



31
2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA REGIÓN REGULATORIA
DEL GEN DE INVOLUCRINA HUMANA**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGO

P R E S E N T A
ADRIANA CADENA CERVANTES

MÉXICO, D. F., AGOSTO, 1993

DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS MARAT ALVAREZ SALAS

LUGAR DONDE SE REALIZÓ:
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I.P.N., DEPARTAMENTO
DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	2
GENES, PORTADORES DE INFORMACION.....	2
MEDIANTE LA ESPECIALIZACION Y LA COOPERACION, LAS CELULAS SE COMBINAN FORMANDO UN UNICO ORGANISMO COORDINADO.....	5
EL EPITELIO ESTA CONFORMADO POR CAPAS CELULARES QUE REVISTEN LAS CAPAS INTERNAS Y EXTERNAS DEL CUERPO.....	9
QUERATINOCITOS EN HUMANOS.....	11
PROTEINAS EXPRESADAS EN EPITELIO ESTRATIFICADO....	14
LA INVOLUCRINA HUMANA, UNA PROTEINA IMPORTANTE EN EL PROCESO DE DIFERENCIACION TERMINAL DE EPITELIO ESTRATIFICADO ESCAMOSO.....	16
GEN QUE CODIFICA LA SINTESIS DE LA PROTEINA INVOLUCRINA HUMANA.....	19
EL INTRON COMO REGULADOR DE LA EXPRESION DEL GEN DE INVOLUCRINA.....	19
OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y METODOS.....	23
PLASMIDOS.....	23
DIGESTION DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCION.....	25
CINETICA DE DIGESTION DE ADN.....	25
MIGRACION ELECTROFORETICA DEL ADN.....	26
PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	28
CLONACION.....	30
LIGACION.....	33
PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES.....	34

TRANSFORMACION DE BACTERIAS.....	35
MINIPREPARACION DE PLASMIDOS.....	36
MAXIPREPARACION DE PLASMIDOS.....	37
PURIFICACION DE PLASMIDOS POR GRADIENTE ISOPICNICO DE CsCl.....	38
CUANTIFICACION DE ADN.....	40
ANALISIS COMPUTACIONAL DE SECUENCIAS DE ADN CONOCIDAS.....	40
RESULTADOS.....	42
DISCUSION.....	64
REFERENCIAS.....	70

R E S U M E N

La epidermis es un tejido que cubre las superficies libres del cuerpo; siendo este tejido de constante desgaste, sus células se renuevan continuamente.

La diferenciación celular en el epitelio estratificado queratinizado es un proceso en el cual algunas proteínas como citoqueratina 14 (proteína del estrato basal), filagrina (proteína del estrato espinoso) e involucrina juegan un papel muy importante.

En particular, la involucrina se presenta de manera diferencial en las capas epiteliales, siendo más abundante en el estrato córneo.

El mecanismo de regulación para la expresión del gen de la involucrina que participa en el proceso de diferenciación se desconoce.

En este trabajo se estudió la región reguladora (RR) del gen que codifica para la proteína involucrina humana (HI) la cual es estudiada como modelo de expresión genética asociado a diferenciación celular.

Dentro de la región 5' no codificadora del gen de HI, se encontraron diversas secuencias consenso que pueden ser reconocidas por factores reguladores de la transcripción como AP1, NF1, K y OCTA. Se realizaron construcciones a partir del plásmido pλ3H6B (tiene insertado el gen de HI) con variables de los diferentes factores de transcripción para estudios posteriores como son análisis in vitro para conocer los factores primordiales para que se lleve a cabo la transcripción.

INTRODUCCION

En 1935 Milislav Demerec visualiza el concepto de genética en la apariencia de un ser vivo como resultado de la interacción de los genes que posee un organismo y el ambiente en el cual se desarrolla (Lewin, B. 1990).

Así pues, con el descubrimiento de la estructura de la doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN) realizado por Watson y Crick en 1953 se dió inicio a la manipulación del ADN, logrando el avance del conocimiento de la anatomía molecular de un número de genes y la organización general de los genomas eucarióticos (Breathnach, R. 1981).

Actualmente se define al gen como una secuencia de ADN que se transcribe como una unidad sencilla y que codifica para ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y cadenas polipeptídicas (Alberts, B. 1989).

GENES, PORTADORES DE INFORMACION

Cuando el interés se centró en el estudio individualizado de los genes, apareció la Ingeniería Genética, empeño que no prosperó por un tiempo ya que el contenido de ADN de una bacteria es muy grande y mucho mayor lo es el de una célula de mamífero, la que encierra unos 2500 millones de pares de bases (pb) de información organizada a lo largo del ADN cromosómico (Shaphiro, A. 1983). Las secuencias de bases se disponen en segmentos de información discretos llamados

genes, cada uno presumiblemente responsable de especificar la estructura de un producto génico como son las proteínas, ARNr y ARNt. Dos técnicas revolucionaron el análisis de la estructura del ADN: La primera de ellas procede del descubrimiento de las enzimas llamadas endonucleasas de restricción extraídas de bacterias; estas enzimas cortan las moléculas de ADN sólo en secuencias específicas localizadas en distintos puntos de la doble hélice. Una enzima de restricción permite establecer puntos de identificación en el ADN y reducir esta molécula -excesivamente grande- a un conjunto de fragmentos discretos. Dichos fragmentos pueden separarse unos de otros, en razón de su tamaño, mediante electroforesis en gel y someterse a un análisis posterior (Maniatis, T. 1982 y Lewin, B. 1990).

La otra técnica es la secuenciación del ADN. Se idearon varios procedimientos por los que se podía determinar el orden y el tipo de la secuencia de bases de un segmento obtenido mediante enzimas de restricción. Gracias a dichas técnicas se estableció, en 1978, la secuencia entera de nucleótidos del genoma del virus de simio SV40 (Shaphiro, A. 1983). Dado que ya se conocía entonces el código genético, que permite traducir una secuencia de bases en el ADN a una secuencia de aminoácidos, ciertas regiones del genoma pudieron traducirse en proteínas. Se dedujo así la estructura de las proteínas de SV40 a partir de la estructura de su ADN. De esta forma se comenzó a estudiar un gen aislado.

Como se ha visto el ADN puede cortarse, modificarse, volverse a ensamblar y multiplicarse (amplificarse) en miles de copias.

Más aún, usando el ADN como molde se fabrica ARN y luego moléculas protéicas de la clase y construcción deseada. La técnica experimental básica para estas manipulaciones se denomina CLONACION DE GENES.

La clonación de genes ha arrojado luz sobre aspectos evolutivos, así como el conocimiento sobre genes desfavorables para los organismos (en particular el hombre). Se han detectado por ejemplo algunos que ponen en evidencia a la anemia falciforme, arterioesclerosis, cáncer y hemofilia entre otros; esta técnica puede identificar a los genes implicados en dichas enfermedades, con lo que se amplía la perspectiva de un diagnóstico claro basado en la disposición genética en los adultos e incluso en el embrión (Garland, E. 1983).

Históricamente tres líneas de pensamiento han tenido que ver con la formación de la biología molecular tal y como se conoce hoy: la estructural, relacionada con la arquitectura de las moléculas biológicas, la bioquímica, relacionada con la manera cómo las moléculas biológicas interactúan en el metabolismo celular y en la herencia, y la informativa, relacionada con la forma en que se transfiere el mensaje de una generación de organismos a otra, traducidiéndose en moléculas biológicas únicas (Lewin, B. 1990).

Ahora no sólo se conocen los componentes de la célula, sino también se conoce el funcionamiento molecular para la producción de la información genética, el ADN es la molécula que la transmite de una generación a otra. Para la preservación y transmisión de información genética son necesarios los procesos de DUPLICACION,

(copia del ADN en forma idéntica a las moléculas patrón); TRANSCRIPCION, (proceso por el cual el mensaje genético del ADN es transcrito en forma de ARN mensajero (ARNm) y llevado a los ribosomas); y TRADUCCION, (el mensaje genético es decodificado en los ribosomas para la síntesis de proteínas) (Alberts, B. 1989).

MEDIANTE LA ESPECIALIZACION Y LA COOPERACION, LAS CELULAS SE COMBINAN FORMANDO UN ORGANISMO UNICO Y COORDINADO

La diferenciación es la capacidad que tienen las células para especializarse, evento en el cual algunos genes son selectivamente expresados para llevar a cabo un cambio morfológico y funcional.

El epitelio estratificado es uno de los ejemplos de más alta complejidad en diferenciación celular (Kenneth, J. 1966).

Durante el desarrollo, la expresión de los genes se regula tanto en espacio como en tiempo. El espacio, es el medio en que están envueltos los genes, células, tejidos, órganos y organismos. En tiempo, el reloj biológico de cada organismo determina la activación e inactivación de proteínas, moléculas que instrumentan la diferenciación celular. Lo anterior se lleva a cabo a niveles altamente coordinados. Esta coordinación depende de la existencia de jerarquías, es decir, de genes que controlen la expresión de otros genes.

¿Qué factores determinan que un gen se active primero que otro?.

Uno de los procesos más importantes que regulan la expresión de proteínas es la TRANSCRIPCION, en ella participan entre otros

elementos la enzima polimerasa del ácido ribonucleico (ARN Pol), que interactúa con el ADN al inicio de la transcripción del gen (fase de iniciación) y se mueve a lo largo de éste, transcribiendo esta información en el ARNm (fase de alargamiento), hasta encontrar un sitio en el cual cesan los enlaces por puente de hidrógeno entre ADN-ARN, liberando a la enzima ARN Pol separándose así el ADN del ARN. Pero los genes no se transcriben invariablemente; existen sitios en el ADN y proteínas que interactúan con ellos funcionando ambos como reguladores de la transcripción y determinando el gen particular que será transcrito.

En eucariotes, los genes se dividen en tres clases definidas por el tipo de promotor y la clase de enzima ARN Pol. La ARN Pol I se localiza en el nucléolo, sintetiza pre-ARN ribosomal (45S); la ARN Pol II, localizada en el nucleoplasma, sintetiza ARN heterogéneo nuclear (precursor del ARN mensajero (ARNm) y la ARN Pol III, se encuentra también en el nucleoplasma y sintetiza ARN de bajo peso molecular (ARN de transferencia 5S). (Lewin, B. 1990).

El reconocimiento de un gen específico por parte de cada enzima ARN Pol depende de proteínas auxiliares llamadas factores de transcripción (Fst) que también tienen una función reguladora en cuanto a la expresión del gen. Los pioneros que reconocieron los Fst fueron Roeder y colaboradores en el año de 1980, ellos estudiaron el promotor tardío de adenovirus y con una fracción de proteínas pudieron identificar cuatro componentes: TFIIA, TFIIB, TFIIC Y TFIID, los cuales demostraron ser necesarios para que se llevará a cabo un correcto inicio de transcripción, conjuntamente

con los promotores (Wingender, E. 1990).

Actualmente se sabe que TFIIA es necesario para la transcripción basal; TFIIB reconoce estructuras de ADN alterado e induce la unión al promotor; TFIIC es un supresor de eventos no específico y TFIID complejo de proteínas que se unen a un sitio consenso de ADN rico en adenina y timina conocido como CAJA TATA y se localiza en las cercanías del sitio de inicio de la transcripción. TFIIA y TFIIB son ahora llamados factores de iniciación general y se sabe que se unen a proteínas de unión a la caja TATA llamadas TBPs ("TATA binding protein") (Greenblatt, J. 1992 y Nikolov, D. 1992).

Existen otros componentes que están presentes en algunos genes celulares como son los potenciadores, los cuales se pueden identificar como secuencias específicas presentes en un tipo celular (Lewin B. 1990) (Tabla 1). Estos potenciadores permiten aumentar la actividad del promotor. Todos los elementos antes mencionados son importantes para que se lleve a cabo la transcripción y funcionan como reguladores para la expresión de un gran número de genes en distintos tipos celulares.

Tabla 1. Algunos factores generales de transcripción (Wingender, E. 1990 y Greenblatt, J. 1992).

FACTOR	UNION AL ADN	UNION A POLIMERASA
PROMOTOR		
TFIIA	SI	SI (POL II)
TFIIB	SI	SI (POL II)
TFIIIB	NO	SI (POL III)
TFIIC supresor de eventos de iniciación no específica		
TFIIIC	NO	NO
TFIID	NO	POL II
TFIIE	NO	POL II
POTENCIADOR		
SP1 (CAJA GC)	NO	POL II
OCTA II	NO	POL II
NF1 (CAAT)	NO	POL II
API	NO	POL II

EL EPITELIO ESTA CONFORMADO POR CAPAS CELULARES QUE REVISTEN LAS CARAS INTERNAS Y EXTERNAS DEL CUERPO

En el siglo XVIII Dutch definió a los epitelios como tejidos que crecen por encima de otro tejido (epi: otro tejido) y theleo: hacia arriba. Actualmente se define como un tejido que cubre las superficies libres del cuerpo, desde las superficies expuestas fuera del organismo hasta las superficies internas, que cubren los órganos (Sengel, P. 1976).

El epitelio humano se origina en las tres capas germinativas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), siendo su función proteger las superficies (Maclean, N. 1978).

Las capas epiteliales son el mejor ejemplo de las limitaciones a la difusión de moléculas a través de la membrana. Poseen dos superficies: la superficie apical que está en contacto con el haz de luz y la basolateral que está en contacto con tejidos que nutren a las células epiteliales (Sengel, P. 1976).

La comunicación de las células puede ser a través de desmosomas, los cuales están conectados por tonofilamentos que permiten la difusión de moléculas y presentan también placas adhesivas, permitiendo el contacto estrecho entre las células (Sengel, P. 1976).

La comunicación también se puede llevar a partir de uniones comunicantes, estos constan de dos agrupaciones de estructuras radiales situadas a continuación una de la otra, con un poro de

aproximadamente 20 Å de diámetro por lo que pueden entrar iones, aminoácidos, azúcares y nucleótidos menores (Maclean, N. 1978).

Los distintos tipos celulares presentan especialización, implicando la existencia de células que se adaptan a una función específica. Para esto, necesitan de cambios morfológicos, que se presentan con ayuda del citoesqueleto.

El citoesqueleto está conformado por tres sistemas de fibras protéicas siendo una de sus funciones, darle forma y movimiento a las células. Uno de ellos está representado por fibras delgadas de 7 nm de diámetro las cuales constan de proteínas de actina, a este grupo de fibras se les llamó microfilamentos. El segundo grupo lo componen los microtúbulos que miden 24 nm de diámetro y que constan de tubulina. El tercero, son los filamentos intermedios de 7-11 nm de diámetro. En los filamentos intermedios están presentes proteínas específicas para tipos particulares de células. De acuerdo con su bioquímica variable, la disposición de los filamentos intermedios difiere en los distintos tejidos (Lazarides, E. 1982).

Hacia finales de la década de 1970 los estudios inmunológicos y bioquímicos demostraron que los genes para las proteínas de los filamentos intermedios, se expresaban de acuerdo con la vía que seguía el tejido durante la embriogénesis. La diversidad de vías da lugar a cinco tipos: a) filamentos de la glia de 80 Å de diámetro, encontrados en el citoplasma de astrocitos; b) filamentos de vimentina de 100 Å de diámetro, presentes en fibroblastos, sugiriendo que funcionan como soporte en el citoplasma; c)

filamentos de desmina de 100 Å, predominante en músculo esquelético, cardíaco y liso, d) neurofilamentos de 100 Å, que son los elementos principales de los axones de las neuronas, dendritas y pericardio, y e) filamentos laminares nucleares son vainas dimensionales altamente organizadas las cuales desensamblar y reensamblar estados específicos de mitosis; y f) filamentos que contienen proteínas afines a queratina, que son característicos de células epiteliales (queratinocitos). (Pruniéras, M. 1981 y Lazarides, E. 1982).

QUERATINOCITOS EN HUMANOS

Los queratinocitos son las células presentes en el epitelio escamoso estratificado. La queratinización de células epidérmicas se caracteriza por la producción y el arreglo espacial de cierto número de componentes macromoleculares estructurales y se da en dos fases. La primera es una fase de síntesis de proteínas específicas de cada tipo celular. La segunda es el rearrreglo de las células que termina en la pérdida del núcleo y de organelos citoplasmáticos que son reemplazados por una matriz amorfa de queratina (Pruniéras, M. 1981).

El epitelio estratificado se forma de varias capas celulares que actúan en forma dinámica. Iniciando están las células germinativas del estrato basal, la característica principal de las células germinativas es que tienen una alta capacidad mitótica. La segunda capa celular llamada estrato espinoso está formada por

células que poseen proyecciones citoplasmáticas (espinosas) que establecen puentes intercelulares a nivel membranar, es a partir de esta capa que cesa la división mitótica. El estrato granuloso está caracterizado por los gránulos de queratohialina, apareciendo señales iniciales de degeneración. Una vez que la queratohialina se convierte en queratina, las células mueren formando una capa de células queratinizadas con apariencia translúcida, constituyendo el estrato lúcido. La última capa es el estrato córneo el cual se compone de escamas sucesivas de queratina y representa el estado terminal de diferenciación (Sengel P. 1976), (Figura 1).

Las células mencionadas antes, en una separación estricta una de otra forman en realidad parte de un sólo sistema, debido a la comunicación que establecen les permite una organización altamente compleja junto con el medio que las rodea, logrando así la homeostasis.

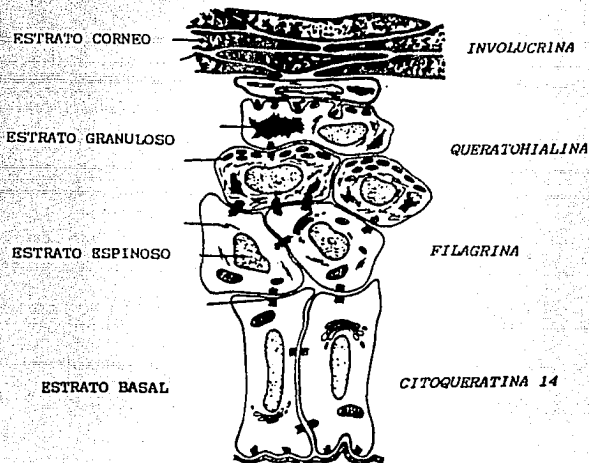


Fig. 1. Diferenciación de queratinocitos humanos en epitelio estratificado escamoso. El epitelio estratificado se constituye de varios estratos, en cada uno de los cuales predomina una proteína característica.

PROTEINAS EXPRESADAS EN EPITELIO ESTRATIFICADO

En las diferentes capas del epitelio estratificado escamoso existen genes en cuyos promotores se han identificado posibles dominios reguladores y factores de transcripción, que pueden estar participando en la expresión de otros genes endógenos o virales.

La proteína citoqueratina 14 (K14) de 50 Kilodaltones (kd) en humanos está presente en las capas basales de epitelio escamoso estratificado y se ha utilizado como marcador de proliferación celular. Actualmente se ha despertado un gran interés en el estudio de la regulación de esta proteína, dada la existencia de una familia de virus de ADN de doble cadena circular conocida como virus del papiloma, los cuales son huéspedes específicos del epitelio estratificado escamoso una vez diferenciado (Leask, A. 1990). A pesar de la importancia de los queratinocitos en biología celular y medicina, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares de expresión de sus genes. Leask y colaboradores, en 1990 reportaron con detalle la caracterización de la secuencia y los factores que controlan un gen humano (gen K14), expresado específicamente en queratinocitos durante la actividad mitótica, en células basales de epidermis de ratones transgénicos. Estos investigadores demostraron la existencia de los elementos distal y proximal localizados en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen K14 los cuales, cuando son combinados con elementos de la caja TATA, parecen actuar en la expresión específica de los queratinocitos. Se examinó la región proximal con

detalle mediante la construcción de plásmidos y usando ensayos de transfección transitoria (Alam, J. 1992), lo que permitió estudiar la expresión del gen de interés en diferentes líneas celulares. En la secuencia mínima para la activación de K14: 5' GCCTGCAGGC 3' contenida dentro de los 110 pb del dominio proximal 5' del sitio de inicio de la transcripción, se une un factor epidérmico llamado AP2. (Leask A. 1990, Jiang C. 1990, Vassar R. 1989). AP2 es importante en la expresión de genes específicos de queratinocitos (Tabla 2). (Bernhard, L. 1989).

Tabla 2. Unión de AP2 a diferentes promotores de genes que codifican para diferentes citoqueratinas (Bernhard, L. 1989).

Sitios de unión	Secuencia de reconocimiento
AP2 (con 1)*	5' GCC NNNGGC 3'
AP2 (con 2)	5' GCC CCAGGC 3'
K14	-231 GCC TGCAGGC -222
K5	-100 GCC CCAGGC -92
K1	-122 GGC TGCAGGC -113
K6B	-329 GCT GGAGGC -321

* secuencia consenso (con).

Una segunda proteína presente en el proceso de diferenciación del epitelio estratificado es la INVOLUCRINA, que al igual que la

K14 se ha utilizado como marcador, pero en este caso como marcador de diferenciación temprana. La involucrina está presente en concentraciones ascendentes desde la capa basal a la capa cornificada (Watt F., 1981). Su estudio comprende poder conocer la regulación de un gen no sólo en una capa de epitelio estratificado sino en las diferentes capas y esto permitirá esclarecer los factores involucrados en la expresión genética ligada a diferenciación celular.

LA INVOLUCRINA HUMANA, UNA PROTEINA IMPORTANTE EN EL PROCESO DE DIFERENCIACION TERMINAL DE EPITELIO ESTRATIFICADO ESCAMOSO

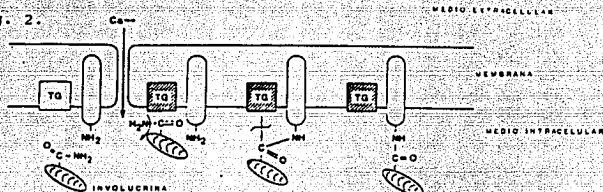
Para la formación del estrato terminal de diferenciación del epitelio escamoso estratificado, las células migran a la superficie y empiezan a ser permeables a iones, principalmente al calcio (Pillai, S., 1990). El flujo de calcio es responsable de la activación de la enzima transglutaminasa, específica de queratinocitos y que cataliza la formación del estrato córneo (Rice y Howard, G., 1979).

El precursor o sustrato para la cubierta de queratinocitos es la proteína de 68 kilodaltones (kd), conocida como INVOLUCRINA, que se encuentra en el citosol y que junto con otras proteínas forman enlaces entrecruzados, estos enlaces son activados por la transglutaminasa y el calcio (Simon, M., 1984). Existen ocho proteínas que participan en la formación del estrato terminal, todas están localizadas en la membrana excepto la involucrina. Seis

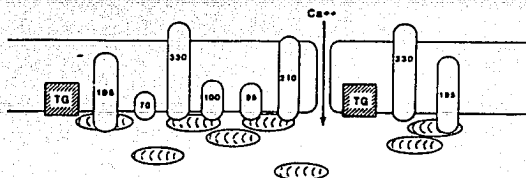
de las proteínas membranales son precursoras de la cubierta de la membrana (70, 95, 100, 195, 210 y 330 kd), y la otra es la enzima transglutaminasa (TG). La involucrina se enlaza con las seis diferentes proteínas de la membrana formando una estructura rígida en la superficie celular (Eckert, R.1989). (Figura 2).

Existe una correlación entre el tamaño celular y la síntesis de involucrina en queratinocitos humanos, la relación se debe al contenido celular de ARN específico y a su vez el tamaño celular está correlacionado con la posición de la célula en el epitelio estratificado (Watt F. 1981). Este estudio abrió las puertas para utilizar a la involucrina como un indicador de diferenciación del epitelio estratificado tanto en tejidos normales como patológicos.

Fig. 2.



A) Mecanismo de formación de enlaces peptídicos mediados por la enzima transglutaminasa. La transglutaminasa (TG) no sombreada es inactiva y la sombreada es la forma activa en presencia del ion calcio. El enlace peptídico se lleva a cabo a partir del grupo amino de las proteínas de la membrana y el grupo carboxilo de la involucrina.



B) Un modelo de formación de la cubierta cornificada. La yuxtaposición de la involucrina con las diferentes proteínas de la membrana sugiere la posibilidad de la estructuración de un homopolímero que permite formar una red firme de enlaces entrecruzados (Eckert and Green 1989).

EL GEN QUE CODIFICA LA SINTESIS DE LA PROTEINA INVOLUCRINA HUMANA

La organización genómica de la involucrina hacia el extremo 3' del sitio de inicio de la transcripción consiste de dos exones de 43 y 2500 pb separados por un intron de 1188 pb y hacia el 5' de una región no codificadora de 2600 pb (Eckert, 1986). (Figura 3).

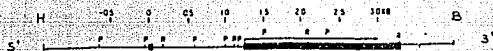


Fig. 3. Mapa de restricción del gen de involucrina humana. El gen de involucrina tiene un tamaño de 6 kb [flanqueado por Hind III (H) y BamHI (B)] el cual está organizado por dos exones que están representados como cajas sombreadas separados por un intron. La escala está en kb desde el sitio de inicio de la transcripción y contiene los sitios de restricción Rsa I (R) y Pst I (P) (Eckert and Green 1986).

EL INTRON COMO REGULADOR DE LA EXPRESION DEL GEN DE INVOLUCRINA

Un intron es una secuencia presente en el ADN de células eucariotas y en arqueobacterias que puede ir desde 80 a 10,000 nucleótidos. Durante la transcripción, el intron sigue presente en el transcrito primario y se remueve durante la formación del ARNm maduro, de tal forma que no codifica para ninguna región de la proteína producida.

El corte de los intrones después de la formación del ARN transcrito primario es llamado empalme del ARN "RNA Splicing" (SRNA). La existencia de diferentes sitios de SRNA genera diferentes ARNm y por lo tanto diferentes proteínas. La versatilidad de los RNAs mensajeros fue descubierta en adenovirus humanos. La existencia de una mutación presente en los extremos que flanquean a los intrones, provoca la remoción del sitio de corte del intron, aumentando o disminuyendo el número de nucleótidos del exon, logrando así un ARNm diferente al previsto; es por ello que se dice que la expresión de genes puede estar regulada también a nivel postranscripcional (Alberts, B. 1987).

c-myc, proto-oncogen que participa en la regulación de células específicas durante la diferenciación celular y proliferación, depende del control de diferentes factores fisiológicos, incluyendo factores de crecimiento protéicos (Kelly, K., 1983) que no sólo interactúan en la región no codificadora. Se ha observado que el intron 1 de c-myc forma parte de la regulación postranscripcional a nivel terminal (Bentley, D., 1988).

c-fos parece influir el encendido y apagado de la proliferación celular y diferenciación en una variedad de tipos celulares. La regulación de este gen comprende mecanismos transcripcionales como postranscripcionales (Collart, A., 1991). La transcripción se regula grandemente a nivel de la iniciación y la postranscripción en el proceso de alargamiento (Blanchard, J., 1988).

Carroll y Taichman en 1992 encontraron que en la expresión del gen de involucrina, el intron actúa bajo ciertas condiciones como

silenciador y en otras como activador de la transcripción. Sin embargo, el papel del intron en la regulación de este gen, así como los elementos participantes en la activación del promotor se desconocen.

Así pues, la regulación de la expresión de algunos genes puede intervenir mediante diferentes componentes como son iones (calcio) o moléculas que interactúan con la célula; o bien temporal, actuando a nivel transcripcional, procesamiento del ARN, transporte del ARN, traducción, degradación del ARN y control activacional de la proteína. Si lo manejamos como un sistema, existen innumerables variables para la expresión de un gen, pero la expresión de muchos genes se controla predominantemente a nivel transcripcional. Existen factores específicos para cada tipo celular que permiten la regulación de sus genes, conocer los factores que intervienen en la transcripción de la involucrina, nos permitirá profundizar en su estudio, como un modelo de un gen regulado durante la diferenciación de epitelios; siendo que el epitelio constituye uno de los mejores ejemplos de diferenciación celular.

OBJETIVO GENERAL

ESTUDIAR LA REGION REGULADORA (RR) DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEINA INVOLUCRINA HUMANA, (HI) COMO MODELO DE UN GEN ASOCIADO A LA DIFERENCIACION CELULAR.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

A) CLONAR LA RR DEL GEN DE LA HI.

B) FRACCIONAR Y SUBCLONAR LA RR DEL GEN DE LA HI.

C) LOCALIZAR SITIOS POSIBLES DE INTERACCION CON FACTORES DE TRANSCRIPCION EN LA RR DEL GEN DE LA HI.

MATERIAL Y METODO

El primer paso que se siguió fue buscar dentro de la secuencia conocida de la RR de HI sitios posibles de interacción con factores nucleares para posteriormente obtener diferentes fragmentos de la región reguladora del gen.

La construcción de plásmidos a partir de la fragmentación del p λ 3H6B se realizó con la clonación en vectores (de expresión o amplificación) para su posterior utilización en otras etapas del proyecto. Básicamente la estrategia experimental que se siguió se describe a continuación:

PLASMIDOS

Los plásmidos son elementos de ADN extracromosomales, encontrados en una amplia variedad de especies, principalmente bacterias. Son circulares de doble cadena y tienen un tamaño entre 1 a 200 Kb aproximadamente. Las características que definen a un plásmido son: que codifica para una resistencia a antibióticos utilizada como marcador de selección, orígenes de duplicación que permiten un gran número de copias, sitios únicos de restricción que facilitan el proceso de la clonación (Maniatis, T. 1982).

Se describen a continuación los plásmidos usados en este trabajo.

a) p λ 3H6B

Es el plásmido que contiene el gen de análisis, del cual se tomó

la secuencia de interés (inserto) que es la región no codificadora del gen de la involucrina humana. El plásmido p λ 3H6B fue donado por el Dr. Howard Green del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Escuela de Medicina de Harvard. El plásmido comprende 9 kb de los cuales 6 kb corresponden al gen de involucrina, flanqueada en los extremos por sitios de reconocimiento a enzimas Hind III y BamHI y las restantes 3 kb son el vector pSP64.

b) p827c.b.

Se conoce la secuencia de los primeros 827 pb más próximos al sitio de inicio de la transcripción de la región no codificadora del gen de la involucrina (Richard. L, 1986) (Figura 3).

Conociendo la secuencia del fragmento de 827 pb lo amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) creando un sitio Xba I 3' artificial para su clonación frente al gen CAT del vector pCAT-basic.

c) pUC19

Vector de 2686 pb, utilizado para manejar y amplificar un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a ampicilina y con un sitio de clonación múltiple (SCM) de 58 pb (Yanisch-Perron 1985).

d) pCAT-promoter

Vector de 4506 pb con SCM de 24 pb. Contiene la caja TATA del virus SV40 (promotor) y el gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transferasa), el cual se expresa de acuerdo a la regulación

ejercida por el inserto sobre el promotor (Cornelia, M. 1982).

DIGESTION DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCION

Para la obtención de los fragmentos de ADN deseados se utilizaron enzimas de restricción, las cuales son endonucleasas que reconocen pequeñas secuencias (± 7 pb) e hidrolizan el ADN dejando extremos simétricos (romos) o asimétricos (cohesivos).

Para fines analíticos, las digestiones se llevaron a cabo a partir de ADN en solución (200 ng - 1 μ g), utilizando el amortiguador adecuado al tipo de enzima. La cantidad de enzima fue de 5-10 unidades y se incubaron a 37°C de temperatura dependiendo del tipo de enzima.

La solución de ADN digerido se sometió a electroforesis en geles de agarosa, a fin de separar los fragmentos.

CINETICA DE DIGESTION DE ADN

Con la finalidad de obtener la región reguladora 5' no codificadora completa del plásmido p λ 3H6B se realizó una cinética de digestión a partir de restricciones parciales.

La eficiencia de cada enzima depende del tiempo de restricción, así como de la concentración de la enzima. La cinética de digestión se realizó en los ensayos con la enzima Apa 1 en diferentes tiempos (60, 30, 20, 15, 10 y 5 minutos) y diferentes concentraciones de enzima (20, 10 y 5 unidades).

MIGRACION ELECTROFORETICA DEL ADN

La electroforesis en geles permitió ver el tamaño del ADN cuando fue fragmentado por las enzimas de restricción así como las formas que predominaban del ADN (superenrollado, circular, y lineal), las variantes de esta técnica son:

a) ELECTROFORESIS EN MINIGELES DE AGAROSA

Los geles se prepararon en concentraciones del 1.0 al 1.5% de agarosa en un volumen de 20 ml de amortiguador TBE 1X, (mM): Tris 80, ácido bórico 80 y EDTA 2, calentando la solución hasta ebullición para disolver la agarosa. La solución se vertió en una cámara para geles colocando el peine formador de pozos en un extremo; una vez que la temperatura bajó aproximadamente a 50°C, se agregó Bromuro de Etidio (0.05 µg/ml) para teñir los ácidos nucleicos.

Una vez solidificada la agarosa, el peine se retiró y se introdujo a una cámara de electroforesis horizontal. Se añadieron 100 ml de solución de TBE 1X, lo que permitió cubrir totalmente el gel.

Las muestras de ADN y el marcador de peso molecular del ADN se colocaron en los pozos añadiendo colorante indicador de corrida (Azul de bromofenol 0.02%, Xilen-cianol 0.02% y Glicerol 50%).

El corrimiento electroforético se hace del cátodo al ánodo

aplicando voltaje constante de 100 V. El tiempo de corrimiento dependió del tamaño de los fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN forman bandas horizontales, las que se visualizaron exponiendo el gel bajo luz ultravioleta de onda larga (320 nm).

b) ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA

Se armó un par de vidrios perfectamente limpios y desengrasados con separadores de 1.2 mm que se sellaron con lubricante de silicona para evitar fugas. Se procedió a preparar la solución de acrilamida en un tubo cónico de polipropileno de 50 ml, se agregaron 10 ml de solución de acrilamida-bis-acrilamida (30:1), 5 ml de TBE 10X y se llevó a 50 ml con agua bidestilada. Posteriormente, se agregaron 50 µl de TEMED, que es un catalizador de la polimerización y 150 µl de persulfato de amonio al 10%, el cual al homogenizarlo con los demás componentes, inicia la reacción. Esta solución se vertió a la cámara de vidrios evitando burbujas y se le introdujo un peine formador de pozos. Una vez polimerizada la acrilamida, se retiró el peine y se montó en una cámara de electroforesis vertical con TBE 1X, se lavaron los pozos con el mismo amortiguador quedando listo el gel para la aplicación de las muestras.

Las muestras se prepararon con colorante indicador de corrida y se colocaron cada una de ellas en los pozos del gel. La migración electroforética se llevó con voltaje constante a 250 V.

Una vez terminado el corrimiento electroforético se retiró el gel de los vidrios, se sumergió en TBE 1X y bromuro de etidio 0.05 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 min y se visualizó el ADN con luz ultravioleta de onda larga (320 nm).

PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Esta técnica permite obtener por separado uno o más de los fragmentos deseados que se producen durante la digestión de ADN.

Después de la obtención de fragmentos separados en geles de agarosa se cortó la banda deseada. Los fragmentos menores de 1 kb se purificaron por el método de nitrógeno líquido y los mayores de 1 kb se obtuvieron por electroelución.

a) Purificación de fragmentos de ADN con nitrógeno líquido.

Se preparó una punta amarilla para micropipeta tapada con algodón, se colocó el fragmento de agarosa (que contiene el fragmento de ADN) dentro de la punta y se congeló durante 5 minutos en nitrógeno líquido. Se cortó un tubo de microcentrifuga de 500 μl en la base y sin tapadera y se colocó la punta dentro del tubo. Este a su vez se colocó dentro de un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml sin tapadera. Se centrifugó en una microcentrifuga a 15,000 rpm durante 15 minutos y se tomó el líquido del tubo de 1.5 ml; a este líquido se le añadió medio volumen de fenol saturado y se agitó con vórtex, después se agregó medio volumen de cloroformo-álcohol

isoamílico 24:1 y se volvió a agitar con vórtex. Se centrifugó por 5 min a 15,000 rpm. Posteriormente, se tomó la fase acuosa y se precipitó el ADN con medio volumen de acetato de amonio 7.5 M pH 7.5 y dos volúmenes y medio de etanol absoluto (a -20°C), se centrifugó a 15,000 rpm durante 30 minutos, se desechó el sobrenadante con cuidado y se agregó etanol al 80% para enjuagar y quitar sales, se centrifugó 5 min a la misma velocidad y nuevamente se tiró el sobrenadante con cuidado, dejando evaporar el etanol.

Una vez obtenida la muestra se procedió a resuspender en el volumen deseado con agua estéril.

b) Purificación de fragmentos de ADN mayores de 1 kb por electroelución.

El trozo de agarosa se introdujo en una bolsa de diálisis con porosidad excluyente para moléculas de 12-14000 daltones y se acomodó en uno de los extremos de la bolsa, se introdujo TE 1X hasta que cubrió completamente el gel. Posteriormente se puso en una cámara de electroforesis horizontal con TBE 1X y se aplicó un voltaje de 100 V, de tal manera que el ADN saliera del gel de agarosa y quedara en el amortiguador TE 1X, una vez hecho, se rescató el ADN de la bolsa y se precipitó con acetato de amonio-etanol absoluto.

CLONACION

La clonación consiste en insertar el fragmento de interés en un sitio específico de un plásmido, unir fragmento y vector mediante una enzima (ligación) y amplificar el nuevo plásmido en un sistema bacteriano adecuado.

Las variantes que utilizamos se describen a continuación:

a) CLONACION DIRIGIDA

La clonación dirigida consiste en obtener el vector y el inserto flanqueados por dos sitios diferentes de corte con endonucleasas de restricción. Por ejemplo, en el extremo 5' tenemos un sitio Hind III y en el extremo 3' se tiene un sitio BamHI, esto dirigió la orientación del fragmento con respecto a los extremos del vector de tal forma que obtuvimos un sólo tipo de unión entre el inserto y el vector (Figura 4).

b) CLONACION EN VECTORES QUE TIENEN AMBOS EXTREMOS COMPATIBLES CON EL INSERTO

El vector linearizado por una sola enzima tiene extremos flanqueados por el mismo sitio de restricción, ya sea cohesivos o romos. El hecho de que tengan un mismo sitio de reconocimiento le permite al vector recircularizarse, impidiendo de esta forma la entrada de cualquier inserto; es por ello que fue necesario llevar a cabo la desfosforilación del extremo 5' del ADN (Figura 5). Para 3 µg del vector se utilizó 1 µl de fosfatasa alcalina y se incubó

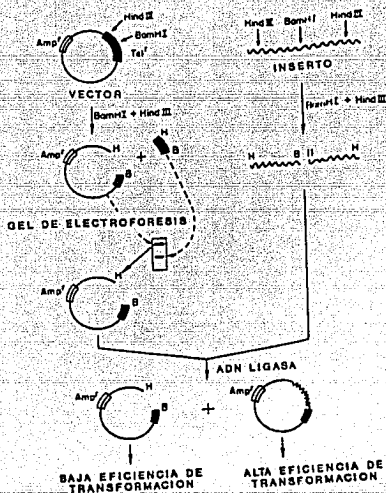


Figura 4. Diagrama de la clonación dirigida.

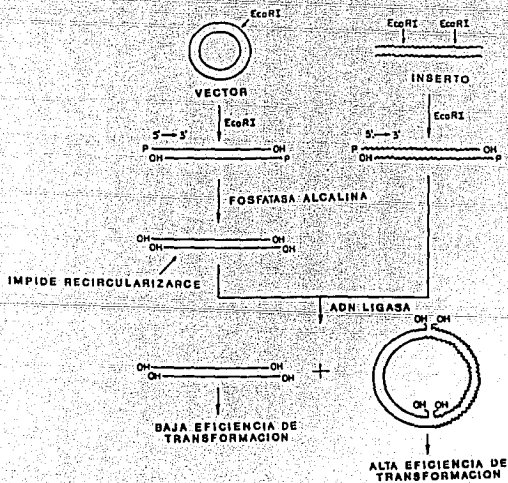


Figura 5. Desfosforilación del ADN.

durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se eliminaron las impurezas con fenol-cloroformo isoamílico y por precipitación del ADN. De esta manera el inserto puede ser ligado al vector en cualquiera de las dos orientaciones posibles.

REPARACION DEL ADN

En algunos casos se presentaron sitios del fragmento de ADN así como del vector que no fueron compatibles entre sí para clonarse, por lo que se reparó el ADN completando los extremos para obtener sitios romos.

A partir de 5 µg de ADN linearizado se adicionó dGTP, dTTP, dCTP y dATP 0.25 mM, 1.5 µl de amortiguador (mM): Tris-HCl 10, MgCl₂ 10, NaCl 50, DTT 1, pH 7.9, el agua necesaria para un volumen final de 14 µl y 1 µl de enzima Klenow. Se homogenizó y se incubó a 37°C durante 45 min. Posteriormente, se añadió agua hasta obtener 100 µl en solución y se llevó a cabo la purificación del ADN con fenol-cloroformo isoamílico y por precipitación con etanol absoluto y acetato de amonio se resuspendió el ADN en 10 µl de agua estéril.

LIGACION

La ligación consiste en la unión de los fragmentos por medio de la enzima ligasa del fago T4 al catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-OH y 5'-PO terminal en ADN (Maniatis T., 1982).

El ADN vector linearizado con extremos desfosforilados (cuando estuvo flanqueado por el mismo sitio de reconocimiento para una enzima) se añadió al inserto (fragmento de ADN), se agregó 1 μ l de amortiguador de reacción (10X) y 1 μ l de ATP (10 mM), se añadió el agua necesaria para 9 μ l y se homogenizó. Posteriormente, se le agregó 1 μ l de ligasa T4 (400 U) y se incubó a 4°C toda la noche. La relación vector inserto que se guardó en todas las ligaciones fue de 1:5 (50:250 ng).

PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES

Para la obtención de bacterias competentes, se utilizó la técnica descrita por Hanahan (1983). Una colonia de la bacteria Escherichia coli (E. coli) DH5 α [F'/endA1 hsdR17(r⁻m⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA(Nal^r) relA1 (lacZYA-argF)₀₁₄₀ (ϕ 80lacZ M15)] se inoculó en medio SOB (g): Bactotripton 20, NaCl 0.5; pH 7.5 aforado a 1 litro), complementado con MgSO₄ 10 mM; se incubaron las bacterias a 37°C con agitación constante (200 rpm) aproximadamente durante 16 horas; 500 μ l de este precultivo se inocularon en 50 ml de medio SOB complementado con 10 mM de MgSO₄, se incubó con agitación moderada (200 rpm) a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O.) a 550 nm de 0.5.

El cultivo se transfirió a tubos Falcon de 50 ml en condiciones de esterilidad y se enfrió 10 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó 12 minutos a 4°C y 2500 rpm.

El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 16 ml

de amortiguador de transformación 1 (mM): acetato de potasio 30, RbCl₂ 100, CaCl₂ 10, MnCl₂ 50, glicerol 15% [se ajustó el pH a 5.8 con 0.2 M ácido acético]].

La mezcla se centrifugó 12 minutos a 4°C y 2500 rpm, el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de amortiguador de transformación 2 (mM): Morfolino (MOPS) 810 pH:6.5 (3-(N-Morfolino) ácido propano sulfónico), CaCl₂ 75, RbCl₂ 10, glicerol 15%. Se incubó 15 minutos en hielo y se distribuyó en alícuotas de 200 µl en tubos estériles preenfriados y se almacenaron a -80°C.

TRANSFORMACION DE BACTERIAS

Para la amplificación del ADN deseado fue necesario introducirlo en bacterias competentes de la cepa DH5α de *E. coli* a fin de que mediante su proceso de duplicación, se copie muchas veces el plásmido.

A una alícuota de 200 µl de suspensión de bacterias competentes DH5α se agregaron 50 ng de ADN y se incubó por 20' en hielo.

La mezcla se incubó en baño maría a 42°C por 90 segundos y nuevamente en hielo por 2 minutos; se añadieron 800 µl de medio SOC (medio SOB + 16 µl de glucosa al 20% + 8 µl de MgSO₄ 1M), y se incubó en agitación a 200 rpm durante 45' a 37°C.

Se vertieron y espataron 100 µl de este cultivo en cajas de medio agar-Luria-ampicilina (50µg/ml) más 40 µl de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosida) (100 mM) y Xgal (5-Bromo-4-cloro-

3-indolil- β -D-galacto piranosida) al 2% en dimetil formamida, se incubaron a 37°C durante 16 horas, obteniendo colonias de color azul que metabolizaban la lactosa (cuando no contenían inserto) y de color blanco (si es que estaba presente el inserto) seleccionando así las bacterias con plásmidos recombinantes (blancas).

MINIPREPARACION DE PLASMIDOS

Esta técnica tuvo la finalidad de tamizar las colonias, de tal forma que permitió saber con exactitud qué bacterias contenían la clonación esperada y que en ellas el inserto estuviese en las condiciones deseadas de tamaño y orientación.

Se sembró un píe de cultivo con la bacteria portadora del plásmido de interés en 1.5 ml de medio Luria estéril (10% Bactotripton, 5% extracto de levadura, 10% NaCl pH 7.5 y 50 μ g/ml de ampicilina). Se incubó en agitación moderada a 200 rpm, toda la noche a 37°C.

El cultivo se transfirió a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 15000 rpm para empastillar las bacterias.

El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 200 μ l de solución TS (Tris 50 mM pH 7.5, sacarosa 25%) y se le agregó 200 μ l de ELT (EDTA 100 mM pH 8.0, 2 mg/ml de lisozima, Triton X100 0.1%).

La mezcla se agitó y posteriormente se incubó 5' a temperatura

ambiente y 10 min a 70°C; se centrifugó en una microcentrífuga a 15000 rpm 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de solución PEG-NaCl (polietilenglicol 20%, NaCl 1M), se mezcló suavemente, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 rpm 3'.

El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua estéril.

MAXIPREPARACION DE PLASMIDOS

Una vez obtenido las bacterias con el plásmido recombinante se procedió a tener concentraciones altas del mismo, para estudios posteriores.

Se sembró un pie de cultivo con la cepa portadora del plásmido de interés en 5 ml de medio Luria estéril más ampicilina (50µg/ml).

Se inocularon 5 ml del precultivo en 500 ml de medio Luria/ampicilina (50 µg/ml); se incubaron en agitación a 200 rpm a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una D.O. a 600 nm de 0.5 a 0.6. Se procedió a realizar la amplificación del plásmido (incremento del número de copias por célula) deteniendo la síntesis de proteínas bacterianas con 170 µg/ml de cloranfenicol y se incubó en agitación a 200 rpm a 37°C durante 14 horas.

El cultivo se transfirió a botellas de polipropileno de 500 ml y se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm en un rotor Beckman JA-10 a 4°C.

El sobrenadante se eliminó y la pastilla de bacterias se

resuspendió en 4 ml de solución TS, la mezcla se transfirió a tubos de polialómero para rotor Beckman 50 Ti y se añadieron 4 ml de ELT.

La mezcla se agitó y posteriormente se incubó 10 min a temperatura ambiente y 10 min a 70°C, se centrifugó a 40000 rpm en ultracentrífuga Beckman a 4°C durante 20 min en rotor 50 Ti. Se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de solución PEG-NaCl en tubos corex de 15 ml, se mezcló suavemente, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 4°C y 3000 rpm, en rotor Sorvall SS34 con una centrífuga Sorvall.

El sobrenadante se eliminó y la pastilla de ADN se resuspendió en 3 ml de TE 1X.

PURIFICACION DE PLASMIDOS POR GRADIENTE ISOPICNICO DE CsCl

Para tener el plásmido libre de ARN e impurezas se realizó la purificación del plásmido por gradiente isopícnico, que consiste en separar los componentes según su densidad. El ADN plasmídico puede presentar tres tipos de conformación: relajado, lineal y superenrollado; ésta conformación hace la diferencia de densidad y por lo tanto su distribución en un gradiente varía. El ARN es más denso que cualquier conformación del ADN, quedando empastillado en el fondo del gradiente.

Para la purificación del plásmido se obtuvo el ADN total y se le añadió 1 g/ml de CsCl el cual se disolvió por inversión. Por cada 5 ml de la mezcla (CsCl, TE 1X y ácidos nucleicos), se añadieron 400 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), alcanzando una densidad de

1.55 g/ml y con un índice de refracción de 1.38.

Se llenaron tubos Beckman "quick-seal" de 5.1 ml de polialómero con el plásmido preparado, completando el volumen del tubo con CsCl+TE 1X. Posteriormente, los tubos se balancearon en balanza semianalítica, se sellaron por calor y se centrifugaron 6 horas a 20°C a 50,000 rpm en un rotor vertical Vti 65.2 en una ultracentrífuga L-7 (Beckman). Con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de onda corta se pudo visualizar la banda de interés (ADN superenrollado). Para coleccionar el ADN, se rompió el vacío del tubo y se extrajo el ADN con una jeringa de 5 ml y una aguja de 18 X 38 mm.

Para quitar el bromuro de etidio se hicieron varios lavados con isopropanol saturado con NaCl, formando dos fases, la fase orgánica (isopropanol) y la fase acuosa en donde estuvo presente el ADN.

El plásmido en solución se introdujo a bolsas de diálisis y se dializó contra TE 1X haciendo tres cambios de TE 1X durante tres días.

CUANTIFICACION DE ADN

Una vez obtenido el ADN puro se realizó su cuantificación por espectrofotometría. Se hicieron diluciones de la muestra 1:500 ó 1:1000 en agua estéril. Se realizaron las mediciones en un espectrofotómetro Beckman DU-7, se consideró que un valor de densidad óptica a 260 nm igual a 1.00, corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de ADN de doble cadena (Maniatis, T. 1982), para calcular la concentración se utilizó la relación:

$$\text{concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{D.O. } 260 \times 50 \times \text{DILUCION}}{1000}$$

ANALISIS COMPUTACIONAL DE SECUENCIAS DE ADN CONOCIDAS

El reconocimiento de secuencias de ADN se hizo a partir de un análisis computacional empleando el programa SEQ.4 (Alvarez-Salas, L. 1990), el cual es aplicable esencialmente para buscar sitios probables de interacción de proteínas reguladoras de la transcripción en una secuencia discreta de ADN.

Los sitios consenso de factores de transcripción buscados fueron:

SITIOS	SECUENCIA
AP1	GTGACTCA
K	AAGTCAAA
*NF1	CAATT
	TTGGC
	TTTGGCG
	TGGCA
OCTA	TGTTTGCAT
	GCTTTGCAT

***secuencia consenso de NF1: TTGGCNNNNNGCCAA**

RESULTADOS

SITIOS POSIBLES DE INTERACCION DEL ADN DE LA RR DE HI CON ALGUNOS FACTORES DE TRANSCRIPCION

En la parte secuenciada de la RR del gen de HI (nt. -827 al 1), reconocida por el grupo de Howard Green se realizó un análisis por computadora en busca de sitios posiblemente reconocidas por factores de transcripción como AP1, NF1, K y OCTA; encontrándose cinco de la familia en NF1, dos de la familia en OCTA, un sitio AP1 y uno K, la localización de estos sitios se muestra en la figura 6 y Tabla 3.

Figura 6. Secuencia del fragmento de 827 pb de la región 5' no codificadora del p λ 3H6B. Los nucleótidos enmarcados corresponden a las secuencias consenso que son reconocidas por los factores de transcripción AP1, K, NF1 y OCTA; la barra negra corresponde a la caja TATA. La numeración que se encuentra en el margen derecho indica el número correspondiente de los nucleótidos de la región 5' no codificadora del p λ 3H6B.

AAAGTAGT T TGGT T TGTCAT TATAAAAAGCAATACT TAT T T T TATAT TGTGTAGAT TCAA T - 767
 CT TGT T TCCT TGCCTAGAGTGGGCCGTGCT T TGGAGT TCT TATGAGCATGGCAT TCCTGAG - 706
 AACT TCTCTAACTGCAGCCTCGGGCATAGAGGCTGGGCAGCAAGTGGCAGCAGCAGAGGA C - 645
 TCCTAGAAGCCT TCTACT TGA CTCTACT TGGCCTA AAGTCAAAC TCCCTCCACCAAAGACA - 584
 GAGT T TAT T TCCACATAGGATGGAGT TAAAAAATATAT TCTGAGAGAGGAAGGGCT TGTG G - 523
 CCCAAGAGAACACCCCAGAAATACCACCCCT TCATGGGAAGTGA CTCTATCT TCAAACAT A - 462
 TAACCCAGCCTGGACATCCCCGAAAGACACATAA CTT TCCAT T TCATGCCCT TGAAAGTGA - 401
 ATCT T TGGCCTAATAATGAGAACAACTCAT T TGAAGTGGAAAAAT TGAGATTCAGAG - 340
 CAGAAGT T TGA CTAAAGGT TCACAAAACAGTAGGATGCCTCACTCAGCTCCCTGTGCCTAG T - 279
 CAGAAAAGCATCACAGGAATAGT TGAGCTACCAGGATCCTCTGGCCAGGCAGGAGCTGTGT - 218
 GTCCCTGGGAAATGGGGCCGTAAAGGGT T TGTGCTTAAGATGCCTGTG GTGAGTCAGGAA - 157
 GGGGT TAGAGGAAGT TGACGAACTAGAGTGGTGAAACCTGTCCATCACCT TCAACCTGGAG - 96
 GGAGGCCAGGCTGCAGAATGATATAAAGAGTGCCTGACTCCTGCTCAGCTCAGCACTCC A - 35
 CCAAAGCCTCTGCCTCAGCCT TACTGTGAGTCTG 1

CLONACIONES

El fragmento de 827 pb está flanqueado en el extremo 5' por Hind III y al 3' por Xba I. Con él se realizaron diferentes construcciones fraccionándolo con enzimas de restricción; con Pst I dio lugar a tres fragmentos de 79, 138 y 610 pb; el fragmento de 79 pb (Pst I/Xba I) y el fragmento de 138 pb (Hind III/Pst I) se subclonaron en forma dirigida en pUC19 resultando los plásmidos pIN79 y pIN138 respectivamente. Para comprobar que efectivamente el fragmento fue clonado, se realizó la digestión de los plásmidos con las enzimas que flanquean cada fragmento. (Figura 7 y 8).

El fragmento de 610 pb Pst I/Pst I se subclonó con el vector pUC19 desfosforilado, el nombre del plásmido resultante fue pIN610. El plásmido se restringió con Pst I obteniendo el fragmento clonado de 610 pb (Figura 8).

En la tabla 3 se resume cuales son los sitios posibles de interacción con algunos de los factores de transcripción y su ubicación en estas construcciones en relación al sitio de inicio de la transcripción.

Figura 7. Clonación dirigida de los fragmentos de 79 y 138 pb obtenidos a partir de p827c.b. Las líneas de mayor grosor corresponden a los fragmentos de 79 y 138 pb. El fragmento de 79 pb esta flanqueado por Pst 1 (P) y Xba 1 (X), el de 138 pb por Hind III (H) y Pst 1.

CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS PIN79 Y PIN138

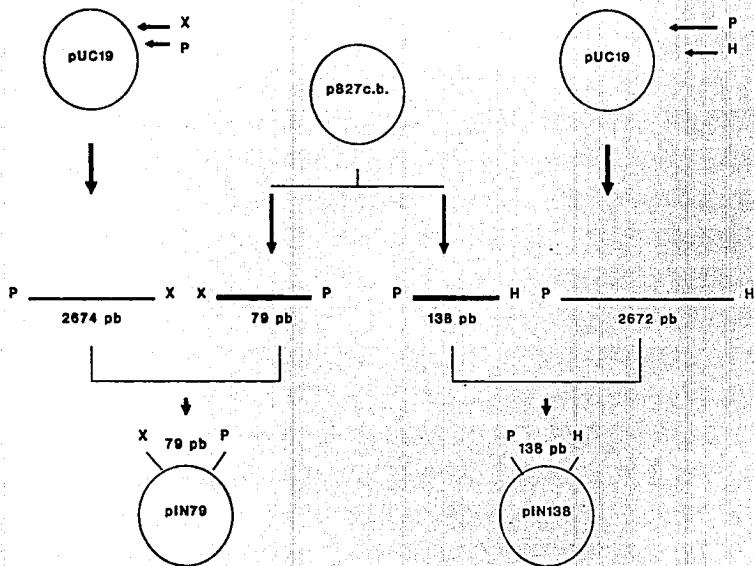


Figura 8. Mapa de los plásmidos pIN79, pIN138 y pIN610, construcciones realizadas a partir del plásmido p827c.b. El nombre enmarcado corresponde al vector en el cual se clonó el fragmento. a, tiene presentes los sitios de restricción [Hind III (H), Pst I (P) y Xba I (X)] por los cuales se obtuvo la subclonación ilustrada en a'. Se muestran los sitios de interacción con los factores de transcripción [NF1 (●), OCTA (▼), AP1 (○) y K (▽)], la caja TATA representada como una barra negra, así como la posición que ocupan los fragmentos en la región 5' no codificadora del pλ3H6B. En la parte superior del extremo derecho, se encuentra el gel de acrilamida donde están presentes los fragmentos producidos al digerir cada uno de los plásmidos con las enzimas que permitieron obtener el fragmento deseado y en la parte inferior se muestra el vector pUC19 con los sitios de clonación múltiple en el cual se clonaron los fragmentos.

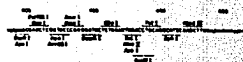
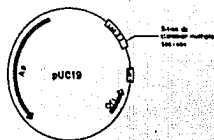
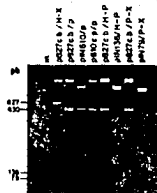
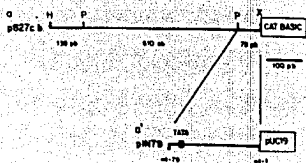
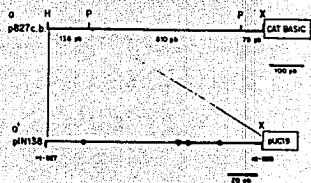
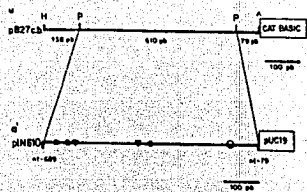


Tabla 3. Sitios posibles de interacción con algunos factores de transcripción presentes en las construcciones pIN79, pIN138, p138c.p., pIN610 y p610c.p.

PLASMIDO	SITIOS DE SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO A FACTORES DE TRANSCRIPCION			
	SITIO	NUCLEOTIDO	SECUENCIA	HOMOLOGIA
1) pIN79	TFIID	- 67	TATAA	100%
2) pIN138 p138c.p.	NF1	- 796	CAATA	80%
	NF1	- 730	TGGGAG	85.7%
	NF1	- 713	TGGCA	100%
	OCTA	- 730	TGCTTTGGAG	80%
3) pIN610 p610c.p.	AP1	- 160	GTGAGTCA	87.5%
	K	- 601	AAGTCAAA	100%
	NF1	- 656	TGGCA	100%
	NF1	- 611	TTGGCC	100%
	NF1	- 390	TTGGCCT	85.7%
	NF1	- 390	TTGGCC	85.7%
	OCTA	- 419	CTTCCAT	87.5%

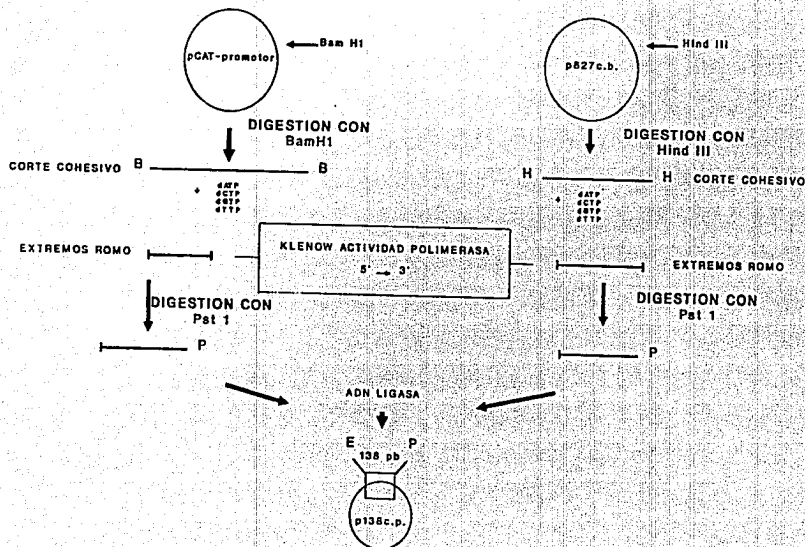
Posteriormente, los fragmentos de 138 y 610 pb se clonaron en el vector pCAT-promoter para conocer la expresión del promotor mediante transfecciones transitorias en células epiteliales.

El fragmento de 610 pb se clonó con el vector pCAT-promoter desfosforilado y se obtuvo el plásmido p610c.p.

La clonación del fragmento de 138 se obtuvo con el fragmento de 138 pb Hind III/Pst 1 (obtenido a partir del p827c.b.) y el vector pCAT-promoter. La estrategia que se siguió fue reparar el extremo Hind III del fragmento de 138 pb y el extremo BamHI del vector para que fuesen compatibles en el extremo 5' para su ligación. En ambos se llevó a cabo una segunda digestión, esta vez con Pst 1 en el extremo 3' para especificar la orientación del fragmento con respecto a la caja TATA. Esta construcción fue llamada p138c.p. (figura 9).

Figura 9. Esquema del fragmento de 138 pb en el vector pCAT-promoter. El p827c.b. se digirió con Hind III (H) y el vector pCAT-promoter con BamHI (B). Los sitios para BamHI del vector y Hind III del inserto se perdieron, ya que son modificados por la integración de desoxirribonucleótidos necesarios para la ligación del inserto-vector por la enzima Klenow. Una vez reparado el extremo H del fragmento y B del vector se procede a la segunda restricción con Pst 1 (P) tanto del inserto (138 pb) como del vector (4481 pb).

CONSTRUCCION DEL PLASMIDO p138c.p.



La siguiente construcción hecha a partir de p827c.b. se describe a continuación:

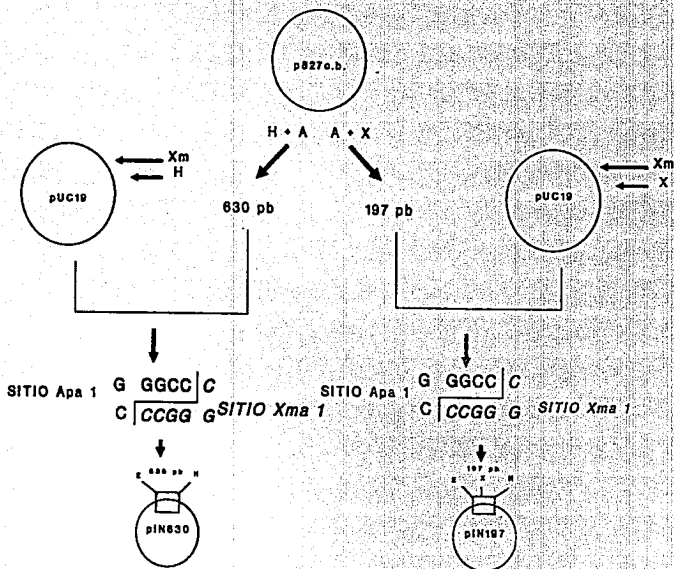
El plásmido p827c.b. se fraccionó con la enzima Apa I obteniéndose dos fragmentos, uno de 630 pb (Hind III/Apa 1) y el segundo está comprendido por 197 pb (Apa 1/Xba 1).

Ambos fragmentos (197 y 630 pb) contienen el sitio Apa 1, el cual no existe en el vector pUC19 así que éste se digirió con Xma 1 la cual deja un extremo cohesivo que es compatible con el sitio Apa 1. Así, la clonación del fragmento de 197 pb se hizo en un vector pUC19 digerido con Xma 1 y Xba 1. El plásmido resultante se denominó pIN197.

La clonación del fragmento de 630 pb se realizó en pUC19 digerido con Hind III y Xma 1. Esta construcción se nombró pIN630. Para mostrar los fragmentos integrados de los plásmidos construidos se restringió con Hind III-Eco R1, La enzima Eco R1 fue el sustituto de Apa 1, ya que se perdió el sitio de reconocimiento de Apa 1 al ser unida con el sitio Xma 1 (Figuras 10 y 11).

Figura 10. Clonación dirigida de los fragmentos de 197 y 630 pb obtenidos a partir de p827c.b. Los fragmentos de 197 pb (Apa 1 (A)/Xba 1 (X)) y el de 630 pb (Hind III(H)/Apa 1(A)). Se clonaron direccionalmente en pUC19 digerido con X-Xma 1 (Xm) y H-Xm, respectivamente, perdiendo el sitio A del inserto y Xm del vector. En la figura se muestra el sitio Apa 1 y el sitio Xma 1 los cuales son compatibles para unirse.

CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS pIN630 Y pIN197

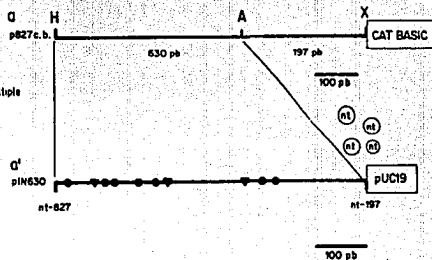
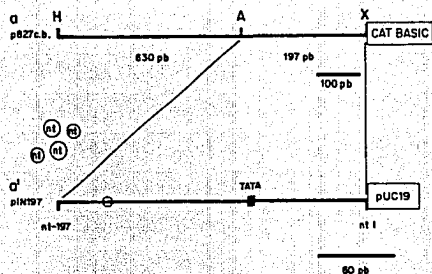
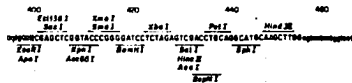
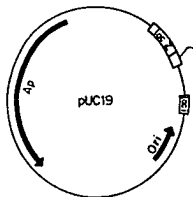


En la Tabla 4 se muestran los sitios posibles de interacción de algunos factores de transcripción y su posición en relación al sitio de inicio de la transcripción de los plásmidos pIN197 y pIN630.

Tabla 4. Sitios posibles de interacción con algunos factores de transcripción presentes en las construcciones pIN197 Y pIN630.

PLASMIDO		SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO A FACTORES DE TRANSCRIPCION		
	SITIO	NUCLEOTIDO	SECUENCIA	HOMOLOGIA
pIN197	AP1	-160	GTGAGTCA	87.5%
	TFIID	-67	TATAAA	100%
pIN630	K	-601	AAGTCAAA	100%
	NF1	-796	CAATA	80%
	NF1	-730	TGGAG	85.7%
	NF1	-713	TGGCA	100%
	NF1	-611	TGGC	100%
	NF1	-390	TTGGCCT	85.7
	NF1	-390	TTTGGCCT	85.7%
	OCTA	-419	CTTTCCAT	87.5%

Figura 11. Mapa de los plásmidos pIN197 y pIN630. Construcciones realizadas a partir del plásmido p827c.b: el nombre enmarcado corresponde al vector por el cual se clonó el fragmento. En a están representados los sitios de restricción [Hind III (H), Apa I (A) y Xba I (X)] mediante los cuales se obtuvo la subclonación descrita en a', se señalan los sitios en donde posiblemente interactúan los factores de transcripción [NF1 (●), OCTA (▼), AP1 (○) y K (▽)], la caja TATA está representada por una barra negra, así como los nucleótidos que abarca el fragmento. El número de los nucleótidos se relaciona con la posición que ocupa este fragmento en la región 5' no codificadora del pλ3H6B. Los círculos que tienen indicado "nt" son los nucleótidos que se adicionaron para la clonación del fragmento de 630 pb. En el extremo izquierdo superior se encuentra el gel de acrilamida donde están presentes los fragmentos de cada uno de los plásmidos digeridos con las enzimas que permitieron obtener las clonaciones.



CLONACION DE LA REGION REGULADORA 5' NO CODIFICADORA COMPLETA DEL PLASMIDO p λ 3H6B

La región 5' no codificadora completa del plásmido p λ 3H6B consta de 2597 pb.

El gen HI clonado en p λ 3H6B está flanqueado en el extremo 5' por Hind III (Figura 3) por lo que se restringió este plásmido con Hind III linearizándolo. Posteriormente, se realizó una segunda restricción con Apa I por ser la enzima que tiene un único sitio de corte en el plásmido p827c.b. (plásmido que se utilizó como vector para la clonación de la mayor parte de la RR del p λ 3H6B).

El p λ 3H6B digerido con Apa I dio lugar a tres fragmentos de 900, 1500 (de la región no codificadora) y 6600 pb (de la región codificadora y vector) (Figura 12).

Se realizó una subclonación del fragmento de 1.5 kb (Hind III/Apa I) en el vector pUC19 (Figura 13).

Se procedió a realizar una cinética de restricción del p λ 3H6B/Hind III de 5, 10 y 15 minutos con la enzima Apa I para obtener fragmento de 2.4 kb (Hind III/Apa I) que contiene la mayor parte de la región reguladora (Figura 13).

Paralelamente, se realizó una doble digestión del plásmido p827c.b. con las enzimas Hind III y Apa I obteniendo dos fragmentos, uno de 630 pb (Hind III/Apa I) región no codificadora y otro de 4561 pb (Apa I/Hind III) que comprende 197 pb de la región no codificadora más 4364 pb del vector pCAT-basic.

Una vez obtenidos los fragmentos deseados se ligó el fragmento

de 2.4 kb (Hind III/Apa I) del pλ3H6B al fragmento de 4561 pb (Apa I/Hind III) de p827c.b. de tal forma que se obtuvo la región reguladora completa del gen HI (2.6 kb) frente al vector pCAT-basic (Figuras 12 y 13).

Figura 12. Diagrama de la estrategia para obtener el plásmido p2.6c.b.

ESTRATEGIA PARA LA OBTENCION DEL PLASMIDO 2.6c.b.

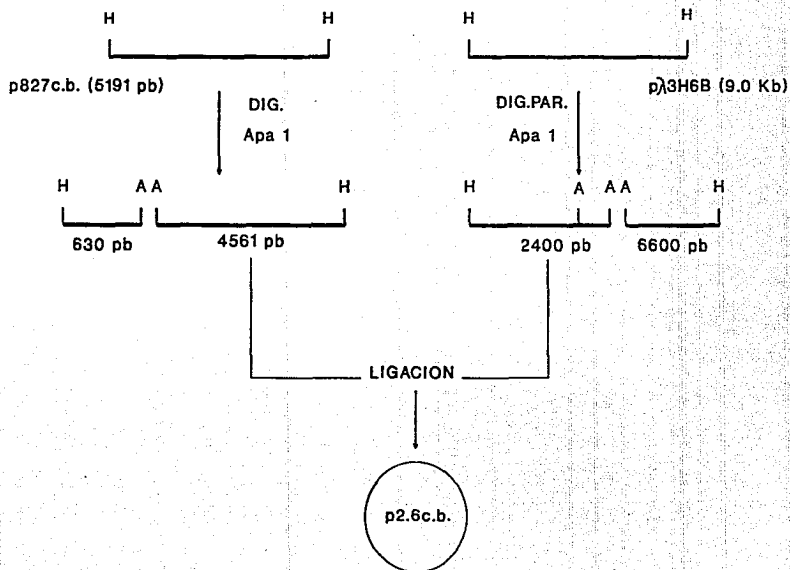


Figura 13. Mapa de los plásmidos p2.6c.b. y pIN1.5 obtenidos del extremo 5' del plásmido p λ 3H6B. a) Los diagramas muestran la obtención de los fragmentos de 2.4 y 1.5 kb a partir p λ 3H6B con enzimas de restricción como es Apa 1 (A). Los círculos "nt" indican los nucleótidos que se adicionaron para la clonación del fragmento de 1.5 kb (reparación). En la parte izquierda se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se aprecian las restricciones parciales que se realizaron con Apa 1 para obtener el extremo 5' de la región no codificadora del p λ 3H6B, así como la obtención del fragmento de 1.5 kb.

pIN1.5
 p2.6c.b.
 p3H6B
 H-A
 nt-2597
 nt-197

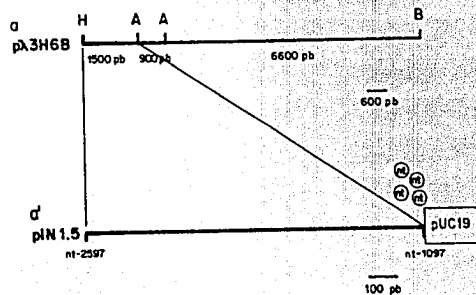
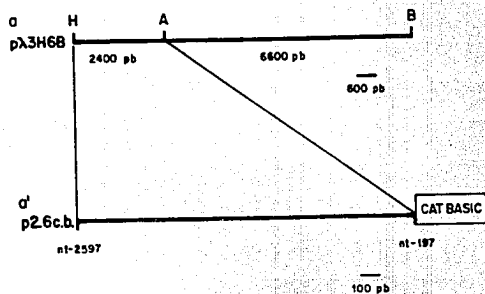


Tabla 5. Plásmidos obtenidos a partir de p827c.b. y de p λ 3H6B.

NOMBRE	VECTOR	FRAGMENTO	OBTENCION
pIN79	pUC19	79 pb	p827c.b.
pIN138	pUC19	138 pb	p827c.b.
pIN197	pUC19	197 pb	p827c.b.
pIN610	pUC19	610 pb	p827c.b.
pIN630	pUC19	630 pb	p827c.b.
p138c.p.	pCATp	138 pb	p827c.b.
p610c.p.	pCAT-promoter	610 pb	p827c.b.
pIN1.5	pUC19	1500 pb	p λ 3H6B
p2.6c.b.	pCAT-basic	2597 pb	p λ 3H6B y p827c.b.

MAPA DE RESTRICCION DEL FRAGMENTO DE 2597 pb DE LA REGION

5' NO CODIFICADORA DEL PLASMIDO p λ 3H6B CON PATRONES DE DIGESTION

Se desconoce la secuencia completa de la región 5' del plásmido p λ 3H6B por lo que se procedió a obtener un mapa de restricción utilizando diferentes tipos de enzimas que cortan en la región reguladora.

El mapa de restricción se realizó tomando como base el extremo 5' que tiene el sitio de reconocimiento a la enzima Hind III de la

región no codificadora del p2.6c.b. Se realizaron tres tipos de digestiones por separado con este plásmido, 1) linearizar el plásmido p2.6c.b. con Hind III (extremo 5'), 2) digerirlo con enzimas que corten dentro del fragmento de 2.6 kb, 3) realizar dobles digestiones: Hind III y enzimas que corten a lo largo del fragmento de 2.6 kb.

Acc 1

La digestión del p2.6c.b. con la enzima Acc 1 lineariza al plásmido (6964 pb). Como el vector no tiene sitio de reconocimiento para la enzima Acc 1 (Cornelia, M., 1982), este sitio se localiza dentro del fragmento. Al realizar la segunda digestión con Hind III, se generan dos fragmentos de 1250 y 5714 pb (Hind III/Acc 1) (Figura 14).

Apa 1

La enzima Apa 1 genera dos bandas de 900 y 6064 pb al digerir el plásmido p2.6c.b., esta enzima tampoco corta en el vector. La doble digestión con Hind III despliega tres bandas de 900, 1500 y 4864 pb, entonces los fragmentos de 900 y 1500 corresponden al fragmento clonado, el fragmento de 1500 no se presenta cuando se realiza la digestión tipo 2, esto quiere decir que la banda de 1500 pb está flanqueada por el extremo 5' con Hind III y en el 3' con Apa 1; la banda de 900 pb que se presenta en las restricciones tipo 2 y 3

está flanqueada por Apa 1 (Figura 14).

Ava 1

El p2.6c.b. restringido con Ava 1 lineariza al plásmido, al restringir con Hind III se observan dos bandas de 2100 y 4864 pb, la banda de 2100 pb representa la parte 5' de la región reguladora (Figura 14).

Bgl 1

El p2.6c.b. genera dos bandas de 1100 y 5864 al restringirlo con Bgl 1, el fragmento de 1100 pb corresponde a una parte de la región reguladora, al de 5864 se encuentra la otra parte de la región reguladora y el vector (Figura 14).

Pst 1

La digestión de p2.6c.b. con Pst 1, genera tres bandas: de 610, 1200 y 5164 pb. El vector está contenido dentro del fragmento de 5164 pb por lo que los fragmentos de 610 y 1200 pb pueden registrarse dentro de la región reguladora y no dentro del vector. Cuando se restringe con Hind III se generan las mismas dos bandas que con Pst 1 (610 y 1200) y una banda más de 700 pb, lo que quiere decir que dentro del fragmento de 5164 pb se encuentra parte de la

región reguladora y al restringirlo con Hind III, el fragmento de 700 pb delimita el sitio que corresponde al extremo 5'. Las dos bandas de 610 y 1200 pb por lo tanto están flanqueadas por Pst 1 y son posteriores al fragmento de 700 pb (Figura 14).

Rsa 1

Rsa 1 genera cuatro bandas de 600, 700, 1000 y 3054 pb del p2.6c.b. Sin embargo, el vector también contiene sitios para Rsa 1. Las bandas de 600 y 700 pb corresponden al vector (Cornelia, M., 1982), el fragmento de 1000 pb corresponde a la región reguladora flanqueada por Pst 1 y el fragmento de 3054 pb contiene parte de la región reguladora; al restringirlo con Hind III se generan dos bandas más, una de 1900 pb (parte del vector) y otra de 1200 pb Hind III/Rsa I (Figura 14).

Kpn 1

Kpn 1 lineariza el p2.6c.b., el sitio corresponde a la región reguladora y no del vector pues éste no tiene sitio de reconocimiento para Kpn 1. Cuando se realiza la doble digestión con Hind III despliegan dos bandas de 1500 y 5464 pb, donde el fragmento de 1500 pb está flanqueado por Hind III y Kpn 1 y por lo

tanto, la banda de 1500 no se observa cuando se realiza la restricción tipo 2 (Figura 14).

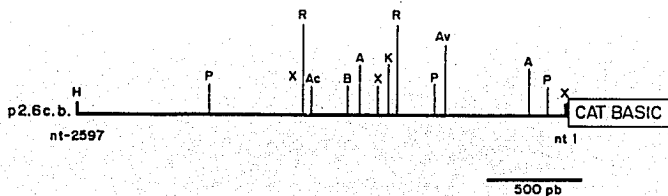
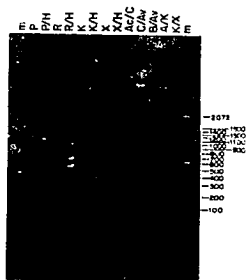
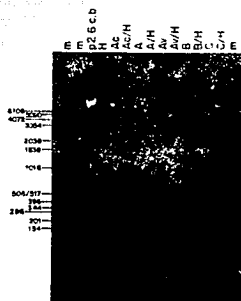
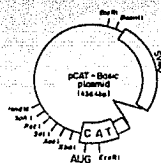
Xba 1

Cuando se restringe el plásmido p2.6c.b. con Xba 1, se generan tres bandas de 500, 900 y 5600 pb este último fragmento corresponde al vector ya que tiene un solo sitio Xba 1, el cual es el que se utilizó para clonar el fragmento de 2.6 Kb, por lo tanto las bandas de 500 y 900 pb corresponden a la región reguladora y están flanqueadas por Xba 1. La restricción tipo 3 genera las dos bandas de 500 y 900 pb y una más de 1300 pb Hind III/Xba 1 (Figura 14).

Xba 1 - Kpn 1

Se realizaron dobles digestiones pero ahora con Xba 1 y Kpn 1 con la finalidad de ubicar la posición de estos sitios de restricción en el fragmento de 2.6 kb. Al utilizar estas enzimas en el p2.6c.b. se generaron dos bandas de 500 y 400 pb, la de 500 pb está flanqueada por Xba 1, misma que se presenta cuando se restringe con Xba 1 y otra banda que sólo se presenta con la digestión Kpn 1-Xba 1 de 400 pb, con ello confirmamos los sitios de restricción de la región reguladora (Figura 14)

Figura 14. Caracterización del plásmido p2.6c.b. por medio de endonucleasas de restricción. En la parte superior se muestra el vector pCAT-basic que tiene un gen reportero CAT el cual puede reportar la actividad reguladora del fragmento clonado y sitios de restricción únicos en el que se clonó el fragmento de 2.6 kb. En la parte media se muestran las digestiones que se llevaron a cabo con las enzimas Acc 1 (Ac), Ava 1 (Av), Bgl 1 (B), Cla 1 (C), Pst 1 (P), Rsa 1 (R), Kpn 1 (K) y Xba 1 (X). Las bandas que se muestran, así como el marcador (m) permitieron elaborar el mapa de restricción del plásmido p2.6c.b. que se esquematiza en la parte inferior.



DISCUSION

Todas la células somáticas normales de un organismo eucariote tienen la misma cantidad y secuencia de ADN nuclear, sin embargo, las proteínas presentes en cada estirpe celular de un tejido específico son distintas, lo que hace que ellas sean los agentes fenotípicos por excelencia. La diferenciación celular implica la expresión selectiva de algunos genes. (Kenneth, J. 1966).

Poco se conoce sobre la transcripción de genes que codifican para proteínas de los estratos epiteliales, sin embargo el grupo de Howard Green, que logró la clonación y la mayor parte de la secuencia del gen de la involucrina humana, dio la pauta para el estudio transcripcional de este gen asociado a diferenciación celular (Eckert y Green, 1986.).

A lo largo del presente trabajo se logró fraccionar y subclonar en diferentes vectores la región reguladora del gen de la involucrina humana, así como aportar nuevos datos acerca de su estructura.

Primordialmente nuestro interés en elaborar todas estas construcciones plasmídicas fue obtener la materia prima indispensable para profundizar en el mecanismo de regulación transcripcional de este gen, mediante otras herramientas moleculares. Este proyecto contempla en su totalidad dilucidar qué tipo de interacciones ADN-Proteína se dan a lo largo de la RR del gen HI.

Las construcciones realizadas a partir del plásmido p827c.b.

(Tabla 5) cuya secuencia se conoce revelaron algunos sitios posibles de interacción con factores nucleares importantes en la transcripción, que para algunos casos es tejido-específica, por ejemplo:

El pIN138 tiene presentes secuencias que son reconocidas por factores de transcripción que se presentan prácticamente en todo tipo de células como son NF1 y OCTA.

El plásmido pIN610, es un plásmido cuyo análisis posterior será muy interesante ya que en él está presente la secuencia K (su importancia se describirá más adelante).

El plásmido pIN79 contiene una parte esencial que es el posible promotor basal (caja TATA).

La combinación de estas construcciones son las siguientes: pIN630. Tiene una poza de sitios de unión a factores de transcripción: NF1, OCTA y K.

El plásmido pIN197 además de contener la caja TATA presenta sitios AP1.

La presencia de sitios (secuencias de ADN) posiblemente reconocidas por factores de transcripción no significa que se active la transcripción a través de todos y cada uno de ellos, ya que la presencia de otras proteínas nucleares, la cooperatividad entre factores, la distancia que existe entre un factor y las proteínas que reconocen el promotor (CAJA TATA) también tiene una importancia crítica; por lo que encontrar sitios posibles de interacción sobre el ADN con factores nucleares sólo nos permite conocer la regulación del gen de manera hipotética.

Sin embargo, estos datos son muy importantes para apoyar técnicas como el ensayo de huella sobre el ADN (protección a la digestión con DNasa I), que permitirán dilucidar cuales son realmente los sitios de interacción funcionales en el contexto de las proteínas nucleares de células que expresan este gen (queratinocitos).

Estudios hechos con los sitios que son reconocidos por factores de transcripción sobre el ADN, han ido aclarando poco a poco, por qué las células de un organismo que contiene el mismo material genético tienen un diferente cometido.

La secuencia AP2 es importante en la regulación de los genes de las citoqueratinas. El sitio AP2 se localiza 5' de la caja TATA del gen de la citoqueratina 14 y a él se une un factor, enriquecido en epidermis, llamado inicialmente KER 1, el cual ha sido identificado posteriormente como el factor AP2 (Luscher, P. 1989, Leask, A. 1991).

Otro factor es fos que junto con jun integran el factor transcripcional AP-1, el cual está asociado tanto con diferenciación específica como con el crecimiento de células normales (Treisman, R. 1985). c-fos responde frecuentemente a señales externas que conservan muchos tipos celulares (Greenber, M. 1984). Se piensa que estas señales son eventos asociados a la activación de superficies celulares, como es flujo iónico y fosforilación protéica (Morgan, J. 1986).

De acuerdo con la información que se tiene de cada uno de los factores de transcripción es importante conocer algunos otros

aspectos sobre ellos como la especificidad que tienen sobre un gen determinado.

Acerca de los sitios que probablemente son reconocidos por factores de transcripción encontrados en las construcciones plasmídicas descritas en este trabajo se tiene información acerca de sus funciones reguladoras, por ejemplo:

API, proteína activadora 1, fue primero descubierta como un activador de elementos potenciadores inducidos por ésteres de forbol. Actualmente se sabe que API está formado por un complejo de dos proteínas: Fos y Jun los cuales interactúan cooperativamente con el ADN (Rauscher. 1988).

OCTA, en el virus SV40 que representa el prototipo para estimular la transcripción por parte de la ARN Pol II, es una de las secuencias que se unen a la ARN Pol II en la mayoría de las regiones reguladoras de los genes (Sergeant, A. 1984).

K, secuencia altamente conservada en las regiones promotoras de los genes de citoqueratinas, involucrina y en regiones reguladoras de papilomavirus genitales. Todos estos genes son expresados únicamente en epitelios (Alvarez-Salas, L. 1990 y García-Carranca et al., 1990).

NP1, corresponde a una familia de factores que activan la transcripción y duplicación de diferentes modelos genéticos celulares y virales (Wingender, E. 1990).

Los potenciadores o activadores de la transcripción que pueden encontrarse hacia arriba o abajo del sitio de inicio de la transcripción funcionan independientemente de su orientación.

Muchos de los potenciadores son específicos para la expresión de un tipo particular de proteína, por lo que su estudio es de gran interés.

Para determinar cuáles factores de transcripción se unen a una secuencia reguladora es necesario llevar a cabo estudios bioquímicos. Básicamente la construcción de plásmidos permite llevar a cabo ensayos de huella sobre el ADN, los cuales demuestran la unión específica de una proteína a una secuencia. Estudios *in vitro* usando líneas celulares determinan la importancia del factor para que se active un gen y si ésta activación es importante para la célula durante su diferenciación.

Mediante la realización de transfecciones transitorias con los fragmentos clonados frente al gen reportero CAT, sabremos cuáles de los fragmentos en que se dividió la RR de HI afectan la expresión de la proteína.

Actualmente, se tienen algunos ensayos de huella sobre el ADN ("footprint DNasa I") de una porción de la RR de HI empleando proteínas de extractos nucleares de células HeLa (línea celular epitelial, derivada de un adenocarcinoma) incubados con un fragmento de ADN que contiene los sitios de unión al factor K y NF1 (contenido en los plásmidos pIN630 y pIN610) lo que permitió observar la unión de una proteína a esta secuencia. Posteriormente, se realizaron ensayos de competencia con oligonucleótidos que contienen los sitios consenso de factores nucleares conocidos, de tal forma que se encontró que los factores que protegen la secuencia K corresponden a una de las proteínas de la familia de

NF1/CTF (López-Bayghen, E. comm. pers.).

Usando queratinocitos humanos inducidos a diferenciarse, en ensayos de transfección transitoria con el plásmido de p827c.b., no se observó un aumento significativo en la activación del promotor. Es decir, que para la expresión de la proteína involucrina se requieren otras secuencias más allá de la región cubierta por el p827c.b. que funcionen como activadores transcripcionales (Alvarez-Salas, L. comm. pers.).

Carroll J. y Taichman en 1992, postularon que la regulación de la expresión del gen de HI puede estar también a nivel postranscripcional, donde el intron actúa a nivel de silenciador o activador del gen de la involucrina.

Queda por determinar si el intron o parte de él, actúa como un silenciador o un activador de la transcripción.

Con este modelo llegamos a la conclusión de que existe una cascada de estímulos que van a actuar directamente sobre el gen y la respuesta de éste se proyectará en el organismo.

En conclusión, el estudio de cómo se regulan los genes que funcionan durante los proceso de diferenciación celular apenas comienza para células como los queratinocitos.

El aporte de las herramientas básicas para el estudio del gen de la involucrina humana es la principal contribución del presente trabajo. Ahondar en cómo se regula su expresión y cuáles son las piezas claves de su regulación son los pasos hacia el futuro en esta línea de investigación.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

- Alam, J. and Cook, J. 1990. Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription. Analytical Biochemistry 188:245-254.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. 1989. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. Págs. 1219.
- Alvarez-Salas, L.M. 1990. Análisis Molecular de Factores Nucleares que interactúan con la Región Control del Papilomavirus Humano tipo 18. Tesis de Maestría. CINVESTAV I.P.N., México.
- Angel, P., et. al. 1987. Phorbol Ester-Inducible Genes Contain a Common Cis Element Recognized by a TPA-Modulated Trans-Acting Factor. Cell 49:729-739.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. Published by Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.
- Bentley, D. and Groudine, M. 1988. Sequence Requirements for Premature Termination of Transcription in the Human c-myc Gene. Cell 53:245-256.
- Bernhard, L., Michell, P., Williams, T., Tjian, R. 1989. Regulation of Transcription factor AP2 by the Morphogen Retinoic Acid and by Second Messenger. Genes & Development 3:1507-1517.

- Blanchard, J., Piechaczyk, M., Fort, P., Bonnieu, A., and Jeanteur, P. 1988. The Regulatory Strategies of c-myc and c-fos proto-oncogenes share some common mechanisms. Biochimie 70:877-884.
- Breathnach, R. 1981. Organization and Expression of Eucaryotic Split Genes Coding for Proteins. Ann. Rev. of Bioch. 50:349-83.
- Carroll, J. and Taichman, L. 1992. Characterization of the human involucrin promoter using a transient β -galactosidase assay. Journal of Cell Science 103:925-930.
- Collart, M., Tourkine, N., Belin, D., Vasalli, P., Jeanteur, P., and Blanchard, J. 1991. c-fos Gene Transcription in Murine Macrophages Is Modulated by a Calcium-Dependent Block to Elongation in Intron 1. Molecular and Cellular Biology 11:2826-2831.
- Cornelia, M., Gorman, Leslie F. Moffat, and Bruce H. Howard. 1982. Recombinant Genomes Which Express Chloramphenicol Acetyltransferase in Mammalian Cells. Molecular and Cellular Biology 2:1044-1051.
- Eckert and Green H. 1986. Structure and Evolution of the Human Involucrin Gene. Cell 46:583-589.
- Eckert and Green. 1989. Molecular Biology of Keratinocyte Differentiation. Environmental Health Perspectives 80:109-116.
- Erich, H., Gelfand, D. and Saiki, R. 1988. Specific DNA amplification. Nature 331:461-462.
- Fuchs, E. and Green, H. 1978. The Expression of Keratin Genes in Epidermis and Cultured Epidermal Cells. Cell 15:887-897.

- García-Carrancá, A., Thierry, F., and Yaniv, M. 1988. Interplay of Viral and Cellular Proteins along the Long Control Region of Human Papillomavirus Type 18. J. of Virol 62:4321-4330.
- Garland, E. 1983. La Ciencia de la Vida en el siglo XX. CONACyT, Fondo de Cultura Económica, México. Págs. 522.
- Greenblatt, J. 1992. Binding high on the TATA box. Nature 360:16-17.
- Greenber, M. and Ziff, E. 1984. Stimulation of 3T3 Cells induces transcription of the c-fos Proto-Oncogene. Nature 311:433-437.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. 1990. PCR Protocols, Academic Press, Inc. Harcourt. Brace Jovanovich, Publishers. Págs. 482.
- Jiang, K., Epstein, H., Tomic, M., Freedberg, I. and Blumenberg. 1990. Epithelial-specific Keratin Gene Expression Identification of 300 base-pair controlling segment. Nucleic Acids Research 18:247-253
- Kelly, K., Cochran, B., Stiles, C. and Leder, P. 1983. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell 35:603.
- Kenneth, J. and Bernstein, I. 1966. Protein Synthesis Related to Epidermal Differentiation. Biochemistry. 56:594-601.
- Lawn, R., Fritsch, E., Parker, R., Blake, G. and Maniatis, T. 1978. The Isolation and Characterization of linked δ - and β -Globin Genes from a Cloned Library of Human DNA. Cell 15:1157-1174.

- Lazarides, E. 1982. Intermediate Filaments: A Chemically Heterogeneous, Developmentally Regulated Class of Proteins. Ann. Rev. Biochem. 51:219-250.
- Leask, A., Rosenberg, M., Vassar, R. and Fuchs, F. 1990. Regulation of a Human epidermal Keratin gene: sequences and nuclear factors involved in Keratinocyte-specific transcription. Genes & Development 4:1985-1998.
- Leask, A., Byrne, C. and Fuchs, E. 1991. Transcription Factor AP2 and its role in epidermal-specific Gene Expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:7948-7952.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. and Tjian, R. 1987. Activation of Transcription by two Factors that bind Promoter and Enhancer Sequences of the Human Metallothionein Gene and SV40. Nature 325:368-372.
- Lewin, B. 1990. Genes IV. 4th Edition. Oxford University Press. Págs. 857.
- Luo, Y., Fujii, H., Gerster, T., Roeder, R. 1992. A novel B Cell-Derived Coactivator Potentiates the Activation of Immunoglobulin Promoters by Octamer-Binding Transcription Factor. Cell 71:231-241.
- Luscher, B., Mitchell, P. Williams, T. and Tjian, R. 1989. Genes Dev. 3:1507-1517.
- Maclean, N. 1978. The Differentiation of Cells. University Park Press. Britain. Págs. 216
- Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. Págs. 545.

- Moll, R., Werner, W. and Schiller, L. 1982. The catalog of Human Citokeratins: Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells. Cell 31:11-24.
- Morgan, J. and Curran, T. 1986. Role of ion flux in the control c-fos expression. Nature 322:
- Nikolov, D. et. al. 1992. Crystal Structure of TFIID TATA-box binding protein. Nature 360:40-46.
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M., Allen, D. and Brinster, R. 1991. Heterologous introns can enhance expression of transgenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:478-482.
- Pillai, S., Bible, D., Mancianti, M., Cline, P., and Hincenbergs, M. 1990. Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Normal Human Keratinocytes: Modulation of Differentiation Competence by Stages of Growth and Extracellular Calcium. Journal of Cellular Physiology 143:294-302.
- Pruniéras, M. 1981. Epidermal Keratinocyte Differentiation and Fibrillogenesis. S. Karger. Basel. München. Paris. London. New York. Sydney. págs. 190.
- Rauscher III, F., Voulalas, P., Franza, R. and Curran, T. 1988. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. Genes & Development 2:1687-1699.
- Rice and Howard, G. 1979. Presence in Human Epidermal Cells of a Soluble Protein Precursor of the Cross- Linking by Calcium Ions. Cell 18:681-694.

- Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113:237-25.
- Sengel Philippe. 1976. Morphogenesis of skin. Cambridge University Press. Págs. 277.
- Sergeant, A., Bohmann, D., Zentgraf, H., Welher, H. and Keller, W. 1984. A Transcription Enhancer Acts in Vitro over Distances of Hundreds of Base-pairs on both Circular and Linear Templates but no on Chromatin-Reconstituted DNA. Journal Molecular Biology 180:577-600.
- Shapiro A. 1988. Bacteria as Multicellular Organisms. Scientific American pp 62-69.
- Simon, M., and Green, H. 1985. Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro. Cell 40:677-683.
- Treisman, R. 1985. Transient Accumulation of c-fos RNA Following Serum stimulation Requires a Conserved 5' Element and c-fos sequences. Cell 42:889-902.
- Vassar, R., Rosenberg, M., Ross, S., Tyner, A. and Fuchs, E. 1989. Tissue-specific and differentiation-specific expression of a Human K14 Keratin gene in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:1563-1567.
- Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. and Weiner, A. 1987. Molecular Biology of the gene. 4th Edition. The Benjamin/Cumings Publishing Company, Inc. Págs. 744.

- Watt, F. and Green, H. 1981. Involucrin Synthesis is Correlated with Cell Size in Human Epidermal Cultures. The Journal of Cell Biology 90:738-742.
- Wingender, E. 1988. Compilation of Transcription Regulating Proteins. Nucleic Acids Research 16:1879-1902.
- Wingender, E. 1990. Transcription Regulation Proteins and their recognition sequences. Critical Reviews In 1:11-48.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phase cloning vectors and host strains:nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.