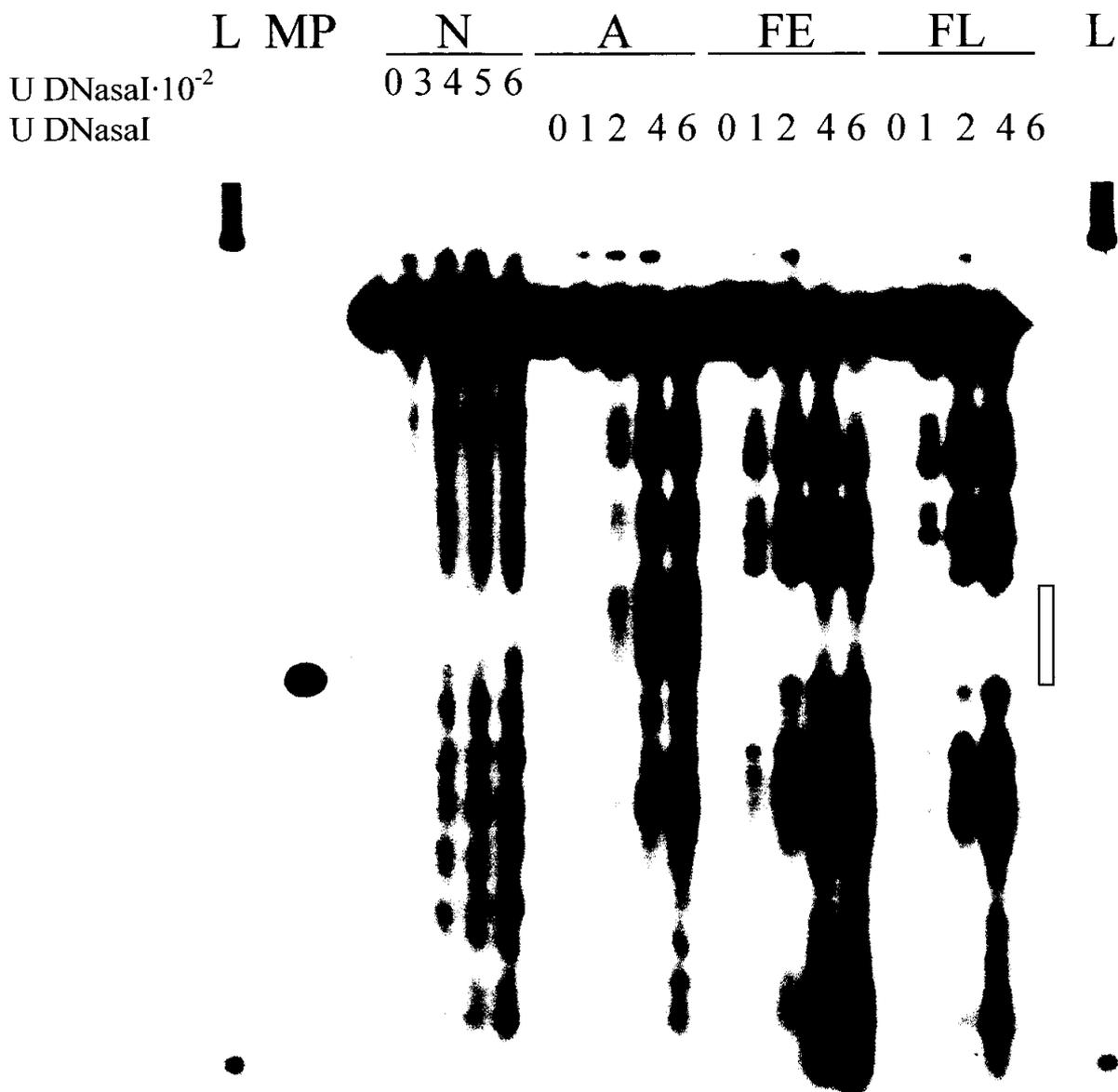
*Calles a, b y c: digestión con 50 U/μl MNasa diluída 1/300, durante 15, 30 y 60 segundos;*

*calles d, e y f: digestión con 50 U/μl MNasa diluída 1/4, durante 30, 45 y 60 segundos.*

*En la parte superior se indica el tipo de ADN utilizado en el ensayo (N: ADN desnudo; A: ADN ensamblado; F: ADN ensamblado en presencia de FGA).*

*L: escalera de 123 pb; MP: marcador del plásmido.*

*La barra y la flecha indica las posiciones comentadas en el texto.*



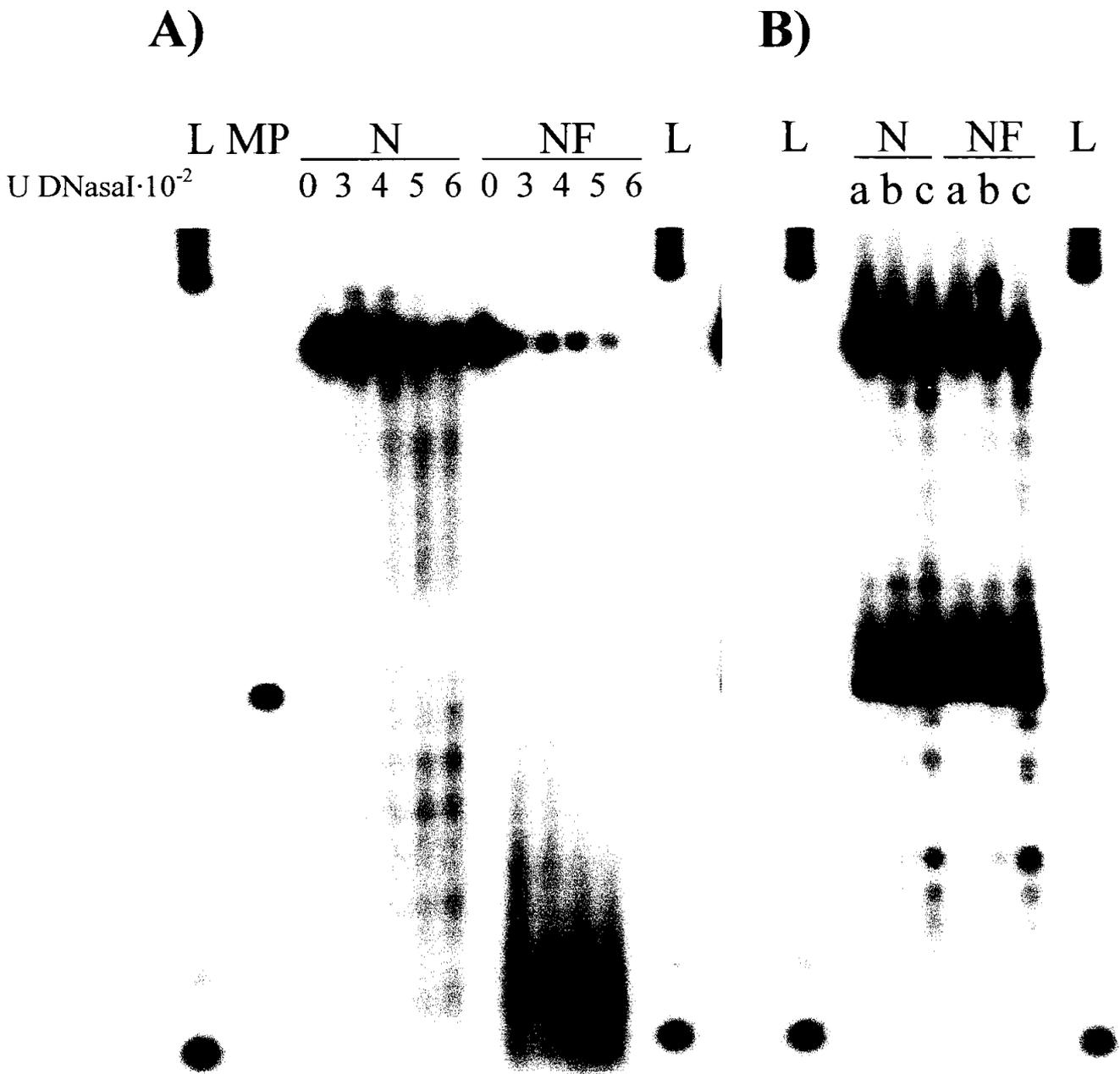
**Fig. 62.**

*Plásmido X19 GAGA. Digestión con DNasa I y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 1,3%).*

*En la parte superior se indica el tipo de ADN utilizado en el ensayo (N: ADN desnudo; A: ADN ensamblado; FE: ADN ensamblado en presencia de FGA durante todo el tiempo de incubación; FL: ADN ensamblado en presencia de FGA durante la última hora de incubación) y las unidades de DNasa I empleadas en la digestión.*

*La barra indica la posición comentada en el texto.*

*L: escalera de 123 pb; MP: marcador del plásmido.*



**Fig. 63.**

**A)** Plásmido X19 GAGA. Digestión con DNasa I y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 1,3%).

En la parte superior se indica el tipo de ADN utilizado en el ensayo (N: ADN desnudo; NF: ADN desnudo incubado 1 hora a 26°C en presencia de FGA) y las unidades de DNasa I empleadas en la digestión.

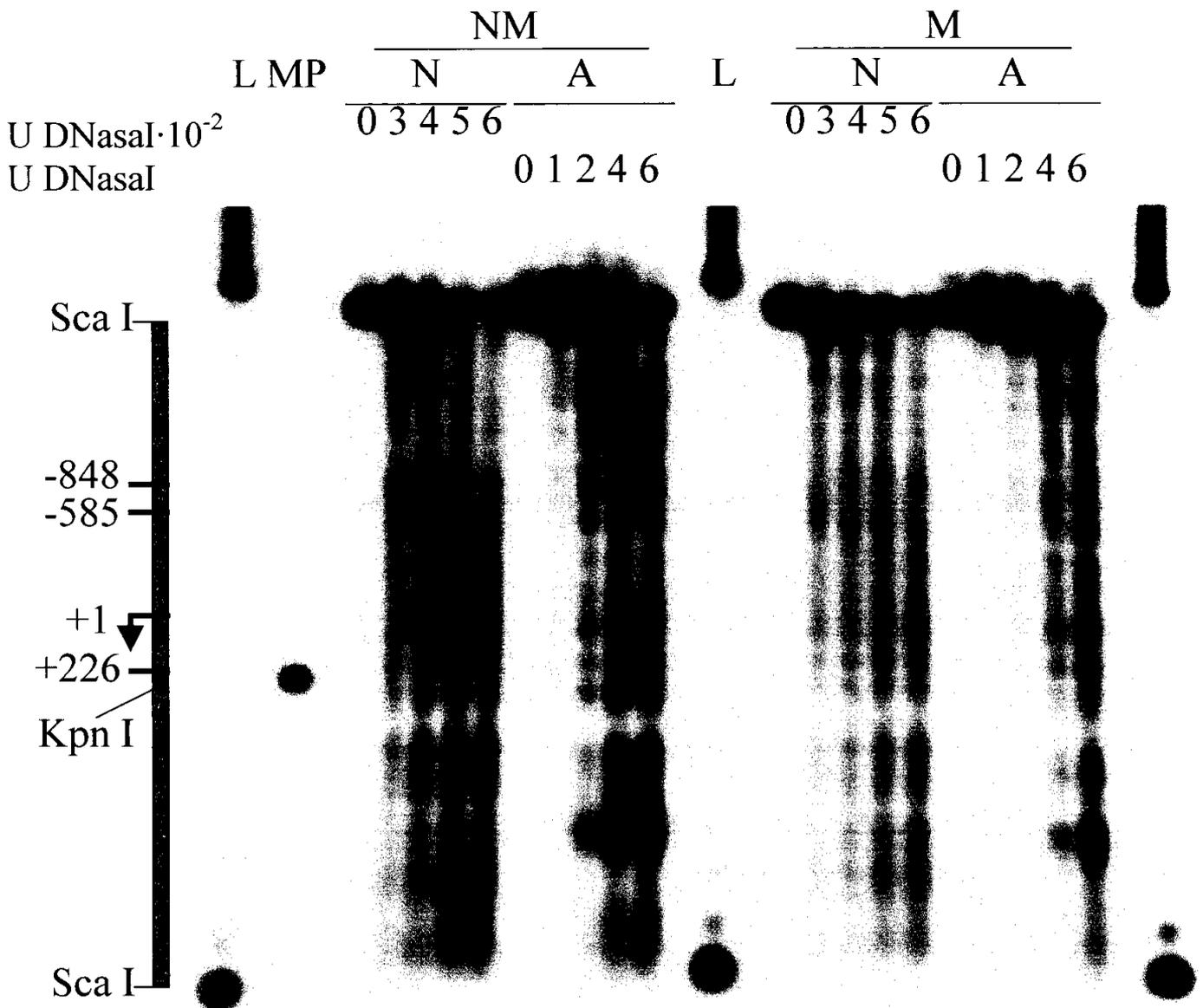
L: escalera de 123 pb; MP: marcador del plásmido.

**B)** Plásmido X19 GAGA. Digestión con MNasa y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 1,3%).

Calles a, b y c: digestión con 50 U/μl MNasa diluída 1/300, durante 15, 30 y 60 segundos.

En la parte superior se indica el tipo de ADN utilizado en el ensayo (N: ADN desnudo; NF: ADN desnudo incubado 1 hora a 26°C en presencia de FGA).

L: escalera de 123 pb.



**Fig. 64.**

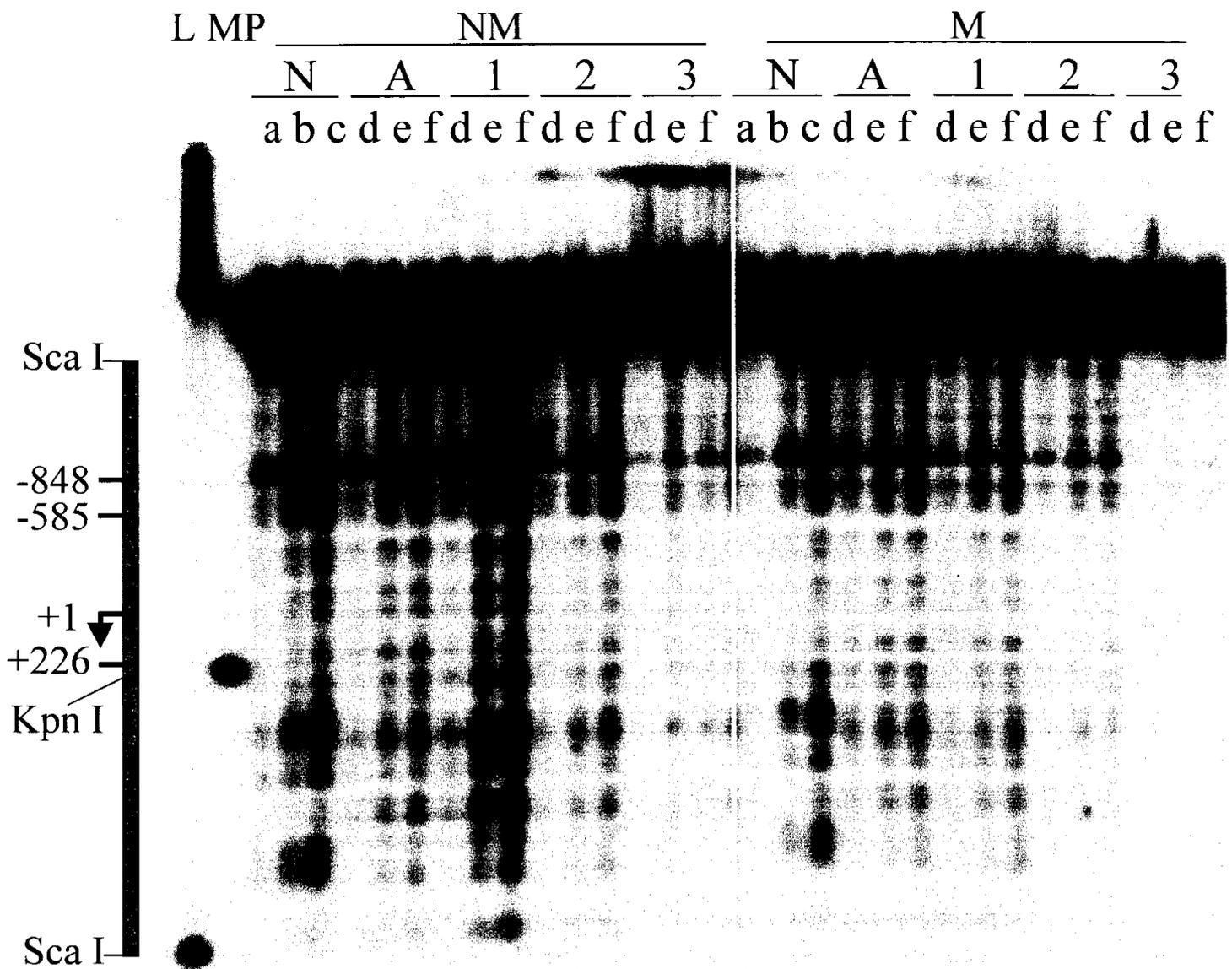
Fragmento 222 en pTZ19R ensamblado en cromatina. Digestión con DNasa I y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 0,8%).

En la parte superior se indica el tipo de ADN utilizado en el ensayo (N: ADN desnudo; A: ADN ensamblado; NM: ADN sin metilar; M: ADN metilado) y las unidades de DNasa I empleadas en la digestión.

En la parte izquierda se expone un esquema vertical de la construcción analizada, mostrando las enzimas usadas para digerir el marcador del plásmido (ScaI / KpnI) y las muestras tratadas con la nucleasa (ScaI), así como los límites del inserto (barras azules), la situación de la secuencia diana (barra roja) y del inicio de la transcripción (+1).

L: escalera de 123 pb; MP: marcador del plásmido.

La flecha indica la posición del SHD.



**Fig. 65.**

*Fragmento 222 en pTZ19R ensamblado en cromatina en presencia o ausencia de fracción proteica (XX, XXI/2). Digestión con MNasa y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 0,8%).*

*Calles a, b y c: digestión con 50 U/ $\mu$ l MNasa diluída 1/300, durante 15, 30 y 60 segundos, respectivamente;*

*calles d, e y f: digestión con 50 U/ $\mu$ l MNasa diluída 1/4, durante 30, 45 y 60 segundos, respectivamente.*

*1: ADN ensamblado en presencia de 5  $\mu$ l de fracción XX;*

*2: ADN ensamblado en presencia de 10  $\mu$ l de fracción XX;*

*3: ADN ensamblado en presencia de 10  $\mu$ l de fracción XXI/2.*

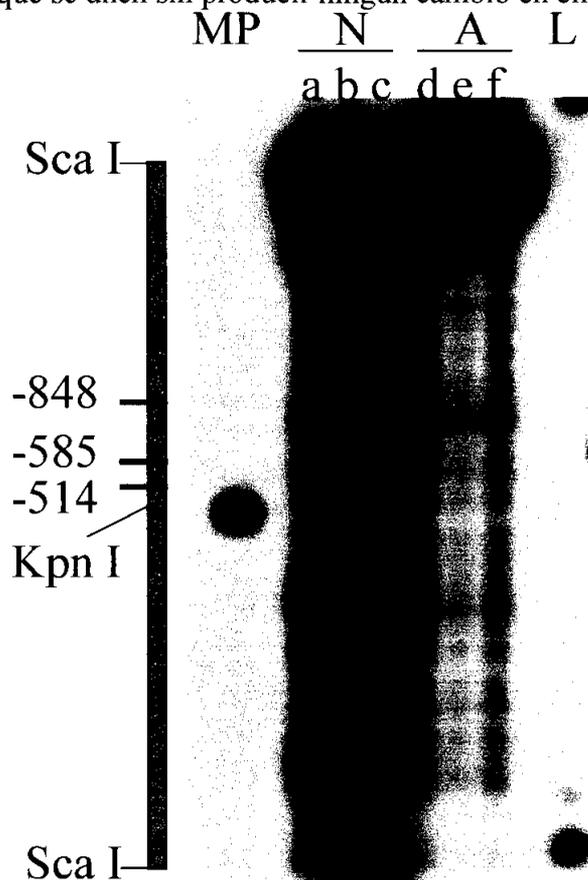
*N: ADN desnudo; A: ADN ensamblado; NM: ADN sin metilar; M: ADN metilado.*

*En la parte izquierda se expone un esquema vertical de la construcción analizada, mostrando las enzimas usadas para digerir el marcador del plásmido (ScaI / KpnI) y las muestras tratadas con la nucleasa (ScaI), así como los límites del inserto (barras azules), la situación de la secuencia diana (barra roja) y del inicio de la transcripción (+1).*

*L: escalera de 123 pb; MP: marcador del plásmido.*

Para el fragmento 225-1, la técnica no tenía la resolución suficiente como para sacar conclusiones: la sonda estaba muy lejos y el análisis no era lo bastante exacto. De todos modos, tanto para la digestión con MNasa como con DNasa I no se observaron diferencias significativas entre el ADN desnudo y el ensamblado, sin obtenerse ni nucleosomas fuertemente posicionados ni sitios hipersensibles a la DNasa I (figs. 66 y 67, respectivamente).

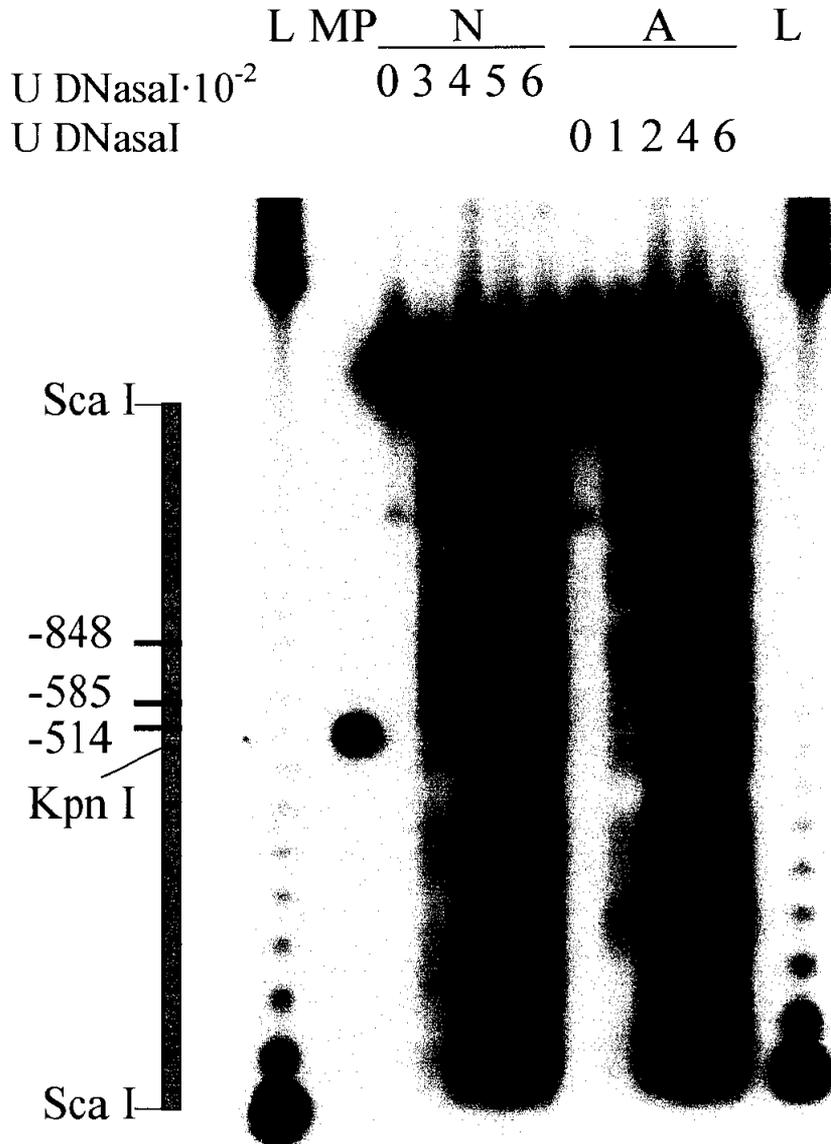
De todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que no hay ninguna secuencia en esta región del promotor I de la GGT de rata que posicione fuertemente a los nucleosomas y que las proteínas presentes en las fracciones cromatográficas no ejercen ningún efecto sobre la cromatina formada sobre estas secuencias de ADN (bien porque no se unen a la cromatina, o bien porque se unen sin producir ningún cambio en ella).



**Fig. 66.**

*Fragmento 225-1 en pTZ19R ensamblado en cromatina. Digestión con MNasa y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 0,8%): Calles a, b y c: digestión con 50 U/ $\mu$ l MNasa diluída 1/300, durante 15, 30 y 60 segundos, respectivamente; calles d, e y f: digestión con 50 U/ $\mu$ l MNasa diluída 1/4, durante 30, 45 y 60 segundos, respectivamente.*

*En la parte superior se indica el tipo de ADN utilizado en el ensayo (N: ADN sin metilar desnudo; A: ADN sin metilar ensamblado). En la izquierda se expone un esquema vertical de la construcción analizada, mostrando las enzimas usadas para digerir el marcador del plásmido (ScaI / KpnI) y las muestras tratadas con la nucleasa (ScaI), así como los límites del inserto (barras azules) y la situación de la secuencia diana (barra roja). La numeración indicada está tomada con referencia al +1 del inserto. L: escalera de 123 pb; MP: marcador del plásmido.*



**Fig. 67.**

*Fragmento 225-1 en pTZ19R ensamblado en cromatina, digestión con DNasa I y marcaje terminal indirecto (gel de agarosa al 0,8%).*

*En la parte superior se indica el tipo de ADN utilizado en el ensayo (N: ADN sin metilar desnudo; A: ADN sin metilar ensamblado) y las unidades de DNasa I empleadas en la digestión.*

*En la parte izquierda se expone un esquema vertical de la construcción analizada, mostrando las enzimas usadas para digerir el marcador del plásmido (ScaI / KpnI) y las muestras tratadas con la nucleasa (ScaI), así como los límites del inserto (barras azules) y la situación de la secuencia diana (barra roja). La numeración indicada está tomada con referencia al +1 del inserto.*

*L: escalera de 123 pb; MP: marcador del plásmido.*

### 3. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GGT DE RATA.

Se llevaron a cabo dos aproximaciones: ensayos de transcripción *in vitro* y ensayos de expresión transitoria en líneas celulares derivadas de rata.

#### 3.1 TRANSCRIPCIÓN IN VITRO

Para estos experimentos, los fragmentos originales de la zona 5' del gen de la GGT de rata clonados en los plásmidos pTZ18R o pTZ19R se subclonaron en el vector pUC18. Las construcciones obtenidas fueron: ABC (pUC18 con el fragmento 222), AC (pUC18 con un promotor deleccionado que se obtuvo al colocar la secuencia que se extiende desde -765 a -514 pb en 5' a la secuencia con el inicio de la transcripción: de -143 a +144 pb) y C (pUC18 con el fragmento 226).

En primer lugar se fijaron las condiciones estándar de los ensayos de transcripción *in vitro*, determinando para cada una de las variables (temperatura, tiempo de transcripción, etc.) el valor para el cual se obtenía el resultado óptimo (fig. 68). Para estos ensayos se empleó la construcción AC, puesto que originaba un producto de transcripción único.

Como se puede observar en la figura 68A, la cantidad de transcrito obtenido era máxima cuando se emplearon 4  $\mu$ l de extracto nuclear hepático. Cuando se emplearon 5  $\mu$ l la cantidad de transcrito obtenida fue menor, probablemente debido al aumento en el medio de reacción de factores inhibidores de la transcripción.

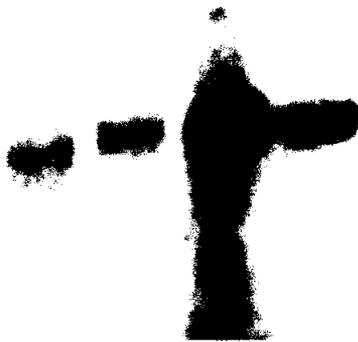
Quando se emplearon cantidades crecientes de molde (de 100 ng a 700 ng de ADN, fig. 68B), se observó un aumento del transcrito; sin embargo, para 1000 ng de ADN molde la cantidad de transcrito disminuyó, debido a un efecto dilucional: el aumento de la cantidad de molde provoca la dispersión de los componentes del complejo de iniciación de la transcripción en complejos incompletos que no son efectivos.

A medida que se aumentaba el tiempo de transcripción, la cantidad de transcrito disminuía, posiblemente debido a la degradación de éste por factores presentes en el extracto (fig. 68C). Por otro lado, al aumentar el tiempo de extensión, se obtenía más señal, con un óptimo a los 45 minutos (fig. 68D); a los 60 minutos la señal era menor que a los 45 minutos, probablemente debido a un aumento de la degradación del ARN.

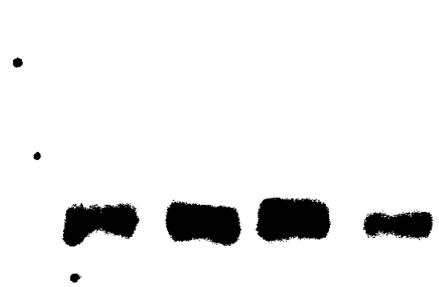
La concentración óptima de  $Mg^{2+}$  fue de 2 mM; esta concentración de  $Mg^{2+}$  tan baja se debía a la activación paralela por  $Mg^{2+}$  de las nucleasas presentes en los extractos (fig. 68E).

También se estudió la temperatura de incubación de la reacción de transcripción para la cual se obtenía mayor cantidad de transcrito. Como se puede observar en la figura 68F, a 20-25° C la señal obtenida era mucho mayor que a 30-35° C. Este efecto puede ser debido a un aumento de la actividad de la nucleasa y/o la degradación del transcrito y/o a una alteración de las proteínas del extracto nuclear implicadas en la transcripción del molde de ADN.

**A) Cantidad de extracto**  
0,5 1 2 3 4 5  $\mu$ l



**B) Cantidad de molde**  
100 200 300 700 1000 ng



**C) Tiempo de transcripción**  
10 20 30 45 60 min.



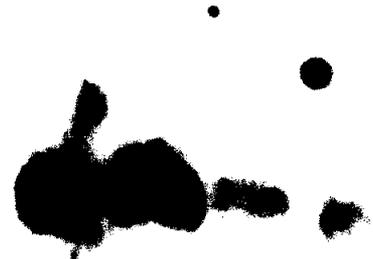
**D) Tiempo de extensión**  
15 30 45 60 min.



**E) Concentración de MgCl<sub>2</sub>**  
2 4 6 8 10 12 mM



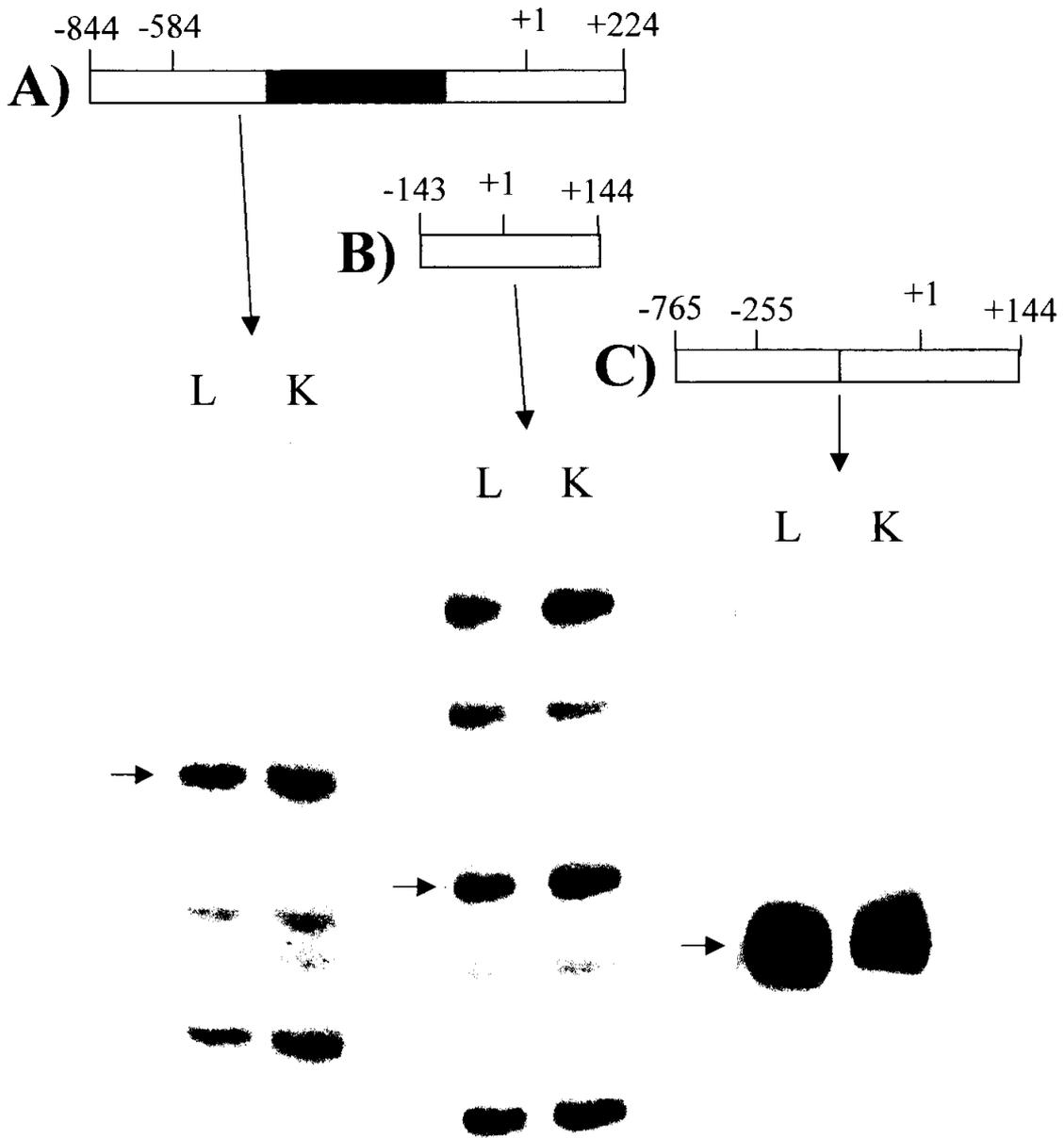
**F) Temperatura**  
20° 25° 30° 35° °C



**Fig. 68.**

*Determinación de las condiciones estándar de los ensayos de transcripción in vitro. Se empleó la construcción AC.*

*Sobre cada figura se indican los valores de cada una de las variables examinadas y sus unidades.*



**Fig. 69.**

*Ensayos de transcripción in vitro de diferentes moldes por extractos nucleares de hígado (L) y riñón (K):*

*A) Construcción ABC (fragmento 222 en pUC18);*

*B) construcción C (fragmento 226 en pUC18);*

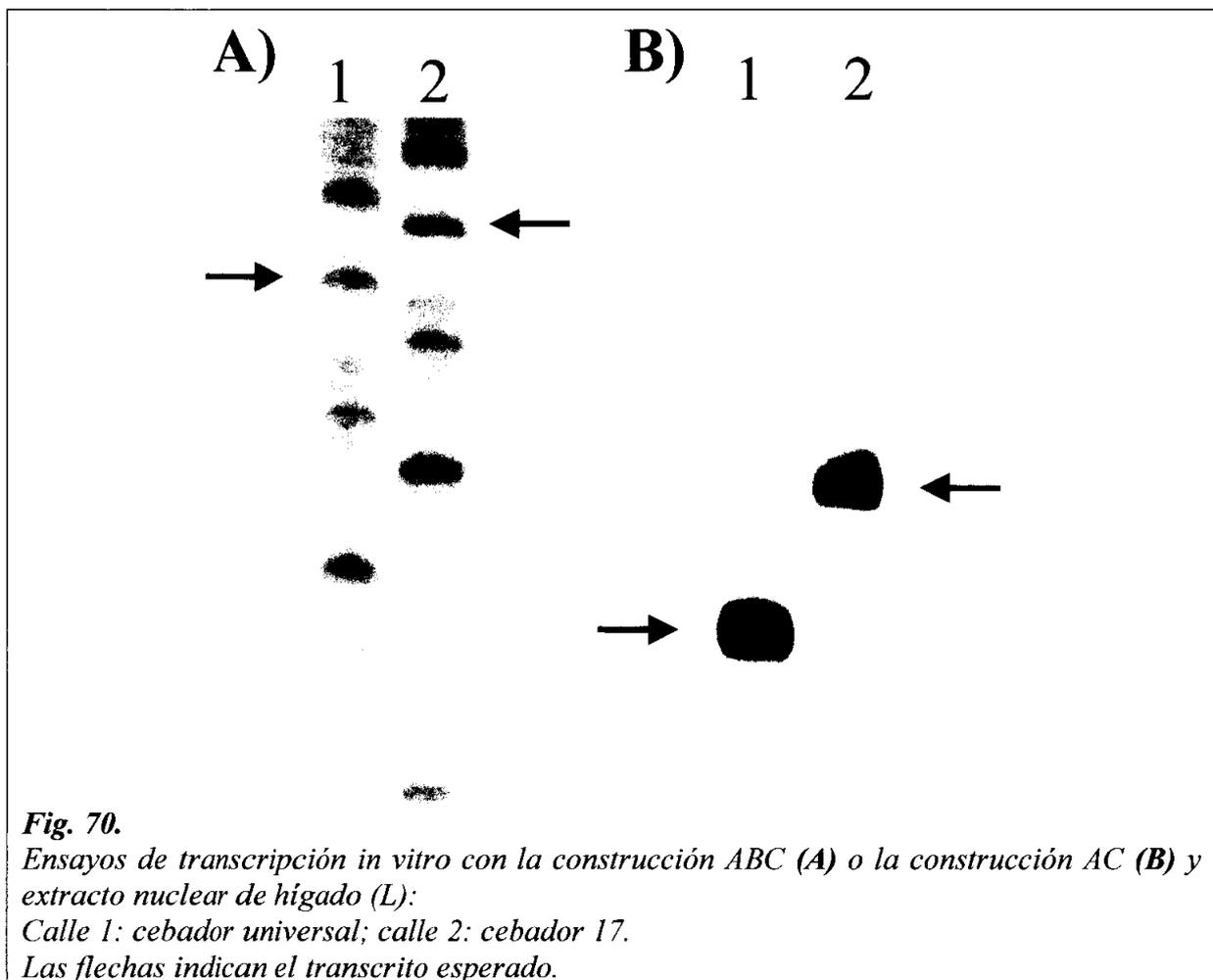
*C) construcción AC (fragmento desde -765 a -514 pb en 5' a la secuencia con el inicio de la transcripción: de -143 a +144 pb en pUC18).*

*La flecha indica la banda correspondiente al producto de transcripción esperado.*

Las condiciones finalmente establecidas fueron: 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25° C, 30 minutos de transcripción y 45 minutos de extensión, 4 µl de extracto nuclear y 500 ng de molde.

En estas condiciones, la transcripción de la construcción ABC por extractos hepáticos y renales dio lugar a la banda de 260 pb (flecha en la figura 69A), correspondiente al producto de transcripción esperado; pero se obtuvieron otras bandas, lo cual indica que no hay un punto específico de inicio de la transcripción (fig.69A). Cuando se realizaron estos ensayos empleando sólo la secuencia más próxima al inicio de la transcripción (construcción C), se obtuvo la banda de 200 pb (flecha en la figura 69B) esperada, pero también se observó un mayor número de bandas de otros tamaños en comparación con la construcción ABC, poniéndose de manifiesto la escasa especificidad que confieren estas secuencias proximales en el proceso de iniciación de la transcripción. Sin embargo, con la construcción AC (obtenida al acercar la secuencia de -584 al lugar de inicio de la transcripción) se obtuvo una única banda de 200 pb (flecha en la figura 69C), tanto con los extractos hepáticos como con los renales.

Para conocer si el inicio de la transcripción era específico se efectuaron ensayos de transcripción empleando las construcciones ABC y AC y los cebadores universal y 17. Como se esperaba, la banda de mayor tamaño se obtuvo con el cebador 17 en las dos construcciones (fig. 70).



**Fig. 70.**

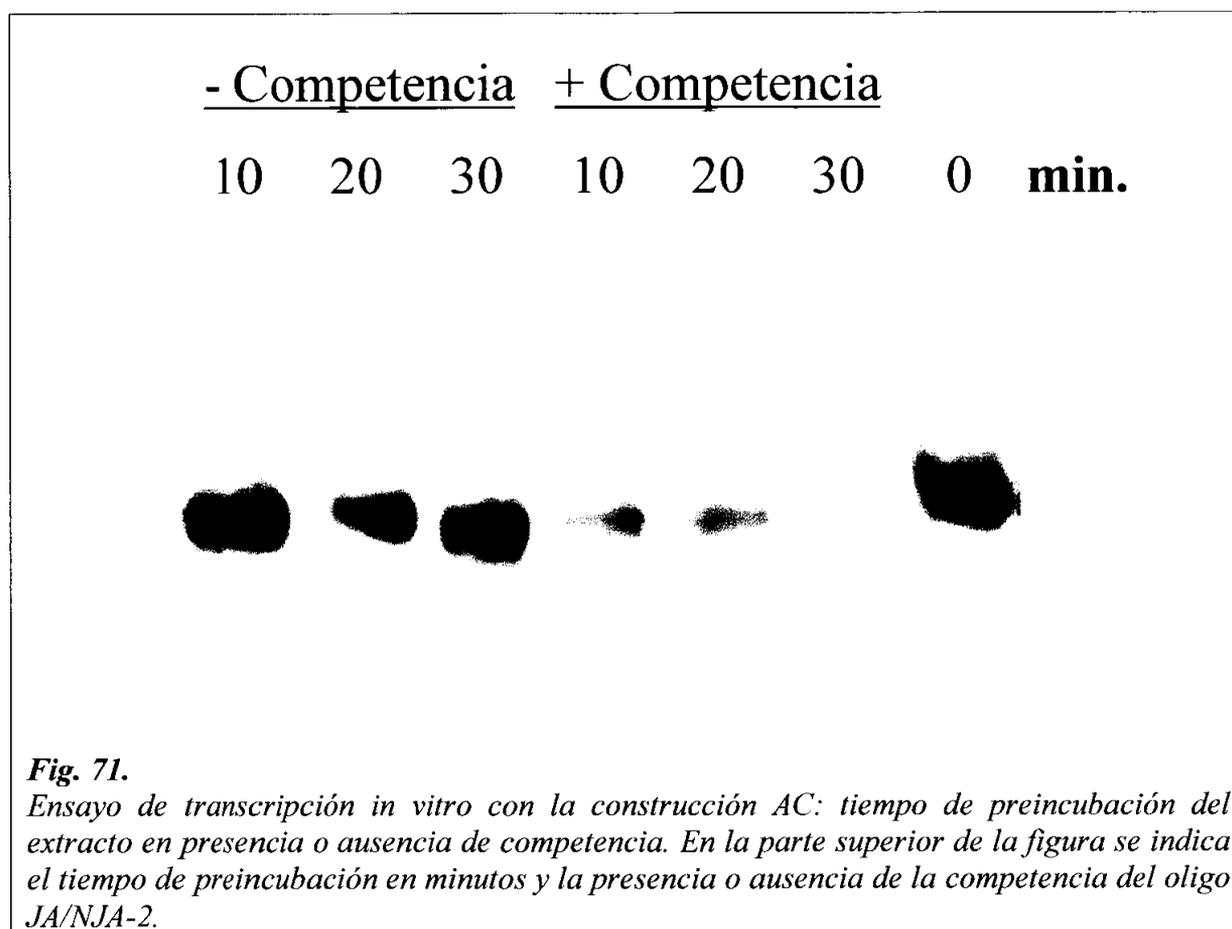
*Ensayos de transcripción in vitro con la construcción ABC (A) o la construcción AC (B) y extracto nuclear de hígado (L):*

*Calle 1: cebador universal; calle 2: cebador 17.*

*Las flechas indican el transcrito esperado.*

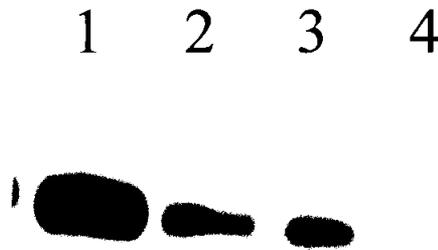
Mediante ensayos con competencias se comprobó el efecto de la especificidad de los factores nucleares presentes en los extractos hepáticos en el control de la transcripción de los fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata.

En primer lugar se estudió el efecto de la preincubación del extracto con competencia del oligo JA/NJA-2 empleando el molde AC. La calle control ("0 minutos" en la figura 71) puso de manifiesto que se obtenía la misma cantidad de transcrito que al cabo de 10 minutos de preincubación sin competencia; a los 30 minutos de preincubación en ausencia de competencia la cantidad de transcrito era prácticamente idéntica a la obtenida a los 10 minutos de preincubación. Sin embargo, la preincubación con competencia provocó una clara disminución de la señal obtenida a los 10 minutos; señal que disminuía más a los 30 minutos de preincubación con la competencia (fig. 71).



Cuando se estudió el efecto de la presencia de competencia (como tal se utilizó el oligo JA/NJA-2) en la reacción de transcripción con el molde AC, se observó que al aumentar la cantidad de competencia, disminuía la señal obtenida (comparar calles 1, 2 y 3, figura 72).

En cuanto a la metilación del promotor, ésta impidió la transcripción de la construcción AC por los extractos nucleares (fig. 72, calle 4).

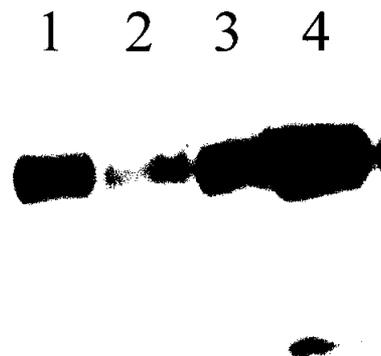


**Fig. 72.**

*Efecto de la presencia de competencia en la reacción de transcripción y transcripción con molde metilado. Se empleó la construcción AC y el oligo JA/NJA-2 como competencia:*

*Calle 1: control; calle 2: 0,5 µg de competencia; calle 3: 1 µg de competencia; calle 4: molde metilado.*

Con el fin de corroborar la especificidad de los factores nucleares de los extractos hepáticos en el control del inicio de la transcripción, se comparó el efecto que tenían las competencias del oligonucleótido JA/NJA-2, la sonda 225-1-T y un oligonucleótido inespecífico en la obtención de transcrito. Como se observa en la figura 73, el oligo JA/NJA-2 compitió de manera más efectiva que la sonda 225-1-T (calles 2 y 3, respectivamente, fig. 73), dado que, para la misma cantidad de ADN de competencia hay mayor proporción de secuencia diana al emplear el oligonucleótido que al utilizar la sonda. Cuando se incubaron las muestras en presencia de un oligonucleótido inespecífico, se obtuvo la misma cantidad de transcrito que en la reacción control (cfr. calles 4 y 1, respectivamente en la figura 73).

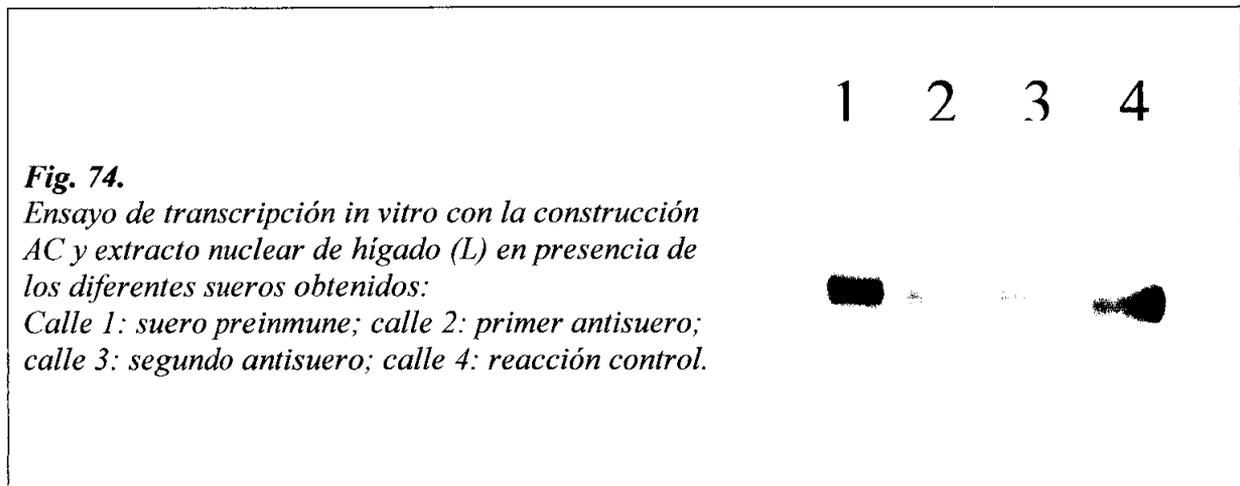


**Fig. 73.**

*Efecto de la presencia de competencia en la reacción de transcripción. Se empleó la construcción AC:*

*Calle 1: reacción control; calle 2: competencia del oligonucleótido JA/NJA-2; calle 3: competencia de la sonda 225-1-T; calle 4: competencia de oligonucleótido inespecífico.*

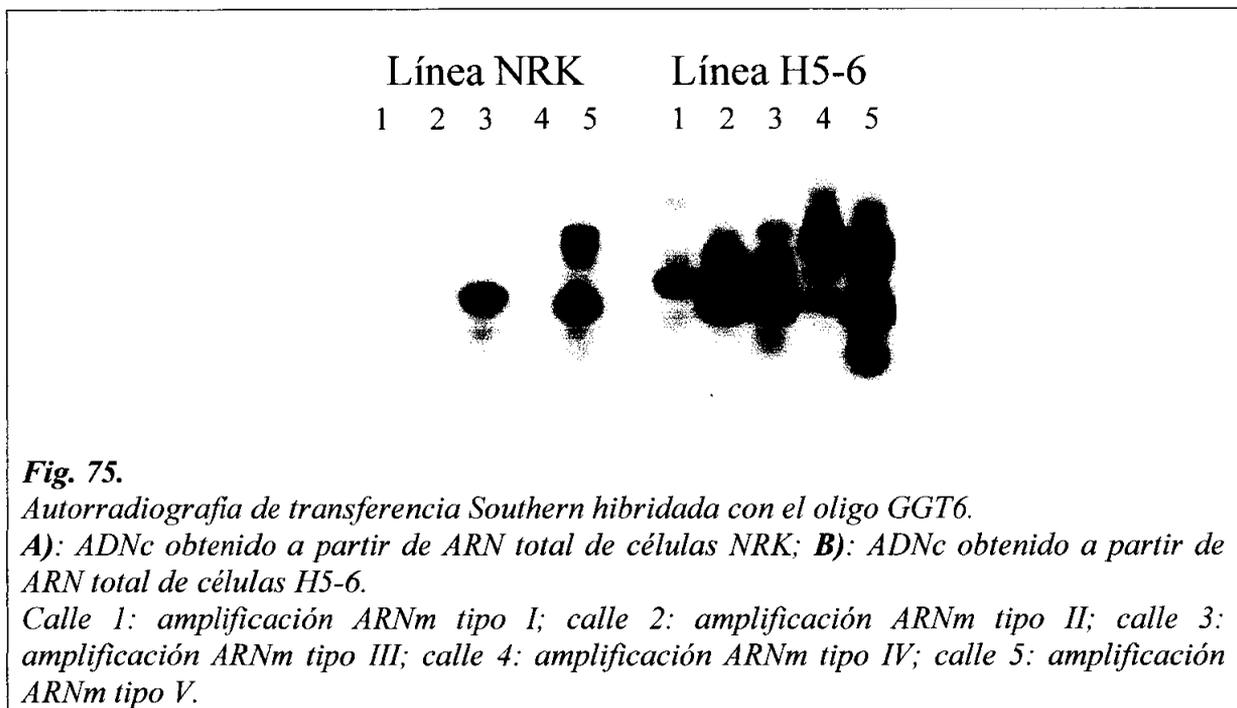
Cuando se empleó en ensayos de transcripción *in vitro* con la construcción AC el sobrenadante obtenido al tratar con proteína A-Sepharosa una mezcla en la que se incubó extracto hepático con suero preinmune o antisueros (ver página 98 de *Material y Métodos*), se obtuvo diferencia en los transcritos obtenidos y con respecto al obtenido en la reacción control: mientras que, con los sobrenadantes obtenidos a partir de la incubación con el suero preinmune (calle 1, fig. 74) se obtuvo la misma cantidad de transcrito que en la reacción control (calle 4, fig. 74), en las reacciones en las que se emplearon los sobrenadantes obtenidos a partir de las incubaciones de extracto hepático con antisueros (calles 2 y 3, fig. 74) se obtuvieron menor cantidad de transcrito que en la reacción control (calle 4, fig. 74): los anticuerpos presentes en los antisueros fueron capaces de secuestrar los factores necesarios para la transcripción del fragmento AC.



## 3.2 EXPRESIÓN TRANSITORIA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE RATA

### 3.2.1 Actividad transcripcional

En estos ensayos se emplearon dos líneas celulares derivadas de rata (ver *Material y Métodos*, apartado 1.2): la línea NRK, que presentaba una actividad GGT de 88,7 mU/mg, y la línea H5-6, cuya actividad GGT era de 747,4 mU/mg. En estas líneas se detectaron, mediante ensayos de RT-PCR, diferentes tipos de ARNm que codifican para la GGT: como muestra la figura 75, en las células H5-6 se detectó la presencia de los ARNm tipo I, II, III, IV-1 y V-1 y V-2, mientras que en la línea NRK se detectaron sólo los tipos III, V-1 y V-2.



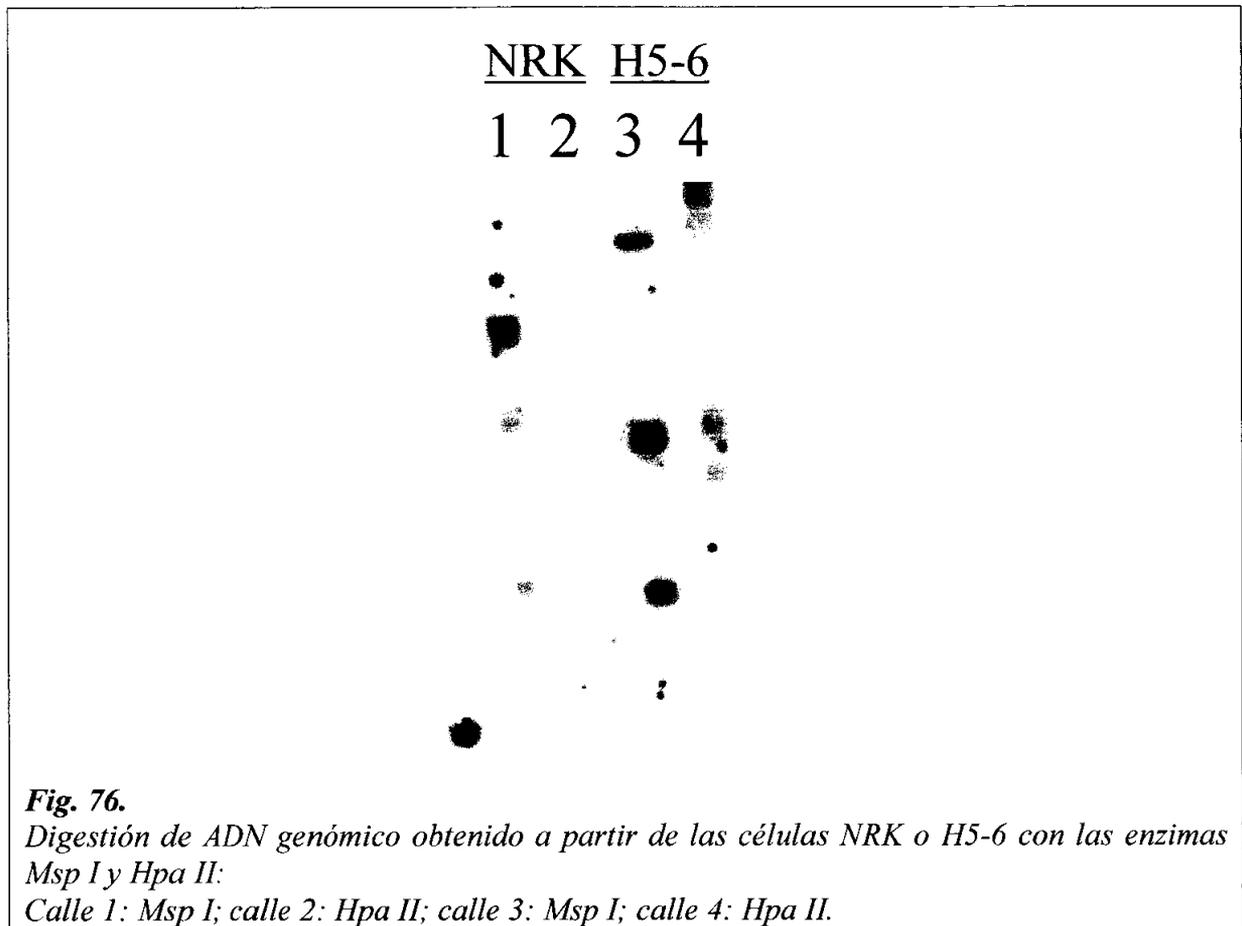
**Fig. 75.**

*Autorradiografía de transferencia Southern hibridada con el oligo GGT6.*

*A): ADNc obtenido a partir de ARN total de células NRK; B): ADNc obtenido a partir de ARN total de células H5-6.*

*Calle 1: amplificación ARNm tipo I; calle 2: amplificación ARNm tipo II; calle 3: amplificación ARNm tipo III; calle 4: amplificación ARNm tipo IV; calle 5: amplificación ARNm tipo V.*

A partir de células H5-6 y NRK se aisló ADN genómico (apartado 20 de *Material y Métodos*) con el fin de estudiar el grado de metilación del ADN de estas células mediante la digestión con las enzimas de restricción *Hpa* II y *Msp* I. Estas enzimas reconocen y cortan la misma secuencia de ADN: 5'-CCGG-3', pero sólo la *Msp* I es capaz de digerir el ADN cuando las citosinas en posición 5' a las guaninas se encuentran metiladas: 5'-C<sup>m</sup>CGG-3'. Como se puede observar en la figura 76, en la calle 2 no se observaron fragmentos de bajo peso molecular procedentes de la digestión del ADN de las células NRK con la enzima *Hpa* II; en cambio, sí se observaron fragmentos de bajo peso molecular en las calles 1, 3 y 4, correspondientes a las digestiones del ADN de las NRK con *Msp* I y del ADN de las células H5-6 con las enzimas *Msp* I y *Hpa* II, respectivamente. Estos resultados indican que el grado de metilación del ADN de las células de la línea NRK es mayor que el de las células H5-6.

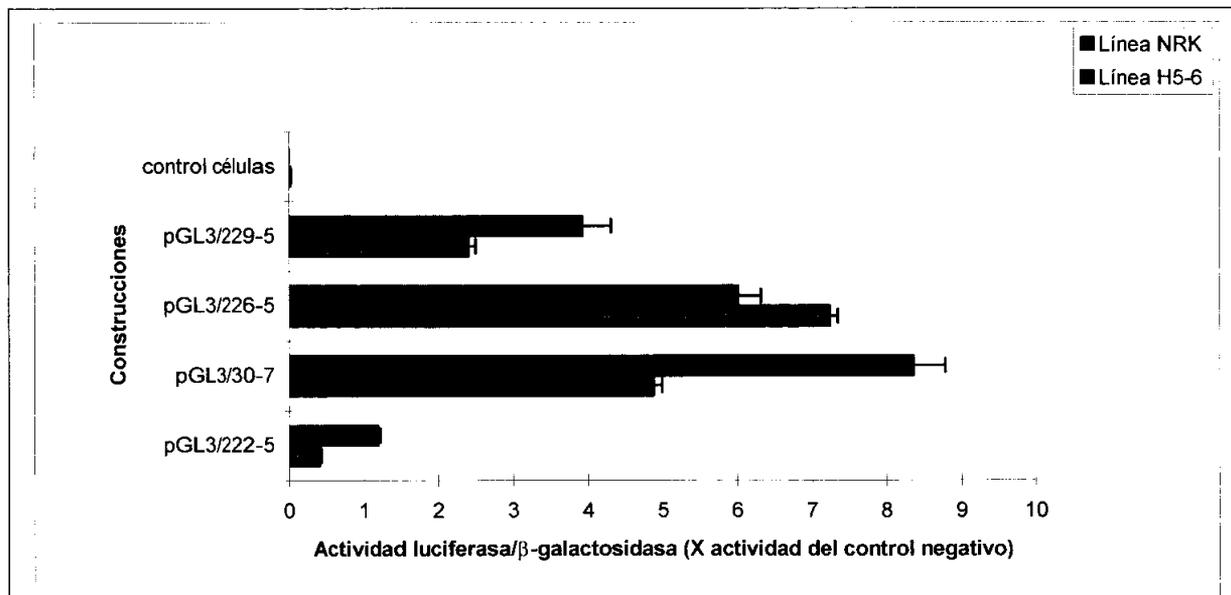


Con el fin de estudiar la actividad de diferentes zonas del promotor I de rata, se hicieron distintas construcciones empleando el plásmido pGL3- Enhancer. Este plásmido contiene el enhancer del SV40 en 3' a un ADNc de la luciferasa de luciérnaga (luc+) y la señal de poliadenilación. Diversos fragmentos del promotor I (ver *Material y Métodos*, figura 14) se insertaron en 5' al gen de la luciferasa.

Los resultados obtenidos en la transfección, por el método de la lipofección, de las líneas celulares NRK y H5-6 se muestran en la figura 77. La actividad promotora se expresa estandarizada con la actividad  $\beta$ -galactosidasa y con respecto al control negativo, el pGL3-Enhancer. Como control positivo del ensayo se empleó el plásmido pGL3-Control, el cual lleva el promotor y el enhancer del SV40, de manera que la expresión de la luciferasa es alta en muchos tipos celulares de mamíferos (223).

La H5-6 presenta, en general, actividades transcripcionales menores a las de la NRK.

Las construcciones con mayor tasa de expresión fueron la pGL3/226-5 y la pGL3/30-7, mientras que la pGL3/229-5 presentaba una mayor tasa de expresión que la pGL3/222-5, pero menor que las otras dos.



**Fig. 77.**

*Actividad promotora en las dos líneas celulares estudiadas de los fragmentos de la región 5' del promotor I del gen de la GGT de rata clonados en pGL3. "Control células": células mantenidas en medio sin suero durante el tiempo que duró la transfección. Las actividades luciferasa, estandarizadas con la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se expresan con respecto al control negativo, al que se asignó el valor uno. Los resultados fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) al comparar los datos entre células H5-6 y de NRK.*

Al comparar las construcciones pGL3/226-5 y pGL3/30-7, se observó un comportamiento diferente: mientras en la NRK aumentó significativamente la actividad promotora al aproximar la región de inicio de la transcripción a la secuencia de -765 a -508 (construcción pGL3/30-7), en la H5-6, disminuyó.

El fragmento 229-5 posee una baja actividad promotora con respecto a las construcciones pGL3/30-7 y pGL3/226-5, efectuando la comparación dentro de cada una de las líneas de rata. Esto lleva a pensar en la presencia de algún elemento regulador negativo en la zona que se extiende desde -511 hasta -144, que vería potenciado su efecto en la construcción 222-5 por otro u otros elementos situados en la región de -765 a -514 pb (como se observa en la figura 77, la construcción pGL3/222-5 presenta la menor actividad promotora en ambas líneas). Estos elementos situados en la secuencia desde -765 a -514 pb no interfieren, sino que, incluso aumentan la actividad promotora en la línea NRK (como ya hemos indicado al comparar las construcciones pGL3/226-5 y pGL3/30-7); no obstante, en la línea H5-6 parece que sí que disminuye la expresión basal debida a la zona de inicio de la transcripción (comparar pGL3/226-5 vs. pGL3/30-7)

### 3.2.2 Efecto de la metilación

Se estudió también el efecto de la metilación en la actividad transcripcional de estos fragmentos. Para ello se metilaron las construcciones con la metilasa Sss I, como se ha descrito en *Material y Métodos*. Aunque los resultados obtenidos muestran una mayor actividad luciferasa (estandarizada y expresada con respecto al control negativo metilado) con los plásmidos que contenían los fragmentos 226-5 y 307, con respecto a los plásmidos pGL3/222-5 y pGL3/229-5, el efecto de la metilación de estas construcciones en cada una de las líneas de rata estudiadas fue diferente.

En general, se observó que los plásmidos metilados presentaron una actividad transcripcional menor a la de los plásmidos sin metilar en las células NRK, mientras que en las células H5-6 se comportaron a la inversa.

Analizando cada una de las construcciones metiladas transfectadas en las células NRK se obtuvieron los siguientes resultados (fig. 78):

- Los plásmidos pGL3/229-5 y el pGL3/30-7 metilados presentaron una disminución significativa de sus actividades promotoras con respecto a las de pGL3/229-5 y el pGL3/30-7 sin metilar, respectivamente.

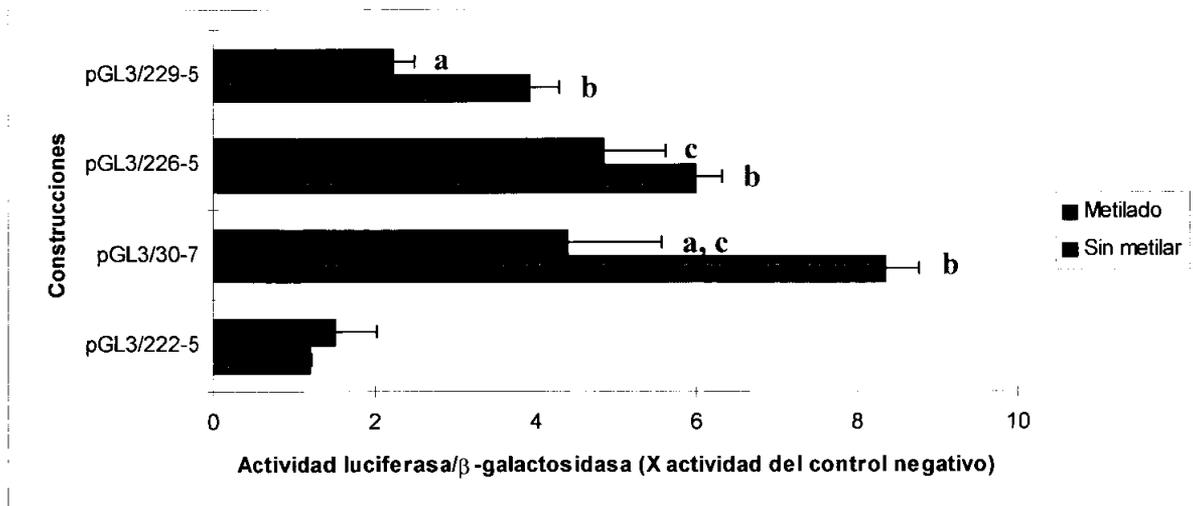
- El pGL3/222-5 y el pGL3/226-5 metilados no presentaron diferencias significativas entre sus valores de actividad y los de las respectivas construcciones no metiladas. Por lo tanto, la metilación no parece afectar a las actividades promotoras de éstas construcciones.

- La construcción pGL3/222-5 metilada es la que presentó menor actividad con respecto a las otras construcciones metiladas, a excepción del plásmido pGL3/229-5 metilado (ver en la figura el resultado del tratamiento estadístico).

Para el caso de las células H5-6 se observan los siguientes resultados (fig. 79):

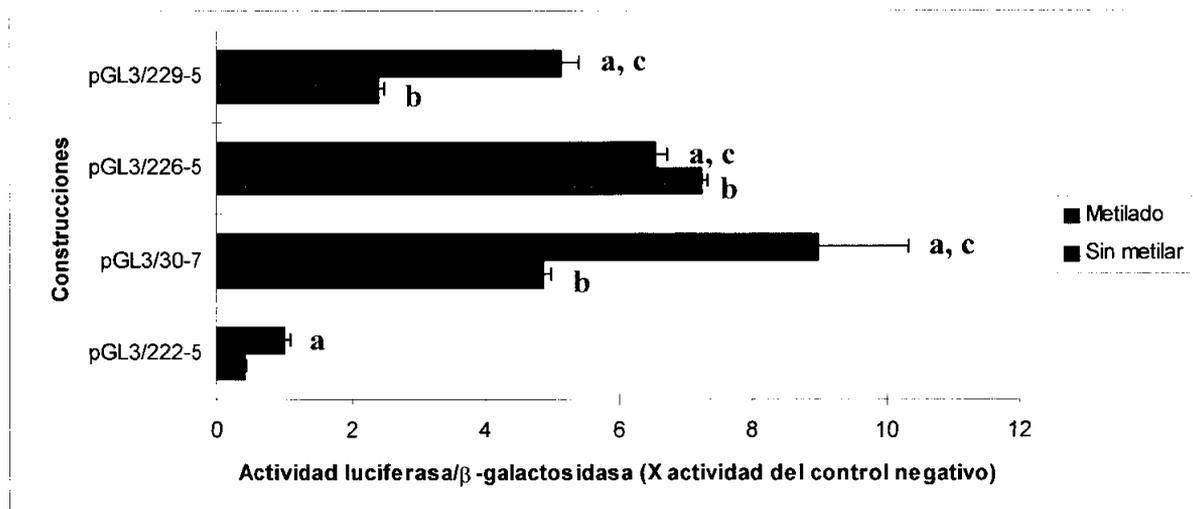
- En primer lugar, todas las construcciones metiladas (pGL3/229-5, pGL3/226-5, pGL3/30-7 y pGL3/222-5) presentaban diferencias significativas de actividad promotora con respecto a sus respectivas construcciones no metiladas. Las construcciones pGL3/229-5, pGL3/30-7 y pGL3/222-5 metiladas mostraron una actividad luciferasa estandarizada mayor que la de las respectivas construcciones no metiladas: aproximadamente del doble. Esta diferencia de actividades era más significativa en el caso de los plásmidos pGL3/229-5 y pGL3/30-7. Para el pGL3/226-5 la actividad promotora era ligeramente, aunque significativamente, mayor para la construcción no metilada que para la metilada.

- Las construcciones pGL3/229-5, pGL3/226-5 y pGL3/30-7 metiladas presentaron actividades significativamente mayores que la actividad promotora de la construcción pGL3/222-5 metilada.



**Fig. 78.**

Actividad promotora de las construcciones metiladas y sin metilar en la línea NRK. Las actividades luciferasa, estandarizadas con la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se expresan en tanto por uno del control negativo metilado para las construcciones metiladas y del control negativo sin metilar para las no metiladas. Las barras que muestran letras fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) al comparar: **a)** datos de una misma construcción metilada y sin metilar; **b)** datos de construcciones sin metilar con respecto a pGL3/222-5 sin metilar; **c)** datos de las construcciones metiladas con respecto a la pGL3/222-5 metilada.



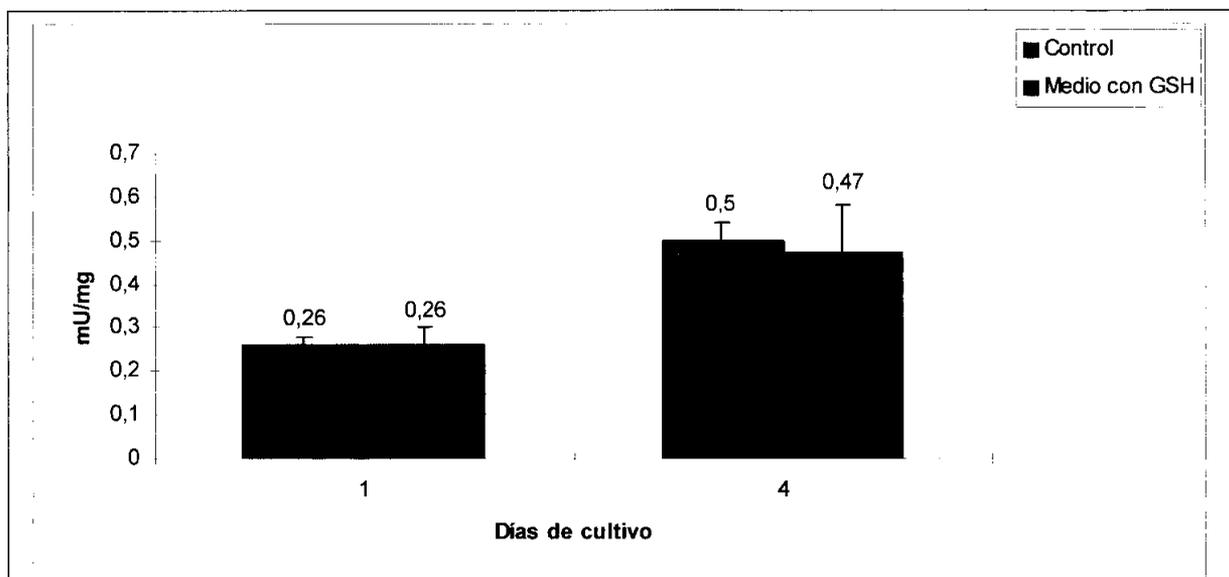
**Fig. 79.**

Actividad promotora de las construcciones metiladas y sin metilar en la línea H5-6. Las actividades luciferasa, estandarizadas con la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se expresan en tanto por uno del control negativo metilado para las construcciones metiladas y del control negativo sin metilar para las no metiladas. Las barras que muestran letras fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) al comparar: **a)** datos de una misma construcción metilada y sin metilar; **b)** datos de construcciones sin metilar con respecto a pGL3/222-5 sin metilar; **c)** datos de las construcciones metiladas con respecto a la pGL3/222-5 metilada.

### 3.3 EFECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS EN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GGT DE RATA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE RATA

#### 3.3.1 Actividad GGT en células cultivadas en presencia de GSH, dexametasona o SAM

Se cultivaron células de la línea NRK en medio DMEM completo suplementado con 0,001 g/l de GSH con el fin de ver si aumentaba la actividad GGT en una línea que se caracteriza por expresar niveles bajos de esta enzima y tener un crecimiento muy rápido. Se eligió esta concentración final de GSH porque es la concentración presente en el medio RPMI-1640, que es el empleado para mantener la línea H5-6. Como se observa en la figura 80, los valores en los controles (sin GSH) y en placas con medio suplementado con GSH, son iguales, observándose en ambos casos, un discreto aumento en la expresión de la enzima, a lo largo del tiempo de cultivo, que no fue significativo ( $p < 0,05$ ).



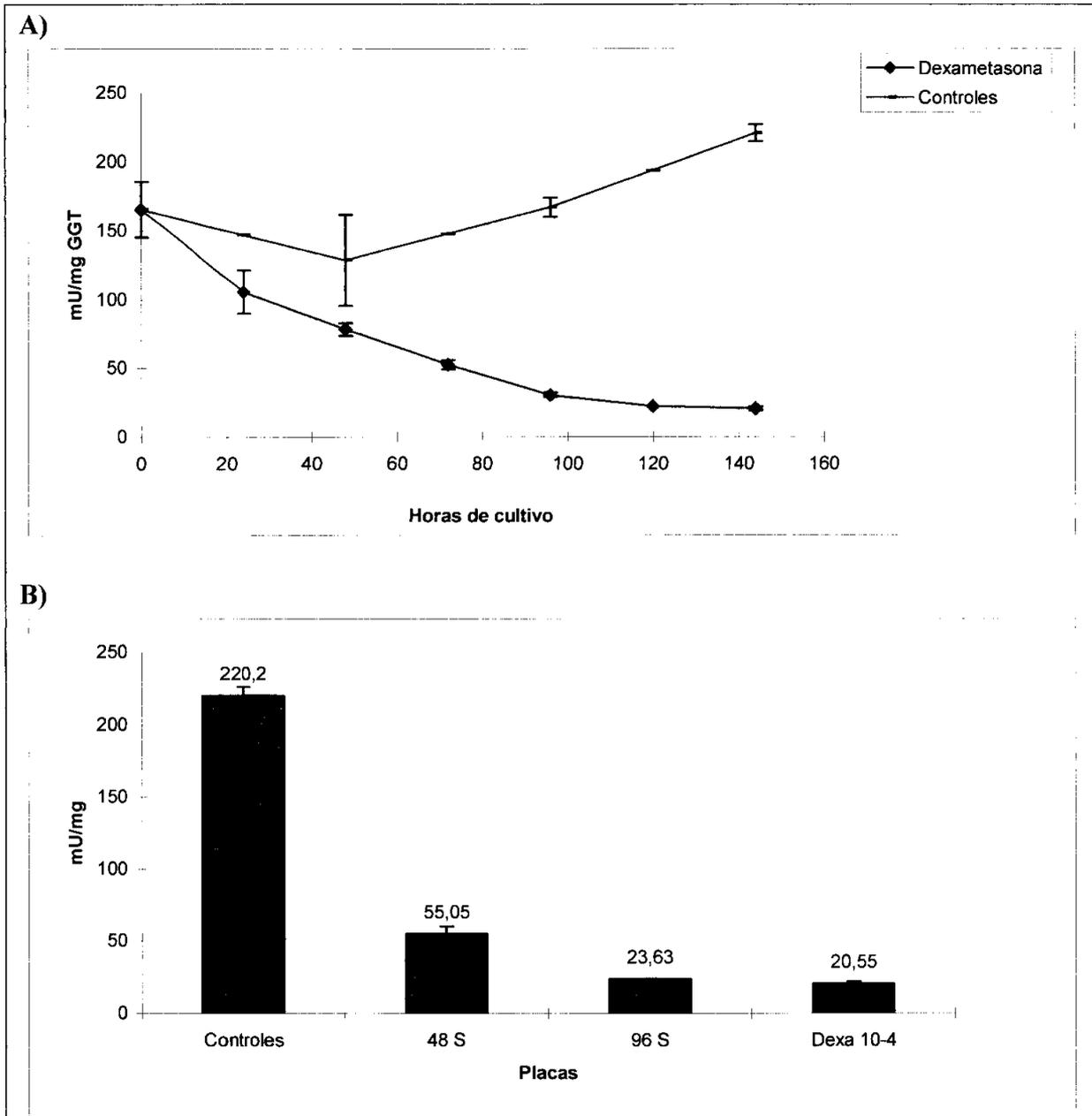
**Fig. 80.**

*Efecto de la presencia de GSH (0,001 g/l) en los valores de actividad GGT en células NRK al 1<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de cultivo. Las células se cultivaron en presencia o ausencia de GSH, durante todo el tiempo del ensayo.*

Por otro lado, células de la línea H5-6 se cultivaron en medio RPMI-1640 completo en presencia o ausencia de dexametasona  $10^{-4}$  M o SAM 1mM.

La dexametasona es un glucocorticoide sintético derivado del cortisol, cuyo mecanismo de acción viene mediado por la interacción con los receptores de glucocorticoides presentes en las células. Estos receptores poseen tres dominios: el que fija la hormona, el que se une al ADN y el que interacciona con la cromatina. El efecto final observado consiste en la represión o la inducción de la síntesis de una proteína. Esta diferencia en la acción nos llevó a ver cuál era el efecto que tenía sobre células con una actividad GGT alta.

Como se observa en la figura 81A, la actividad GGT aumentó en las placas control a lo largo del tiempo de cultivo, mientras que en presencia de dexametasona disminuyó, alcanzando un valor 10,7 veces menor que el valor del control al 6° día de cultivo:



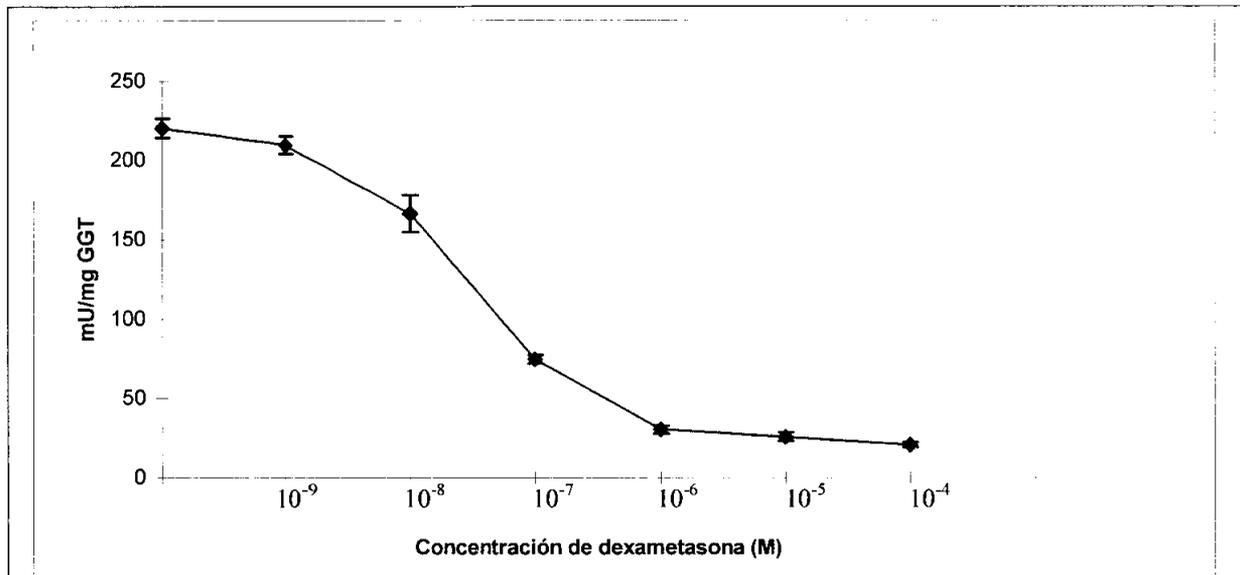
**Fig. 81.**

**A)** Actividad GGT en células de la línea H5-6 cultivadas en presencia (Dexa) y ausencia (controles) de dexametasona  $10^{-4}$  M. Al comparar los valores de actividad GGT de células tratadas con los de células controles se obtuvo que eran significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**B)** Comparación de la actividad GGT al 6° día de cultivo en placas tratadas con dexametasona durante las primeras 48 (48S) y 96 horas (96S) y transferidas a medio sin dexametasona hasta el 6° día de cultivo, con placas control y placas tratadas con dexametasona durante todo el periodo de cultivo (Dexa  $10^{-4}$ ).

Cuando células tratadas durante 48 horas, se pasaron a medio completo sin dexametasona, se observó una pequeña recuperación en los niveles de actividad GGT (fig. 81B: placas 48S) al final del periodo de cultivo (al 6° día). En las placas tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M durante las primeras 96 horas y después pasadas a medio sin dexametasona hasta el final del ensayo, no se observó una diferencia significativa en los valores de actividad enzimática al 6° día de cultivo con respecto a las células tratadas con dexametasona durante todo el periodo de cultivo (fig. 81B placas 96S).

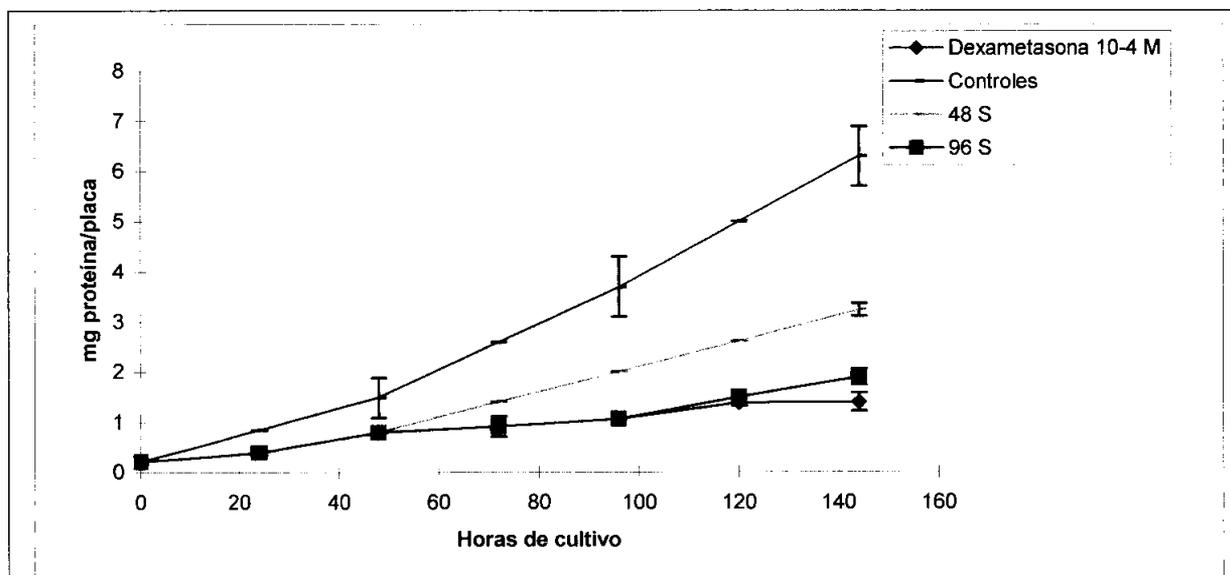
El efecto de la dexametasona era dependiente de la concentración, obteniendo el mayor efecto a concentraciones superiores a  $10^{-6}$ M (fig. 82):



**Fig. 82.**

*Curva dosis-respuesta: valores de actividad GGT en células H5-6 al 6° día de cultivo. Las células se cultivaron en presencia de la concentración de dexametasona indicada durante todo el tiempo del ensayo.*

Hay que señalar que las células experimentaban una clara inhibición o retardo en la velocidad de división, hecho que se pone de manifiesto en la gráfica de la figura 83, en la que se puede considerar la cantidad de proteína por placa como una aproximación al número de células presentes. En esta figura 83 también podemos observar cómo las células tratadas durante 48 horas con dexametasona y cultivadas en ausencia de esta sustancia durante el resto del periodo de cultivo (placas 48S), eran capaces de recuperar la capacidad de división celular, mientras que aquellas que estuvieron tratadas durante 96 horas no mostraron una diferencia significativa con las células que fueron tratadas con dexametasona durante los seis días de cultivo.



**Fig. 83.**

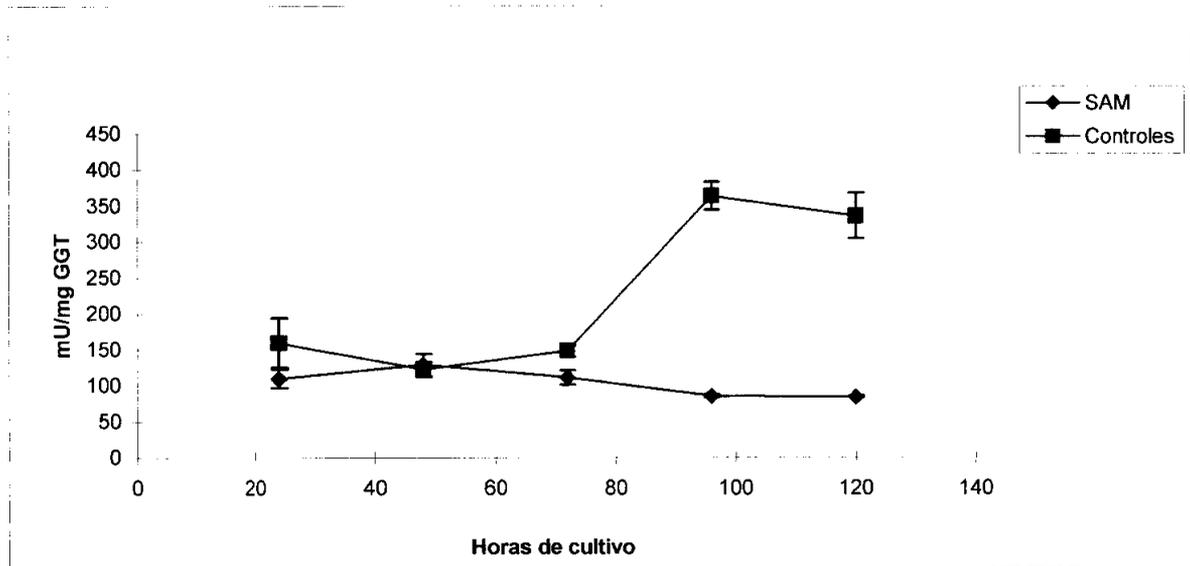
*mg de proteína/placa de preparados de células H5-6 controles y tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M durante todo el tiempo de cultivo, durante las primeras 48 horas (48S) o durante las primeras 96 horas (96S). Los valores de actividad a partir de las 72 horas fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí, a excepción de los valores de actividad obtenidos para la muestra 96S, que no eran significativamente distintos de los datos obtenidos para las placas cultivadas con dexametasona  $10^{-4}$  M durante todo el tiempo del ensayo (144 horas).*

La S-adenosilmetionina (SAM) es un compuesto fisiológico implicado en vías metabólicas como la transmetilación y la trans-sulfuración (224) y en biología molecular se emplea como agente metilante del ADN en reacciones catalizadas por metilasas nucleares.

Al cultivar células H5-6 en presencia de SAM 1 mM durante cinco días, se observó una disminución significativa de la actividad de la enzima con respecto a los controles (fig. 84): al 5° día de cultivo la actividad GGT en las placas tratadas con SAM 1 mM fue cuatro veces menor que la actividad obtenida en las placas control ese mismo día. En cuanto a las placas controles, se volvió a observar un aumento de la actividad GGT a lo largo del tiempo de cultivo.

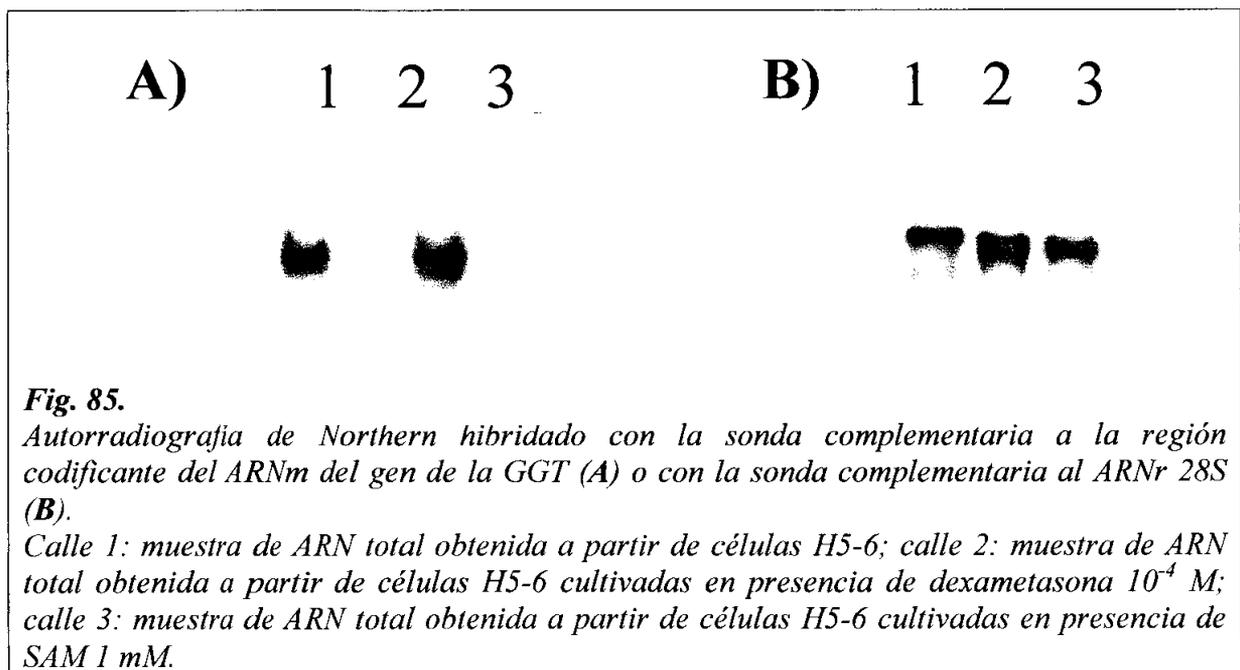
Con el fin de determinar si la disminución en la actividad enzimática observada en los tratamientos con dexametasona y SAM se debía a una inhibición a nivel de la transcripción se realizó un Northern con muestras de ARN total obtenidas a partir de células H5-6 cultivadas en presencia de dexametasona  $10^{-4}$  M o de SAM 1 mM durante días. La hibridación con una sonda de la región codificante del ARNm del gen de la GGT puso de manifiesto la presencia de ARNms de la GGT en las muestras procedentes de las células control y de las células cultivadas con SAM 1 mM, siendo la cantidad de transcritos obtenida para las células tratadas con SAM un 25% menor que la del control (cuantificado por DO); sin embargo, no se detectaron ARNms de la GGT en la muestra procedente de las células

cultivadas en presencia de dexametasona  $10^{-4}$  M (fig. 85A). Como control de la cantidad de ARN cargado en el gel se utilizó una sonda complementaria al ARNr 28S (fig. 85B), obteniéndose la misma señal en las tres muestras. Estos hechos demuestran que la disminución de actividad GGT observada en las células cultivadas en presencia de dexametasona era debida a una inhibición a nivel de la transcripción, mientras que la disminución de la actividad enzimática en las células cultivadas en presencia de SAM se produce por un mecanismo inhibitorio más general como es la metilación inespecífica del genoma celular.



**Fig. 84.**

Actividades GGT en células de la línea H5-6 cultivadas en presencia y ausencia de SAM 1 mM. Los valores de actividad para las células tratadas fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al valor obtenido para los controles, a partir de las 72 horas.



**Fig. 85.**

Autorradiografía de Northern hibridado con la sonda complementaria a la región codificante del ARNm del gen de la GGT (A) o con la sonda complementaria al ARNr 28S (B).

Calle 1: muestra de ARN total obtenida a partir de células H5-6; calle 2: muestra de ARN total obtenida a partir de células H5-6 cultivadas en presencia de dexametasona  $10^{-4}$  M; calle 3: muestra de ARN total obtenida a partir de células H5-6 cultivadas en presencia de SAM 1 mM.

### 3.3.2 Factores nucleares con actividad de unión a la secuencia diana presentes en extractos celulares de las líneas H5-6 y NRK

Extractos nucleares preparados como se indicó en *Material y Métodos* permitieron la realización de diversos ensayos con el fin de detectar la presencia de factores nucleares con actividad similar a los estudiados en los extractos hepáticos y renales.

En primer lugar, ensayos de CMG permitieron detectar actividad de unión al oligonucleótido JA/NJA-2 en las fracciones citoplasmáticas S-100 y en los extractos nucleares de las células NRK, H5-6 y H5-6 tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M (fig. 86A); incubando estas reacciones en presencia de 500 ng/calle de oligo JA/NJA-2 frío como competencia se pudo estudiar la especificidad de las uniones ADN-proteína al observar qué complejos eran eliminados por la competencia (fig. 86B):

\* En el extracto nuclear de células NRK se observaron dos complejos ADN-proteína: un complejo de igual movilidad que el obtenido con el extracto hepático y otro complejo de mayor movilidad; ambos complejos eran específicos ya que desaparecían en presencia de las competencias.

\* En la fracción S-100 de células NRK se observaron complejos de mayor movilidad que el obtenido con el extracto hepático.

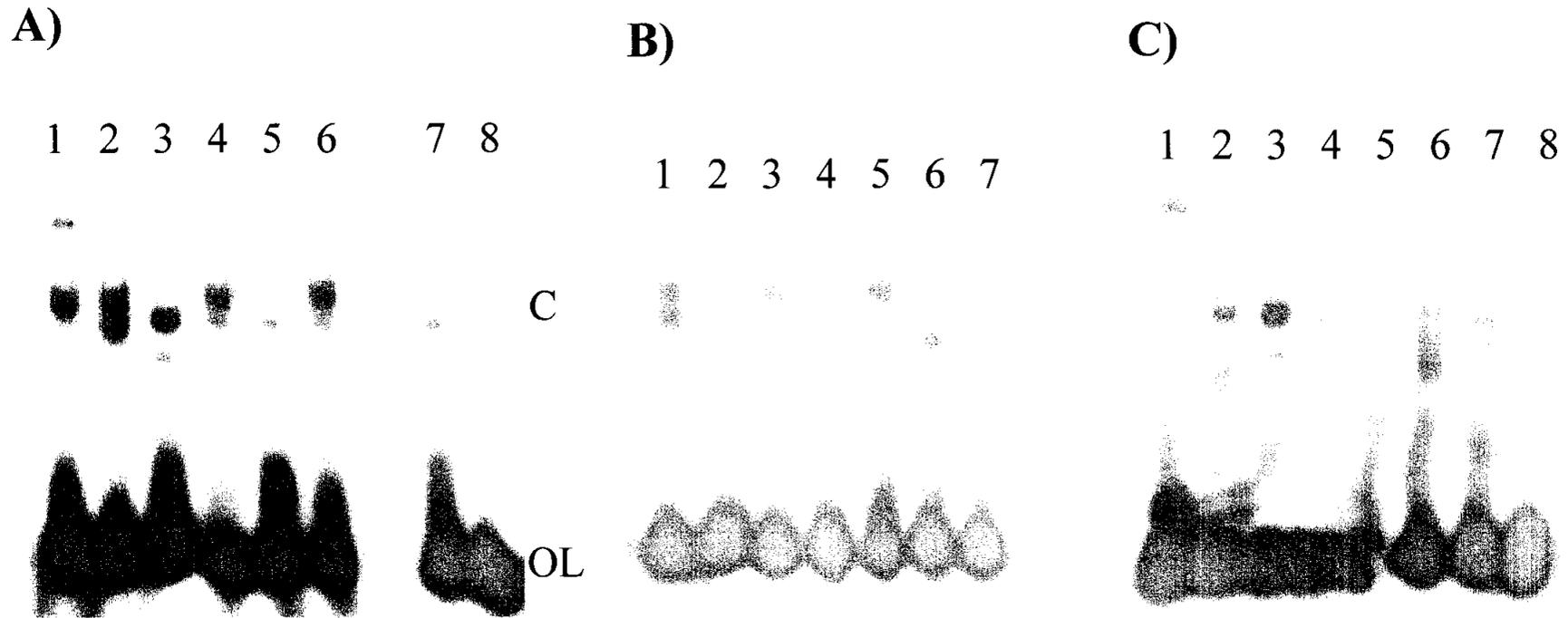
\* Con el extracto nuclear de células H5-6 se obtuvo un complejo idéntico en movilidad al obtenido en el extracto hepático y un pequeño complejo de mayor movilidad; ambos complejos eran específicos.

\* En la fracción S-100 de células H5-6 se observó un complejo similar a uno de los observados en la fracción S-100 de las células NRK, pero en menor cuantía.

\* En el caso del extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona se obtuvo el mismo patrón de complejos que con los extractos nucleares de células H5-6 sin tratar; sin embargo, aunque disminuía la intensidad de la banda con movilidad similar a la del complejo observado en los extractos hepáticos, se observaba un complejo inespecífico de mayor movilidad que aparecía al incubar la reacción de unión en presencia de competencia fría.

\* En la fracción S-100 de células H5-6 tratadas con dexametasona se obtuvo un patrón similar al obtenido con la fracción S-100 de células H5-6 sin tratar.

Cuando se empleó el oligo mutado JAM/NJAM se pudo observar como el extracto hepático no daba lugar a ningún complejo definido, sin embargo, en los extractos nucleares de células se observaban complejos de mayor movilidad y prácticamente no se observaba el complejo de movilidad similar al obtenido con extractos hepáticos (comparar calles 1, 2, 4 y 6 de la fig. 86C, con calles 1, 2, 4 y 6 de la fig. 86A). Para las fracciones S-100 se obtenía el mismo patrón de complejos inespecíficos que se obtenía con el oligo JA/NJA-2 (comparar calles 3, 5 y 7 de la fig. 86C, con calles 1, 3 y 5 de la fig. 86A).



**Fig. 86.**

**A) y C):** Ensayo de CMG: de 3 a 7  $\mu$ l de muestra se incubaron con oligo JA/NJA-2 marcado (A) o con oligo JAM/NJAM marcado (C) según las condiciones descritas en "Material y Métodos".

Calle 1: extracto nuclear hepático; calle 2: extracto nuclear de células NRK; calle 3: fracción S-100 de células NRK; calle 4: extracto nuclear de células H5-6; calle 5: fracción S-100 de células H5-6; calle 6: extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M; calle 7: fracción S-100 de células H5-6 tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M; calle 8: reacción control sin muestra.

**B)** Ensayo de CMG en las condiciones anteriores y empleando 500 ng/calle de oligo JA/NJA-2 frío como competencia fría (Cf).

Calle 1: extracto nuclear de células NRK; calle 2: extracto nuclear de células NRK con (Cf); calle 3: extracto nuclear de células H5-6; calle 4: extracto nuclear de células H5-6 con (Cf); calle 5: extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M; calle 6: extracto nuclear de células H5-6, tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M, con (Cf); calle 7: reacción control sin muestra.

C: complejo ADN-proteína; OL: oligo libre.

En cuanto a la actividad de unión detectada en los extractos nucleares de estas células, hay que señalar que se observó la presencia de barrera a la Exo III en la hebra codificadora de la sonda 225-1, en todos los extractos nucleares, tanto con máximo volumen de muestra (3  $\mu$ l) (fig. 87A) como con igual cantidad de proteínas (9  $\mu$ g) (fig. 87B); como se puede observar, no hubo diferencias entre los extractos nucleares de las células H5-6 y los extractos nucleares de las células H5-6 tratadas con dexametasona (calles 4, 6, 8 y 9, fig. 87A y calles 4 y 5, fig. 87B). Por otro lado, en las fracciones S-100 no se obtuvo barrera a la Exo III. El oligo JA/NJA-2 eliminó la barrera a la Exo III en todas las muestras en las que se empleó como competencia fría (fig. 87A).

Sin embargo, en los ensayos de protección a la digestión por DNasa I no se observaron ni la huella ni el sitio hipersensible que se obtenían en los extractos hepáticos (no se muestra la figura).

Por otro lado, mediante la técnica de ELUV se pudieron determinar los pesos moleculares aparentes de las proteínas con actividad de unión al oligonucleótido JA/NJA-2 y el empleo de competencias frías puso de manifiesto aquellos complejos que eran específicos (fig. 88). Teniendo en cuenta que el peso molecular del oligo empleado es de 12,2 kDa, se detectaron proteínas con pesos aparentes de:

- \* Extracto nuclear de células NRK: 80-90, 65-70, 40-45, 30-35 y 8-10 kDa; en presencia de competencia fría desaparecieron todas las bandas, incluido un complejo de 8-10 kDa.

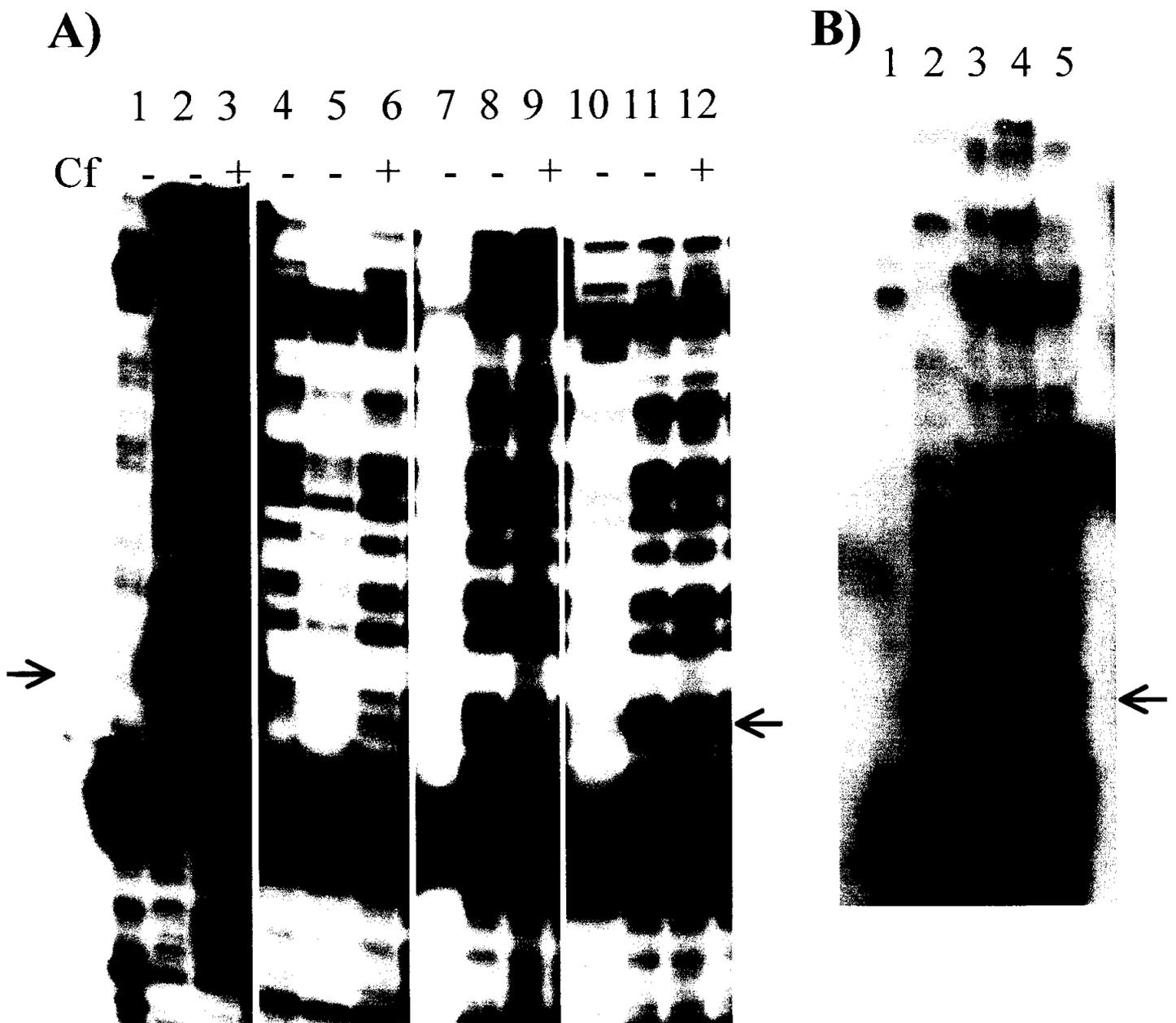
- \* Fracción S-100 de células NRK: 30-35 y 8-10 kDa.

- \* Extracto nuclear de células H5-6: 65-70, 40-45, 30-35 y 8-10 kDa; las competencias frías provocaron la desaparición de todos los complejos ADN-proteína.

- \* Fracción S-100 de células H5-6: 65-70, 40-45 y 30-35 kDa muy débilmente y 8-10 kDa.

- \* Extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona: no se observaron bandas claramente diferenciadas entre 90 y 30 kDa y no desaparecían con las competencias (a excepción de una banda a 65-70 kDa) por lo que se consideraron inespecíficas; se observaba la banda a 8-10 kDa, que sí desaparecía en presencia de competencia fría. En la reacción de unión en presencia de competencia se podía observar una banda a 113 kDa.

- \* Fracción S-100 de células H5-6 tratadas con dexametasona: 8-10 kDa principalmente; también bandas de proteínas de 80-90, 65-70, 40-45 y 30-35 kDa.



**Fig. 87.**

**A)** Ensayo de protección a la Exo III con la hebra codificadora y máximo volumen de muestra admitido por la reacción:

Calle 1: digestión control en ausencia de muestra; calles 2 y 3: 1  $\mu$ l de extracto nuclear hepático (114  $\mu$ g); calles 4: 3  $\mu$ l de extracto nuclear de células H5-6 (19,5  $\mu$ g); calle 5: 3  $\mu$ l de fracción S-100 de células H5-6 (24  $\mu$ g); calle 6: 3  $\mu$ l de extracto nuclear de células H5-6 (19,5  $\mu$ g); calle 7: 3  $\mu$ l de fracción S-100 de células H5-6 tratadas con dexametasona (16  $\mu$ g); calles 8 y 9: 3  $\mu$ l de extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona (9  $\mu$ g); calle 10: 3  $\mu$ l de fracción S-100 de células NRK (15,6  $\mu$ g); calles 11 y 12: 3  $\mu$ l de extracto nuclear de células NRK (16,9  $\mu$ g).

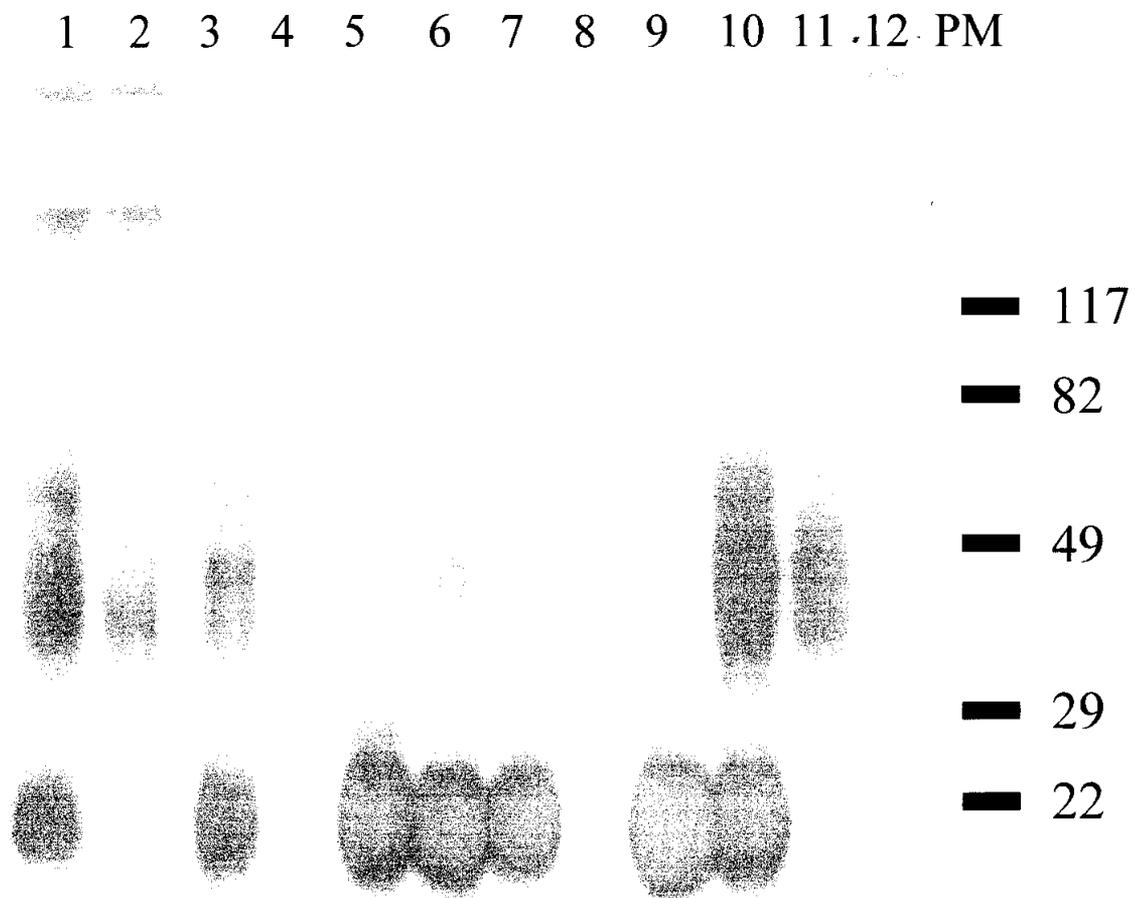
En la parte superior se indica la presencia de competencia fría (Cf: 300 ng/calle de oligo JA/NJA-2 frío) en las reacciones.

Las flechas muestran la posición de la barrera a la Exo III.

**B)** Ensayo de protección a la Exo III con la hebra codificadora e igual cantidad de proteína (9  $\mu$ g de cada muestra) para todas las reacciones:

Calle 1: digestión control en ausencia de muestra; calle 2: extracto nuclear hepático; calle 3: extracto nuclear de células NRK; calle 4: extracto nuclear de células H5-6; calle 5: extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M.

La flecha indica la posición de la barrera a la Exo III.



**Fig. 88.**

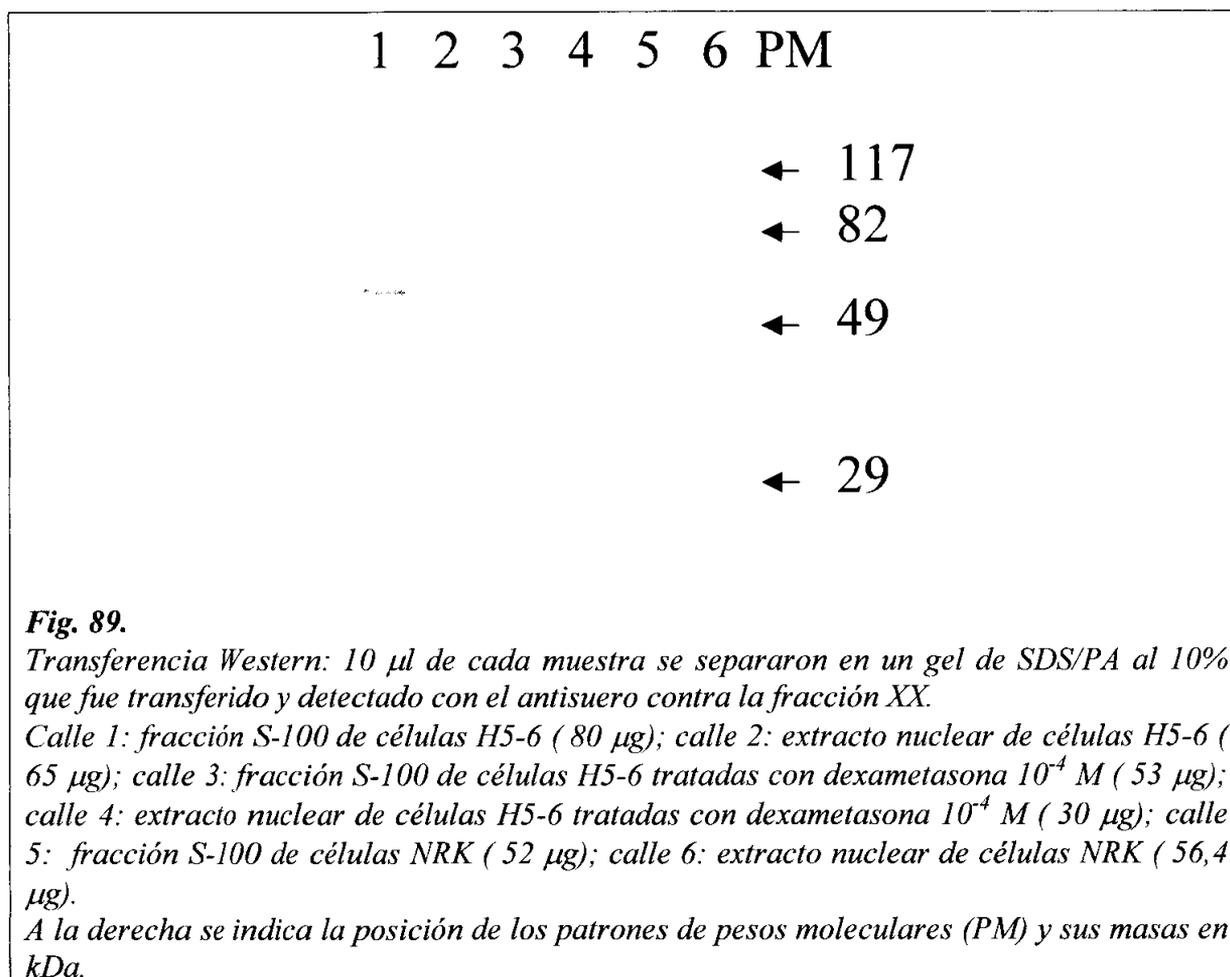
*Ensayo de ELUV: 1  $\mu$ l de extracto nuclear hepático, 3  $\mu$ l de extracto nuclear o fracción S-100 de las células NRK y 5  $\mu$ l de extracto nuclear o fracción S-100 de las células H5-6 (tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M) se sometieron al ensayo de ELUV, separando los complejos ADN-proteína obtenidos en un gel de SDS/PA al 15%. Como competencia fría (Cf) se emplearon 500 ng/calle de oligonucleótido JA/NJA-2 frío.*

*Calle 1: extracto nuclear hepático; calle 2: extracto nuclear hepático con (Cf); calle 3: extracto nuclear de células NRK; calle 4: extracto nuclear de células NRK con (Cf); calle 5: fracción S-100 de células NRK; calle 6: extracto nuclear de células H5-6; calle 7: fracción S-100 de células H5-6; calle 8: extracto nuclear de células H5-6 con (Cf); calle 9: fracción S-100 de células H5-6, tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M; calle 10: extracto nuclear de células H5-6, tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M; calle 11: extracto nuclear de células H5-6, tratadas con dexametasona  $10^{-4}$  M, con (Cf); calle 12: reacción control sin muestra.*

*A la derecha se indica la posición de los patrones de pesos moleculares (PM) y sus masas en kDa.*

Finalmente, se efectuaron ensayos de transferencia Western (fig. 89) en los que se cargó el máximo volumen en los pocillos (10  $\mu$ l; en la figura se indican los  $\mu$ g de proteína cargados en cada pocillo), encontrándose bandas mayoritarias con pesos moleculares aparentes de:

- \* 75 kDa, 65-68, 45-43 y 29 kDa en la fracción S-100 de células H5-6;
- \* 100 y 45-43 kDa en el extracto nuclear de células H5-6;
- \* 75, 65-68, 45-43 y 29 kDa en la fracción S-100 de células H5-6 tratadas con dexametasona;
- \* 100 y 45-43 kDa en el extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona;
- \* 75 y 65-68 kDa en la fracción S-100 de células NRK;
- \* 100 y 45-43 kDa en el extracto nuclear de células NRK.



Para comparar la riqueza de las muestras nucleares y citoplasmáticas, en cada una de las proteínas observadas en el ensayo de la figura 89, se cargó la misma cantidad de proteína por pocillo (30 µg/pocillo) encontrándose que (fig. 90):

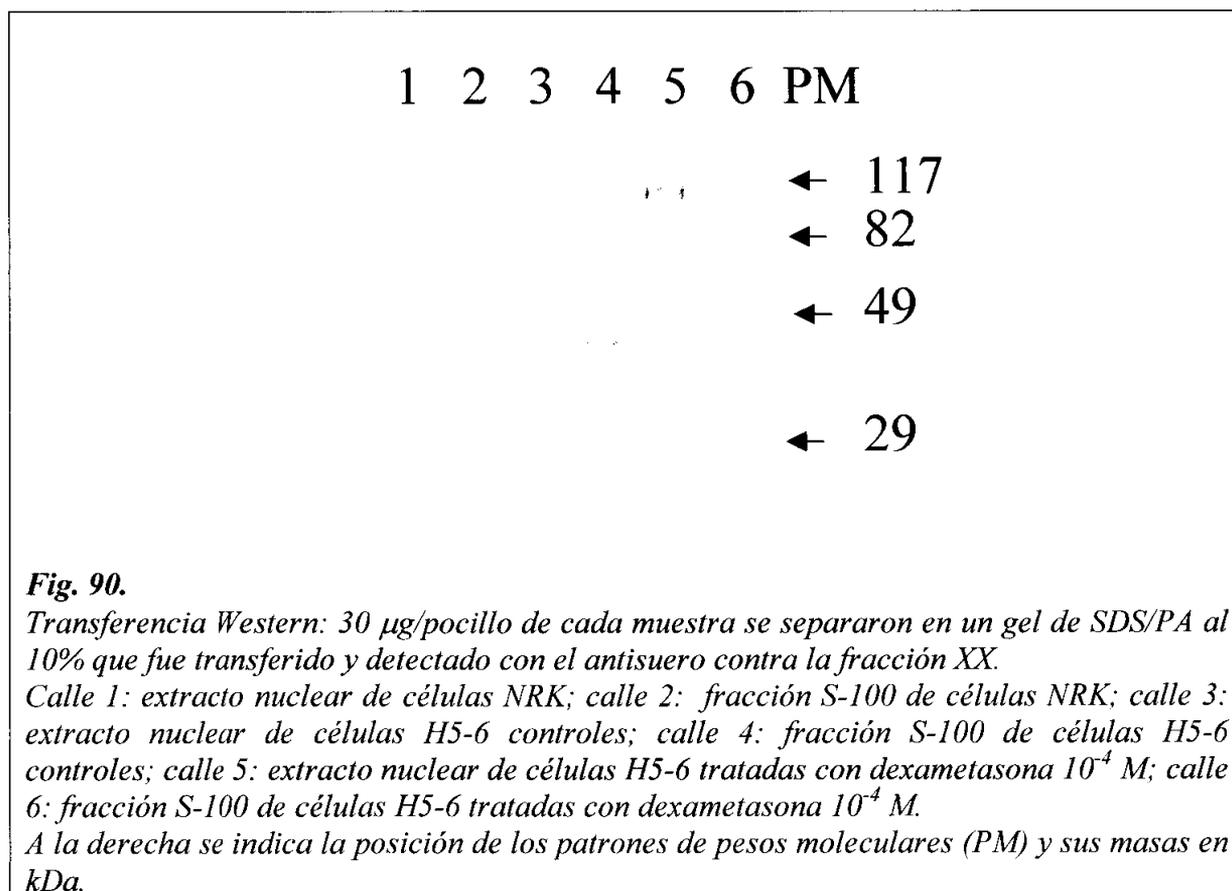
\* La muestra más rica en proteínas era el extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona, mientras que en el extracto nuclear de células NRK no se observaron las bandas detectadas en la figura 89;

\* La banda de 100 kDa sólo se detectó en el extracto nuclear de células H5-6 tratadas con dexametasona.

\* La banda de 45-43 kDa se detectó en las fracciones citoplasmáticas y extractos nucleares de las células H5-6 controles y tratadas con dexametasona.

\* Se detectaron bandas de 75 y 65 kDa en las fracciones S-100 de células NRK, H5-6 controles y H5-6 tratadas con dexametasona.

Por lo tanto, las diferentes líneas celulares difieren en cuanto a la riqueza de proteínas nucleares. También se puede observar cómo la presencia de dexametasona en el medio de cultivo provoca un cambio cualitativo y cuantitativo de la composición de las proteínas nucleares en la línea celular H5-6.





## **DISCUSIÓN**



Como ya se ha comentado en la introducción, la expresión del gen de la GGT varía tanto con la etapa de desarrollo como entre diferentes tipos celulares, encontrándose también variaciones en función del estado fisiológico o patológico. En la rata se trata de un gen de copia única para el que se han descrito varios promotores. De estos promotores, la expresión del promotor I se ha relacionado con el grado de metilación del ADN y la presencia de factores específicos de tejido (221,225). En esta Tesis se han estudiado actividades nucleares con capacidad de reconocimiento y unión a secuencias presentes en este promotor y se ha analizado la actividad transcripcional de esta región reguladora.

## PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES NUCLEARES

En este laboratorio se detectaron en extractos hepáticos, factores nucleares con actividad de unión específica a la secuencia que se extiende desde -560 hasta -600 en el promotor I del gen de la GGT de rata (221). Cuando se emplearon oligonucleótidos con la secuencia que se extiende desde -585 a -566 (oligonucleótido JA/NJA-2 conteniendo la secuencia diana) se obtuvo un patrón de complejos ADN-proteína en ensayos de CMG que difería del obtenido al emplear un oligonucleótido (JA/NJA-3) con la secuencia adyacente de -601 a -586 (fig. 24, calles 1-6); esta actividad con unión al oligo JA/NJA-3 demostró ser específica en ensayos de competencia, lo que indicaba la existencia de otras proteínas diferentes con actividad de unión a una de las secuencias GAG descrita por Kurauchi et al. (164) en el promotor I. Sin embargo, al emplear oligos con la secuencia diana mutada (oligo JAM/NJAM), no se obtuvieron bandas definidas de complejos ADN-proteína (fig. 24), lo que indica la elevada especificidad de la unión de estas proteínas al ADN. Mediante ensayos de protección a la DNasa I y a la Exo III se observó que la zona de unión de estas proteínas se extendía desde -595 a -566 (fig. 25). La presencia de diferentes actividades de unión al promotor I de la GGT de rata motivó el **fraccionamiento cromatográfico** de las proteínas presentes en extractos nucleares hepáticos con unión a la secuencia del oligonucleótido JA/NJA-2 (fig. 26).

En una primera aproximación se realizó una cromatografía a través de una columna de Heparina-Sefarosa, obteniéndose las proteínas con actividad de unión a la secuencia de -585 a -566, en la fracción H2 (fig. 27B). Ensayos de competencia permitieron comprobar que la unión a la secuencia diana de estas proteínas presentes en la fracción H2 era específica (fig. 29, calles 1 y 2). Puesto que existe una caja CG degenerada para el factor Sp1 en la zona de la secuencia diana, se decidió descartar, mediante ensayos de CMG, que alguna de las proteínas activas presentes en esta fracción cromatográfica fuera el factor Sp1: el complejo obtenido al incubar factor Sp1 puro con el oligo JA/NJA-2 presentaba una movilidad diferente a la del complejo obtenido con la fracción H2, por lo que se eliminaba la posibilidad de que la actividad de unión observada a la secuencia diana en extractos hepáticos se debiera a la presencia de factor Sp1 (fig. 27C).

Esta fracción H2 se cromatografió, en presencia de NP-40 al 0,1% (para eliminar uniones inespecíficas), a través de una columna de ADN-Sefarosa, obteniéndose las proteínas activas en las fracciones D1 y D2 (fig. 28B). Puesto que ambas fracciones activas presentaban la misma barrera a la Exo III y el sitio hipersensible a la DNasa I (figs. 32A y C), pero la zona protegida de la digestión por la enzima se detectaba mejor en la fracción D1 (fig. 32C) y la obtención de complejos ADN-proteína con el oligo JA/NJA-2 era más evidente con la fracción D1 que con la D2 (comparar calles 2 y 3 en la fig. 28C), se decidió proseguir el

estudio con la fracción D1, efectuando un fraccionamiento a través de una columna de afinidad con el oligo JA/NJA-1 como ligando activo. Sin embargo, las fracciones obtenidas (serie A) carecían de actividad de unión al ADN (fig. 30B). Se consideró la posibilidad de que se hubieran separado en diferentes fracciones las proteínas y cofactores necesarios para el reconocimiento y/o estabilización de la unión al ADN; por este motivo, se reunieron las fracciones obtenidas de esta columna y se volvieron a cromatografiar efectuando una única elución a 2M en KCl (serie S). Sin embargo, se obtenía un complejo ADN-proteína, en ensayos de CMG con el oligo JA/NJA-2, que presentaba una movilidad diferente a la de los complejos obtenidos con las fracciones H2 y D1 y este complejo era eliminado tanto por un exceso molar de ADN heterólogo, como por la competencia fría del oligo JA/NJA-2 (fig. 31B). Además, no se obtuvo ni barrera a la Exo III (no se muestra figura) ni sitio hipersensible ni huella en los ensayos con DNasa I (fig. 32D, calle3).

Con el fin de descartar la posibilidad de que la columna de afinidad con el oligonucleótido fuera la causa de la inactivación de las muestras, se procedió a cromatografiar la fracción H2 directamente: si la inactivación de los factores proteicos se debía a proteasas inespecíficas presentes en la muestra o en la columna, al emplear una fracción menos pura se conseguiría recuperar, al menos, parte de la actividad de unión debido a que las proteasas inespecíficas tendrían muchas otras proteínas sobre las que actuar. De este modo se obtuvo la serie C. Mediante ensayos de CMG se detectó actividad de unión en las fracciones obtenidas (fig. 31D) y se obtuvo el sitio hipersensible a la DNasa I y la huella de protección a la digestión de la enzima (fig. 32D, calle 5), pero no se observaba barrera a la Exo III (no se muestra figura).

En un intento de optimizar y mejorar el proceso se eliminó el fraccionamiento a través de la columna de ADN-Sefarosa. Se consideró que no aportaba una mejora en cuanto al grado de purificación y representaba una mayor manipulación de la muestra. Diversos autores han constatado la pérdida de actividad de factores nucleares en períodos más o menos cortos de tiempo, incluso conservando las muestras a  $-70^{\circ}\text{C}$ , cuando éstas sufrían sucesivos ciclos de congelaciones-descongelaciones (226). Además, al eliminar esta etapa de cromatografía se evitaba la posible separación de factores en diferentes fracciones.

El nuevo esquema de purificación (fig. 33) consistió en sucesivas cromatografías a través de la columna de afinidad con el oligonucleótido JA/NJA-2 como ligando activo (un oligo más corto para aumentar la especificidad frente al oligo JA/NJA-1 de la columna de afinidad anterior, puesto que se podía haber enriquecido las muestras S y C en otras proteínas con mayor afinidad por el ADN al emplear un oligo más largo) y empleando polidIdC o detergentes como el NP-40% con el fin de eliminar uniones inespecíficas a los oligos de la matriz de la columna. En el FT-XX se separó la actividad con unión a la secuencia adyacente de  $-586$  a  $-601$  (oligo JA/NJA-3), que se purificó, por cromatografía de afinidad, en la fracción E1/2. De este modo se consiguió obtener una fracción con actividad de unión específica (la fracción XX: fig. 34B, calle 4; fig. 34C, calles 8 y 9) que presentaba en geles de SDS/PA cuatro bandas de proteínas con pesos moleculares de 100, 70, 41 y 38 kDa (fig. 34D, calle 3). Dado que la otra fracción obtenida en esta purificación (la fracción XX1/2) también presentaba actividad de unión específica (fig. 34C, calles 10 y 11), pero su patrón en geles de SDS/PA era más complejo (observar en la figura 34D, calle 2, como se obtenían varias bandas, entre las cuales encontramos proteínas con pesos moleculares de 100, 70, 41, 32 y 28 kDa), se decidió fraccionarla varias veces consecutivas y en diferentes condiciones

(en presencia de poli(dIdC) o NP-40 al 0,1%) a través de la columna de afinidad con oligonucleótido JA/NJA-2. En primer lugar se efectuó una cromatografía en presencia de polidIdC (serie WW), obteniéndose una actividad que sólo mostró la presencia de sitio hipersensible a la DNasa I en ensayos de protección a la digestión por DNasa I pero no mostró la barrera a la Exo III. Sin embargo, se siguió obteniendo un patrón de bandas complejo al analizar la fracción activa en geles de SDS/PA (fig. 35C). A continuación se efectuó otro pase por la columna de afinidad empleando un mismo volumen de muestra activa WW1/2 pero en dos condiciones diferentes: con polidIdC (serie I) o con NP-40 al 0,1% (serie  $\alpha$ ). Como se puede observar al comparar las figuras 36 A y C, el empleo del detergente como agente eliminante de uniones inespecíficas se traduce en la obtención de perfiles de elución distintos que se reflejan en la obtención de una fracción  $\alpha$ 1/2 más enriquecida en ciertas bandas de proteínas con PM de 70, 64, 51, 46, 41 y 32 kDa (comparar la calle 3 de la figura 35C con las calles 5 y 6 de la figura 38). En un intento de mejorar la pureza de las fracciones obtenidas, se efectuó la cromatografía de la fracción  $\alpha$ 1/2 en presencia de polidIdC y NP-40 al 0,1% (serie  $\beta$ ) pero, el patrón de bandas en SDS/PA era similar y las proteínas obtenidas carecían de actividad de unión (fig. 37B), probablemente debido a las sucesivos ciclos de congelaciones-descongelaciones y al tiempo transcurrido.

La imposibilidad de separar estas bandas de proteínas llevó a concluir que las proteínas presentes en la fracción XX1/2 (y por ende, las de la fracción XX) formaban un complejo multimérico que se une a la secuencia de -585 a -566. Se han descrito muchos ejemplos de factores transcripcionales que están formados por diversas subunidades, unas con capacidad de reconocimiento y de unión al ADN y otras sin esta cualidad pero, capaces de interaccionar estableciendo uniones proteína-proteína (227).

La cantidad de proteína obtenida en las fracciones de las series I,  $\alpha$  y  $\beta$  con actividad de unión a la secuencia diana era tal que el seguimiento de la especificidad mediante ensayos de competencia no llevó a obtener resultados concluyentes, ya que, tanto con pequeñas cantidades de polidIdC como con cantidades de oligo frío, desaparecía, en la autorradiografía, la señal debida al complejo ADN-proteína (no se muestra figura). Por otro lado, tampoco se observó ni barrera ni huella o sitio hipersensible en ensayos de Exo III y DNasa I, respectivamente, en ninguna de las fracciones de las series I,  $\alpha$  y  $\beta$ .

Estos resultados nos decidieron a considerar a la fracción XX como la fracción activa más pura y como esquema definitivo de purificación la cromatografía de la mezcla dializada de extractos crudos hepáticos a través de la columna de Heparina-Sefarosa y el fraccionamiento de la fracción activa H2 obtenida en este primer paso de purificación, a través de la columna de afinidad con el oligo JA/NJA-2 como ligando activo (fig. 40). Se consideró la fracción XX como la más pura ya que es la fracción con actividad específica de unión al oligo JA/NJA-2, que presenta el menor número de bandas en geles de SDS/PA (bajo diferentes condiciones de purificación, siempre se acababan obteniendo cuatro bandas con pesos moleculares de 100, 70, 41 y 38 kDa; calle 3, fig. 34D) y mostró: actividad de unión específica en ensayos de CMG (calle 7, fig 34C), barrera a la Exo III y sitio hipersensible a la DNasa I (calle 8, fig. 39A; calle 7, fig. 39B); algunos autores han justificado con distintas razones la posibilidad de que una preparación contenga múltiples polipéptidos, como por ejemplo: que más de una proteína se una a la secuencia del oligonucleótido empleado como ligando en la columna de afinidad; que el factor sea multimérico; que exista en diferentes formas originadas, bien por corte y empalme alternativos de su transcrito de ARN, bien por

modificaciones post-traduccionales; etc. (228). Consideramos que se trata de varias proteínas que se unen a la secuencia diana del oligo formando un complejo multimérico y que se disocian debido a la concentración de KCl del tampón empleado para la elución de la fracción XX: 2M en KCl. Son numerosos los ejemplos descritos en la bibliografía sobre factores nucleares multiméricos, como todas aquellas proteínas para las que se ha detectado en su estructura el motivo de plegado de histona, que parece ser que permite la formación de interacciones proteína-proteína y proteína-ADN estables (227).

A continuación se llevó a cabo la caracterización de los factores purificados, empleando las fracciones H2 y XX. La fracción XX se empleó, también, para la obtención de anticuerpos contra las proteínas en estudio.

Los **pesos moleculares aproximados**, determinados mediante la **técnica de ELUV** (fig. 48), de los factores proteicos presentes en la mezcla dializada de extractos nucleares crudos que formaban complejos ADN-proteína fueron de 80-90 kDa, 65-70 kDa, 40-45 kDa, 30-35 kDa y 8-10 kDa; mientras que en la fracción H2 eran de: 80-90 kDa, 40-45 kDa y 30-35 kDa. Las proteínas de 8-10 kDa se separaban en la fracción H1. En la fracción XX no se apreciaban complejos ADN-proteína por esta técnica del ELUV, quizás debido a que la energía de la radiación empleada destruía o inactivaba estas proteínas al encontrarse más concentradas en una fracción más enriquecida; los pesos moleculares determinados para las proteínas presentes en la fracción XX1/2 fueron de 80-90 kDa, 40-45 kDa y 30-35 kDa. Obsérvese que las sumas de los pesos moleculares de unas bandas tienen por resultado los pesos moleculares de otras bandas:  $45 + 35 = 80$ ,  $40 + 30 = 70$ . Por lo tanto, las bandas de 40-45, 30-35 y 8-10 kDa podrían ser debidas a fragmentos de proteínas mayores (de 80-90 y 65-70 kDa) y que aún conservarían la capacidad de unirse al oligo con la secuencia diana.

Las bandas a 65-70, 40-45 y 30-35 kDa se corresponden con bandas mayoritarias de proteínas de los geles de SDS/PA teñidos con plata. Sólo la banda de 100 kDa observada en los geles SDS/PA teñidos con plata no se corresponde con ninguna proteína implicada en complejos ADN-proteína detectados por el ensayo de ELUV: puede ser que, al irradiarse con luz UV durante una hora (etapa necesaria en el ensayo de ELUV, ya que permite fijar las uniones ADN-proteína), la proteína de 100 kDa se degrade, por lo que, en el caso de que fuera activa, no diera complejo ADN-proteína en los ensayos de ELUV. Cuando se analizó el efecto de la temperatura (figs. 51 y 52) en los extractos nucleares, se vio que a tiempos largos de incubación a temperatura ambiente (25-30°C) llegaba a desaparecer esta banda a 100 kDa. También puede ocurrir que se hidrolice al contacto con el ADN: se trataría de un precursor que inmediatamente que se forma, pasa al núcleo; allí se rompe en las de 80-90, 65-70, 40-45, 30-35, 8-10 kDa (obsérvese que la suma de los pesos de las bandas pequeñas da como resultado los pesos moleculares de las bandas de mayor peso). Por tratarse de un precursor inactivo no formaría complejos con el oligo marcado. Hay muchas enzimas que se sintetizan como precursores inactivos (zimógenos o proenzimas) que posteriormente se activan por ruptura de uno o unos pocos enlaces peptídicos determinados. Esta activación es irreversible. La activación de proteínas por proteólisis específica es bastante frecuente en los seres vivos, por ejemplo, los enzimas digestivos y la cascada de la coagulación sanguínea. Por otro lado, a nivel nuclear, se ha descrito la hidrólisis de la proteína represora *lexA* durante la puesta en marcha de la respuesta SOS de reparación de ADN lesionado en procariontes; esta proteína *lexA* se encuentra unida al ADN reprimiendo la transcripción de determinados genes

necesarios para la reparación del ADN. Es un complejo de ADNss y la proteína recA el que hidroliza este represor, inactivándolo (229).

Los ensayos de ELUV con competencias (fig. 48) permitieron demostrar la especificidad de estos complejos. En el caso de la fracción H2 la disminución en la intensidad de la señal de las bandas de complejos ADN-proteína en presencia de competencias era mayor para la banda de 80-90 kDa y tanto para las hebras por separado como para el oligo de doble cadena. También se puede observar para la fracción H2, que la hebra no codificadora compete mejor que el oligo de doble cadena; este efecto puede deberse a que la proteína reconoce mejor esta secuencia o a que este oligo adquiere una estructura en solución más parecida a la que el factor reconoce en el ADN nuclear *in vivo*. Para la fracción XX1/2 se observa como la competencia fría provoca la disminución en la señal debida a los complejos ADN-proteína, aunque en menor grado que para la fracción H2. Esta situación puede deberse a que la fracción XX1/2, al estar más purificada, está más enriquecida en la proteína o proteínas en estudio, por lo que la cantidad de competencia añadida fue insuficiente para observar de modo más claro como disminuía la señal en presencia del oligo frío. Esta disminución de las señales de los complejos ADN-proteína en presencia de las competencias frías pone de manifiesto la especificidad de las uniones entre el ADN y los factores nucleares en estudio.

Las bandas de complejos de ADN-proteína en torno a los 40 kDa no se consideraron inespecíficas, aunque la disminución en la señal no sea tan grande como en el caso de la banda de 80-90 kDa; por lo tanto, en principio, podemos descartar la posibilidad de que se deban a la presencia en las muestras, de unas proteínas de unos 40 kDa que a veces copurifican durante las preparaciones de factores nucleares (230).

Además de llevar a cabo la purificación de la actividad de unión presente en los extractos nucleares hepáticos, **se caracterizaron algunos aspectos de esta interacción entre los factores nucleares y la secuencia diana** detectada en el promotor I del gen de la GGT de rata.

Empleando la fracción H2, y mediante el ensayo de interferencia por DMS, se pudieron determinar las **guanósinas** en la hebra codificadora **implicadas en la unión al ADN** (figs. 41 y 42): estas guanósinas se encontraban situadas entre las posiciones -566 y -578 pb del promotor I del gen de la GGT de rata. La mayor parte del genoma eucariota se encuentra en la forma B-ADN, en el que una vuelta de hélice abarca 10,4 pares de bases (229), que es la longitud de la secuencia de las guanósinas implicadas en la unión al ADN de las proteínas en estudio. Esto implica que las proteínas se unen al ADN envolviéndolo. Por otro lado, en esta región se encuentran dos secuencias repetitivas de pirimidinas-purinas (de -578 a -573 y de -570 a -576) que podrían dar lugar a segmentos de Z-ADN, para el que una vuelta de hélice implica 12 pares de bases; la transición de la forma B a la Z no es estable termodinámicamente, pero la metilación de las citosinas en el C-5 parece que favorece esta transición (229). La presencia de dos dinucleótidos CG en estas secuencias podría favorecer, cuando se metilaran, la forma Z-ADN; esta diferente conformación del ADN podría estar implicada en la ausencia de unión de los factores en estudio al ADN, ya que la hélice de ADN adquiere una forma más alargada, es levógira, el surco mayor es plano y el menor es mucho más estrecho y profundo que el de la forma B-ADN (229), de modo que las proteínas podrían no reconocer correctamente su secuencia.

Otro aspecto que estudiamos fue el **efecto de la metilación de las citosinas de los dinucleótidos CG de la secuencia** en la actividad de unión, ya que uno de los mecanismos descritos para explicar el silenciamiento de la transcripción es que ciertos factores reguladores no se unen a su secuencia diana, bien porque no reconocen su secuencia de unión al estar metilada o bien porque se han unido otras proteínas que reconocen ADN metilado.

La metilación del oligonucleótido JA/NJA-2 no provocó una clara desaparición de la señal obtenida en ensayos de CMG, obteniéndose el mismo tipo de complejo ADN-proteína que cuando se empleó el oligonucleótido JA/NJA-2 sin metilar (fig. 43A y B). Estos resultados implicarían que las proteínas en estudio no parecen ver afectada su actividad de unión cuando se metila su secuencia diana. Esta situación se ha descrito para otros factores transcripcionales, como el Sp1 (72). Sin embargo, no se pudo comprobar la metilación de los oligos empleados con las enzimas *Hpa II* y *Msp I*, ya que carecían de secuencias de corte para estas enzimas.

Cuando se incubaron extractos renales y hepáticos con la sonda 225-1 metilada se obtuvo un patrón de complejos ADN-proteína diferente del obtenido con la sonda sin metilar. Los ensayos con competencias pusieron de manifiesto la especificidad de las uniones (fig. 43C).

Como ya se indicó en la *Introducción*, se han caracterizado una serie de proteínas nucleares con actividad de unión a secuencias de ADN metilado MeCP-1 y MeCP-2 (59, 73, 75), MDBP-1 y MDBP-2 (76) y la histona H1 (74). Es posible que el diferente patrón de complejos obtenido con la sonda 225-1 metilada se deba a la presencia de estas proteínas en los extractos nucleares por las siguientes razones:

- Consideramos que los complejos obtenidos con el oligonucleótido y la sonda 225-1-T metilados se deben a estas proteínas con unión al ADN metilado porque en el ensayo de interferencia por DMS se pudieron detectar las G implicadas en la unión de las proteínas presentes en la fracción H2 porque el ADN metilado impidió la unión de las proteínas en estudio a su secuencia diana.

- Se observó que las proteínas implicadas en los complejos ADN metilado-proteína mostraban especificidad de unión en los ensayos con las competencias metiladas (disminuía la intensidad de los complejos obtenidos) y no metiladas (no se observó disminución en la intensidad de los complejos obtenidos).

Estas proteínas con afinidad al ADN metilado se unirían a la secuencia metilada al no haberse podido unir los factores en estudio (porque la metilación de las citosinas se lo impide) o debido a que su afinidad por la secuencia metilada fuera mayor que la de los factores en estudio, a los cuales desplazarían de su unión al ADN.

La unión de factores transcripcionales (FTs) al ADN no sólo se regula mediante modificaciones de las bases de los nucleótidos, sino también por modificaciones en la estructura de los propios factores nucleares. Por ejemplo, la **fosforilación** de proteínas es uno de los modos en que la célula regula la actividad de enzimas y FTs (36,37).

La fosforilación reversible de las proteínas es uno de los mecanismos más universales de control de procesos nucleares como la transcripción y la replicación del ADN, entre otros (231). El estado de fosforilación de residuos individuales suele estar controlado por diferentes proteín-quinasas y proteín-fosfatasas que actúan independientemente, asegurando una respuesta coordinada e integrada a señales de diverso origen.

Diversos autores han descrito factores transcripcionales que poseen una forma fosforilada nuclear y otra forma desfosforilada citoplasmática (40,41), aunque también se han descrito vías de activación por fosforilación en las que las quinasas implicadas son translocadas al interior del núcleo (por ejemplo, las MAPK (33)), en donde fosforilan los factores que tienen por diana, coexistiendo dos formas de estos factores en el núcleo: fosforilada y no fosforilada.

Se puede decir, en general, que la fosforilación activa, induce o potencia la unión de un factor de transcripción concreto a su secuencia diana (38,39). Por ejemplo, se ha observado que el factor Sp1 es una fosfoproteína cuyas actividades transactivadora y de unión al ADN están moduladas a través de una vía de transducción de señales dependiente de la PK-A y de AMPc (222).

Cuando se efectuó una reacción de fosforilación de las proteínas presentes en los extractos crudos y en la fracción H2, no se observó ninguna variación en la actividad de unión al ADN en ensayos de CMG y de protección a la digestión por DNasa I (figs. 44 y 45, respectivamente). Se podría pensar que en aquellas muestras más impuras, como extractos crudos nucleares o fracción H2, hay fosfatasas nucleares activas que eliminan los fosfatos que introduce la kinasa y que por eso no se observa ningún cambio en la actividad. Está claro que esta posibilidad es muy factible, en tanto en cuanto los ensayos de unión se hicieron con extractos crudos nucleares hepáticos y en el núcleo se localizan diversas fosfatasas, como las fosfatasas PP-1 y PP-2A (232). La PP-1, por ejemplo, es más abundante en el núcleo que en otros compartimientos celulares (233). Estas fosfatasas no actúan inmediatamente sobre sus sustratos, sino que hay un tiempo de latencia durante el cual los FTs fosforilados ejercen su función (unión al ADN, transactivación, etc.), de lo contrario resultaría del todo inútil que la célula fosforilara estos factores si inmediatamente los va a desfosforilar. Una de las evidencias experimentales que apoyan esta idea es la fase de atenuación de la respuesta a AMPc (de 4-6 horas) observada para la fosforilación del factor CREB y la transcripción génica inducida (34); esta fase de atenuación viene mediada por la actividad de fosfatasas nucleares como la PP-1. La PP-1 se sabe que posee diversas isoformas que poseen diferentes subunidades reguladoras que dictan la localización y la especificidad de sustrato de la subunidad catalítica (233); estas subunidades reguladoras podrían responder a señales extracelulares para regular la actividad de la fosfatasa, desencadenando un mecanismo regulador de la inducción de la expresión de genes (34). Beullens et al. identificaron varios polipéptidos inhibidores de la PP-1 en núcleos de timo bovino, como la proteína NIPP-1 (*nuclear inhibitory protein*), la cual inactiva a la fosfatasa PP-1 al formar un complejo con ella (232).

Sin embargo, ensayos de fosforilación de las proteínas de las muestras con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP permitieron comprobar que, efectivamente, las proteínas se fosforilaban, descartando la presencia de fosfatasas en las muestras. Podemos afirmar que:

- Aún cuando en los extractos hayan fosfatasas, también estarían presentes inhibidores de éstas, como NIPP-1 (los cuales, a su vez, están también controlados por quinasas y fosfatasas nucleares).

- La fase de atenuación por fosfatasas descrito para algunos FTs es de varias horas, y la reacción completa de fosforilación y unión al ADN se desarrolla durante una hora, al cabo de la cual se efectúa la separación de los complejos obtenidos por electroforesis.

- A pesar de que la reacción de fosforilación *in vitro* ocurre en un entorno que podríamos considerar fisiológico al emplear extractos crudos nucleares, faltan otros componentes del núcleo, como es la cromatina. Para el ejemplo comentado de la proteína PP-1, se ha visto que esta fosfatasa se localiza unida a cromatina (232), por lo que se considera a la cromatina como un reservorio de esta proteína.

Empleando  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP en reacciones de fosforilación de la fracción más pura, XX, no se observó ningún cambio en la movilidad de las cuatro bandas visualizadas mediante la tinción con plata de un gel de SDS/PA (fig. 47): las proteínas que se fosforilaban eran minoritarias y no se visualizaban con la tinción de plata del gel de SDS/PA correspondiente. Sólo una banda de 74 kDa de la fracción XX, observada en la tinción de plata del gel de SDS/PA en el que se separaron las proteínas presentes en esta fracción tras ser sometidas a una reacción de fosforilación con PK-A (fig. 47), coincide con una de las bandas de la autorradiografía correspondiente a ese gel; probablemente sea una pequeña fracción de la proteína de 70 kDa que, al fosforilarse no sufre un gran cambio en su movilidad electroforética: la incorporación de grupos fosfato a una proteína de un peso molecular entre 100 y 40 kDa no provoca, en las condiciones de separación empleadas, cambios grandes de la movilidad electroforética de las proteínas. En el caso del factor Sp1 se ha observado que migra como un doblete (234, 235). Al tratar la fracción H2 con PK-A no se observa la banda de 74 kDa ya que esta fracción es muy impura y no está tan enriquecida en esta proteína como lo está la fracción XX.

Estas observaciones experimentales nos llevan a considerar dos posibilidades:

(1) puesto que la adición de grupos fosfato a proteínas no ha modificado su movilidad electroforética y ninguna banda del gel de SDS/PA se corresponde con ninguna banda de la autorradiografía, concluimos que las proteínas en estudio no se fosforilan con la PK-A porque lo hacen por otro mecanismo diferente, por ejemplo: MAP-quinasas, quinasas dependientes de ADN, proteín-quinasa CK2, ... Es posible que la PK-A no sea capaz de fosforilar los factores nucleares en estudio, los cuales necesitarían una enzima más específica ya que, la PK-A introduce grupos fosfato en residuos de serina y treonina del motivo RRX (S/T) (236); si este motivo no está presente en los factores con actividad de unión a la secuencia diana, no hay fosforilación mediada por PK-A. Por otro lado, las proteínas pueden ser fosforiladas también en otros residuos, como histidinas y tirosinas (194).

(2) las proteínas de estos complejos ya están fosforiladas y no se desfosforilan mediante el tratamiento con CIP (fig. 59). Como consecuencia del tratamiento con fosfatasa alcalina y considerando que las proteínas estuvieran fosforiladas se esperaba una variación en su movilidad electroforética tras perder los fosfatos; hay proteínas que muestran mayores cambios en su movilidad electroforética después de ser desfosforiladas, mientras que otras

que se muestran como dobletes cuando están fosforiladas pasan a dar una sola banda (41). Sin embargo, no se observó ninguna variación en el comportamiento electroforético de las proteínas de la fracción H2 detectadas con anticuerpos tras su tratamiento con CIP. Algunos autores han observado que la fosfatasa alcalina tiene una mayor preferencia por residuos de fosfotirosina (237). Así pues, si las proteínas en estudio poseen los grupos fosfato unidos a residuos de serina y treonina principalmente, la desfosforilación no sería total y no se observaría un cambio apreciable en la movilidad al tratarlas con la fosfatasa alcalina.

En resumen, podemos concluir que: (1) las proteínas de 100, 70, 41 y 38 kDa observadas en la tinción de plata del gel de SDS/PA, en la fracción XX, no se fosforilan con la PK-A, a excepción de una fracción de la proteína de 70 kDa que parece fosforilarse con la PK-A dando lugar a una banda de proteína de 74 kDa; (2) las restantes proteínas fosforiladas son muy minoritarias; (3) el tratamiento con la CIP no provoca cambios en la movilidad electroforética de las proteínas; (4) la actividad de unión no se ve afectada por la fosforilación con PK-A.

Otra modificación post-traduccional que pueden sufrir los factores transcripcionales es la **glicosilación**, de la cual se conoce poco del papel real que puede ejercer en la actividad y en otros aspectos, como la localización, velocidad de degradación, etc., de los FTs. La mayoría de proteínas nucleares para los que se ha descrito una parte glucídica poseen residuos de N-acetil-glucosamina, aunque se han encontrado otros azúcares.

Con la WGA se detectaron proteínas glicosiladas con restos glucídicos de N-acetil-glucosamina en la fracción H2 (fracción muy impura en la que se encontraron proteínas glicosiladas con pesos moleculares aparentes de 117, 93, 88 y 65 kDa, similares a los de las proteínas de los complejos ADN-proteína de los ensayos de ELUV (cfr. figuras 44 y 60A)) y en la fracción purificada XX1/2 (con una banda de peso molecular de 70 kDa que se corresponde en peso con las de 70 kDa detectadas en las fracciones XX1/2 y XX en los ensayos de Western (cfr. figuras 49 y 60A)), pero en la fracción XX no se detectó ninguna proteína de la muestra con la WGA (fig. 60A, calle 3).

Con la Concanavalina A se detectaron bandas mayoritarias de proteínas glicosiladas con restos de  $\alpha$ -D-glucosa y  $\alpha$ -D-manosa, con PM aparentes de 98, 70, 50 y 37.5 kDa en la fracción H2 (fig. 60B, calle 5). No se detectaron proteínas glicosiladas con restos de  $\alpha$ -D-glucosa y  $\alpha$ -D-manosa en estas fracciones más puras.

En estos ensayos se empleó factor Sp1 como control (el cual fue detectado como una banda de 95 kD mediante el ensayo de la WGA, como cabía esperar, ya que posee residuos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente (45) permitió determinar la fiabilidad del ensayo. El hecho de que no se detectaran bandas en la fracción XX con la WGA, no indica necesariamente que no hubieran proteínas glicosiladas, ya que sólo una parte de las proteínas con este tipo de residuos glucídicos se une suficientemente fuerte a esta lectina (228) y en esta fracción hay tan poca proteína que podríamos estar por debajo de los límites de detección de la técnica.

Podemos concluir que la proteína de 70 kDa presenta restos glucídicos de N-acetil-glucosamina.

Respecto a la relación entre fosforilación y glicosilación, Kelly et al. (42) observaron que la subunidad grande de la RNAPolimerasa II presentaba residuos glucídicos en el dominio carboxi-terminal de la proteína que no estaba fosforilada, deduciendo que todas las proteínas que están glicosiladas son también, normalmente, fosfoproteínas y que estas modificaciones son excluyentes. En nuestro caso sólo se fosforiló con PK-A una pequeña fracción de proteína con un peso molecular de 74 kDa. Es probable que si los factores en estudio ya están mayoritariamente glicosilados, sólo se fosforilen en una pequeña proporción.

La obtención de anticuerpos contra la fracción XX (anticuerpos anti-XX) permitió plantear la realización de diferentes **inmunoensayos**.

En primer lugar, y como ya se indicó en el apartado de *Resultados*, el factor Sp1 no fue detectado específicamente por los anticuerpos obtenidos contra las proteínas de nuestras fracciones cromatográficas en ensayos de transferencia Western. Se consideró que el factor Sp1 no formaba parte de la actividad de unión que estudiábamos teniendo en cuenta que las reacciones cruzadas entre factores nucleares son elevadas (debido a la presencia de motivos estructurales similares) y que el factor Sp1 originaba complejos ADN-proteína diferentes a los de la actividad de unión presentes en las muestras activas.

En la siguiente tabla se resumen los pesos moleculares, en kDa, de las proteínas detectadas con los ensayos de Western y ELUV:

**Tabla 6.**

Muestra \ Técnica	ELUV	Western
Extracto nuclear crudo (M)	80-90, 65-70, 40-45, 30-35, 8-10	100, 67, 38
H2	80-90, 40-45, 30-35	100, 70
XX1/2	80-90, 40-45, 30-35	100, 70
XX	No se obtuvieron bandas	70

Mientras que en los ensayos de Western sólo detectamos proteínas, en los de ELUV detectamos proteínas activas (con actividad de unión al ADN); esta situación implica que, el hecho de no obtener proteínas con un peso molecular de 100 kDa en ensayos de ELUV (fig. 48), tanto en extractos hepáticos como en las fracciones H2 y XX1/2, signifique que las proteínas observadas en los ensayos de Western con peso molecular de 100 kDa no son activas. Como ya hemos comentado anteriormente (página 192), existen varias explicaciones acerca de esta banda de 100 kDa: o es una proteína inespecífica (reacción cruzada), o es una forma inactiva o es un precursor inactivo que se hidroliza generando proteínas de menor tamaño con actividad de unión a la secuencia diana del oligo JA/NJA-2; no puede tratarse de un dímero, ya que en los gels de SDS/PA las proteínas se mueven separadas en sus subunidades. Las bandas de proteínas con pesos de 67 y 38 kDa detectadas en los ensayos Western (fig. 49) pueden corresponderse con las de 65-70, 40-45 y 30-35 kDa detectadas en extractos hepáticos en los ensayos de ELUV (fig.48). Sin embargo, en ensayos de ELUV no

se obtienen proteínas de 70 kDa de peso en las fracciones H2 y XX1/2, mientras que en los Western sí; por tanto estas proteínas de 70 kDa no son activas. Obsérvese que la suma de las proteínas activas de menor peso (30 y 40 kDa) corresponde a estas proteínas de 70 y 100 kDa: es probable que estas proteínas de 100 y 70 kDa sean precursores inactivos que dan lugar a proteínas activas de menor peso molecular. Tampoco se puede descartar que se trate de proteínas más lábiles que se degradan por efecto de la radiación ultravioleta.

En la fracción XX sólo se obtuvo la proteína de 70 kDa en los ensayos Western y no se obtuvieron bandas de complejos ADN-proteína en los ensayos de ELUV; probablemente, la escasa concentración de proteína de la muestra sea la causa de que las proteínas activas presentes en ella (en ensayos de CMG se obtenían complejos ADN-proteína) se degraden por efecto de la radiación UV recibida durante el experimento de ELUV.

Se estudió el efecto de la **temperatura** en las proteínas de las fracciones cromatográficas ya que se observó que perdían actividad con el tiempo: se observó un aumento de bandas de peso molecular bajo en ensayos de Western. En concreto, los ensayos pusieron de manifiesto que sólo la banda de 100 kDa pareció verse afectada por la temperatura, ya que incubaciones de extractos crudos hepáticos a temperatura ambiente durante doce horas provocaban la desaparición de ésta en la detección con los anticuerpos (fig. 51). Este efecto era tanto más acusado cuanto más viejos eran los extractos nucleares, de forma que pasaba de ser un doblete (93-100 kDa) a ser una sola banda o incluso desaparecía (fig. 52). A la vez, se observaba un aumento de una banda de 60 kDa.

De este modo se planteó la posibilidad de que la temperatura provocara la hidrólisis o la inactivación de los factores presentes en las muestras. Algunos autores suelen recomendar que se eviten las congelaciones y descongelaciones de muestras del tipo de extractos nucleares (194), ya que es muy posible que las proteínas se inactiven, aunque esto es algo que depende de la naturaleza de cada proteína.

En ensayos de CMG en los que se realizaban las reacciones de unión empleando la fracción H2 en presencia de anticuerpos anti-XX no se observó *supershift*, tanto en geles de alta fuerza iónica (fig. 53) como en geles de baja fuerza iónica (fig. 54). Solamente se observó que mejoraba la resolución en la obtención de los complejos que se habían incubado en presencia del suero preinmune y del antisuero debido a que la albúmina del suero mejoraba la unión de las proteínas al ADN. Es más, parecía ejercer un efecto protector, ya que los complejos obtenidos en su presencia mostraban una mayor intensidad en la autorradiografía que el de la reacción control incubada el mismo tiempo y a la misma temperatura.

Esta ausencia de efecto podría explicarse por el hecho de que el epitopo estuviera implicado en la unión al ADN (es decir, el anticuerpo no se une porque si la proteína antigénica forma parte de un complejo y el epitopo queda oculto, el anticuerpo no puede reconocerla) y que la proteína poseyera una afinidad mayor por el ADN que por el anticuerpo. También podría ocurrir que al haber empleado una fracción poco pura existiera una reacción cruzada con alguna otra proteína o proteínas presentes en el extracto y que competirían por el anticuerpo.

Relacionado con la idea de la inactivación por la temperatura, en la reacción control (calle 1 de la figs. 53A y B) el complejo era menor cuando la fracción se había preincubado que cuando se añadía directamente a la reacción de unión. Como el tiempo de preincubación era de 30 minutos y el tiempo necesario para observar de modo apreciable la disminución de la banda de 100 kDa de los extractos crudos en los ensayos de Western era de doce horas, podemos suponer que primero ocurre una inactivación de los factores y, a tiempos más largos una hidrólisis o degradación de estos factores.

Las reacciones control de “blanco de anticuerpos” permitieron descartar la formación de complejos debidos a componentes del suero y los ensayos con competencias permitieron demostrar la especificidad de las uniones ADN-proteína (figs. 54A y B).

La **transferencia de complejos ADN-proteína** a una membrana de nitrocelulosa y posterior detección con anticuerpos anti-XX mostró la detección del complejo ADN-proteína del extracto hepático M y de la muestra FT-H, pero no se obtuvo señal para la fracción H2 pese a que sí se detectaba señal en la autorradiografía de la membrana correspondiente (fig. 55).

Cuando se efectuaron ensayos de CMG con diferentes cantidades de proteína o de oligo en la reacción de unión, la detección con anticuerpos anti-XX de la membrana a la que se habían transferido los complejos de los geles de acrilamida al 4% correspondientes, mostró una correlación directa entre la cantidad de proteína o de oligo (por tanto, de complejo) y la señal obtenida (figs. 56 y 57). Estos ensayos permitieron verificar que la proteína no unida al ADN, es decir, aquella que no forma complejos, posee una movilidad electroforética tal que se mueve con el frente en las condiciones de estos ensayos y que la proteína detectada en los complejos está toda unida al ADN. Por lo tanto, el hecho de que se detectaran con anticuerpos los complejos obtenidos con el extracto nuclear, pero no con la fracción H2 no se debe a la presencia de proteína libre en las reacciones con el extracto M, sino a que hay alguna interferencia en el reconocimiento de la proteína en la fracción H2 por los anticuerpos cuando el ADN está presente, lo que explicaría también que no se obtuviera un *supershift*. Estas interferencias podrían ser, por ejemplo: el epitopo queda oculto; la proteína pierde afinidad por los anticuerpos debido a impedimentos estéricos, cambios conformacionales, hidrólisis, etc.

Al efectuar transferencias a membrana de ensayos de ELUV, se estaba trabajando en unas condiciones que permitían detectar en la membrana todas las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-XX y relacionar las bandas detectadas en la membrana con aquellas obtenidas en la autorradiografía de la membrana (siendo las bandas obtenidas en la autorradiografía correspondientes a proteínas unidas al oligo JA/NJA-2). En la membrana se detectaron bandas con pesos moleculares de 80, 67 (banda mayoritaria), 57 y 30 kDa en las muestras del extracto hepático, FT-H y H2 (fig. 58); en la fracción H1 no se detectaron proteínas con los anticuerpos anti-XX. Al comparar las bandas detectadas mediante el ensayo de ELUV con las bandas de fracción H2 separada en el gel de SDS/PA sin reacción previa de ELUV (fracción H2 nativa), se observó que la movilidad de la banda de 70 kDa de la fracción H2 nativa era muy similar a la de la banda de 67 kDa detectada con el ELUV transferido. En la autorradiografía se obtenían las bandas de complejos obtenidas habitualmente en ensayos de ELUV para estas muestras, pero sólo la banda de 65-70 kDa obtenida para el extracto

nuclear crudo hepático se correspondía con la de 67 kDa de la membrana. Teniendo en cuenta los siguientes hechos:

1.- en ensayos de ELUV, sólo se obtienen bandas de complejos ADN-proteína con proteínas de 65-70 kDa en el extracto crudo (bandas que son específicas como se puede observar en ensayos de ELUV con competencias, fig. 88); estas bandas no se vuelven a observar posteriormente en ensayos de ELUV con fracciones con actividad de unión al ADN (fracciones H2, XX1/2 y XX) pero sí se observan en ensayos de transferencia Western y en geles de SDS/PA teñidos con plata (figs. 49 y 34, respectivamente). El hecho de que en la fracción H2 no se observara ninguna banda a 60-70 kDa en ensayos de ELUV indicaría que la banda de 67 kDa detectada con los anticuerpos en la membrana del ELUV transferido no tenía actividad de unión;

2.- en una transferencia Western sin reacción de ELUV previa se detectaron proteínas de 100 kDa en el extracto crudo y en las fracciones H2 y XX1/2, pero no en la fracción XX; en todas estas muestras se detectaron proteínas en torno a 70 kDa,

3.- en geles de SDS/PA teñidos se observaban bandas de 100 kDa en la fracción XX,

4.- en ensayos de ELUV transferidos se siguen detectando, en la membrana, proteínas en torno a 60-70 kDa, pero no se detectaron bandas de proteínas de 100 kDa ni en la membrana ni en la autorradiografía,

5.- en ensayos de CMGs transferidos no se detectaron proteínas en la fracción H2 (fig. 55) y tampoco se obtuvo *supershift* empleando extractos crudos y fracciones H2 (figs. 53 y 54) por lo que la unión de las proteínas al ADN interfería de algún modo en la detección con los anticuerpos anti-XX, es posible que la proteína de 60-70 kDa se tratara de una proteína que se fuera inactivando a lo largo del tiempo y por efecto de la radiación UV, de modo que en los extractos hepáticos aún se obtendrían complejos ADN-proteína específicos (el mayor grado de impureza de los extractos crudos frente al de las sucesivas fracciones cromatográficas ejercería un efecto protector frente al daño de las proteínas por la radiación UV) pero, posteriormente, en las fracciones cromatográficas activas se habría inactivado, no observándose complejos ADN-proteína en ensayos de ELUV, pero obteniéndose bandas en geles de SDS/PA teñidos con plata y en membranas detectadas con anticuerpos anti-XX (tanto en membranas de geles SDS/PA transferidos como en membranas de ensayos de ELUV transferidos). Si la unión al ADN interfiere en la detección con los anticuerpos, la detección de la banda de 67 kDa en la calle del extracto crudo, en el ELUV transferido, se debería a que coexistiría proteína activa con proteína inactiva. Por este mismo motivo, se detecta con anticuerpos la banda de 67 kDa en la fracción H2, en el ELUV transferido, pero no se observa complejo ADN-proteína en las autorradiografías de ensayos de ELUV (a causa de la inactivación por la radiación UV). Los complejos ADN-proteína observados en ensayos de CMG podrían deberse, por lo tanto, a que las proteínas de 60-70 kDa no sufren la inactivación debida a la radiación UV y a las otras proteínas observadas formando complejos ADN-proteína en los ensayos de ELUV. Por otro lado, la proteína de 100 kDa parece ser que se hidrolizaría, bien por efecto de la radiación UV o bien porque sea un precursor inactivo que en contacto con su sustrato (el ADN) se hidrolizara generando proteínas de menor peso (de 70 kDa, 30 kDa, ...) con actividad de unión al ADN.

Las conclusiones que pueden derivarse de esta primera parte del trabajo son: el esquema definitivo de purificación, que constaba de una primera cromatografía a través de una columna de Heparina-Sefarosa y una segunda cromatografía a través de una columna de afinidad (empleando un oligonucleótido con la secuencia de unión de los factores en estudio como ligando activo), permitió la obtención de dos fracciones con actividad de unión a la secuencia del oligo JA/NJA-2, una de las cuales (fracción XX) estaba constituida por cuatro proteínas (de 100, 70, 41 y 38 kDa) detectadas mediante tinción de plata de un gel de SDS/PA. Los ensayos de ELUV permitieron detectar proteínas con actividad de unión específica en la fracción XX1/2 con pesos de 80-90, 40-45 y 30-35 kDa; las proteínas con pesos de 40 y 30 kDa podrían ser fragmentos de una mayor de 70 kDa. Los ensayos de Western empleando anticuerpos obtenidos contra las proteínas de la fracción XX permitieron detectar proteínas con pesos de 100 kDa (fracción XX1/2) y de 70 kDa (fracciones XX1/2 y XX); debido a que la banda de 100 kDa no se observaba en los ensayos de ELUV pero era reconocida por los anticuerpos, se sugiere que sea o una reacción cruzada o un precursor inactivo de mayor tamaño. Esta proteína de 100 kDa mostró ser sensible a la temperatura. Las proteínas de 100, 70, 41 y 38 kDa no se desfosforilan al tratarlas con CIP ni se fosforilan con la PK-A, a excepción de una pequeña fracción de la proteína de 70 kDa que daría lugar a la banda de 74 kDa de proteína fosforilada; esta proteína de 70 kDa presenta restos glucídicos de N-acetil-glucosamina,  $\alpha$ -D-glucosa y  $\alpha$ -D-manosa. Respecto a su actividad de unión al ADN, se han determinado las guanosinas de la secuencia de unión implicadas en la unión al ADN, unión que parece que podría establecerse de manera que las proteínas envuelven o abrazan a la doble hélice; esta unión de las proteínas al ADN se ve alterada por la metilación de las citosinas de dinucleótidos CG presentes en la secuencia de unión (como más adelante se confirmará mediante los ensayos de transcripción *in vitro*); por otro lado, las proteínas en estudio mostraron que se unían al ADN con mayor afinidad que a los anticuerpos, cuando éstos se encontraban presentes en reacciones de unión para CMGs.

## ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR I DEL GEN DE LA GGT DE RATA

Para el estudio de la actividad promotora de las secuencias en 5' no traducidas del promotor I de la GGT de rata se investigaron varios aspectos fundamentales, como son el empaquetamiento en cromatina, el comportamiento de diferentes zonas del promotor en ensayos de transcripción *in vitro*, la expresión transitoria de diversas regiones del promotor en líneas celulares derivadas de rata y el efecto de algunos compuestos en la expresión de la enzima en una línea celular con una alta actividad GGT (línea H5-6).

Por un lado se estudió la interrelación entre secuencias promotoras, factores reguladores de la transcripción y **cromatina**, para determinar si los factores presentes en las fracciones más puras eran capaces de interaccionar con nucleosomas dispuestos en fragmentos de secuencias del promotor en estudio.

Como ya se indicó en la introducción, el ADN nuclear está empaquetado con proteínas histonas y no histonas, generando una estructura llamada cromatina. Las partículas básicas son los nucleosomas, formados por casi dos vueltas de hélice de ADN enrolladas en torno a un octámero de histonas. La combinación de la digestión con DNasa I o MNasa y del marcaje terminal indirecto permiten cartografiar, a baja resolución, la posición de los

nucleosomas. El significado funcional del posicionamiento de nucleosomas, y por tanto su importancia en la transcripción, se debe a que puede actuar sobre ésta de diferentes formas y según el contexto:

(1) puede actuar como represor, al proteger u ocultar secuencias reguladoras activadoras;

(2) puede presentar secuencias reguladoras en la superficie del nucleosoma, ya sea en los límites de la interacción ADN-partícula núcleo, o bien en el “centro” del nucleosoma (238);

(3) puede colocar secuencias reguladoras entre nucleosomas; y

(4) puede acercar elementos reguladores alejados en la secuencia lineal, permitiendo la interacción de los correspondientes FTs que reconocen estos elementos.

Como control de la técnica se utilizó el **factor GAGA** (FGA); este factor nuclear se ha localizado tanto en heterocromatina centromérica como en promotores altamente accesibles de muchos genes (239, 240).

La idea era determinar si los elementos GAGA aislados en promotores y las secuencias altamente repetitivas ricas en GA (frecuentes en heterocromatina) adoptarían diferentes estructuras en la cromatina. Para ello, se empleó la reconstitución fisiológica de cromatina, gracias al empleo de extractos de embriones de *Drosophila*. En estos ensayos se emplearon plásmidos en los que se habían introducido diecinueve repeticiones GAGA (X19 GAGA). Generalmente, cuando se aumenta el número de secuencias diana para un factor de transcripción, se espera tener un aumento de la unión y, por lo tanto, un incremento del efecto que este factor ejerce, ya sea activación o represión. Puesto que diversos autores habían descrito que, cuando el factor GAGA se une a secuencias promotoras empaquetadas en nucleosomas, desplaza los nucleosomas de la zona promotora, activando la expresión del correspondiente gen (241, 94), se esperaba una alteración en el patrón de cromatina obtenido por ensamblaje con extractos de *Drosophila*, tanto mayor cuantas más secuencias GAGA hubieran.

Se observó que, cuando el factor GAGA se unía a las diecinueve cajas GAGA, no se producía un desplazamiento de nucleosomas en esta secuencia, sino que parecían permanecer en la región cuando se efectuaban digestiones con MNasa o DNasa I. Sorprendentemente, las repeticiones GAGA parecían posicionar los nucleosomas más fuertemente que otras secuencias, de manera que el FGA no era capaz de desplazarlos. Sólo se pudo ver un pequeño cambio en los límites de esta secuencia con el tratamiento con DNasa I, probablemente debido a la unión del factor GAGA (figs. 51 y 52).

Algunos autores (242) han señalado la posibilidad de que las secuencias altamente repetitivas de regiones heterocromáticas actúen como un sumidero o reservorio de factores nucleares, lo cual parece estar de acuerdo con la observación experimental de que el factor GAGA se une a estas secuencias repetitivas sin desplazar los nucleosomas, a pesar de estar presentes en el medio otros factores nucleares, proteínas y complejos multiproteicos con actividades remodeladoras que estarían presentes en los extractos de embriones de

*Drosophila* empleados al ensamblar la cromatina. Es más, parece ser que el papel del FGA sería el impedir o inhibir que estas regiones se extiendan hacia zonas de eucromatina, impidiendo el silenciamiento de genes activos (239). En algunos modelos propuestos (54), estas maquinarias remodeladoras de nucleosomas actúan cuando son reclutados por FTs específicos que se unen a sus secuencias diana, provocando la remodelación de los nucleosomas de una región reguladora y provocando la activación, potencialmente o realmente, de la transcripción del gen que controla. Otra posibilidad, es que en las secuencias repetitivas falte alguna señal que provoque la remodelación de los nucleosomas que se sitúan sobre ellas o, al contrario, que existan señales que no impidan la unión de FTs, como le ocurre al factor GAGA en este caso, pero que imposibiliten la remodelación de esas zonas, por lo que se mantienen transcripcionalmente inactivas.

Por otro lado, puede que, sencillamente, el hecho de que se unan muchos factores GAGA en una secuencia, quizás entorpezca la unión o interacción con otros factores o complejos proteicos que serían los responsables reales de la remodelación de la cromatina.

Se han descrito varios mecanismos que explicarían la existencia de nucleosomas posicionados: la replicación, interacciones ADN-histona, proteínas posicionadoras, estructuras limítrofes o de flanqueo (flanqueadoras) y el propio empaquetamiento de la cromatina. De entre las citadas, las estructuras limítrofes pueden ser de diversa naturaleza: regiones sensibles a nucleasas (RSN), determinadas secuencias de ADN (estructuras cruciformes, tramos de poli(dA)-poli(dT) de cierta longitud, etc.) y también proteínas, como por ejemplo, el factor GRF2 que se une a la secuencia UAS del promotor GAL1-10 actuando como límite y posicionando nucleosomas (238).

Las RSN son estructuras que actúan como límites que posicionan los nucleosomas. Estas RSN son zonas desprovistas de nucleosomas, pero no necesariamente de histonas, generalmente situadas en promotores, regiones 3' de genes o en orígenes de replicación; precisamente por su localización se les ha atribuido un papel funcional importante, al permitir el acceso y la interacción de determinadas proteínas reguladoras con el ADN. De hecho, se han identificado diversas proteínas capaces de unirse a estas regiones RSN (238). En el promotor I del gen de la GGT de rata se identificó una región hipersensible a la DNasa I (SHD) (165) cerca del lugar de inicio de la transcripción y que se encuentra en riñón, en donde el gen está desmetilado y es activo.

En el estudio del promotor I del gen de la GGT de rata, se planteó la posibilidad de que los factores purificados a partir de extractos hepáticos fueran capaces de interaccionar de un modo similar a como lo hacía el factor GAGA con su secuencia. En la digestión de plásmidos con los **fragmentos 222 y 225-1** con DNasa I no se obtuvo ninguna posición preferente de corte en la muestra ensamblada (calles A, figs. 64 y 67), tampoco se observó que los factores en estudio indujeran la aparición de sitios hipersensibles a la DNasa I (SHD) al ensamblar cromatina en la secuencia del fragmento. Sin embargo, en preparados de núcleos de riñón de rata se había detectado un SHD en el promotor I de la GGT (165). Es probable que el ensamblaje de cromatina mediante el empleo de extractos de *Drosophila* genere una estructura de cromatina en la que estarían ausentes determinados componentes nucleares, específicos de especie o de tipo celular, que estarían presentes en los núcleos de riñón de rata y que serían los responsables de la observación de ciertas estructuras en núcleos nativos (como el SHD).

En cuanto a la comparación entre muestras metiladas y no metiladas, se apreció una pequeña diferencia en el patrón de digestión con DNasa I: tanto las muestras de ADN desnudo como de ADN ensamblado se mostraban menos digeridas que las correspondientes reacciones con ADN no metilado (comparar calles N y A del ADN metilado (M) con las calles N y A del ADN no metilado (NM), fig. 64); esto coincide con las observaciones de Kochanek et al. en cuanto a diferencias en la accesibilidad del ADN metilado o no metilado a la DNasa I (243). Parece ser que las estructuras de cromatina ensambladas sobre ADN metilado son más compactas (57, 101) que aquellas en las que el ADN no está metilado, lo que explicaría su menor digestibilidad por parte de las nucleasas empleadas en los estudios.

El patrón de MNasa reveló que los nucleosomas no estaban fuertemente posicionados (figs. 65 y 66), sino más bien al azar puesto que, al comparar muestras de ADN desnudo y muestras ensambladas en cromatina no se observó ninguna diferencia en el patrón de bandas. El hecho de que se obtenga un patrón de corte similar al del ADN desnudo es debido a que los nucleosomas ocupan posiciones múltiples, ya que, para obtener una huella se requiere que la mayoría de las moléculas con una secuencia concreta estén cubiertas por un octámero de histonas. Por lo tanto, no hay ninguna secuencia en esta zona del promotor que posicione a los nucleosomas.

En nuestro caso, el patrón de MNasa para muestras ensambladas en presencia de las **fracciones cromatográficas** más puras con actividad de unión a secuencias del promotor I (XX, XX1/2) fue igual al de las muestras ensambladas en ausencia de estas fracciones. Esto indica que las proteínas presentes en estas fracciones de afinidad con actividad de unión ensayadas, no parecen ejercer ningún efecto sobre muestras de cromatina; es decir, no parece que las proteínas posicionen los nucleosomas, actuando como límites.

En resumen, teniendo en cuenta nuestras condiciones experimentales, en las que las proteínas que usamos no son recombinantes (a diferencia del FGA empleado en los otros ensayos discutidos anteriormente), sino procedentes de fracciones eluidas de una columna cromatográfica, y los fragmentos empleados en las construcciones de los plásmidos son bastante grandes por lo que la resolución es baja, se puede deducir que las proteínas purificadas se unen sin producir ningún cambio, entendiendo por cambio un reordenamiento de los nucleosomas en la zona de unión. (99) Kadonaga define el remodelado de la cromatina como cualquier cambio detectable en la cromatina o en estructuras mononucleosomales. Hay que considerar que la detección por transferencia Southern de la digestión de la cromatina con MNasa sólo permite ver si la periodicidad o el espaciado de los nucleosomas se ha visto alterado, pero no permite conocer si el nucleosoma permanece intacto: la técnica de marcaje indirecto permite ver si los nucleosomas se han movido o desplazado; generalmente esto ocurre de manera que se sitúan a ambos lados del lugar de unión del FT (244), aunque, a veces, los nucleosomas pueden haberse alterado sin que se observe un cambio en la regularidad o periodicidad de éstos, debido a que la secuencia de unión del FT está en el ADN espaciador o, en el caso de varios FTs que se unen a una región reguladora, a que los lugares de unión de las proteínas se sitúan periódicamente, de forma que se corresponden con la repetición de los nucleosomas (245). También puede ocurrir que nuestro factor no sea capaz de reclutar alguna de las maquinarias remodeladoras de cromatina al tratarse de un sistema heterólogo, es decir, en el que las proteínas y factores nucleares presentes, así como las histonas, son de otra especie, de manera que podría faltar algún factor específico de

especie que interviniera en el proceso de interacción o reconocimiento entre la maquinaria remodeladora de *Drosophila* y el factor o factores nucleares de rata aportados.

Otra posibilidad importante a tener en cuenta es que, puede que los factores transcripcionales en estudio no se unan a la secuencia diana porque ésta no está accesible al encontrarse empaquetada en cromatina.

Los ensayos de **transcripción *in vitro*** permitieron determinar la actividad promotora de diferentes regiones del promotor I del gen de la GGT de rata.

Tras poner a punto las condiciones óptimas de reacción, se observó para la construcción ABC (fragmento que se extiende desde -844 hasta +224), que no había un lugar específico de inicio de la transcripción, sino que existían varios sitios de inicio que se encuentran entre -22 y +8 (164) (figs. 69A y 70A). La región C (de -143 a +144) mostró poseer una escasa especificidad en el proceso de inicio de la transcripción, ya que generaba más bandas (fig. 69B). Sin embargo, la construcción AC (un promotor delecionado en el que se han acercado la secuencia que se extiende desde -765 hasta -514 (y que contiene la secuencia diana de los factores en estudio, presentes en los extractos crudos hepáticos) al extremo 5' inmediato a la región codificante y que contiene el sitio de inicio de la transcripción (secuencia de -143 a +144)) confería una elevada especificidad en el momento de inicio de la transcripción, ya que originó una sola banda del tamaño esperado (200 pb; fig. 69C). Este lugar de inicio de la transcripción era altamente específico, como se puso de manifiesto en los ensayos en los que se emplearon dos cebadores situados a diferentes distancias del punto de inicio de la transcripción (fig. 70).

Parece claro que la presencia de factores nucleares que se unen a la secuencia situada entre -584 y -566 es importante en el proceso de control de la transcripción, junto con la zona adyacente que se extiende desde -514 a -144 (el fragmento B de la construcción ABC): la eliminación de esta secuencia de -514 a -144 se traduce en la obtención de un mensajero mayoritario y prácticamente único. En esta secuencia se encontrarían elementos reguladores negativos, como más adelante parece demostrarse en ensayos de transfección de células con estos fragmentos del promotor I, mientras que en la secuencia de -765 a -514 se encontrarían secuencias que conferirían una elevada especificidad en cuanto a la formación del complejo de inicio de la transcripción.

También se demostró que la actividad de los factores nucleares presentes en extractos hepáticos era altamente específica en cuanto al control del inicio de la transcripción, mediante ensayos de competencia: la adición de competencia del oligo JA/NJA-2 (que contiene la secuencia diana de los factores en estudio) era capaz de competir con el molde de ADN por los factores nucleares implicados en la transcripción de la construcción AC, no sólo cuando se preincubaban los extractos con la competencia previamente a la reacción de transcripción, sino, también cuando se añadía la competencia directamente a la reacción de transcripción (fig. 72). Esta observación se confirmó empleando diferentes tipos de competencias de ADN: como se puede observar en la figura 73, un oligonucleótido inespecífico no fue capaz de impedir la transcripción de la construcción AC por los factores presentes en los extractos hepáticos (calle 4, fig. 73) en comparación con la competencia del oligo JA/NJA-2, que produjo una clara disminución en la cantidad de transcrito obtenida (calle 2, fig. 73). Cuando se empleó el fragmento 225-1-T, estábamos añadiendo a la reacción secuencias de 330 pb

que incluyen la secuencia diana de 20 pb, es decir, sólo un 6% de la secuencia introducida como competencia era específica, por lo que sólo se aprecia una pequeña disminución en la señal del transcrito obtenido (fig. 73, calle 3).

Por otro lado, se observó que la metilación del molde AC impedía claramente la actividad transcripcional de los extractos nucleares, confirmándose la hipótesis de que las proteínas implicadas en la transcripción de esta región promotora no son capaces de interactuar con el ADN metilado para iniciar la transcripción (fig. 72). Estos resultados confirmarían la hipótesis de que los complejos ADN-proteína obtenidos al emplear la sonda 225-1 metilada y extractos nucleares renales y hepáticos en reacciones de unión (en ensayos de CMG) se debían a proteínas presentes en las muestras y con actividad de unión (o afinidad) por ADN metilado, por ejemplo, MeCP-1, etc.

Los anticuerpos obtenidos contra la fracción XX eliminaban los factores presentes en los extractos nucleares, impidiendo la posterior transcripción del molde de ADN ya que, la cantidad de transcrito obtenida es comparativamente menor que la obtenida en presencia de suero preinmune o en una reacción control sin sueros (fig. 74). El hecho de que no se observara *supershift* en ensayos de CMG realizados bajo diferentes condiciones de reacción (figs. 53 y 54) pero que sí se observe una interferencia en la reacción de transcripción al encontrarse los anticuerpos anti-XX, se debe a que las condiciones de los ensayos de transcripción *in vitro* y de *supershift* son diferentes: en los CMG el anticuerpo que se añade a la mezcla de reacción está presente en todo momento y, o se une al ADN o a las proteínas, mientras que en los ensayos de transcripción *in vitro* los anticuerpos que se unen a los factores nucleares presentes en el medio de reacción son retirados al añadir una suspensión de proteína A-Sepharosa y centrifugar, de modo que el sobrenadante utilizado en la reacción de transcripción carece de aquellos factores transcripcionales que han sido secuestrados por los anticuerpos.

Por otro lado, se estudió la actividad promotora de las secuencias en 5' no traducidas del promotor I de la GGT de rata mediante el análisis de la **expresión transitoria en líneas celulares** derivadas de rata.

Se estudiaron dos líneas celulares derivadas de rata: NRK y H5-6; la línea NRK deriva de fibroblastos de riñón normal de rata (*Rattus norvegicus*), mientras que la línea H5-6 deriva de la línea H4-II-E-C3 (ECACC 85061112), la cual deriva, a su vez, de las células de hepatoma Reuber 35. La máxima **actividad GGT** la encontramos en la línea H5-6 (747,4 mU/mg frente a 88,73 mU/mg de actividad que presentan las NRK), hecho que se correlaciona directamente con el número de **ARNms detectados** para la GGT en estas células (se detectaron los tipos I, II, III, IV-1, V-1 y V-2 en las células H5-6 y los tipos III, V-1 y V-2 en las NRK, fig. 75) y con el **grado de metilación del genoma** (el ADN de las células NRK presenta un mayor grado de metilación que el de las H5-6 (fig.76)). Se confirmaría otra vez la hipótesis de que la metilación del promotor I impide su transcripción.

En las células H5-6 la gran variedad de mensajeros podría estar reflejando una alteración de los mecanismos de control del *splicing*.

Por otro lado, Habib et al. detectaron mediante RT-PCR y *dot-blot* trazas de los tres mensajeros en hígado adulto, asumiendo que se debería a una transcripción inapropiada o

ilícita. Estos mismos autores también detectaban los tres mensajeros en riñón fetal y adulto, proponiendo que el aumento en la expresión de la enzima en el tejido adulto con respecto al fetal se debería más a un aumento en la tasa de transcripción de estos mensajeros que a la aparición de nuevas especies de ARNm (167). En este sentido, en la línea celular H5-6, la presencia del ARNm I expresado junto a otros como el V (detectados por ensayos de RT-PCR), sugiere que podrían haber otras secuencias reguladoras situadas más arriba, en 5'. Estas secuencias se podrían situar en los promotores V descritos, a los que se debería la expresión de la GGT y la generación por corte y empalme alternativo de diferentes ARNm con secuencias 5' distintas, las cuales serían responsables de una regulación post-transcripcional, afectando a la estabilidad de éstos (a su vida media) y a su eficiencia a la hora de ser traducidos a proteínas.

La generación de ARNm con diferentes extremos 5' debida a la existencia de mecanismos de corte y empalme permitiría la existencia de varios niveles de regulación de la expresión génica:

(1) En un primer nivel, la regulación en la transcripción se da como respuesta inmediata a una señal de estrés o alteración redox.

(2) En un segundo nivel se produce la regulación durante la traducción; se ha observado que regiones 5' no traducidas actúan como elementos moduladores de la traducción (247).

La expresión del promotor tipo III parece ubicua, a diferencia de la expresión de los tipos I, II y IV, pero se encuentra aumentada en ciertas situaciones fisiológicas y patológicas, como en el hígado fetal, en la glándula mamaria lactante y en nódulos neoplásicos hepáticos (153). Brouillet et al. observaron que, en células de hepatoma el ARNm de tipo III se expresa en relación con el estado de diferenciación de las células, de modo que algunos autores han observado que en líneas derivadas de la línea Reuber H-35 este ARNm se expresa en células que poseen un fenotipo diferenciado (células Fao) (155); incluso, estos autores observaron la reexpresión del ARNm tipo III en células de la variante C2Rev7 que habían revertido a un fenotipo de hepatocito diferenciado, llegándose a identificar la presencia de una secuencia reconocida por los factores NF-1 y NF-Y que potenciaba la actividad transcripcional en células Fao y C2Rev7 (diferenciadas), pero no en células desdiferenciadas. Por otro lado, Darbouy et al., observaron que células de hepatoma HTC expresaban unos niveles muy bajos de ARNm tipo III (153). La presencia del ARNm III en células H5-6 (derivadas de la línea H4-II-E-C3, la cual se deriva de las células de hepatoma Reuber 35) reflejaría, por lo tanto, un fenotipo de hepatocito diferenciado, basándonos en las observaciones de los autores citados.

La detección del mensajero tipo III en células NRK se debería a la citada ubicuidad de la expresión del promotor III.

La expresión del ARNm de tipo IV en células de hepatoma HTC ha sido relacionada con el posible origen común de células intestinales y hepáticas (153). Es probable que la expresión de este tipo de ARNm en la línea H5-6 se deba al mismo motivo y que la ausencia de este tipo de ARNm en la línea NRK se debe a un diferente origen ontogénico con respecto a la línea H5-6.

En la línea NRK hay que destacar la ausencia de los ARNms I, II y IV, ya que la expresión de estos ARNms se debe a factores específicos de tejido y es característica de células renales normales (153). De hecho, se considera que su expresión se pone en marcha durante el desarrollo, considerándose como factores de diferenciación que contribuyen al establecimiento y mantenimiento de un fenotipo maduro; en células epiteliales de riñón LLC-PK1 (que, al igual que las células NRK, expresan una actividad GGT baja) la actividad GGT aumenta al exponerlas a compuestos químicos inductores de diferenciación (153).

Todos los fragmentos ensayados llevaban la secuencia comprendida entre -143 a +143 pb (fragmento 226-3), la cual contiene el exón I del promotor I y parte del intrón situado en 5' a este exón (desde -21 a -143 pb), incluyendo una de las cajas CCAAT (posición -136), una secuencia consenso para el factor AP2 (posición -13; ref. 164), una de las dos repeticiones inversas descritas por Chobert et al. (posición +92; ref. 246) y un elemento de respuesta a hormonas esteroideas (AGAAGA; posición +97; ref. 247). El fragmento de -511 a -144 contiene otra parte del intrón antes citado y en la que se han encontrado una secuencia consenso para un *enhancer* (posición -459) y una repetición GAG (situada a -420; refs. 164, 154). El fragmento desde -845 hasta -510 (fragmento 225-1) contiene la otra caja CCAAT (posición -605), varias repeticiones GAG (-598, -689 y -817) y la secuencia diana identificada en este laboratorio (de -584 a -565; ref. 221). Otros autores identificaron secuencias consenso para AP-1 (-764) y Sp1 (-101 y -746) (154), que no fueron descritas por Kurauchi et al. (164) debido a pequeñas diferencias en las secuencias clonadas (por inserción, delección o cambio de alguna base). En este laboratorio se identificó la unión *in vitro* del factor Sp1 a la secuencia degenerada GC (-573), generando una huella diferente a la obtenida con extractos hepáticos y renales en ensayos de protección a la DNasa I; sin embargo, no se pudo detectar en ensayos de protección a la Exo III (187).

Al efectuar experimentos de **transfección** de fragmentos del promotor clonados en pGL3 (figs. 78 y 79), se observó que la construcción pGL3/222-5 presentaba la menor actividad promotora. La construcción pGL3/222-5 incluye, en su extremo 3', una parte del exón común: desde +141 a +224; la disminución en la tasa de expresión de este fragmento del promotor puede deberse a alguna secuencia situada en este extremo 5' del exón común y que podría actuar a nivel de la traducción.

No es probable que faltaran en esta construcción 222-5 secuencias potenciadoras (que provocaran una elevada tasa de transcripción) situadas en 5' a la zona que se extiende desde -765 hasta el exón del segundo promotor, ya que, Kurauchi et al. (164) encontraron que las secuencias desde -508 hasta -1960 daban lugar a una disminución de la actividad promotora en la línea LLCPK (derivada de túbulo renal de cerdo). En esta región del promotor hay secuencias consenso para el factor GAGA, cuyo papel en el control de la expresión de genes en los mamíferos no ha sido todavía bien establecida en comparación con *Drosophila*, ya que se conocen pocos ejemplos, como es el caso del gen de la albúmina de rata para el que se detectaron estas cajas GAGA pero no se ha aclarado su papel (248); por lo tanto, no les podemos atribuir, con seguridad, un papel regulador negativo.

Existe la posibilidad de que la baja tasa transcripcional detectada para el plásmido pGL3/222-5 pueda deberse al empaquetamiento en nucleosomas de la secuencia. Como se vio en el análisis por MNasa y DNasa I de la cromatina reconstituída en el fragmento 222, los

nucleosomas se posicionan al azar, es decir, este fragmento 222 no tiene ninguna secuencia posicionadora de nucleosomas. Un posicionamiento de nucleosomas debido a secuencias del plásmido (y no del inserto) se produciría por igual en las dos líneas celulares (suponiendo que no hubieran diferencias en cuanto a la formación de cromatina entre ambos tipos de células), aunque no tendría, necesariamente, el mismo efecto en cuanto a tasa de expresión.

Aunque las actividades de los diferentes fragmentos son ligeramente superiores o iguales en la línea NRK con respecto a la H5-6, no se detectó transcrito del tipo I en la línea NRK mediante la amplificación por RT-PCR y posterior transferencia Southern. Esto se podría deber a que en la línea NRK el promotor está metilado y, como ya se ha dicho, la metilación generalmente produce un efecto negativo sobre la transcripción (57). Por este motivo, cuando se transfectaron las células NRK con estas mismas construcciones metiladas, se encontró una disminución en la expresión del gen de la luciferasa, ya que, tradicionalmente se ha correlacionado la metilación de las citosinas en regiones promotoras o reguladoras con un efecto negativo sobre la transcripción (fig. 78).

En general, las actividades en ambas líneas eran muy bajas con respecto al control positivo de pGL3-Control. No se puede descartar la posibilidad de que hubieran secuencias reguladoras en 3' (por ejemplo, secuencias potenciadoras de la transcripción en zonas intrónicas) cuya ausencia explicaría que en estas líneas de rata las actividades promotoras de los fragmentos transfectados fueran tan bajas.. En la región 3', estos elementos reguladores pueden situarse, ya sea en la secuencia restante del exón común (de +224 hasta +278) o en el intrón situado entre este exón no traducido y el primero codificante. Para la GGT humana se ha descrito la presencia de un elemento promotor en el intrón 7, que sería responsable de la expresión de ARNm truncados de la GGT (180).

La construcción pGL3/30-7 se puede considerar como un promotor delecionado, en el cual se ha eliminado la secuencia que va desde -514 a -143, colocando la secuencia en estudio adyacente al lugar de inicio de la transcripción; esto provoca el acercamiento de las cajas CCAAT presentes en este promotor (la distancia en la secuencia natural es de 450 pb y en esta construcción se acorta a 100 pb). Es posible que la mayor actividad con respecto a la pGL3/229-5, en las líneas de rata, se produzca, más que por el hecho de acercar estas cajas CCAAT (en el pGL3/226-5 sólo hay una de estas cajas y la actividad es menor a la actividad de pGL3/30-7 en las células NRK, pero mayor a la actividad del pGL3/30-7 en las H5-6), por la posible eliminación de algún elemento negativo presente en la secuencia delecionada de -514 a -143 y que viera potenciada su actividad por elementos situados entre -765 y -514; estos elementos actuarían como potenciadores negativos, de manera similar al mecanismo de regulación propuesto para el factor PEA-3 en el promotor IV de la GGT de rata, el cual regularía la transcripción de la GGT actuando como un activador o como un represor a través de los sitios de unión que posee en este promotor (171). Por otro lado, el acercamiento de la secuencia diana detectada entre -580 y -566 a la región de inicio de la transcripción haría más efectiva la formación del complejo de iniciación de la transcripción, o provocaría el acercamiento de secuencias reguladoras con efecto sinérgico positivo o que actuaran cooperativamente aumentando la transcripción. Los experimentos de transcripción *in vitro* mostraron una elevada especificidad en el inicio de la transcripción para el promotor delecionado AC, y en los ensayos de transfección, el fragmento 30-7 (prácticamente igual en su secuencia al fragmento AC) muestra una actividad promotora elevada.

Para la construcción pGL3/229-5 se obtuvo una actividad promotora menor a la obtenida con la construcción pGL3/30-7 en ambas líneas, por lo que debía de localizarse algún elemento con actividad reguladora negativa en la secuencia que se extiende desde -514 hasta -143.

Para la secuencia que se extiende desde -143 a +144 (construcción pGL3/226-5) la actividad promotora observada es mayor a la obtenida con el fragmento que se extiende desde -514 hasta +144 (construcción pGL3/229-5), aunque, a diferencia de las otras construcciones, la actividad fue significativamente mayor para la línea H5-6 con respecto a la línea NRK. Incluso fue mayor que la actividad obtenida para la construcción pGL3/30-7. Probablemente este efecto se deba a que en la línea H5-6, derivada de hepatoma, los mecanismos reguladores inhibitorios de la transcripción estén alterados de tal modo que, una secuencia que contiene el sitio de inicio de la transcripción, con los elementos *trans* más simples y básicos de regulación, sea capaz de desarrollar una actividad transcripcional basal e inespecífica (recordemos que en los experimentos de transcripción *in vitro* se obtenían múltiples transcritos, por lo que no había un punto específico y principal de inicio de la transcripción).

Cuando células de la línea H5-6 son transfectadas con los plásmidos metilados las actividades aparecen ligeramente superiores que cuando se transfectan con los no metilados (fig. 79). Se ha visto que las células H5-6 poseen hipometilado el gen de la GGT (225), lo cual se correspondería con la elevada actividad detectada para la enzima. Podría ocurrir que en estas células los mecanismos de desmetilación estuvieran más activos de lo normal, o que los de mantenimiento de la metilación estuvieran inactivos o fueran menos eficaces, o que la represión vía proteínas de unión a ADN metilado no se diera por deficiencia o ausencia de este tipo de proteínas (243). Levine et al., por ejemplo, observaron que en ciertas líneas celulares faltaría un factor que inhibiría la transcripción vía metilación del ADN; además, determinadas situaciones (como, por ejemplo, presencia de  $Zn^{2+}$ , butirato) activan la transcripción aunque el ADN no se desmetile (249). También se ha observado que, cuando se transfecta una construcción metilada, transcurre un tiempo hasta su inactivación, de manera que se puede transcribir durante ese lapso de tiempo (57). La alteración en cualquiera de los posibles mecanismos de silenciamiento de los genes podría explicar esta expresión de las construcciones metiladas en esta línea celular. Por otro lado, algunos autores, como Graessmann et al., han observado que en algunos casos la metilación no afecta a la transcripción (101).

Para las células NRK se observó una disminución de la expresión de los fragmentos metilados transfectados con respecto a los no metilados (fig. 78), coincidiendo con el principio general de que la metilación de un gen provoca su silenciamiento y con las observaciones previas en experimentos de transcripción *in vitro*, en los que la metilación del molde de ADN provocaba la ausencia de transcrito.

En resumen, la actividad promotora de los fragmentos del promotor I transfectados es mayor en la línea NRK que en la línea H5-6 (fig. 77). Sólo la construcción pGL3/226-5 presenta una actividad significativamente menor en la línea NRK frente a la línea H5-6. Sin embargo, la actividad GGT en la línea NRK es menor que en la H5-6 y el grado de metilación es mayor en la línea NRK frente a las células H5-6. Puesto que los fragmentos transfectados no estaban metilados y en riñón adulto la actividad GGT es mayor que en

hígado adulto, los resultados observados se deberían a que en el tiempo de ensayo, los fragmentos transfectados no se han metilado aún y se expresan (57) como lo harían en células renales normales, dando lugar a una actividad GGT comparativamente mayor a la de células H5-6. El hecho de que el plásmido pGL3/226-5 tenga más actividad en células H5-6 que en NRK puede deberse a que en líneas de hepatoma, los mecanismos de transcripción de genes se encuentran alterados y, es posible, que ninguna secuencia reguladora presente en esta zona del promotor I tuviera efectividad.

El análisis de diferentes fragmentos del promotor I del gen de la GGT de rata mediante los experimentos de transcripción *in vitro* y transfección de líneas celulares ha puesto de manifiesto la actividad reguladora positiva de secuencias situadas en el fragmento de -765 a -514 (en donde se sitúa la secuencia diana para los factores en estudio: de -585 a -566) y en el lugar de inicio de la transcripción (de -143 a +144): el acercamiento de estas secuencias aumenta la tasa de transcripción en ensayos de transfección de células y genera un transcrito mayoritario, de manera altamente específica, en ensayos de transcripción *in vitro*. La metilación de las diversas secuencias impide claramente la obtención de ARNm en ensayos de transcripción *in vitro* y provoca la disminución de la tasa de transcripción en células de la línea NRK transfectadas con construcciones metiladas de los fragmentos del promotor en estudio. Sin embargo, las células H5-6 transfectadas con construcciones metiladas mostraron un comportamiento inesperado, ya que mostraron actividades transcripcionales mayores a las obtenidas con las construcciones sin metilar. Las células H5-6 se caracterizan por presentar una mayor actividad GGT, un mayor número y tipo de transcritos y un genoma hipometilado en comparación con las células NRK; es posible que en estas células derivadas de hepatoma los mecanismos celulares que regulan la inhibición de la transcripción génica se encuentren alterados y por ello muestren una actividad transcripcional desregulada.

Finalmente, se realizó un **análisis del efecto de diferentes sustancias exógenas sobre la expresión de la GGT** en líneas celulares derivadas de rata.

Se cultivaron células NRK con medio suplementado con GSH a la concentración de 0,001 g/l, con el fin de ver si aumentaba la actividad GGT. El GSH es un compuesto antioxidante que constituye el principal sustrato de la GGT. Del mismo modo que una elevada concentración de algunos sustratos es capaz de inducir la expresión de enzimas implicados en su metabolismo, se consideró la posibilidad de que un aumento de la cantidad de GSH en el medio de cultivo empleado para las células NRK, indujera la expresión de GGT, manifestándose como un aumento de la actividad de esta enzima: el cultivo en presencia de GSH no mostró diferencias significativas en cuanto a actividad GGT con respecto a células NRK cultivadas en medio sin suplementar con GSH (fig. 80); hasta ahora no se ha descrito ningún caso en el que se induzca la expresión de la GGT por la presencia de GSH en el medio extracelular, aunque se ha señalado que la presencia de GGT constituye una ventaja para las células tumorales frente a las normales, al permitirles tomar del medio extracelular la cisteína en forma de GSH, ya que en suero la cantidad de GSH reducido es igual o mayor a la de cisteína reducida, siendo, por tanto, el GSH la principal fuente de cisteína para las células (183). Es posible que la cantidad de L-cistina·2HCl presente en la formulación del medio empleado (0.0626 g/l) sea suficiente para satisfacer las necesidades de cisteína de las células, por lo que la cantidad de GSH no sea fundamental para el desarrollo de éstas. Sí se observó un discreto aumento de la actividad GGT a lo largo del tiempo de

cultivo; otros autores también han observado este fenómeno en células epiteliales de riñón de la línea LLC-PK1 durante el cultivo a confluencia (153).

En cuanto a la **dexametasona**, su acción final en la célula consiste en la represión o la inducción de la síntesis de proteínas, aunque no se sabe si esto se produce por una acción directa sobre los mecanismos de transcripción o por un mecanismo indirecto (250). Estudios previos han demostrado que la dexametasona aumenta, en general, la expresión de la enzima en diferentes tipos celulares (247, 251), aunque también se ha visto que hay casos en que disminuye concomitantemente al tratamiento con esta sustancia (252) o no hay efecto (253). Esta diferencia en la acción nos llevó a ver cual era el efecto que tenía sobre células con una actividad GGT alta como son las células H5-6 y en las que se observaba la expresión del ARNm de tipo III, en cuya secuencia promotora se identificaron unos elementos de respuesta a glucocorticoides (155).

La dexametasona causaba una clara disminución de la actividad GGT determinada en los extractos de células H5-6 (fig. 81). Rahman et al. (252) también observaron una disminución en la actividad GGT y en la actividad  $\gamma$ -glutamyl-cisteín-sintetasa, así como una disminución en la concentración de proteína por célula en respuesta a la dexametasona en la línea celular A549 (una línea de células epiteliales alveolares humanas).

Estas células H5-6 experimentaban una clara inhibición o retardo en la velocidad de división, como se mostraba en la gráfica de proteína total (equivalente al número de células presentes; fig. 83) a lo largo del período de cultivo cuando en el medio se encontraba presente el glucocorticoide.

En nuestro caso se observó que la respuesta era dosis-dependiente (fig. 82), de modo que existe una relación inversa entre la concentración de dexametasona y la actividad GGT en los lisados celulares. Asimismo, el pase de células tratadas durante 48 horas a medio sin dexametasona reveló un aumento de la actividad GGT (figs. 81 y 83), es decir, revirtió la respuesta a la dexametasona: se podría considerar que la vía o mecanismo de represión de la expresión de la actividad GGT en estas condiciones de cultivo es reversible, ya que el valor de actividad de estas células en el último día de cultivo era significativamente mayor al de células tratadas durante todo el cultivo, aunque no llegaba a ser, ni mucho menos, similar al de las células controles (fig. 81). En cambio, en aquellas células que se habían tratado durante 96 horas en medio con dexametasona no se observó un aumento significativo de la actividad GGT en comparación con las células tratadas durante todo el periodo de cultivo con dexametasona (figs. 81 y 83), por lo que se consideraba que se había alcanzado un punto en el que la inhibición era irreversible o, al menos, los mecanismos inhibitorios desencadenados tenían una acción más duradera.

Los corticosteroides, como la dexametasona, se supone que actúan suprimiendo la inflamación por interacción con varios FTs (252). En nuestro caso quedaría por resolver si la disminución de la actividad GGT puede ser debida a una acción directa del glucocorticoide sobre el gen de la GGT (en el promotor III de la GGT de rata se ha identificado la existencia de secuencias consenso para el elemento de respuesta a glucocorticoides: tres hexámeros situados entre -1418 y -1377) o indirecta, consecuencia de una interacción de la dexametasona con promotores de genes de FTs que podría conducir a una inhibición del

crecimiento celular, y como consecuencia a una disminución en la actividad de esta enzima, entre otras proteínas.

Cuando se cultivaron células H5-6 en presencia de SAM 1 mM, empleado como sustrato de metilasas nucleares que metilan el ADN, se observó una disminución significativa de la actividad GGT, con respecto a los controles (fig. 84). Este efecto podía explicarse de varias maneras:

- bien por la metilación del ADN: el crecimiento celular se vio muy disminuído frente a las placas control y en comparación con la reducción en la tasa de división observada en las células cultivadas con dexametasona, lo que hace suponer que se habría producido metilación del ADN, inhibiéndose la síntesis de gran cantidad de proteínas;

- por la masiva metilación de los fosfolípidos de membrana, pudiéndose alterar la adecuada fluidez de las membranas celulares (254);

- o bien por una acción conjunta de estos dos efectos.

De todas maneras, en ambos casos el mecanismo de acción sería inespecífico, en el sentido de que no se trataría de una acción selectiva de la SAM sobre este gen, sino, más bien de una metilación del genoma de las células en general o de un efecto sobre las membranas, con la consiguiente alteración y posible liberación al medio extracelular de constituyentes de éstas; una de las proteínas que podría verse liberada al medio externo es la GGT, puesto que se trata de una enzima de membrana

Finalmente, la comparación de los datos de actividad GGT en células tratadas con dexametasona con los datos de células tratadas con SAM, permitió observar que la disminución de los valores de enzima tras 5 días de cultivo fueron más marcados en las células tratadas con el glucocorticoide que con SAM (un 10% y un 25 % de la actividad del control al 5º día de cultivo, respectivamente), lo que podría suponer, junto a la disminución en el número de células viables presente en uno y otro caso para un mismo inóculo inicial, una acción más selectiva de la dexametasona, ya sea directa o indirecta en lo que se refiere a la actividad GGT.

Mediante ensayos de transferencia Northern empleando ARNs de células H5-6 controles o células H5-6 tratadas con dexametasona o con SAM, se observó la ausencia de ARNms para la GGT en las células tratadas con dexametasona (fig. 85); para las células tratadas con SAM se detectó una menor cantidad de ARNms para la GGT en comparación con las células controles. Esto indica que se produce una inhibición a nivel de la transcripción, sobre todo en las células tratadas con el glucocorticoide; esta inhibición a nivel de la transcripción es la responsable de la disminución en la actividad GGT. En las células tratadas con SAM la disminución de la actividad enzimática GGT se produciría por un mecanismo inhibitorio de la transcripción más general, como es la metilación inespecífica del genoma celular. Por lo tanto, las células H5-6 debían la elevada actividad GGT a la producción de diferentes transcritos de ARNm para esta enzima y la disminución o la abolición de la transcripción de estos ARNms provocaba la disminución de la actividad enzimática GGT observada; estos hechos indican una regulación de la GGT a nivel de la transcripción.

Se decidió investigar también la presencia de los **factores nucleares con actividad de unión a la secuencia diana en extractos de líneas celulares derivadas de rata**: NRK y H5-6 (éstas últimas cultivadas en presencia y ausencia de dexametasona). El estudio se realizó preparando dos tipos de muestras: fracción citoplasmática S-100 y extracto nuclear.

Puesto que en las fracciones S-100:

- se obtenían complejos diferentes de los obtenidos con extractos hepáticos y con extractos nucleares celulares en ensayos de CMG (fig. 86),

- se obtenían complejos con el oligo mutado JAM/NJAM, de igual movilidad electroforética que los que se obtenían con estas muestras al emplear el oligo JA/NJA-2 (fig. 86),

- se detectaran en estas fracciones S-100, débiles bandas de complejos ADN-proteína, en ensayos de ELUV, con un peso molecular similar al observado para proteínas de los extractos nucleares y con actividad de unión (fig. 88),

- y en ensayos de protección a la Exo III no se observaba ninguna barrera (no se muestra figura),

se consideró que estas actividades eran contaminaciones debidas a los correspondientes extractos nucleares durante el proceso de obtención o uniones inespecíficas y se decidió seguir estudiando sólo los extractos nucleares celulares.

En ensayos de CMG con el oligo JA/NJA-2, en el caso de los extractos nucleares de células NRK y H5-6 se obtuvieron complejos ADN-proteína con una movilidad idéntica a la de los complejos obtenidos con extractos hepáticos (fig. 86). Al emplear el oligo JAM/NJAM se obtuvo un patrón de complejos con una movilidad distinta, lo que indica la existencia de proteínas presentes en estos extractos con capacidad de unión a la secuencia mutada. Cuando se empleó el fragmento 225-1 marcado en la hebra codificadora estos extractos nucleares proporcionaban barreras a la Exo III similares a las obtenidas con los extractos hepáticos (fig. 87); la presencia de competencia fría en las reacciones de unión provocaba la desaparición de la barrera, poniendo de manifiesto la especificidad de los complejos ADN-proteína (fig. 87). No se pudo obtener huella en ensayos de protección a la DNasa I, por lo que no se pudo establecer con exactitud la extensión de la interacción.

En la siguiente tabla se resumen los pesos moleculares, en kDa, de las proteínas detectadas con los ensayos de ELUV (fig. 88) y de Western (figs. 89-90) en los extractos nucleares de las líneas celulares NRK y H5-6:

**Tabla 7.**

Muestra	Técnica	ELUV	Western
Extracto nuclear hepático (M)		80-90, 65-70, 40-45, 30-35, 8-10	100, 67, 38
Extracto nuclear NRK		80-90, 65-70, 40-45, 30-35, 8-10	100, 45-43
Extracto nuclear H5-6		65-70, 40-45, 8-10	100, 45-43
Extracto nuclear H5-6 tratadas con dexametasona		80-90, 65-70, 40-45, 30-35, 8-10	100, 45-43

Como podemos observar, con los extractos nucleares de las líneas celulares se obtuvo un patrón de complejos ADN-proteína en los ensayos de ELUV que era similar al obtenido con los extractos crudos nucleares hepáticos (fig. 88). Por lo tanto, las proteínas presentes en las muestras obtenidas de las líneas celulares son las mismas proteínas presentes en las muestras de tejido hepático.

En los ensayos de transferencia Western con los anticuerpos anti-XX, se detectaron proteínas con peso molecular de 100 kDa en los extractos nucleares, pero no en las fracciones S-100, en donde se encontraron proteínas en torno a los 65 y 75 kDa (figs. 89 y 90). Como ya se vio para el caso de las muestras hepáticas, no se detectaba ninguna proteína de 100 kDa en los ensayos de ELUV, mientras que las proteínas de 65-70 kDa que formaban complejos ADN-proteína en los extractos nucleares celulares no se detectaban con los anticuerpos anti-XX en ensayos de transferencia Western con estas mismas muestras. Podría ser que la banda de 100 kDa (sin actividad de unión según los ELUVs) observada en los ensayos Western se hidrolizara dando lugar a proteínas de menor peso molecular con actividad de unión y que los anticuerpos anti-XX no detectan porque no están presentes en los extractos nucleares de líneas celulares.

Los ensayos de Western pusieron de manifiesto, también, la presencia de proteínas con pesos moleculares de 45-43 kDa (tanto en los extractos nucleares de células NRK como en los de células H5-6 controles y tratadas) que se pueden corresponder con la banda de 40-45 kDa observada en los ensayos de ELUV con estas mismas muestras (figs. 88-90).

Los extractos nucleares de células H5-6 controles y tratadas con dexametasona se diferenciaban en la presencia de bandas de proteínas con pesos moleculares de 80-90 kDa y 30-35 kDa: la presencia de estas bandas en los extractos nucleares de células H5-6 tratadas con dexametasona y, también, en los extractos nucleares de células NRK y el hecho de que ambos tipos de células presentaran una baja actividad enzimática GGT, sugiere que podría tratarse de factores transcripcionales inhibidores implicados en una regulación a la baja de la GGT. Más aún, en extractos nucleares de hígado de rata adulta se detectaron también, en ensayos de ELUV (fig. 48), estas proteínas de 80-90 y 30-35 kDa y en hígado adulto la actividad GGT es baja, lo que apoya la hipótesis enunciada sobre la posible actividad reguladora negativa de estas proteínas.

Para concluir, la secuencia J05310 de GenBank (correspondiente a 2776 pb del extremo 5' del gen de la GGT de rata) se sometió al programa MatInspector 2.2 (255), especificando un valor de 0,90 tanto para el parámetro "similitud de secuencia" como para la "similitud de matriz"; esta búsqueda reveló la presencia de secuencias consenso para diferentes FTs descritos en vertebrados. De todas éstas, aquella para la cual se encontró la máxima similitud en ambos parámetros (valor = 1,00) fue la contenida en el oligo JA/NJA-2, es decir, la secuencia diana estudiada en este laboratorio. Las proteínas que, según el programa, reconocen y se unen a esta secuencia pertenecen a la subfamilia Egr/Krox: un tipo de factores de transcripción inducibles de respuesta inmediata temprana (dentro de la familia de reguladores del desarrollo y del ciclo celular, según la clasificación de la base de datos Transfac.gbf-braunschweig.de de la referencia 28), de la clase "dedos de zinc Cys2/Hys2", bien conservados desde *Drosophila* hasta los humanos. Esta subfamilia incluye, actualmente, los factores Egr-1 (53,9 kDa para el ADNc; 54 y 84 kDa en SDS), Egr-2 (44,6 kDa para el ADNc), Egr-3 (42,6 kDa para el ADNc) y Egr-4 ( $\geq 478$  aa). Estos factores se han descrito y caracterizado en el sistema nervioso, entre otros tejidos. A Egr-1 se le ha supuesto un papel en la regulación a la baja de promotores de mamíferos por competencia con Sp1, al unirse a sitios de estos factores que se solapan; efectivamente, se ha visto que el factor Sp1 se puede unir a esta secuencia, solapándola, activando la transcripción a través de este elemento (256). Recientemente, se ha descrito la unión de la proteína Egr-1 a un sitio Sp1 en el promotor del gen de la tirosín-hidroxilasa de rata (257). Se ha hipotetizado una posible heterodimerización de estos factores con Sp1 para controlar la expresión de genes como los del colágeno tipo I de ratón (258). En nuestro laboratorio se observó la unión del factor Sp1 a la caja CG degenerada situada entre -573 y -568 (solapándose con la secuencia diana en estudio), como ya se ha indicado anteriormente, generando una huella diferente a la obtenida con los extractos hepáticos nucleares. Además, en el caso de los genes del colágeno, uno de los sitios de unión para c-Krox está adyacente a una caja CCAAT (258), situación similar a la que se da en la secuencia en estudio (en la que se encuentra una caja CCAAT de -606 a -602); Galéra et al. observaron, por mutaciones en estas secuencias, que se favorecía la unión de CBF a la secuencia CCAAT, incrementándose la actividad de este promotor; por este motivo, se supuso que la unión de c-Krox podía prevenir la unión de CBF (ya que los sitios de unión para estos dos factores se solapan en este promotor), lo cual explicaría que las secuencias de unión de c-Krox se consideraran como inhibidores de la transcripción, debido a los resultados obtenidos en ensayos previos de transfección de ADN. Sin embargo, en nuestro caso, el análisis informático de la secuencia del promotor I de la GGT de rata no encontró FTs que se unieran a las cajas CCAAT ni a la posible secuencia potenciadora descritas por Kurauchi et al. y presentes en esta secuencia (164); como tampoco se ha observado experimentalmente ni huella para la DNasa I ni barrera para la Exo III (Ref.: figs. 33 y 32, respectivamente, de la ref. T.A.) debidas a factores que se unieran a la caja CCAAT situada en -606.

Estos factores de la subfamilia Egr/Krox poseen regulación por estado redox, glicosilación y fosforilación (259). Para el factor Egr-1, Day et al. (41) encontraron que estaba fosforilado, pero no pudieron demostrar la presencia de glicosilación, al menos de residuos de N-acetilglucosamina. Este factor presenta además dos formas de 54 y 84 kDa, aunque el ADNc predice una forma de 54 kDa; según estos autores, parece ser que estas dos formas derivan de un gen pero una de ellas está truncada, sin haber podido demostrar si esta ruptura se produce a nivel pre- o post-traducciona l ni la presencia de un precursor común. Por otro lado, estas dos formas de la Egr-1 se encuentran en diferentes localizaciones: la forma de

54 kDa está en el citosol y la de 84 kDa está en el núcleo de las células analizadas (línea PC12 y hsA-CHO, ésta última no expresa la forma de 54 kDa). Este hallazgo es similar a la observación de que en las líneas celulares NRK y H5-6 se encuentra una proteína de 100 kDa en los extractos nucleares que no se encuentra en las fracciones citosólicas S-100. Además, en nuestro caso encontrábamos que proteínas de 70 kDa, de los complejos ADN-proteína más específicos en extractos nucleares, no se correlacionaban con bandas detectadas con anticuerpos en las transferencias Western de estas muestras, en las que se detectaba una proteína de 100 kDa, por lo que se podía pensar que, o bien la de 100 kDa es una reacción cruzada, o bien que se trata de un precursor que se hidroliza, se une al ADN y, una vez cumplida su función en el núcleo, pasan al citoplasma (inactivándose antes o después), en donde se detectan bandas de menor peso molecular.

Todas estas características más o menos comunes entre los factores de la familia Egr/Krox y las proteínas en estudio hacen sospechar que la proteína detectada con actividad a la secuencia diana entre -567 y -580 en el promotor I del gen de la GGT de rata sea una proteína relacionada.

Por otro lado, la búsqueda no redundante de la secuencia del oligo JA/NJA en las bases de datos de GenBank, EMBL, DDBJ y PDB con el programa BLAST (260) permitió encontrar algunos genes en los que se encontraban estas secuencias, como el de la displasia faciogenital de ratón (91% de identidad), el gen de la proteína de choque térmico hsp70 de diversas especies (protozoos, mamíferos, humanos), el gen del ARNr 5S de ratón, el gen humano de la subunidad  $\alpha 1$  del canal de calcio dependiente de voltaje, entre otros. Esto apuntaría la implicación de las proteínas estudiadas en esta Tesis en la regulación de diversos genes en mamíferos, incluyendo el hombre.

La regulación de la expresión de un gen a nivel de la transcripción es un proceso complejo en el cual intervienen diferentes elementos que, a su vez, se encuentran sometidos a diferentes vías de regulación. En el caso del promotor I del gen de la GGT hemos determinado la presencia de secuencias con actividad reguladora positiva y negativa; más aún, la generación de un promotor deleciónado provoca un marcado aumento de la eficacia y la especificidad de la transcripción, lo que pone de relieve la importancia de las secuencias promotoras en la regulación de la transcripción. En este promotor no se han encontrado secuencias posicionadoras de nucleosomas. Por otro lado, a partir de extractos hepáticos y de extractos de líneas celulares derivadas de rata, se han detectado, purificado y caracterizado factores proteicos nucleares con actividad de unión a secuencias de este promotor I; estos factores constituyen complejos multiproteicos que interactúan con el ADN envolviendo a la doble hélice y cuyos elementos están regulados por fosforilación, glicosilación y, probablemente, por la generación de precursores inactivos; la actividad de estos factores se ve sensiblemente afectada por la metilación de las citosinas del ADN y no parecen ser capaces de modificar estructuras de cromatina. La actuación conjunta de estas secuencias *cis* y de los factores proteicos *trans* es la responsable del control de la regulación de la expresión del promotor I del gen de la GGT de rata.

## **CONCLUSIONES**



- A partir de extractos hepáticos de rata, se han detectado, purificado y caracterizado factores nucleares con pesos moleculares de 100, 70, 41 y 38 kDa, con actividad de unión a la secuencia de -586 a -566 del promotor I del gen de la GGT de rata.

- En líneas celulares derivadas de rata se han detectado estas mismas proteínas con actividad de unión a la secuencia de -586 a -566 del promotor I del gen de la GGT de rata.

- Se ha descartado que el factor Sp1 forme parte del complejo multiproteico estudiado.

- Los factores nucleares estudiados se unen al ADN constituyendo complejos multiproteicos que interaccionan con la secuencia envolviendo a la doble hélice; en el complejo multiproteico hemos observado la presencia de una proteína de 70 kDa que presenta restos glucídicos de  $\alpha$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D-manosa y N-acetilglucosamina y que se fosforila con PK-A en una pequeña fracción.

- Estos factores nucleares no parecen ser capaces de modificar estructuras de cromatina.

- La transcripción del promotor delecionado AC (fragmento de -765 a -514 adyacente al fragmento de -143 a +144) se debe específicamente a la acción de los factores presentes en los extractos nucleares de hígado de rata. En este promotor delecionado el acercamiento de la secuencia de unión de los factores en estudio al lugar de inicio de la transcripción, aumenta la especificidad y la eficacia de la transcripción.

- La metilación del ADN provoca la represión de la transcripción mediada por estos factores nucleares.

- Diversas zonas de la secuencia que se extiende desde -765 hasta +144, presentan actividad positiva o negativa sobre la expresión del promotor I del gen de la GGT de rata: la secuencia que se extiende desde -508 a -143 posee actividad reguladora negativa, pues promueve una baja expresión de las construcciones del promotor I, del gen de la GGT de rata, que la contienen (construcciones pGL3/222-5 y pGL3/229-5). El acercamiento de las secuencias presentes en las regiones de -765 a -508 y de -143 a +144 (pGL3/30-7) tiene un efecto regulador positivo en la actividad transcripcional del promotor I.

- Sustancias como la dexametasona y la SAM son capaces de interferir la expresión del gen de la GGT en líneas celulares derivadas de rata.

- Análisis informáticos han mostrado la posible relación entre las proteínas en estudio y factores transcripcionales de la familia Egr/Krox.

- En resumen, en la regulación de la expresión del promotor I del gen de la GGT de rata están implicados tanto elementos *cis*, como elementos *trans*, que actuarían de manera coordinada y no aisladamente, regulando la tasa de expresión final del promotor en la célula.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- 1. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998).**  
*Essential Cell Biology; An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*; capítulos 7 y 8. Garland Publishing Inc..
- 2. Mathews, van Holde (1996).**  
*Biochemistry*, 2ª edición; capítulo 28. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- 3. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. (1995).**  
*Molecular Cell Biology*, 3ª edición; capítulo 11. Scientific American Books, Inc..
- 4. Ogbourne, S., Antalis, T.M. (1998).**  
Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.*, **331**; 269-282.
- 5. Schibler, U., Sierra, F. (1987).**  
Alternative promoters in developmental gene expression. *Ann. Rev. Genet.*, **21**; 237-257.
- 6. Jackson, R.J., Wickens, M. (1997).**  
Translational controls impinging on the 5'-untranslated region and initiation factor proteins. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **7**; 233-241.
- 7. Hanover, J.A. (1992).**  
The nuclear pore: at the crossroads. *FASEB J.*, **6**; 2288-2295.
- 8. Dynan, W.S., Tjian, R. (1985).**  
Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence specific DNA-binding proteins. *Nature*, **316**; 774-778.
- 9. Yang, V.W. (1998).**  
Eukaryotic transcription factors: identification, characterization and functions. *J. Nutr.*, **128**; 2045-2051.
- 10. Ptashne, M. (1986).**  
Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature*, **322**; 697-701.
- 11. Ayoubi, T.A.Y., van de Ven, W.J.M. (1996).**  
Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.*, **10**; 453-460
- 12. Stapleton, G., Somma, M.P., Lavia, P. (1993).**  
Cell type-specific interactions of transcription factors with a housekeeping promoter *in vivo*. *Nucleic Acids Res.*, **21**; 2465-2471.
- 13. Fischer, G., Schmidt, C., Opitz, J., Cully, Z., Kühn, K., Püschel, E. (1993).**  
Identification of a novel sequence element in the common promoter region of human collagen type IV genes, involved in the regulation of divergent transcription. *Biochem. J.*, **292**; 687-695.
- 14. Hampsey, M. (1998).**  
Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2**; 465-503.
- 15. Pedersen, A.G., Baldi, P., Chauvin, Y., Brunak, S. (1998).**  
DNA structure in human RNA polymerase II promoters. *J. Mol. Biol.*, **281**; 663-673.
- 16. Hoffmann, A., Oelgeschläger, T., Roeder, R.G. (1997).**  
Considerations of transcriptional control mechanisms: Do TFIIID-core promoter complexes recapitulate nucleosome-like functions? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**; 8928-8935.
- 17. van der Vliet, P.C., Verrijzer, C.P. (1993).**

Bending of DNA by transcription factors. *BioEssays*, **15**; 25-32.

**18. Werner, M.H., Burley, S.K.** (1997).

Architectural transcription factors: proteins that remodel DNA. *Cell*, **88**; 733-736.

**19. van Holde, K., Zlatanova, J.** (1996).

Chromatin architectural proteins and transcription factors: a structural connection. *BioEssays*, **18**; 697-700.

**20. Aoki, T., Koch, K.S., Leffert, H.L.** (1997).

Attenuation of gene expression by a trinucleotide repeat-rich tract from the terminal exon of the rat hepatic polymeric immunoglobulin receptor gene. *J. Mol. Biol.*, **267**; 229-236.

**21. Drew, H.R., Travers, A.A.** (1985).

DNA bending and its relation to nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.*, **186**; 773-790.

**22. Wang, Y.H., Griffith, J.** (1995).

Expanded CTG triplets blocks from the myotonic dystrophy gene create the strongest known natural nucleosome positioning elements. *Genomics*, **25**; 570-573.

**23. Kozak, M.** (1991).

An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.*, **115**; 887-903.

**24. Kozak, M.** (1987).

An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**; 8125-8148.

**25. Nabeshima, Y., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., Ogata, K.** (1984).

Alternative transcription and two modes of splicing results in two myosin light chains from one gene. *Nature*, **308**; 333-338.

**26. Periasamy, M., Strehler, E.E., Garfinkel, L.I., Gubits, R.M., Ruiz-Opazo, N., Nadal-Ginard, B.** (1984).

Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *J. Biol. Chem.*, **259**; 13595-13604.

**27. Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., Burley, S.K.** (1993).

Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364**; 412-420.

**28. Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F., Wingender, E.** (1999).

Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res.*, **27**; 318-322.

**29. Jackson, S.P., Tjian, R.** (1988).

O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*, **55**; 125-133.

**30. Daniel, P.B., Walker, W.H., Habener, J.F.** (1998).

Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu. Rev. Nutr.*, **18**; 353-383.

**31. Calkhoven, C.F., Geert, A.B.** (1996).

Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem.J.*, **317**; 329-342.

**32. Armstrong, S.A., Barry, D.A., Leggett, R.W., Mueller, C.R.** (1997).

Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, **272**; 13489-13495.

**33. Brunet, A., Pouyssegur, J.** (1997).

Mammalian MAP kinase modules: how to transduce specific signals. *Essays Biochem.* **32**; 1-16.

**34. Montminy, M. (1997).**

Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**; 807-822.

**35. Treisman, R. (1996).**

Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **8**; 205-215.

**36. Leggett, R.W., Armstrong, S.A., Barry, D., Mueller, C.R. (1995).**

Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver. *J. Biol. Chem.*, **270**; 25879-25884.

**37. Hunter, T., Karin, M. (1992).**

The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*, **70**; 375-387.

**38. Voit, R., Kuhn, A., Sander, E.E. Grummt, I. (1995).**

Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res.*, **23**; 2593-2599.

**39. Merchant, J.L., Du, M., Todisco, A. (1999).**

Sp1 phosphorylation by Erk2 stimulates DNA binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**; 454-461.

**40. Haspel, R.L., Salditt-Georgieff, M., Darnell, J.E.Jr. (1996).**

The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J.*, **15**; 6262-6268.

**41. Day, M.L., Fahrner, T.J., Aykent, S., Milbrandt, J. (1990).**

Zinc finger protein NGFI-A exists in both nuclear and cytoplasmic forms in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **265**; 15253-15260.

**42. Kelly, W.G., Dahmus, M.E., Hart, G.W. (1993).**

RNA polymerase II is a glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **268**; 10416-10424.

**43. Banerjee, S., Bennion, G.R., Goldberg, M.W., Allen, T.D. (1991).**

ATP dependent histone phosphorylation and nucleosome assembly in a human cell free extract. *Nucleic Acids Res.*, **19**; 5999-6006.

**44. Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D., Kelly, W.G. (1989).**

Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**; 841-874.

**45. Han, I., Kudlow, J.E. (1997).**

Reduced O-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.*, **17**; 2550-2558.

**46. Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R., Kudlow, J.E. (1997).**

O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.*, **17**; 6472-6480.

**47. Berger, S.L. (1999).**

Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**; 336-341.

**48. Pazin, M.J., Kadonaga, J.T. (1997).**

What's up and down with histone deacetylation and transcription?. *Cell*, **89**; 325-328.

**49. Kuo, M.H., Allis, C.D. (1998).**

Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays*, **20**; 615-626.

**50. Sen, C.K., Packer, L. (1996).**

Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, **10**; 709-720.

**51. Roeder, R.G.** (1996).

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.*, **21**; 327-335.

**52. Martínez, E., Chiang, C.M., Ge, H., Roeder, R.G.** (1994).

TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J.*, **13**; 3115-3126.

**53. Martínez, E., Zhou, Q., L'Étoile, N., Oelgeschläger, T., Berk, A.J., Roeder, R.G.** (1995).

Core promoter-specific function of a mutant transcription factor TFIID defective in TATA-box binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**; 11864-11868.

**54. Kingston, R.E., Bunker, C.A., Imbalzano, A.M.** (1996).

Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.*, **10**; 905-920.

**55. Kim, Y.J., Björklund, S., Li, Y., Saire, M.H., Kornberg, R.D.** (1994).

A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, **77**; 599-608.

**56. Nur, I., Szyf, M., Razin, A., Glaser, G., Röttem, S., Razin, S.** (1985).

Prokaryotic and eukaryotic traits of DNA methylation in Spiroplasmas (Mycoplasmas). *J. Bacteriol.*, **164**; 19-24.

**57. Kass, S.U., Landsberger, N., Wolffe, A.P.** (1997).

DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.*, **7**; 157-165.

**58. Zingg, J.M., Jones, P.A.** (1997).

Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **18**; 869-882.

**59. Nan, X., Campoy, F.J., Bird, A.** (1997).

MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, **88**; 471-481.

**60. Barlow, D.P.** (1993).

Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation. *Science*, **260**; 309-310.

**61. Ogawa, O., Eccles, M., Szeto, J., McNoe, L., Yun, K., Maw, M., Smith, P., Reeve, A.** (1993).

Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature*, **362**; 749-751.

**62. Rainier, S., Johnson, L., Dobry, C., Ping, A., Grundy, P., Feinberg, A.** (1993).

Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*, **362**; 747-749.

**63. Davies, K.** (1992).

Imprinting and splicing join together. *Nature*, **360**; 492.

**64. Goetz, S.E., Vogelstein, B., Hamilton, S.R., Feinberg, A.P.** (1985).

Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, **228**; 187-190.

**65. Jones, P.A., Laird, P.W.** (1999).

Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet.*, **21**; 163-166.

**66. Robertson, K.D., Jones, P.A.** (2000).

DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, **21**; 461-467.

**67. Tycko, B.** (2000).

Epigenetic gene silencing in cancer. *J. Clin. Invest.*, **105**; 401-407.

68. **Challita, P.M., Skelton, D., El-Khoueiry, A., Yu, X.Y., Weinberg, K., Kohn, D.B.** (1995). Multiple modifications in *cis* elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. *J. Virol.*, **69**; 748-755.
69. **Ng, H.H., Bird, A.** (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **9**; 158-163.
70. **Antequera, F., Boyes, J., Bird, A.** (1990). High levels of *de novo* methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cells lines. *Cell*, **62**; 503-514.
71. **Tazi, J., Bird, A.** (1990). Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell*, **60**; 909-920.
72. **Höller, M., Westin, G., Jiricny, J., Schaffner, W.** (1988). Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev.*, **2**; 1127-1135.
73. **Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., Bird, A.P.** (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, **58**; 499-507.
74. **Wolffe, A.** (1992). *Chromatin: Structure and Function*; capítulo 2. Academic Press, London.
75. **Boyes, J., Bird, A.** (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, **64**; 1123-1134.
76. **Jost, J.P., Hofsteenge, J.** (1992). The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially *in vitro* and *in vivo* to methylated nonspecific DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**; 9499-9503.
77. **Cervoni, N., Bhattacharya, S., Szyf, M.** (1999). DNA demethylase is a processive enzyme. *J. Biol. Chem.*, **274**; 8363-8366.
78. **Bhattacharya, S., Ramchandani, S., Cervoni, N., Szyf, M.** (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, **397**; 579-583.
79. **Ramchandani, S., Bhattacharya, S., Cervoni, N., Szyf, M.** (1999). DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**; 6107-6112.
80. **Murray, E.J., Grosveld, F.** (1987). Site specific demethylation in the promoter of human  $\gamma$ -globin gene does not alleviate methylation mediated suppression. *EMBO J.*, **6**; 2329-2335.
81. **Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., Cedar, H.** (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell*, **44**; 535-543.
82. **Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myohanen, S., Herman, J.G., Baylin, S.B.** (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.*, **21**; 103-107.
83. **Hayes, J.J., Wolffe, A.P.** (1992). The interaction of transcription factors with nucleosomal DNA. *Bioessays*, **14**; 597-603.
84. **Bird, A.P., Wolffe, A.P.** (1999). Methylation-induced repression. Belts, braces and chromatin. *Cell*, **99**; 451-454.

- 85. Björklund, S., Almouzni G., Davidson, I., Nightingale, K.P., Weiss, K. (1999).**  
Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell*, **96**; 759-767.
- 86. Felsenfeld, G. (1992).**  
Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature*, **355**; 219-224.
- 87. Hartzog, G.A., Winston, F. (1997).**  
Nucleosomes and transcription: recent lessons from genetics. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **7**; 192-198.
- 88. Bradbury, E.M. (1992).**  
Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *BioEssays*, **14**; 9-16.
- 89. Berger, S.L. (1999).**  
Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**; 336-341.
- 90. Beato, M., Eisfeld, K. (1997).**  
Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.*, **25**; 3559-3563.
- 91. Elgin, S.C.R. (1988).**  
The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.*, **263**; i9259-i9262.
- 92. Sandaltzopoulos, R., Becker, P.B. (1997).**  
Antirepression, potentiation and activation of promoters in reconstituted chromatin. En: *Nucleic Acids and Molecular Biology*, **11**; 291-307. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 93. Croston, G.E., Kerrigan, L.A., Lira, L.M., Marshak, D.R., Kadonaga, J.T. (1991).**  
Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science*, **251**; 643-649.
- 94. Tsukiyama, T., Becker, P.B., Wu, C. (1994).**  
ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature*, **367**; 525-532.
- 95. Wallrath, L.L., Quinn, L., Granok, H., Elgin, S.C.R. (1994).**  
Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *BioEssays*, **16**; 165-170.
- 96. Varga-Weisz, P.D., Becker, P.B. (1995).**  
Transcription factor-mediated chromatin remodelling: mechanisms and models. *FEBS Letters*, **369**; 118-121.
- 97. Becker, P.B. (1994).**  
The establishment of active promoters in chromatin. *BioEssays*, **16**, 541-547.
- 98. Varga-Weisz, P.D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., Becker, P.B. (1997).**  
Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, **388**; 598-602.
- 99. Kadonaga, J.T. (1998).**  
Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell*, **92**; 307-313.
- 100. Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A., Hörz, W. (1986).**  
Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.*, **5**; 2689-2696.
- 101. Graessmann, M., Graessmann, A. (1993).**  
*DNA methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Jost & Saluz eds.. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.

- 102. Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993).**  
A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**; 971-983.
- 103. Orr, H.T., Chung, M., Banfi, S., Kwiatkowski, T.J., Jr., Servadio, A., Beaudet, A.L., McCall, A.E., Duvick, L.A., Ranum, L.P.W., Zoghbi, H.Y. (1993).**  
Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.*, **4**; 221-226.
- 104. Kremer, E.J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S.T., Schlessinger, D., Sutherland, G.R., Richards, R.I. (1991).**  
Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science*, **252**; 1711-1714.
- 105. Vilain, A., Vogt, N., Dutrillaux, B., Malfoy, B. (1999).**  
DNA methylation and chromosome instability in breast cancer cell lines. *FEBS Lett.*, **460**; 231-234.
- 106. Kanai, Y., Ushijima, S., Nakanishi, Y., Hirohashi, S. (1999).**  
Reduced mRNA expression of the DNA demethylase, MBD2, in human colorectal and stomach cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**; 962-966.
- 107. Curthoys, N.P., Hughey, R.P. (1979).**  
Characterization and physiological function of rat renal  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase. *Enzyme*, **24**; 383-403.
- 108. Visvikis, A., Thioudellet, C., Oster, T., Fournel-Gigleux, S., Wellman, M., Siest, G. (1991).**  
High-level expression of enzymatically active mature human  $\gamma$ -glutamyltransferase in transgenic V79 Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**; 7361-7365.
- 109. Gardell, S.J., Tate, S.S. (1981).**  
Subunit interactions in gamma-glutamyl transpeptidase. Reconstitution of the active species from isolated subunits. *J. Biol. Chem.*, **256**; 4799-4804.
- 110. Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, N. (1983).**  
Studies on the structure of gamma-glutamyltranspeptidase. III. Evidence that the amino terminus of the heavy subunit is the membrane binding segment. *J. Biochem.*, **93**; 1427-1433.
- 111. Tate, S.S., Meister, A. (1977).**  
Affinity labeling of gamma-glutamyl-transpeptidase and location of the gamma-glutamyl binding site on the light subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**; 931-935.
- 112. Hughey, R.P., Curthoys, N.P. (1976).**  
Comparison of the size and physical properties of gamma-glutamyltranspeptidase purified from rat kidney following solubilization with papain or with Triton X-100. *J. Biol. Chem.*, **251**; 7863-7870.
- 113. Tate, S.S., Meister, A. (1975).**  
Identity of maleate-stimulated glutaminase with gamma-glutamyltranspeptidase in rat kidney. *J. Biol. Chem.*, **250**; 4619-4627.
- 114. Capraro, M.A., Hughey, R.P. (1983).**  
Processing of the propeptide form of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase. *FEBS Lett.*, **157**; 139-143.
- 115. Altman, R.A., Hughey, R.P. (1986).**  
The identification of two subcellular sites for cleavage of gamma-glutamyltranspeptidase propeptide. *Biochem. Int.*, **13**; 1009-1018.
- 116. Kottgen, E., Reutter, W., Gerok, W. (1976).**  
Two different gamma-glutamyltransferases during development of liver and small intestine: a fetal (sialo-) and adult (asialo-) glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**; 61-66.

- 117. Arai, K., Sumi, S., Toshida, K., Komoda, T. (1995).**  
A precursor form of human kidney gamma-glutamyltransferase in normal and cancerous tissues, and its possible post-translational modification. *Biochim. Biophys. Acta*, **1253**; 33-38.
- 118. Ohita, H., Sawabu, N., Kawakami, H., Watanabe, H., Ozaki, K., Toya, D., Hattori, N. (1993).**  
Characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from human hepatocellular carcinoma, compared with enzymes from normal liver and cirrhotic liver. *Clin. Chim. Acta*, **214**; 83-92.
- 119. Hanigan, M.H., Pitot, H.C. (1985).**  
Gamma-glutamyl transpeptidase: its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **6**; 165-172.
- 120. Guellaén, G. (1989).**  
Rôle physiologique de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. *M/S Synthèse*, **5**; 637-644.
- 121. Bannai, S. and Tateishi, N. (1986).**  
Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J. Membrane Biol.*, **89**; 1-8.
- 122. Kaplowitz, N., Aw, T.Y., Ookhtens, M. (1985).**  
The regulation of hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**; 715-744.
- 123. Dominici, S., Valentini, M., Maellaro, E., Del Bello, B., Paolicchi, A., Lorenzini, E., Tongiani, R., Comporti, M., Pompella, A. (1999).**  
Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-dependent  $H_2O_2$  production and S-thiolation. *Free Rad. Biol. Med.*, **27**; 623-635.
- 124. Griffith, O.W., Bridges, R.J., Meister, A. (1979).**  
Transport of gamma-glutamyl amino acids: role of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **12**; 6913-6922.
- 125. Marshall, W.J., Bangert, S.K. (1995).**  
*Clinical Biochemistry. Metabolic and clinical aspects*, páginas 155, 242-244 y 248. Churchill Livingstone.
- 126. Lieberman, M.W., Barrios, R., Carter, B.Z., Habib, G.M., Lebovitz, R.M., Rajagopalan, S., Sepúlveda, A.R., Shi, Z.Z., Wan, D.F. (1995).**  
 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase: What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions?. *Am. J. Path.*, **147**; 1175-1185.
- 127. Pace-Asciak, C.R., Laneuville, O., Su, W.G., Corey, E.J., Gurevich, N., Wu, P., Carlen, P.L. (1990).**  
A glutathione conjugate of hepatoxilin A3: formation and action in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**; 3037-3041.
- 128. Carter, B.Z., Wiseman, A.L., Orkiszewski, R., Ballard, K.D., Ou, C.N., Lieberman, M.W. (1997).**  
Metabolism of leukotriene C4 in gamma-glutamyltranspeptidase-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, **272**; 12305-12310.
- 129. Carter, B.Z., Shi, Z.Z., Barrios, R., Lieberman, M.W. (1998).**  
Gamma-glutamyl-leukotrienase, a gamma-glutamyltranspeptidase gene family member, is expressed primarily in spleen. *J. Biol. Chem.*, **273**; 28277-28285.
- 130. Henson, S.E., Nichols, T.C., Holers, V.M., Karp, D.R. (1999).**  
The ectoenzyme  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase regulates antiproliferative effects of S-nitrosoglutathione on human T and B lymphocytes. *J. Immunol.*, **163**; 1845-1852.
- 131. Jourdain, D., Hallén K., Feelisch, M., Grisham, M.B. (2000).**  
Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**; 409-417.
- 132. Chevalier, C., Thiberge, J.M., Ferrero, R.L., Labigne, A. (1999).**  
Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.*, **31**; 1359-1372.

- 133. Moellering, D., McAndrew, J., Patel, R.P., Forman, H.J., Mulcahy, R.T., Jo, H., Darley-USmar, V.M.** (1999).  
The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. *FEBS Lett.*, **448**; 292-296.
- 134. Paolicchi, A., Minotti, G., Tonarelli, P., Tongiani, R., De Cesare, D., Mezzetti, A., Dominici, S., Comporti, M., Pompella, A.** (1999).  
Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation: a potential mechanism in atherosclerosis. *J. Investig. Med.*, **47**; 151-160.
- 135. Lieberman, M.W., Wiseman, A.L., Shi, Z.Z., Carter, B.Z., Barrios, R., Ou, C.N., Chévez-Barrios, P., Wang, Y., Habib, G.M., Goodman, J.C., Huang, S.L., Lebovitz, R.M., Matzuk, M.M.** (1996).  
Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyltranspeptidase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**; 7923-7926.
- 136. Will, Y., Fischer, K.A., Horton, R.A., Kaetzel, R.S., Brown, M.K., Hedstrom, O., Lieberman, M.W., Reed, D.J.** (2000).  
Gamma-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial function and cellular function. *Hepatology*, **32**; 740-749.
- 137. Lawrence, B.P., Will, Y., Reed, D.J., Kerkvliet, N.I.** (2000).  
Gamma-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model for understanding the consequences of diminished glutathione on T cell-dependent immune responses. *Eur. J. Immunol.*, **30**; i902-i910.
- 138. Ogawa, M., Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Takeuchi, Y., Aiso, S.** (1998).  
Immunohistochemical study of localization of gamma-glutamyltranspeptidase in the rat brain. *Tissue Cell*, **30**; 597-601.
- 139. Hanigan, M.H., Frierson, H.F.** (1996).  
Immunohistochemical detection of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, **44**; 1101-1108.
- 140. Meister, A., Larsson, A.** (1989).  
*The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6ª edición; páginas 855-868. Editado por Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D.. New York McGraw-Hill.
- 141. Meister, A., Larsson, A.** (1995).  
*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol. I; 7ª edición. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., editores. McGraw Hill, Inc.
- 142. González de Buitrago, J.M.** (1998).  
*Bioquímica Clínica*, páginas 583-584. McGraw Hill Interamericana.
- 143. Horn, K.D., Wax, P., Schneider, S.M., Martin, T.G., Nine, J.S., Moraca, M.A., Virji, M.A., Aronica, P.A., Kalipatnapu, N.R.** (1999).  
Biomarkers of liver regeneration allow early prediction of hepatic recovery after acute necrosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **112**; 351-357.
- 144. Mihm, S., Monazahian, M., Grethe, S., Fechner, C., Ramadori, G., Thomssen, R.** (1999).  
Ratio of serum  $\gamma$ -GT/ALT rather than ISDR variability is predictive for initial virological response to IFN- $\alpha$  in chronic HCV infection. *J. Med. Virol.*, **58**; 227-234.
- 145. Tsutsumi, M., Sakamuro, D., Takada, A., Zang, S.C., Furukawa, T., Taniguchi, N.** (1996).  
Detection of a unique  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **23**; 1093-1097.

- 146. Gerber, M.A., Thung, S.N. (1980).**  
Enzyme patterns in human hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.*, **98**; 395-400.
- 147. Taniguchi, N., Lizuka, S., Zhe, Z.N., House, S., Yokosawa N., Ono, M., Kinoshita, K., Makita, A., Sekiya, C. (1985).**  
Measurement of human serum immunoreactive gamma-glutamyltranspeptidase in patients with malignant tumors using enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer Res.*, **45**; 5835-5839.
- 148. Courtay, C., Heisterkamp, N., Siest, G., Groffen, J. (1994).**  
Expression of multiple  $\gamma$ -glutamyltransferase genes in man. *Biochem. J.*, **297**; 503-508.
- 149. Figlewicz, D.A., Delattre, O., Guellaën, G., Krizus, A., Thomas, G., Zucman, J., Rouleau, G.A. (1993).**  
Mapping of human gamma-glutamyltranspeptidase genes on chromosome 22 and other human autosomes. *Genomics*, **17**; 299-305.
- 150. Rajagopalan, S., Wan, D.F., Habib, G.M., Sepúlveda, A.R., McLeod, M.R., Lebovitz, R.M., Lieberman, M.W. (1993).**  
Six mRNAs with different 5' ends are encoded by a single  $\gamma$ -glutamyltransferase gene in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**; 6179-6183.
- 151. Sepúlveda, A.R., Carter, B.Z., Habib, G.M., Lebovitz, R.M., Lieberman, M.W. (1994).**  
The mouse  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase gene is transcribed from at least five separate promoters. *J. Biol. Chem.*, **269**; 10699-10705.
- 152. Habib, G.M., Carter, B.Z., Sepúlveda, A.R., Sui, Z.Z., Wan, D.F., Lebovitz, R.M., Lieberman, M.W. (1995).**  
Identification of a sixth promoter that directs the transcription of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase type III RNA in mouse. *J. Biol. Chem.*, **270**; 13711-13715.
- 153. Darbouy, M., Chobert, M.N., Lahuna, O., Okamoto, T., Bonvalet, J.P., Farman, N., Laperche, Y. (1991).**  
Tissue-specific expression of multiple  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase mRNAs in rat epithelia. *Am. J. Physiol.*, **261**; C1130-C1137.
- 154. Rajagopalan, S., Park, J.H., Patel, P.D., Lebovitz, R.M., Lieberman, M.W. (1990).**  
Cloning and analysis of the rat gamma-glutamyltransferase gene. *J. Biol. Chem.*, **265**; 11721-11725.
- 155. Brouillet, A., Darbouy, M., Okamoto, T., Chobert, M.N., Lahuna, O., Garlatti, M., Goodspeed, D., Laperche, Y. (1994).**  
Functional characterization of the rat  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase promoter that is expressed and regulated in the liver and hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **269**; 14878-14884.
- 156. Okamoto, T., Darbouy, M., Brouillet, A., Lahuna, O., Chobert, M.N., Laperche, Y. (1994).**  
Expression of the rat gamma-glutamyltranspeptidase gene from a specific promoter in the small intestine and in hepatoma cells. *Biochemistry*, **33**; 1536-1543.
- 157. Palladino, M.A., Hinton, B.T. (1994).**  
Developmental regulation of the expression of multiple gamma-glutamyltranspeptidase mRNAs in the postnatal rat epididymis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**; 554-559.
- 158. Courtay, C. (1993).**  
*Étude de la famille multigénique et de l'expression tissu-spécifique des GGT.* Tesis Doctoral.
- 159. Leh, H. (1997).**  
*Organisation moléculaire et étude des promoteurs de la GGT humaine.* Tesis Doctoral.

- 160. Pawlak, A., Wu, S.J., Bulle, F., Suzuki, A., Chikhi, N., Ferry, N., Baik, J.H., Siegrist, S., Guellaén, G.** (1989).  
Different gamma-glutamyltranspeptidase mRNAs are expressed in human liver and kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**; 912-918.
- 161. Wetmore, L.A., Gerard, C., Drazen, J.M.** (1993).  
Human lung expresses unique  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**; 7461-7465.
- 162. Carter, B.Z., Habib, G.M., Sepúlveda, A.R., Barrios, R., Wan, D.F., Lebovitz, R.M., Lieberman, M.W.** (1994).  
Type VI RNA is the major  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase RNA in the mouse small intestine. *J. Biol. Chem.*, **269**; 24581-24585.
- 163. Nomura, S., Lahuna, O., Suzuki, T., Brouillet, A., Chobert, M.N., Laperche, Y.** (1997).  
A specific distal promoter controls  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase gene expression in undifferentiated rat transformed liver cells. *Biochem. J.*, **326**; 311-320.
- 164. Kurauchi, O., Lahuna, O., Darbouy, M., Aggerbeck, M., Chobert, M.N., Laperche, Y.** (1991).  
Organization of the 5' end of the rat gamma-glutamyltranspeptidase gene: structure of a promoter active in the kidney. *Biochemistry*, **30**, 1618-1623.
- 165. Coloma, J., García-Gimeno, A.** (1991).  
Tissue-specific methylation in the 5' flanking region of the gamma-glutamyl transpeptidase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**; 229-234.
- 166. Lahuna, O., Brouillet, A., Chobert, M.N., Darbouy, M., Okamoto, T., Laperche, Y.** (1992).  
Identification of a second promoter which drives the expression of gamma-glutamyltranspeptidase in rat kidney and epididymis. *Biochemistry*, **31**; 9190-9196.
- 167. Habib, G., Rajagopalan, S., Godwin, A.K., Lebovitz, R.M., Lieberman, M.W.** (1992).  
The same gamma-glutamyltranspeptidase RNA species is expressed in fetal liver, hepatic carcinomas and rasT24-transformed rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.*, **5**; 75-80.
- 168. Palladino, M.A., Laperche, Y., Hinton, B.T.** (1994).  
Multiple forms of gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid are expressed in the adult rat testis and epididymis. *Biol. Reprod.*, **50**; 320-328.
- 169. Palladino, M.A., Hinton, B.T.** (1994).  
Expression of multiple g-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid transcripts in the adult rat epididymis is differentially regulated by androgens and testicular factors in a region-specific manner. *Endocrinology*, **135**; 1146-1156.
- 170. Lan, Z.J., Palladino, M.A., Rudoiph, D.B., Labus, J.C., Hinton, B.T.** (1997).  
Identification, expression and regulation of the transcriptional factor polyomavirus enhancer activator 3, and its putative role in regulating the expression of gamma-glutamyltranspeptidase mRNA-IV in the rat epididymis. *Biol. Reprod.*, **57**; 186-193.
- 171. Lan, Z.J., Lye, R.J., Holic, N., Labus, J.C., Hinton, B.T.** (1999).  
Involvement of polyomavirus enhancer activator 3 in the regulation of expression of gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid-IV in the rat epididymis. *Biol. Reprod.*, **60**; 664-673.
- 172. Joyce-Brady, M., Oakes, S.M., Wuthrich, D., Laperche, Y.** (1996).  
Three alternative promoters of the rat g-glutamyl transferase gene are active in developing lung and are differentially regulated by oxygen after birth. *J. Clin. Invest.*, **97**; 1774-1779.
- 173. Baik, J.H., Siegrist, S., Giuli, G., Lahuna, O., Bulle, F., Guellaén, G.** (1992).  
Tissue and developmental-stage-specific methylation in the two kidney promoters of the rat  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase gene. *Biochem. J.*, **287**; 691-694.

- 174. Wapnir, R.A., Mancusi, V.J., Goldstein, L.A. (1982).**  
Comparative ontogenesis of gamma-glutamyl transpeptidase in rat tissues. *Experientia*, **38**; 647-648.
- 175. Ganong, W.F. (1990).**  
*Fisiología Médica*, página 464. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F..
- 176. Baik, J.H., Griffiths, S., Giuilli, G., Manson, M., Siegrist, S., Guellaén, G. (1991).**  
DNA methylation patterns of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene in embryonic, adult and neoplastic liver. *Carcinogenesis*, **12**; 1035-1039.
- 177. Diederich, M., Wellman, M., Visvikis, A., Puga, A., Siest, G. (1993).**  
The 5' untranslated region of the human gamma-glutamyltransferase mRNA contains a tissue-specific active translational enhancer. *FEBS Lett.*, **332**; 88-92.
- 178. Markey, C.M., Rudolph, D.B., Labus, J.C., Hinton, B.T. (1998).**  
Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyltranspeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. *J. Androl.*, **19**; 92-99.
- 179. Sepúlveda, A.R., Huang, S.L., Lebovitz, R.M., Lieberman, M.W. (1997).**  
A 346-base pair region of the mouse gamma-glutamyltranspeptidase type II promoter contains sufficient *cis*-acting elements for kidney-restricted expression in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **272**; 11959-11967.
- 180. Leh, H., Chikhi, N., Ichino, K., Guellaén, G., Wellman, M., Siest, G., Visvikis, A. (1998).**  
An intronic promoter controls the expression of truncated human gamma-glutamyltransferase mRNAs. *FEBS Lett.*, **434**; 51-56.
- 181. Fiala, S., Fiala, A.E., Dixon, B. (1972).**  
Gamma-glutamyltranspeptidase in transplantable, chemically induced rat hepatomas and "spontaneous" mouse hepatomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**; 1393-1401.
- 182. Gallagher, B.C., Rudolph, D.B., Hinton, B.T., Hanigan, M.H. (1998).**  
Differential induction of gamma-glutamyltranspeptidase in primary cultures of rat and mouse hepatocytes parallels induction during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **19**; 1251-1255.
- 183. Hanigan, M.H. (1995).**  
Expression of gamma-glutamyltranspeptidase provides tumor cells with a selective growth advantage at physiologic concentrations of cyst(e)ine. *Carcinogenesis*, **16**; 181-185.
- 184. Hanigan, M.H., Frierson, H.F., Swanson, P.E., Young, B.R. (1999).**  
Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase. *Hum. Pathol.*, **30**; 300-305.
- 185. Stark, A.A., Russell, J.J., Langenbach, R., Pagano, D.A., Zeiger, E., Huberman, E. (1994).**  
Localization of oxidative damage by a glutathione-g-glutamyl transpeptidase system in preneoplastic lesions in sections of livers from carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis*, **15**; 343-348.
- 186. Yao, D., Jiang, D., Huang, Z., Lu, J., Tao, Q., Yu, Z., Meng, X. (2000).**  
Abnormal expression of hepatoma specific  $\gamma$ -glutamyl transferase and alteration of  $\gamma$ -glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **88**; 761-769.
- 187. Coloma, J., García-Gimeno, A. (1995).**  
Effect of DNA methylation on protein-DNA interactions upstream of the gamma-glutamyltranspeptidase gene. *Biochem. Mol. Biology Int.*, **35**, 21-30.
- 188. Sandaltzopoulos, R., Mitchelmore, C., Bonte, E., Wall G., Becker, P. B. (1995).**  
Dual regulation of the *Drosophila hsp26* promoter *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **23**; 2479-2487.
- 189. Hanahan, D. (1983).**

Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**; 557-580.

**190. Birnboim, H.C., Doly, J. (1979).**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**; 1513-1523.

**191. Ish-Horowicz, D., Burke, J.F. (1981).**

Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acids Res.*, **9**; 2989-2991.

**192. Maxam, A., Gilbert, W. (1980).**

Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.*, **65**; 499-560.

**193. Gorski, K., Carneiro, M., Schibler, U. (1986).**

Tissue-specific *in vitro* transcription from the mouse albumin promoter. *Cell*, **47**; 767-776.

**194. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1995).**

Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

**195. Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983).**

Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.*, **11**; 1475-1489.

**196. Kadonaga, S.T., Tjian, R. (1986).**

Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *PNAS* **83**, 5889-5893.

**197. Fried, M., and Crothers, D.M. (1981).**

Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **9**; 6505-6525.

**198. Garner, M.M., Revzin, A. (1981).**

A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.*, **9**; 3047-3060.

**199. Dent, C.L., Latchman, D.S. (1993).**

*The DNA mobility shift. En: Transcription Factors. A Practical Approach*; págs. 1-26. Latchman, D.S., editor. IRL Press-Oxford University Press.

**200. Galas, D., Schmitz, A. (1978).**

DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.*, **5**; 3157-3170.

**201. Wu, C. (1985).**

An exonuclease protection assay reveals heat-shock element and TATA box DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nature*, **317**; 84-87.

**202. Hillel, Z., Wu, C.W. (1978).**

Photochemical cross-linking studies on the interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with T7 DNA. *Biochemistry*, **17**; 2954-2961.

**203. Siebenlist, U., Gilbert, W. (1980).**

Contacts between *E. coli* RNA polymerase and an early promoter of phage T7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**; 122-126.

**204. Becker, P.B., Tsukiyama, T., Wu, C. (1994).**

Chromatin assembly extracts from *Drosophila* embryos. *Methods Cell. Biol.*, **44**; 207-223.

**205. Wu, C. (1989).**

Analysis of hypersensitive sites in chromatin. *Methods Enzymol.*, **170**; 269-289.

- 206. Nedospasov, S.A., Georgiev, G.P. (1980).**  
Non-random cleavage of SV40 DNA in the compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**; 529-532.
- 207. Wu, C. (1980).**  
The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature*, **286**; 854-860.
- 208. Southern, E.M. (1975).**  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**; 503-508.
- 209. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987).**  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**; 156-159.
- 210. Rosenthal, N. (1987).**  
Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Meth. Enzymol.*, **152**, 704-720.
- 211. Schiele, R., Muller, J., Colinet, E., Siest, G. (1987).**  
Production and certification of an enzyme reference materia for gamma-glutamyltransferase (CRM 319). Part 1: Preparation and characterization. *Clin. Chem.*, **33**, 1971-1977.
- 212. Szasz, G. (1969).**  
A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyltranspeptidase. *Clin. Chem.*, **15**; 124-131.
- 213. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951).**  
Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- 214. Bradford, M.M. (1976).**  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- 215. Kadonaga, J.T. (1990).**  
Assembly and disassembly of the *Drosophila* polymerase II complex during transcription. *J. Biol. Chem.*, **265**; 2624-2631.
- 216. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989).**  
Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 217. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979).**  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, **76**; 4350-4354.
- 218. Kyhse-Andersen, J. (1984).**  
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biochem. Biophys. Meth.*, **10**; 203-209.
- 219. Coloma, J., Pitot, H.C. (1986).**  
Characterization and sequence of a cDNA clone of gamma-glutamyltranspeptidase. *Nucleic Acids Res.*, **14**; 1393-1403.
- 220. Marck, Ch. (1988).**  
"DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res.*, **16**; i829-i836.
- 221. García Gimeno, M.A. (1994).**  
*Elementos implicados en la regulación del gen de la GGT*. Tesis Doctoral.

- 222. Rohlf, C., Ahmad, S., Borellini, F., Lei, J., Glazer, R.I.** (1997).  
Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **272**; 21137-21141.
- 223. Promega Corp.** (1994).  
pGL3 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual.
- 224. Giulidori, P., Galli-Kienle, M., Catto, E., Stramentinoli, G.** (1984).  
Transmethylation, transsulfuration and aminopropylation reactions of S-adenosyl-L-methionine in vivo. *J. Biol. Chem.*, **259**; 4205-4211.
- 225. El yaagoubi, M., Visvikis, A., Siest, G., Wellman, M.** (1995).  
Developmental- and tissue-specific DNA methylation patterns and expression of rat gamma-glutamyltransferase. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **36**; 257-264.
- 226. Molloy, P.L.** (1986).  
Effects of DNA methylation on specific transcription by RNA polymerase II *in vitro*. *Mol. Biol. Rep.*, **11**; 13-17.
- 227. Baxevanis, A.D., Arents, G., Moudrianakis, E., Landsman, D.** (1995).  
A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res.*, **23**; 2685-2691.
- 228. Jackson, S.P.** (1993).  
*Identification and characterization of eukaryotic transcription factors*. En: *Gene transcription. A practical approach*; capítulo 5. Hames, B.D. y Higgins, S.J. editores. IRL Press).
- 229. Stryer, L.** (1990).  
*Reordenación de genes: recombinación y transposición*. En: *Bioquímica, 3ª ed.*; págs. 693-708; W.H. Freeman & Co. (eds.); ed. Reverté.
- 230. Nicolas, R.H., Goodwin, G.H.** (1993).  
*Purification and cloning of transcription factors*. En: *Transcription Factors. A Practical Approach*; capítulo 4; Latchman, D.S. (eds.); IRL Press.
- 231. Norbury, C., Nurse, P.** (1992).  
Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**; 441-470.
- 232. Beullens, M., van Eynde, A., Bollen, M., Stalmans, W.** (1993).  
Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (NIPP-1) by protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, **268**; 13172-13177.
- 233. van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torrekens, S., van Leuven, F., Stalmans, W., Bollen, M.** (1995).  
Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein-phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J. Biol. Chem.*, **270**; 28068-28074.
- 234. Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S., Tjian, R.** (1990).  
GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*, **63**; 155-165.
- 235. Black, A.R., Jensen, D., Lin, S.Y., Azizkhan, J.C.** (1999).  
Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **274**; 1207-1215.
- 236. Kennelly, P.J., Krebs, E.G.** (1991).  
Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, **266**; 15555-15558.
- 237. Swarup, G., Cohen, S., Garbers, D.L.** (1981).

Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **256**; 8197-8201.

**238. Thoma, F.** (1992).

Nucleosome positioning. *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**; 1-19.

**239. Raff, J.W., Kellum, R., Alberts, B.** (1994).

The *Drosophila* GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle. *EMBO J.*, **13**; 5977-5983.

**240. Granok, H., Leibovitch, B.A., Shaffer, C.D., Elgin, S.C.R.** (1995).

Chromatin. Ga-ga over GAGA factor. *Curr. Biol.*, **5**; 238-241.

**241. Wall, G., Varga-Weisz, P.D., Sandaltzopoulos, R., Becker, P.B.** (1995).

Chromatin remodeling by GAGA factor and heat shock factor at the hypersensitive *Drosophila hsp26* promoter *in vitro*. *EMBO J.*, **14**; 1727-1736.

**242. Marcand, S., Gasser, S.M., Gilson, E.** (1996).

Chromatin: a sticky silence. *Curr. Biol.*, **6**; 1222-1225.

**243. Kochanek, S., Renz, D., Doerfler, W.** (1993).

Differences in the accessibility of methylated and unmethylated DNA to DNase I. *Nucleic Acids Res.*, **21**; 5843-5845.

**244. Pazin, M.J., Kamakaka, R.T., Kadonaga, J.T.** (1994).

ATP-dependent nucleosome reconfiguration and transcriptional activation from preassembled chromatin templates. *Science*, **266**; 2007-2011.

**245. Pazin, M.J., Bhargava, P., Geiduschek, E.P., Kadonaga, J.T.** (1997).

Nucleosome mobility and the maintenance of nucleosome positioning. *Science*, **276**; 809-812.

**246. Chobert, M.N., Lahuna, O., Lebargy, F., Kurauchi, O., Darbouy, M., Bernaudin, J.F., Guellaén, G., Barouki, R., Laperche, Y.** (1990).

Tissue-specific expression of two gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs with alternative 5' ends encoded by a single copy gene in the rat. *J. Biol. Chem.*, **265**; 2352-2357.

**247. Diederich, M., Wellman, M., Siest, G.** (1994).

Localization of a regulatory region on the 5'-untranslated region of human hepatoma HepG2  $\gamma$ -glutamyltransferase mRNA and response to dexamethasone and antisense oligonucleotide treatment, *FEBS Lett.*, **356**; 307-310.

**248. Swamynathan, S.K., Revathi, C.J., Srinivas, U.K.** (1996).

Identification and characterization of promoter elements responsible for the induction of the albumin gene by heat shock in early embryonic rat liver. *DNA Cell Biol.*, **15**; 897-905.

**249. Levine, A., Cantoni, G.L., Razin, A.** (1991).

Inhibition of promoter activity by methylation: possible involvement of protein mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**; 6515-6518.

**250. Flórez, J., Amado, J.A.** (1992).

*Esteroides corticales y antiinflamatorios esteroideos*. En: *Farmacología humana*, 2ª edición; págs. 811-812; Flórez, J. (editor); Masson-Salvat.

**251. Chobert, M.N., Grondin, G., Brouillet, A., Laperche, Y., Beaudoin, A.R.** (1996).

Control of gamma-glutamyl transpeptidase expression by glucocorticoids in the rat pancreas. Correlation with granule formation. *J. Biol. Chem.*, **271**; 12431-12437.

**252. Rahman, I., Bel, A., Mulier, B., Donaldson, K., MacNee, W.** (1998).

Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **275**; L80-86

**253. Barouki, R., Perrot, N., Bouguet, J., Chobert, M.N., Toffis, V., Pave-Preux, M., Yang, C.S., Beaune, P., Hanoune, J. (1989).**

Glucocorticoid hormones prevent the induction of gamma-glutamyl transpeptidase by ethanol in a rat hepatoma cell line. *Biochem. Pharmacol.*, **38**; 677-684.

**254. Lu, S.C. (2000).**

S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **32**; 391-395.

**255. Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. (1995).**

MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.*, **23**; 4878-4884.

**256. Kutoh, E., Schwander, J. (1993).**

Sp1 interacts with the consensus for Egr-1 gene product with a cellular factor(s) and activates the transcription through this element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**; 1475-1482.

**257. Papanikolaou, N.A., Sabban, E.L. (1999).**

Sp1/Egr1 motif: a new candidate in the regulation of rat tyrosine hydroxylase gene transcription by immobilization stress. *J. Neurochem.*, **73**; 433-436

**258. Galéra, P., Park, R.W., Ducy, P., Mattéi, M.G., Karsenty, G. (1996).**

c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis. *J. Biol. Chem.*, **271**; 21331-21339.

**259. Beckmann, A.M., Wilce, P.A. (1997).**

Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem. Int.*, **31**; 477-510.

**260. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990).**

Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**; 403-410.