



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

GENES GLOBINA DE POLLO: ORGANIZACIÓN Y
REGULACIÓN DURANTE EL DESARROLLO Y
DIFERENCIACIÓN ERITROIDE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
**H É C T O R D E J E S Ú S R I N C Ó N
A R A N O**

Tutor: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA



MÉXICO, D. F.

Noviembre 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

No me he cansado y ni me cansaré de decirles lo mucho que los quiero y significan para mí. Ustedes son la parte relevante y el principal motivo que me ayuda a seguir adelante. Esto no es un esfuerzo exclusivamente mío, ustedes me han impulsado a seguir adelante y no claudicar ante la adversidad. Por eso es que al final del camino las bases de humildad, confianza y respeto que ustedes inculcaron son las que me han hecho conquistar al mundo. Simplemente, los quiero con todas mis fuerzas.

A Ivon

Tú eres mi orgullo y te dedico en especial este esfuerzo de 6 años, ya que sin tu cercanía no hubiese tenido la estabilidad y fuerzas necesarias para salir adelante. Gracias por escucharme y por dejarte escuchar eres una mujer como pocas, y de poca, se que también conquistarás el mundo.. Y yo estaré ahí a tu lado apoyándote siempre. Recuerda nunca dejar de pensar que tú eres el centro de tu vida y las demás cosas simplemente te suplementan. Te adoro

A Marco, Claudia y Emiliano

Acaban de aderezar a esta familia con un ingrediente más, y no saben lo feliz y emocionante que se siente (claro que estoy consiente que los desvelo son de ustedes!! jeje). Poco a poco me he dado a la tarea de entenderlos y quererlos y se que su amor es la fortaleza de tantos años de incertidumbre. Su camino ahora se ilumina por Emiliano, por lo que la incertidumbre desaparece y solo les queda su amor.

A mis Tías Carmen, Ursula, Vilma, Sara, Bety, Doña Nelsy y mamá Amparito.

Gracia por estar ahí y darme un consejo, así como creer en mí. Sus historias han sido suplementos necesarios para esquivar mis adversidades. Una llamada, un beso o una caricia me hacen más fuerte para superar la adversidad.

A mis tíos Ruben Y Analuz

Quien sin su apoyo inicial esta travesía no hubiese sido realizada. Lo quiero y a sus hijos los adoro..

A Félix Recillas

Gracias por dejarme entrar en este mundo tan maravilloso al que le tenía mucho miedo. Todo con esfuerzo, reditúa..Ahora lo sé. Gracia por todas esas consideraciones y paciencia ante alguien que puede ser muy divagante. Tu apoyo ha sido fundamental en mi desarrollo profesional pero lo más relevante reside en lo agradecido que estoy por tu amistad y confianza.

A Geito Guerrero

A ti por apoyarme, cuidarme, quererme y por permitirme conocerte tanto en lo personal como en lo profesional. Estoy eternamente agradecido de que te hayas cruzado por mi camino ya que te respeto y te quiero. Cada jalón de orejas me lo diste en el momento adecuado y no dejaste que desprendiera los pies de la tierra. Eres genial y tu familia estoy seguro que lo reconoce.

A mi compadre Inti y Viviana

Señores sin ustedes esto hubiese sido insípido, le pusieron de todos los aderezos a éste pastel que hoy termina de cocinarse. Mil gracias por su amistad y confianza. Pero sobre todo por haberle dado el nivel que se merece a esta ciencia, con errores y aciertos pero así hemos aprendido. Son a las personas que más respeto en este ámbito, y ¿por qué?, por que como el sur no hay dos...

A Martín, Ernesto, Olivia, Eria, Mayra, Abraham, Christian 1, Cristian 2, Bernado, Agustín, Blanca, Francisco, Gianelli, Alfonso.

Cada uno de ustedes movió los cimientos de mi preparación y me hicieron ver que todavía me falta mucho por aprender. Este camino nunca acaba pero cuidado de caer en los excesos, esto es una droga y perderse en ella solo te deshumaniza.. así que todo con moderación.

Rata asquerosas Erick García y Gerardo G.

Nuestra amistad estará ahí, por siempre y para siempre. Y aunque este miembro se les vaya por el chiquito rato, siempre estaremos ahí para salir adelante y apoyarnos. Los quiero, los respeto y admiro cada una de sus vidas son un ejemplo para mí.

Gerardo, Itzetzl, Tania, Nancy, Paco, Marbella, Armando.

Todos ustedes entraron en mi vida cuando más solo me sentía y su compañía ha seguido en mi corazón. Nuestros rumbos giraron en direcciones diversas pero sabemos que estamos ahí para escucharnos y dar el consejo. A todos ustedes gracias

A Martincitos

Apareciste y no se decirte como fue y nunca sabré explicarme como pasó, pero lo que vivimos nos dio una estabilidad para replantear que cosas queremos y no.. En sólo un momento la vida giró y me hiciste confiar en algo en lo que yo había dejado de creer. Nuestros caminos se separan pero nuestros corazones se quedarán marcados por toda esa confianza que se depositó y que nunca dudó. El que una mujer confíe en un hombre es algo de respeto y admiración. Y eso y muchas cosas más siento por ti. Dejemos las barajas en el aire y veamos que corrida es la mejor. Gracias por aceptar mi pasado sin cuestionar y por vivir mi presente. Eres simplemente martincitos y te quiero un chingo.

Dr. Rosales

Gracias por enseñarme a no ser conformista. Siempre a anhelar más. Sin su preparación crítica este proyecto no hubiese sido lo mismo. Le debo mucho y le agradezco su amistad y confianza

A Holguer y Fabi

Gracias por quererme y escucharme. Se que esto es para siempre y no bastará que la distancia se interponga en nuestra amistad.. Siempre estaré ahí para escucharlos y apoyarlos. La cruzada que comenzaron hace unos años apenas empieza a tomar color.. Que siempre haya amor entre ustedes, y hacia su hija.

A Maggy Valdez

Por ser esa pequeña chispa que emociona y alegra. Eres genial y lo sabes. Nuestra amistad se generó por diversas acciones circunstanciales y lo que escribimos en esto, nos ha marcado de por vida. Siempre será un placer comer contigo.....

A Lety García

Tu amistad ha sido uno de los tesoros más grandes de lo que me puede rodear. Nunca cambies y nunca dejes de luchar por ti.. Simplemente por ti...

A Lorena

Nuestras vidas se cruzaron y se fusionaron durante tanto tiempo. Tú fuiste una razón y pilar necesario para la creación de esto. Emprendimos un camino juntos, lamentablemente, la inmadurez y miedos nos separaron. Sé que nuestros caminos se bifurcaron pero aún en la distancia siempre existirá esa magia que nos unió. Mil gracias por haberme apoyado y amado tanto. Por dar parte de tu juventud a esta loca relación que tuvimos.. Me diste la certeza y respaldo para luchar por lo que quiero. ¿Como acabó? no sé.. Pero no me arrepiento de nada por que mi corazón no dejó de latir rápido mientras estuvimos juntos...Sé feliz y nunca dejes de pensar en ti, que cuando lo haces, claudicas de lo que te hace ser especial, ser tu. De nuevo gracias

A todos aquello que creyeron en mi y nunca dudaron..Mil gracias

INDICE

	Pag
Carátula	1
Reconocimientos	2
Índice	6
Resumen	8
Abstract	10
Abreviaturas	12
1 Introducción	13
2 Regulación Transcripcional	15
2.1 Transcripción por la RNA Polimerasa II	17
2.2 Enhancers y regiones de control del locus (LCR)	20
3 Cromatina	24
3.1 Definición y componentes	24
3.2 Modificaciones post-traduccionales de histonas	29
3.2.1 Acetilación y desacetilación de histonas	30
3.2.2 Metilación de histonas	33
3.2.3 Fosforilación, ubiquitinación e isomerización de histonas	35
3.3 Metilación del ADN	36
3.4 Complejos de remodelaje dependientes de ATP	39
3.5 Histona H1	42
3.6 Variantes de histonas	43
4 Núcleo	45
4.1 Estructuras y dinámica nuclear	46
5 Dominios cromosómicos	46
5.1 Dominios transcripcionalmente activos (eucromatina)	47
5.2 Dominios transcripcionalmente inactivos (heterocromatina)	49
5.2.1 Centrómero	52
5.2.2 Telómero	54
5.3 Heterocromatina Facultativa	59
5.4 Aisladores cromatínicos o “insulators”	60
6 Dominios globina de pollo	65
6.1 Dominio β -globina de pollo	68
6.1.1 Aisladores del dominio β -globina	75
6.2 Dominio α -globina de pollo	77
6.2.1 Enhancer α -globina	82
7 Comentario sobre los proyectos realizados durante el doctorado	84
Regulación a nivel de dominio	
Regulación a nivel local	
1ª Parte: Protección contra efectos de posición por parte del “insulator” β -globina de pollo.	85
8 Planteamiento del problema	85
9 Hipótesis	86
10 Objetivo general	87

	10.1 Objetivos particulares	87
11	Resultados	88
12	Discusión	109
13	Conclusión	116
14	Perspectivas	117
	(2ª Parte): Regulación genética y epigenética de la expresión de genes α -globina de pollo durante el desarrollo y la diferenciación eritroide.	119
15	Planteamiento del problema	120
16	Hipótesis	121
17	Objetivo general	122
	18.1 Objetivos particulares	122
18	Resultados	123
19	Discusión	151
20	Conclusiones	162
21	Perspectivas	163
22	Materiales y Métodos	
	Cultivo de Tejidos	
	Plásmidos	
	Anticuerpos	
	Hibridización <i>in situ</i> (FISH)	
	Análisis de la integración de un transgen en regiones teloméricas	
	Transfecciones transitorias	
	Extracción de ARN mensajero y RT-PCR semicuantitativo	
	Lisado de células	
	Electroforesis de una dimensión	
	Inmunoblot	
	Co-inmunoprecipitación de proteínas	
	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP y Re-ChIP)	
	Análisis de interacción proteína-proteína por "Pull Down"	
	Análisis de la metilación del ADN mediante bisulfito de sodio	
	PCR sensible a metilación	
	Análisis de la metilación del ADN por enzimas de restricción metilo-sensibles.	
	Diferenciación de células HD3	
	Protocolos descritos en el anexo 2	
23	Referencias	185
	Anexos Artículos	

Resumen

La regulación transcripcional se dá a tres niveles: 1) Cromosoma, 2) Dominio y 3) local. En el laboratorio, nos hemos interesado en el estudio de los dos últimos niveles de regulación. Usando como modelos los dominios α - y β -globina de pollo, nosotros decidimos plantear dos proyectos para la realización de la presente tesis. A nivel de dominio, nos concentramos en el estudio de un elemento tipo “insulator”, conocido como cHS4, localizado en el dominio β -globina de pollo, el cual delimita dicho dominio de una región de heterocromatina (16 kb). Dicho elemento posee la capacidad de proteger transgenes contra el microambiente al cual se someten, evitando su silenciamiento, así como permitiendo una expresión estable y sostenida de éstos. Ha sido propuesto que dicha habilidad del “insulator” se basa en el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina que acetilan y metilan histonas, lo cual permite el establecimiento y propagación de marcas de cromatina abierta que aíslan al transgen del microambiente cromatínico exterior. De esta manera, nuestro interés se centró en determinar si la integración dirigida de un transgen flanqueado con el cHS4 a una región de heterocromatina constitutiva (Telómero) permite la protección de la expresión de mencionado transgen contra el silenciamiento. Nuestros datos muestran que la presencia de secuencias teloméricas provoca un silenciamiento drástico de los transgenes sin “insulators” analizados, y dicho silenciamiento, conocido como efecto de posición telomérico, es provocado por desacetilación de histonas y metilación del ADN. Por su parte, transgenes protegidos con el cHS4 permitieron una expresión sostenida del transgen, sugiriendo que el cHS4 protege contra efectos de posición teloméricos. El análisis de modificaciones epigenéticas nos permitió determinar que en el contexto telomérico, el transgen mantiene una presencia significativa de marcas de cromatina abierta como la metilación de histonas, pero no así de acetilación. Nuestros resultados muestran evidencia contraria a la ya descrita, pero deja al descubierto la propuesta que el mecanismo de protección de transgenes por parte del cHS4 depende del contexto al que se encuentre.

En cuanto a la regulación transcripcional a nivel local, se decidió estudiar los mecanismos genéticos y epigenéticos que controlan la expresión de los genes del dominio α -globina de pollo. Dicho dominio posee tres genes, el gen embrionario π y los genes adultos α^D y α^A , los cuales son regulados durante el desarrollo y la diferenciación

eritroide. El dominio α -globina de pollo posee un elemento tipo enhancer, el cual se encuentra constituido por tres sitios de unión al factor GATA-1, localizado río abajo de los genes globina. El análisis bioinformático de las regiones aledañas al enhancer permitió caracterizar una región de 120 pb localizadas río abajo del enhancer conservadas en el pato y en el pollo. Inicialmente, nosotros evaluamos si dicha región es de relevancia para la función del enhancer. Nuestros resultados muestran que la región de 120 pb modula la función del enhancer durante la diferenciación. Dicha modulación se basa en la co-existencia e interacción de GATA-1 y YY1 sobre la región de 120 pb. Así mismo, al evaluar el efecto de dicho enhancer sobre los 3 promotores α -globina, encontramos que dicho efecto es diferencial, con una marcada preferencia de *trans*-activación por el promotor embrionario. A través del uso de inhibidores de la metilación del ADN, detectamos que el gen embrionario π se encuentra metilado en el locus endógeno. La metilación local del ADN evita que el promotor del gen embrionario sea activado en etapas adultas, así mismo sugerimos que dicha marca epigenética es establecida en etapas tempranas de la diferenciación adulta. La mantención de la metilación sobre el promotor embrionario es dependiente de MeCP2. En resumen, la regulación de genes globina a nivel de dominio y local es más compleja que lo previamente reportado, involucrando elementos que actúan en los dos niveles de regulación abordados en esta tesis, es decir, tanto a nivel local como de dominio.

Abstract

Transcription regulation can be studied at three different levels: chromosome, domain and local level. During the last 10 years, our laboratory has been interested in studying the local and genomic domain regulation levels, using the chicken globin loci as models. These loci, composed by the α - and β -globin group of genes, are a complex system widely used for analysis of eukaryotic gene expression. Two questions were addressed for the development of this thesis. For the domain level, we choose the chicken β -globin cHS4 insulator from the β -globin domain, which is located at the 5' end of the domain and establish the boundary between a 16 kb heterochromatic region and the β -globin locus. The cHS4 insulator can protect a transgene against chromosomal position effects allowing a stable and constant expression of a linked reporter gene. It has been suggested that this protection is due to the active recruitment of chromatin remodelers to the insulator, like histone acetyltransferase and histone methyltransferases. However, it is not clear whether the cHS4 insulator is able to protect transgene expression against the silencing effect of a constitutive source of heterochromatin, like telomeres. Using either an insulated or a non-insulated transgene flanked with telomeric repeats, we targeted the transgene integration at a telomeric region. The integration of a non-insulated transgene at the telomere resulted in a dramatic alteration of transcription, including a rapid silencing of expression. This phenomenon is known as telomeric position effect and is mainly dependent on DNA methylation and histone deacetylation. Nevertheless, the integration of cHS4 insulated transgene had no effect over the expression of the reporter, even after 100 days of continuous culture in absence of selection, showing that the cHS4 insulator protects against telomeric position effects. The analysis of epigenetic marks demonstrated the establishment of open chromatin marks in the insulated transgene, including dimethylation of lysine 4 and 79 of histone H3. However, acetylation marks are absent from the transgene, supporting the idea that this modification is not required by the cHS4 insulator for the establishment of an open transcription domain at the telomere. In other words, our work proposes that the cHS4 insulator may adapt by itself to the environment where it is integrated in order to keep its protective role.

At the local regulatory level, we decided to use the chicken α -globin domain, which is composed by three genes, the embryonic π gene and the adult α^D and α^A genes. These genes are regulated along erythroid development and differentiation and

the major known regulator is a silencer/enhancer element located side-by-side at the 3' end of the domain. The enhancer was initially identified as a DNA sequence mainly composed by three GATA-1 binding sites. Sequence comparison between duck and chicken allowed identifying a conserved 120-bp region downstream of the enhancer, but its relevance is not clear. Curiously, it is not clear whether the enhancer is selective for a specific α -globin promoter, even less the relevance of the conserved 120-bp DNA-fragment for the enhancer function. We first addressed the function of the conserved 120-bp fragment in the context of the enhancer function. Using an array of transient transfection, point-mutation and GATA-1 over-expression assays, we found that the 120-bp element can modulate the enhancer *trans*-activation ability differentially during development and differentiation. The modulation depends on GATA-1 interaction with an ubiquitously-expressed transcription factor, named Ying Yang 1. Interestingly, the enhancer can *trans*-activate the expression of the three α -globin promoters at different levels, showing a preference for the embryonic π promoter during all the studied stages of erythroid development and differentiation.

It is known that the α -globin genes are developmentally regulated. This is suggested by the transient expression of the embryonic π gene until the 5th day post-coitum, when α -globin switching off takes place, silencing the embryonic gene and turning on the expression of the adult genes. Although the expression of the π gene is restricted to erythrocytes between 5th to 7th day postcoitum, our data show a latent ability to *trans*-activate the expression of the embryonic gene in adult stages during development. Curiously, the promoter of the π gene in adult stages exhibits a stable DNA methylation pattern and its inhibition produces the reactivation of the embryonic π gene in adult-committed erythroblasts. However, the methylation-dependent associated machinery is not recruited to the promoter until the last stages of differentiation, when the adult genes are being expressed. On the other hand, chromatin immunoprecipitation allows us to suggest that the transcription factor composition of the embryonic promoter is simpler than the adult promoters, and this simplicity seems to be responsible for the potential activation in adult committed erythroblast. In general our results support that epigenetic mechanisms, mainly DNA methylation, are needed in order to avoid the early expression of the embryonic gene in adult stages offering a novel view of globin regulation.

Abreviaturas

ADN- Ácido desoxiribonucleico

ARN- Ácido ribonucleico

LCR- Región de control del locus

cHS4- Sitio de hipersensibilidad 4 del dominio β -globina de pollo

CRDA- Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP

H3K9me3- Di-metilación de la lisina 9 de la histona H3

H4K20me3- Di-metilación de la lisina 20 de la histona H4

H3K4me2- Di-metilación de la lisina 4 de la histona H3

H3K79me2- Di-metilación de la lisina 79 de la histona H3

ChIP- Inmunoprecipitación de cromatina

TSA- Tricostatina A

5azaC- 5-aza-2'-deoxicitidina

1. Introducción

Hasta antes de los años 90, el atributo principal conferido al núcleo celular fue el contener a un universo de genes, que constituyen la base de los principales mecanismos de herencia y procesos bioquímicos que perpetúan la vida celular. Por lo tanto, el conocer la cantidad de genes que conforman el genoma, sus productos potenciales y sus mecanismos de regulación se volvió una prioridad. En este ámbito, los estudios se realizaron considerando que el ADN se encontraba “desnudo” con lo que se consideraba que toda la maquinaria transcripcional tenía libre acceso. Aunque dichos estudios proporcionaron conceptos básicos para un entendimiento inicial de la regulación génica, ha sido necesario considerar que el ADN no se encuentra en forma lineal y “desnudo”; por lo que muchos conceptos se han replanteado. El genoma de un organismo eucarionte se organiza en una serie de estructuras que han mostrado ser fundamentales para efectuar diversas funciones. El ADN se asocia con un conjunto de proteínas, conocidas como histonas, constituyendo lo que se conoce como “Cromatina”. Esta estructura nucleoprotéica posee una organización, regulación y localización definida dentro del núcleo celular. Dicha organización en conjunto con la participación de elementos reguladores que se localizan en el ADN permiten una regulación fina y específica, la cual dicta los patrones de expresión para cada gen en un momento y tejido dado de un organismo.

Durante los últimos años el núcleo ha resultado ser un universo de secretos sorprendentes e insospechados. De ser considerado como un “plato con espagueti” donde el genoma no poseía una organización definida, el núcleo se ha convertido en un organelo cuya organización es fundamental para la regulación y dinámica de la expresión génica. Durante mucho tiempo, la atención se centró en las regiones donde

se encuentran los genes, así mismo se planteó que el resto de genoma estaba constituido por “ADN basura”. Sin embargo, durante los últimos 20 años ha sido evidente que este adjetivo no es tan real y ha sido injustamente usado. Con base en que sólo el 2% del genoma humano contiene secuencias codificantes, resulta intrigante cuestionar por qué las células incrementaron de manera significativa la cantidad de ADN y no así el número de genes a lo largo de la evolución. De lo anterior surgieron diversas preguntas con el fin de entender cómo es que un organismo tan complejo como el ser humano aún preserva millones de pares de bases de ADN sin “ninguna” aparente función (secuencias no-codificantes). En la actualidad se considera que procesos tan complejos y vitales como diferenciación, desarrollo, meiosis y mitosis, tener una dependencia tanto funcional como estructural hacia el ADN no-codificante. Por lo anterior, en esta tesis se pretende mostrar un panorama más amplio de la relevancia de los elementos de regulación localizados en el ADN no-codificante, con la finalidad de reivindicar su importancia en diversos procesos biológicos.

2. Regulación transcripcional

La regulación de los genes eucariontes está dada por una serie de elementos en *cis* codificados en la cadena del ADN, los cuales son necesarios para que la maquinaria transcripcional pueda establecer la presencia de un gen. Los principales elementos en *cis* que controlan la expresión de los genes son los promotores y los elementos de regulación a distancia (Figura 1). El promotor es la región localizada cercana al sitio de inicio de la transcripción y está compuesto por un elemento mínimo (\pm 30 pares de bases del sitio +1) y por elementos de regulación proximales. El elemento mínimo está constituido frecuentemente por una secuencia Py_2CAPy_5 (Py: pirimidina) localizada entre -3 a +5 conocida como iniciador, así como una secuencia TATA (caja TATA) localizada alrededor del nucleótido -25. Durante los últimos años otras dos nuevas secuencias han sido caracterizadas, el elemento de unión al factor TFIIB, conocido como BRE y, por otro lado, el elemento DPE –del inglés “downstream promoter element”-, localizado usualmente alrededor del nucleótido +25. Diversos promotores poseen uno o varios de estos elementos, sin embargo existe evidencia que sugiere que en algunos casos estos elementos pueden ser dispensables entre sí (Figura 1)(74).

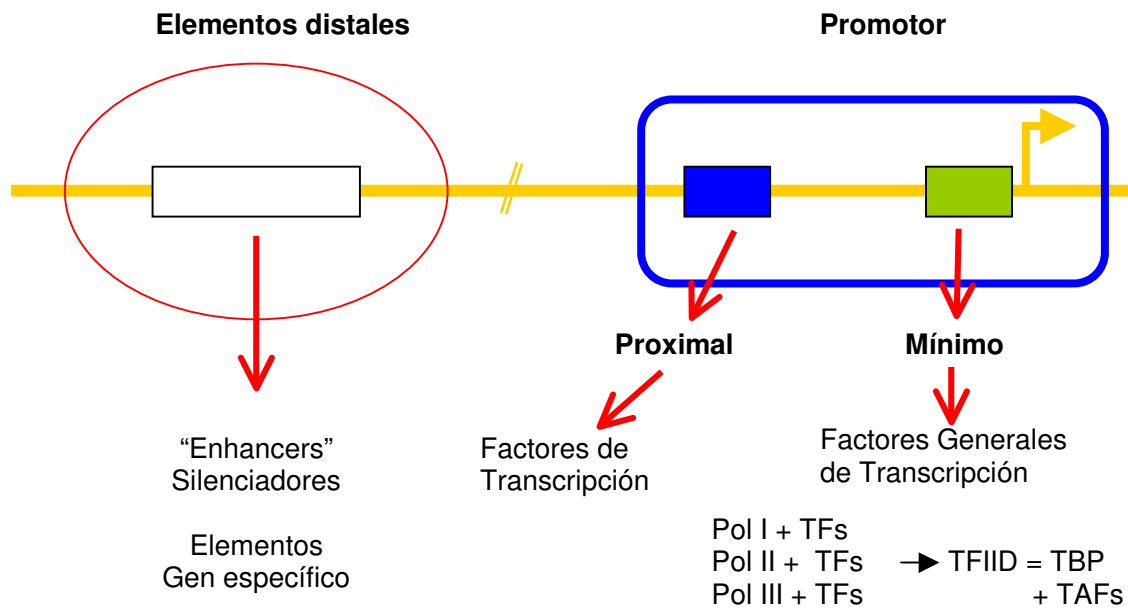


Figura 1.- Elementos de regulación transcripcional. Los elementos de regulación son los proximales y distales. Los elementos proximales están constituidos por elementos mínimos y proximales, los cuales reclutan a la maquinaria basal (RNA Polimerasa I, II o III, así como factores transcripcionales –TFs-) y a factores transcripcionales específicos de tejido, respectivamente (TBP, proteína de unión a la secuencia TATA; TAF, Proteína asociada a TBP). Por su parte, los elementos distales están involucrados en la regulación en tiempo y espacio de genes específicos. Estos elementos reclutan a factores específicos de tejido que actúan sobre su promotor blanco de manera independiente a la distancia entre ellos.

El elemento mínimo es la secuencia de ADN reconocida por los factores generales de la transcripción –maquinaria basal- y que posee la capacidad de mediar la iniciación correcta y basal de la transcripción, al menos en condiciones *in vitro*. Por otro lado y cubriendo un área de 400 pares de bases (pb) río arriba del sitio +30, usualmente se localizan los elementos proximales del promotor y, frecuentemente, contienen sitios de unión a factores de transcripción (143). La unión de activadores o represores a este elemento, en cooperación con la maquinaria basal, coordinan y permiten un incremento mayor en los niveles de expresión de un gen, así como una regulación más específica del proceso en tiempo y espacio (74).

Los elementos de regulación a distancia son secuencias localizadas en regiones del genoma que van de unas cuantas decenas de pares de bases a cientos de pares

bases del promotor, sin importar su posición respecto a éste. Dentro de estos elementos podemos encontrar secuencias potenciadoras y silenciadoras de la transcripción. Funcionalmente, los potenciadores o enhancers se definen como secuencias que incrementan la transcripción de un promotor, de manera independiente de su posición y orientación (61, 178). Dentro de este tipo de elementos podemos encontrar a los elementos de control del locus (LCRs) y a potenciadores -enhancers- (ver más adelante). Por otro lado, existen elementos que poseen el efecto contrario al disminuir los niveles de expresión de un gen, conocidos como silenciadores; la funcionalidad de estos elementos también es independiente de la orientación y posición (43). Como se puede apreciar, la regulación génica es compleja tanto por los componentes como por los mecanismos que se utilizan. Así mismo, el panorama se complica al contemplar el entorno genómico y la organización cromatínica que el genoma adquiere tanto a nivel local de un gen como a nivel cromosómico.

2.1 Transcripción por la RNA Polimerasa II

En eucariontes la transcripción de los diferentes mensajes codificados en el genoma es realizado por 3 diferentes RNA polimerasas, la cuales se denominan I, II y III. Dentro de estas, la RNA polimerasa II (RNA Pol II) es la responsable de producir la mayoría de los ARN mensajeros que codifican para proteínas. Esta polimerasa es un complejo proteico de gran tamaño (>500 kDa) compuestos de 8-14 subunidades. Funcionalmente, la RNA Pol II es incapaz de iniciar la transcripción por sí misma, debido a que requiere de un conjunto mínimo de factores de transcripción auxiliares, que en su conjunto se le conoce como maquinaria basal. Este concepto va de la mano con la definición de un promotor mínimo, ya que es la secuencia mínima requerida para

que dicha maquinaria basal inicie la transcripción (74). El paso inicial en la formación del complejo es el reclutamiento del factor TFIID a la caja TATA. Este factor posee dos componentes esenciales, una proteína que reconoce la secuencia TATA, denominada TBP –del inglés “TATA binding protein”; así como un número variable de factores asociados a la proteína TBP, llamadas TAFs – del inglés “TBP-associated factors”- (Figura 1) (103). Diferentes TAFs pueden unirse a la TBP y, de esta manera, discriminar entre los diferentes promotores a activar. Así mismo, la expresión diferencial de las TAFs modula y determina el patrón de expresión de ciertos genes, con el fin de seleccionar el promotor a activar. Existen TAFs con estructuras o dominios proteicos similares al dominio central de las histonas (143), y cuya presencia en el complejo de iniciación resulta fundamental para la expresión de genes específicos en levadura (117). Así mismo, algunas TAFs poseen actividad de acetiltransferasa de histonas, la cual se ha sugerido que es relevante para la remodelación estructural del promotor (ver más adelante) (74). Por otro lado, la unión de la TAF_{II230} con TBP y evita que cualquier secuencia TATA en el genoma sea reconocida, ya que la región de interacción sobre la TAF mimetiza el surco menor de dicha secuencia. Una vez reconocido el blanco sobre el promotor, TFIIA se incorpora al complejo establecido y desplaza a la TAF_{II230} y favorece el desplazamiento del TBP sobre la región +30 hacia +10. TBP puede ejercer una torsión sobre el ADN del promotor con el objetivo de favorecer la exposición del BRE y el posterior reconocimiento por TFIIB (111). La subsecuente incorporación de TFIIB en la región posterior a TBP estabiliza el complejo y al parecer expone la superficie necesaria para la incorporación de la RNA polimerasa. Posteriormente, el factor TFIIIF, acoplado a la RNA polimerasa, permite el posicionamiento de la polimerasa sobre el promotor. Sin embargo, el inicio de la transcripción se da hasta que

los factores TFIIE, H y J son incorporados al complejo en el orden que se mencionan. TFIIH, quien posee actividad de cinasa, helicasa y ATPasa, fosforila el extremo carboxilo de la RNA polimerasa II. Dicho extremo carboxilo consiste de 25-52 repeticiones del heptámero YSPTSPS, denominado como CTD – del inglés “Carboxyl-Terminal Domain”- el cual se hiperfosforila en los residuos de serina causando la liberación de la polimerasa del promotor y el inicio de la transcripción. Conforme las investigaciones han avanzado, este proceso ha mostrado ser más complejo, dado que necesita del reclutamiento de diferentes y nuevas entidades proteicas para lograr el adecuado reconocimiento del promotor blanco.

Como ya se mencionó, los factores transcripcionales (activadores) pueden identificar a sus secuencias blanco sobre elementos proximales del promotor (dentro de las 400 pb río arriba del sitio +30); esta unión es necesaria para identificar los promotores en el contexto de la compleja organización que representa la cromatina (ver más adelante). Por lo que se sugiere que, dentro de los pasos previos a la interacción con la maquinaria basal, el reconocimiento de factores transcripcionales sobre el promotor es fundamental para remodelar la estructura de la cromatina que posee el promotor. Un ejemplo de esta situación ocurre sobre el promotor del gen del interferón beta en linfocitos T, en la cual el factor NF-kB interacciona con su secuencia blanco en su secuencia promotora. Dicha unión permite la atracción de complejos de remodelaje dependientes de ATP (SWI/SNF) junto con acetiltransferasas de histonas (1). El promotor descubierto o remodelado, finalmente es identificado por la maquinaria basal de transcripción, contribuyendo al inicio de la expresión del gen bajo su control. En resumen, la combinación adecuada entre secuencias en *cis*, la maquinaria basal, factores generales de transcripción y asociados, así como actividades enzimáticas que

remodelan la estructura de la cromatina es fundamental para llevar a cabo la expresión específica de los genes.

2.2 Enhancers y regiones de control del locus (LCR)

Existen ciertos genes cuya regulación necesita ser controlada de manera específica de acuerdo al tejido y al momento en donde se deben de expresar, y cuyas secuencias promotoras no son suficientes para proporcionar niveles adecuados de sus productos proteicos. En estas circunstancias, los genes hacen uso de elementos que potencian la actividad transcripcional del promotor y que pueden actuar sobre distancias largas. Dentro de estos elementos encontramos a los potenciadores o enhancers, así como a los elementos de control del locus (LCR) (61, 178). Funcionalmente, estos elementos son definidos como secuencias que incrementan la transcripción de un promotor ligado a éste y que actúan de manera independiente a la orientación y posición respecto al promotor que regulan. La caracterización de estos es, inicialmente, realizada a través de ensayos de sensibilidad al corte por la endonucleasa DNasa I; usualmente los sitios hipersensibles al corte por esta enzima –sin incluir a las regiones promotoras- correlacionan con algún elemento a distancia (53).

Los potenciadores o enhancers son elementos en *cis* cuya secuencia se organiza de forma modular y específica, a la cual se unen diversos factores transcripcionales tanto tejido específicos como ubicuos (53). Dichos elementos pueden ser regulados a través de modificar post-traduccionalmente a las entidades proteicas reclutadas a éstos (43). Hasta el momento, estudios genéticos y moleculares han ayudado a la caracterización de varios elementos tipo enhancer tanto en genes tejido

específico como en genes constitutivos. A pesar de ello, aún persisten dudas en cuanto a sus mecanismos y modos de acción.

Los LCRs por su parte son elementos potenciadores localizados a grandes distancias de los genes que modifican. Estos elementos tienen una actividad tejido específica, y sus blancos son genes que necesitan ser expresados en una determinada etapa del desarrollo o diferenciación (107). Usualmente, y a diferencia de los enhancers, estos elementos están constituidos por varios sitios de hipersensibilidad a la DNasa I (SHD) cuya similitud a nivel de secuencia entre ellos no es un requisito, aunque pueden compartir sitios de unión a los mismos factores. La organización de cada uno de estos sitios de hipersensibilidad es modular y resulta importante remarcar su función es tejido específica. Funcionalmente, los LCRs se definen por su capacidad de incrementar la transcripción de un promotor unido a éste de manera dependiente al número de copias e independiente al sitio de integración tanto en ratones transgénicos como en un contexto estable en células en cultivo (40). La función de los enhancers con respecto a los LCRs es distinto, con base en que los potenciadores que actúan sobre secuencias transgénicas no son funcionales en todos los sitios de integración a los que son integrados. Durante los años 90s se propuso que los LCRs poseen además una actividad de apertura de la cromatina, la cual favorece la expresión génica en la mayoría de los contextos genómicos a los que fueron incorporados (88, 91).

Los potenciadores son elementos que están involucrados en dirigir el tiempo y la especificidad de tejido en el que un gen debe ser expresado. Se ha sugerido que estos elementos son primero identificados por factores específicos, y existe evidencia de que la maquinaria transcripcional (RNA pol II y TAFs) pueden ser reclutada (104, 105). Posteriormente, la maquinaria es trasladada al promotor para remodelarlo y facilitar el

inicio de la transcripción. En consecuencia durante el proceso de activación transcripcional, los potenciadores y promotores, separados por distancias considerables, deben de encontrarse físicamente cercanos para iniciar la transcripción (43). Sin embargo, hasta el momento no queda claro cómo los potenciadores realizan dicho proceso de reconocimiento a distancia. Evidencia genética y bioquímica ha permitido apoyar 3 modelos (Figura 2):

1) Modelos de formación de asas. En este modelo la organización del genoma en cromatina y su subsiguiente estructuración en asas cromatínicas podría permitir que elementos que se encuentran a grandes distancias se aproximen e incluso se asocien. Lo anterior con base en un estudio denominado de 3C (captura conformacional del cromosoma), que permite, experimentalmente, demostrar que dos secuencias genómicas -linealmente distantes- se encuentren en contacto o físicamente cercanas (25, 26). Dicha estrategia utiliza la inmovilización de la cromatina a través de un proceso reversible de fijación con formaldehído. Posteriormente, la cromatina es digerida con enzimas de restricción y religada, para posteriormente realizar amplificaciones de ADN usando oligonucleótidos de las dos regiones distantes a analizar, en espera de aislar una secuencia bien definida. De esta manera se ha encontrado que estos elementos pueden coexistir en un área relativamente cercana. Esta cercanía favorece la formación de holocomplejos que agrupan de manera altamente específica tanto a factores transcripcionales como remodeladores de la cromatina, con la finalidad de activar la transcripción de un gen de manera específica (61).

2) Modelo de interacción facilitada. En este modelo se propone que existen proteínas que se localizan a lo largo de la fibra de cromatina y sirven como un puente estructural para identificar y atraer al promotor blanco. Esto con base en experimentos

de genética en *Drosophila* y al descubrimiento de proteínas como Chip (proteína de unión a dominio LIM), las cuales son requeridas para la actividad máxima de ciertos enhancers en *Drosophila*. Chip puede interaccionar entre proteínas LIM reclutadas por factores del enhancer, y cuyos sitios de unión están interpuestos entre dichos elementos y promotores. Este tipo de proteínas podrían facilitar la identificación del promotor blanco por la maquinaria transcripcional reclutada a los enhancers (25).

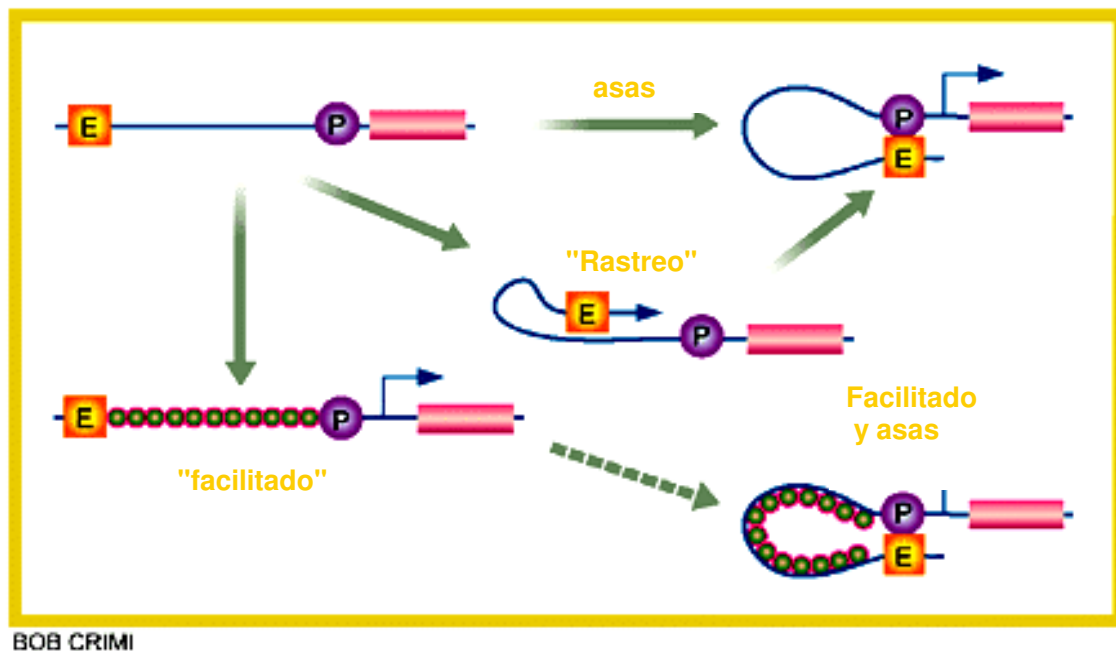


Figura 2.- Modelos de interacción de elementos distales con promotores. Un elemento a distancia podría, a través de la formación de un asa, interaccionar con su promotor blanco. Por otro lado, el enhancer y la maquinaria asociada a el podría rastrear sobre la cromatina hasta localizar el promotor blanco. O finalmente, proteínas facilitadoras ayudarían al enhancer a encontrar a su promotor blanco. Estos modelos no son excluyentes entre sí. Esquema tomado de Bulger M.,(26) .

3.- Modelo de rastreo. En este modelo se propone que la maquinaria transcripcional es inicialmente reclutada en el enhancer o el LCR, e inicia un rastreo a lo largo de la cromatina hasta encontrar su promotor blanco. Si consideramos este modelo como válido, la actividad basal de la RNA polimerasa permitiría la transcripción de regiones intergénicas. Con el uso de sondas específicas, se han caracterizado recientemente transcritos intergénicos, los cuales abarcan largas áreas genómicas sobrelapando o no

con secuencias codificantes. Se ha postulado que la transcripción de estos ARNs es una manera de mantener abierta una región transcripcionalmente activa (61). La actividad basal de la transcripción podría reclutar la maquinaria necesaria para mantener remodelada la cromatina durante el tiempo que un gen sea activado por un potenciador.

El espectro de elementos analizados y los resultados hasta el momento obtenidos no permiten establecer qué modelo es el correcto a nivel molecular, sin embargo, se considera más viable que estos modelos no sean excluyentes entre sí. Hasta el momento, diversos grupos de investigación están abocados a conocer el mecanismo exacto de función de los elementos a distancia.

3. Organización del genoma en cromatina

3.1 Definición y componentes

Una célula de vertebrados posee alrededor de 2-4 metros de ADN compactados en una estructura de apenas 10 μm de diámetro -el núcleo-. Para alcanzar dicha compactación, las células organizan el ADN en cromatina, la cual consiste en la asociación del ADN con un conjunto de proteínas, denominadas histonas, con la finalidad principal de compactar el genoma y lograr contenerlo al interior del núcleo (55). La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, el cual abarca aproximadamente 146 pb de ADN (Figura 3) contactando de manera externa a un octámero de histonas. Dicho octámero consiste en un par de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El nucleosoma, quien representa el nivel primario de organización del genoma, compacta alrededor de 6 veces el ADN. Cada nucleosoma está asociado al nucleosoma vecino por un fragmento de ADN que va de 40-60 pb, región denominada internucleosomal. A

nivel microscópico, dichos nucleosomas dispuestos sobre el ADN forman una fibra cuyo grosor es de alrededor de 10 nm (Figura 3)(55). El siguiente nivel de organización está constituido por un conjunto de 6 nucleosomas cuya estructura posee un diámetro de 30 nm, conocida como solenoide. Dicho conjunto de nucleosomas provoca una compactación total de 50 veces. Esta estructura es estabilizada por una quinta histona que no forma parte del nucleosoma, conocida como H1 (ver más adelante), y contribuye a la formación de una estructura tipo zig-zag. Dicho rearrreglo es posteriormente compactado a una estructura conocida como solenoide, a través del reclutamiento de proteínas accesorias. Dichas proteínas, incluyendo a la histona H1, interaccionan con las regiones internucleosomales estabilizando la estructura de 30 nm contribuyendo a la formación de los subsecuentes niveles de compactación. Interesantemente, evidencias experimentales, respaldadas por cálculos matemáticos, proponen que dicha fibra es en donde se llevan a cabo los principales procesos de regulación génica, ya que el área del núcleo no sería suficiente si los genes activos se encontraran organizados en la fibra de 10 nm. La fibra de 30 nm es posteriormente organizada y/o estructurada favoreciendo la formación de asas cromatínicas abarcando áreas genómicas de incluso cientos de kilobases, las cuales pudieran constituir dominios génicos. Posteriormente, diversos niveles de compactación más complejos contribuyen a la formación de una fibra de 240 nm, la cual puede ser identificada como la base para la formación de los cromosomas metafásicos. Esta organización permite compactar el ADN alrededor de 10,000 veces (55). Sin embargo, al igual que en las estructuras previas a su formación, aun no ha podido ser descifrada. Como ya se mencionó, el máximo grado de compactación se da durante la mitosis, pero ¿qué ocurre en células que se encuentran en interfase? La respuesta a la pregunta anterior esta bajo intensa investigación, sin

embargo varios estudios apuntan a que cada cromosoma ocupa una región discreta del núcleo, denominado territorio cromosómico, en este espacio nuclear las secuencias a ser transcritas y las secuencias no-codificantes se encuentran aparentemente distribuidas de manera no aleatoria. En este nivel, diversos grupos proponen que el patrón de expresión de un cromosoma se sustenta en 3 factores, 1) el patrón de genes a expresarse en un tejido, 2) el orden lineal de éstos y 3) la organización topológica que la cromatina presenta dentro de cada territorio al interior del núcleo. En otras palabras, el patrón específico de expresión se define por la suma de secuencias de eucromatina y heterocromatina que cada cromosoma posee; además su distribución tri-dimensional al interior del núcleo contribuye a la regulación diferencial de los genes (96). Así, diversos esfuerzos están en marcha con el fin de entender cómo se organizan y cuales son los componentes de ambos tipos de cromatina.

Funcionalmente, el compactar el ADN en cromatina impone *per se* un impedimento o control sobre diversos procesos, lo anterior como consecuencia de una reducida accesibilidad a ciertas secuencias o regiones del genoma. Por ejemplo, las zonas de eucromatina son duplicadas primero respecto a las de heterocromatina ocurriendo en la parte final de la fase S del ciclo celular (24). En transcripción, un regulador o la maquinaria basal de transcripción podrían tener o no acceso a una región de regulación de acuerdo al grado de compactación de la cromatina. Aunque esto parece una desventaja, el proceso de compactación puede ser necesario para ocultar secuencias regulatorias de genes que no son requeridos en un momento dado, lo cual sugiere que este proceso es finamente regulado. Si dicha compactación fuera un proceso definitivo o irreversible, la célula podría estar en problemas al compactar, por ejemplo, a un gen esencial involucrado en el control del ciclo celular. Afortunadamente,

la célula eucarionte desarrolló mecanismos de compactación, así como mecanismos que revierten de manera regulada dicho proceso.

Un pilar clave en la organización y compactación de la cromatina es el conjunto de factores cuya tarea es la de fomentar, mantener o alterar la asociación de las histonas con el ADN. En los factores encontrados existen histonas que que sufren diversas modificaciones post-traduccionales como la metilación del ADN, el reclutamiento de diversos complejos proteicos que remodelan la cromatina, así como de proteínas estabilizadoras de la cromatina que influyen sobre la transcripción de manera positiva o negativa (53, 55). Estos procesos constituyen la base de lo que se conoce como “**Epigenética**”, concepto asignado a los procesos que modifican el patrón de expresión de un gen sin involucrar cambios en la secuencia del ADN (Figura 2).

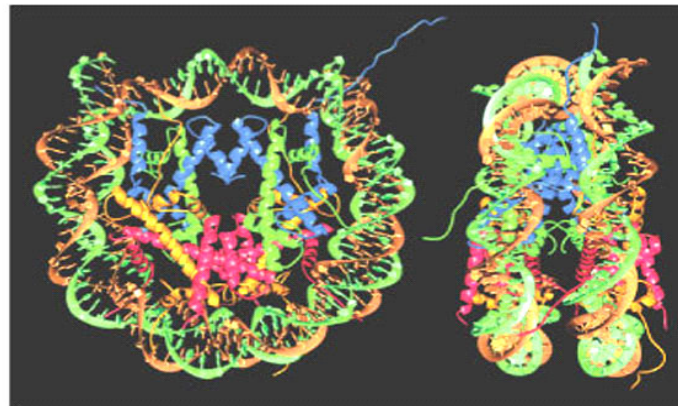
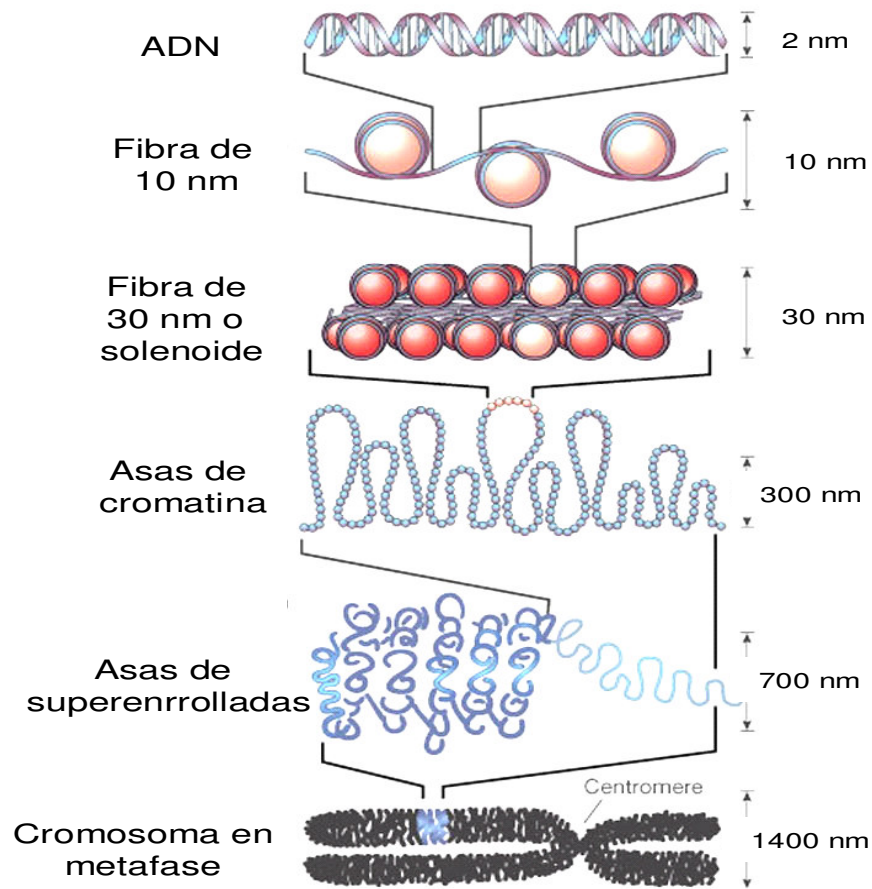


Figura 3.- Niveles de compactación del ADN. El ADN se enrolla alrededor de un octámero de histonas para dar lugar al nucleosoma. El cual con la ayuda de la histona H1 se organiza en la fibra de 30 nm. Posteriormente, esta fibra forma asas de gran tamaño que constituye parte fundamental de niveles superiores de compactación hasta la formación de cromosomas metafásicos. Imagen inferior. Estructura cristalográfica del nucleosoma a una resolución de 2.5 Å. Esquema tomado de Felsenfeld y Groudine (55).

3.2 Modificaciones post-traduccionales de histonas

Las histonas son blanco de modificaciones post-traduccionales que alteran su relación con el ADN. El efecto de estas modificaciones sobre la expresión génica debe de ser entendida en el contexto de la naturaleza de los componentes que conforman a la cromatina. Las histonas son proteínas que poseen una carga positiva (básica) intrínseca proporcionada por aminoácidos como la lisina, favoreciendo una asociación muy fuerte con el ADN (cuya carga neta es negativa por los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos). Por lo tanto, una modificación en la carga de las histonas puede alterar la estructura del nucleosoma y su asociación con el ADN. Cada histona se encuentra constituida por dos dominios estructurales denominados dominio tipo histona – del inglés: “Histone fold”, o región “core”- y de características globulares cuya función es la de fomentar los contactos entre histonas y favorecer el enrollamiento del ADN (55).

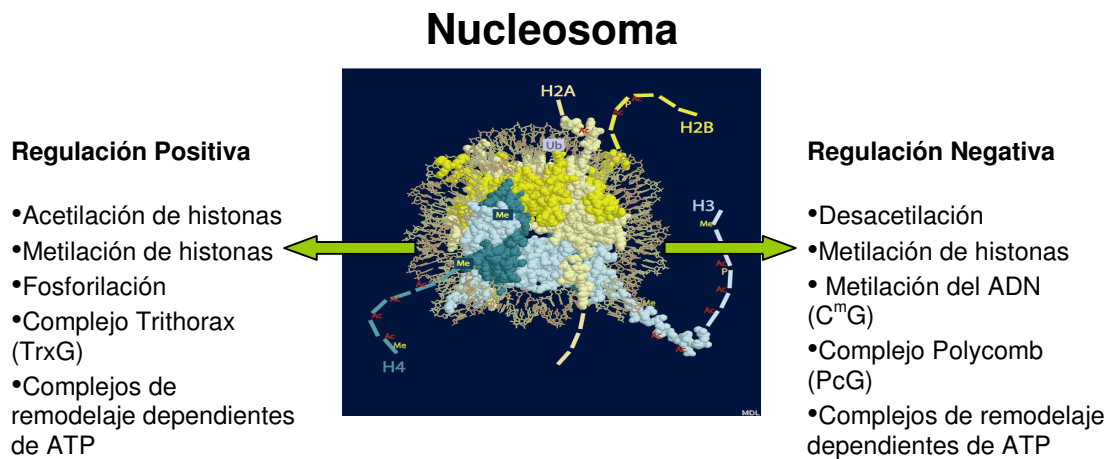


Figura 4.- Regulación epigenética. Concepto asignado a la regulación de la expresión génica sin involucrar la secuencia del genoma. Dicha regulación puede favorecer o reprimir la expresión de genes, a través de una serie de modificaciones covalentes sobre el ADN (metilación en dinucleótido CG) e histonas (metilación, acetilación, fosforilación, etc.), así como del reclutamiento de complejos proteicos que ayudan a modificar la estructura de la cromatina de manera dependiente de ATP o independiente de ATP (Grupo Polycomb y Trithorax).

La porción amino terminal de las histonas representa regiones dinámicas que sobresalen del nucleosoma, por lo que son un blanco fácil de modificaciones post-traduccionales, aunque el dominio central o “core” puede ser modificado por diversas enzimas (77, 114, 175). Las principales modificaciones son acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación. Cada una de estas modificaciones posee un efecto definido sobre la dinámica nucleosomal (Tabla 1). Para lo anterior debemos de considerar que hasta la fecha se han reportado al menos 20 diferentes sitios modificables en las cuatro histonas (Figura 5), por lo que son necesarias nuevas investigaciones para evaluar su papel en la formación, manutención o remodelaje de la cromatina (64, 77, 114). Por lo tanto, si consideramos el número de aminoácidos modificables, podemos deducir que el universo de combinaciones que se pueden formar es grande y difícil de definir experimentalmente. A esta serie de combinaciones factibles que se encuentran sobre los nucleosomas se le conoce como “**código de histonas**” (55). Por lo que resulta de gran relevancia desarrollar estrategias que permitan el análisis de dichas combinaciones de modificaciones post-traduccionales para cada histona. Pero más importante aún, definir cual es la función fisiológica para cada grupo de modificaciones específicas, en particular, desde una perspectiva epigenética (Tabla 1).

3.2.1 Acetilación de histonas

La acetilación en histonas neutraliza la carga positiva de la lisina por lo que la interacción histonas-ADN se debilita; dicha reducción en carga positiva favorece un mayor movimiento del nucleosoma y, por lo tanto, fomenta el proceso de transcripción (77). Las enzimas encargadas de dicho proceso son conocidas como acetiltransferasas

de histonas (HAT; del inglés: “histone acetyltransferase”), entre las que podemos encontrar a p300/CBP, Gcn5, PCAF entre otras. La especificidad de estas enzimas está en duda, ya que se han caracterizado múltiples sustratos para cada una de ellas.

Tabla 1. Modificaciones post-traduccionales en las histonas

Modificación	Aminoácidos modificados	Histona	Efecto
Fosforilación	Treonina Serina	H3, H4, H2A y H2B	Condensación de cromosomas
Acetilación	Lisina	H3, H4, H2A y H2B	Activación de genes
Mutilación	Lisina Arginina	H3, H4, H2A y H2B	Activación y represión de genes
Ubiquitinación	Lisina	H2A y H2B	Activación de gene
Isomerización	Prolina	H3	Activación de genes

Se ha sugerido que la incorporación de estas enzimas a complejos multiproteicos determina en gran medida el péptido a modificar. Por otro lado, las enzimas que revierten el proceso de acetilación, conocidas como “desacetilasas de histonas” (HDAC), están involucradas en compactar la estructura de la cromatina y por lo tanto reducir la activación transcripcional (175). Estas enzimas remueven el grupo acetilo de las lisinas y permiten la recuperación de la carga positiva de dicho aminoácido (77). Un aspecto crítico de dichas enzimas es que no interaccionan directamente con el ADN, por lo que su reclutamiento a su región blanco es promovida por factores y co-factores transcripcionales específicos (175). Existen 3 familias de HDACs las cuales son clasificadas de acuerdo a su sensibilidad a compuestos que inhiben su actividad.

Las familias 1 y 2 están conformadas por más de 10 miembros y son sensibles a Tricostatina A (TSA); estas proteínas se diferencian entre sí por lo dominios estructurales que poseen (83). La familia 3 utiliza NAD como cofactor, por lo que su función puede ser antagonizada por nicotinamida (83). Estas proteínas se han encontrado asociadas a complejos represores, dentro de los que podemos destacar a las proteínas que reconocen ADN metilado (ver más adelante), por lo que su participación en procesos de represión y silenciamiento génico se encuentra ampliamente establecido. Y su presencia es regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional, así mismo, su función puede ser controlada a través de su incorporación selectiva dentro de complejos multiproteicos que modifican la organización de la cromatina. Recientemente se han caracterizados compuestos celulares que regulan la función de estas enzimas conocidos como inhibidores de HDACs. Estas moléculas junto con compuestos sintéticos están siendo estudiadas en detalle para su probable uso terapéutico contra el cáncer, con el fin de reactivar genes que permitan reinstaurar el control del ciclo celular en células tumorales (9).

3.2.2 Metilación de histonas

La metilación de histonas no altera la carga neta de la lisina (114), por lo que su efecto sobre la dinámica de la cromatina no depende de alteraciones en las interacciones electrostáticas entre las histonas y el ADN. La metilación de histonas sirve como marca molecular o “ancla” para la unión específica de proteínas estructurales, las cuales provocan una relajación o compactación de la cromatina con el fin de coadyuvar a la activación o represión génica, respectivamente (133, 137, 181). Por ejemplo, la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me) por metiltransferasas de histonas

está asociada con procesos de activación transcripcional, dada su presencia exclusiva en genes transcripcionalmente activos (114). Por otro lado, la metilación de la lisina 9 de la histona H3 está asociada a una cromatina compacta a través de su reconocimiento por la proteína de hetercromatina HP1. Esta proteína interacciona con la histona a través de su cromodominio, y provoca la expansión de dicha metilación mediante su interacción con la metiltransferasa de histonas SUV39h. Dicha metiltransferasa permite la modificación de las histonas aledañas y, por lo tanto, el subsecuente reclutamiento en la inmediaciones de la proteína HP1 (102). Al parecer, la metilación de aminoácidos sirve como plataforma estructural que permite dictar un código de unión a proteínas específicas para modular la compactación de una zona definida del genoma.

La metilación se definió como un proceso permanente e irreversible sobre zonas específicas del genoma, por lo cual ha sido propuesta como una especie de memoria epigenética. Esta marca permite perpetuar la información contenida en la cromatina a través de procesos tan drásticos y vitales, como la replicación y la mitosis. La estabilidad de dicha marca epigenética podría representar un problema para genes cuya presencia es requerida en lapsos de tiempo cortos, por ejemplo, interleucinas en linfocitos. La cromatina de la mayoría de los genes inducibles se encuentra en una estructura compacta (heterocromatina facultativa), correlacionando con una resistencia generalizada al corte por nucleasas, así como una presencia marcada en la metilación de la lisina 9 (131). En dicho contexto, ¿Cómo es posible que estos genes puedan ser transcritos? La reciente caracterización de proteínas con dominios Jumonji –JmjX- (donde X representa al menos 3 familias denominadas de la A-C) ha cambiado el concepto de que la metilación de histonas es permanente (154, 165, 166). Estas

proteínas pertenecen a un grupo conocido como metaloenzimas (debido al uso de metales inorgánicos como cofactores). Estas se dividen en al menos 3 familias, dentro de las cuales JmjD y C poseen diferentes afinidades por aminoácidos específicos de las histonas (165). Aunque su regulación y genes blanco no han sido caracterizados, se cree que estas proteínas deben de formar parte de complejos de gran peso molecular involucrados tanto en activación como en represión transcripcional dependiendo de la isoforma reclutada y el aminoácido blanco. Por otro lado, la conversión de argininas metiladas a citrulina ha sido otro mecanismo por el cual la metilación pudiera ser reversible y así modificar la organización y estado transcripcional de un gen.

3.2.3 Fosforilación, ubiquitinación e isomerización en histonas

La fosforilación de las histonas está relacionada con procesos de condensación de cromosomas, en especial durante la fase M del ciclo celular. La función de la histona H1, involucrada en la compactación de la cromatina, es regulada mediante su fosforilación en serinas por cinasas específicas, por ejemplo, la cinasa Aurora. Por otro lado, la fosforilación de aminoácidos sobre la histona H3 afecta el reclutamiento de componentes epigenéticos a las lisinas aledañas a los sitios fosforilables, como es la serina 10 (59).

Por otro lado, la ubiquitinación, la cual consiste en la adición de un pequeño péptido de secuencia específica, la ubiquitina está asociada con modificaciones subsecuentes de las histonas. Lo anterior con base en que la inhibición de la ubiquitinación impide el establecimiento de otras modificaciones, como la metilación de histonas. En levadura, la metilación de la lisina 4 de la histona H3 es dependiente de la previa ubiquitinación de la lisina 123 en la histona H2B (153). Al parecer su papel en la

activación transcripcional de genes es fundamental para establecer y permitir modificaciones específicas que mantenga el estatus transcripcional.

La isomerización de la prolina es un mecanismo usado frecuentemente en la regulación de vías de transducción de señales. La prolina de diversos péptidos puede adoptar dos estados conformacionales distintos, *cis* o *trans*, con consecuencias directas sobre la estructura secundaria de las proteínas (124). La isomerasa de prolinas Fpr4 interacciona con el extremo amino terminal de la histona H3, con el fin de catalizar isomerización de las prolinas 30 y 38. Dicha isomerización inhibe la metilación de la lisina 36 de la histona H3 por la metiltransferasa de histona Set2. La eliminación de la actividad catalítica de la isomerasa Fpr4 incrementa los niveles de la metilación de la lisina 36 y, consecuentemente, da lugar a una activación más lenta de ciertos genes inducibles (124). Por lo tanto, la isomerización de prolinas en las histonas emerge como un mecanismo no-covalente que regula la transcripción génica, a través de mediar los niveles de lisinas metiladas en las histonas. En resumen, cada día se demuestra un papel relevante para cada una de las modificaciones post-traduccionales que sufren las histonas, y tanto su número como su función aumentan cada día (Figura 5).

3.3 Metilación del ADN

Esta modificación epigenética sobre el ADN se caracteriza por la incorporación de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina, siempre y cuando se encuentre en el contexto del dinucleótido CG. Lo anterior es hecho por un grupo de proteínas especializadas denominadas metiltransferasas de ADN (Dnmts). La Dnmt1 se encarga de la manutención de la metilación del ADN durante la formación *de novo* de la cromatina. Durante la replicación del ADN, esta enzima modifica la citosina cuando el ADN se

encuentra hemimetilado (Figura 6A) (167). Las Dnmt3a y b son fundamentales para la metilación *de novo*, en función de que son capaces de incorporar un grupo metilo a los dinucleótidos CG del ADN no metilado en etapas tempranas del desarrollo (Figura 6A) (167). Ambas enzimas usan la 5-adenosil-metionina como sustrato, con el fin de transferir un grupo metilo a la citosina (41, 94). Esta modificación se presenta en organismos más complejos, ya que por ejemplo las levaduras carecen de este proceso; asimismo, en moscas y hongos existe una reducida presencia de esta modificación, con funciones poco claras hasta el momento. En cambio, en mamíferos una reducción en los niveles de citosinas metiladas desencadena una mayor inestabilidad genómica y re-expresión de genes silenciados (46). Dicho silenciamiento se debe a dos efectos:

1) Reclutamiento de proteínas de unión a ADN metilado. Existe un grupo de proteínas capaces de reconocer citosinas metiladas, denominadas MBD (del inglés "Methyl Binding Domain protein") o MeCP (del inglés: "Methyl-CpG-binding protein"). Estas proteínas se unen directamente a los grupos metilos de las citosinas y mediante co-represores reclutan desacetilasas de histonas, extendiendo estas señales represoras a las secuencias aledañas (Figura 6B). Es necesario remarcar que la metilación del ADN está directamente asociada a modificaciones post-traduccionales de las histonas (45).

2) La metilación del ADN puede impedir o alterar la unión de un activador transcripcional. Los sitios de unión, cuya secuencia contiene dinucleótidos CG, pueden ser metilados y alterar la unión de uno o varios factores transcripcionales, evitando con esto ejercer su efecto regulatorio sobre el gen blanco (46).

La metilación anormal del ADN se considera de importancia clínica, ya que su presencia ha sido asociada con el silenciamiento de genes necesarios para el control

del ciclo celular, promoviendo ciertos tipos de cáncer (46). Por otro lado, la metilación del ADN juega un papel relevante en la reprogramación del cigoto durante las primeras etapas de la embriogénesis. Después de la fecundación, el genoma paterno es desmetilado casi por completo, seguido por la desmetilación del genoma materno (76, 106). Esto ocurre a lo largo del genoma excepto en dominios con impronta (proceso asociado a la expresión diferencial y mono-alélica de genes paternos o maternos). La metilación del ADN contribuye a establecer qué alelo debe de ser expresado o no. Dicha función involucra factores transcripcionales cuya unión al ADN es afectada por la metilación en las citosinas, por ejemplo, el factor de unión a la secuencia CTCC conocido como CTCF (35, 58, 93).

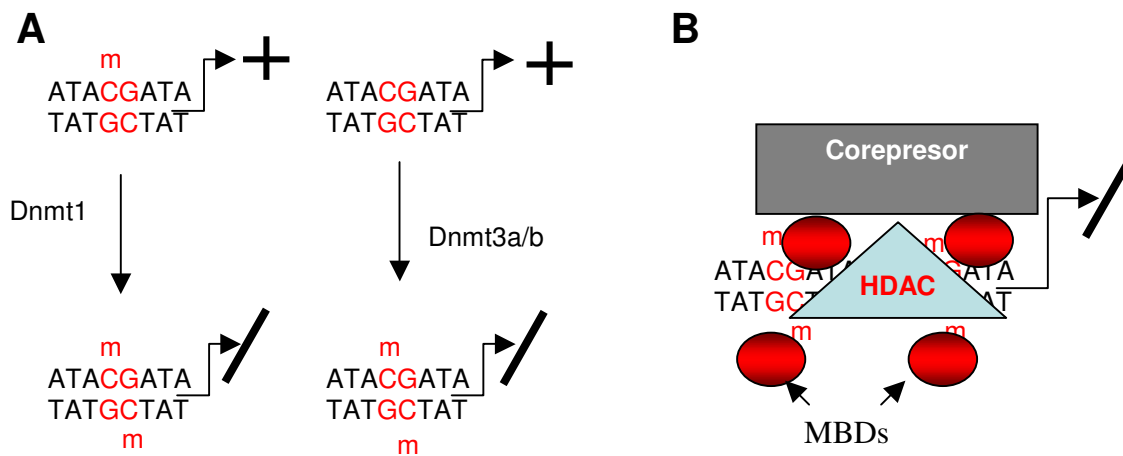


Figura 6.- Metilación del ADN. A) Las enzimas que metilan el ADN se denominan Dnmts. La metilación de manutención es realizada por la Dnmt1. Por otro lado, Dnmt3a/b son las encargadas de realizar la metilación *de novo*. Funcionalmente, la metilación lleva a que la transcripción de un gen (+) se apague (/). B) la metilación del ADN es reconocida por proteínas especializadas conocidas como MBDs (proteína de unión a CpG metilados, círculo rojo), la cuales reclutan co-represores y deacetilasas de histonas para compactar la cromatina e impedir la transcripción.

En resumen, la metilación es una marca epigenética necesaria para programar la expresión génica. El reconocimiento de co-represores, así como su maquinaria asociada, permiten la regulación negativa de genes durante periodos en los cuales

éstos no son requeridos. Cabe mencionar que dicha marca se considera permanente y/o irreversible ya que hasta el momento no se ha caracterizado alguna actividad enzimática de desmetilación del mismo.

3.4 Complejos de remodelaje dependientes de ATP

Los complejos de remodelaje dependientes de ATP (CRDA) tienen la capacidad de modular la estructura de la cromatina a nivel del nucleosoma, a través de la alteración de las interacciones ADN-histona, con el gasto de ATP. La subunidad conservada entre todos los complejos de remodelaje es la subunidad con actividad de ATPasa; dicha subunidad se encuentra embebida en complejos multiproteicos que incluyen componentes necesarios para su reclutamiento a la cromatina y/o su regulación. Cabe mencionar que los CRDA no pueden reconocer y unirse al ADN, por lo que deben de ser reclutados por factores o co-factores, al igual que otras enzimas remodeladoras de la cromatina (38). El dominio con actividad de ATPasa se encuentra estructuralmente relacionado con dominios catalíticos encontrados en helicasas, y esto ha contribuido a dilucidar las funciones de los complejos de remodelaje dependientes de ATP. La hipótesis más apoyada sugiere que estos complejos trabajan como proteínas que translocan el ADN una vez ancladas a la cromatina; la interacción de la subunidad ATPasa con su sustrato, el nucleosoma, junto con su actividad de translocación del ADN produce un cambio de los segmentos de ADN en relación a la superficie de las histonas (172). Lo anterior contribuye a exponer o, en caso necesario, a ocultar secuencias de ADN que son blanco de factores transcripcionales, con consecuencias en la expresión génica dependiendo del factor asociado (38).

Diversas evidencias apoyan de manera substancial la participación de los CRDA en regulación transcripcional así como en replicación, reparación y recombinación del ADN, cohesión de cromátidas hermanas durante la replicación e integración de transposones dentro del genoma (172). Posiblemente, estas funciones no reflejen diferentes funciones de dichos CRDA, sino funciones similares en diferentes contextos cromatínicos.

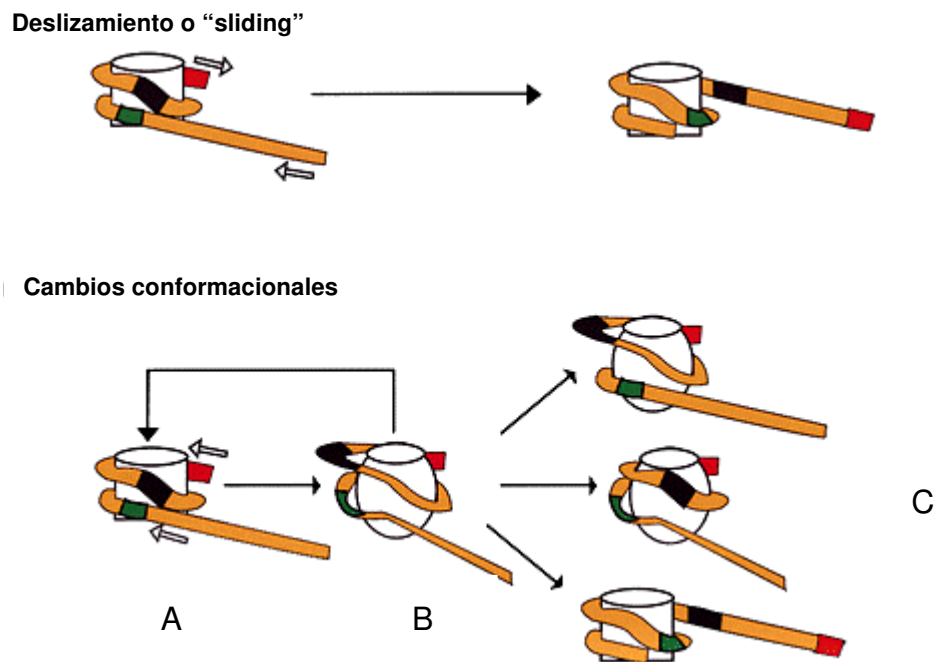


Figura 7.- Mecanismos de acción de los Complejos de Remodelaje dependientes de ATP (CRDA). Dichos complejos utilizan ATP para relajar la fibra de 30 nm o para formarla. Hasta el momento, los mecanismos de acción propuestos para los CRDA son dos: deslizamiento, en el cual el CRDA desliza a un nucleosoma sobre el ADN, favoreciendo o impidiendo la exposición de secuencias específicas. Cambios conformacionales, en el cual el ADN asociado a un nucleosoma (A) es alterado transitoriamente, desestabilizando al nucleosoma (B). Lo cual permite reposicionar al octámero de histonas una nueva región del ADN, permitiendo o impidiendo la exposición de secuencias (C). Figura tomada de (122).

Los CRDA pueden promover la compactación de la fibra de cromatina a través de la organización de nucleosomas en estructuras espaciadas de manera regular. Para dicho fin, los extremos amino terminales de las histonas, en especial de la histona H4, son necesarios para las funciones ejercidas por estos complejos favoreciendo al menos *in vitro*, la organización de la cromatina a un nivel supra-nucleosomal (64). Lo anterior sugiere que los CRDA directamente interaccionan con los determinantes de la estructuración y compactación de la cromatina. En este contexto, las diferentes modificaciones post-traduccionales de las histonas juegan un papel fundamental para sincronizar la compleja organización de la cromatina con los diferentes CRDA; curiosamente, existe evidencia de que las desacetilasas de histonas son necesarias para complementar las funciones de estos complejos (64).

A nivel molecular hay 2 modelos que se proponen para entender cómo estos elementos alteran la dinámica de la cromatina (Figura 7)(38): 1) Deslizamiento: una vez reclutado el CRDA al ADN promueve que los nucleosomas se recorran a secuencias aledañas, deslizándose por la cadena de ADN; 2) Translocación o cambio conformacional: proceso por el cual un CRDA disocia parcialmente a un nucleosoma o en caso extremo remueve un nucleosoma de un lugar y lo introduce en otra región genómica, con el fin de organizar estructuras compactas de la cromatina. Un efecto paralelo de dicho remodelaje puede ser el bloqueo o exposición de ciertas secuencias, evitando o favoreciendo el acceso de activadores transcripcionales a regiones reguladoras como los promotores (38).

En resumen, los CRDA forman parte fundamental de la maquinaria tanto para permitir como para evitar la transcripción, a través de modular la estructura de la cromatina de una región específica, por ejemplo, elementos promotores. Asimismo,

estos complejos exponen la importancia que la dinámica de las interacciones ADN-histonas posee en procesos de expresión génica.

3.5 Histona H1

La compactación de la cromatina a nivel de la fibra de 30 nm o solenoide esta favorecida por la asociación de la quinta histona, denominada H1. Dicha histona se une de manera externa al nucleosoma, específicamente en los puntos de entrada y salida del ADN (55). Estudios *in vitro* apoyan que la histona H1 estabiliza al nucleosoma y limita su movilidad. Dichas características permiten alcanzar niveles superiores de compactación y, en consecuencia, se reduce el área del ADN expuesta sobre los nucleosomas. En muchos casos el ensamblaje de la histona H1 sobre una región genómica causa silenciamiento sobre la actividad transcripcional. Por consiguiente, las regiones transcripcionalmente activas presentan una presencia reducida de la histona H1(180). Existe evidencia de que la reducción en los niveles proteicos de ésta histona conlleva a la activación de varios genes, sin embargo, ciertos genes presentaron una represión de los mismos sugiriendo que la compactación de la cromatina de manera global es necesaria para permitir que ciertos genes se vuelvan accesibles a la maquinaria de transcripción (50).

Aun cuando su función es estabilizar la fibra de cromatina, la histona H1 se encuentra en un frecuente recambio durante el ciclo celular. La fosforilación es la principal modificación post-traducciona que sufre dicha histona (29). Actualmente, la modulación y dinámica de la histona H1 es de gran relevancia para poder entender la compactación de la cromatina a niveles superiores a la fibra de 30 nm. Por lo tanto, la

incorporación de la “quinta” histona representa una vía para la compactación y estabilización de la cromatina.

3.6 Variantes de Histonas

Las histonas son de las proteínas más abundantes dentro de las células eucariontes, e interesantemente de cada una de estas existen isoformas alternas cuyas funciones no han sido establecidas completamente (Tabla 2). Recientemente, diferentes grupos se han abocado a la caracterización funcional de dichas isoformas y su potencial para modular la dinámica nuclear de los nucleosomas, y en consecuencia la fisiología nuclear (79). Algunas variantes poseen diferentes características biofísicas que además de afectar al nucleosoma son capaces de incorporarse en regiones específicas del genoma. A diferencia de las histonas canónicas, la expresión de las variantes no se restringe a la fase S, sino que son expresadas a través de todo el ciclo celular, sugiriendo que su incorporación podría ser independiente de la replicación y, en consecuencia, su función restringida a tiempos y zonas específicas del genoma (78).

Los genes que codifican a las variantes usualmente se encuentran en copia sencilla y, a diferencia de las versiones canónicas de las histonas, los genes poseen intrones y pueden ser poliadenilados (87). Conforme las células se diferencian, la cantidad de diversas variantes de histonas se vuelve mas prominente; dicha característica sugiere que las variantes de histonas tienen funciones especializadas en regular la dinámica de la cromatina en tejidos diferenciados. Por otra parte, existe evidencia que señala funciones específicas para cada variante, por ejemplo: la variante H3.3 se incorpora en regiones transcripcionalmente activas, a diferencia de la histona canónica H3 (H3.1), la cual se incorpora en regiones de baja actividad transcripcional

(78, 79, 116). Un dato interesante es que dichas variantes solo poseen 4 aminoácidos de diferencia en la región amino terminal, los cuales junto a la maquinaria que los reconoce son los encargados de dirigir dichas variantes a sus respectivas regiones dentro del genoma. Datos recientes sugieren que la incorporación de estas variantes es mediada por complejos de remodelaje dependientes de ATP (2). Existen más variantes para otras histonas y, al parecer, cada una de ellas juega un papel en funciones nucleares específicas. En resumen, cada día es más evidente que las variantes pueden ser utilizadas para enmarcar regiones del genoma con funciones definidas, tales como transcripción o sitios de daño al ADN entre otras (Tabla 2) (79, 87).

Tabla 2. Ejemplos de variantes de histonas.

Variantes de histonas	Características
Histonas de arqueas	Proteínas ancestrales con dominio tipo histona las cuales no poseen extremo amino terminal. El ADN se enrolla en unidades tetraméricas y modifican la expresión de genes.
H2A, H2B	Histonas canónicas codificadas por genes acoplados a la replicación
H2A.Z	Variante de la histona H2A con un dominio de auto-interacción muy divergente
macroH2A	Variante de la histona H2A con un dominio globular en el extremo carboxilo terminal específica de vertebrados. Se encuentra enriquecida en el cromosoma X inactivo.
H2A-Bbd	Variante de la histona H2A que es globalmente distribuida y específica de vertebrados. Su localización se excluye del cromosoma X inactivo.
H2AX	Es muy similar a la H2A pero con un dominio carboxilo terminal hidrofóbico que se fosforila en sitios en donde el genoma sufre rupturas de doble cadena.
H3, H4	Histonas canónicas codificadas por genes acoplados a replicación.
H3.3 (H3.2 en plantas)	Variante de la histona H3 y difiere en 4 aminoácidos que permiten su deposición en sitios transcripcionalmente activos
Histonas de empaquetamiento	Histonas del nucleosoma y de unión adaptadas para unir fuertemente el ADN y empaquetarlo en el núcleo de el espermatozoide y en el polen de algunos organismos
H5	Variante de la H1. Las células la expresan en condiciones en donde el genoma debe de ser compactado de manera global en un tejido diferenciado.

4 El núcleo celular

El núcleo es la estructura sub-celular que permite contener el genoma de una célula eucarionte. Este organelo está constituido por dos bi-capas de membranas lipídicas rodeando el área del núcleo. Esta estructura es complementada por complejos proteicos conocidos como poros nucleares, los cuales son necesarios para diversos procesos tanto de regulación transcripcional como de importe y exporte de moléculas hacia el citoplasma. La membrana externa se extiende al citosol como una extensión del retículo endoplásmico. La membrana interna del núcleo mantiene una estrecha interacción con una capa proteica conocida como lámina nuclear, compuesta entre otras muchas proteínas, por lámina nuclear A, B y C (118).

En resumen, el núcleo es una estructura muy dinámica, hecho que se enfatiza a través del ciclo celular (119). Durante la fase S, el núcleo debe de adaptarse en tamaño debido a la duplicación que ocurre en esta fase. Posteriormente en vertebrados, las membranas que constituyen los límites del núcleo desaparecen temporalmente durante la fase terminal de la mitosis. Una vez que la citocinesis termina, el núcleo se ensambla de nuevo en las células hijas (118), y durante todos estos procesos debe de existir una coordinación fina con diversos procesos de compactación y relajación a los que el genoma debe de someterse. En conclusión, la dinámica y la organización deben de coexistir en una coordinación fina que permita la adecuada segregación de la información genética.

4.1 Estructura y Dinámica nuclear

Con la finalidad de ampliar nuestros conocimientos básicos relacionados con la organización y dinámica nuclear, decidimos redactar una revisión, la cual se encuentra en el **anexo 1**. Esta revisión contempla los modelos actuales sobre las diversas estructuras dinámicas que el núcleo posee, las cuales son de gran relevancia para procesos como la transcripción, re-localización, replicación y transporte de moléculas.

5. Dominios cromosómicos

Durante los últimos años diversas evidencias apoyan la idea de que el genoma de una célula eucarionte se encuentra organizado en dominios. Lo anterior con base en observaciones citológicas, a través del uso de tinciones específicas para el ADN, que permitieron delimitar regiones cromosómicas en donde el genoma de una célula en interfase se encuentra compactado y en otras en donde se observa una cromatina más relajada (97). Idea reforzada por la caracterización citológica sobre cromosomas politénicos de un patrón de bandas correspondientes a dominios transcripcionalmente activos y no activos en *Drosophila melanogaster* (Figura 8). Un dominio es una región del genoma que posee todos los elementos estructurales y de regulación, tanto positivos como negativos, que permiten la adecuada e independiente expresión de los genes contenidos en ella. De manera funcional, se propone que existen dominios transcripcionalmente activos y no activos (eucromatina y heterocromatina, respectivamente). En resumen, modificaciones epigenéticas y factores genéticos se deben de coordinar para establecer, mantener y/o cerrar un dominio cromosómico.

Diversos grupos de investigación, incluyendo el nuestro, consideran que la formación de un dominio es un proceso regulado y que corresponde a uno de los

primeros niveles de regulación. Dicho nivel representaría un estado previo a los procesos de regulación fina de los genes contenidos en dicho dominio.

5.1 Dominios Transcripcionalmente activos (Eucromatina).

Dentro de esta caracterización de dominios, estudios citológicos en *D. melanogaster* han permitido determinar que un dominio que está siendo transcrito se encuentra acotado con respecto a una región de cromatina más relajada (97). En cromosomas politénicos, la inducción de los genes de estrés calórico (del inglés: “Heat Shock”) conlleva a cambios estructurales evidentes a nivel microscópico y específicos de la región que se necesita expresar (Figura 8; áreas de actividad transcripcional conocidas como “Puffs”). Dominios activos como los ya mencionados reflejan su actividad transcripcional a nivel epigenético ya que se pueden encontrar marcas como la acetilación de las histonas, metilación de las lisinas 4 y 79 de la histona H3 que delimitan un dominio genómico (129).

Las marcas epigenéticas pueden o no extenderse mas allá de los genes a expresar, con la finalidad de acotar la región genómica que contiene a dichos genes (ver más adelante los dominios globina de pollo). Asimismo, cabe remarcar que el código epigenético necesario para la estructuración adecuada de cada dominio parece ser específico, lo cual impone una complejidad mayor a la regulación de la expresión génica (24). Incluso se ha propuesto que la formación de un dominio puede ser un pre-requisito y que su apertura ocurre incluso en etapas previas a la expresión de los genes contenidos en él (140).

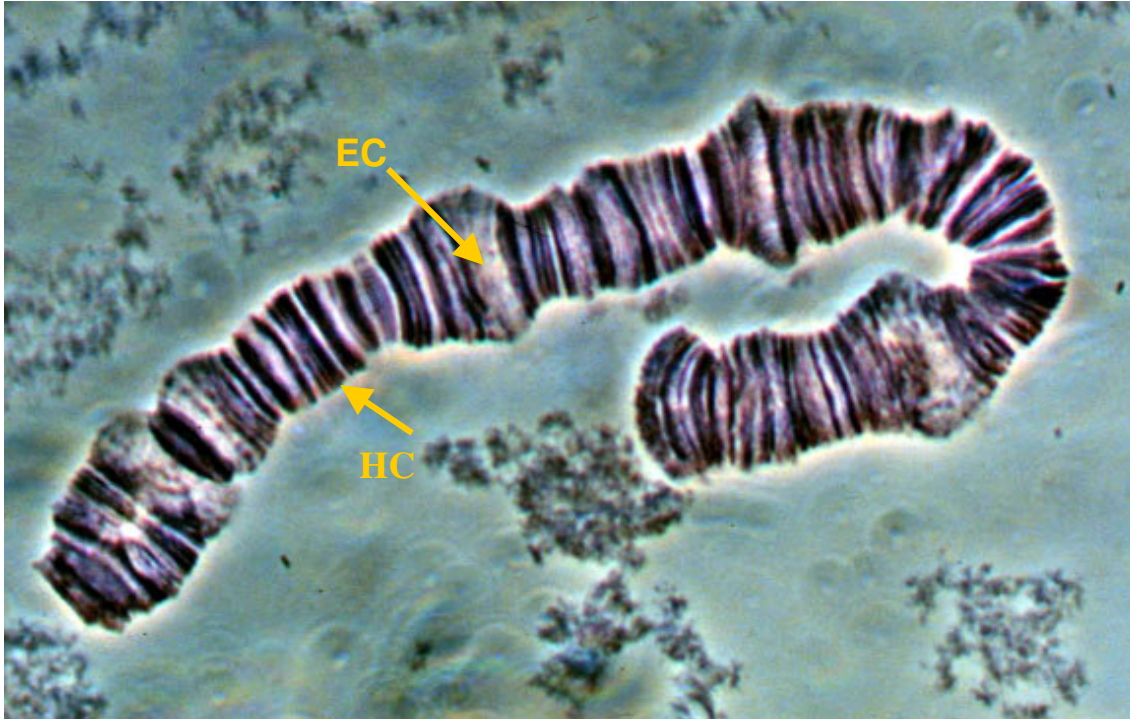


Figura 8.- Cromosoma Politénico. Tinción de Giemsa para identificar regiones de heterocromatina (HC) y eucromatina (EC). Las zonas de eucromatina pueden presentar rearrreglos de grandes dimensiones ante la activación de los genes contenidos en dicha región, conocidos como “Puff”.

Por otro lado, la presencia de ADN metilado es prácticamente nula en los dominios transcripcionalmente activos, aunque se sabe que existen genes cuyos exones podrían estar metilados y regular la tasa de transcripción (46). Asimismo una región del genoma que está siendo transcrita puede poseer regiones discretas de metilación con el fin de regular, de manera fina, genes del dominio o modular la función de elementos de regulación durante el desarrollo y la diferenciación celular (41).

A nivel de su organización estructural los dominios pueden ser caracterizados por presentar una sensibilidad mayor al corte por la DNasa I, presencia de proteínas de alta movilidad electroforética, conocidas como HMGs, y ausencia de la histona H1 (32). Esto permite que la fibra de 30 nm recurra a procesos constantes y dinámicos de descompactación a la estructura de 10 nm y re-compactación. Estos dominios, por lo

regular, se agrupan en regiones discretas al interior del núcleo con alta abundancia de la RNA polimerasa II, conocidas como “fábricas” transcripcionales (125). Dichas fábricas pudieran contener una serie de dominios génicos que deben de ser co-regulados por un mismo conjunto de factores transcripcionales. La co-localización de dominios co-regulados ha sido estudiada durante los últimos 5 años, en especial en los dominios globina en el ratón, los cuales presentan una frecuencia mayor de co-localización espacial cuando dichos dominios se encuentran transcripcionalmente activos (23). Los dominios génicos modulados por este tipo de co-regulación espacial varían de célula a célula, con base en el diverso patrón de expresión característico de cada estirpe celular. La composición de los factores transcripcionales necesarios para dicho patrón de expresión también varía, por ejemplo: GATA-1 es una proteína de unión al ADN cuya expresión se restringe principalmente a células eritroides (5, 53). Factores tejido-específicos y constitutivos están encargados de orquestar junto con la maquinaria basal de transcripción diferentes actividades, incluyendo las epigenéticas, sobre los diferentes dominios activos con el fin de posicionarlos e incluso re-localizarlos a las fábricas transcripcionales en distintos compartimientos del núcleo celular; dicho mecanismo puede ser de gran ayuda en la co-regulación de genes tejido específicos.

5.2 Dominios transcripcionalmente inactivos (heterocromatina)

La heterocromatina se definió como segmentos del genoma que se encuentran compactados de manera estable y que su replicación se realizaba en la última parte de la fase S (176). Dentro de este tipo de dominios podemos definir dos clases: la heterocromatina constitutiva, que se encuentra compactada de manera permanente en todas las estirpes celulares (telómeros, centrómeros, retroelementos como secuencias

Alu y otras secuencias repetidas) y la heterocromatina facultativa (47). Esta última enmarca dominios génicos cuya expresión no es necesaria en una determinada estirpe celular, por lo que su estructura a nivel de la cromatina se encuentra compactada. Contrario a lo que ocurre con la heterocromatina constitutiva, la heterocromatina facultativa tiene la capacidad de revertir su compactación formando euromatina de manera regulada (84).

La heterocromatina constitutiva se localiza en regiones específicas del núcleo, en muchos casos asociada a la envoltura nuclear (85). Actualmente, nuestra percepción acerca de la distribución de los cromosomas al interior del núcleo ha cambiado. El uso de técnicas para pintar cromosomas ha permitido definir que cada cromosoma ocupa un lugar discreto dentro del núcleo, conocido como territorio cromosómico, y que cada territorio posee regiones de heterocromatina que no necesariamente co-localiza con la periferia nuclear (85, 96). Por otro lado, la organización de dicha heterocromatina varía entre diferentes estirpes celulares, debido a la composición de la heterocromatina facultativa que cada cromosoma posee. Funcionalmente, la heterocromatina juega un papel importante evitando que secuencias de ADN móviles, como transposones o inclusive secuencias repetidas, desestabilicen el genoma y se produzcan alteraciones genómicas. Por otro lado, en este tipo de cromatina la maquinaria basal de transcripción tiene un acceso restringido, lo que contribuye a mantener a un gen o grupo de genes en un estado transcripcionalmente inactivo (44).

De manera estructural la heterocromatina tiene una serie de características comunes. Su accesibilidad al corte por la DNasa I es reducida y los nucleosomas se encuentran homogéneamente distribuidos y con reducida movilidad (176), en parte, por que las histonas se encuentran desacetiladas, lo cual favorece una interacción estable

con el ADN (44). La desacetilación de aminoácidos específicos, como la lisina 9 de la histona H3, es fundamental para la organización de la cromatina, lo cual posee drásticos efectos sobre la transcripción llevando en casos extremos al silenciamiento de genes (86). Como se había mencionado, la lisina 9 desacetilada de la histona H3 puede ser metilada por la enzima Suv39h1. Esta metiltransferasa de histonas adiciona tres grupos metilos a la lisina 9, con el subsecuente reclutamiento de la maquinaria asociada a la propagación de un estado inactivo a la transcripción, por ejemplo HP1. Recientemente, en *S. pombe* se ha demostrado que el reclutamiento de la maquinaria de silenciamiento posee un componente de ARN, conocido como ARN de interferencia (33, 81, 126). Este mecanismo es necesario para organizar, mantener y extender la formación regulada de una heterocromatina represora. Curiosamente, HP1 posee la capacidad de dimerizarse, lo cual sugiere otro mecanismo por el cual dicha proteína favorecería la compactación de la cromatina, esto es por su interacción con HP1s asociadas a otros nucleosomas (81). La complejidad de este sistema se incrementa al considerar que isoformas de esta proteína pueden realizar diferentes funciones que en algunos casos son antagónicas. La eliminación de HP1 conlleva a la re-expresión de genes normalmente silenciados, pero a la vez, al silenciamiento de otros. Interesantemente, el reclutamiento de HP1, mediante el uso de una proteína de fusión a un gen activo, ocasiona el silenciamiento de los genes evaluados (173). Por otro lado, la translocación de un gen activo a regiones de heterocromatina conlleva al silenciamiento gradual del mismo (ver adelante)(50).

Por su parte, la metilación de la lisina 27 de la histona H3 sirve como marca de reclutamiento para proteínas del tipo Polycomb (PcG), las cuales fueron descubiertas como proteínas necesarias para la regulación epigenética de los genes homeóticos en

la mosca de la fruta (15). Estas proteínas se organizan en grandes complejos cuya función es la de organizar la cromatina y mantenerla en una conformación cerrada e inaccesible para la maquinaria basal de transcripción (128).

Asimismo, la metilación del ADN posee un papel relevante en la organización de la heterocromatina, ya que la mayoría del ADN contenido en los elementos móviles, retrotransposones, etc., se encuentran metilado (42). La pérdida de la metilación del ADN conlleva a un incremento en la inestabilidad genómica, por ejemplo por la recombinación anómala de cromátidas hermanas, especialmente en regiones teloméricas, durante la mitosis o reactivación de elementos móviles (20). Durante los últimos años se ha puesto en evidencia una interdependencia entre la metilación del ADN y el reclutamiento de marcas epigenéticas, que en su conjunto son la responsables de establecer y mantener regiones de una conformación de heterocromatina constitutiva. Los diferentes dominios que constituyen este tipo de cromatina, por ejemplo, centrómero versus telómeros, poseen características estructurales que los diferencian.

5.2.1 Centrómero

Esta estructura es de las principales características físicas de los cromosomas en metafase, la cual se identifica como una pequeña constricción en el cromosoma condensado. El centrómero es la estructura cromosómica reconocida por el cinetocoro, el cual funciona como una columna de anclaje de los microtúbulos para la segregación de los cromosomas a las células hijas durante la mitosis (4). Curiosamente, ha sido complicado localizar o definir la secuencia de un centrómero; en levaduras los centrómeros cubren un área aproximada de 40-100 kb y en la mosca de la fruta de 200-

400 kb (4). Dicho elemento está compuesto por secuencias repetidas denominadas ADN satelital. En primates este tipo de elemento consiste de secuencias repetidas de 170 pb presentes en muchas copias. Sin embargo, la capacidad de esta región de segregar cromosomas no reside en la secuencia primaria del ADN. La estructura de la cromatina en esta región es fundamental para discriminar entre diversas secuencias centroméricas putativas que posee un cromosoma. La incorporación de la variante de la histona H3 conocida como CENP-A (en humanos) es fundamental para identificar a la secuencia centromérica adecuada (78). La incorporación de dicha variante de la histona H3 se da de manera sincrónica a la replicación del centrómero, constituyendo un mecanismo por el cual se señala epigenéticamente la localización del centrómero a la cromátida replicada (78). El centrómero se encuentra organizado en heterocromatina, denominada pericentromérica, la cual abarca a las secuencias repetidas de ADN satelital que flanquean al centrómero. La región posee histonas desacetiladas y se replica durante la parte tardía de la fase S de la mitosis, asimismo la presencia de genes es nula (36).

En levadura, la inserción de un transgen a regiones de heterocromatina constitutiva permitieron caracterizar el fenómeno de “**Efecto de posición**” (3, 7, 8). Dicho término se define como la expresión condicionada de un transgene de acuerdo a la cromatina en la que éste es introducido. Estos resultados fueron confirmados en *Drosophila melanogaster*, la translocación del gen que determina el color de los ojos, conocido como *white*, provoca la pérdida o expresión variegada del color de los ojos de las moscas (115). El centrómero al poseer una organización compacta extiende marcas represivas o de silenciamiento a las regiones aledañas a éste provocando el silenciamiento del gen re-localizado (Figura 9) (3). Cabe mencionar que este proceso es

determinante para la expresión heteróloga y sostenida de transgenes, ya que en la mayoría de los casos la expresión de un transgene se ve comprometida por efectos de posición. Por lo que diversos laboratorios -incluyendo el nuestro- están abocados a identificar elementos que eviten el silenciamiento de transgenes y entender sus mecanismos de silenciamiento, lo cual redituaria en mejores sistemas para la expresión sostenida de proteínas heterólogas o en terapia génica.

5.2.2 Telómeros

Los cromosomas de la mayoría de los eucariontes están compuestos de segmentos lineales de ADN. Esta característica impone un problema logístico al momento de la replicación del genoma, y es que durante cada ciclo de replicación un cromosoma se acortaría en tamaño (34). Para resolver este problema, las células desarrollaron una estructura que cubre, protege y organiza los extremos de los cromosomas, la cual se conoce como telómero. Los telómeros son importantes dado que permiten diferenciar los extremos de los cromosomas de extremos ocasionados por rupturas del ADN, los cuales deben de ser identificados como daño al genoma para su subsiguiente reparación (39). El telómero esta constituido por varios cientos de repetidas TTAGGG, cuya extensión va desde 10-20 kb en humanos y de 25-40 kb en ratón, así como una cadena sencilla de ADN rica en Gs, con una extensión de 150-200 pb (19).

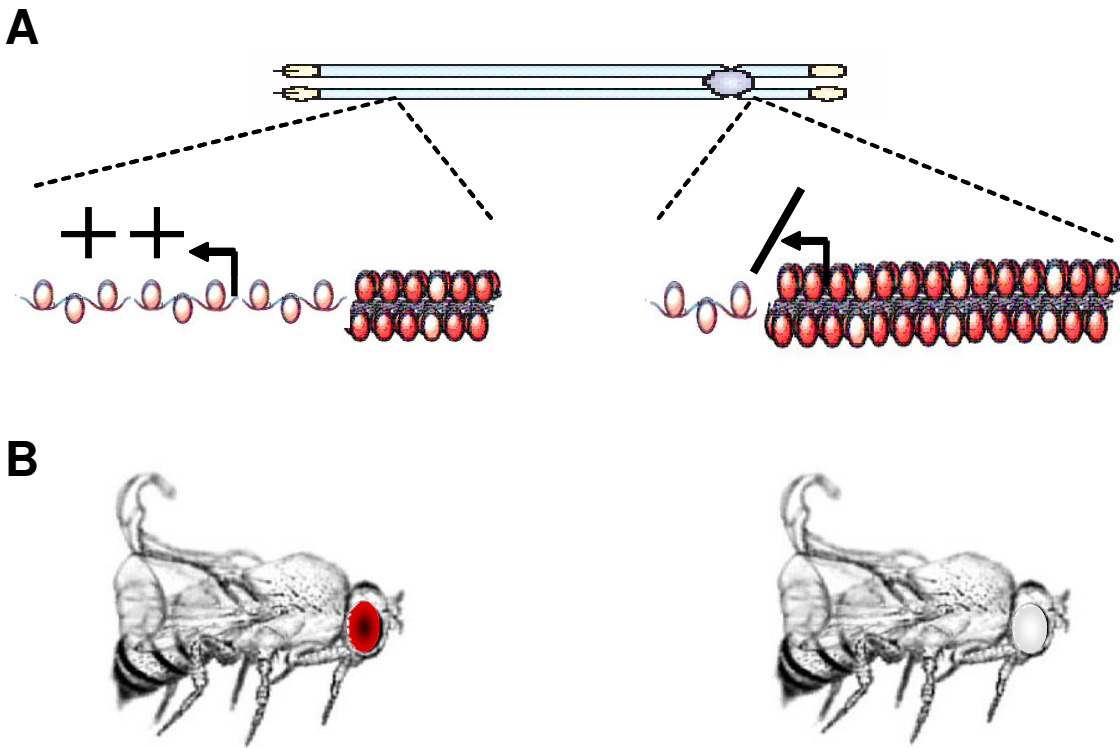


Figura 9.- Efecto de posición. La expresión de un transgene integrado en una región cromosómica está sometida a la ambiente cromatínico que lo rodea. **A)** La integración de un transgene en una región de cromatina abierta permite la expresión del mismo (++). Sin embargo, si la integración se da en una región centromérica, la heterocromatina del centrómero eventualmente invade la región del transgene y provocando el silenciamiento del mismo (--). Este proceso ocurre en la mayoría de las regiones de heterocromatina incluyendo el telómero. **B)** Efecto de posición por la translocación del gen *white* a regiones intergénicas o centroméricas, provocando la expresión (ojos rojos) o silenciamiento (ojos blancos) del transgen, respectivamente.

Por otro lado, se han descrito una serie de proteínas que protegen el extremo del cromosoma denominadas factores de reconocimiento del telómero –TRF- (Figura 10). Dichas proteínas reconocen las secuencias repetidas TTAGGG y a la cadena sencilla rica en G con el fin de organizar el telómero en una estructura tipo bastón (Asa T y D; figura 10), con el objetivo de protegerlo de eventos de recombinación (20). En levaduras los telómeros se han observado asociados en grupos, cercanos o en asociación de la periferia nuclear. Esta localización se ve facilitada por una serie de proteínas denominadas Ku, las cuales actúan en concierto con las proteínas TRF y los modificadores de la cromatina organizan el telómero hacia la periferia nuclear; sin

embargo, la ubicación nuclear de los telómeros en células de mamíferos no ha sido bien definida.

La telomerasa es la enzima responsable de mantener la extensión de los extremos de los cromosomas. Esta es una enzima poco usual la cual posee un componente proteico y un componente de ARN; la región central de dicho oligoribonucleótido contiene la secuencia complementaria a las poseídas por las repetidas teloméricas. La telomerasa usa dicho ARN como molde para sintetizar y extender la cadena de ADN que durante la replicación del ADN se sintetiza más lentamente. Dicha síntesis se realiza durante etapas embrionarias y en célula germinales con la finalidad de proteger los extremos de los cromosomas (20).

Los telómeros poseen una organización nucleosomal, la cual sufre modificaciones epigenéticas específicas y características de heterocromatina constitutiva. Esto sugiere la necesidad de un control fino a nivel estructural con el fin de regular la longitud y estructura del telómero (37). La característica del ADN repetitivo en los telómeros favorece la formación de heterocromatina con características particulares, y en consecuencia la zona es transcripcionalmente inactiva. Lo anterior se confirma con la presencia de la proteína de heterocromatina HP1, incluyendo todas sus isoformas. La presencia significativa de la metilación de la lisina 9 (marca de reconocimiento para la proteína HP1) y la lisina 20 de las histonas H3 y H4, respectivamente, apoyan este hecho. Dichas modificaciones son realizadas por metiltransferasas de histonas como la SUV39H y SUV4-20H (20, 149). La importancia de estas proteínas se ha puesto en

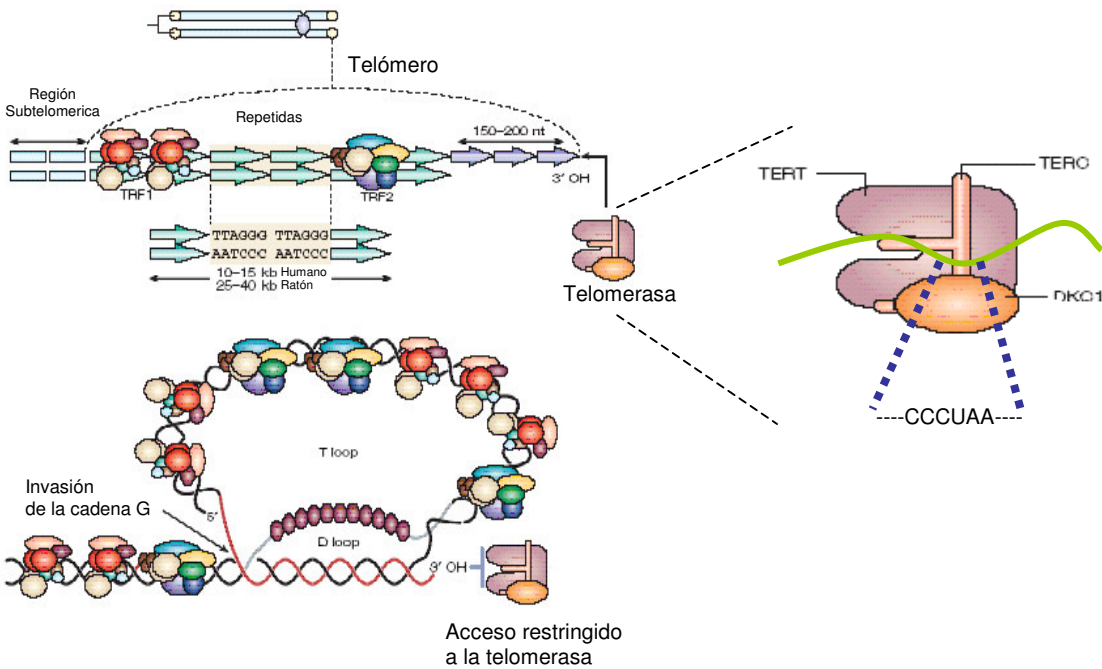


Figura 10.- Estructura de los extremos de los cromosomas: el telómero. El telómero está compuesto de repetidas teloméricas y de una región subteloérica. Dichas secuencias repetidas están constituidas de la secuencia TTAGGG y de una región extendida de secuencia ricas en guaninas. La replicación del extremo terminal de cada cromosoma la realiza la telomerasa durante la etapa embrionaria de cada organismo, compuesta de varias subunidades como TERT, TERC y DKO1 así como de un componente de ARN (verde); dicho ARN posee en su región central la secuencia complementaria a la repetida telomérica. La cadena rica en Gs es capaz de invadir el extremo de los cromosomas con la subsiguiente formación de 2 asas conocidas como “T-Loop” y “D-Loop”, dichas asas protegen del acceso a la telomerasa en etapas del desarrollo adultas. Figura tomada de Blasco MA 2006.

evidencia con la generación de ratones con mutaciones en la metiltransferasa SUV39H, cuyo fenotipo muestra un decremento global en la di- y tri-metilación de la lisina 9 de la histona H3 y pérdida de la unión de HP1, en especial en los telómeros (132). Estos cambios correlacionan con una extensión aberrante de las repetidas teloméricas y alteraciones en la unión de los factores TRFs. Lo cual sugiere que la pérdida de heterocromatina conlleva a una descompactación y re-organización del telómero y el subsecuente acceso de la telomerasa a dicha región.

La organización de los telómeros en heterocromatina tiene efectos negativos y dominantes sobre la expresión de genes localizados en regiones subteloéricas aledañas a éste. La inserción de un transgen en una región telomérica conlleva a la

variegación transcripcional del mismo, así como su subsecuente silenciamiento (11, 37). El silenciamiento observado puede acelerarse mediante la sobreexpresión de la telomerasa, lo anterior causado por una extensión de los telómeros. Dicho silenciamiento es causado por la estructuración de telómero extendido en heterocromatina y, en consecuencia, sus efectos negativos sobre la transcripción se incrementan. Al silenciamiento provocado por la heterocromatina de los telómeros se le conoce como efecto de posición telomérico y ha sido observado desde levaduras hasta mamíferos (Figura 9) (7, 8, 11, 37). Este efecto puede ser antagonizado mediante el uso de inhibidores de remodeladores de la cromatina, como la Tricostatina-A (TSA), la cual inhibe a las desacetilasas de histonas (11). El papel de la metilación del ADN ha permanecido sin descubrir, sin embargo, Blasco y cols., han demostrado que las secuencias sub-teloméricas poseen una gran cantidad de ADN metilado, la cual es fundamental para mantener la estabilidad de los telómeros (68). Inhibidores de la metilación del ADN provocan la re-expresión de transgenes integrados en los extremos de los cromosomas, lo cual sugiere que la metilación del ADN en regiones subtelo-méricas es relevante para la organización y compactación de la cromatina del telómero (68).

En resumen, la manutención y estabilidad de los telómeros es dependiente de mecanismos epigenéticos que, a su vez, modula su organización en una estructura compacta y estable permitiendo identificar a los extremos de los cromosomas. Modificaciones epigenéticas sobre las histonas y el ADN están involucradas en dicha organización con efectos negativos sobre la expresión génica. Identificados desde levaduras hasta humanos, los efectos de posición teloméricos muestran la fortaleza que la organización del telómero tiene sobre la transcripción. Interesantemente, hasta el

momento sólo en levadura se han caracterizado elementos de regulación que bloqueen el silenciamiento génico provocado por el telómero (123). Actualmente, nuestro laboratorio se encuentra en el estudio de este proceso y de elementos que eviten el silenciamiento provocado por el telómero (Rincón-Arano y Recillas-Targa, en preparación; **Anexo 2**).

5.3 Heterocromatina facultativa

Las regiones del genoma cuyos genes y sus correspondientes productos proteicos no son requeridos para la fisiología celular de un tejido dado son compactadas en heterocromatina, la cual es conocida como heterocromatina facultativa. Lo anterior en función de que dependiendo de la estirpe celular, en la cual un gen debe ser o no expresado, el entorno cromatínico del dominio génico se relaja o se compacta, respectivamente. Las marcas de la cromatina que se localizan en una región o dominio de este tipo de cromatina son muy similares a los conformados por heterocromatina constitutiva (85). La presencia de di- y tri-metilación de las lisinas 9 y 27 en la histona H3, metilación de la lisina 20 en la histona H4, presencia de HP1 β y γ , así como metilación del ADN son de las principales características epigenéticas de este tipo de cromatina (86, 149). Por otro lado, la histona H1 y el reclutamiento de desacetilasas de histona dependientes de NAD –como SirT1- son capaces de promover la formación de heterocromatina facultativa (171). A diferencia de la heterocromatina constitutiva, en la heterocromatina facultativa existen regiones genómicas cuya organización puede ser regulada por factores transcripcionales específicos activados por señales regulatorias definidas (84).

En resumen, la heterocromatina facultativa está compuesta por regiones que se pueden compactar o no de acuerdo a los requerimientos celulares. Por lo que delimitar su presencia a lo largo de cada cromosoma es fundamental para coordinar el conjunto de genes que no deben de expresarse en una estirpe celular dada, procesos que deben darse en función de programas epigenéticos y genéticos muy precisos, en etapas tempranas posteriores a la fecundación. Por otro lado, el conjunto de genes a expresarse debe de poseer los mecanismos necesarios para que su apertura y mantención no se afecte por las regiones de cromatina compacta con las que colindan. Dichos límites son establecidos por elementos reguladores, dentro de los que destacan los aisladores cromatínicos o “insulators”. Estos elementos surgen como una opción novedosa para la protección contra efectos de posición ocasionados por regiones de heterocromatina.

5.4 Aisladores cromatínicos o “Insulators”

Ante el paradigma de que un dominio es la región que contiene a uno o varios genes, así como a todos los elementos de regulación necesarios para la expresión de los mismos, se ha cuestionado cómo es que un dominio se distingue de otro (89). Lo anterior desde dos puntos de vista: 1) funcionalmente, cómo es que los elementos de regulación de dominios transcripcionalmente activos no alteran de manera inespecífica la expresión de dominios adyacentes. 2) estructuralmente, cómo es que dominios con estructuras de la cromatina antagónicas (heterocromatina *versus* eucromatina) adyacentes no se afectan una a la otra. Estos dilemas empezaron a tener respuesta hasta el descubrimiento de secuencias de ADN que permitían la expresión constante del transposón Gypsy de manera independiente al sitio de integración del mismo (100).

Dichos elementos fueron denominados aisladores o “insulators”, los cuales pueden ser definidos como secuencias que separan dominios funcional y estructuralmente distintos, evitando la promiscuidad entre elementos de regulación, así como la modificación de la estructura de la cromatina por dominios vecinos (65).

Funcionalmente, los “insulators” se definen como secuencias neutras, es decir, no afectan la transcripción y en general se encuentran enmarcando dominios génicos (31). Durante los últimos años, varios grupos han identificado elementos tipo “insulators” en diversos dominios génicos, como el dominio β -globina de pollo o el locus improntado Igf2/H19, entre otros (178). Experimentalmente pueden ser caracterizadas a través de dos ensayos:

1.- Bloqueo de enhancer. Es la capacidad que tienen estos elementos para bloquear la función de un potenciador sobre un promotor, siempre y cuando el “insulator” se encuentre entre estos dos elementos. Es la función más estudiada de los “insulators”, aunque sus mecanismos de acción no son claros. Uno de los principales responsables de esta función es la proteína de unión a la secuencia CTCC, conocida como CTCF, la cual se encuentra en la mayoría de los “insulators” de vertebrados (51, 139). Este factor posee un dominio de unión al ADN constituido por 11 dedos de zinc, los cuales usa de manera diferencial para interaccionar con el ADN. Lo anterior impone un problema al momento de caracterizar los sitios unión de CTCF, ya que esta proteína usa una combinación específica de dedos de zinc para reconocer diversas secuencias de unión, y por lo tanto, dificulta la caracterización de una secuencia consenso. La incorporación de un CTCF entre un enhancer y su promotor blanco en cromosomas artificiales provoca un bloqueo en el traslado de la maquinaria transcripcional reclutada inicialmente al potenciador (184). Este factor tiene la capacidad de formar dímeros, lo

cual ha permitido sugerir que esta proteína unida en los extremos de un dominio interacciona entre sí para constituir una asa que permite definir estructuralmente un dominio (Figura 11). Este modelo ha sido recientemente confirmado experimentalmente mediante el ensayo de captura conformacional de cromosomas (3C) (108, 110, 168). De manera interesante, la asociación de CTCF a distintas zonas del dominio β -globina parece ser un evento temprano previo al inicio de la transcripción.

La contribución de los “insulators” a la organización topológica del genoma se vé apoyada por el descubrimiento de que el “insulator” Gypsy, cuyas copias en el genoma se organizan en estructuras tipo rosetas. Dichas estructuras constituyen agrupaciones conocidas como cuerpo de “insulators” (del inglés “insulator bodies”) y mediante ensayos de hibridación fluorescente se ha podido establecer que de estos elementos emanan asas cuya finalidad es la de organizar el genoma (31). Por otro lado, elementos tipo “insulator” en levadura tienen la capacidad de interactuar con proteínas del poro nuclear (31). Dicha interacción contribuiría a la organización espacial de dominios en zonas específicas de la periferia nuclear, acelerando probablemente la exportación de ARN mensajeros hacia el citoplasma (22, 31, 100). Recientemente, usando el insulator β -globina de pollo como modelo, se ha sugerido que la organización de la cromatina sobre el insulator es fundamental para bloquear la función de un enhancer. El estudio de dicho elemento sobre cromosomas artificiales sugiere que la función de bloqueo de enhancer depende de una reducida presencia de nucleosomas sobre el “insulator” (184). En resumen, la organización de dominios en unidades discretas con características estructurales y espaciales puede ser fundamental para afectar o promover la comunicación entre un elemento enhancer y un promotor (63).

2.- Protección contra el efecto de posición (actividad de barrera cromatínica). Como ya se ha mencionado, los efectos de posición son la serie de eventos que el ambiente cromatínico impone a un transgen de acuerdo al sitio de integración del mismo. Los “insulator” son elementos capaces de proteger la expresión de un transgen independientemente del sitio de integración, tanto de efectos positivos como negativos (123). Por ejemplo, estos elementos tienen la capacidad de evitar la propagación de heterocromatina, siempre y cuando éste elemento se encuentre posicionado entre la secuencia que promueve la heterocromatina y el transgene sensible a ésta (178). Por otro lado, los “insulators” pueden evitar que elementos de regulación positiva aledaños al sitio de integración modifiquen el patron de expresión del transgen a utilizar.

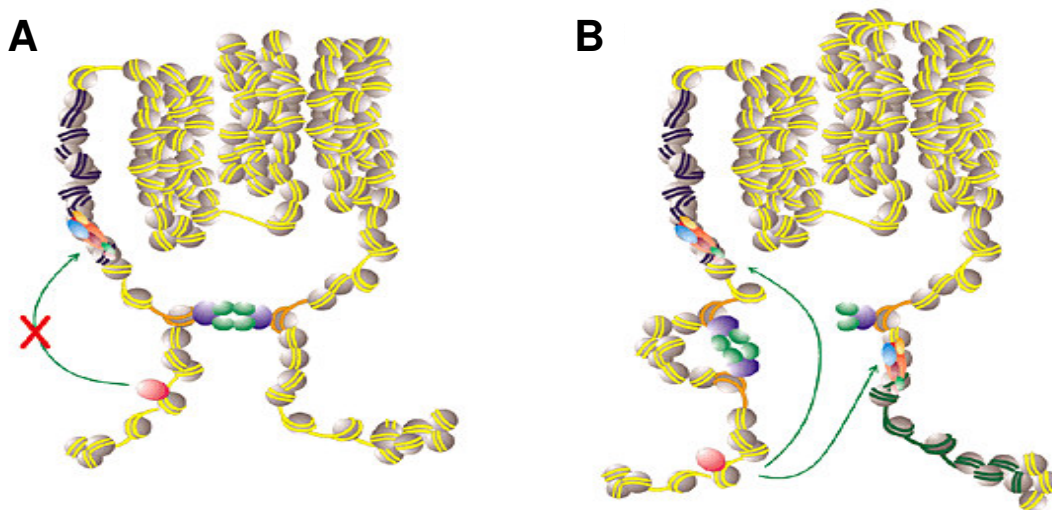


Figura 11.- Modelo de acción de delimitadores cromatínicos (“Insulators”). **A)** Los “insulators” (círculo verdes) forman barreras estructurales que impiden (X) que potenciadores actúen sobre un promotor o evitan que la cromatina de regiones vecinas se extiendan sobre el dominio que se regula. **B)** Si un “insulator” no protege a un dominio, los elementos de regulación tienen libre acceso a los promotores, lo cual conlleva a la activación transcripcional.

Dicha actividad de barrera se ha propuesto que es realizada a través del reclutamiento de actividades remodeladoras de la cromatina a dichos “insulators”, en especial la acetilación de histonas y metilación de la lisina 4 en la histona H3, con el fin

de contrarrestar el efecto de expansión de la heterocromatina (121, 179). Además, datos aún no publicados proponen que estos elementos evitan que la metilación del ADN sea incorporada a las zonas promotoras de los genes del dominio (Felsenfeld, comunicación personal)(135). Las actividades de protección contra los efectos de posición y bloqueo de enhancer no son siempre incluyentes, esto es, que no necesariamente todos los “insulators” poseen ambas propiedades, asimismo para ciertos “insulators” ambas funciones son separables (142).

Experimentalmente, estos elementos son caracterizados por su capacidad para proteger a un transgen contra los efectos de posición originados a partir de distintos sitios de integración (135). Sin embargo, el estudio se basa en el análisis de diferentes sitios de integración, por lo que no se ha establecido si en todos los sitios de integración, incluyendo los más represivos como los telómeros, estos elementos mantienen su actividad de delimitador cromatínico. Lo anterior con base en que dichos sistemas usualmente utilizan un gen reportero y otro de resistencia para la selección de integrantes estables (clonas). Por lo que si el transgene es inicialmente integrado en una región de heterocromatina e inmediatamente silenciado, la célula aún cuando haya integrado el transgen morirá por haber silenciado el gen de resistencia. Este problema no ha sido abordado, por lo que resulta de interés demostrar si en cualquier contexto cromatínico los “insulators” protegen contra efectos de posición, en particular, en aquellos lugares donde la presión selectiva es mas fuerte, como en los centrómeros y en los telómeros. En conclusión, los dominios puede ser separados por elementos tipo “insulators”, los cuales delimitan a un dominio y evitan alteraciones sobre la expresión de los genes, tanto de la cromatina como de elementos de regulación aledaños al dominio que dicho aislador protege. Un ejemplo clásico de este tipo de elemento lo

constituye un sitio de hipersensibilidad localizado en el dominio β -globina de pollo, conocido como el “insulator” cHS4. Dicho elemento posee las dos propiedades descritas previamente para este tipo de aisladores, pero para su entendimiento es necesario disectar la arquitectura del dominio y su entorno cromatínico.

6. Dominios globina de pollo

El transporte de oxígeno es esencial en el desarrollo de cualquier organismo multicelular, sin embargo los requerimientos de dicho gas durante cada etapa del desarrollo son diferentes. Para poder trasladar el oxígeno a lo largo del organismo se requiere de la hemoglobina, la cual es una proteína sintetizada en los eritrocitos (127). La hemoglobina es una proteína tetramérica compuestas de dos tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas α y β . Cada cadena es producida a partir de dos dominios multigénicos localizados en diferentes cromosomas, pero co-regulados a lo largo del desarrollo. Dichos dominios están compuestos de genes embrionarios (ϵ y ρ en el dominio β , y π en el dominio α) y genes adultos (β^A y β^H en el dominio β , y α^D y α^A en el dominio α) (127).

Durante el desarrollo del embrión de pollo las células eritroides primitivas, las cuales aparecen en la circulación entre los días 4 y 5 post-fecundación, expresan los genes embrionarios (52). A partir del 5° día del desarrollo el linaje definitivo (adulto) inicia la expresión de los genes adultos (β^A y β^H en el dominio β , así como α^D y α^A en el dominio α). Sin embargo, existe evidencia de que los genes adultos del dominio α son expresados a lo largo del desarrollo (52). A este proceso se le conoce como recambio de genes globina (conocido en inglés como: “hemoglobin switching”) (127). Desde hace más de 20 años se ha sugerido que dicho proceso esta dado por una estrecha

relación entre la regulación genética y la epigenética. Éste recambio correlaciona también con la reorganización de las islas sanguíneas que producen eritrocitos, cuyo origen es el tejido mesodérmico. En ratón, durante los primeros días las islas sanguíneas se organizan en el saco vitelino. Posteriormente, un sub-tipo de células madre hematopoyéticas localizadas en la región aorta-gonadal-mesonefros (AGM) dentro del tejido embrionario, migran al hígado (día 5-6), y posteriormente a la médula ósea (día 10) (90, 127).

Durante el desarrollo, las células madre hematopoyéticas se comprometen a la producción de células con un linaje definido, proceso conocido como diferenciación. Esto incluye a las células eritroides, las cuales parten de un precursor totipotencial a célula madre unipotencial y, finalmente, su diferenciación a la estirpe eritroide madura, a través de la expresión de factores específicos de tejido como GATA-2 y posteriormente GATA-1 (Figura 12). La diferenciación ocurre durante todos los días de la vida de un vertebrado, por lo que es de interés determinar como se lleva a cabo el proceso de recambio de hemoglobina durante etapas sucesivas de diferenciación (71, 90). Estudios pioneros realizados por Weintraub y Groudine propusieron que la regulación se da a nivel transcripcional por mecanismos epigenéticos, los cuales deben de ser aprovechados por la célula madre para establecer qué tipo de hemoglobinas adultas deben de ser sintetizadas y usadas por el pollo adulto y, por el contrario, qué genes embrionarios deben silenciarse, sin embargo la comprobación de esta hipótesis no se ha realizado (72, 73).

Los genes globina representan un paradigma en la regulación génica tanto por poseer una organización multigénica, como por su regulación a través de la diferenciación y a lo largo del desarrollo. El estudio de estos genes permitió establecer

las bases experimentales y conceptos necesarios para entender que la expresión de los genes está íntimamente ligada a la estructura de la cromatina. A partir de los trabajos pioneros de Weintraub y Groudine, quienes demostraron por primera vez que la cromatina de los genes activos es mas sensible a la digestión por parte de la DNasa I en comparación a los genes inactivos dentro de una misma célula (177). Interesantemente, observaron que dicha sensibilidad se extendía varias kilobases más allá de los genes. Estos resultados establecieron las primeras evidencias que muestran que la estructura cromatínica de un dominio está íntimamente asociada a la actividad transcripcional.

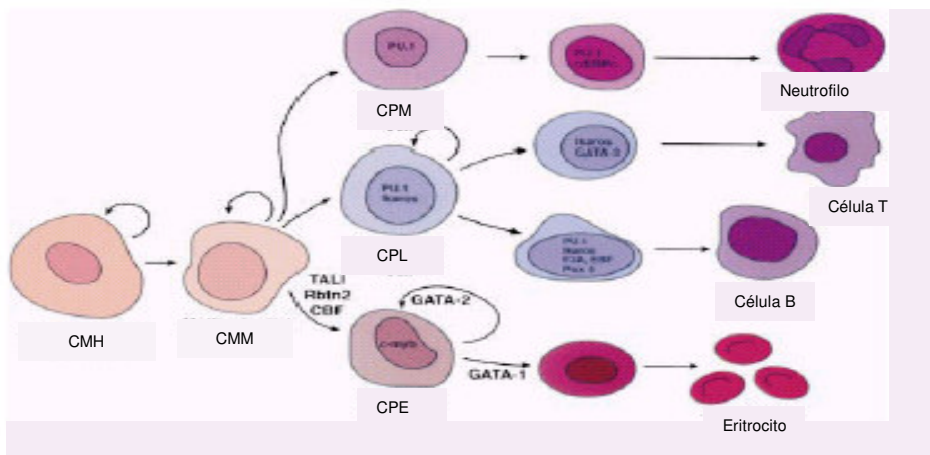


Figura 12.- Diferenciación eritroide. La célula madre hematopoyética (CMH) se diferencia a una célula multipotencial mieloide eritroide (CMM). Posteriormente las CMM sufren divisiones celulares la cuales permiten comprometerse (CPE), a través de la expresión de factores específicos (por ejemplo GATA-1 y GATA-2), al linaje definitivo (por ejemplo eritrocitos).

Posteriormente, en estos dominios se estableció que las regiones que cubren elementos de regulación poseen una distorsión característica en la cadena de ADN (52, 53). Dicha distorsión provoca una mayor sensibilidad al corte por la DNasa I, nombrando a estas regiones como sitios de hipersensibilidad (HS). La sensibilidad al corte por dicha enzima ha sido ampliamente usada durante los últimos 20 años para la

caracterización de componentes estructurales y regulatorios, tales como promotores, potenciadores, silenciadores e “insulators”, localizados a lo largo de amplias extensiones genómicas. En sí, los dominios globina de pollo representan un modelo viable para el estudio de la regulación de genes a nivel dominio y a nivel local, lo anterior con base en que dichos dominios han sido claves en la identificación y caracterización, tanto estructural como funcional, de elementos de regulación génica.

6.1 Dominio β -globina de pollo

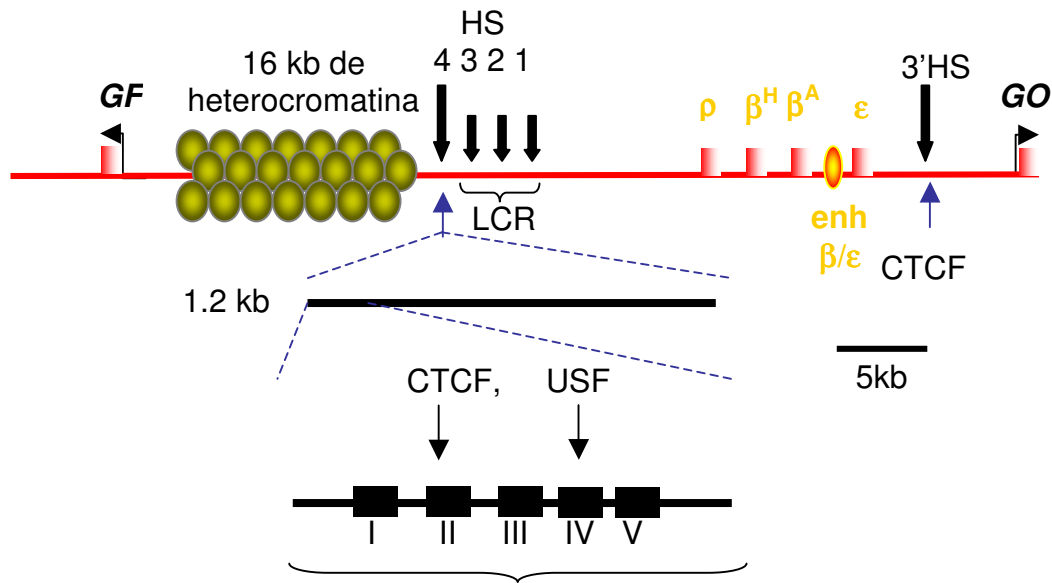
El dominio β -globina de pollo es uno de los dominios genómicos mejor caracterizados y abarca alrededor de treinta kilobases y se localiza en el cromosoma 1; está compuesto de cuatro genes, un gen embrionario, uno fetal y dos adultos (ρ , ϵ , β^H y β^A , respectivamente; Figura 13). Cada uno de los promotores contiene la información necesaria para la expresión en cada gen globina en la etapa del desarrollo donde su expresión es requerida (52, 140). Dicha regulación está basada en el reclutamiento de factores transcripcionales ubicuos –como por ejemplo: Sp1, YY1- y específicos de tejido –como por ejemplo: GATA-1, EKLF y NF-E2- (5, 21, 52). Interesantemente, la mayoría de los elementos de regulación de genes eritroides poseen de manera recurrente varios sitios de unión para los factores antes descritos que trabajan en conjunto. Los elementos de regulación donde interviene el factor GATA-1 comprenden regularmente más de dos sitios de unión, co-existiendo en muchos casos con sitios de unión a otros factores de regulación, tanto ubicuos como eritroide específicos, los cuales en su conjunto regulan la expresión de genes eritroides (70). Lo anterior es cierto para genes globina cuyos elementos de regulación tanto proximales como distales poseen

generalmente más de dos sitios de unión al factor GATA-1 tanto en los promotores como en potenciadores (30).

El dominio posee dos elementos potenciadores, un enhancer entre los genes β^A y ϵ , así como un elemento tipo LCR ubicado río arriba del dominio β -globina. El enhancer β^A/ϵ se ha propuesto que su función es la de favorecer la expresión de los genes que lo enmarcan. Por otro lado, la región 5' del dominio posee 4 sitios de hipersensibilidad al corte por la DNasa I. El sitio más externo es constitutivo y constituye un elemento tipo "insulator" conocido como cHS4 (ver más adelante). Los 3 sitios proximales respecto a los genes constituyen un LCR y se encuentran conservados entre vertebrados. Dichos sitios son necesarios para potenciar la expresión de los genes β -globina exclusivamente en tejido eritroide, sin embargo, la eliminación de alguno de estos sitios provoca que los sitios restantes se comporten como silenciadores (56, 104). Mutaciones en las cuales se elimina el LCR en el locus endógeno provocan niveles reducidos de expresión de los genes globina, y que la caracterización de dichas mutaciones en humanos correlaciona con distintos tipos de anemia (14).

En el dominio β -globina de ratón se ha permitido establecer que el LCR se encuentra en contacto directo físico con los promotores blanco de acuerdo a la etapa del desarrollo, lo anterior mediante la técnica de captura conformacional de cromosoma (26). Por otro lado, el LCR posee sitios de unión al factor NF-E2, y esta proteína puede ser localizada en los promotores globina, los cuales no poseen sitios de unión para dicho factor, confirmando la interacción entre elementos tan distantes, apoyando el modelo de asas para potenciadores (150, 168). Sin embargo, la caracterización de un transcrito intergénico, que cubre gran parte del dominio β -globina, apoya que el LCR podría trasladarse a lo largo de la cromatina apoyando el modelo de rastreo (168).

Dominio β -globina



Elemento mínimo del “insulator” cHS4

Figura 13.- Dominio β -globina de pollo. El dominio abarca alrededor de 30 kb del cromosoma 1, compuesta por los genes globina (ρ , β^H , β^A y ϵ). Dichos genes se encuentran bajo la influencia de un elemento tipo LCR y del enhancer β^A/ϵ . Dos sitios de hipersensibilidad al corte por la DNasa I enmarcan el dominio, conocidos como cHS4 y 3'HS, los cuales poseen funciones de delimitadores cromatínicos o “insulators”. Río arriba del dominio se encuentra una región de 16 kb de heterocromatina, formada principalmente de secuencias repetidas CR1. Los dominios génicos que rodean al dominio β -globina son el del gen receptor de folato (*GF*) y un gen de receptor olfatorio (*GO*). El cHS4, caracterizado como una secuencia mínima de 250 pb, está constituido de al menos 5 secuencias de interacción para proteínas (“caracterizados por ensayos de “footprinting”), de las cuales CTCF se une al sitio II y USF en el IV (28, 54, 62). Las entidades proteicas localizadas en los sitios I, III y V no han sido hasta el momento caracterizadas.

A nivel de dominio se ha propuesto que el LCR del locus β -globina murino podría estar involucrado en la apertura del dominio β -globina. La incorporación de este elemento a transgenes y la posterior integración en un contexto cromatínico contribuyó a definir que el LCR favorece una expresión dependiente del número de copias e independiente del sitio de integración. Dichos estudios permitieron postular que el LCR podría abrir la cromatina del dominio con el fin de prepararlo para la expresión de los genes que éste contiene. Sin embargo, la eliminación del LCR murino permitió establecer que aunque la expresión de los genes se mantiene en niveles bajos, la

ausencia del mismo no altera la apertura y estructura de la cromatina del dominio β -globina restante (49, 151). Las secuencias río arriba del LCR, las cuales incluyen sitios de hipersensibilidad como el HS-62S, tampoco poseen un efecto significativo sobre la expresión de los genes globina en presencia o ausencia del LCR (13). Por lo tanto, el dominio β -globina parece contener dentro de las regiones génicas todos los elementos necesarios para la correcta expresión de los genes y adecuada organización estructural del dominio.

Si el LCR es fundamental para la expresión de los genes globina ¿cómo es que este elemento participa en el recambio de genes globina durante la etapa embrionaria a la adulta? Durante dicho recambio de genes embrionarios por adultos, se pensaba que el LCR competía por los promotores de los diferentes genes globina. En otras palabras al encontrarse el LCR río arriba de los genes, éste realizaba un rastreo del promotor más proximal, siendo éste el promotor embrionario. En etapas posteriores del desarrollo, los promotores adultos se volvían más atractivos para el LCR, lo cual permitía la expresión de los genes adultos. Estas hipótesis han sido rechazadas con base en resultados obtenidos en ratones transgénicos, en los cuales el LCR era eliminado del contexto endógeno. Lo anterior permitió demostrar que aunque los niveles de los genes globina disminuían dramáticamente, el recambio de los genes embrionarios por los adultos procedía correctamente. En otras palabras, el LCR no juega un papel relevante en el recambio de genes embrionarios por genes adultos (12, 14, 82).

Otras hipótesis plantean que los promotores compiten por la interacción con el LCR. Mediante el uso de ratones transgénicos se demostró que la inversión del orden de los promotores ϵ y β^{h1} en el locus endógeno invertía la expresión de dichos genes

durante el desarrollo. Asimismo, la alteración del orden de los genes globina en transgenes posee un efecto similar. Sin embargo, evidencia en contra de la competición gradual del LCR por los promotores fue provista con la eliminación de los promotores globina en el locus endógeno, concluyendo que los promotores restantes transcriben en tiempo y espacio adecuado e independientemente de la presencia del promotor vecino (12, 159). Aunque muchos de los estudios se han realizado en ratón durante los últimos años varios de los modelos se han trasladado a pollo y humano, sin embargo, la veracidad e integración de estos ésta aún bajo investigación.

Recientemente se han caracterizado factores transcripcionales como componentes fundamentales del silenciamiento de genes para permitir el recambio de genes β -globina. Proteínas como SOX6 y Sp1 han sido involucradas en el silenciamiento de genes β -globina de ratón, aunque solo SOX6 ha mostrado una habilidad clara para silenciar el gen embrionario ϵ en el dominio β -globina murino durante etapas adultas (183). En pollo, dichas proteínas no han sido aún caracterizadas por lo que su papel en la expresión diferencial de los genes β -globina es desconocido. En otros sistemas como en ratón, el silenciamiento autónomo del gen ϵ es un fenómeno complejo que involucra secuencias dentro y cerca del promotor. Por ejemplo, la caracterización de un sitio de unión al factor eritroide GATA-1 parece ser fundamental, ya que alrededor de dicha secuencia, existe un sitio de unión al factor de transcripción YY1. La interacción de dicho factor ubiuno compite con GATA-1 por la interacción a su respectivo sitio inhibiendo la expresión del gen ϵ (159).

Por otro lado, la regulación epigenética esta involucrada en el silenciamiento de genes embrionarios, ya que se ha encontrado una relación directa entre el estado de la metilación del ADN y los genes a silenciarse (159). Por ejemplo, el gen embrionario ρ

de pollo se encuentra metilado en sitios CpG en etapas adultas (157, 158). Dicha metilación permite el reclutamiento de proteínas de unión a ADN metilado, como MBD2 (98). Sin embargo, los componentes que reclutan a la maquinaria que metila al ADN no se conocen claramente. Una hipótesis probable consiste en que la ausencia de transcripción permita la metilación del promotor del gen embrionario, o por otro lado, factores transcripcionales y co-factores, que realizan el silenciamiento autónomo del promotor, se encuentren acoplados a las metilasas de ADN. Interesantemente, en humano, cuyos genes embrionarios también son metilados, el uso de un inhibidor de la metilación del ADN (5-aza-2'-desoxicitidina) puede reactivar la expresión de los genes embrionarios en etapas adultas (146). Lo anterior sugiere que el silenciamiento del gen embrionario se da en una etapa del desarrollo y después, mediante mecanismos epigenéticos, la regulación negativa se conserva. Hasta la fecha, no queda claro si la cromatina local del promotor embrionario es compactada o si la metilación del ADN solo evita la unión de factores de transcripción al promotor.

Otro problema al cual el dominio β -globina de pollo se debe de enfrentar se encuentra localizado hacia el extremo 5' del mismo. Felsenfeld y cols., caracterizaron una región de 16 kb de heterocromatina, constituida por secuencias repetidas tipo CR1 y una alta densidad de CGs metiladas (28, 136). Hacia el extremo 3', el dominio β -globina colinda con dominios que contienen a los genes que codifican para un receptor olfatorio (Figura 13) (28). La presencia de una zona de heterocromatina río arriba del dominio puede ser un "peligro" para la expresión de los genes globina. Interesantemente, el dominio está flanqueado por sitios de hipersensibilidad que son constitutivos, el cHS4 y el 3'HS, los cuales constituyen los límites del dominio y actúan como delimitadores cromatínicos –"insulators"- (28). Dentro del dominio, conforme las

células eritroblásticas se diferencian a eritrocitos, a lo largo del dominio se van adquiriendo marcas de cromatina abierta, por ejemplo: hiperacetilación de las histonas H3 y H4, así como metilación de la K4 de la histona H3 (109), previas a la expresión de los genes globina. Dichas marcas presentan límites bien definidos los cuales coinciden con los sitios de hipersensibilidad constitutivos -“insulators”-. En células no eritroides, únicamente las secuencias asociadas con los “insulators” mantienen marcas de apertura, a diferencia del resto del dominio cuya cromatina refleja su estado transcripcionalmente inactivo, como por ejemplo: presencia de di-metilación de la lisina 9 de la histona H3 (28, 109). Este hallazgo permite sugerir que los “insulators” podrían definir o delimitar regiones que contienen genes de las que no.

En resumen, mecanismos genéticos y epigenéticos deben de controlar la adecuada activación de los genes β -globina en tiempo y espacio. Aunque la información necesaria para la regulación de estos genes se encuentra en los promotores, resulta clara la necesidad de la participación de elementos de regulación a distancia para mantener los niveles necesarios de los genes globina durante la ontogenia. Un aspecto fundamental en la diferenciación eritroide debe de ser la selección correcta del dominio y su adecuada organización de manera regulada e independiente del contexto genómico en el que se encuentra. Para dichos fines elementos tipo “insulators” han emergido como candidatos para la selección y apertura regulada de dominio génicos (66, 75, 123).

6.1.1 “Insulators” del dominio β -globina.

Como ya se mencionó, el dominio β -globina posee dos sitios constitutivos de hipersensibilidad al corte por la DNasa I que enmarca a este grupo de genes. Dichos sitios han sido caracterizados como elementos tipo “insulator” y cuya función principal es la de delimitar y proteger al dominio β -globina del microambiente epigenómico que lo rodea (51). Sin embargo, estas características, así como las funciones asociadas a este “insulator”, han sido establecidas indirectamente, ya que hasta el momento, el “insulator” cHS4 no ha podido ser removido de su contexto endógeno.

El sitio de hipersensibilidad 3'HS, localizado en el costado 3' del dominio, es un elemento que posee actividad de bloqueo de enhancer dependiente de la proteína CTCF (147). Por lo que se ha propuesto que el “insulator” 3'HS evita la “promiscuidad” entre los elementos de regulación del dominio β -globina con el o los dominios vecino(s) localizados río abajo de este. Por otro lado, el sitio de hipersensibilidad 4, conocido como “insulator” cHS4, tiene la capacidad de bloquear la comunicación entre un potenciador y su promotor, pero a su vez, también puede actuar como barrera cromatínica (135). El elemento mínimo del “insulator” cHS4 está contenido en un fragmento de ADN de 250 pb, constituido por al menos 5 sitios de unión a factores nucleares, los cuales fueron caracterizados *in vitro* mediante ensayos de interacción proteína-ADN. Entre estos sitios de hipersensibilidad se encuentra el sitio 2, conocido como FII (del inglés: “Footprinting II”), el cual es el encargado de reclutar al factor CTCF y proveer la capacidad de bloqueo de enhancer (62, 139).

De manera paralela, el “insulator” cHS4 tiene la capacidad de proteger a distintos tipos de transgenes contra los efectos de posición causados por el entorno cromatínico asociado al sitio de integración (135). El enmarcar un transgen con dos copias del

“insulator” cHS4 permite la expresión homogénea y constante a lo largo del tiempo (Figura 14). Recientemente, el grupo de Felsenfeld y cols., caracterizaron la unión de la proteína USF a la secuencia FIV, y dicha proteína es, en parte, la encargada de proteger a un transgen contra los efectos de posición a través del reclutamiento activo de modificadores de cromatina como acetiltransferasas y metiltransferasas de histonas (179). La caracterización epigenética de transgenes sin el “insulator” cHS4 permitió establecer que el silenciamiento génico está acompañado de una gradual desacetilación y metilación de histonas y, subsecuentemente, una metilación del ADN asociado al transgen. Finalmente, estos procesos epigenéticos extinguen progresivamente la expresión del transgene (120). La actividad dual de este elemento es evidente al confrontar estos resultados con la arquitectura del dominio β -globina (Figura 13). Río arriba del dominio existe una región de 16 kb de heterocromatina y, posteriormente, se encuentra localizado el siguiente dominio correspondiente al gen del receptor a folato. Por lo que se ha propuesto que el cHS4 podría estar evitando la propagación de la heterocromatina hacia el dominio β -globina (investigación en curso), así como evitando la promiscuidad entre señales regulatorias. Aunque se ha analizado la protección de un transgen contra los efectos de posición por parte del “insulator” β -globina de pollo cHS4 en distintos sitios de integración, no es claro si dicho elemento protege la expresión de un transgene en regiones definidas como de heterocromatina constitutiva como centrómeros y telómeros. En resumen, el “insulator” β -globina cHS4 de pollo constituye un elemento de regulación con actividad dual, el cual permite definir y aislar al dominio globina. Este elemento constituye el prototipo de aislador cromatínico, sin embargo, cabe mencionar que a la fecha sus mecanismos de acción no

son claros y se encuentran bajo estudio por parte de varios grupos de investigación incluyendo el nuestro.

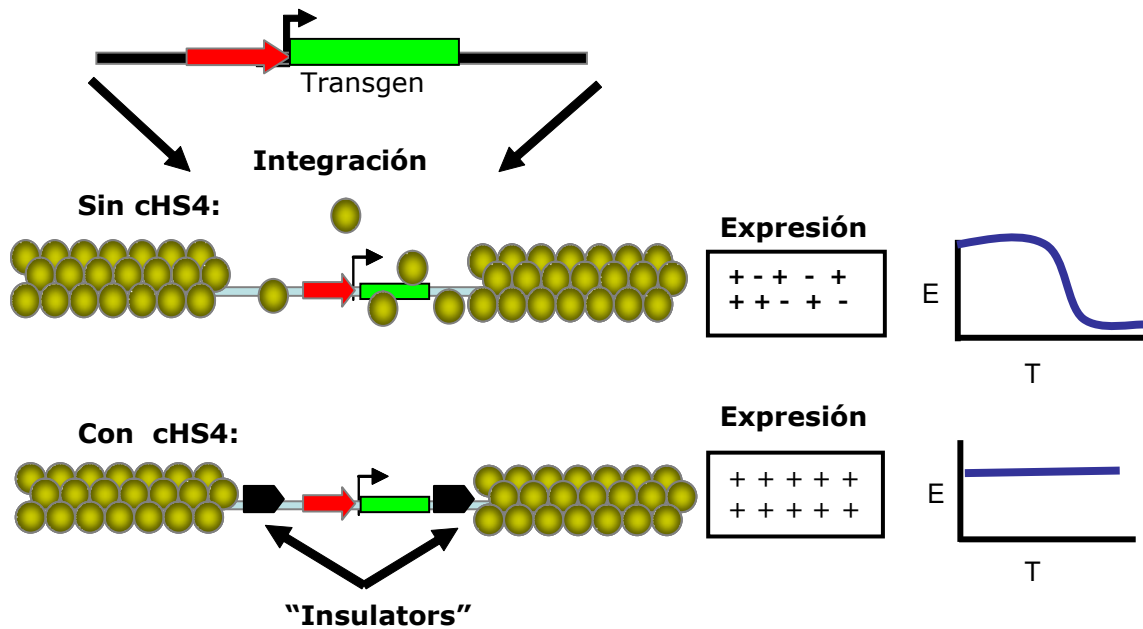


Figura 14.- Protección contra el efecto de posición por parte del “insulator” cHS4. La expresión de un transgene esta sometida al ambiente del sitio de integración en el genoma. Por lo que la expresión (E) va a ser heterogénea (+,-) y a lo largo del tiempo (T) va a decaer. El enmarcar al mismo transgene con el “insulator” cHS4 permite una expresión más homogénea sin importar el sitio de integración y sostenida a lo largo del tiempo (T).

6.2 Dominio α -globina de pollo

El dominio α -globina de pollo se encuentra localizado en el minicromosoma 14 dentro de una región de 40 kb, aproximadamente. Dicho dominio se conforma de un gen embrionario y dos genes adultos, conocidos como π , α^D y α^A , respectivamente (Figura 15). La organización de dicho dominio varía significativamente a la del dominio β -globina, incluyendo a los dominios homólogos en humano y ratón. Los promotores de los genes de pollo poseen una organización modular y contienen toda la información necesaria para su expresión durante las diferentes etapas de desarrollo eritroide, sin embargo requiere de elementos potenciadores para alcanzar los niveles de expresión adecuados (52). Los tres promotores poseen una caja TATA y por lo general una serie

de sitios de unión a los factores YY1, Sp1 y GATA-1, siendo este último fundamental para su activación génica eritroide. Curiosamente, el promotor embrionario presenta, de manera exclusiva, sitios putativos de reconocimiento al factor Sox6; por su parte, los promotores adultos poseen sitios de reconocimiento al factor NF-E2, que no están presentes en el promotor embrionario. Este último factor no posee sitios de unión sobre el promotor embrionario. Sin embargo la contribución real de estos factores transcripcionales no ha sido determinada.

A diferencia del dominio β -globina, en el dominio α -globina de pollo no se ha caracterizado un elemento tipo LCR, aunque se ha propuesto la existencia de un elemento de regulación río arriba del dominio mediante análisis *in silico*. Dicho análisis comparó entre los diferentes dominios α -globina de vertebrados caracterizando una región homóloga que generaba un sitio de hipersensibilidad *in vivo*. En transfecciones transitorias, éste sitio de hipersensibilidad al corte por la DNase actúa como un potenciador apoyando la idea de que podría actuar como un LCR (Figura 15; Rebollar *et al* datos no publicados) (60). Sin embargo, la relevancia y caracterización funcional de dicho potenciador sobre el dominio α -globina de pollo se encuentra bajo estudio en nuestro laboratorio.

Por otro lado, los principales elementos de regulación, descritos hasta el momento, son un silenciador/enhancer localizados en el extremo 3' respecto a los genes (Figura 15). El enhancer está constituido por 3 sitios GATA-1 (95) y por un fragmento de ADN conservado entre pollo y pato de 120 pb, cuya función hemos estudiado en el contexto de esta tesis (162, 164). El silenciador por su lado está constituido por al menos tres sitios de unión a factores nucleares, los cuales hasta el momento no han sido identificados (162).

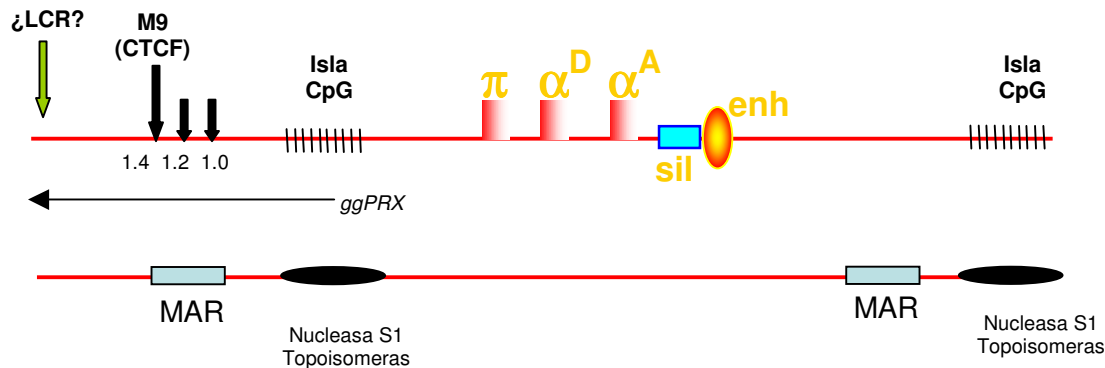


Figura 15.- Dominio α -globina de pollo. El dominio abarca una región aproximada de 40 kb, aunque no se conoce los límites exactos del mismo. El dominio contiene a los tres genes globina (π , α^D y α^A), así como los principales elementos de regulación hasta el momento descritos, el silenciador (sil) y el enhancer (enh). Los genes se encuentran enmarcados por islas CpG; la ubicada en el extremo 5' corresponde al sitio de inicio de la transcripción para el gen *ggPRX*. Río arriba se encuentran 3 sitios de hipersensibilidad (α EHS-1.4, α CHS-1.2 y α EH-1.0) dentro de los cuales se ha caracterizado un elemento con actividad de bloqueo de enhancer, conocido como M9 (α EHS-1.4), y que une a CTCF *in vitro* e *in vivo*. 5 kb arriba de dichos sitios se localiza una secuencia conservada entre vertebrados, a la cual se le ha asignado una posible función de LCR. En la parte inferior del diagrama se denotan las regiones que pueden tener una función estructural, las secuencias de unión a matriz nuclear (MAR) y los sitios de unión a la topoisomerasa. Estos correlacionan con las islas CpG y son regiones genómicas de sensibilidad al corte por la nucleasa S1. Diagrama no a escala.

En contrasentido al dominio, se encuentra el gen *-14* –ahora llamado *ggPRX*–, el cual se encuentra conservado con respecto a su homólogo en humano y en una gran variedad de organismos (6). Aparentemente, dicho transcrito no codifica para alguna entidad proteica, por lo que se cree que pueda tener un papel estructural a nivel del dominio (140). La regulación de dicho gen es desconocida y el promotor de dicho transcrito ha sido caracterizado parcialmente en el contexto de esta tesis en colaboración con el grupo del Dr. Sergey Razin. 5 kb arriba del gen embrionario π , una isla CpG fue identificada, y trabajos preliminares propusieron que podría tener actividad de enhancer, sin embargo en transfecciones transitorias de este elemento sólo incrementó 2 veces la transcripción. Alrededor de 6 kb río abajo del gen α^A hemos

identificado otra isla CpG, cuya función es actualmente materia de estudio en nuestro laboratorio. Estas islas correlacionan con sitios de hipersensibilidad al corte por la nucleasa S1, la cual tiene preferencia por ADN de cadena sencilla, así como a la DNasa I (experimentos en curso). La relevancia funcional de estas islas CpG dista mucho de ser conocida, aunque por su sensibilidad a la nucleasa S1 se sugiere que podrían estar participando de manera estructural en la formación de asas cromatínicas (138, 141).

Por otro lado, río arriba de la isla CpG del costado 5' del dominio se han caracterizado varios sitios de hipersensibilidad al corte por la DNasa I, tanto constitutivos como específicos del tejido eritroide. Estos sitios de hipersensibilidad se encuentran localizados entre 11 y 15 kb río arriba del gen embrionario π , llamados α EHS-1.4, α CHS-1.2 y α EH-1.0 (Figura 15). Recientemente, en nuestro laboratorio se definió que dos de estos sitios (α EHS-1.4 y α CHS-1.2) poseían actividad de bloqueo de enhancer dependiente de CTCF (170). Sin embargo, aunque se ha determinado dicha actividad, no queda claro si estos elementos representan los límites del dominio o si existe una transición tan marcada como en el dominio β -globina. Varios de los sitios de hipersensibilidad correlacionan con secuencias de unión a la matriz nuclear, por lo que su papel en la organización del dominio debe de ser relevante inclusive para delimitar al locus α -globina (138, 140). Dichos hallazgos junto con los datos del grupo de Higgs, en relación a un posible LCR río arriba del dominio, podrían parecer contradictorios, sin embargo varios resultados preliminares del laboratorio sugieren que los aisladores caracterizados podrían ser regulables y actuar de manera coordinada con otros elementos.

La caracterización de la estructura a nivel del dominio no se ha realizado a detalle. Datos iniciales del grupo de Higgs sugieren que la cromatina a lo largo del dominio α -globina de pollo se encuentra abierta, debido a una alta acetilación en la histona H4, la cual puede ser detectada mas allá de los sitios de hipersensibilidad con actividad de “insulators” caracterizados en nuestro laboratorio (23). Dicha configuración de cromatina abierta parece estar conservada a lo largo de la evolución. Los mecanismos por los que este dominio se remodela para atraer a la maquinaria responsable de transcripción no son entendidos y se encuentran bajo estudio en nuestro laboratorio.

Durante los años 80s, experimentos pioneros realizado por Weintraub y Groudine mostraron que el locus α -globina esta compuesto por sub-dominios, los cuales adquieren características estructurales específicas de acuerdo al gen globina que debe de ser expresado de manera regulada. Por otra parte, presencia de ADN metilado puede ser observada sobre el gen π en eritrocitos adultos, sugiriendo de manera indirecta un remodelaje de la cromatina a nivel local (177). Esto podría sugerir que la compactación diferencial de la cromatina a nivel del dominio es un mecanismo para determinar que genes deben de ser activados o reprimidos en función del recambio de hemoglobinas embrionarias por adultas. Sin embargo, a diferencia del dominio β -globina los factores y mecanismos involucrados en dicho recambio no son conocidos.

En conclusión, el dominio α -globina representa un modelo atractivo de estudio por las diferencias tanto estructurales como de organización que presenta respecto al dominio β -globina. Especialmente, en el contexto de elementos de regulación positiva, el dominio α -globina se caracteriza por la presencia de dos elementos antagónicos

localizados uno al lado del otro, como lo son el silenciador y el enhancer 3' (Figura 15). A nivel de dominio, éste se encuentra en un contexto constitutivamente abierto aun cuando se desconoce como la cromatina podría influir en la regulación de los genes contenidos en el mismo. Cabe mencionar que parte del interés de esta tesis se enfoca en el estudio del potenciador del dominio α -globina de pollo.

6.2.1 El enhancer α -globina de pollo localizado en el costado 3' del dominio.

El enhancer α -globina fue inicialmente descrito como una secuencia de 300 pb compuesta por tres sitios de unión al factor GATA-1. Dicho elemento puede *trans*-activar a los promotores α -globina, sugiriendo que sólo actúa de manera dependiente al estado del desarrollo y del tipo de hemoglobina necesaria en cada etapa (52). Por otro lado, el enhancer también posee dos sitios de reconocimiento al factor ubicuo Sp1 intercalado entre los sitios GATA-1. Aunque su función no se ha estudiado, se propone que los sitios Sp1 coadyuvan a la *trans*-activación efectuada por GATA-1, además de tener una demostrada participación en procesos de remodelaje de la estructura de la cromatina (138, 140). La secuencia se encuentra conservada en pato y pollo e incluye a una región de 120 pb la cual posee sitios de unión a los factores EKLF, NF-E2 y GATA-1 (Figura 16) (163). La relevancia funcional de dicha región no se conoce, pero se propone que ayudan al potenciador a incrementar la transcripción (163). Hasta la fecha no se ha determinado si el enhancer del dominio está directa o indirectamente involucrado en el recambio de genes embrionarios por adultos, y mucho menos cómo el silenciador, localizado río arriba de éste, coordina la expresión de los genes α -globina de pollo.

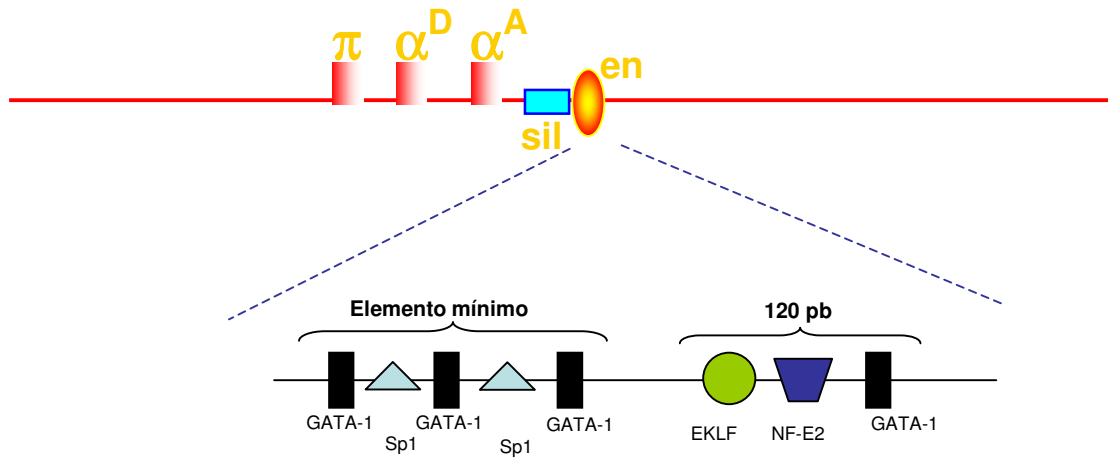


Figura 16.- Descripción del enhancer del dominio α -globina. El potenciador inicialmente descrito se denomina elemento mínimo y está constituido por tres sitios GATA-1 y dos sitios Sp1. Un fragmento de ADN de 120 pb localizado río abajo del elemento mínimo parece formar parte del enhancer. Dicho fragmento posee sitios de unión para los factores EKLF, NF-E2 y una cuarta secuencia de unión al factor GATA-1.

7 Comentarios sobre los proyectos realizados durante el doctorado

Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha estado interesado en el estudio de la regulación transcripcional a nivel de un dominio y a nivel local, considerando como premisa que la selección y apertura de un dominio es un pre-requisito fundamental para lograr una regulación adecuada de los genes contenidos en el mismo. Sin embargo, hasta el momento, no existe evidencia directa que permita establecer una co-dependencia. Asimismo, para fines prácticos de esta tesis y con base en cómo fue desarrollándose experimentalmente, nosotros decidimos estudiar ambos niveles de regulación, los cuales proponemos que son interdependientes. Ante este panorama, se decidió abordar conjuntamente dos proyectos de investigación:

- Estudio de la protección contra efectos de posición por parte del “insulator” cHS4 globina de pollo.
- Regulación genética y epigenética de los genes del dominio α -globina de pollo.

Ante dicho argumento, me gustaría aclarar que la tesis ha sido organizada en dos partes. De esta manera, a continuación expongo la relevancia del proyecto A, así como los resultados y conclusiones establecidas. De este proyecto nos encontramos preparando un artículo que pensamos será una aportación relevante al entendimiento de la regulación a nivel de dominio. Posteriormente, abordaré el proyecto B con las estrategias y hallazgos realizados durante mis estudios de doctorado que han sido publicados parcialmente. Finalmente, presentaré una conclusión global final, así como las perspectivas que se derivan a partir de nuestros estudios.

1ª Parte

Estudio de la protección contra efectos de posición por parte del “insulator” cHS4 globina de pollo.

8 Planteamiento del problema

La integración de un transgen en regiones aledañas a heterocromatina conlleva a una extinción gradual de la expresión del mismo, a dicho efecto se conoce como efectos de posición, el cual ha sido descrito tanto en levaduras como en células de mamíferos. Por otro lado, el “insulator” cHS4 del dominio β -globina de pollo es capaz de proteger contra los efectos de posición cromosomales. Se sugiere que dicha protección esta basada en el reclutamiento de actividades remodeladoras de la cromatina, por ejemplo: acetiltransferasas de histonas. Sin embargo, no se ha establecido de manera directa si el “insulator” cHS4 protege contra efectos de posición provocados por una fuente dominante de heterocromatina constitutiva, ya que previamente su estudio se había basado en el análisis de sitios de integración aleatorios dentro del genoma de pollo. De esta manera, la eliminación de un “insulator” del sitio de integración proporcionaría la evidencia necesaria para determinar si la protección contra los efectos de posición observados es realmente dependiente de la presencia del “insulator” cHS4. Asimismo, la integración dirigida de un transgen protegido con el “insulator” cHS4 a una zona de heterocromatina constitutiva proporcionaría la vía para evaluar si dicho elemento protege contra los efectos de posición telomérico.

9 Hipótesis

El “insulator” cHS4 del dominio β -globina protege transgenes contra los efectos de posición cromosomales. Dicha protección se lleva a cabo por el reclutamiento de enzimas modificadoras de la cromatina que mantienen abierta la región en donde el transgen se integró. Por lo tanto la eliminación *in vivo* de este elemento conllevará a modificaciones en la expresión del transgen ligado a dicho elemento, provocando en casos extremos el silenciamiento del mismo. Con este razonamiento, la introducción de un transgen protegido con el “insulator” cHS4 dentro de una zona de heterocromatina permitirá la expresión del mismo, aun en presencia de la heterocromatina que rodea al sitio de integración. Lo anterior como resultado de un efecto dominante del reclutamiento de acetil- y metil- transferasas de histonas.

10 Objetivo general

Analizar la capacidad del “insulator” cHS4 de proteger contra efectos de posición cromosomal en un mismo sitio de integración ante un ambiente de heterocromatina.

10.1 Objetivos particulares

Desarrollar un nuevo sistema para el estudio de los efectos de posición sobre la expresión de un transgen integrado de manera estable en células de pollo en cultivo.

Evaluar si la eliminación del “insulator” cHS4 en un mismo sitio de integración afecta la expresión del transgen.

Evaluar la capacidad del “insulator” cHS4 para proteger a un transgene del silenciamiento provocado por heterocromatina constitutiva.

11 Resultados

Sistema para estudiar efectos de posición

A nivel de un dominio transcripcionalmente activo, las regiones de unión a la matriz nuclear y los aisladores cromatínicos o “insulators” tienen un papel importante en la mantención y estabilidad funcional de dominios génicos. Lo anterior se basa en las características funcionales de los elementos antes mencionados, ya que son capaces de evitar la promiscuidad entre elementos de regulación y tienen la capacidad de proteger la expresión de transgenes enmarcados por estas secuencias. Para estudiar esta última característica en vertebrados, Felsenfeld y colaboradores establecieron un sistema basado en la co-transfección estable de dos plásmidos, uno que permitía la selección de clones estables y otro que era sensible a efectos de posición (135). Los transgenes sin protección eran silenciados rápidamente, y dicho silenciamiento se encontraba asociado a la desacetilación y metilación de histonas, así como a la metilación del ADN (121, 179). La estrategia se basa en la evaluación de diferentes sitios de integración entre reporteros protegidos o no con el “insulator” cHS4. Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencia directa de que en un mismo sitio de integración un “insulator” proteja contra efectos de posición. Por lo que ante este hecho, propusimos establecer un sistema alternativo y sensible a efectos de posición y que permitiera eliminar al “insulator” cHS4 dentro de un mismo sitio de integración. Para este fin, se construyeron una serie de plásmidos para evaluar su sensibilidad a efectos de posición; dichos plásmidos poseen elementos de regulación virales (por ejemplo: citomegalovirus) y eritroides (por ejemplo: promotor α^D del dominio α -globina de pollo) que dirigen la expresión de la proteína verde fluorescente (Figura 17A). Los plásmidos fueron transfectados establemente en la línea celular eritroblástica HD3 de pollo, y clones individuales fueron seleccionados con el uso de un medio semisólido en presencia de geneticina. La expresión del transgen fue evaluada por citometría de flujo ya que las propiedades de fluorescencia de la GFP pueden ser evaluadas por esta metodología, asimismo, ésta nos permite determinar el comportamiento poblacional de cada clona (Figura 17B). Dentro del análisis se fijó como población negativa la que mostraba una fluorescencia dentro del rango de 10^0 - 10^1 URF (unidades relativas de fluorescencia); por su parte, la población positiva se fijó a partir de 10^1 URF en adelante (Figura 17B). Las líneas celulares estables fueron mantenidas en cultivo, en ausencia

del antibiótico de selección por 100 días, con evaluaciones quincenales de los niveles de expresión del transgen por citometría. Interesantemente, tanto los elementos de regulación virales como aquellos plásmidos que contienen al enhancer α -globina fueron capaces de proteger contra los efectos de posición, esto es, las clonas resultantes eran capaces de mantener la expresión del transgen aún después de 100 días de cultivo continuo (ver adelante). Por otro lado, las clonas resultantes de la transfección con el plásmido regulado exclusivamente por el promotor α^D mostraron un comportamiento variegado de la expresión en la mayoría de las clonas después de 30 días en cultivo, el silenciamiento total se observó alrededor del día 50 (Figura 18).

Los resultados muestran que la expresión del transgen seleccionado (pG α D3) es dependiente del microambiente en el cual dicho plásmido se integró en el genoma de las células HD3 e independiente del número de copias. La extinción gradual de la expresión del transgen sugiere que éste se encuentra sometido a efectos de posición por la cromatina circundante o que el transgen fue eliminado del sitio de integración. Para determinar si la primera opción era la correcta, decidimos evaluar la capacidad de reactivar la expresión en las clonas silenciadas. Para dicho fin, las células fueron incubadas con inhibidores de remodeladores de la cromatina asociados al silenciamiento, en particular inhibidores de desacetilasas de histonas y metilación del ADN. Las clonas silenciadas fueron incubadas con tricostatina A (TSA), inhibidor de desacetilasas de histonas, durante tres días con el fin de evaluar la cinética de reactivación. El 90% de las clonas fueron reactivadas con dicha droga, lo cual excluye que el transgen haya sido eliminado del sitio de integración. El porcentaje de células reactivadas varió de acuerdo a la clona estudiada, obteniéndose reactivaciones en un rango que vá del 15% hasta un 65% de la población; los porcentajes mayores de reactivación fueron observados a las 72 h de incubación con TSA (Figura 19A). Estos resultados sugieren que el silenciamiento observado del transgen bajo el control del promotor α^D es causado por una desacetilación gradual de las histonas que cubren la región.

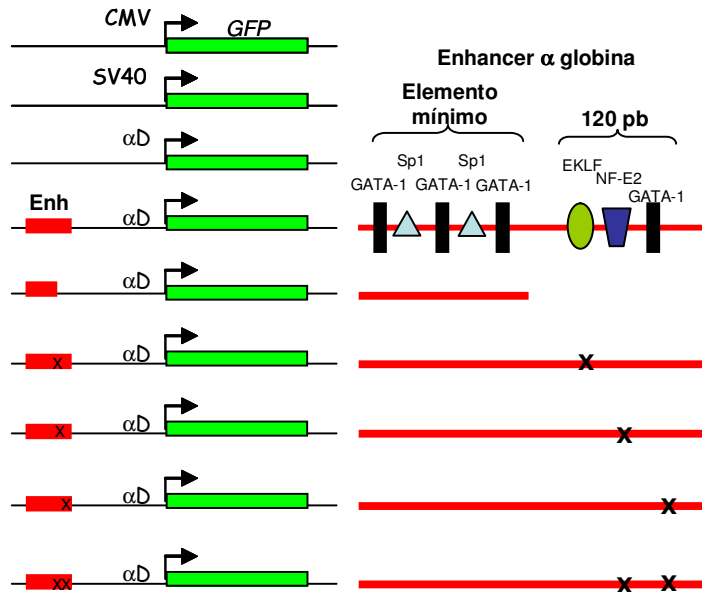
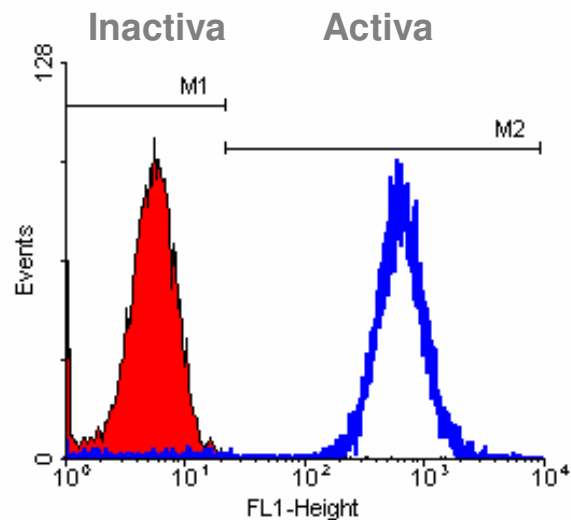
A**B**

Figura 17.- Plásmidos diseñados para evaluar su sensibilidad a los efectos de posición. A) El gen reportero utilizado fue el que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), cuya expresión se encontraba bajo el control de elementos de regulación viral (CMV o SV40) o eritroide (promotor α^D con o sin el enhancer α -globina de pollo –ver a la derecha de la figura-). Debido a la capacidad del enhancer α -globina para proteger contra efectos de posición, diferentes versiones mutadas (x) sobre el fragmento de ADN de 120 pb del enhancer fueron analizadas en el mismo sistema, con la finalidad de debilitar su capacidad potenciadora. **B)** Análisis de clonas transfectadas establemente, considerando como población negativa la región del histograma denominada como M1 y considerando a la región M2 como la de expresión del transgene (en escala logarítmica).

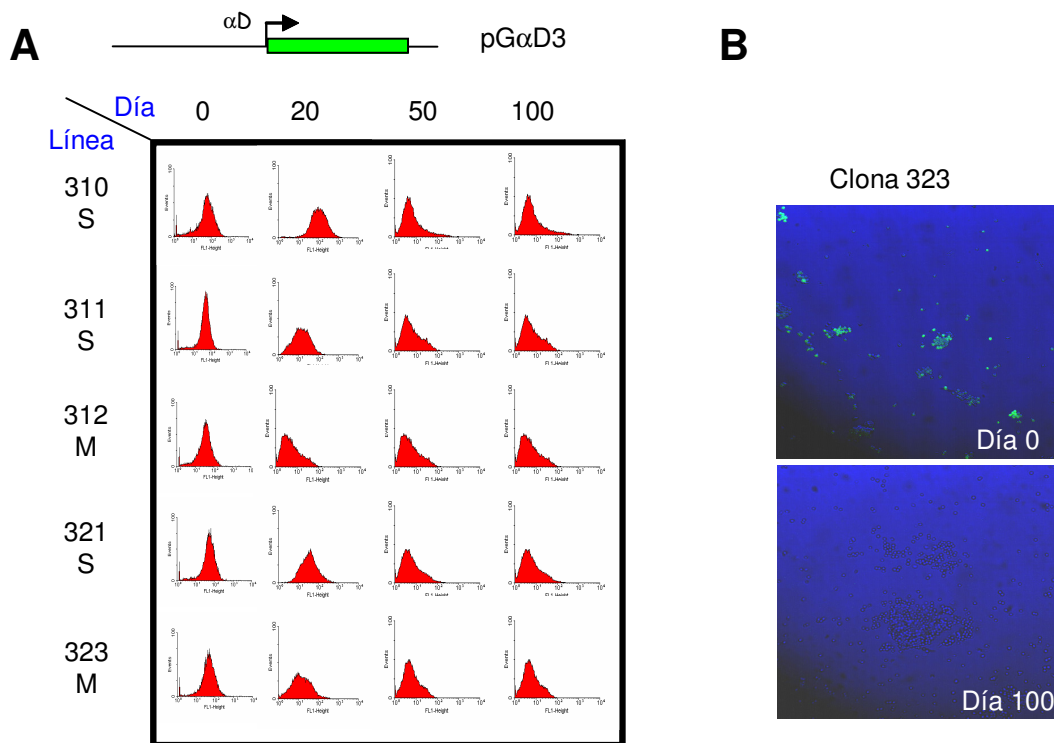


Figura 18.- Análisis de efectos de posición sobre un transgen. **A)** Clonas individuales HD3 transfectadas establemente con el plásmido pGαD3, el cual dirige la expresión de la proteína verde fluorescente a través del promotor α^D , exclusivamente. Se muestran 5 clonas correspondientes a integrantes de copia sencilla (S) o multicopia (M) -evaluadas por southern blot-, cuya expresión del transgen se evaluó por 100 días en ausencia de antibiótico de selección. La expresión de la mayoría de las clonas se ve abatida después de 50 días en cultivo continuo. **B)** El silenciamiento puede observarse a nivel de microscopia de fluorescencia, como por ejemplo: la clona 323 que expresaba al transgen (Día 0) después de tres meses de cultivo (Día 100) pierde la fluorescencia proveniente de la GFP.

Por otro lado, para evaluar si la metilación del ADN participa en el silenciamiento del transgen, realizamos experimentos de reactivación en presencia de 5-aza-2'-desoxicitidina (5azadC). Dicho fármaco es un compuesto análogo de la citosina que no puede ser metilado, por lo que su incorporación al ADN durante la replicación del ADN elimina la presencia de citosinas metiladas del genoma, provocando la subsecuente reactivación transcripcional. Las clonas transfectadas con el plásmido pGαD3 e incubadas en presencia de 5azadC provocó la reactivación del transgene. Interesantemente, alrededor del 60% de la población de cada una de las clonas analizadas fue reactivada. Dicha reactivación se observó en la totalidad de las clonas analizadas (Figura 19B). Estos resultados sugieren de manera indirecta que la metilación del ADN también participa en el silenciamiento del transgen pGαD3 y que dicha marca epigenética tiene una jerarquía mayor en relación con la desacetilación de histonas. De esta manera, el uso de inhibidores de cromatina nos sugiere que el

transgen se encuentra íntegro, ya que es posible reactivar la expresión del mismo; así como que la cromatina que rodea a cada sitio de integración esta involucrada en el silenciamiento observado. Estos ensayos nos permitieron confirmar la validez de nuestro sistema experimental diseñado para el estudio de los efectos de posición, demostrando que la cromatina es el principal factor para el silenciamiento génico de transgenes. Asimismo, el sistema desarrollado muestra ventajas técnicas sobre el protocolo previamente desarrollado por el laboratorio de Felsenfeld, ya que el uso de la GFP como reportero evita el uso de anticuerpos y agiliza el análisis de las muestras por citometría de flujo.

Protección contra efectos de posición por parte del enhancer α -globina de pollo

Durante la búsqueda por elementos de regulación sensibles a efectos de posición encontramos que el enhancer 3' del dominio α -globina es *per se* capaz de contrarrestar los efectos de posición. Ésta habilidad no fue sorprendente ya que ha sido sugerida para otros elementos de regulación positiva como elementos de regulación de locus (LCR) y otros enhancers (91, 160). Por otro lado, el promotor adulto α^D es sensible a la *trans*-activación provocada por el enhancer del mismo locus (ver más adelante). Dicha *trans*-activación provoca un incremento considerable de la expresión del transgen ligado a dichos elementos de regulación tanto de manera transitoria como en un contexto cromatínico (Figura 20). El enhancer está constituido por un elemento mínimo compuesto de tres sitios GATA-1 y Sp1, así como de un fragmento de ADN de 120 pb con sitios putativos de unión a los factores EKLF, NF-E2 y GATA-1 (Figura 17). Con la finalidad de debilitar la fuerza del enhancer y volver más sensible al transgen a los efectos de posición, se decidió mutar algunos de los componentes de este elemento de regulación. Para dicho fin, se diseñaron una serie de mutaciones en los sitios putativos de unión a factores transcripcionales sobre el fragmento de 120 pb localizado río abajo del enhancer.

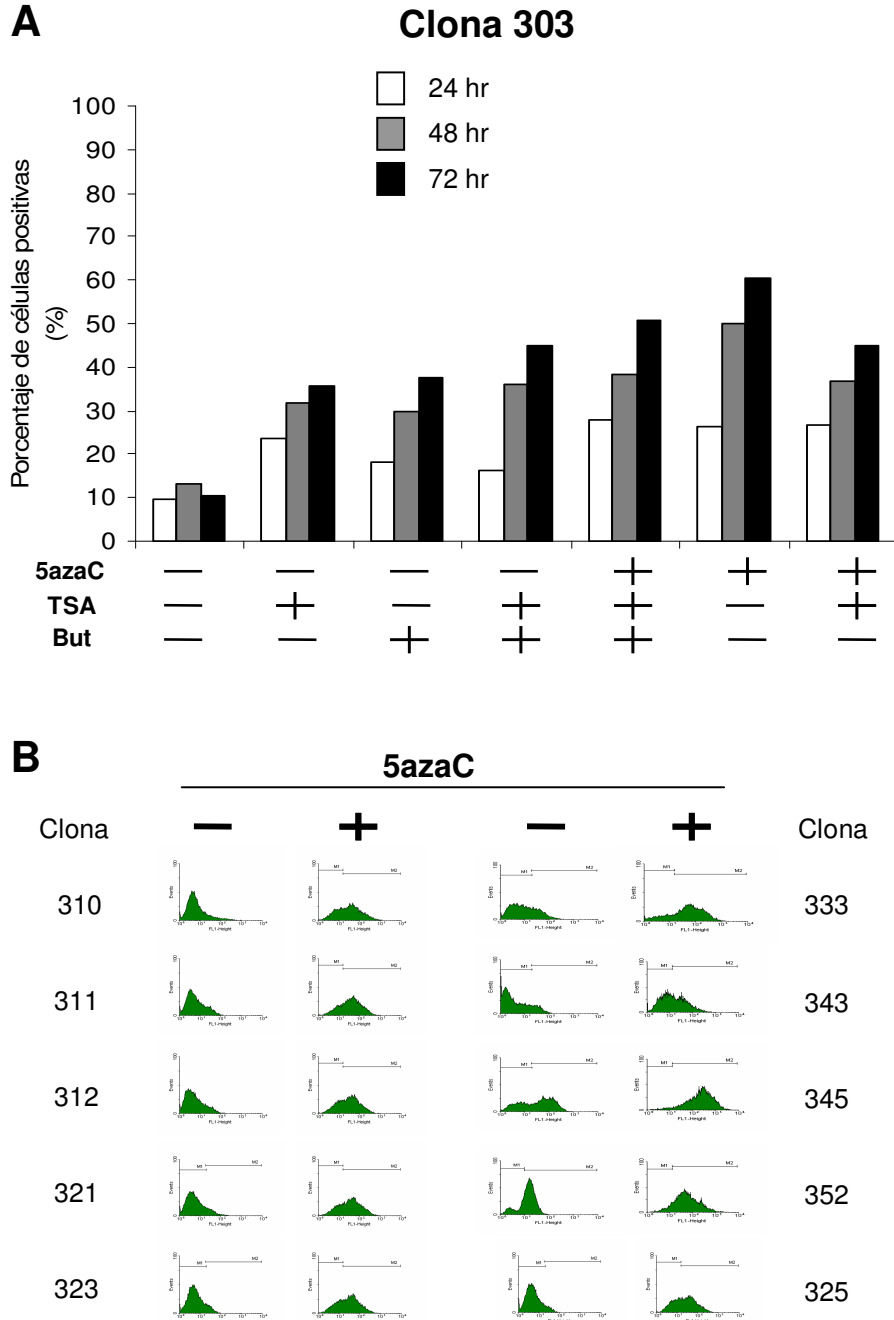


Figura 19.- Reactivación de clonas silenciadas. A) La clona 323, transfectada establemente con el plásmido pGαD3, fue incubada por tres días en presencia de TSA (2.5 ng/ml) y la re-expresión del transgen analizada por citometría de flujo. **B)** Clonas transfectadas estables obtenidas como en (A) fueron incubadas con 5-aza-2'-desoxicitidina (3 mM 5azaC) por 48 h. La re-expresión del transgen fue analizada por citometría de flujo.

Nuestros resultados nos permitieron determinar que el sitio EKLF no afecta la expresión del transgen en clonas estables. Por otro lado, la mutación del sitio NF-E2 presentó un mayor efecto disminuyendo la capacidad de *trans*-activación del enhancer, provocando una expresión variegada del transgen (Figura 20). Por su parte, la eliminación del sitio GATA-1 dentro de la región de 120 pb provocó una mayor *trans*-activación del promotor adulto en las células bajo estudio, sugiriendo que dicho sitio podría modular negativamente la actividad del enhancer α -globina de pollo (ver mas adelante; Rincón-Arano *et al* 2005). El uso de dichas mutantes para evaluar su sensibilidad a efectos de posición generó una serie de resultados que en forma global nos permitieron establecer que el elemento mínimo del enhancer –el cual incluye a los 3 sitios GATA-1 y dos sitios Sp1- es suficiente para contrarrestar los efectos de posición (Figura 20C). En resumen, nuestros resultados sugieren que el elemento mínimo del enhancer es un elemento lo suficientemente “fuerte” para proteger a un transgen contra los efectos de posición cromatínicos, y que el enhancer 3' α -globina de pollo posee un elemento dominante dependiente de GATA-1 que modula su función en un contexto de cromatina. Datos recientes de nuestro laboratorio confirman este planteamiento, dado que mutaciones en sitios GATA-1, en un contexto cromatínico, provocan la pérdida total de la actividad del enhancer mediante la formación de una estructura de la cromatina compacta (Escamilla-Del-Arenal y Recillas-Targa en preparación).

Estrategias para eliminar a un elemento tipo “insulator” en el mismo sitio de integración

Los estudios iniciales sobre cómo el “insulator” cHS4 protege contra los efectos de posición consideraban el análisis de diferentes sitio de integración y la comparación entre un transgen protegido o no con dicho “insulator” en distintos entornos cromatínicos. Para determinar si el “insulator” cHS4 protege en el mismo sitio de integración, nosotros planeamos el uso de dos estrategias experimentales: 1) eliminación *in vivo* de “insulators” protegiendo a un transgen mediante recombinación homóloga sitio específica, y 2) evaluar la incorporación de un transgen protegido o no con el “insulator” cHS4 al mismo sitio de integración por medio de la técnica de intercambio de casete mediado por la recombinasa (RMCE) (112).

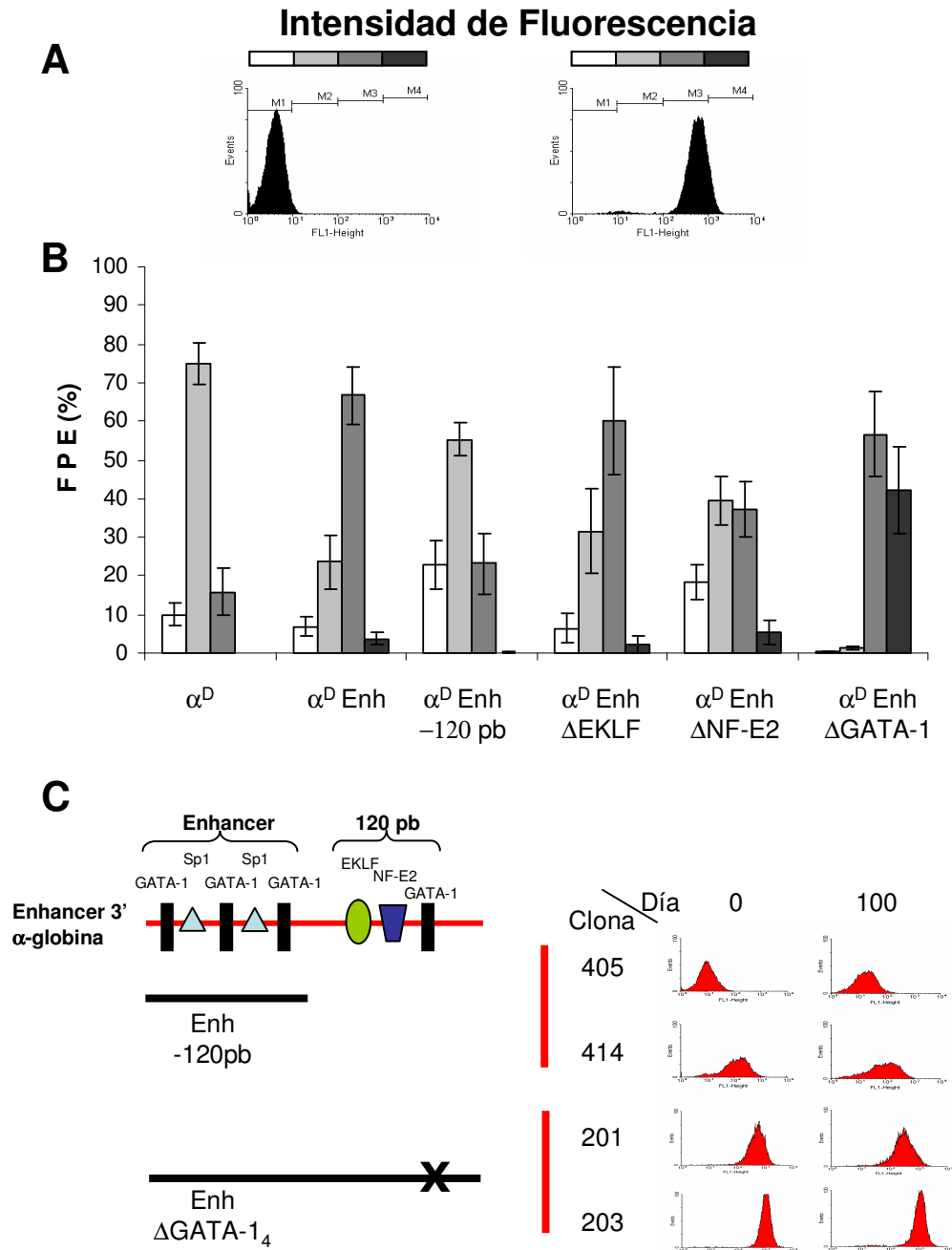


Figura 20.- El enhancer α -globina protege contra efectos de posición. **A)** Células HD3 fueron transfectadas de manera estable con plásmidos que expresan al reportero GFP, el cual se encuentra bajo el control del promotor α^D solo o con diferentes versiones del enhancer α -globina (Enh, enhancer completo; Enh-120, elemento mínimo; Enh Δ EKLF, Enh Δ NF-E2 y Enh Δ GATA-1₄, mutaciones en los sitio de unión a factores dentro de la región de 120 pb). La expresión fue analizada con histogramas separando la intensidad de fluorescencia en cuatro regiones (M1-M4), con el fin de analizar el porcentaje de células que emiten fluorescencia dentro de cada una de esas regiones para cada construcción. FPE%, porcentaje de expresión poblacional de fluorescencia. **B)** Determinación del nivel de expresión del transgen bajo la regulación de diferentes versiones del enhancer α -globina. **C)** Evaluación de la sensibilidad del enhancer α -globina a efectos de posición. Se muestran 2 clonas tanto de la construcción con el elemento mínimo del enhancer como del enhancer completo mutado en el sitio GATA-1₄ dentro de la región de 120 pb.

1- Eliminación *in vivo* de “insulators”

Para dicho fin, diseñamos una serie de plásmidos que nos permitirían evaluar si en un transgen protegido con el “insulator” cHS4 e integrado en un contexto cromatínico, la eliminación *in vivo* del “insulator” sometería al transgen a los efectos de posición. Con esto en mente, el “insulator” cHS4 fue flanqueado con sitios de recombinación sitio específico LoxP y FRT, los cuales a su vez protegen a un gen reportero (Figura 21). Dicho plásmido es linearizado y transfectado establemente en células HD3. Clonas individuales fueron mantenidas en cultivo en ausencia de antibiótico y la fluorescencia analizada por citometría de flujo. Los resultados muestran que el “insulator” cHS4 protege la expresión del transgen por periodos superiores a 100 días (Figura 21B), de manera independientemente al número de copias integradas del transgen. Dichos resultados validan el sistema desarrollado ya que reproducen y son consistentes con los resultados previamente publicados (120, 121, 135). El enmarcar a los insulators con sitios de recombinación sitio específico nos permitirá, mediante la expresión transitoria de las recombinasas CRE y FLP, eliminarlos en un contexto cromatínico, y así determinar si el efecto *in vivo* de la protección contra efectos de posición.

2- Intercambio de casete mediado por la recombinasa Cre (RMCE).

Dicha estrategia contempla el uso de una serie de plásmidos proporcionados por el laboratorio del Dr. Mark Groudine del Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, EU. El plásmido pLHyTKL contiene un gen que codifica una fusión entre dos proteínas, permitiendo obtener clonas estables por selección positiva, así como por selección negativa para analizar la ausencia del mismo. Dicho gen expresa a una proteína de fusión compuesta por el gen de resistencia a higromicina (Hy) y el gen de la cinasa de timidina (TK). La co-existencia del producto proteico de este gen en presencia de ganciclovir causa daño celular, característica utilizada para seleccionar negativamente la pérdida del gen de resistencia. Dicho transgen se encuentra bajo el control del promotor/enhancer del citomegalovirus, así como enmarcado por sitios de recombinación LoxP invertidos (Figura 22). El plásmido es transfectado de manera estable y se seleccionan clonas estables de copia sencilla a través de la incubación en

medio semisólido con higromicina, y subsecuente análisis por “Southern blot”. Cinco clonas de copia sencilla fueron aisladas para su posterior estudio.

Por otro lado, se utilizó el plásmido pB1LL1 para flanquear a un transgen, protegido o no con el elemento mínimo del “insulator” cHS4, con sitios de recombinación LoxP (Figura 22). Una vez transferido el fragmento de interés al vector pB1LL1, este es linearizado y co-transfectado junto con los plásmidos que contienen las secuencias codificantes de las recombinasas Cre y FLP, lo anterior se realiza en las clonas estables a higromicina previamente obtenidas. Dicha co-transfección fue realizada con el fin de expresar a la recombinasa Cre e intercambiar el casete que posee el transgen de interés por el casete de resistencia a higromicina. El intercambio de los casetes fue seleccionado mediante una incubación con ganciclovir, ya que el mismo casete de resistencia permite usar este antibiótico para una selección negativa (56).

Los avances de estas estrategias fueron satisfactorios; lamentablemente, dichas estrategias fueron publicadas por el grupo de Dr. Bode en Alemania en el transcurso del año 2005 (67), tiempo en el cual nosotros nos encontrábamos transfectando los diferentes plásmidos para iniciar el análisis del comportamiento de las distintas construcciones. Los resultados muestran que el “insulator” cHS4 protege contra efectos de posición en cada uno de los sitios de integración evaluados en dicho estudio (67). A pesar de lo anterior, los vectores aquí generados siguen siendo de gran utilidad para la realización de futuras investigaciones basadas en el planteamiento de nuevas preguntas (ver perspectivas).

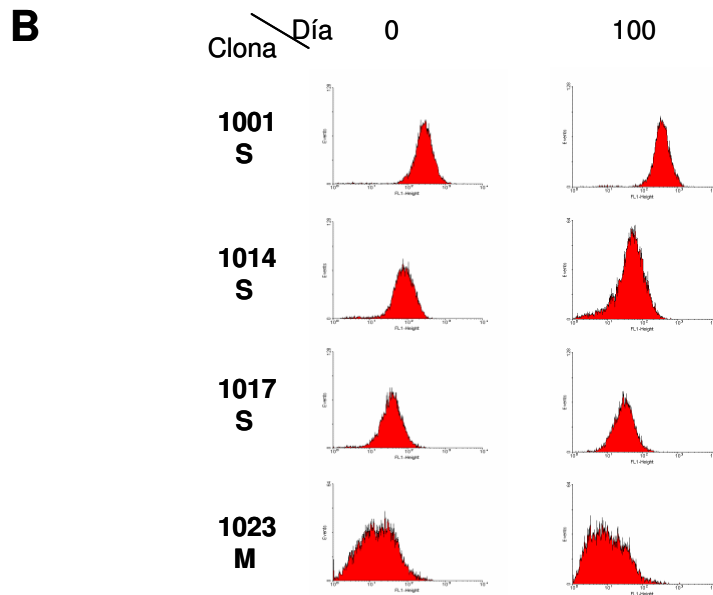
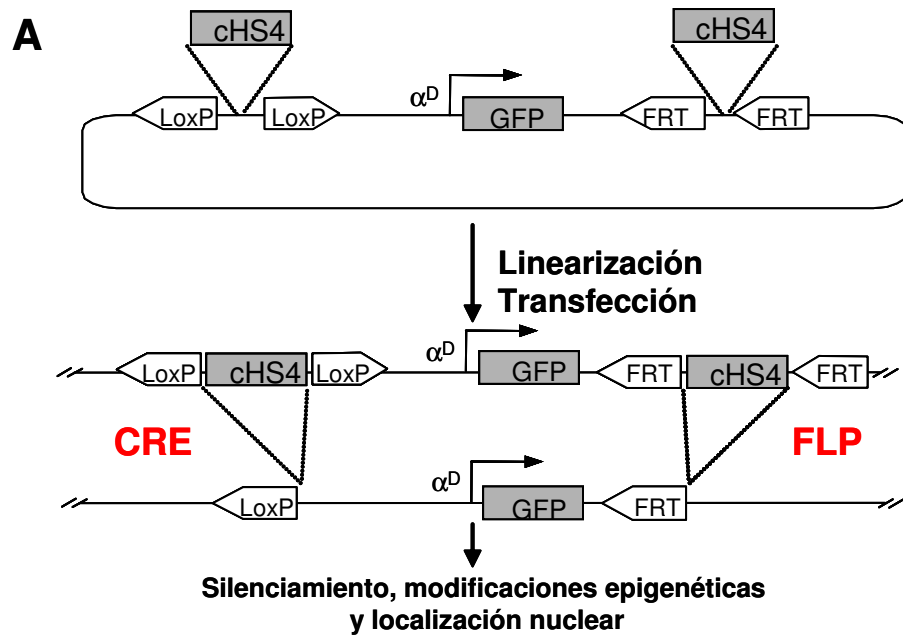


Figura 21.- Ensayo para evaluar la capacidad del “insulator” cHS4 para proteger contra los efectos de posición cromosómicos. A) Se diseñaron plásmidos con un transgen sensible a efectos de posición flanqueado con el elemento mínimo del “insulator” cHS4 y la versión de 1.2 kb. Cada aislador cromatínico fue a su vez enmarcado con sitios de recombinación sitio específico LoxP y FRT. Dichos sitios permitirían la eliminación específica del “insulator” del sitio de integración. Los plásmidos fueron linearizados con las enzimas ApaLI o EcoO109 I, transfectados e integraciones de copia sencilla fueron seleccionadas. Dicha estrategia nos permitiría analizar si existen las marcas epigenéticas están involucradas en dicho silenciamiento y como se modifica la localización nuclear del transgen comparando los resultados de un mismo sitio de integración. **B)** Protección contra efecto de posición por parte del “insulator” cHS4. Clonas transfectadas con el transgen protegido, tanto de copia sencilla (S) o multicopia (M), fueron mantenidas por 100 días y la expresión fue analizada por citometría de flujo.

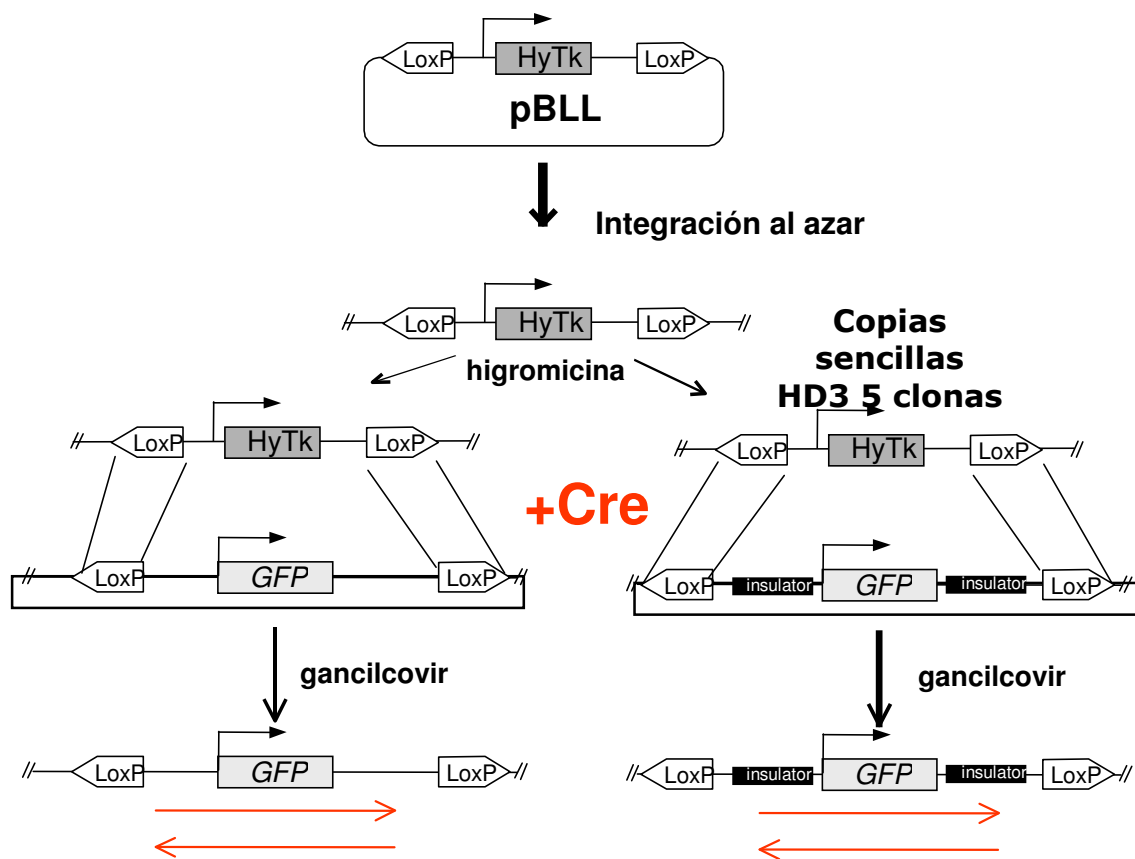


Figura 22.- Estrategia para evaluar la protección contra efectos de posición por parte del “insulator” cHS4 utilizando el intercambio de casete mediado por la recombinasa Cre. Esta estrategia utiliza un transgen, que permite tanto selección positiva como negativa, el cual es inicialmente transfectedo establemente en la línea celular HD3 de pollo. Integrantes de copia sencillas son seleccionadas para posteriormente ser co-transfectadas con las construcciones que llevarán a cabo el intercambio (transgen con o sin el “insulator cHS4) y el plásmido con la secuencia de la recombinasa Cre. 48 h posteriores a la transfección, la células son incubadas en presencia de ganciclovir para seleccionar las clonas que satisfactoriamente intercambiaron el casete. Finalmente, la orientación e integridad de los transgenes intercambiados fueron analizadas por “Southern blot”.

El “insulator” cHS4 protege contra efectos de posición telomérico (objetivo 1.3)

Las estrategias hasta ahora descritas en células de vertebrados están enfocadas a evaluar la capacidad de un “insulator” en diferentes entornos cromatínicos, pero no de manera directa sobre regiones de heterocromatina constitutiva. Para contestar dicha pregunta, decidimos plantear en paralelo la posibilidad de dirigir a un transgen protegido o no con el “insulator” cHS4 hacia una región genómica de heterocromatina constitutiva. Lo anterior con base en una estrategia previamente descrita, en la cual a un transgen se le incorporan secuencias teloméricas TTAGGG, favoreciendo que dicho transgen se integre en regiones teloméricas por recombinación homóloga (10). Aunque dicho procedimiento fue desarrollado para células de mamíferos, las secuencias teloméricas

se encuentran conservadas entre levadura, aves y mamíferos, lo cual nos motiva a evaluar la misma estrategia en nuestro sistema para estudiar efectos de posición (10, 11).

Con esto en mente, 1.6 kb de secuencias repetidas teloméricas TTAGGG fueron incorporadas río arriba de un transgen protegido o no con el elemento mínimo del “insulator” *chs4*. Asimismo, para evaluar el efecto de la eliminación del “insulator” *in vivo*, el aislador del extremo 5' respecto al transgen fue enmarcado con sitios de recombinación LoxP (Figura 23). Dichos plásmidos se transfectaron en la línea celular HD3 de pollo, y clonas estables fueron aisladas bajo las condiciones ya establecidas en el laboratorio.

Se obtuvieron quince clonas independientes de cada construcción las cuales fueron mantenidas en cultivo continuo por 100 días en ausencia del antibiótico de selección. Las clonas aisladas muestran un nivel de expresión bajo con respecto a las clonas transfectadas con las construcciones sin secuencias teloméricas, con una fluorescencia media de 10^1 - 10^2 . Las clonas transfectadas con el transgen sin “insulator” presentan una expresión variegada respecto al tiempo, y en algunos casos es drásticamente silenciada. Este proceso de silenciamiento se observa en un intervalo de 20-30 días, en promedio, lo cual es más rápido en comparación al silenciamiento observado en las clonas integradas aleatoriamente en el genoma (40-50 días) (Figura 24A). Interesantemente, el patrón de expresión de las clonas silenciadas muestra que los niveles de expresión se pierden casi completamente (Figura 24A). En resumen, la presencia de secuencias constituidas por repetidas teloméricas alrededor del transgen posee un efecto negativo sobre la expresión del transgen, así como dominante respecto a transgenes integrados al azar.

El silenciamiento observado puede ser revertido con el uso de inhibidores de remodeladores de la cromatina, principalmente de la metilación del ADN (5-aza-2'-desoxicitidina, 5azaC) (Figura 24C), en todas las clonas silenciadas. La tricostatina A o la nicotinamida no tienen ningún efecto sobre el silenciamiento del transgen por sí solos. Sin embargo, el uso de la tricostatina A en células tratadas con 5azaC tiene un efecto sinérgico sobre la reactivación, ya que la intensidad media de fluorescencia se incrementa. Dicho efecto no es observado con la nicotinamida, excluyendo a la familia de desacetilasas III en los efectos de posición teloméricos (Figura 24C) (11).

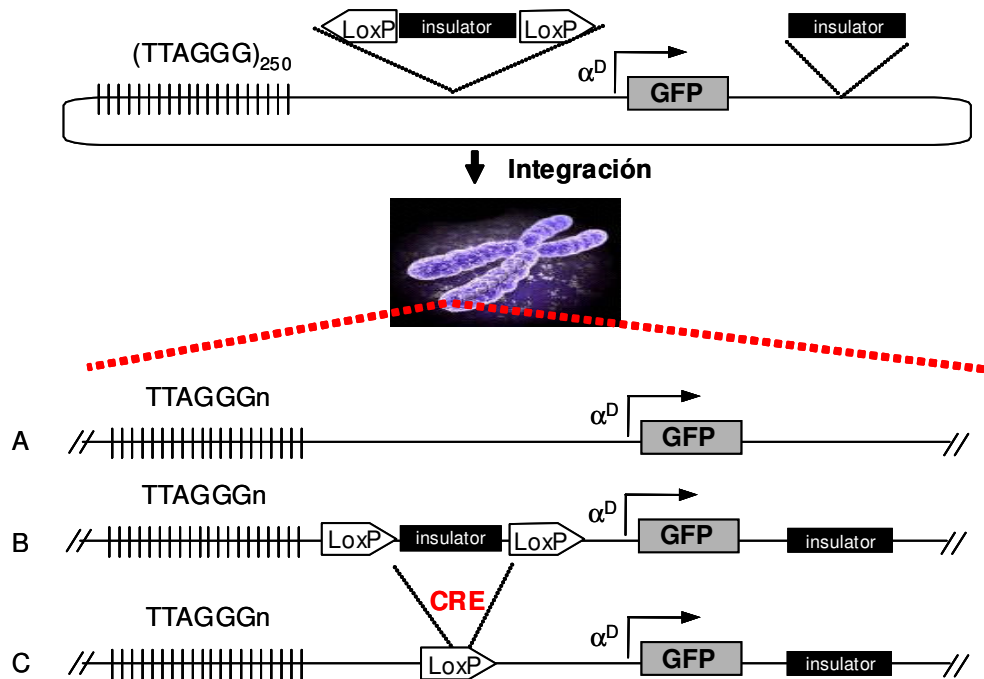
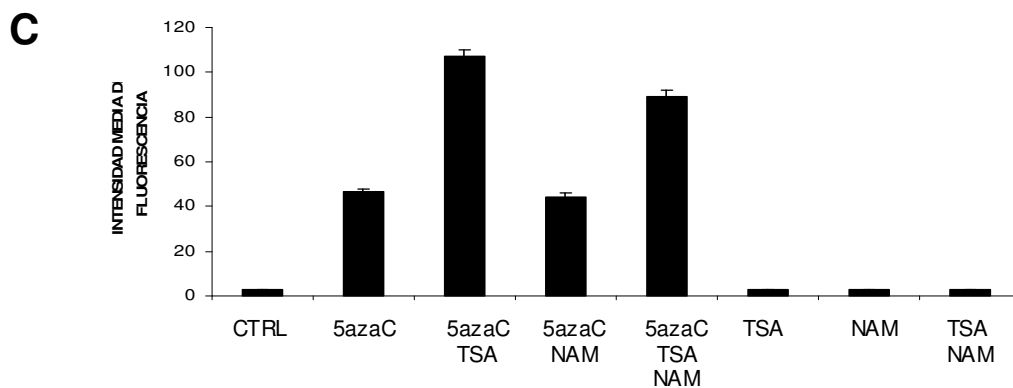
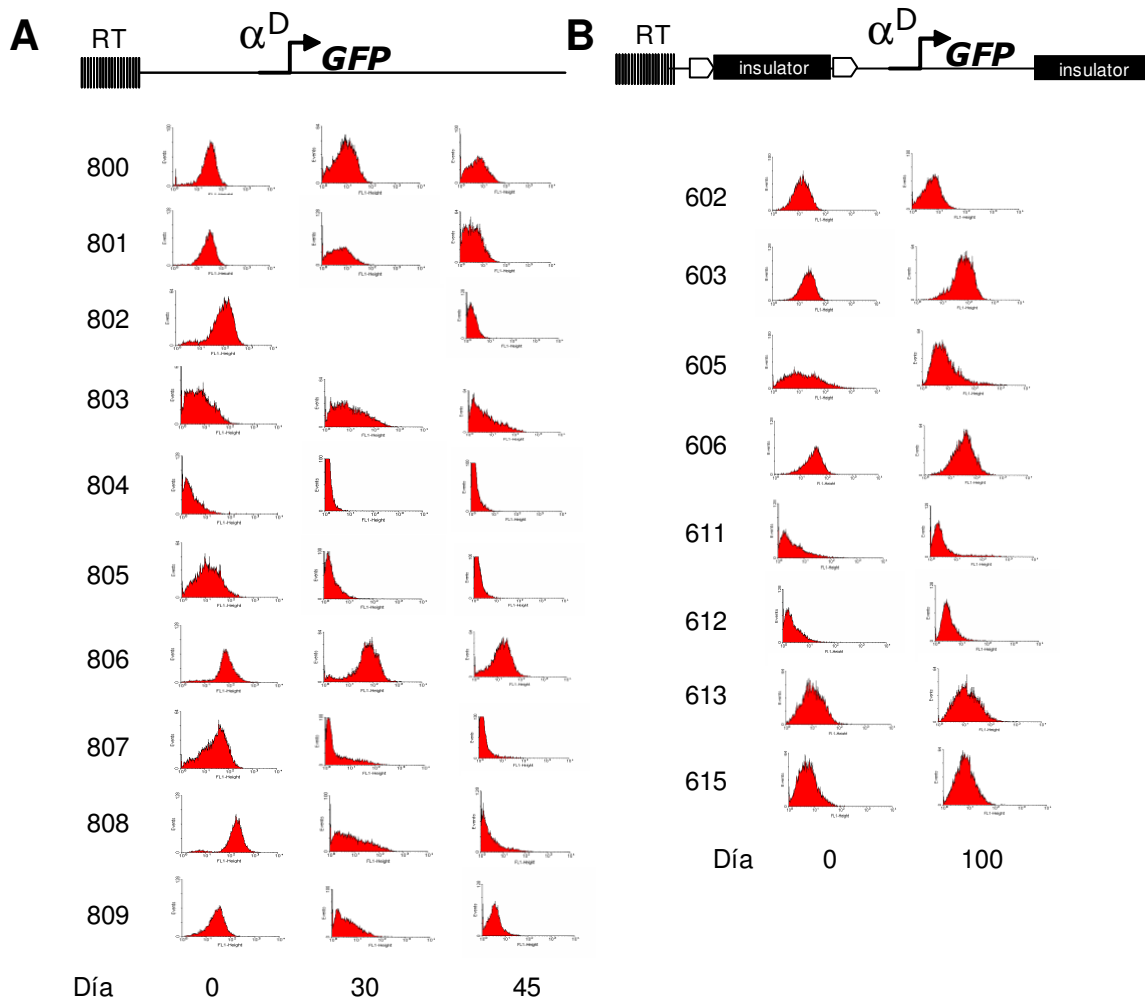


Figura 23.- Integración de un transgen en regiones teloméricas. El transgen *GFP* bajo el control del promotor α^D fue flanqueado o no con el “insulator” *cHS4*. Río arriba de dichas construcciones se clonaron 1.6 kb de secuencias teloméricas TTAGGG. La linealización de los plásmidos, transfección y selección fueron realizadas bajo las condiciones previamente establecidas en el laboratorio. Clonas estables HD3 fueron obtenidas con el fin de evaluar la expresión del transgen sin (A) o con (B) el “insulator” *cHS4* en un contexto de heterocromatina constitutiva. Cabe mencionar que la construcción protegida fue a su vez enmarcada con secuencias de recombinación *LoxP*, para eliminar al “insulator” *in vivo* ante la expresión de la recombinasa *Cre* (C).

Por su parte las clonas transfectadas con el transgen protegido con el “insulator” *cHS4* presentan niveles similares del gen reportero con respecto a la construcción no protegida con el “insulator” al inicio del experimento (día cero). Sin embargo, la incubación de dichas células por un periodo mayor a 100 días muestra que las células mantienen la expresión del transgen, lo cual sugiere que la presencia del “insulator” *cHS4* protege al transgen de los efectos de posición. Dentro de las clonas analizadas podemos detectar dos tipos de comportamientos, aquellas líneas establecidas que desde el inicio presentan un reducido nivel de expresión (Figura 24B; clona 611,612, 613 y 615) y las que expresan el transgen en nivel similares a la construcción sin protección (Figura 24B; clonas 603, 605, 606, 613 y 615). Estos resultados sugieren

que las clonas 611 y 612, podrían estar en un ambiente mas represivo o que el transgen podría haber sufrido algún daño. Nosotros apoyamos el segundo escenario, ya que el análisis por southern blot identificó que las dos clonas mencionadas presentaban una pérdida de una parte del transgen (datos no mostrados), por lo que el efecto sobre la expresión podría deberse a dicha alteración. En resumen, la presencia de secuencias repetidas TTAGGG resulta en un silenciamiento mas dramático del transgene, sin embargo, la protección del mismo con el “insulator” cHS4 permite la expresión del transgen contrarrestando los efectos de posición provocados por dichas secuencias teloméricas. Estos resultados son relevantes dado que representan el primer estudio de “insulators” asociados a secuencias de heterocromatina constitutiva.

Figura 24. El “insulator” cHS4 protege contra los efectos de posición teloméricos. Clonas transfectadas con transgenes en ausencia o presencia del “insulator” cHS4 fueron mantenidas en cultivo continuo en ausencia de antibiótico de selección hasta por 100 días y analizadas por citometría de flujo cada quince días. **A)** Las clonas sin “insulators” presentan alteraciones en los patrones de expresión durante los primeros 20-30 días, dichas clonas fueron mantenidas en cultivo hasta un periodo de 100 días, sin alteración alguna en su patrón de expresión al mostrado al día 45. **B)** Por su parte, el transgen protegido con el “insulator” cHS4 muestra que la expresión del mismo es mantenida hasta por 100 días en cultivo, sin alteración alguna en los patrones de expresión. **C)** Grafica representativa de la reactivación de la clona 805. Dicha clona fue incubada con 5-aza-2'-deoxicitidina (5azaC), Tricostatina A (TSA) y Nicotinadima (NAM). La expresión del transgen fue analizada por citometría de flujo (n=3 +/- ES).

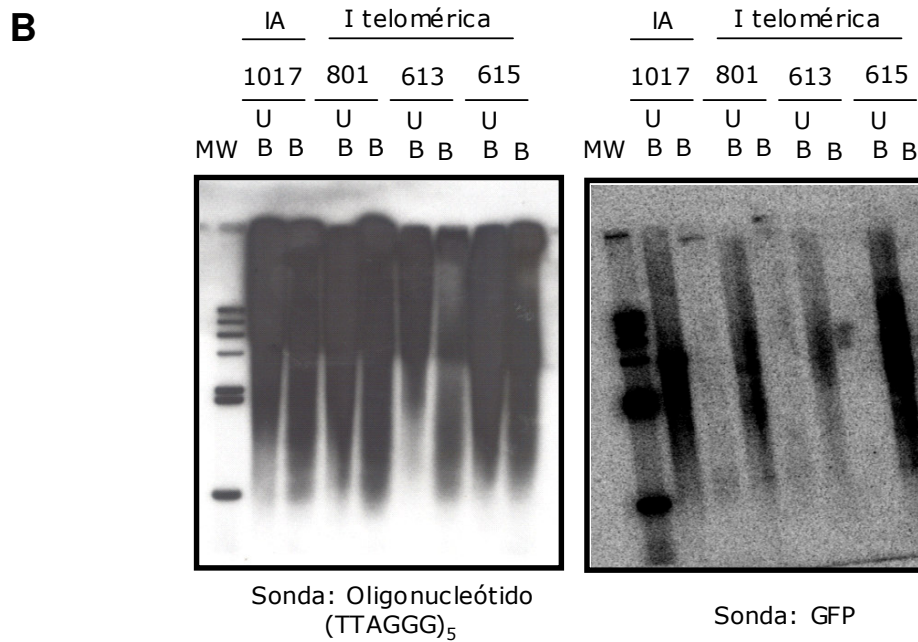
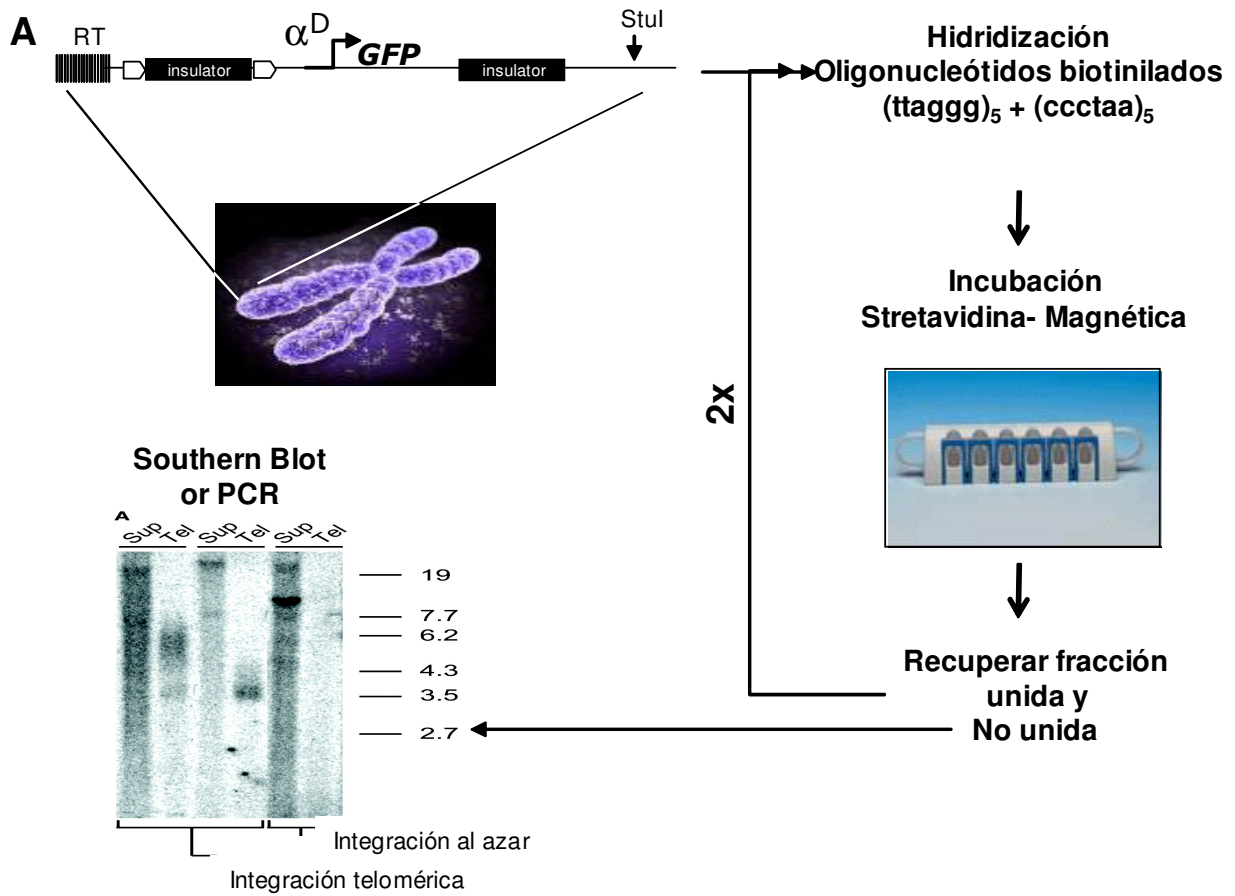


Análisis del sitio de integración en telómeros

Para verificar la integración del transgen en secuencias teloméricas se utilizó una prueba bioquímica conocida como ensayo de “Pull down” específico para secuencias teloméricas. Dicha prueba consiste en el uso de oligonucleótidos biotinilados

complementarios a las secuencias teloméricas que, mediante estreptavidina acoplada a perlas magnéticas, separan a los telómeros del resto del ADN genómico. Posteriormente, por ensayo de “Southern blot” se evalúa si la secuencia de interés (transgen) se encuentra presente en la fracción telomérica recuperada. Como control, ADN genómico de las líneas estables con el transgen protegido con el insulador cHS4 e integradas al azar fueron incorporados al estudio. Inicialmente, la membrana fue hibridada con oligonucleótidos marcados radioactivamente complementarios a las secuencias teloméricas (Figura 25B); los resultados muestran que efectivamente podemos aislar regiones teloméricas de diferentes tamaños. Al utilizar como sonda la secuencia codificante de la *GFP*, se observa que en la clona 613 presenta una señal en la fracción unida confirmando la presencia del transgen en la fracción unida a lo oligos complementarios a las repetidas teloméricas (Figura 25B). Dicha señal se observa como un barrido el cual es ocasionado por los diferentes tamaños que poseen los telómeros. Por otro lado, la clona 801 y 615 no parecen estar integradas en telómero debido a que no se observó una señal clara en la fracción unida del transgen.

Figura 25.- Análisis de la incorporación del transgen a secuencias teloméricas. A) Clonas estables transfectadas con el el transgen con (613 y 615) o sin (801) “insulators” y direccionados a regiones teloméricas, así como una clona cuya integración del transgen protegido es aleatoria. El ADN genómico fue digeridos con *Stu*I y se hibridó con oligonucleótidos (TTAGGG)₅ biotinilados. Los oligonucleótidos fueron recuperados mediante streptavidina acoplada a perlas magnética y un separador magnético, para separar la fracción telomérica (Tel) del resto del genoma (sup). **B)** Las fracciones unidas (B) y no unidas (UB) fueron separadas en un gel de agarosa al 0.8% y transferido a una membrana para su posterior análisis. Para determinar la eficiencia de la fracción unida, la membrana fue hibridada con un oligonucleótido TTAGGG marcado radioactivamente. La misma membrana fue lavada y re-hibridada con una sonda correspondiente a la secuencia codificante de la *GFP*. La clona 801 no parece estar integrada en una región telomérica.



La eficiencia de los ensayos de integración en el telómero no ha sido analizada; con base en la comunicación directa que mantuvimos con los autores que desarrollaron este sistema, se sugiere que dichos eventos de recombinación no son muy frecuentes, por lo que resulta imprescindible corroborar la integración al menos por dos estrategias diferentes. La presencia de los transgenes utilizados en regiones teloméricas está siendo confirmada por medio de hibridización *in situ* fluorescente. Dicha técnica fue aprendida durante la realización de una estancia en el laboratorio del Dr. Mark Groudine -Fred Hutchinson Cancer Research Center en Seattle, EU; durante el otoño del 2003- lo cual me permitió adquirir los conocimientos necesarios para llevar a cabo esta metodología. Dicha técnica ha sido establecida en el laboratorio y nos encontramos realizando los ensayos necesarios para corroborar los resultados ya obtenidos por los ensayos bioquímicos (Hernandez-Hernandez, A, Rincón-Arango, H. *et al*; sometido a Genetics). Hasta el momento consideramos que la línea 613 posee al transgen integrado en una región telomérica.

Marcas epigenéticas en clonas protegidas con el “insulator” cHS4 β-globina de pollo en regiones teloméricas

La actividad de los “insulators” está en gran parte mediada por modificaciones epigenéticas que modulan la estructura de la cromatina. Felsenfeld y colaboradores han demostrado que el “insulator” cHS4 es capaz de reclutar, a través del factor transcripcional USF, una serie de proteínas involucradas en modificar la cromatina. Dentro de esta maquinaria se encuentran acetiltransferasas de histonas y metiltransferasas de histonas (121, 179). Por otro lado, transgenes que carecen de la protección por parte del “insulator” son silenciados en respuesta a una desacetilación de histonas en la región y, subsecuentemente, metilación de su ADN (135). Ante este panorama, nosotros decidimos estudiar las marcas epigenéticas que se presentan en un transgen protegido con el “insulator” cHS4 e integrado en una región telomérica. Para analizar el estado de la cromatina se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, incorporando al estudio marcas de cromatina abierta: Acetilación de las histonas H3 (acH3) y H4 (acH4) y dimetilación de la lisina 4 (H3K4me2) y 79 (H3K79me2) de la histona H3; así como marcas de cromatina cerrada: trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) y lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3). La

cromatina de las líneas celulares caracterizadas fue fragmentada por sonicación en un rango de 100 a 500 pb e incubada con anticuerpos que reconocen las marcas epigenéticas ya descritas. La cromatina recuperada de la inmunoprecipitación es purificada y utilizada como templado de ensayos de PCR duplex (usando dos pares de oligonucleótidos en cada reacción de PCR). Lo anterior con la finalidad de determinar semicuantitativamente el enriquecimiento de una marca epigenética en específico sobre la región de interés respecto a una región control que carece de dichas marcas. Para las marcas de activación se amplificó como región control un fragmento de ADN de 150 pb localizada en la región de 16 kb de heterocromatina constitutiva localizada río arriba del dominio β -globina (Figura 13 y 26A). Para las marcas de cromatina cerrada se utilizó como control una región localizada 5 kb río arriba del dominio α -globina cuya organización es principalmente de eucromatina (Rebollar E y Recillas-Targa F., en preparación).

Inicialmente se analizaron las marcas de activación como la acetilación de las histonas H3 y H4, e interesantemente, las clonas 613 y 615 –cuyo transgen se encuentra en una región telomérica- presentan nula acetilación de dichas histonas, a pesar de encontrarse activo transcripcionalmente (Figura 26B). Por otro lado, las marcas H3K4me2 y H3K79me2 parecen estar presentes en el transgen, aún en ausencia de las marcas de acetilación. Además, la H3K4me2 parece estar más enriquecida respecto a la H3K79me2.

Por otro lado, analizamos marcas de cromatina cerrada características de regiones teloméricas, como la H3K9me3 y H4K20me3. Encontramos que el transgen exhibe de manera significativa el enriquecimiento de la H3K9me3, la cual esta asociada con heterocromatina constitutiva. Por otro lado, la H4K20me3 no se encuentra enriquecida sobre el transgen, lo cual podría sugerir que el “insulator” cHS4 evitó la propagación de dicha marca epigenética. En resumen, las marcas de activación y represión hasta el momento analizadas muestran que existe un programa epigenético específico para bloquear el silenciamiento de un transgen en regiones teloméricas. Lo anterior con base en que la expresión del transgen presenta marcas de cromatina abierta, principalmente metilación de histonas, aunque entre éstas no se encuentra la acetilación de histonas. Estos datos revelan que la función de protección contra efectos

de posición por parte del “insulator” cHS4 puede ser independiente del reclutamiento de acetiltransferasas de histonas en un contexto telomérico.

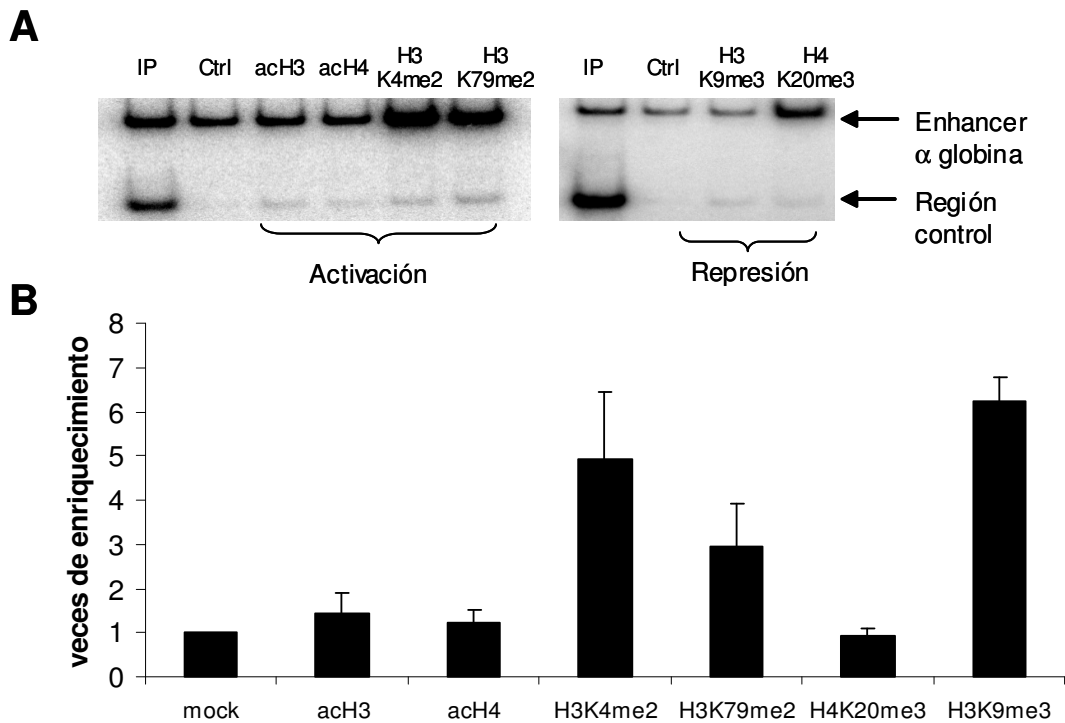


Figura 26 Modificaciones epigenéticas de la cromatina sobre el transgen enmarcado con el “insulator” cHS4 integrado en telómeros. A) Reacciones de PCR duplex fueron utilizadas para determinar semi-cuantitativamente el enriquecimiento relativo de las marcas epigenéticas bajo estudio. Las marcas de activación analizadas fueron la acetilación de las histonas H3 y H4 (acH3 y acH4, respectivamente), así como la dimetilación de la lisina 4 y 79 de la histona H3 (H3K4me2 y H3K79me2). Las marcas de cromatina cerrada analizadas se encuentran la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) y la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3) -anticuerpos donados por Thomas Jenuwein-. La señal obtenida con los anticuerpos utilizados fue evaluada respecto a un anticuerpo irrelevante (mock). **B)** Abundancia relativa de marcas epigenéticas. Gráfica mostrando el promedio de abundancia relativa de 3 ensayos de amplificación +/-ES.

12 Discusión

El estudio de elementos con actividad de barrera cromatínica, conocidos como “insulators”, es uno de los campos de mayor interés biomédico por su uso potencial en vectores con capacidad terapéutica (141). Dentro de los “insulators” más estudiados se encuentra el “insulator” cHS4 β -globina de pollo, cuyas actividades funcionales se restringen hasta el momento en su capacidad de bloquear la comunicación enhancer-promotor, así como de proteger a un transgen contra efectos de posición, esta última función es la menos estudiada debido a limitaciones técnicas. Felsenfeld y colaboradores establecieron un sistema en el que se utilizó el receptor de interleucina 2 como transgen, y cuya expresión era seguida por citometría de flujo con anticuerpos específicos. Dicho transgen, protegido o no con el “insulator” cHS4, era co-transfectado con un plásmido que proporcionará resistencia a un antibiótico. Sin embargo, dicha estrategia permitía la evaluación de sitios de integración diferentes. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un sistema para el estudio de efectos de posición con ventajas relevantes sobre el sistema previamente reportado. Nuestro sistema hace uso de un solo plásmido, el cual contiene tanto a la construcción de interés como un gen que proporciona resistencia a un antibiótico de selección. Asimismo, consideramos el uso de la proteína verde fluorescente como gen reportero, lo cual permite evaluar su expresión a nivel de una población celular por citometría de flujo sin el uso de anticuerpos. Las características de fluorescencia de la GFP permiten que a través del canal FL1 (excitación 480/emisión 530) del citómetro se pueda registrar la presencia de dicha proteína al interior de la célula. Sin embargo, cabe mencionar que nuestro sistema también impone un problema logístico al estudio de efectos de posición en células de pollo. El uso de un solo plásmido para evaluar efectos de posición, cuyo casete de resistencia a antibióticos esta bajo el control de elementos de regulación viral, podría llevar a la *trans*-activación y manutención de la expresión de un transgen sin “insulators”. Para disminuir dicho efecto, nosotros utilizamos elementos de regulación del virus SV40, el cual no es eficiente en células eritroides de pollo, pero permite la expresión necesaria del gen de resistencia para la obtención de clonas estables (Recillas-Targa, F., observaciones personales).

Dentro de los objetivos iniciales, se planteó el caracterizar elementos sensibles a efectos de posición. Para dicho fin, evaluamos la sensibilidad a efectos de posición por

elementos virales tal como el promotor/enhancer tempranos del citomegalovirus, el cual no fue sensible a efectos de posición y podía mantener la expresión del transgen por periodos largos de tiempo. El análisis de la secuencia de dicho elemento viral muestra que existen diversos sitios de unión a factores asociados con la apertura de la cromatina y de expresión ubicua, los cuales podrían proteger de marcas represivas en un contexto de cromatina. Debido a la necesidad de tener un sistema sensible a efectos de posición, decidimos evaluar elementos de regulación celulares. Ante este panorama, se evaluó la sensibilidad de elementos de regulación tejido específica contra los efectos de posición, tales como el promotor globina α^D y el enhancer 3' del dominio α -globina. Interesantemente, nuestros resultados muestran que el enhancer 3' del dominio α -globina es un elemento de regulación lo suficientemente fuerte como para aliviar la expresión de un transgen en contra de efectos de posición. Esta habilidad se encuentra en el elemento mínimo, compuesto por tres sitios de unión al factor GATA-1 intercalados con sitios Sp1 (140). GATA-1 es capaz de interaccionar con acetiltransferasas (113), y dicha interacción podría ser suficiente para proteger contra efectos de posición. Este hallazgo, aunque es novedoso para el laboratorio, no es el único, ya que elementos de regulación como regiones de control de locus (LCR), entre otros, son capaces de contrarrestar los efectos de posición (48, 91, 160). Interesantemente, el enhancer β^A/ϵ del dominio β -globina, el cual posee sitios de unión al factor GATA-1, es sensible a efectos de posición (135). Lo anterior podría ser consecuencia de la fuerza y/o capacidad que cada enhancer posee para *trans*-activar. Sin embargo hasta el momento no se han realizado experimentos para evaluar dicha hipótesis.

Ante estos resultados evaluamos la sensibilidad del promotor α^D solo, y dicha construcción resultó ser la más sensible a efectos de posición por lo que fue seleccionada para estudios posteriores (Figura 18), lo anterior con base en reactivaciones de la expresión del transgen con inhibidores de enzimas que modifican la estructura de la cromatina (Figura 19). La expresión dirigida por el promotor del gen globina adulto α^D es reducida y lo bastante sensible a efectos de posición. Interesantemente, el promotor es inactivo en su contexto endógeno en células HD3 (ver más adelante; proyecto B, patrón de expresión de los genes α -globina de pollo en cultivos primarios). Probablemente, la re-localización del promotor α^D a otras regiones

genómicas permite que la maquinaria de transcripción lo identifique, permitiendo la expresión del gen reportero asociado a éste. La protección del mencionado transgen con el “insulator” cHS4 permite aliviar los efectos de posición y mantener la expresión del mismo por periodos de hasta 100 días, corroborando los resultados publicados por Felsenfeld y cols., (135). Recientemente, se ha propuesto que la desacetilación de histonas es un proceso inicial en el silenciamiento de transgenes, para después incorporar la metilación de histonas y asegurar este proceso represivo con la metilación del ADN (121, 130, 135, 145). Nuestros resultados muestran que la inhibición de desacetilasas de histonas permite la expresión del transgen, sin embargo, la inhibición de la metilación del ADN posee efectos dominantes sobre el silenciamiento del mismo (Figura 19). La metilación del ADN asociado a un transgen parece ser un mecanismo de protección celular. El efecto funcional de dicho proceso epigenético es el de colocar un seguro estructural, como un mecanismo de defensa, a la transcripción de un gen re-localizado a otra región del genoma o en contra de ADN exógeno (46, 152).

Para abordar la pregunta relacionada a la capacidad del “insulator” cHS4 para proteger a un transgen en todos los contextos genómicos, diseñamos una serie de plásmidos que nos permitirían abordar dicho estudio (Figuras 21 y 22). Inicialmente, generamos plásmidos de transferencia, en los cuales un elemento tipo “insulator” puede ser flanqueado con secuencias de recombinación sitio específico LoxP o FRT. Posteriormente los elementos ya flanqueados son colocados río arriba y abajo del transgen sensible a efectos de posición. Estos plásmidos están siendo utilizados con otros “insulators” recientemente caracterizados en el laboratorio, con el fin de determinar si protegen contra efectos de posición.

De manera paralela, se decidió abordar con una estrategia alternativa la misma pregunta, dicha estrategia consiste en el intercambio de casetes protegidos o no con el “insulator” cHS4 dentro de una región pre-determinada del genoma. Para dicho fin, se generaron una serie de clonas estables con un transgen que permite la selección tanto positiva como negativamente. Lamentablemente, el grupo del Dr. Bode publicó un artículo en el cual se hace uso de las mismas estrategias planeadas por nosotros, para resolver las mismas preguntas (67). En dicho artículo se muestra que la eliminación, tanto río arriba y/o abajo, del “insulator” cHS4 que se encuentra protegiendo un transgen conlleva a severos efectos negativos sobre la expresión del mismo. Asimismo,

el intercambio de un transgen protegido o no con el “insulator” cHS4 mediante la técnica de RMCE en un mismo sitio de integración, permitió evaluar si en un sitio definido como de baja actividad transcripcional el “insulator” protege contra los efectos de posición cromosomales. De forma relevante, este grupo de investigación demostró que el “insulator” cHS4 permite una expresión sostenida y elevada del transgen al cual protege comparado a un transgen sin “insulators”. Aunque el “insulator” cHS4 es considerado un elemento neutro, dicho incremento en la transcripción del transgen podría ser ocasionado por la ausencia de una presión negativa sobre el transgen. Por lo tanto, la expresión resultante del transgen es la consecuencia de la actividad basal de los elementos de regulación contenidos en el transgen (67).

Ante la situación descrita decidimos enfocarnos a evaluar la capacidad del “insulator” cHS4 para proteger la expresión de un transgen contra los efectos de posición generados a partir de regiones de heterocromatina constitutiva. En levaduras y moscas se ha demostrado que la inserción de un transgen cerca de regiones teloméricas conlleva al silenciamiento del mismo de manera dependiente de desacetilasas de histonas (37). En mamíferos, recientemente, Baur *et al.*, demostraron que la inserción de repetidas teloméricas en un plásmido favorece su integración en regiones teloméricas (11). Dichos estudios corroboraron que la presencia de un transgen cerca o en secuencias teloméricas provoca un silenciamiento gradual de la expresión del mismo. Usando esa misma estrategia, enmarcamos nuestro transgen con dos copias del “insulator” cHS4 e introdujimos secuencias repetidas teloméricas a dichos plásmidos. Nuestros datos muestran que la inserción de dichas repetidas causa el silenciamiento de la expresión de manera más rápida a la de un transgen integrado sin este tipo de secuencias repetidas. Interesantemente, la incubación de las clonas silenciadas con tricostatina A no es capaz de reactivar la expresión del transgen. Por su parte, el tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina reactiva en gran medida la expresión del transgen en las clonas silenciadas, sugiriendo que la metilación del ADN es el principal responsable del silenciamiento. Lamentablemente nuestros resultados no nos permiten determinar si durante el proceso de silenciamiento existió una desacetilación de histonas, sin embargo, lo que si podemos proponer es que una vez establecida la metilación del ADN, las desacetilasas ya no son requeridas. Dichos resultados contrastan con los obtenidos con el transgen integrado sin repetidas teloméricas, en el

que la inhibición de la desacetilación de histonas juega un papel activo aun después de establecida la metilación del ADN. Nosotros creemos que estos resultados son en gran parte debidos a los sitios de integración a los cuales el transgen pudo acceder con o sin repetidas teloméricas. Reportes previos han propuesto que la metilación del ADN está asociada a una metilación de aminoácidos específicos de las histonas, en especial de la H3K9 (9, 45, 102, 112, 120, 186). Actualmente, nuestro laboratorio está interesado en analizar las marcas epigenéticas sobre los transgenes integrados en ausencia del “insulator” cHS4. Por otro lado, Blasco y cols., recientemente establecieron que la metilación del ADN en regiones subtelo­méricas es el principal factor involucrado en el silenciamiento en regiones teloméricas, evitando la recombinación entre telómeros de cromátidas hermanas, asegurando así la estabilidad del genoma (68). Por otro lado, nuestros resultados muestran que un transgen protegido con el “insulator” e integrado en regiones teloméricas no muestra una presencia significativa de histonas acetiladas, aún cuando permite la expresión del transgen. De esta manera, si no existe la necesidad de mantener histonas acetiladas para permitir la expresión del transgen protegido, tampoco se requiere la presencia de desacetilasas de histonas. Asimismo, nuestros resultados contrastan a los previamente publicados, ya que la expresión de un transgen en regiones teloméricas podía ser parcialmente recuperada por la presencia de tricostatina A (11, 130). Esta inconsistencia podría deberse a las líneas celulares y elementos de regulación usados entre dicho reporte y nuestros datos, por ejemplo: elementos virales reportados *versus* elementos celulares utilizados en nuestros estudios.

Los análisis bioquímicos de las clonas protegidas con el “insulator” cHS4 y enmarcado con secuencias teloméricas, nos permitieron encontrar dos líneas estables cuyos transgenes se encuentran integrados en las inmediaciones de una región telomérica. Interesantemente, dichas clonas presentan una baja pero mantenida expresión del transgen (Figura 24). Esta expresión puede ser causada por el aislamiento provocado por los “insulators” respecto a la cromatina, lo cual permite la expresión basal del promotor sin ser afectada por la cromatina que la rodea provocado en gran medida por la función de bloqueo de enhancer a partir del “insulator” cHS4 (139). Por otro lado, el análisis de marcas epigenéticas nos permite proponer que la capacidad del “insulator” cHS4 para proteger contra efectos de posición teloméricos

puede ser un atributo exclusivo de reclutar metiltransferasas de histonas. Lo anterior en función de que marcas de metilación de histonas asociadas a dominios activos transcripcionalmente (H3K4me2 y H3K79me2) pueden ser reclutadas al transgen integrado en regiones teloméricas, pero no así la acetilación de histonas. Estos resultados parecen contradecir los propuestos por el grupo del Dr. Felsenfeld, quien sugiere que la función de protección es consecuencia de una co-existencia entre acetil y metiltransferasas de histonas reclutadas al “insulator” cHS4 por el factor USF. Ante éste panorama, nosotros proponemos dos hipótesis:

1- Las acetiltransferasas de histonas tienen un acceso restringido a las regiones teloméricas, por lo cual el “insulator” favorece en este contexto en particular la atracción de metiltransferasas de histonas. Lo anterior aunque suficiente para proteger, reduce la probabilidad de transcripción lo cual podría ocasionar bajos nivel de la expresión del transgen. Incluso, no podemos descartar el reclutamiento de metiltransferasas de histonas distintas a las atraídas por el factor USF.

2- La protección contra efectos de posición teloméricos no requiere de la participación de acetiltransferasas de histonas, por el tipo de silenciamiento que en los telómeros se lleva a cabo. Ante cualquiera de estas dos alternativas, nuestros resultados resultan ser relevantes desde la perspectiva de que el “insulator” tiene la capacidad de “adaptarse” al ambiente genómico en el cual se ha insertado. Por otro lado, es de importancia remarcar que dicho “insulator” puede actuar en ausencia de acetilasas de histonas. Lo anterior resulta ser una propuesta totalmente novedosa ya que se ha considerado que la acetilación es un requisito indispensable para promover la transcripción génica. Recientemente, en el genoma del ratón se caracterizó que existen dominios cuya cromatina presenta metilación y acetilación de histonas co-existiendo o separadas, definiendo distintos dominios génicos (182). Por lo tanto, nuestros datos apoyan que la acetilación de histonas no es un requisito indispensable para la transcripción.

Cabe mencionar que dentro de las marcas de cromatina cerrada que analizamos se encuentra la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3). Dicha marca es abundante en regiones de heterocromatina constitutiva como son los telómeros (20). En nuestros experimentos la H3K9me3 se mantiene enriquecida significativamente sobre el cuerpo del transgen utilizado. Aunque contradictorio, dicha marca epigenética ha sido

encontrada en regiones de cromatina abierta, especialmente se ha encontrado asociada a la elongación de la transcripción (169). Lamentablemente, nuestros datos no nos permiten establecer si dicha marca es resultado de la transcripción del transgen o de una expansión de esta modificación en particular sobre el transgen, sin afectar la expresión del mismo. Aunque existen datos que relacionan la metilación de la lisina 9 con la metilación del ADN (169), hasta el momento, no conocemos el nivel de metilación del ADN del transgen en las diferentes clonas analizadas.

En resumen, la integración de un transgen en regiones teloméricas causa el silenciamiento de la expresión génica, dicho efecto puede ser contrarrestado por la presencia del “insulator” cHS4 β -globina de pollo. La protección ejercida por el “insulator” en regiones teloméricas se asocia al reclutamiento de metil-transferasas de histonas, que modifican la estructura de la cromatina, haciéndola permisible a la transcripción. Aunque la metilación del ADN es un pilar en el silenciamiento telomérico, el “insulator” y la metilación de histonas podrían estar evitando la presencia de dicha marca sobre el transgen o sobre sus elementos de regulación.

13 Conclusión

En esta primera parte del trabajo de tesis establecimos un sistema para el estudio de efectos de posición. Dicho sistema evita el uso de anticuerpos y facilita la evaluación quincenal por citometría de flujo de las clonas previamente caracterizadas. Asimismo, se desarrolló un sistema de plásmidos que permiten enmarcar elementos tipo “insulator” con secuencias de recombinación sitio específico. Lamentablemente, nuestro objetivo de estudio no pudo ser completado, debido a la publicación de una investigación similar. Sin embargo, la reciente caracterización de “insulators” en el laboratorio y el establecimiento de los protocolos básicos durante mi doctorado permitirán el estudio de los mecanismos por los cuales dichos elementos tienen la capacidad de proteger a un transgen de los efectos de posición. Nuestro sistema experimental permitió reproducir los hallazgos previamente publicados (135), tanto para transgenes protegidos o no con el “insulator” cHS4. Lo anterior nos permite validar nuestro sistema y poder emplearlo para nuevas preguntas con la finalidad de entender los mecanismos de acción de los “insulators”.

Los telómeros se caracterizan por ejercer una influencia dominante sobre la expresión de un transgen localizado en las inmediaciones del mismo, en gran parte debido a los efectos de posición provocados por la cromatina que poseen. Como un resultado inédito de este trabajo de tesis, se propone que dichos efectos de posición pueden ser satisfactoriamente aliviados por el “insulator” cHS4, a través del reclutamiento exclusivo de metiltransferasas de histonas. La ausencia de acetilación en el cuerpo del transgen protegido nos permite suponer que el reclutamiento de acetilación y metilación de histonas son eventos separables en función del contexto cromatínico en el que el transgen se haya integrado. Nuestros resultados revelan una novedosa forma en la que un “insulator” actúa diferencialmente ante el contexto cromatínico en el que se encuentre con el fin de proteger a un transgen contra los efectos de posición (**ANEXO 2**).

14 Perspectivas

En este trabajo de tesis se estableció un sistema para evaluar efectos de posición, con la idea fundamental de evaluar la protección contra dichos efectos por parte del “insulator” cHS4 β -globina de pollo. El sistema establecido hace uso de un elemento de regulación lo suficientemente fuerte para permitir la expresión del transgene asociado a éste, así como lo necesariamente sensible para evaluar efectos de posición cromosomal. Esta estrategia establecida está siendo usada en otra área del laboratorio, ya que recientemente hemos caracterizado un nuevo “insulator” localizado 12 kb río arriba del dominio α -globina. Por lo que, el establecimiento de esta estrategia está siendo redituable para el análisis de elementos que protegen contra efectos de posición.

Por otro lado, durante la búsqueda de elementos sensibles a efectos de posición, encontramos que el enhancer 3' del dominio α -globina de pollo tiene la capacidad de proteger contra los efectos de posición. Sin embargo, las entidades proteicas responsables de dicha protección no han sido establecidas. Actualmente, nuestro laboratorio se encuentra descifrando el código proteico por el cual dicho elemento es capaz de mantener una transcripción constante de un transgen de manera independiente al sitio de integración.

De manera mas específica a los hallazgos realizados en este trabajo de tesis, nos encontramos comparando las marcas epigenética de transgenes protegidos con el “insulator” cHS4 de pollo pero integrados al azar en el genoma de pollo. Lo anterior con la idea de establecer la marcas epigenéticas reclutadas por dicho “insulator” en una región telomérica respecto a una integración al azar. Asimismo, como un control alterno, marcas epigenéticas sobre cromatina de clonas transfectadas con un transgen sin “insulators” integrado en el telómero están siendo evaluadas. Al final, nos gustaría tener un panorama sobre qué marcas epigenéticas son reclutadas por el “insulator” cHS4 dependiendo del contexto y si éstas son también reclutadas por otros elementos tipo “insulator”. Por otro lado, hemos iniciado los experimentos de sobre-expresión de la recombinasa CRE en las clonas obtenidas, con el fin de eliminar *in vivo* al “insulator” cHS4 de regiones teloméricas. Lo anterior con el objetivo de obtener la evidencia definitiva sobre la protección contra efectos de posición por parte del “insulator” cHS4 del dominio β -globina de pollo.

En general, estos resultados han abierto un nuevo panorama, y por lo tanto nuevas preguntas para nuestro laboratorio, sobre los mecanismos que utiliza el “insulator” cHS4 para proteger a un transgen contra los efectos de posición, especialmente de los efectos de posición ejercidos por los telómeros.

2ª Parte

Regulación genética y epigenética de los genes del dominio α -globina de pollo.

Como se planteó en un inicio, este trabajo de tesis también se centró en el estudio de la regulación transcripcional a nivel local. Nuestro laboratorio ha estado interesado durante los últimos 6 años en entender los mecanismos que regulan la expresión en tiempo y espacio de los genes α -globina de pollo durante el desarrollo y diferenciación eritroide. Interesantemente, la organización de dichos genes posee diferencias significativas respecto al dominio β -globina. Ante este panorama, hemos cuestionado si muchos de los mecanismos hasta el momento establecidos son compartidos por el dominio α -globina de pollo. Nuestros resultados muestran que los genes α -globina están regulados por factores ubicuos y tejido específicos similares a los usados por los genes β -globina, sin embargo los mecanismos de acción reflejan diferencias significativas no descritas para ninguno de los dominios globina.

15 Planteamiento del problema

La información codificada dentro del dominio está regulada finamente por una serie de mecanismos genéticos y epigenéticos. Dentro de la regulación a nivel local, el dominio β -globina de pollo ha sido usado como base para proponer varios modelos sobre como funcionan los elementos de regulación a distancia. Por su parte, el dominio α -globina de pollo no ha sido estudiado con tanto detalle, interesantemente, su arquitectura y organización muestran marcadas diferencias respecto al dominio β -globina, como por ejemplo: la localización del enhancer río abajo de los genes que componen el dominio. La organización de dicho elemento de regulación muestra ser más compleja de lo que inicialmente se consideró, y cuya relevancia funcional no ha sido aún claramente estudiada. Dichos mecanismos aunque fueron parcialmente abordados en el dominio β -globina no han sido estudiados en el dominio α -globina de pollo.

16 Hipótesis

El dominio α -globina está compuesto por tres genes cuya expresión está regulada durante el desarrollo y diferenciación eritroide de pollo. Los mecanismos que gobiernan dicha regulación tienen un componente genético constituido por un elemento potenciador localizado río abajo del dominio, además de las secuencias promotoras de cada uno de los genes. El enhancer, inicialmente caracterizado como una región compuesta por tres sitios GATA-1, tiene un elevado grado de similitud en las regiones aledañas al compararlo entre pollo y pato, especialmente dentro de la región río abajo. Análisis *in vitro* permitieron establecer que dicha región homóloga posee la habilidad de unir factores de transcripción, sin embargo su función *in vivo* no ha sido establecida (163). Nosotros proponemos que dicha región forma parte del enhancer previamente descrito aunque sus funciones no han sido claramente definidas.

Asimismo, los elementos de regulación (proximales y distales) utilizan mecanismos epigenéticos para activar la transcripción. Lo anterior con base en evidencia que muestra que el gen π , probable blanco del enhancer, se encuentra metilado a nivel del ADN. Por lo que mecanismos epigenéticos más complejos deben de constituir una parte fundamental de la regulación del dominio α -globina de pollo.

17 Objetivo General

Estudiar la regulación de los genes α -globina de pollo durante el desarrollo y la diferenciación eritroide.

17.1 Objetivos Particulares

Determinar los niveles de expresión de los genes α -globina de pollo.

Evaluar la funcionalidad del fragmento de ADN de 120 pb que colinda con el elemento mínimo del enhancer.

Caracterizar a los factores transcripcionales involucrados en la expresión de los genes α -globina por los diferentes elementos de regulación en *cis* –promotores y enhancer-.

Analizar la participación de la cromatina en la activación transcripcional realizada por el enhancer α -globina de pollo.

18 Resultados

Evaluación de los niveles de expresión de los genes α -globina en cultivos primarios y líneas celulares transformadas de pollo

Los genes globina son familias multigénicas cuya expresión es regulada a lo largo del desarrollo y de la diferenciación (Figura 27A). Durante el desarrollo del pollo, el linaje eritroride embrionario o primitivo aparece en la circulación a partir de 4^º día posterior a la fecundación. Durante esta etapa, se ha reportado que los eritrocitos expresan el gen embrionario π , así como a los genes adultos α^D y α^A (52). Durante los días 6-7 posteriores a la fecundación, el linaje adulto inicia de manera específica la transcripción de los genes adultos α^D y α^A (52). Con base en estos antecedentes nos propusimos abordar el análisis de la expresión de los genes α -globina por medio de RT-PCR. Sin embargo, los resultados obtenidos daban evidencia de que durante todas las etapas del desarrollo los tres genes α -globina se expresan. Ante esto, decidimos establecer un sistema de RT-PCR semicuantitativo para el análisis de la expresión de los genes en cuestión. Dicho sistema se basa en la síntesis de ADNc con el uso exclusivo de un oligonucleótido dT. Posteriormente, el ADNc es adicionado a una reacción de PCR duplex radiactiva, para amplificar el gen de interés junto a un gen de expresión constitutiva, con el fin de normalizar la expresión dentro de la misma reacción. De esta forma, evaluamos la expresión de los genes α -globina en cultivos primarios para determinar la expresión de los genes de interés durante el desarrollo. Para el estudio de la diferenciación, utilizamos una serie de líneas celulares arrestadas en diferentes etapas de la diferenciación eritroide adulta, incluyendo a la línea HD24 (precursor mieloide-eritroide), 6C2 (pre-eritroblasto en un estado de unidad formadora de colonia, CFU-E), HD3 (eritroblasto), así como la línea linfoide DT40, como control negativo.

Nuestros resultados muestran que los genes globina se expresan diferencialmente durante el desarrollo. El gen embrionario π se puede detectar de manera abundante en eritrocitos de 5 días, posteriormente su expresión decae conforme se avanza en el desarrollo (Figura 27B). Por su lado, los genes adultos se expresan de manera basal en eritrocitos de 5 días, y sus niveles se incrementan a partir del 7^º día. Dichos genes alcanzan sus niveles más elevados de expresión alrededor del día 10 (Figura 27B), y este patrón de expresión se mantiene durante el resto de la vida

del pollo (73). Nuestros resultados discrepan de lo previamente reportado, mostrando de manera clara que durante las etapas embrionarias la expresión del gen π se ve favorecida. Alrededor del 6^º día post-fecundación, los eritrocitos en circulación realizan el intercambio de genes globina embrionarios por los genes adultos, cuya expresión se mantiene por el resto del desarrollo. Este recambio se presenta en el dominio α -globina de manera similar a lo reportado por el dominio β -globina (12, 72).

Para determinar la expresión de los genes α -globina durante la diferenciación, los transcritos del dominio α -globina fueron analizados en líneas celulares que mimetizan la diferenciación eritroide adulta (16-18, 69). En otras palabras, estas líneas celulares están comprometidas a un linaje eritroide adulto por lo que su patrón de expresión al final de la diferenciación se espera muy similar al observado en eritrocitos de 10 días. Curiosamente, todos los precursores eritroides analizados presentan niveles basales de los genes π , α^D y α^A (Figura 27C). Por otro lado, la línea DT40 muestra una nula expresión de los genes globina, lo cual correlaciona con su origen linfóide y valida nuestro ensayo. En resumen, las líneas celulares analizadas muestran niveles reducidos de los genes α -globina, sin poder observarse diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión de cada uno de los genes (Figura 27).

En conclusión, nuestros resultados contribuyen una nueva visión de la expresión de los genes α -globina de pollo, ya que en etapas embrionarias, el gen π es el principal gen α -globina expresado, para un subsecuente recambio por los genes adultos. En nuestro sistema de estudio, hacemos uso de líneas celulares que mimetizan la diferenciación eritroide adulta. La expresión de los genes globina se presenta en las etapas finales de la diferenciación, ya que en etapas tempranas la expresión de los genes es casi nula. Lamentablemente, la falta de un sistema similar para el estudio de la diferenciación eritroide embrionaria no nos permite establecer si este proceso es similar durante la diferenciación eritroide embrionaria o primitiva.

Trans-activación de los promotores α -globina por el enhancer del dominio

El dominio α -globina, a diferencia del dominio β -globina, posee dos elementos de regulación río abajo de los genes que constituyen el dominio, y que corresponden a un elemento de regulación tipo silenciador y a un enhancer (140). Este último fue caracterizado como una región de 250 pb las cuales contienen 3 sitios de unión al factor

eritroide específico GATA-1. Sin embargo, la comparación de las secuencias de la región del enhancer entre pollo y pato permitió caracterizar una región de 120 pb río abajo del enhancer, la cual incorpora secuencias putativas de unión para factores eritroide específicos, tales como: sitios de unión para EKLF/Sp1, sitios de reconocimiento a proteínas de la familia Maf (NF-E2), y un cuarto sitio de unión al factor GATA-1 (Figuras 16 y 28). Aunque en ensayos *in vitro* dichos sitios tienen la capacidad de unir proteínas, la relevancia funcional de los mismos no se ha establecido. Del mismo modo, la especificidad del enhancer 3' por cada uno de los promotores α -globina no había sido establecida y creemos que dicha especificidad debe ser relevante durante el desarrollo y diferenciación eritroide (140).

Como un primer acercamiento, decidimos evaluar la capacidad de *trans*-activación del enhancer α -globina sobre los tres diferentes promotores del dominio, en presencia y ausencia del fragmento de 120 pb. Para dicho fin, se clonaron cada uno de los promotores α -globina a partir de ADN genómico de pollo y se construyeron un conjunto de plásmidos que expresan al gen reportero de la luciferasa bajo el control de cada uno de los promotores, solos, en presencia del elemento mínimo del enhancer, o con el elemento mínimo más el fragmento de ADN de 120 pb (Figura 28A). Estas construcciones fueron transfectadas transitoriamente en los distintos cultivos primarios y líneas celulares para evaluar su capacidad para ser *trans*-activados durante el desarrollo y la diferenciación. Los resultados obtenidos muestran que el promotor π puede ser *trans*-activado tanto en eritrocitos de 5 como de 10 días (Figura 28B). Curiosamente este mismo promotor es *trans*-activado en todas las líneas precursores eritroides, a pesar de su compromiso hacia eritrocitos adultos al final de su diferenciación. En resumen, el gen embrionario es *trans*-activado en todos los tejidos eritroides sin importar el estado de diferenciación y desarrollo.

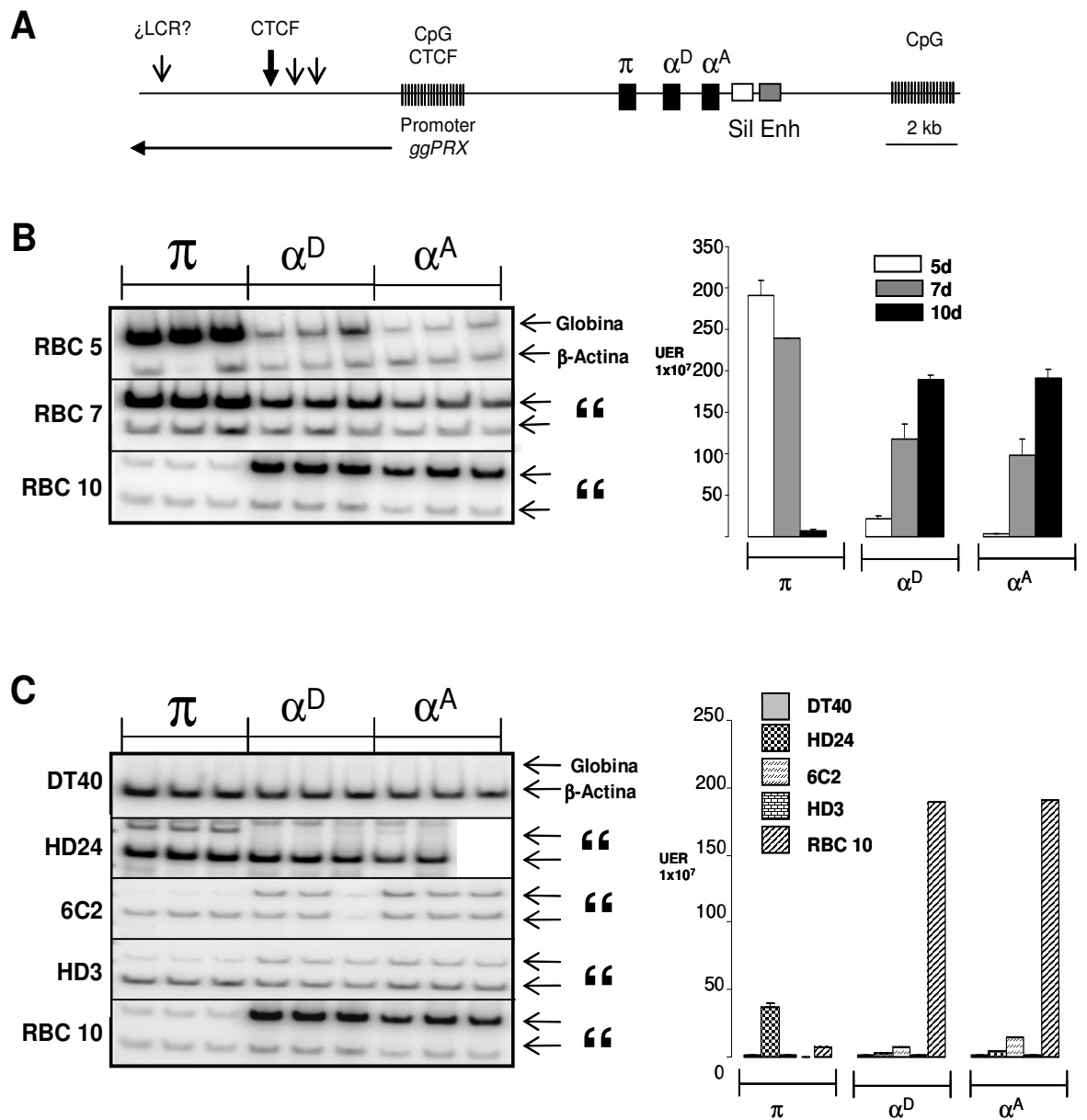


Figura 27.- Expresión de genes α -globina durante el desarrollo y diferenciación eritroide. A) Esquema del dominio α -globina de pollo. Se muestran los tres genes que constituyen al dominio, el gen embrionario π y los genes adultos α^D y α^A , así como los principales elementos estructurales hasta el momento caracterizados (ver introducción). **B)** Expresión de genes α -globina durante el desarrollo por RT-PCR duplex. El RNA mensajero fue obtenido de cultivos primarios de eritrocitos de pollo de 5, 7 y 10 días posteriores a la fecundación. Oligonucleótidos diseñados en los sitios de empalme de los exones 2 y 3 de los genes embrionarios y adultos fueron utilizados para amplificar RNA mensajero maduro, excluyendo posibles contaminaciones genómicas. Se utilizó como control de amplificación el primer exón del gen para la β -actina. Se muestran 3 reacciones de PCR por cada gen analizado, especificando que de 2 a 3 reacciones de transcripción reversa independientes fueron realizadas. La señal obtenida fue normalizada con la amplificación del transcrito de β -actina y graficada como unidades de expresión relativa (UER) \pm ES. **C)** Expresión de genes α -globina en líneas celulares arrestadas en diferentes etapas de la diferenciación eritroide. Se muestra gel con las mismas especificaciones de (B), así como los resultados de la expresión graficados \pm ES. En dicha grafica se utilizó la señal obtenida para eritrocitos de 10 días para comparar los niveles de expresión basal obtenida en dichas líneas celulares.

Por su parte, los genes adultos son *trans*-activados por el enhancer α -globina exclusivamente en un ambiente diferenciado sin importar el grado del desarrollo (Figura 28B). Interesantemente, el enhancer no activa la transcripción de los promotores adultos en los precursores eritroides (líneas celulares) aún cuando dichas células están comprometidas a la expresión de los genes adultos. Lo anterior sugiere que algún componente dentro de los promotores adultos se encuentra presente de manera exclusiva en un ambiente diferenciado (eritrocito). Asimismo, con estos resultados no podemos discriminar si la regulación diferencial proviene del enhancer o de la combinatoria de éste con los promotores adultos (ver más adelante).

Por otro lado, la adición del fragmento de ADN de 120 pb al elemento mínimo tiene un efecto antagónico de acuerdo al ambiente celular en el que se encuentre. En eritrocitos de 5 días, el fragmento de ADN de 120 pb parece tener un efecto potenciador sobre la función del enhancer, sin embargo, en eritrocitos de 10 el mismo fragmento de ADN tiene un efecto modulador sobre el enhancer (Figura 28B). En precursores eritroides no parece haber un efecto claro, al menos en las construcciones bajo el control del promotor π , ya que los genes adultos no son activos en dicho contexto celular. Estos resultados sugieren el reclutamiento de una combinatoria proteica diferencial sobre el fragmento de 120 pb de acuerdo al estado de desarrollo en el que un eritrocito se encuentre.

En conclusión, la capacidad de *trans*-activación del enhancer 3' sobre los promotores α -globina varía de manera dependiente al estado del desarrollo y diferenciación. Sin embargo, el promotor embrionario π parece ser más susceptible a ser *trans*-activado durante cualquier estado eritroide, diferenciado o no. Por su parte, el efecto del enhancer sobre los promotores adultos depende una completa diferenciación para su consecuente activación transcripcional. El fragmento de 120 pb juega un papel en la modulación de la *trans*-activación solo en etapas adultas, sin embargo en etapas embrionarias parece potenciar aún más la transcripción. En resumen y como resultado relevante, la especificidad del enhancer 3' para *trans*-activar los promotores α -globina es diferencial, con una preferencia especial por el promotor embrionario π .

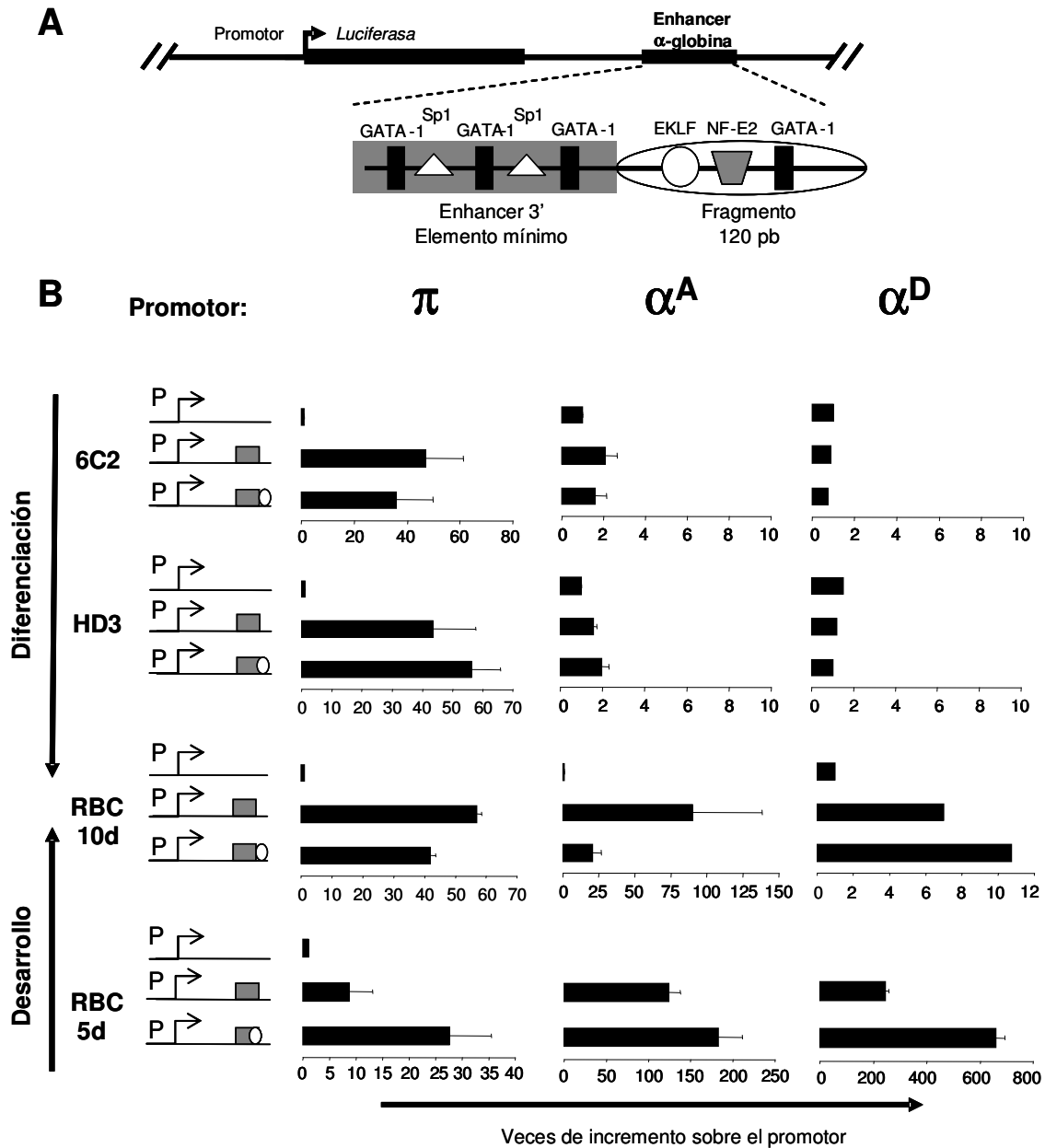


Figura 28.- Ensayos de *trans*-activación de promotores α -globina durante la diferenciación y el desarrollo. **A)** Los promotores α -globina fueron introducidos en plásmido pGL3 basic, solos o junto con el enhancer 3' del dominio α -globina. Este enhancer fue utilizado tanto con su elemento mínimo (cuadrado gris) o junto al fragmento de 120 pb localizado río abajo del mismo el cual contiene sitios de unión a los factores EKL1, NF-E2 y GATA-1. **B)** Los plásmidos con los promotores globina π , α^D o α^A y con las diferentes versiones del enhancer 3' ya descritos fueron transfectados transitoriamente en células 6C2, HD3 y eritrocitos de 10 días (RBC 10d) para mimetizar la diferenciación eritroide. Por otro lado, eritrocitos de 5 días (RBC 5d) fueron transfectados con las mismas construcciones y comparadas a RBC 10d para evaluar el efecto del desarrollo sobre las diferentes construcciones analizadas. Se muestran graficas representativas de 3 transfecciones independientes realizadas por triplicado cada una. Se muestran las veces de incremento respecto al promotor usado +/- ES.

El fragmento de ADN de 120 pb modula la función del enhancer α -globina

Los resultados obtenidos durante las transfecciones transitorias nos permitieron observar que el fragmento de 120 pb, localizado río debajo de los tres sitios GATA-1, muestra un efecto antagónico sobre la capacidad de *trans*-activar del enhancer dependiente de la etapa del desarrollo. Sin embargo, dicha *trans*-activación no parece efectuarse sobre los promotores adultos en precursores eritroides. El incremento de GATA-1 durante la diferenciación eritroide ha sido bien documentado, por lo que la abundancia de la proteína podría ser un factor determinante, aunque no el único (5, 30, 185). Para evaluar si los niveles de GATA-1 son responsables de esta falta de potenciación por el enhancer α -globina, evaluamos el efecto de la sobre-expresión del factor GATA-1 sobre la modulación de la actividad del enhancer ejercida por el fragmento de 120 pb. Para dicho fin, co-transfectamos pre-eritroblastos (línea 6C2) con los plásmidos que contienen el promotor α^D y las diferentes combinaciones con concentraciones crecientes del plásmido que contiene el ADNc para GATA-1. Los resultados muestran que la sobre-expresión de GATA-1 no tiene efecto alguno sobre el promotor α^D , pero en presencia del elemento mínimo del enhancer se observa una clara *trans*-activación del gen reportero (Figura 29). Interesantemente, la incorporación del fragmento de 120 pb al enhancer evita que dicha *trans*-activación dependiente de GATA-1 se lleve a cabo en células 6C2 (Figura 29). En su conjunto, estos resultados sugieren que los niveles de GATA-1 pueden ser un factor importante en la *trans*-activación de promotores adultos, sin embargo, el fragmento de 120 pb ejerce un efecto modulador sobre la función del potenciador.

GATA-1 y YY1 modulan la actividad del enhancer de manera específica durante la diferenciación eritroide.

La capacidad de GATA-1 para activar la función del enhancer nos permite suponer que dicho factor juega un papel importante en la regulación de los genes α -globina durante la diferenciación. Asimismo, en la primera parte de esta tesis nos abocamos a la búsqueda de elementos sensibles a efectos de posición, encontrando que la mutación del sitio GATA-1 contenido en el fragmento de ADN de 120 pb incrementa la *trans*-activación del enhancer sobre el promotor α^D , sugiriendo que dicho sitio actúa como un modulador (Figura 20). Estos efectos nos motivaron a evaluar las

secuencias aledañas al sitio de unión de GATA-1 en el fragmento de ADN de 120 pb. Dicha búsqueda nos permitió detectar que la secuencia colindante al cuarto sitio GATA-1 posee una secuencia homóloga a la secuencia de unión al factor Ying Yang 1 (YY1, Figura 30A). El factor YY1 es ampliamente reconocido por su actividad bimodal (activador y represor) sobre la transcripción. Para determinar si los sitios de unión a los factores GATA-1 y YY1 tienen una actividad funcional, ambos sitios fueron mutados y su efecto fue evaluado en transfecciones transitorias.

Los resultados muestran que la eliminación de los sitios GATA-1 y YY1 en el fragmento de ADN de 120 pb permite recuperar la *trans*-activación ejercida por el elemento mínimo del enhancer (Figura 30B), por lo que proponemos que la modulación de la *trans*-activación esta mediada en gran parte por dichos factores transcripcionales. Para confirmar estos resultados, se decidió sobreexpresar al factor YY1, a través de la co-transfección de un plásmido que contiene el ADNc de dicho factor junto con las construcciones ya descritas, lo anterior se realizó tanto en células 6C2 como en eritrocitos de 10 días (RBC 10d).

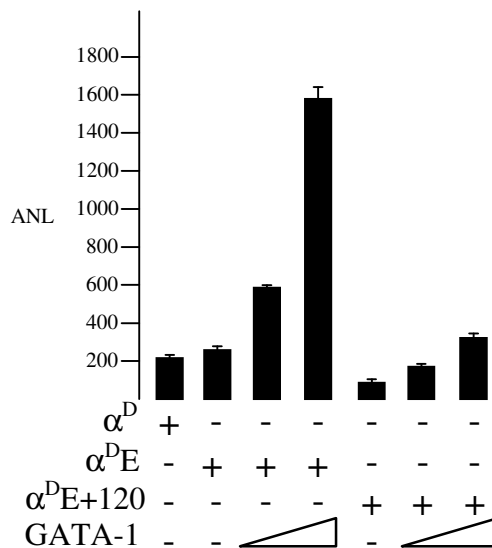


Figura 29.- *Trans*-activación del promotor adulto por el enhancer α -globina mediante la sobreexpresión de GATA-1. Concentraciones crecientes (1 y 2 μ g) del cDNA de GATA-1 fueron co-transfectados transitoriamente en células 6C2 junto con los plásmidos controlados por el promotor adulto α^D solo, o junto con las dos variantes ya descritas del enhancer α -globina ($\alpha^D E$ o $\alpha^D E+120$). Se muestra el promedio actividad normalizada de luciferasa (ANL) de 3 transfecciones independientes realizadas por triplicado +/- ES (Rincón-Arango, H et al 2005; anexo 2).

Interesantemente, la sobreexpresión del factor YY1 en presencia del enhancer más el fragmento de 120 pb ($\alpha^D E+120$) provoca una reducción de la *trans*-activación (Figura 30C). Asimismo, el incremento en los niveles de YY1 produjo un efecto negativo sobre la *trans*-activación del elemento mínimo del enhancer ($\alpha^D E$), aún cuando no se ha demostrado la presencia del factor sobre este elemento de regulación. Este efecto negativo se observó en las dos etapas de la diferenciación analizadas, apoyando el hecho de que dicha regulación negativa es independiente del estado de diferenciación eritroide. En conclusión, nuestros resultados sugieren que YY1 tiene un efecto de modulador negativo sobre la función del enhancer, aún en ausencia del sitio de unión para dicho factor, sugiriendo también una unión basada en interacciones proteína-proteína. Por lo tanto demostramos que YY1 es un componente peptídico reclutado al fragmento de ADN de 120 pb, cuya finalidad es la de modular la función del enhancer 3' α -globina de pollo.

GATA-1 y YY1 interactúan para modular la función del enhancer.

La cercanía entre los sitios de unión a los factores GATA-1 y YY1, así como el efecto modulador que ambos factores poseen sobre la función del enhancer en presencia o ausencia del fragmento de 120 pb, nos permiten cuestionar si dichos factores interactúan físicamente entre sí. Ante esto, ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas fueron realizados utilizando extractos totales de células precursoras eritroides de pollo (6C2 y HD3), eritrocitos maduros (RBC), células eritroleucémicas de humano (K562) y como control una línea celular fibroblástica de codorniz QT6. Anticuerpos contra los factores GATA-1 y YY1 fueron utilizados y los complejos asociados fueron detectados por inmunoblot. La inmunoprecipitación de GATA-1 y la subsiguiente identificación del factor YY1 permite demostrar que ambas proteínas se asocian (Figura 31). El uso inverso de los anticuerpos nos permitió corroborar lo anterior, ya que la inmunoprecipitación del factor YY1 permite identificar a GATA-1 dentro de las proteínas asociadas a éste factor (Figura 31). Para confirmar dicha interacción, se construyó una proteína de fusión con la secuencia codificante del factor YY1 y de la proteína glutatión-S-transferasa (GST), con el fin de realizar ensayos de "Pull Down". La proteína de fusión fue producida en *E. coli* (cepa pBL21 Lys) y purificada de acuerdo a los procedimientos estándar, posteriormente fue incubada con

extractos proteicos totales de precursores eritroides y de las líneas control ya mencionadas. Los resultados muestran que la incubación de la proteína de fusión con los diferentes extractos permite identificar una asociación (directa o indirecta) con el factor GATA-1. Dicha asociación no se observa en la línea fibroblástica, confirmando que la asociación detectada es específica del tejido eritroide. Estos resultados sugieren que GATA-1 y YY1 pueden interactuar entre sí, y con base en los resultados de transfecciones transitorias (Figura 29), nosotros proponemos que dicha interacción es necesaria para la modulación del enhancer 3' del dominio α -globina de pollo.

A pesar de haber demostrado la asociación entre GATA-1 y YY1, nuestros datos no aseguran que dicha interacción ocurra *in vivo*. Para determinar si GATA-1 y YY1 interaccionan con sus sitios de unión *in vivo*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina sobre precursores eritroides y eritrocitos maduros, y se utilizó la línea DT-40 como control negativo. La región que cubre las 120 pb localizadas río abajo del enhancer 3' puede ser amplificada a partir de la fracción unida por los anticuerpos que reconocen a los factores GATA-1 y YY1, lo anterior se observa tanto en precursores eritroides como en eritrocitos (Figura 31C). Dicha interacción *in vivo* no se logra observar en la línea linfóide DT-40, así como con el uso de un anticuerpo irrelevante, lo cual valida la especificidad del ensayo.

Para confirmar esta interacción *in vivo* y determinar si la dinámica de asociación es dependiente del estado de diferenciación, se evaluó la co-existencia de ambas proteínas dentro del fragmento de 120 pb al mismo tiempo. Para contestar dicha pregunta se realizaron ensayos de ReChIP. Éste ensayo se basa en la inmunoprecipitación inicial de una proteína de interés asociada a la cromatina, la subsecuente eliminación del primer anticuerpo y una segunda ronda de inmunoprecipitación con el anticuerpo que reconoce al factor presumiblemente asociado a la proteína de interés. Finalmente, el ADN recuperado de la segunda inmunoprecipitación es usado en ensayos de PCR. Para esta metodología, la cromatina de pre-eritroblastos y eritrocitos, fue incubada inicialmente con el anticuerpo contra GATA-1 y posteriormente con el anticuerpo contra YY1. Interesantemente, la amplificación de la región de interés muestra que dichas proteínas co-existen en la región de 120 pb solo en un contexto diferenciado (RBC), pero no así en los precursores eritroides (Figura 31D).

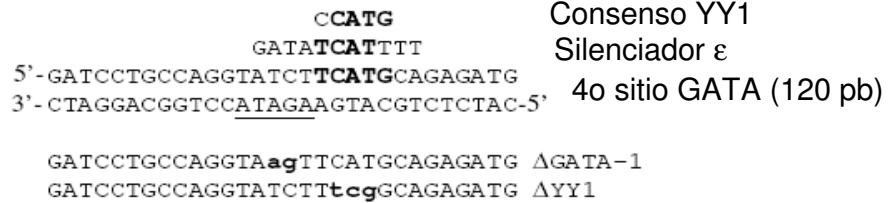
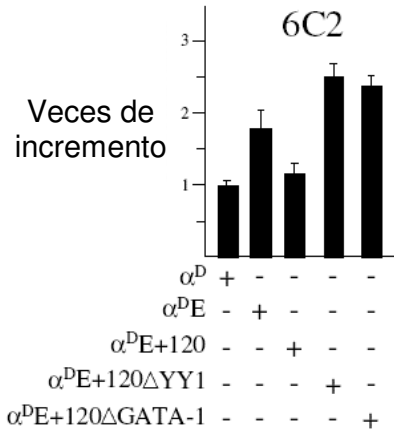
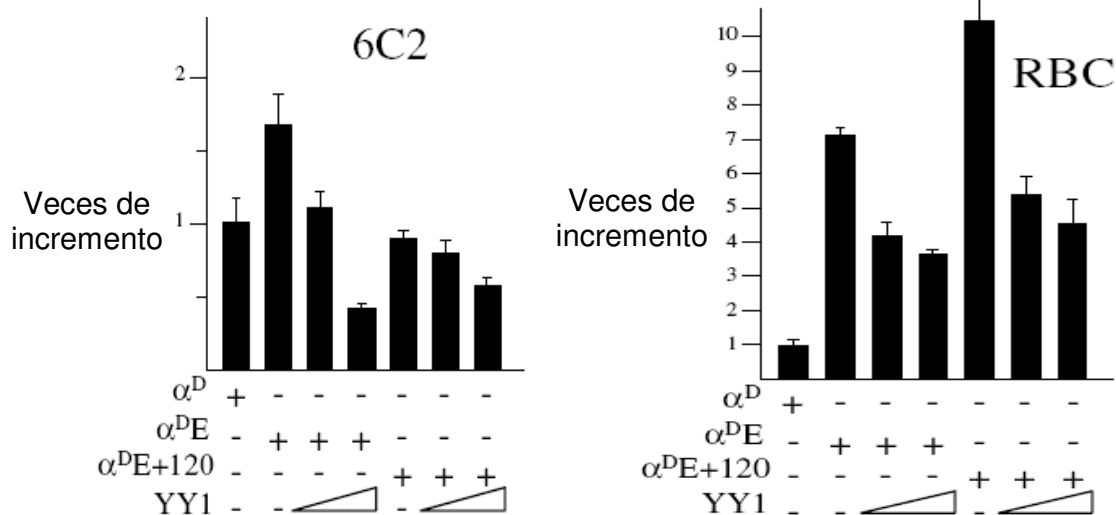
A**B****C**

Figura 30.- Modulación de la función del enhancer α -globina por los factores GATA-1 y YY1. **A)** Alineamiento del sitio de unión GATA-1 y secuencias aledañas dentro del fragmento de 120 pb con secuencias de unión al factor YY1 –consenso (CCATG) y Silenciador ε (TCAT)-. Este alineamiento permite identificar la secuencia TCATG localizada inmediatamente río abajo del sitio GATA-1 (marcada con una línea negra). Se muestran las mutaciones diseñadas sobre el sitio de unión al factor GATA-1 (Δ GATA-1) y al factor YY1 (Δ YY1) dentro de la secuencia de 120 pb. **B)** Transfección transitoria en pre-eritroblastos (línea 6C2) de las construcciones que contienen al promotor α^D solo o junto con las diferentes versiones del enhancer, incluyendo las mutaciones para los sitios GATA-1 y YY1. Se muestra el promedio de las veces de incremento, respecto al promotor α^D , de tres transfecciones +/- ES. **C)** Sobre-expresión del factor YY1 en pre-eritroblastos (línea 6C2) y eritrocitos maduros de 10 días (RBC). Las células fueron co-transfectadas transitoriamente con cantidades crecientes (2 y 4 μ g) del ADNc del factor YY1 junto con los plásmidos ya descritos (α^D , α^{DE} , α^{DE+120}). Se muestra el promedio de las veces de incremento, respecto al promotor α^D , de tres transfecciones independientes +/- ES.

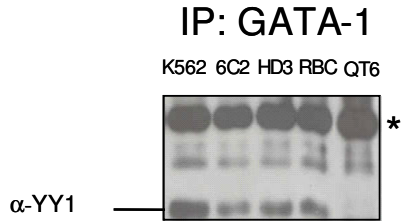
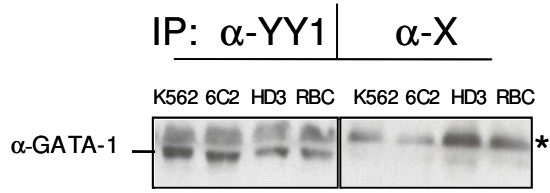
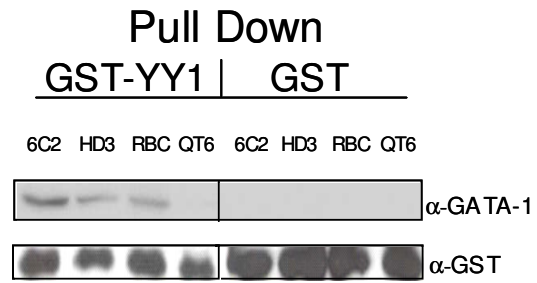
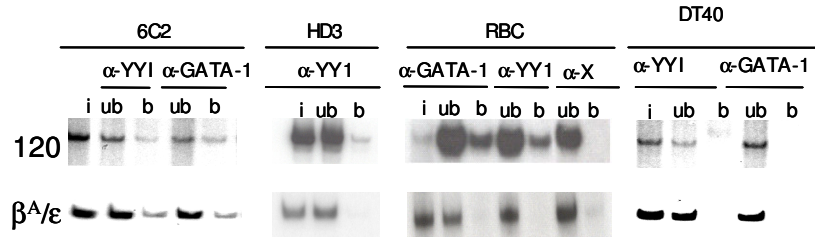
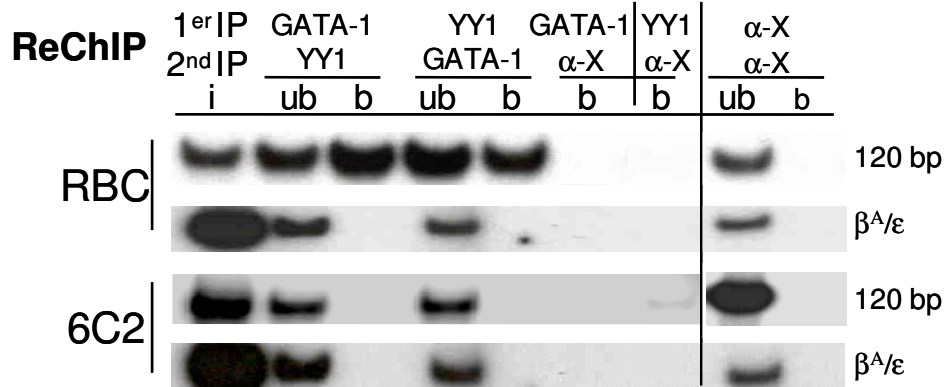
Dicho resultado se corroboró al usar el orden inverso de los anticuerpos, pero no así cuando se usó un anticuerpo irrelevante. La ausencia de amplificación en precursores eritroides podría ser ocasionado por el bloqueo ejercido por algún complejo proteico en eritroblastos, o por una baja concentración local de alguna de las dos proteínas estudiadas. Nosotros apoyamos esta última opción con base en datos que demuestran que durante la diferenciación eritroide la concentración total de GATA-1 aumenta gradualmente (Ver adelante). En resumen, GATA-1 y YY1 pueden co-existir en el fragmento de ADN de 120 pb localizado río abajo del elemento mínimo del enhancer. El reclutamiento de estos factores modula negativamente la función del enhancer, la cual parece ser favorecida por un ambiente terminal de diferenciación eritroide.

GATA-1 es reclutado al enhancer progresivamente durante la diferenciación eritroide

Los resultados del ensayo de ReChIP sugieren que GATA-1 o YY1 podrían incrementar su presencia en el elemento de 120 pb del enhancer durante la diferenciación. Para demostrar si lo anterior es cierto, ensayos semicuantitativos de inmunoprecipitación de cromatina fueron realizados con cromatina de pre-eritroblastos, eritroblastos y eritrocitos. Los factores GATA-1, YY1 y NF-E2 fueron inmunoprecipitados y la cromatina obtenida fue utilizada en reacciones de PCR duplex. La región de interés, la cual incluye al fragmento de 120 pb localizado río abajo del enhancer, fue amplificada junto con una secuencia localizada -9 kb río arriba del enhancer, y que por análisis de secuencia no muestra sitios de unión al factor GATA-1. De esta manera se logró demostrar que existe un enriquecimiento local y gradual del factor GATA-1 sobre el fragmento de ADN de 120 pb del enhancer conforme la diferenciación se lleva a cabo (Figura 32). Por su parte, factores como YY1 y la subunidad p45 del factor NF-E2, muestran una presencia constante sobre la secuencia de 120 pb durante la diferenciación (Figura 32). En resumen, aunque parte de la maquinaria proteica se localiza sobre el elemento de 120 pb, la concentración del factor eritroide específico GATA-1 se incrementa conforme la diferenciación avanza. Este reclutamiento gradual debe de modificar el estatus del enhancer favoreciendo un estado activo con capacidad de *trans*-activar a un promotor determinado. Este hallazgo explica por qué en pre-eritroblastos las dos proteínas no pueden ser encontradas al mismo tiempo sobre el

enhancer (Figura 30). Este reporte es el primero que caracteriza la asociación entre el factor eritroide GATA-1 y el factor YY1, la cual conlleva a la modulación del enhancer α -globina. Nuestros datos en general, nos permiten proponer que el fragmento de ADN de 120 pb localizado río abajo de enhancer constituye parte fundamental del mismo, regulando su capacidad de *trans*-activación de acuerdo al estado de diferenciación en el que la célula eritroide se encuentra.

Figura 31.- Interacción física entre los factores transcripcionales GATA-1 y YY1. **A)** Para establecer una interacción entre los factores, ensayos de co-inmunoprecipitación fueron realizados con anticuerpos para los factores GATA-1 (α -GATA-1) y YY1 (α -YY1) utilizando extractos de una línea eritroblástica humana (K562), precursores eritroides (líneas 6C2 y HD3) y eritrocitos maduros (RBC) de pollo. Las proteínas asociadas fueron analizadas por inmunodetecciones. Se muestra un ensayo representativo de 2 experimentos realizados independientemente. El asterisco muestra una banda inespecífica que sirve como control de cargado. **B)** Asociación de YY1 con GATA-1, ensayos de "Pull Down" fueron realizados incubando a las proteínas purificadas, YY1-GST o GST sola, con extractos totales de precursores eritroides y eritrocitos de pollo, así como en fibroblastos de codorniz (QT6). Las proteínas asociadas se analizaron por inmunodetecciones utilizando un anticuerpo contra GATA-1 (α -GATA-1). Se muestra ensayo representativo de 2 experimentos. **C)** Interacción *in vivo* de los factores GATA-1 y YY1 sobre el enhancer. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina fueron realizados usando anticuerpos contra GATA-1 y YY1 en cromatina de precursores eritroides (6C2 y HD3) y eritrocitos maduros (RBC), como control la línea linfoide DT40. Se amplificaron las regiones de interés por PCR radioactiva de las fracciones unidas (u) o no unidas (ub), tanto en el fragmento de 120 pb del modulador como en el enhancer β/ϵ del dominio β globina como control. **D)** Co-habitación de los factores GATA-1 y YY1. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con un primer anticuerpo (1^{er} IP) de acuerdo a las condiciones en C en pre-eritroblastos (6C2) y eritrocitos maduros (RBC), pero previo a la recuperación del ADN, la cromatina es incubada en 10 mM de DTT y diluida 100 veces en amortiguador de dilución, e incubada con un segundo anticuerpo (2nd IP). Finalmente se amplifica la región de interés y control de las fracciones unidas (b) o no (ub) a los anticuerpos ensayados. Muestra representativa de 3 inmunoprecipitaciones independientes. (i) ADN no incubado con anticuerpos

A**B****C****D**

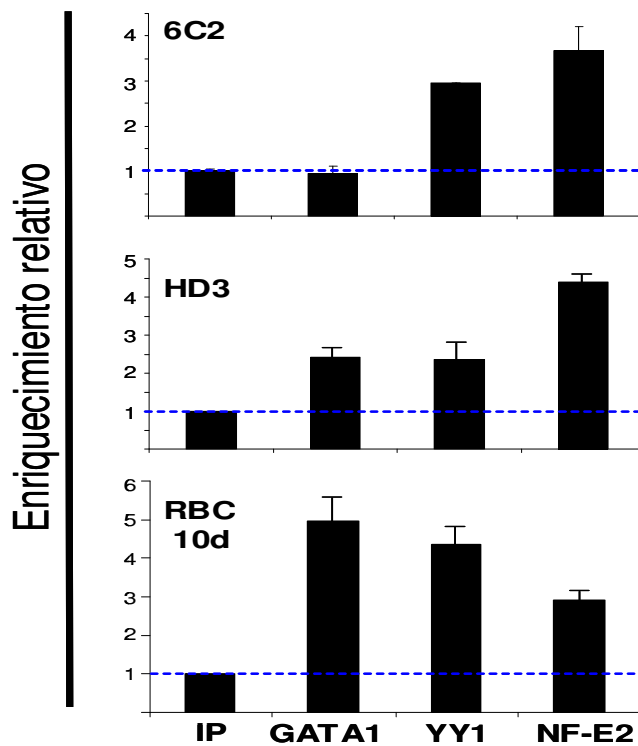


Figura 32.- Abundancia de factores transcripcionales sobre el enhancer α -globina. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron realizados sobre cromatina de precursores eritroides (6C2 y HD3) y eritrocitos maduros (RBC). Dicha cromatina fue incubada con anticuerpos para los factores GATA-1 (2 μ g), YY1 (2 μ g), NF-E2 (5 μ l, policlonal). PCR duplex fueron realizadas con el fin de amplificar el fragmento de 120 pb así como una región intergénica como control de normalización. La señal de dicha amplificación fue analizada y graficada como abundancia relativa, se muestra el promedio de al menos tres reacciones de amplificación y dos inmunoprecipitaciones independientes.

El gen π es activado por GATA-1 en pre-eritroblastos adultos

Durante la diferenciación eritroide, y dependiendo del organismo, ocurren al menos un intercambio en la síntesis de hemoglobinas de embrionarias a adultas. Usualmente dicho cambio es definitivo, provocando que los genes globina adultos sean expresados durante el resto de la vida del organismo. Los mecanismos que conllevan al intercambio de genes embrionarios por adultos han sido estudiados principalmente en el dominio β -globina. Dicho proceso se basa en el silenciamiento autónomo del gen embrionario y el reconocimiento del promotor subsiguiente por parte de los elementos de regulación. Asimismo, se ha establecido que existen factores específicos del desarrollo que ayudan a establecer el patrón de expresión de cada gen globina. Sin embargo, nuestros resultados de transfecciones transitorias utilizando el promotor π , nos permiten observar que dicho promotor es activo en los precursores eritroides de etapas adultas a diferencia de los promotores adultos (Figura 28). Este hallazgo atrajo

nuestra atención, ya que dichas células (HD3) están comprometidas a expresar a los genes adultos, sin embargo mantienen la capacidad de activar al promotor π . Como GATA-1 es un componente fundamental del enhancer, se evaluó si la sobre-expresión del factor GATA-1 puede potenciar en mayor grado la función del enhancer ante dicho promotor. Células HD3 fueron co-transfectadas con una serie de plásmidos bajo el control del promotor π solo y en presencia de las variantes ya usadas del enhancer (Figura 28), junto con un plásmido que permite la sobre-expresión del ADNc de GATA-1 (Figura 33A).

Los resultados muestran que GATA-1, aunque tiene una tendencia a potenciar el efecto *trans*-activador del enhancer, ésta potenciación no es significativa (Figura 33B). Lo anterior se observa tanto con el elemento mínimo del enhancer (πE) como con la versión completa ($\pi E+120$ pb). Como los niveles de *trans*-activación son elevados, se dedujo que tal vez la capacidad transcripcional del promotor embrionario ha llegado a un punto de saturación, por lo que el efecto de GATA-1 se oculta.

Por lo tanto, se diseñaron una serie de mutaciones en dos de los sitios GATA1 localizados en el elemento mínimo, los fragmentos resultantes fueron incorporados al plásmido regulado por el promotor embrionario. Estos plásmidos fueron transfectados en eritroblastos (HD3) y la expresión de luciferasa fue evaluada. La eliminación de los sitios GATA-1 dentro del enhancer afecta dramáticamente la capacidad de *trans*-activación de este elemento sobre el promotor π (Figura 33C). Del mismo modo, se realizaron mutaciones puntuales sobre los sitios de unión al factor Sp1 del elemento mínimo del enhancer, sin embargo, no se observó efecto alguno sobre la capacidad de *trans*-activación del enhancer sobre el promotor embrionario (dato no mostrado). Con estos resultados, el modelo en el cual GATA-1 es el principal responsable de activar el promotor π se favorece; así como que los niveles de este factor, aunque reducidos, son suficientes para llevar a cabo la activación del promotor π .

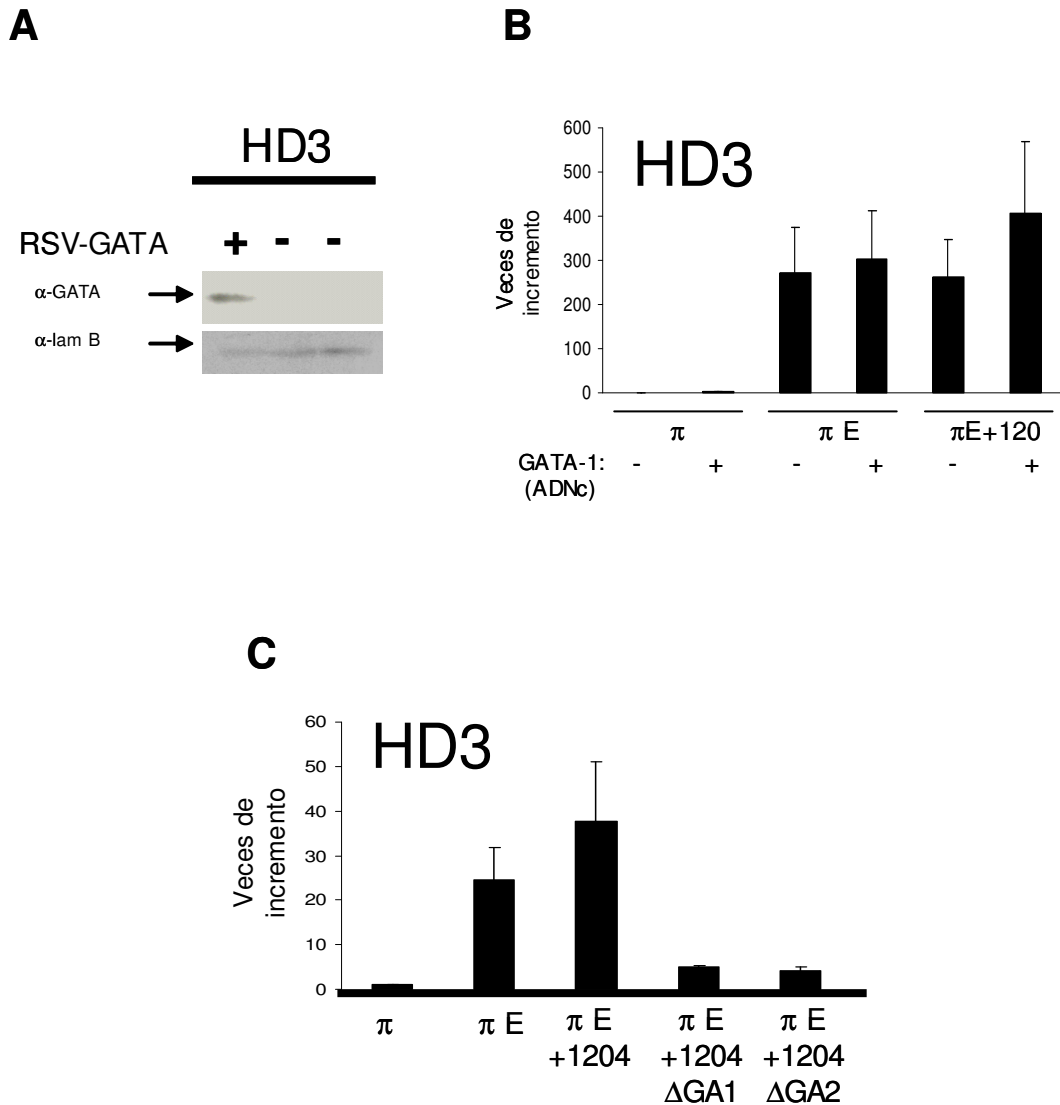


Figura 33.- El enhancer α -globina *trans*-activa vía GATA-1 al promotor embrionario π . **A)** Eritroblastos de pollo (HD3) fueron transfectados transitoriamente con un vector que permite la sobreexpresión de GATA-1 (RSV-GATA). La sobreexpresión fue evaluada por inmunodetecciones con un anticuerpo contra el factor GATA-1 (α -GATA). La misma membrana fue ensayada para la detección de lamina B (α -lam B), como control de cargado. **B)** Célula HD3 fueron co-transfectadas con un plásmido que expresa la luciferasa bajo el control del promotor embrionario π o junto con las variantes del enhancer (πE , elemento mínimo; $\pi E+120$, elemento mínimo más 120 pb), así como con el vector que sobreexpresa a GATA-1 (RSV-GATA). Se muestra el promedio de veces de incremento de 3 transfecciones independientes realizadas por triplicado \pm ES. **C)** Células HD3 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos bajo el control del promotor π descritos en **B**. Estos son comparados con dos plásmidos en los cuales los 2 primeros sitios de unión al factor GATA-1, dentro del elemento mínimo del enhancer, fueron mutados ($\Delta GA1$ y $\Delta GA2$; Figura 28A). Se muestra el promedio de veces de incremento de 3 transfecciones independientes realizadas por triplicado \pm ES.

Con base en lo anterior, nosotros deseamos entender cuales son los procesos que llevan a cabo la regulación diferencial de los genes α -globina de pollo. Ante la capacidad de *trans*-activación del promotor π en eritroblastos adultos, hemos planteado la hipótesis que existen mecanismos epigenéticos que impiden la expresión del gen embrionario en etapas avanzadas del desarrollo, los cuales a su vez favorecen la expresión regulada de los genes adultos. De esta manera, nos enfocamos en establecer cuáles son los factores epigenéticos asociados a cada uno de los promotores durante el desarrollo y la diferenciación eritroide y su relación con elementos de regulación a distancia.

El gen π se encuentra epigenéticamente regulado en etapas tardías del desarrollo.

La regulación epigenética en los genes globina fue sugerida desde los años 70 por Weintraub y Groudine, quienes mostraron que la cromatina de los genes posee características específicas de acuerdo al estado transcripcional de los mismos. Posteriormente, el análisis de la metilación del ADN de los genes embrionarios ρ y π permitieron deducir que durante etapas adultas dichos genes silenciados se encontraban metilados. Sin embargo, dicho análisis fue realizado en cultivos primarios, por lo que no se ha establecido si la presencia de dicha metilación es consecuencia o causa del silenciamiento. Para determinar el estado de metilación del ADN sobre los promotores globina y su efecto sobre la actividad de los mismos, se realizaron ensayos de digestión de ADN genómico con enzimas de restricción sensibles a metilación del dinucleótido CpG. ADN genómico, tanto de líneas celulares como de cultivos primarios, fue digerido con las enzimas HpaII / MspI, las cuales cortan la secuencia CCGG, sin embargo HpaII no efectúa dicho corte cuando la citosina intermedia se encuentra metilada. El estado de la metilación del ADN genómico fue evaluado por Southern blot, utilizando como sondas las ~300 pb representativas de cada uno de los promotores α -globina.

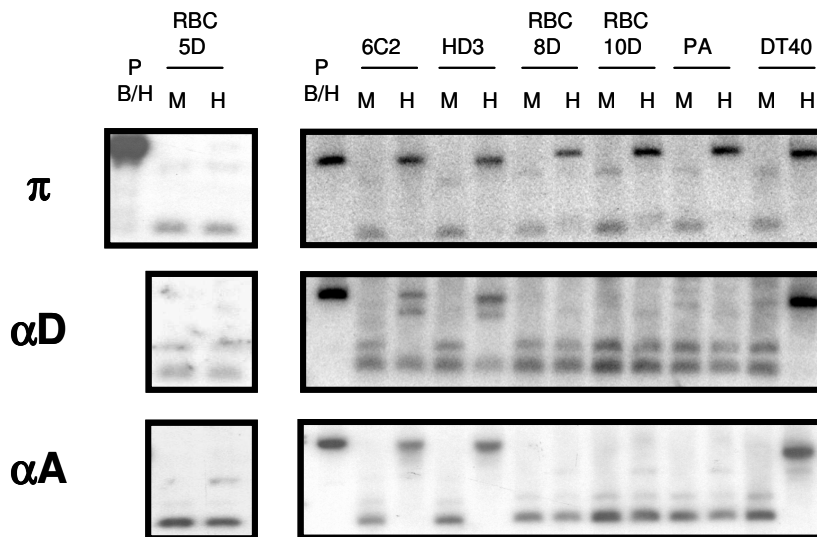


Figura 34.- Estado de metilación de los promotores α -globina de pollo. El ADN genómico de precursores eritroides (líneas 6C2 y HD3), eritrocitos (RBC) de 5,8, 10 días y pollo adulto (PA), así como de la línea linfocitoide DT40 fue digerido inicialmente con las enzimas MspI (M) y HpaII (H), posteriormente digerido con las enzimas BamHI (B) y HindIII (H) con el fin de obtener la banda parental (P). El ADN digerido fue separado en un gel al 2% de agarosa y transferido a una membrana, la cual fue hibridada por separado con sondas radiactivas para cada uno de los promotores α -globina.

Estos experimentos muestran que el promotor del gen π no se encuentra metilado en eritrocitos de 5 días, los cuales expresan a dicho gen (Figura 34). En esta etapa del desarrollo, los genes adultos son expresados en niveles basales, e interesantemente, sus promotores carecen de metilación del ADN. Sin embargo, estos promotores adquieren otras características en tejidos adultos (Figura 34)(157, 158). La metilación del ADN se presenta en las diferentes líneas celulares precursoras utilizadas, sugiriendo que ésta modificación debe efectuarse temprano en la diferenciación eritroide, o que la célula madre progenitora establece y mantiene dicho patrón sobre el dominio. Lo anterior con base en que los promotores adultos también se encuentran metilados en los precursores eritroides, pero no así en los eritrocitos maduros, en donde su activación se lleva a cabo (Figura 34). Este hallazgo abre la interesante posibilidad de que los promotores adultos sean desmetilados para permitir la activación de los mismos, un aspecto que vale la pena ser explorado en un futuro. Por otro lado, se concluye que el promotor embrionario se mantiene metilado una vez que el recambio de genes embrionarios por los genes adultos se ha realizado, dicha metilación es establecida en etapas tempranas de la diferenciación y se mantiene durante el desarrollo del organismo

La metilación del promotor π evita la expresión del gen en etapas adultas

Inicialmente, la metilación de los genes globina embrionarios fue sugerida como un mecanismo para silenciar la expresión de dichos genes. Sin embargo nuestros datos muestran que la metilación es un proceso temprano en la diferenciación y que se presenta en los tres genes α -globina. Ante este hecho, se decidió estudiar el efecto de eliminar la metilación del ADN sobre la expresión basal de los genes α -globina en etapas tempranas de la diferenciación. Para dicho fin, las células HD3 fueron incubadas con el compuesto 5-aza-2'-desoxicitidina, el cual es un análogo no metilable de la citosina. La incubación se realizó por tres días para fomentar su incorporación durante el ciclo celular, y, finalmente, la expresión de los genes fue evaluada por RT-PCR duplex semi-cuantitativa. Interesantemente, la presencia del inhibidor permite la reactivación del gen π , incluso a niveles similares a los observados en eritrocitos maduros de 5 días (Figura 35A). En las mismas condiciones, la pérdida de la metilación del ADN sobre los promotores de los genes adultos no provocó una activación transcripcional de éstos.

Por otro lado, la reactivación del gen π puede ser incluso detectada a nivel de síntesis de hemoglobina mediante una tinción ácida con benzidina (figura 35B). Dicho compuesto tiñe a las moléculas de hemoglobina, la presencia de tinción muestra que la síntesis de dicha proteína se lleva a cabo. La formación de hemoglobina funcional en eritroblastos, en ausencia de metilación del ADN, puede ser consecuencia de la activación del gen embrionario ρ del dominio β -globina, junto con el gen π , los cuales se han encontrado metilados en etapas adultas. En resumen, estos resultados sugieren que en eritroblastos se encuentra toda la maquinaria necesaria para la expresión específica del gen embrionario π , y que probablemente la expresión de los promotores adultos requiera de factores adicionales obtenidos durante la diferenciación eritroide. Estos resultados son coherentes con la ausencia de *trans*-activación de los genes adultos por el enhancer 3' del dominio en estas mismas células. Hasta el momento desconocemos los mecanismos por los cuales los genes adultos inician su transcripción de manera regulada, aun cuando sus promotores se encuentran metilados. De esta manera, estos experimentos aportan evidencia de que procesos epigenéticos son requeridos para realizar y mantener el silenciamiento de un gen embrionario en etapas adultas.

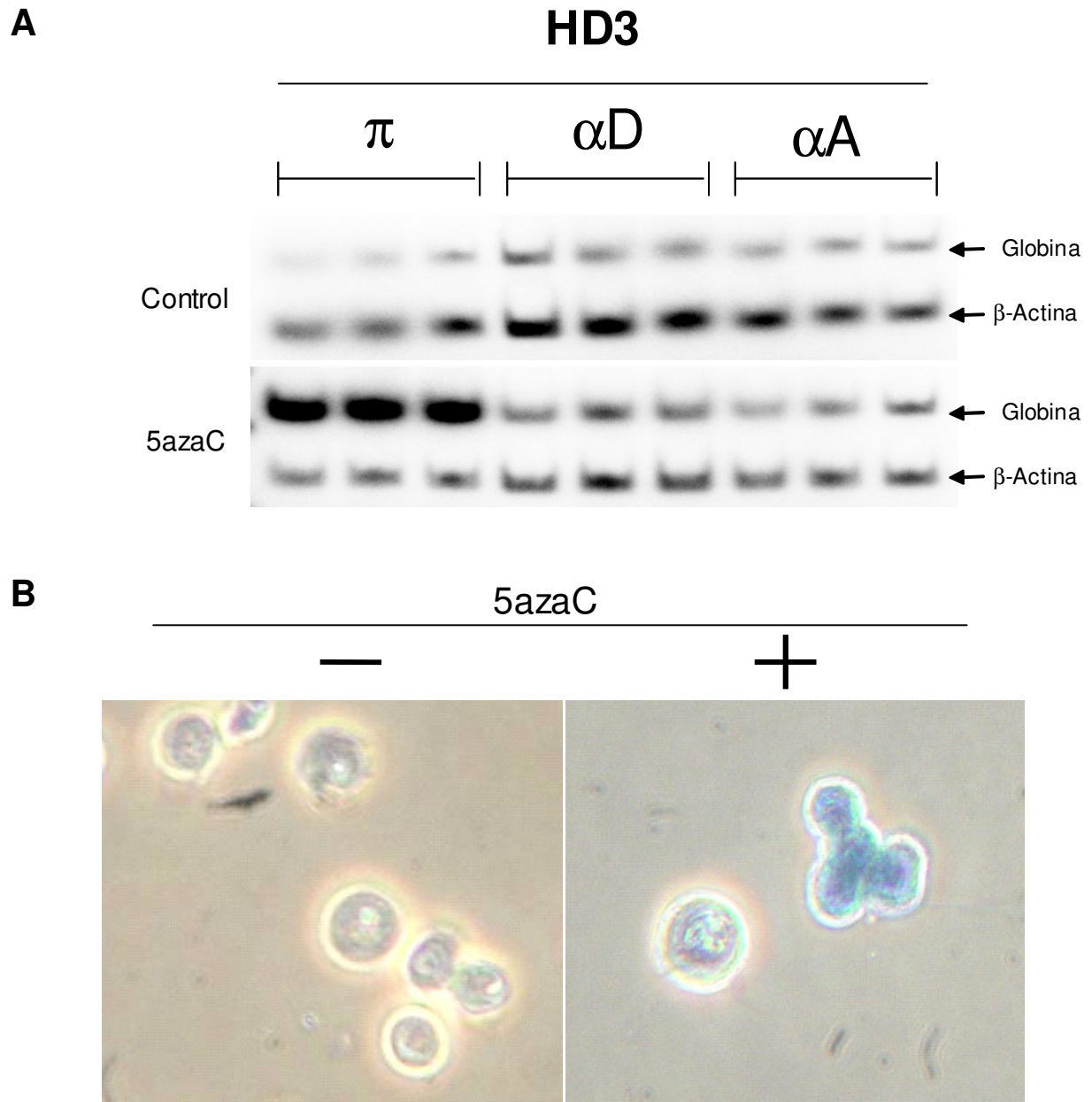


Figura 35. Reactivación del gen π . **A)** Células HD3 fueron tratadas con 5-aza-2'-deoxicitidina (5azaC) - el inhibidor de la metilación del ADN- por tres días. El ARN mensajero fue purificado y la expresión de los genes globina fue evaluada por RT-PCR duplex. La expresión fue normalizada contra el gen β -actina. Se muestra ensayo representativo de al menos 3 experimentos independientes con amplificaciones por triplicado. **B)** Tinción ácida con benzidina. Las células tratadas con 5azadC (+) y control (-) fueron incubadas en una solución de benzidina ácida y analizadas por microscopia de luz.

La proteína de unión al ADN metilado, MeCP2, es reclutada *in vivo* al promotor π en eritrocitos de etapas adultas.

La presencia del ADN metilado sobre los tres promotores α -globina sugiere que proteínas de unión a dicha marca epigenética pueden ser reclutadas. MBD2 y MeCP2 son dos proteínas con la capacidad de reconocer CpG metilados. MeCP2 ha sido asociada a diferentes procesos de silenciamiento a través del reclutamiento de desacetilasas de histonas (94). Por su parte, MBD2 ha sido principalmente localizada en islas CpG metiladas, su asociación con co-represores se ha sugerido como un mecanismo de represión (94). Recientemente, MBD2 ha sido descrita como una proteína con la capacidad de interaccionar con CpGs metilados sobre el promotor embrionario ρ del dominio β -globina de pollo y dicha interacción es específica de etapas posteriores al intercambio en la expresión de genes globinas embrionarios por los adultos (98). Con base en estos datos, se decidió realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para evaluar la presencia de las proteínas de unión a ADN metilado ya mencionadas. La cromatina de eritrocitos de 5 y 10 días, junto con la de la línea HD3 (precursor eritroide), fueron incubadas con anticuerpos específicos para las proteínas MBD2 y MeCP2. La cromatina recuperada fue incorporada a reacciones de PCR duplex para evaluar de manera semi-cuantitativa la interacción de dichas proteínas. En los precursores eritroides no se encontró asociación alguna de las proteínas MBD2 y MeCP2 al promotor embrionario π , aún cuando la secuencia del promotor presenta metilación del ADN. Por otro lado, los eritrocitos de 10 días, los cuales sólo expresan a los genes adultos, presentan *in vivo* una abundancia significativa del factor MeCP2, pero no así de MBD2. Dicha interacción es específica ya que en eritrocitos de 5 días, en donde el promotor π no se encuentra metilado, la interacción de MeCP2 no se lleva a cabo. En resumen, los resultados sugieren que en precursores eritroides, aún cuando los promotores se encuentran metilados, la maquinaria asociada a ADN metilado no es atraída al gen embrionario π . Sin embargo, conforme la diferenciación avanza, MeCP2 es reclutado al promotor embrionario pero no así a los genes adultos, los cuales aparentemente pierden la metilación ante la activación transcripcional de los mismos (datos no mostrados). El reclutamiento específico de MeCP2 al promotor π debe involucrar un mecanismo de “memoria” que evita la activación del promotor embrionario en etapas adultas del desarrollo.

Las deacetilasas de histonas son necesarias para mantener al gen embrionario reprimido durante las etapas finales de la diferenciación eritroide.

La interacción específica de MeCP2 con el promotor π durante la eritropoyesis definitiva, permite suponer que otros co-represores deben ser reclutados para mantener inactivo al promotor embrionario. Dentro de los co-represores frecuentemente asociados a esta proteína de unión al ADN metilado se encuentran las desacetilasas de histona (94). Para evaluar el papel de dicha maquinaria, tanto cultivos primarios como líneas celulares de precursoras eritroides fueron incubados por 24 h con Tricostatina A (TSA), un inhibidor de desacetilasas de histonas de las familias I y II (83). La expresión de los genes globina endógena fue analizada por RT-PCR dúplex. Los resultados muestran que en precursores eritroides los genes α -globina adultos no pueden ser reactivados por el TSA. Sin embargo, en eritrocitos adultos la incubación con TSA provoca una reactivación del gene embrionario y a un decremento en los niveles de los genes adultos. Como resultado de este tratamiento los niveles de expresión entre ellos son muy similares (Figura 37). En eritrocitos de 5 días, donde π se expresa, la incubación con TSA incrementa la expresión del gen embrionario, pero a la vez también aumenta los niveles del gen adulto α^D , y en menor medida el α^A .

En resumen, nuestros resultados apoyan la idea de que existen modificaciones específicas sobre la cromatina asociadas a los promotores α -globina que regulan la expresión de los mismos. En eritrocitos embrionarios y adultos, la expresión de los genes adultos es parcialmente controlada por desacetilasas de histonas. Nuestros datos sugieren que estos eventos epigenéticos no se establecen en etapas tempranas de la diferenciación, ya que los precursores adultos no son sensibles al TSA. Estos resultados son interesantes ya que la metilación del ADN parece regular exclusivamente la expresión del gen embrionario, pero la desacetilación no. Sin embargo, estos procesos parecen conectarse una vez que la célula eritroide se compromete a expresar a los genes adultos, ya que la expresión del gen π se vuelve parcialmente dependiente de las desacetilasas de histonas. La abundancia similar de transcritos maduros ante el uso del TSA en eritrocitos adultos, nos permite sugerir que los elementos de regulación positiva tienen la misma probabilidad de activar a los tres genes α -globina. En resumen, los resultados aquí mostrados sugieren una compleja regulación epigenética de los genes α -globina a nivel local, en conjunción con los

elementos de regulación a distancia, como el enhancer 3'. Estos mecanismos tienen como objetivo evitar que en etapas tempranas de la diferenciación adulta, la transcripción del gen embrionario π se lleve a cabo, y consecuentemente permitir la expresión de los genes adultos.

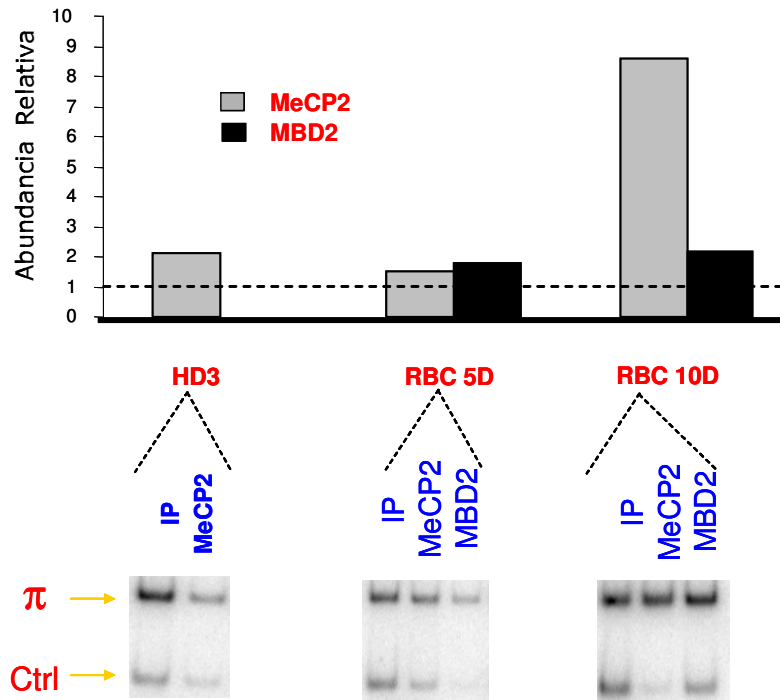


Figura 36.- Inmunoprecipitación de cromatina para determinar la presencia de MeCP2 *in vivo* sobre el promotor del gen embrionario π . Cromatina de eritroblastos (HD3), eritrocitos de 5 y 10 días (RBC 5D y RBC 10D, respectivamente) fue incubada con anticuerpos contra MeCP2 y MBD2. Una porción del promotor π fue amplificada junto a una secuencia intergénica localizada 5 kb río arriba del promotor (ctrl.), mediante PCR duplex. IP, ADN de cromatina sin anticuerpos. La señal del cociente de entre el promotor de interés y la región control del inmunoprecipitado fue dividida entre el cociente de la señal obtenida entre ese mismo cociente de la fracción IP. La señal obtenida de la fracción IP se considera como el basal (la línea punteada)

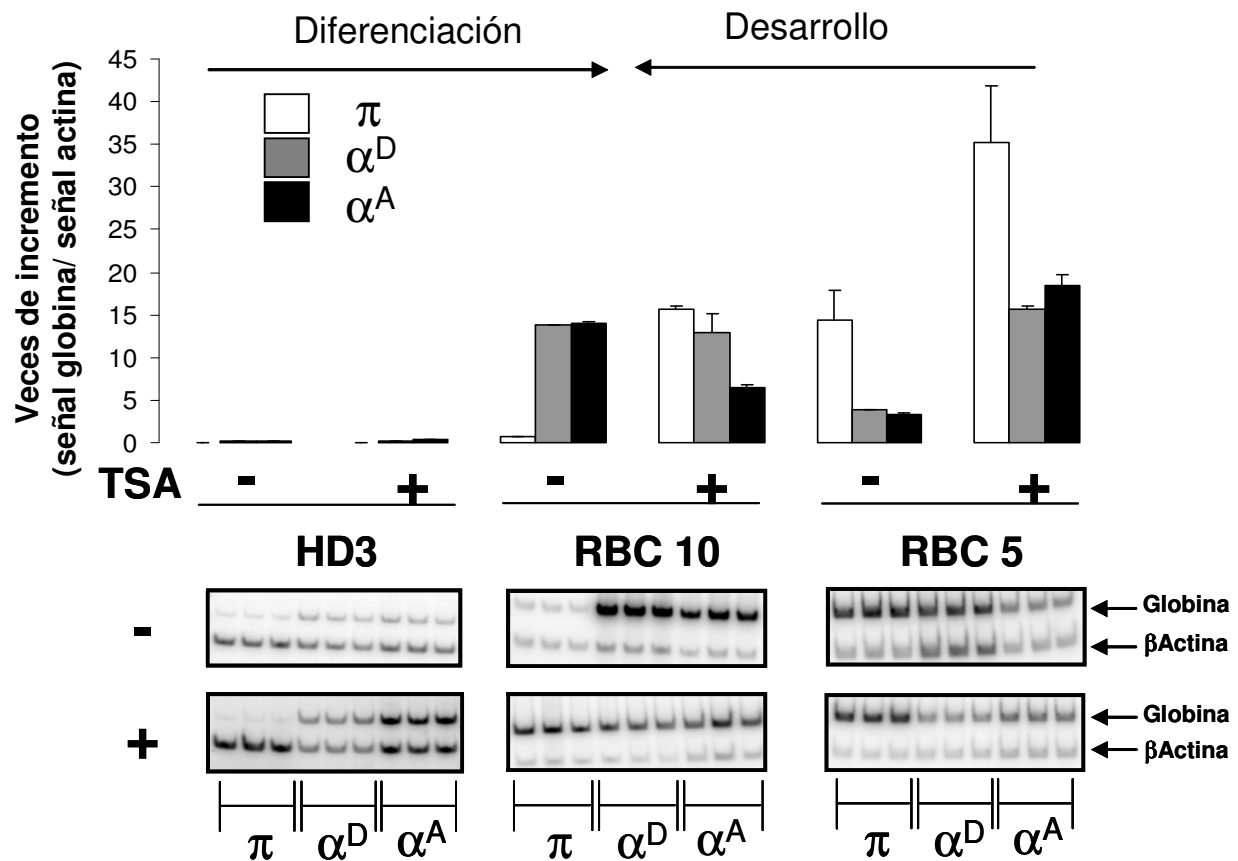


Figura 37.- Desacetilasas de histona regulan diferencialmente a los genes α -globina. Precursores eritroides (líneas HD3) y eritrocitos maduros de 10 días (RBC 10) y 5 días (RBC 5) fueron tratadas o no con tricostatina A (TSA) por 24 h. El ARN mensajero fue purificado y se realizó una RT-PCR semi-cuantitativa con el fin de evaluar el gen de interés del dominio α -globina y normalizando la expresión respecto a la del gen β -actina. Se muestran ensayos por triplicado.

La asociación de factores transcripcionales a los promotores adultos es mas compleja que en el promotor embrionario π .

Hasta el momento, nuestros datos sugieren que en eritroblastos, comprometidos a la expresión de los genes globina adultos, existe el potencial de activar al gen embrionario π . De acuerdo a las transfecciones transitorias en las diferentes líneas celulares y cultivos primarios, se pudo establecer que la actividad del promotor depende de la presencia de un potenciador. Sin embargo de manera endógena, procesos epigenéticos, especialmente la metilación del ADN, impiden la activación transcripcional del promotor embrionario en eritroblastos adultos. Ante este panorama, nos preguntamos si la composición proteica localizada sobre los promotores α -globina activos es similar. En otras palabras, si los factores transcripcionales reclutados a los diferentes promotores determinan la actividad transcripcional en tiempo y espacio

durante el desarrollo y la diferenciación. Para dicho fin, evaluamos la presencia *in vivo* sobre los promotores α -globina de una serie de factores eritroides (p.e. GATA-1 y NF-E2) y ubicuos (p.e. YY1 y Sp1), los cuales son usualmente requeridos para la expresión de los genes globina (159). Así, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina tanto en precursores como en eritrocitos maduros en las dos etapas más representativas del desarrollo -eritrocitos de 5 y 10 días-. En precursores eritroides, los factores analizados no se encuentran asociados a ninguno de los tres promotores α -globina (Figura 38). Lo anterior correlaciona con el hecho de que los genes α -globina no son expresados y los promotores se encuentran metilados, lo cual podría evitar el reclutamiento de los factores transcripcionales estudiados. Esta organización cambia en eritrocitos maduros de 10 días, en los cuales se expresan los genes adultos, donde los factores estudiados son capaces de interaccionar con los tres promotores α -globina. Cabe mencionar que el gen embrionario π se encuentra apagado en esta etapa del desarrollo, y con base en nuestros resultados previos, por la presencia de una conformación cerrada de la cromatina sobre dicho promotor. Sin embargo, la capacidad de reclutar a los factores transcripcionales se mantiene, incluyendo al factor NF-E2 para el que dicho promotor no posee una secuencia consenso de unión. Por otro lado, los promotores adultos reclutan a los factores GATA-1, YY1, Sp1 y NF-E2, dicho reclutamiento correlaciona con el estado transcripcional de los mismos. Curiosamente, el promotor α^A presenta una mayor abundancia de los factores estudiados respecto al promotor α^D . Este incremento podría ser ocasionado por la cercanía de este gen respecto al enhancer 3' del dominio, el cual tiene la capacidad de reclutar los cuatro factores analizados (Figura 32).

Por otro lado, en eritrocitos de 5 días, los cuales expresan al gen embrionario π , el promotor de este gen presenta el reclutamiento específico de los factores GATA-1 y Sp1, pero no así de YY1 y NF-E2. Interesantemente, el promotor α^D muestra un enriquecimiento significativo de los cuatro factores analizados, pero no así en el promotor del gen α^A . La relevancia de dicho incremento se encuentra bajo estudio.

En resumen, nuestros datos describen cómo los promotores reclutan un conjunto de factores específicos de acuerdo al estado de diferenciación. Interesantemente, el promotor embrionario recluta solo a dos de los factores estudiados. Por su parte, los promotores de los genes adultos tienen un patrón de factores más complejo que el gen

embrionario. Esta diferencia podría explicar la sensibilidad del promotor π a ser activado en cualquier etapa del desarrollo y diferenciación eritroide. Por su parte, la metilación del ADN podría estar involucrada impidiendo el acceso de los factores al promotor π en etapas adultas. Sin embargo, los factores estudiados, incluyendo los que carecen de un sitio de unión, puede ser localizados sobre el promotor embrionario π en etapas adultas, por lo que seguramente, la remodelación de la cromatina asociada al promotor debe de impedir el inicio de la transcripción. En otras palabras, la metilación del ADN, así como las actividades remodeladoras de la cromatina sobre el promotor embrionario funciona como un seguro que evita la activación del mismo, probablemente por elementos potenciadores, en etapas tempranas de la diferenciación. Lo anterior permite la incorporación de la maquinaria adecuada sobre los promotores adultos para su posterior activación.

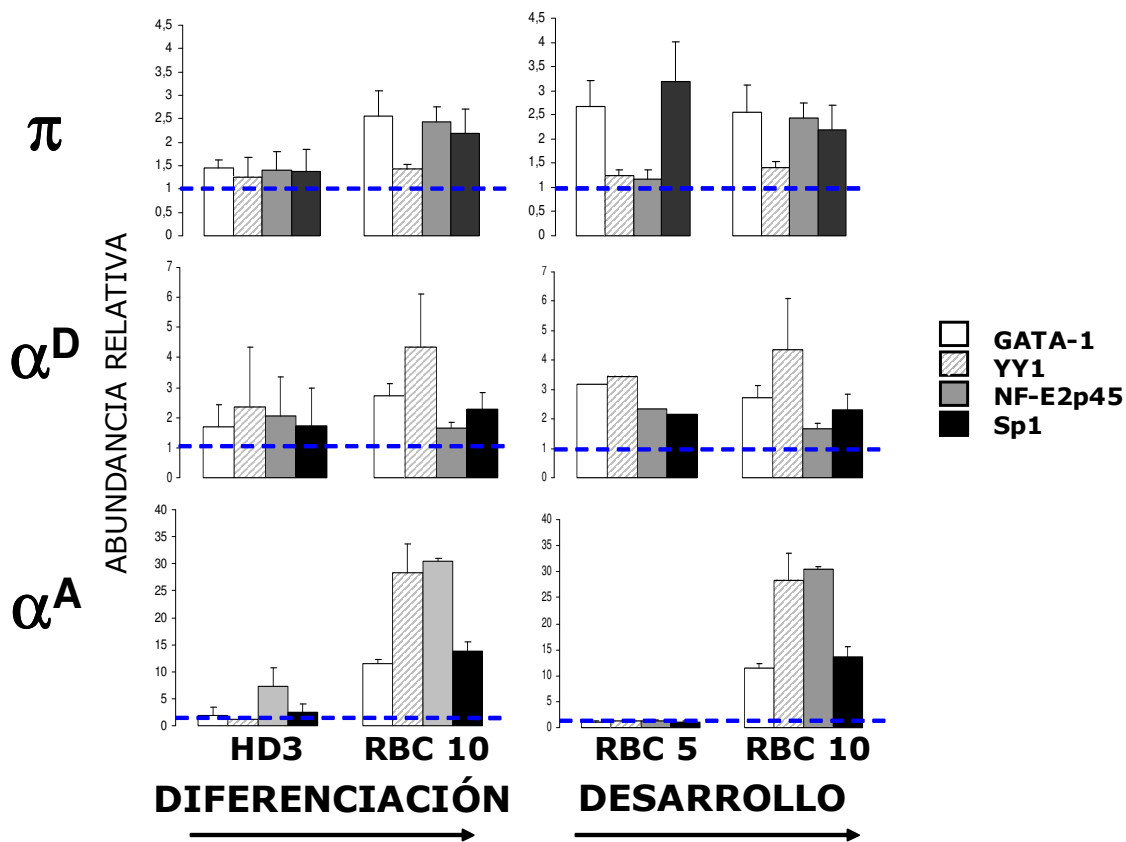


Figura 38.- Ocupación *in vivo* de factores transcripcionales sobre los promotores α -globina durante el desarrollo y diferenciación eritroide. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en eritroblastos (HD3) y eritrocitos de 5 y 10 días (RBC 5 y 10, respectivamente). La cromatina fue incubada con anticuerpos contra GATA-1, YY1, NF-E2 y Sp1. La fracción unida fue sometida a reacciones de PCR dúplex para analizar la abundancia relativa de los factores transcripcionales evaluados. Se muestra el promedio de enriquecimiento relativo de 3 reacciones de amplificación de al menos dos ensayos de inmunoprecipitación independientes.

19 Discusión

Los genes globina representan un paradigma en la regulación génica diferencial a lo largo del desarrollo y en la organización del genoma eucariote en dominios multigénicos. Estos dominios, tanto el α como el β , permiten la expresión regulada en tiempo y espacio de las subunidades necesarias para la formación de las distintas hemoglobinas. Durante etapas tempranas del desarrollo del pollo, los eritrocitos en circulación expresan los genes embrionarios ρ y π , posteriormente, un proceso de recambio promueve el silenciamiento de dichos genes y la expresión de los genes adultos de los respectivos dominio α y β (α^D , α^A y β^A , β^H , respectivamente). Inicialmente se había propuesto que los genes adultos del dominio α se expresaban durante todo el desarrollo del pollo, y que el gen embrionario simplemente era silenciado en una etapa en específico (52). En el contexto de esta tesis analizamos de manera semi-cuantitativa la expresión de los genes α -globina, y demostramos que el gen embrionario π es el principal gen expresado en eritrocitos de 5 días. En esta misma etapa los genes adultos se expresan a niveles basales. El análisis de eritrocitos en etapas adultas, nos permitió establecer que el ARN mensajero de los genes adultos puede ser detectado después del día 7 posterior a la fecundación, concomitante con un decremento de los niveles del gen π , el cual es completamente silenciado alrededor del día 10. La hematopoyesis inicial se da en el saco vitelino, posteriormente, el lugar de este proceso cambia y se concentra en la región aorta-gonadal-mesonefros (AGM). Subsecuentemente, este proceso se traslada al hígado y, finalmente, a huesos largos. El intercambio de genes embrionarios con los genes adultos coincide durante el cambio a la zona AGM. Nuestros resultados pueden ser explicados desde dos perspectivas: 1- el progenitor eritroide cambia de lugar junto con la eritropoyesis, y consecuentemente el proceso de silenciamiento del gen π se lleva a cabo. 2- los progenitores eritroides en el saco vitelino y la región AGM, aunque tengan un origen en común, son diferentes y se localizan en distintos lugares, en consecuencia lo que ocurre es que la eritropoyesis embrionaria se ve reemplazada por la adulta. Lo anterior permitiría plantear la hipótesis de que el progenitor en la región AGM ya contiene al gen π metilado estableciendo un mecanismo epigenético que impide su expresión en el desarrollo adulto del organismo. Lo anterior podría ser abordado mediante el análisis de los transcritos α -globina a nivel de células individuales, con el fin de evaluar la presencia de los tres transcritos en una misma

célula. Lamentablemente, nuestros experimentos analizan la abundancia relativa de los RNA mensajeros maduros de los eritrocitos en circulación, por lo que durante el recambio de genes globina (día 7-8), estos experimentos no permiten distinguir si los transcritos de los genes α -globina provienen de la misma célula o de diferentes poblaciones (Figura 27). Actualmente, nuestro grupo de investigación se encuentra estableciendo las técnicas de "Run On" y RNA-FISH, con el fin de evaluar la acumulación de los transcritos sobre células individuales y así determinar cual de las hipótesis planteadas es la verdadera.

Por otro lado, durante la diferenciación, la célula madre pluripotencial se compromete, bajo las señales adecuadas, a generar eritrocitos que expresan a determinados genes globina. Durante este proceso, factores transcripcionales como GATA-1 dictan el programa de expresión de los genes específicos para el sistema eritroide. Dicho factor es fundamental para establecer el linaje eritroide, ya que su ausencia afecta la eritropoyesis (30, 57, 92, 99, 185). Los dominios α y β responden de manera regulada a los niveles del factor GATA-1, así como de GATA-2 (en etapas más primarias), de acuerdo al estado del desarrollo en que se encuentre el pollo. Para estudiar la diferenciación eritroide, en este proyecto hicimos uso de una serie de líneas celulares de pollo que mimetizan dicho proceso en etapas adultas. Estas líneas celulares fueron obtenidas de médula ósea de pollo adulto y con un proceso de diferenciación detenido, por lo que su compromiso está enfocado hacia la expresión de los genes adultos α^D , α^A y β^A , β^H (16-18). Interesantemente, dichas líneas mantienen un nivel basal de los genes α -globina, a diferencia de una línea linfoide la cual no los expresa. La sobre-expresión del factor GATA-1 en estas líneas celulares provoca la diferenciación de las mismas, por lo que sería relevante establecer un sistema de inducción controlada del factor que nos permita evaluar la presencia de GATA-1 sobre la expresión de los genes globina en cultivo.

El dominio α -globina, a diferencia del dominio β , se encuentra embebido en una región de cromatina constitutivamente abierta, así mismo su organización varía considerablemente respecto al dominio β . Este último ha sido ampliamente estudiado tanto en pollo, ratón y humano, y muchos de los modelos de regulación establecidos se han basado en dichos estudios. Sin embargo, el análisis de la organización del dominio α refleja diferencias significativas respecto al dominio β . Previamente, el único elemento

de regulación caracterizado para el dominio α globina de pollo es un enhancer que se encuentra río abajo de los genes globina, compuesto por tres sitios GATA-1 y dos sitios Sp1. El análisis de secuencia de las regiones aledañas permitió identificar una secuencia de 120 pb río abajo del enhancer conservada entre pato y pollo (140, 163, 164). Para determinar si dicha región es funcionalmente relevante y si la *trans*-activación es específica, se evaluó la capacidad del elemento mínimo y del fragmento de 120 pb para *trans*-activar a los tres promotores α -globina en transfecciones transitorias. El enhancer tiene la capacidad de *trans*-activar eficientemente a los tres promotores en un ambiente diferenciado sin importar el estado del desarrollo. Curiosamente, la presencia de la secuencia de 120 pb modula la función del enhancer dependiendo de la etapa desarrollo. Por otro lado, el análisis de las mismas construcciones en precursores eritroides nos permitieron detectar que los promotores adultos no son funcionales en dichas células, probablemente por los reducidos niveles de GATA-1. Interesantemente, el promotor embrionario conserva su sensibilidad a la *trans*-activación aun cuando estos precursores eritroides están comprometidos a la expresión de los genes adultos. Ante este panorama se plantearon dos preguntas para el estudio de los genes α -globina: 1- ¿por qué mecanismo el elemento de la región de 120 pb modula la función del enhancer?, y 2- ¿cuáles son los mecanismos que activan y reprimen la expresión del gen embrionario π ?

Modulación de la función del enhancer por GATA-1 y YY1

El fragmento de 120 pb localizado río abajo del enhancer α -globina posee una organización modular, lo anterior con base en los diferentes sitios de unión caracterizados previamente por “footprinting” *in vitro* (140, 163, 164). La *trans*-activación de un promotor adulto por el enhancer en precursores eritroides es dependiente de la abundancia de GATA-1 presente. Esta *trans*-activación dependiente de GATA-1 se ve modulada por la incorporación del fragmento de 120 pb a las construcciones analizadas, principalmente por la presencia de un cuarto sitio de unión al factor GATA-1. Por ensayos de análisis de secuencia, mutaciones y retardo en movilidad electroforética, se caracterizó un sitio de unión al factor YY1 río abajo de la secuencia de unión al factor GATA-1. La modulación del enhancer se vé comprometida al mutar los sitios GATA-1 y YY1 respectivamente, sugiriendo que estas proteínas son las

responsables de mencionado efecto (**ANEXO 3**). Ensayos de interacción proteína-proteína nos permitieron establecer que los factores descritos interaccionan entre sí, aunque nuestros estudios no permiten determinar si dicha interacción es directa o no. El efecto de YY1 sobre la función del enhancer en pre-eritroblastos y eritrocitos es negativo, sugiriendo que su presencia es necesaria para modular la función del enhancer. Se ha descrito que en el gen embrionario del dominio β -globina en ratón existe una región necesaria para el silenciamiento de éste, y que es dependiente de la presencia de GATA-1 y YY1 (159). Sin embargo, nuestros datos muestran por primera vez la interacción entre ambos factores transcripcionales con el fin de modular la función de un enhancer. Así mismo, estos resultados apoyan la idea de que el enhancer es más complejo, tanto a nivel de componentes como de su función, de lo que previamente se sospechó. La importancia de dicha modulación recae en datos que sugieren que los niveles de los distintos tipos de proteínas globinas son críticos. La sobreexpresión de genes globina lleva a una agregación anómala de la hemoglobina, la cual afecta su función transportadora de oxígeno (127). Por lo que mantener los niveles de expresión precisos es necesario y podría requerir la presencia de moduladores de este tipo para dicho fin. La falta de ensayos que permitan la eliminación del enhancer en el locus endógeno no nos permite establecer contundentemente la función *in vivo* de dicho elemento. A pesar de ello, en el laboratorio nos encontramos desarrollando una estrategia para la eliminación de elementos de regulación en la línea linfóide de pollo DT40. Esta línea linfóide posee una tasa elevada de recombinación, por lo que se puede utilizar para eliminar regiones de interés mediante recombinación homóloga. Posteriormente, el cromosoma modificado es transferido a un ambiente eritroide para su evaluación *in vivo* durante la diferenciación eritroide. Esta metodología nos permitirá analizar la relevancia funcional de diferentes elementos de regulación.

El mecanismo por el cual estas proteínas ejercen su efecto no lo hemos establecido, pero suponemos que procesos de acetilación y desacetilación de histonas podrían estar involucrados. YY1 ha sido identificado como un factor con actividad represora y activadora, con la capacidad de reclutar acetiltransferasas de histonas y desacetilasas de histonas. Estas enzimas pueden remodelar la cromatina localizada alrededor del factor así como el estado de acetilación del factor, con la finalidad de influir sobre la transcripción (64, 83). A su vez, GATA-1 recluta enzimas que acetilan el

contexto con el cual este factor interacciona, y, a su vez, éste puede ser acetilado incrementando la afinidad por su sitio de unión, provocando un aumento en su potencial de *trans*-activación (80, 101). Se ha demostrado que GATA-1 interacciona con CBP/p300, una acetiltransferasa de histonas y de factores de transcripción, la cual puede modificar el estado de acetilación de YY1 y/o los nucleosomas asociados a la región de unión (113). Por medio de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, demostramos que YY1 y GATA-1 co-habitan en el fragmento de 120 pb, y que dicha presencia es dependiente del estado de diferenciación. En precursores eritroides y en eritrocitos maduros la presencia de YY1 sobre el modulador es constitutiva, pero la concentración local de GATA-1 no, ya que ésta se va incrementando de acuerdo a la diferenciación. Por lo que nosotros sugerimos que en precursores eritroides YY1 podría estar actuando como un modulador negativos, que con la llegada gradual de GATA-1 durante la diferenciación, el estado de acetilación de YY1 se podría modificar vía acetilasas asociadas al factor entrante (Figura 39). Esta modificación conllevaría a relajar la función moduladora sobre el enhancer y en consecuencia a una mejor capacidad de *trans*-activación. Esto explicaría por qué los promotores adultos en precursores eritroides no son transcripcionalmente activos. El requerimiento local de GATA-1 controla la función tanto del elemento mínimo como de la región moduladora (fragmento de 120 pb). Como perspectivas de este estudio estamos interesados en conocer como GATA-1 y YY1 interaccionan entre sí, y qué consecuencias, a nivel de acetilación, ocurren como resultado de dicha interacción (**ANEXO 3**).

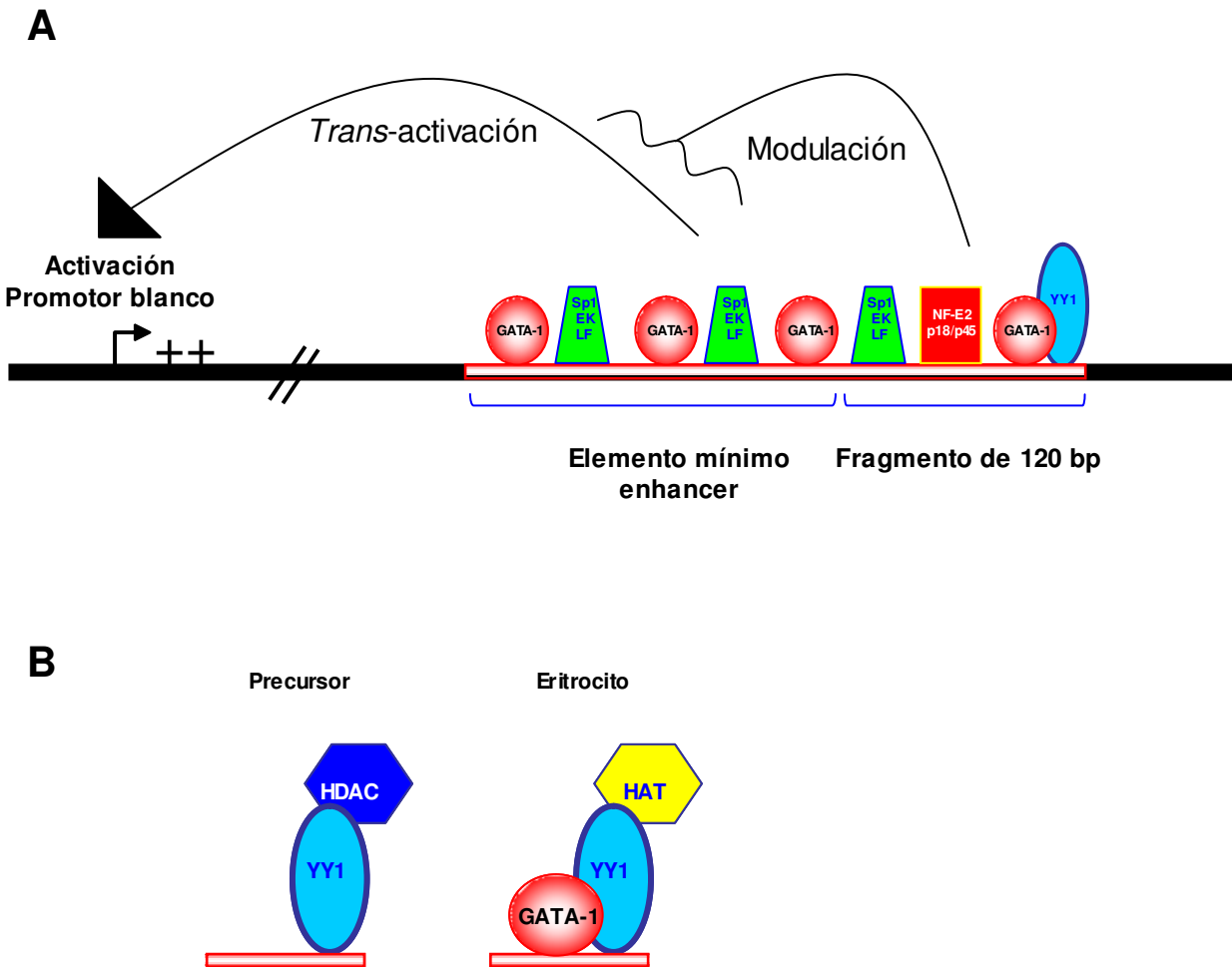


Figura 39.- Modulación del enhancer 3 del dominio α -globina. **A)** El elemento mínimo del enhancer, mediante los sitios GATA-1, tiene la capacidad de *trans*-activar a sus promotores blanco. Sin embargo, dicha transactivación se ve modulada por un fragmento de 120 pb de ADN localizado río debajo de los sitios GATA-1. En especial, la interacción de GATA-1 y YY1 sobre el modulador ayuda a mantener los niveles precisos de transcritos. **B)** Modelos propuestos para la modulación dl enhancer dependiente de GATA-1 y YY1. En precursores eritroides, YY1 interaccionaría con maquinaria que regula la cromatina ocasionando la represión de los genes asociados a dicho elemento. Dicha regulación es aliviada por el reclutamiento gradual del factor GATA-1, el cual modifica la función de YY1, así como la composición de sus factores asociados, con la finalidad de permitir la activación transcripcional de manera regulada.

La metilación del ADN de la región promotora del gen π evita su activación y permite la expresión de los genes adultos del dominio α -globina

El gen embrionario π se encuentra regulado a lo largo del desarrollo, ya que su expresión se restringe a los eritrocitos producidos hasta el 5^º-7^º día post-fecundación. Gradualmente, el gen es silenciado y dicho proceso es mantenido durante el resto de la vida del organismo. Hasta antes de este trabajo, se había postulado que la activación selectiva de los genes globina era el resultado de la expresión de factores específicos de cada etapa del desarrollo (155, 159). Así mismo, el reclutamiento de factores específicos de etapas adultas a los promotores embrionarios promovía el silenciamiento del mismo. Por ejemplo, en el dominio β -globina de ratón, la proteína Sox6 se expresa en etapas adultas con el fin de silenciar al gen fetal ϵ (183). Sin embargo, demostramos que en etapas avanzadas del desarrollo adulto, el promotor π puede ser potencialmente activado, inclusive en precursores eritroides. Dicha activación está basada en la sencillez de su promotor al requerir aparentemente sólo de las proteínas GATA-1 y Sp1, lo cual se sustenta por ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para dichos factores (Figura 38). Ante esto, nos preguntamos qué mecanismos mantienen al gen π apagado, aún cuando existe la capacidad de activarlo. En 2001, a través de ensayos de secuenciación de ADN tratado con bisulfito de sodio, se reportó que el gen π se encuentra metilado en sitios CpG en etapas adultas (158). Nuestros datos apoyan dichos resultados y sugieren que la metilación se establece en los precursores eritroides al inicio de la diferenciación, después del día 5 posterior a la fecundación. En eritrocitos de 5 días en los cuales el promotor del gen es activo, éste no se encuentra metilado, con lo que se sugiere que la metilación correlaciona con el silenciamiento del gen embrionario en etapas adultas. La presencia *per se* de la metilación no es suficiente para reprimir la transcripción (94), una maquinaria epigenética especializada es reclutada a la región para llevar a cabo dicho silenciamiento. En el dominio β -globina de pollo, MBD2 fue recientemente identificada como una proteína que interacciona con el promotor embrionario ρ cuando éste se encuentra metilado (157). En el dominio α -globina de pollo, se había reportado la formación de un complejo proteico que interacciona con el promotor π metilado, dichos ensayos fueron realizados *in vitro* y la entidad proteica no fue caracterizada (158). Interesantemente, nuestros resultados

sugieren la presencia *in vivo* de MeCP2 sobre el promotor embrionario π en eritrocitos de etapas adultas. Dicha asociación no se efectúa en precursores eritroides, sugiriendo que su posterior reclutamiento es consecuencia de procesos adicionales y/o complementarios a la diferenciación eritroide. Así mismo, MBD2 no fue identificada *in vivo* sobre el promotor π , a diferencia del promotor ρ (98). Usualmente, MBD2 está asociada a islas de dinucleótidos CpG metilados (94), sin embargo, el promotor π no posee una cantidad significativa de dinucleótidos CpG, por lo que no puede ser catalogada como una isla CpG, lo cual explicaría que una maquinaria de represión distinta sea reclutada por el dominio α -globina de pollo. Otro escenario posible es que la metilación sea reclutada por la isla CpG que se encuentra río arriba del dominio α -globina de pollo. En colaboración con el grupo del Dr. Razin hemos identificado un elemento silenciador dependiente de CTCF, el cual forma parte del promotor del gen *ggPRX1*, transcrito en sentido inverso a los genes globina (**ANEXO 4**). Esta isla podría favorecer una extensión de la metilación sobre el promotor embrionario en etapas específicas. Sin embargo, un contra-argumento a este evento es que la distancia de la isla al promotor embrionario es de alrededor de 5 kb y entre ambos existe una reducida presencia de dinucleótidos CpG.

La presencia del ADN metilado puede ser consecuencia o causa del silenciamiento del gen π . Si la hipótesis válida fuese la primera, la reactivación del gen π sería imposible porque los mecanismos que reprimen al gen estarían irreversiblemente presentes. Pero si la metilación fuese la causa, su eliminación permitiría la re-expresión del gen embrionario. Para tratar de clarificar este aspecto, líneas celulares de precursores eritroides fueron incubadas con 5-aza-2'-desoxicitidina, con el fin de interferir con la metilación del genoma. Dicha eliminación permite la re-expresión específica del gen embrionario, sin embargo no así la de los genes adultos. Estos resultados apoyan que la metilación del promotor π es en parte responsable del silenciamiento; del mismo modo, esto apoya el hecho de que el potencial para expresar al gen embrionario se encuentra latente. Ante esto, el organismo aprovechó un mecanismo epigenético para evitar la expresión de dicho gen en etapas adultas. Sin embargo, nuestros resultados, aunque revelan un papel fundamental de la metilación del ADN, no permiten establecer quién es el responsable de silenciar el gen embrionario

π y promover su subsecuente metilación del ADN. Este es otro aspecto relevante que surge de nuestro estudio y que se encuentra actualmente bajo estudio.

Ante esto surgen preguntas tales como ¿qué factor o cuáles son los mecanismos responsables de atraer la metilación del ADN a la región promotora del gen embrionario y bloquear la transcripción? Dentro de los eventos descritos como importantes para favorecer la metilación del ADN se encuentra la desacetilación y, subsecuente, metilación de histonas (102, 161). Sin embargo, la desacetilación, al menos, no parece ser relevante para la manutención del silenciamiento del gen embrionario en el dominio α -globina. El tratamiento con TSA no permitió la re-expresión del gen π , aunque sí la de los genes adultos en eritroblastos. Estos datos son relevantes, ya que indican que diferentes mecanismos, los cuales involucran a la estructura local de la cromatina, regulan a cada uno de los promotores α -globina de pollo. Probablemente, el estadio de diferenciación de los eritroblastos (línea celular HD3) permite establecer un re-arreglo de la maquinaria específica sobre los promotores adultos, favoreciendo su selección y posterior activación en eritrocitos maduros.

Por otro lado, la sensibilidad de *trans*-activación del promotor π por elementos a distancia, como el enhancer 3', esta determinada por su habilidad para reclutar un conjunto aparentemente más sencillo de factores transcripcionales, como son los factores GATA-1 y Sp1 (Figura 40) (**ANEXO 5**), por lo que el mantener controlada la estructura local de la cromatina del promotor π es un mecanismo para evitar dicha promiscuidad en etapas adultas. Esta promiscuidad se encuentra latente, ya que en eritrocitos adultos podemos encontrar la presencia de GATA-1, YY1, NF-E2 y Sp1 sobre el promotor π , aun cuando éste se encuentra inactivo. Para evitar la activación del gen embrionario, la maquinaria especializada, como MeCP2 y desacetilasas de histonas, es reclutada al promotor; nosotros proponemos que dichas proteínas mantienen una estructura de la cromatina localmente cerrada sobre el promotor (Figura 40). Cabe mencionar que resulta interesante evaluar la extensión del remodelaje del promotor π , así como la metilación del ADN asociada a éste hacia los genes adultos, ya que éstos se encuentran a solo 2 kb respecto al promotor embrionario.

Pero ¿por qué mantener epigenéticamente silenciada la expresión del gen π ? Parte de la contestación se debe de considerar con base en nuestros ensayos de reactivación en eritrocitos maduros de 10 días. El tratamiento con TSA permitió la

expresión del gen embrionario en este estadio adulto. Sin embargo, dicha reactivación provocó un decremento en el ARN mensajero de los genes adultos. Estos datos nos permiten sugerir efectivamente que el elemento potenciador 3' puede ser compartido por los tres promotores α -globina. Dicho de otra manera, el enhancer 3' tienen la misma capacidad y probabilidad de activar a cada uno de los tres genes α -globina. Por lo tanto, y para alcanzar los niveles de transcritos correspondiente a los genes adultos, es necesario silenciar la expresión del gen embrionario (Figura 40). En otras palabras, en etapas adultas el promotor del gen embrionario π podría competir con los promotores adultos por un elemento de regulación. Por lo que la complejidad o sencillez de los promotores parece ser una variable importante para la regulación de los genes α -globina de pollo (**ANEXO 5**).

Finalmente, parte de los mecanismos para que un elemento a distancia reconozca a su promotor blanco, están basados en la combinatoria de factores transcripcionales que participan en dicha interacción. GATA-1 es necesario para la actividad *trans*-activadora del enhancer α -globina sobre el promotor embrionario. Sin embargo, nuestros datos sugieren que la maquinaria para activar la transcripción de los genes adultos α^D y α^A es más compleja, ya que requiere de otros factores complementarios a GATA-1 y Sp1, tales como por ejemplo NF-E2, YY1, y muy probablemente otros, para modular la expresión de dichos genes. Esta complejidad se cumple durante la diferenciación, ya que la abundancia local de estos factores sobre los promotores solo se da en eritrocitos maduros. Los mecanismos por los cuales el enhancer 3' interacciona con los promotores α -globina no son conocidos, y son tema actual de investigación en el laboratorio. En la región de control del locus asociado al dominio β globina en ratón, el sitio de hipersensibilidad 2 recluta al factor NF-E2 y la potenciación de dicho sitio se da porque el factor GATA-1, localizado sobre el promotor que interacciona con NF-E2, induce una *trans*-activación específica (27, 148, 156, 174). Sin embargo, no hay evidencia contundente de si este tipo de regulación se lleva a cabo en el dominio α -globina. Este tipo de preguntas están empezando a ser abordadas experimentalmente en el laboratorio (**ANEXO 7**).

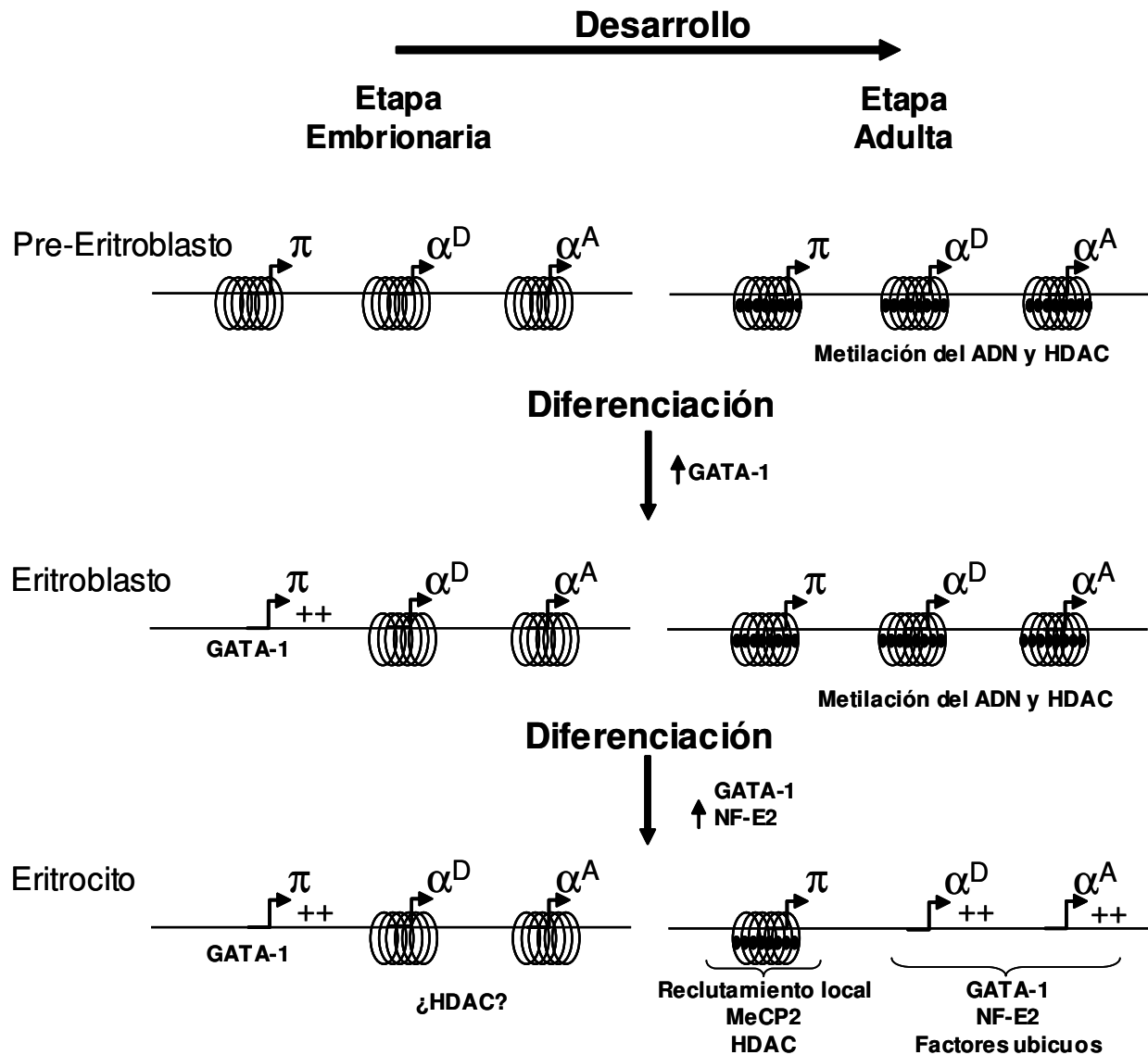


Figura 40.- Regulación de los genes α -globina de pollo. Dividiendo el desarrollo eritroide en dos etapas (embrionaria y adulta) tenemos que los genes están regulados por mecanismos genéticos y epigenéticos. En la etapa embrionaria, aunque se carece de modelos para evaluar la activación del gen π , creemos que este gen es activado en etapas tempranas de la diferenciación eritroide. Dicha activación se debe al reclutamiento del factor GATA-1, el cual es expresado en etapas tempranas de la diferenciación. Posteriormente, desacetilasas de histonas (HDAC) son reclutadas sobre los promotores adultos para mantenerlos silenciados. En etapas adultas, el dominio α -globina es metilado a nivel del ADN, probablemente en las células madre del sistema hematipoyético. Durante la diferenciación eritroide, la metilación del ADN impide la activación del promotor embrionario. Lo anterior permite el reclutamiento de los factores necesarios para la expresión de los genes adultos y de la maquinaria que mantiene la cromatina del promotor embrionario cerrada.

20 Conclusión

El dominio α -globina es un dominio con regulación y estructuras complejas, el cual contempla una estricta interdependencia entre factores genéticos y epigenéticos. Estos factores involucran elementos de regulación proximal y distal. Por ejemplo, el enhancer 3', inicialmente caracterizado como un fragmento de ADN con tres sitios de unión al factor GATA-1, muestra una configuración más compleja a lo previamente publicado. En este trabajo de tesis caracterizamos una secuencia de ADN de 120 pb, la cual posee un efecto modulador sobre la actividad potenciadora del enhancer, característica novedosa no descrita previamente (144). Dicha función es en parte dependiente de la interacción entre los factores GATA-1 y YY1. Asimismo, nuestros datos revelaron una interacción física entre ambos factores de transcripción, la cual es necesaria para modular los niveles de transcripción potenciados por el enhancer.

Por otro lado, haciendo uso de inhibidores de procesos epigenéticos logramos establecer que el gen embrionario π es sensible a metilación del ADN en etapas adultas. Dicha metilación es establecida en los precursores eritroides y sirve para reclutar complejos co-represores que mantienen probablemente la estructura cerrada del promotor en cuestión. Así mismo, los promotores adultos poseen una estructura específica diferente a la del promotor embrionario. Si esta organización es establecida por algún factor en específico no es claro, pero hemos empezado a analizar posibles candidatos, entre los que se encuentra el factor Sox6. Consideramos que la metilación del gen embrionario evita que la simplicidad de éste promueva su *trans*-activación por algún elemento a distancia (enhancer) en precursores eritroides durante etapas adultas. Dicha activación provocaría efectos negativos sobre la expresión de los genes adultos, cuya regulación es más compleja y dependiente de un ambiente eritroide más avanzado en su estado de diferenciación. En resumen, el dominio α -globina posee características específicas no identificadas previamente que regulan la expresión de los genes contenidos en el mismo, y que muestran diferencias significativas respecto a la regulación estudiada del dominio β . Por lo que el estudio del dominio contribuye a la identificación de estrategias celulares de regulación en dominios multigénicos, con la finalidad de entender mejor uno de los niveles primarios de regulación génica en células eucariotas.

21 Perspectivas

En este trabajo nos hemos dado a la tarea de entender los mecanismos de regulación a nivel local de la expresión diferencial de los genes α -globina de pollo. De esta manera hemos evidenciado la importancia de factores genéticos y epigenéticos involucrados en la regulación transcripcional. Así mismo, estos resultados han sentado las bases para el planteamiento de preguntas novedosas sobre los mecanismos finos que regulan diferencialmente en tiempo y espacio la expresión de los genes α -globina y el recambio de genes embrionarios por genes adultos. Actualmente en el laboratorio se ha abierto una línea de investigación para evaluar en detalle los mecanismos que promueven el silenciamiento del promotor embrionario π . Esfuerzos importantes se están desarrollando para determinar las entidades proteicas responsables de llevar a cabo el silenciamiento del mismo; recientemente, hemos adquirido un interés peculiar en el factor Sox6, el cual es responsable de silenciar al gen ϵ del dominio β -globina de ratón en etapa adulta. La búsqueda de sitios putativos de unión sobre los promotores α -globina, nos permitió establecer que solo el gen embrionario π posee sitios de unión, pero no así los promotores de los genes adultos. Datos iniciales en transfecciones transitorias muestran que Sox6 tiene un efecto negativo sobre la capacidad de *trans*-activación del enhancer 3' sobre el promotor embrionario. Sin embargo, más estudios necesitan realizarse para establecer la función *in vivo* de Sox6 sobre los genes α -globina de pollo.

Por otro lado, nos hemos interesado en descifrar cómo es que el gen embrionario π mantiene una estructura local de la cromatina cerrada, aún cuando todo el dominio se encuentra en una conformación abierta. Recientemente, hemos decidido evaluar si para dicho silenciamiento existe un componente de ARN. Actualmente, mecanismos de ARN de interferencia, así como de otros ARN pequeños, empiezan a establecerse como un medio para regular la transcripción génica a diferentes niveles. En levaduras y moscas, la estructuración local en heterocromatina de una región genómica definida es dependiente de la maquinaria de ARN de interferencia. Por lo tanto hemos iniciado estudios para evaluar si dichos mecanismos están presentes en este dominio.

Por otro lado, la diferenciación eritroide parece tener un papel determinante tanto en la activación de los genes adultos del dominio α -globina como en la mantención del silenciamiento del gen embrionario. Afortunadamente, la línea celular HD3, establecida

como eritroblasto, puede ser inducida *in vitro* a diferenciación terminal. Actualmente, hemos establecido las condiciones para la diferenciación de dichas células y nos encontramos evaluando los niveles de expresión de los genes adultos, en presencia o ausencia de la metilación del ADN. Lo anterior con la idea de establecer claramente la relevancia de mantener el gen embrionario apagado durante la activación de los genes adultos.

Recientemente, hemos establecido contacto con grupos de investigación en la Universidad Autónoma de Michoacán, con la finalidad de implementar el uso de pollos transgénicos. Esta idea nos permitiría evaluar la sobre-expresión de factores de regulación eritroide e incluso la evaluación de mutaciones en su contexto endógeno. Así mismo, se ha empezado a implementar el aislamiento y propagación de células madre de pollo, con el objetivo de evaluar los mecanismos que llevan a cabo la activación del gen embrionario π durante la diferenciación.

En resumen, este trabajo de tesis ha sentado las bases e ideas necesarias para realizar preguntas novedosas en relación a la regulación transcripcional del dominio α -globina de pollo.

22 Materiales y Métodos

Cultivo de tejidos

La línea celular 6C2 corresponde a una línea celular obtenida a partir de medula ósea de pollo y transformada con el virus de la eritroblastosis aviar, dichas células se consideran como pre-eritroblastos arrestados en estado de CFU-E (Unidades formadoras de colonias eritroides). Esta línea celular se mantuvo en medio α -MEM (GIBCO) suplementada con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 2% (v/v) de suero de pollo (ChS), 1 mM de HEPES (pH 7.2) y 50 μ M de β -mercaptoetanol. La línea celular K562 originaria de un paciente con leucemia eritroblastica se cultivó en IMEM suplementada con 10% de SFB. Los medios y condiciones de cultivo para la línea celular HD3 de pollo, la cual corresponde a eritroblastos arrestados a través de la infección del virus AEV, y la línea celular humana de cérvix HeLa fueron descrita en la publicación "Sustained heterologous transgene expression in mammalian and avian cell lines" en la revista **Methods in Molecular Biology** (ver anexo 6). La línea celular de fibroblastos de codorniz QT6 fue cultivada en DMEM suplementada con 8% de SFB y 2% de suero de pollo. La línea celular linfocítica de pollo DT40 (célula no eritroide) fue mantenida en DMEM suplementado con 8% de suero fetal bovino, 2% de suero de pollo y antibióticos. Los cultivos primarios de eritrocitos de pollo fueron obtenidos mediante punción de la vena apical de embriones de pollo incubados durante distintos días, con el fin de obtener células rojas de las etapas del desarrollo requeridas (embriones de *Gallus gallus domesticus*, Alpes, Puebla, México). El inhibidor de desacetilasas de histonas, Tricostatina A –TSA-, fue utilizada a 2.5 ng/ml en medio de cultivo por 24 h. El inhibidor de la metilación del ADN, 5-aza-2'-deoxicitidina, fue utilizada a 3 μ M por tres días, realizando cambios diarios de dicho reactivo.

Plásmidos

Para transfecciones estables en las líneas 6C2 y HD3 se realizaron las siguientes construcciones: El promotor/enhancer de CMV fueron obtenidos a partir del plásmido pBS185 (Stratagene) y clonado en los sitios BamHI/HindIII del sitio de clonación múltiple del plásmido pEGFP1, el cual posee la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) y la capacidad de proporcionar resistencia a neomicina. En los mismos sitios de clonación fueron introducidos el promotor/enhancer de SV40, sin embargo la eficiencia de expresión de este plásmido es reducida en células eritroides, por lo que no se usó para estudios posteriores. El promotor globina α^D fue proporcionado por el Dr. Sergey Razin y clonado en el sitio BamHI del plásmido pEGFP1. El enhancer α -globina fue incorporado río arriba del promotor α -globina en los sitios EcoRI/ HindIII. Para la incorporación de secuencias río abajo del transgene (*GFP*), un sitio de clonación múltiple fue diseñado, conteniendo los siguientes sitios de restricción: AflII, BstEIII, PaeI, AscI, MluI, y AflII. Los oligonucleótidos fueron sintetizados (SIGMA) y apareados entre sí con el fin de fosforilarlos *in vitro* con la cinasa del bacteriófago T4. Dicho oligonucleótido fosforilado fue clonado en el sitio AflII del plásmido pG α D1, para dar origen al plásmido pG α D3 (el cual contiene 2 sitios múltiples de clonación, uno en costado 5', y otro en el costado 3'). Dicho plásmido fue la base de la mayoría de las construcciones utilizadas durante este proyecto.

Para flanquear a un transgen con elementos tipo “insulator”, inicialmente, el “insulator” cHS4 β -globina de pollo fue clonado en el plásmido pBS246 (Stratagene). El “insulator” cHS4 fue obtenido del pFRTG4, en cuyo plásmido se encontraba flanqueado por sitios EcoRI/ BamHI. A través de una digestión EcoRI se linearizó el plásmido y se rasuró el extremo utilizando la enzima “Mung Bean Nuclease”, posteriormente,

oligonucleótidos de doble cadena conteniendo el sitio BamHI fueron ligados a dichos extremos. Finalmente la digestión del fragmento con BamHI permitió la liberación de un fragmento de 2.5 kb conteniendo 2 copias del “insulator” cHS4 (2 x 1.2 kb). Dicho fragmento fue ligado en el sitio BamHI del plásmido pBS246, lo cual permitió flanquear al “insulator” cHS4 con secuencias de recombinación sitio específico LoxP (pBS1.22A o B, de acuerdo a la orientación del “insulator” cHS4). La digestión enzimática del plásmido pBS1.2B con la enzimas EcoRI/Sall permitió la remoción de un fragmento de ADN conteniendo las secuencias LoxP1.2HS4LoxP, el cual fue introducido en los sitios correspondientes del plásmido pGαD3, para dar lugar al plásmido pHR1. Para la clonación de la copias del fragmento de 1.2 kb del “insulator” cHS4 río abajo del transgene (*GFP*), el fragmento BamHI conteniendo al “insulator” cHS4 fue introducido en el plásmido pZFR2 (este plásmido permite flanquear al “insulator” con sitios de recombinación sitio específico FRT). Este fragmento flanqueado puede ser recuperado por una digestión con la enzima MluI, para su posterior incorporación en el sitio de clonación múltiple 3' del vector pHR1, para dar lugar al plásmido pHR11. Con el elemento mínimo del “insulator” cHS4 el cual comprende dos copias del fragmento mínimo de 250 pb, se realizaron una nueva serie de vectores con la misma estrategia de clonación descrita previamente, dando lugar a los plásmidos: pHR5 y pHR55.

Durante el proceso de diseño de plásmidos, se generó el plásmido pLCC el cual parte del pHR5, y en el que un fragmento conteniendo dos copias del elemento mínimo del “insulator” cHS4 fue directamente clonado en el costado 3' en el sitio PacI. Un fragmento del 1.6 kb de repetidas teloméricas, obtenido con BamHI, fue incorporado río arriba del “insulator” del costado 5', usando el sitio BglII, para dar lugar al plásmido pTLCC. Por otro lado, el plásmido con 1.6 kb de secuencias teloméricas (TTAGGG)_n,

pSX1.6RT, fue amablemente donado por la Dra. Titia de Lange (Rockefeller University, NY, EU).

Para debilitar la fuerza del enhancer α -globina de pollo, decidimos utilizar mutaciones previamente realizadas en el laboratorio (Briones, M., tesis de maestría) Dichas mutaciones eliminaban por separado los sitios EKLF, NF-E2, el cuarto sitio GATA-1 o la combinación GATA-1/NF-E2.

Por otro lado, para el análisis de efecto de posición en células de origen humano y con el objeto de evaluar la protección del “insulator” cHS4 en un sistema heterólogo, se utilizó el plásmido antes descrito, pGCMV1, así como el pERb. Este último fue producido a través de la amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para el promotor del gen humano de retinoblastoma (450 pb) diseñados con sitios BamHI. Dicho fragmento fue clonado en el sitio BamHI del pEGFP1. Debido a la capacidad de dicho promotor para mantener por largos periodos de tiempo la expresión ectópica del gen reportero (*GFP*), y con base en la caracterización de un sitio de unión para el factor CTCF (Ver anexo 4), se decidió analizar la sensibilidad del promotor en ausencia de dicho sitio. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del promotor Rb sin el sitio CTCF, dando lugar al pERb Δ CTCF.

Para el estudio del enhancer α -globina de pollo, éste fue obtenido a través de una amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos usando ADN genómico de eritrocitos de 10 días fraccionado con la enzima EcoRI. Este elemento de regulación fue clonado río abajo del gen reportero de la luciferasa en el plásmido pGL3basic. Al menos tres versiones de dicho elemento fueron obtenidas, las cuales incorporan al elemento mínimo del enhancer (tres sitios de unión al factor GATA descritos previamente (E), el elemento mínimo mas el fragmento de 120 pb (E4) localizadas río abajo de éste, o el

fragmento de 120 pb, exclusivamente (95, 163). El promotor del gen α^D fue clonado en el sitio BglIII del plásmido conteniendo las diferentes versiones del enhancer α -globina, para dar lugar a los plásmidos: pL α D, pL α DE, pL α DE4 y pL α D4. Los promotores para los genes π y α^A fueron obtenidos por PCR con la ayuda de oligonucleótidos específicos, y clonados en los sitios KpnI/HindIII de los plásmidos que contienen las diferentes versiones del enhancer. Lo anterior dio lugar a los plásmidos: pL α A, pL α AE, pL α AE4, pL α A4, pL π , pL π E, pL π E4 y pL π 4.

La sobre-expresión del ADNc para GATA-1 de pollo fue realizada mediante el uso del vector pRSV-GATA (amablemente donado por Cecelia Trainor, NIH, EU). La producción de GATA-1 de pollo se realizó en *E. coli* utilizando el plásmido pET-GATAopt (donado por Mike Pikaart, NIH, EU), el cual posee la secuencia de dicha proteína con cambios en el uso de codones optimizados para la expresión en bacterias (134). La sobre-expresión de YY1 y Sp1 de pollo se realizó a través de la clonación de los diferentes ADNc's en los vectores de expresión pCDNA3.1. El ADNc de YY1 (donado por Kenneth Walhs y Tamar Aprahamian) fue clonado en el mismo marco de lectura de la Glutación-S-transferasa (*GST*) codificada en el plásmido de expresión pGEX-4T1 (Donado por Delia Pinto-Santini, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle,EU).

Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados son: α -GATA-1 (N-200), α -YY1, α -SP1, α -TFIIB, α -RNA Pol II, α -IgG de raton-Peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos obtenidos de Zimed fueron: monoclonal α -Laminina B y α -IgG de conejo-HRP. Los anticuerpos policlonales para las proteínas MBD2, MeCP2, Histona

H3 y H4 acetiladas, así como la dimetilación de la lisina 4 de la histona H3 fueron obtenidos de Upstate. El anticuerpo α -NF-E2p45 fue proporcionado por el Dr. James Shen (Academia Sinica, Taiwan). El anticuerpo α -Lisina 79 dimetilada fue amablemente proporcionado por el Dr. Dan Gottschling (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, EU). El Dr. Thomas Jenuwein (IMP, Viena, Austria) proporcionó anticuerpos específicos para las siguientes modificaciones: trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 y trimetilación de la lisina 20 de la histona H4.

Hibridización *in situ* fluorescente (FISH)

Las sondas fueron marcadas con dUTP fusionado a biotina o digoxigenina con un kit de “nick-translation” de acuerdo a las instrucciones de la compañía (Invitrogen). Para identificar por fluorescencia a la biotina se usó un anticuerpo anti-biotina o digoxigenina acoplado a fluoresceína. Por otro lado, se utilizó streptavidina marcada con rojo Texas en los experimentos indicados.

Las células fueron incubadas en una solución hipotónica de 75 mM de KCl por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mantuvieron en solución de fijación (metanol/ácido acético en relación 3:1) por 30 min en hielo. Las células se centrifugaron a 4°C por 5 min a 180 g y se repitió el tratamiento dos veces. 100 μ l de células (100 células/ μ l) son agregados por gotéo a laminillas cubiertas con Poly-L-Lisina. Las muestras se dejan secar durante 16 h. Posteriormente, las laminillas son desnaturalizadas en una solución de formamida (70% formamide, 2xSSC) a 72°C por 2 min, después son agregadas en una solución fría de etanol al 70% por 2 min. Subsecuentes incubaciones de dos minutos en etanol al 90 y 100% permiten deshidratar las muestras. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 min y se adiciona la sonda marcada para su posterior incubación durante 16 h a 37°C.

Después a dicha incubación, las laminillas son lavadas tres veces en solución de 50% de formamida/2xSSC a 42°C por 5 min. Posteriormente, éstas son lavadas tres veces en 2xSSC a 42°C por 5 min y un lavado final en 4xSSC a temperatura ambiente. El ruido de fondo se eliminó incubando las laminillas en una solución 4xSSC suplementada con 5% de leche libre de grasas. Para amplificar la señal se utilizó el sistema “Tyramide Signal Amplification Biotin system” (PerkinElmer) de acuerdo a las indicaciones de la compañía. Finalmente se añade medio de montaje adicionado con DAPI (UltraCruz Mounting Medium, sc-24941) y se protege con un cubreobjeto y se sella. Las laminilla fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

Análisis de la integración de un transgen en regiones teloméricas

50 µg de ADN genómico de las diferentes clonas estables fueron digeridos con la enzima *StuI* en 100 µl de volumen final en la condiciones recomendadas por la compañía (NEB). La enzima se inactivó por calor, incubando la reacción a 65°C durante 25 min. A dicha reacción se agregaron 100 µl de amortiguador de unión (2% Triton X-100/2xSSC). 5 pmoles de los oligonucleótidos (TTAGGG)₃ y (CCCTAA)₃ marcados con biotina fueron adicionados a la reacción, y, posteriormente, desnaturalizados por 5 min a 80°C. La mezcla fue incubada a 65°C, 55°C, 45°C, 35°C y a 25°C por 10 min, respectivamente. 10 µl de estreptavidina fusionada a perlas magnéticas fueron incorporados a la mezcla e incubados a 4°C durante 16 h. Las perlas se recuperaron de la mezcla usando un magneto (Novagen). La fracción no unida fue separada y el tratamiento con los oligonucleotidos biotinilados fue repetido 3 veces. La fracción unida a las perlas fue lavada 3 veces con amortiguador de unión, y finalmente fueron resuspendidas en una solución de 0.1% Triton X-100/1xSSC. Dicha mezcla fue

calentada a 80°C durante 5 min e inmediatamente la perlas fueron separadas de la solución con el uso de un magneto. El ADN restante en la fracción no unida fue recuperada con el uso de un sistema para limpiar ADN (Wizard purification system, Promega). Las fracciones unidas y no unidas a la perlas fueron separadas en un gel de agarosa al 0.8% y transferidos a membranas HybondN+ para su análisis por “Southern Blot”. Un fragmento de 800 pb conteniendo la secuencia codificante de la GFP fue usada como sonda. Dichas sondas fueron marcadas radioactivamente con [α -³²P]dCTP mediante un kit de “random primer”.

Transfección transitoria

Las células HD3 y 6C2 fueron transfectadas transitoriamente por lipofección. Para dicho fin 2×10^6 células fueron resuspendidas en 800 μ l de DMEM sin suero y colocadas en pozos de placas 6 pozos. Por otro lado, 2 μ g de plásmido de prueba fueron incubados con 200 ng de plásmido control pTK-Renilla (para normalizar la transfección, Promega) en 100 μ l de DMEM. Así mismo se mantuvo una relación 1:1 de ADN/Liposomas (Lipofectamina 2000, Invitrogen) en 200 μ l de DMEM. Ambas mezclas fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente, para posteriormente ser mezcladas por goteo e incubadas a temperatura ambiente por 20 min adicionales. Los 200 μ l finales de la mezcla son agregados a la suspensión celular y, finalmente, se incubaron por 4 h a 37°C. Después de dicho tiempo 2 ml de medio DMEM suplementado con suero fueron agregados a la transfección e incubadas por 48 h a 37°C. La transfección fue analizada por el sistema Dual Luciferasa en un luminómetro 20/20 Turner, de acuerdo con las instrucciones de la compañía (Promega).

Para los ensayos de reactivación con Tricostatina A (TSA) sobre transfecciones transitorias, la suspensión celular transfectada fue dividida a la mitad e incubada por 24 h en presencia o ausencia de TSA.

Para los ensayos de sobre-expresión, los plásmidos con los ADNc de YY1 y GATA-1 fueron co-transfectados utilizando una cantidad máxima de 3 µg, así como ajustando la cantidad de Lipofectamina a usar, conservando la misma relación (1:1). En los ensayos control se utilizó el vector de expresión vacío, usualmente pcDNA3.1A.

Extracción de ARN y RT-PCR semi-cuantitativo

Las células fueron resuspendidas en Trizol (Invitrogen) y el ARN fue aislado siguiendo las instrucciones de la compañía. El ARN mensajero fue disuelto en agua libre de RNasas y cuantificado. La reacción de transcripción reversa se realizó utilizando el sistema de Transcripción Reversa (Promega). Usualmente, 5 µg de RNA fueron mezclados con Oligo dT en un volumen de reacción de 50 µl. Las amplificaciones por PCR fueron realizadas utilizando la DNA polimerasa en presencia de [α -³²P]dCTP. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización 5 min a 95°C durante 1 ciclo, desnaturalización 5 min a 95°C por 30 segundos, apareamiento a 65°C por 30 s y una temperatura de extensión de 72°C por 50 s durante 25 ciclos de amplificación, para concluir un ciclo de extensión de 5 min a 72°C. La reacción de PCR fue diseñada para obtener de manera reproducible condiciones lineales de amplificación. Los fragmentos fueron separados en un gel de acrilamida al 6% en TBE al 0.25X. El gel fue secado y expuesto a una pantalla sensible a radiactividad y el registro se hizo en un sistema STORM. Los archivos fueron analizados con el software ImageQuant3.

Con el fin de hacer un cálculo semicuantitativo, se realizó una PCR duplex considerando dos pares de oligonucleótidos, un par que corresponde al gen de interés y otro para un gen constitutivamente expresado (β -actina). Los oligonucleótidos para amplificar los genes α -globina fueron diseñados sobre la secuencia de empalme para asegurar el análisis de ARN mensajero maduro y evitar la amplificación de secuencias de ADN genómico.

Para el promotor π se uso: PHIF (5'-TCACTGGAGAGGCTTTTTGCC-3') y PHIR (5'-GTGGGAAAGCAGCTTGAAGTT-3'). El promotor α^D , alphaDF (5'-GCTCTGACTAGGATGTTCCACC-3'); AlphaD R (5'-CTGCGACAACAGC TTGAAA TTG-3'). El promotor α^A : AlphaAF (5'-CCCTGGAAAGGATGTTCCACC-3'); AlphaAR (5'-GGCCCAGGAGTTTGAAGTTG -3'). Para el gen β -actina: BActinaF2 (5'-CCAGACATCAGGGTGTGATG -3), BActinR (5'-GAACACGGTATTGTCA CCAACTGG -3').

Lisado de células

1×10^7 células transfectadas establemente fueron centrifugadas a 2,300 g por 1 min en una microcentrifuga. La pastilla celular se resuspendió con 100 μ l de una solución de lisis RIPA (150 mM de NaCl, 1% Triton X-100 (Sigma), 0.5 % desoxicolato de sodio, 0.5% de EDTA y 50 mM de HEPES) que contenía inhibidores de fosfatasas (1 mM Na_3VO_4 y 1 mM de p-nitrofenil fosfato) e inhibidores de proteasas (50 μ g/ml Aprotinina, 25 μ g/ml Leupeptina, 25 μ g/ml Pepstatina, y 2 mM PMSF). La mezcla se incubó en hielo durante 20 min y posteriormente se centrifugó a 11,000 g durante 5 min a 4 °C en una microcentrifuga. Finalmente, el sobrenadante se recuperó y se transfiere a un tubo nuevo para ser congelado a -70°C o para ser usado inmediatamente.

Electroforesis de una dimensión

Para la separación de proteínas de extractos celulares se realizaron geles de poliacrilamida. La cámara de electroforesis (BioRad) se montó como lo sugiere el fabricante. Se prepararon geles (resolvedor) al 10% a YY1, GATA-1 y Sp1. Los geles al 10% de acrilamida se prepararon mediante la mezcla de 1.25 ml de solución amortiguadora de corrida (48 mM de HCl, 3 M Tris base, pH= 8.9), 2.5 ml de la solución de acrilamida al 40 % (38.96 g de acrilamida (Invitrogen), 1.04 g de bis-acrilamida (Invitrogen) en agua desionizada), 100 µl de 10% dodecil sulfato de sodio (SDS), 100 µl de 10% persulfato de amonio (APS), 10 µl de TEMED y llevando todo a 10 ml con agua desionizada. A la mezcla resultante se le permite polimerizar en la cámara de electroforesis, asimismo por encima del gel se coloca una capa de n-butanol para dejar el borde superior del gel uniforme. Después de la polimerización del gel, el n-butanol se retira.

Para formar el gel concentrador (3.5% de acrilamida) se mezclaron 1.25 ml de solución amortiguadora concentradora (500 mM Tris base pH= 6.7 en agua desionizada), 0.75 ml de acrilamida 40%, 100 µl de 10% SDS, 100 µl de 10% APS, 10 µl de TEMED y llevando todo a 10 ml con agua desionizada. A la cámara de electroforesis (con los geles de 12 o 7.5% de acrilamida) se le colocó un peine de 0.5 mm y sobre el gel resolvedor polimerizado se agrega la mezcla del gel concentrador, a este último se le permite polimerizar. Las muestras de interés fueron mezcladas con el amortiguador de muestras (5 ml de la solución amortiguadora concentradora, 1 g SDS, 4 ml de glicerol, 5 mg de azul de bromofenol), posteriormente, las muestras son hervidas durante 5 min a 100°C y cargadas en los geles. Los geles se corren en una

solución amortiguadora de corrida (25 mM Tris base, 190 mM glicina y 1 % SDS en agua desionizada) a 20 mA por aproximadamente 30 min.

Inmunodetecciones

La membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se humedeció con metanol por 15 s, se enjuaga con agua destilada y se incuba 15 min en solución amortiguadora de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina y 20 % de metanol, pH= 8.3). Por otro lado, el gel en donde se resolvieron las proteínas de interés se montó en el dispositivo de transferencia. El dispositivo se instala colocando: una esponja, papel filtro, el gel, la membrana de PVDF, una segunda capa de papel filtro y por último otra esponja. La transferencia se realiza en aparatos para minigeles (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante colocando la membrana en dirección al polo positivo, a 500 mA por 2 h.

La membrana de PVDF con las proteínas transferidas, se lavó dos veces con PBS y se dejó en una solución bloqueadora (5% leche Carnation libre de grasas, 1% BSA y 0.05 % Tween-20 en PBS) durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo deseado diluido en la solución bloqueadora. La membrana se lavó cinco veces con PBS y se deja incubando durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa) diluido en la solución bloqueadora. La membrana se lava cinco veces con PBS y se transfiere a un recipiente que contenga el substrato quimioluminiscente "SuperSignal" (PIERCE) durante 5 min. Finalmente, la membrana se expone por 10 min o más a una placa fotográfica para rayos X.

Co-Inmunoprecipitación de proteínas

100 μ l de lisado celular se colocaron en un tubo eppendorf y se le agrega 1 μ g del anticuerpo deseado. La mezcla se incubó durante 2 h a 4°C en agitación en una rueda giratoria. Posteriormente, al lisado se le agregó 40 μ l de proteína A-Sefarosa (Pharmacia Biotech.) disuelta en PBS y todo se incubó por 4 h a 4 °C en la rueda giratoria. Después, la mezcla se centrifugó a 800 g durante 1 min en microcentrifuga y el botón de los complejo con proteína A agarosa se lavó dos veces con la solución RIPA y cinco veces con PBS. Posteriormente, la proteína A-Sefarosa se mezcló con 35 μ l de solución amortiguadora de muestra y se hierve a 100 °C durante 5 min. La mezcla resultante se centrifugó a 800 g durante 1 min en microcentrifuga y se recupera el sobrenadante. El contenido del sobrenadante se analiza por inmunodetección.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y ReChIP

1×10^7 de células fueron usadas por cada anticuerpo a probar. Las células fueron lavadas dos veces con PBS suplementado con 2% de SFB. Las células fueron resuspendidas in PBS más 1% de formaldehído de concentración final durante 8 min. La células son lavadas dos veces con PBS frío suplementado con 1 mM PMSF. Las células fueron resuspendidas en amortiguador de lisis (1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1 mas inhibidores de proteasas) e incubados por 10 min en hielo. La muestra fue sonicada con el fin de fragmentar la cromatina en tamaño que rondan las 200-500 pb (este rango es corroborado por electroforesis). Las muestras fueron diluidas 10 veces con la solución de dilución (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1 mas inhibidores de proteasas). Con el fin de reducir el ruido de fondo, la solución fue incubada con perla de proteína A-agarosa (Santa Cruz

Biotechnology) previamente bloqueadas (PBS suplementado con 0.5% BSA, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón incubadas al menos por 12 h a 4°C) y 20 µg de esperma de salmón por 2 h a 4°C.

Las perlas fueron removidas por una centrifugación a 800 g por 5 min. La muestra se dividió en alícuotas de 1 ml e incubada con el anticuerpo de interés a 4°C en un agitador giratorio durante toda la noche. Posteriormente, 20 µl de perlas de proteína A-agarosa prebloqueadas fueron agregadas e incubadas por 4 h a 4°C. Las perlas fueron recuperadas por una centrifugación de a 800 g por 5 min. La fracción no unida en algunos casos fue conservada y el ADN de dicha fracción recuperado para su posterior análisis. Las perlas fueron lavadas una vez con cada uno de lo siguientes amortiguadores: Paro I (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1), Paro II (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1), Paro III (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1) y TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM EDTA), cada uno de los amortiguadores suplementados con inhibidores de proteasas. Las perlas fueron incubadas en 1% de SDS, 0.1 M NaHCO₃ mas Proteinase K (Sigma) a una concentración final de 0.1 mg/ml. La fracción soluble fue recuperada y limpiada con el sistema de purificación para PCR Minielute (Qiagen). PCR duplex en presencia de [α -³²P]dCTP y los fragmentos amplificados fueron separados en un gel de acrilamida al 6%. El gel fue analizado como se describió previamente.

El experimento de ReChIP es similar al descrito, sin embargo en esta ocasión en el último lavado de las perlas, éstas fueron resuspendidas en amortiguador TE (100 µl) suplementado con 10 mM de Ditiotritiol (DTT), para disociar el primer anticuerpo. La suspensión se incubó por 30 min a 37°C. Transcurrido dicho tiempo, la perlas fueron

removidas por centrifugación a 800 g por 1 min y la suspensión se transfirió a un tubo nuevo. La muestra fueron diluidos 10 veces con amortiguador de dilución y el segundo anticuerpo es agregado e incubado a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se agregaron perlas prebloqueadas y se incubó la suspensión a 4°C durante 2 h. Finalmente, se prosigue con el protocolo ya descrito. Los oligonucleótidos usados para los experimentos de ChIP son descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los elementos de regulación del dominio α -globina.

Región Amplificada	Oligonucleotido (5'>3')	Orientación
Promotor π	CGGGATCCGCTCAAAATCCATTGAAAGGCAGG CGGGATCCCCAGAGCAGGTTGTAAGT	Forw Rev
Region control	GTGACCTGCTGGTCGTAAGTGGGAGC CTTCAGCGCCGTGCCCTCAGTG	Forw Rev
Promotor α^D	CGGGATCCCCTGCATGCAGTGTGGAGC CGGGATCCGGGCTGGTGGCTGGTGG	Forw Rev
Región control	GTGACCTGCTGGTCGTAAGTGGGAGC CTTCAGCGCCGTGCCCTCAGTG	Forw Rev
Promoter α^A	CGGGATCCCTCCACCTGCACCAAGGCAGACC CGGGATCCGTGCCCTGAAGTCTGCTGTCAGC	Forw Rev
Región control	GTGACCTGCTGGTCGTAAGTGGGAGC CTTCAGCGCCGTGCCCTCAGTG	Forw Rev
α globin Enhancer	GACGTGGGCAGCAGATAGCCTCG GCCGGACCCCAATGGTGCCAG	Forw Rev
Región control	CAGTCTGTCAGGAAGAAAGA TGTGGCC TGGTTTTAGCTG	Forw Rev
GFP	ACATGAAGCAGCAGCACTTC TGCTCAAGGTAGTGGTTGTC	Forw Rev
Control eucromatina	GTGACCTGCTGGTCGTAAGTGGGAGC CTTCAGCGCCGTGCCCTCAGTG	Forw Rev
Control heterocromatina		Forw Rev
Isla CpG 5'	GTGACCTGCTGGTCGTAAGTGGGAGC CTTCAGCGCCGTGCCCTCAGTG	

Forw, representa la cadena 5'-3'

Rev, representa la cadena 3'-5' (complementaria)

La abundancia relativa para cada anticuerpo fue calculada usando la siguiente ecuación: enriquecimiento = Ac (señal de la región X / señal de la región control)/ genómico (señal de la región X/ señal de la región control). Las condiciones de PCR se normalizan para obtener el rango de amplificación lineal de la reacción.

Análisis de interacción proteína-proteína por “Pull-Down”

La secuencia correspondiente al ADNc de YY1 de pollo fue introducida en el plásmido pGEX-4T1 y expresada como una fusión a la secuencia de la Glutación-S-transferasa en la cepa de *E. coli* BL21. La proteína de fusión fue inmovilizada a perlas de Sefarosa unidas a glutatión e incubadas con 500 µg de extracto celular por 6 h a 4°C. Las perlas son lavadas 3 veces con PBS y, finalmente, resuspendidas en 30 µl de amortiguador Laemmli. Las proteínas unidas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10% y transferidas a membrana de PDVF. La detección de la proteína de interés se realizó por métodos inmunológicos.

Análisis de metilación del ADN mediante bisulfito de sodio

1 µg de ADN genómico purificado a partir de las diferentes líneas celulares o cultivos primarios fueron digeridos con la enzima ScaI o BamHI dependiendo de la región a analizar. El ADN digerido fue desnaturalizado a 95°C por 5 min, enfriado en hielo por 2 min e incubado con 0.3 M de NaOH (volumen final: 20 µl) a 37°C por 30 min. Posteriormente, una solución de bisulfito de sodio / hidroquinona (1.7 M y 0.5 mM, respectivamente), cuyo pH fue ajustado a 5.0 con NaOH preparado al momento, fue adicionado al ADN digerido en un volumen final de 240 µl. La solución fue mezclada suavemente e incubada a 55°C durante >16 h. El ADN fue limpiado con columnas de purificación Wizard (Promega) de acuerdo a las indicaciones de la compañía. El ADN purificado fue incubado con NaOH a una concentración final de 0.3 M por 30 min a 37°C, posteriormente, se utilizó el sistema de purificación de ADN ya mencionado para eliminar el exceso de NaOH. El ADN tratado con bisulfito se conserva a -20°C. Reacciones de amplificación consecutivas fueron realizadas con los siguientes

oligonucleótidos, los cuales fueron diseñados para analizar la metilación del ADN del sitio CTCF en la isla CpG localizada 5kb río arriba del gen embrionario (20 pmol/ μ l de cada uno). SRbiF1: 5'-GTGTTTTTAGT(C/T)GGTTGTTGT-3' y SRBIR1: 5'-CTATACTATAATAAAAATATAAAA-3'; para la segunda reacción se usaron 5 μ l de la primera reacción y los oligonucleótidos (20 pmol/ μ l de cada uno) SRbisF2: 5'-TTTT(C/G)GGGGTGTTTTA(C/G)GGTTGTTGT-3' y SRbisF2: 5'-CTAAACTAAATAAAAAACACAAAAACTCAA-3'). La reacción de la segunda amplificación fue separada en un gel de agarosa al 1.5% y el fragmento de interés recuperado y purificado. El fragmento de amplificación se clonó en el plásmido pDrive usando un sistema de clonación para fragmentos de PCR (Quiagen). Las clonas positiva fueron seleccionadas con base en su capacidad de no formar colonias positivas a X-Gal y por análisis con enzimas de restricción. Las clonas positivas fueron secuenciadas a partir del oligonucleótido SP6 usando el secuenciador de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM.

PCR sensible a metilación

Ensayo diseñado para el análisis rápido del estado de metilación del ADN, ya que el ADN genómico tratado con bisulfito de sodio fue utilizado en una reacción de PCR con oligonucleótidos que discriminan entre citosinas metiladas o transformadas. El ADN genómico de las diferentes clonas fue tratado con bisulfito de sodio de acuerdo al procedimiento ya descrito. 5 μ l del ADN tratado fue agregado a una reacción de amplificación usando los siguientes oligonucleótidos que discriminan entre citocinas metiladas (Met) y citocinas transformadas (no metiladas, nmet) a una concentración de 20 pmoles por reacción. Para el promotor α^D , aDms1.1 (Met, Oligonucleótido sentido):

5'-TATAG TTACGGTTTTTTTCGTGC-3'. aDms1.2 (nmet, Oligonucleótido sentido): 5'-GTAT AGTTATGGTTTTTTTGTGT. aDmsR1 (Oligonucleótido antisentido): 5'-CCAAATACCCCTAAACCTAA-3'. Para el promotor embrionario π , phims1.1 (met, Oligonucleótido sentido): 5'-TTAGGTTATACGGTTAATAC-3'. phims1.2 (nmet, Oligonucleótido sentido): 5'-TTAGGTTATATGGTTAATAT-3'. (Oligonucleótido antisentido) 5'-GGATTGTTGTTTTAGTTTTTTT-3'. Las reacciones se amplificaron por PCR se realizaron con 40 ciclos y Tm's específicas para cada par de oligonucleótidos. Los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%.

Análisis de la metilación del ADN por enzimas de restricción metilo-sensibles.

10 μ g de ADN genómico de las diferentes líneas celulares y cultivos primarios fueron digeridos con BamHI y HindIII para obtener fragmentos parentales, así como con 150 U de la enzima metilo-sensible HpaII o de su isosquisómero, MspI durante toda la noche. Las proteínas de la muestra fueron removidas con dos extracciones con fenol-cloroformo y el ADN fue posteriormente precipitado con etanol. El ADN fue resuspendido en agua y los fragmentos separados en un gel de agarosa al 1.5%. Las muestras fueron transferidas a una membrana HybondN+ y analizadas por "Southern Blot". Los fragmentos de ADN usados como sondas fueron obtenidos a partir de los plásmidos pL π , pL α D y pL α A que contenían los diferentes promotores α -globina. La membrana fue expuesta a películas de rayos X o a una pantalla sensible a radioactividad. Para desnudar la membrana y ser re-utilizada, la membrana fue lavada dos veces con una solución hirviendo de SDS al 1% con 50 mM de NaOH.

Diferenciación de células HD3

Las células HD3 se encuentran arrestadas en un estadio de eritroblastos, pero dicho arresto puede ser revertido mediante la incubación de las células a 42°C. Dicha cualidad puede ser usada para establecer un sistema inducible de diferenciación. Células HD3 fueron cultivadas en medio de diferenciación (DMEM suplementado con 10% SFB, 10% suero de pollo, 1 mg/ml BSA y 100 mM β -mercaptoetanol) y en presencia de 5% de suero de pollo anémico a 42°C por 5, 10 o 12 días. El suero de pollo anémico se obtuvo a través de desangrar por dos días consecutivo gallinas de primera puesta (12 semanas). Finalmente al tercer día los animales son sangrados a blanco. El suero se obtuvo a través de incubar la sangre por 1 h a temperatura ambiente y 1 h a 4°C. La sangre se centrifuga a 800 g por 10 min a 4°C. Alrededor de 8 ml de suero de cada gallina fueron colectados bajo las circunstancias ya descritas. Para determinar la diferenciación de las células HD3, estas fueron teñidas con benzidina en medio ácido (0.5% benzidina en 0.3% V/V de H₂O₂ y 1 M de ácido acético) y analizadas en microscopio de luz. El porcentaje de diferenciación es variable, pero en condiciones óptimas, se ha obtenido un 70% de células diferenciadas.

Las siguientes metodologías se encuentran completamente descritas en el anexo 2, mediante la publicación “Sustained heterologous transgene expression in mammalian and avian cell lines” en la revista Methods in Molecular Biology durante el 2004.

1 Linearización de plásmidos para transfecciones estables

2 Transfección estable

3 Selección de clonas estables para líneas celulares en suspensión o adheridas.

4 Extracción de ADN genómico

5 Southern Blot

6 Análisis de fluorescencia por Citometría de Flujo

23 Referencias

1. **Agalioti, T., S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis, and D. Thanos.** 2000. Ordered Recruitment of Chromatin Modifying and General Transcription Factors to the IFN-[beta] Promoter. *Cell* **103**:667-78.
2. **Ahmad, K., and S. Henikoff.** 2002. Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99 Suppl 4**:16477-84.
3. **Allshire, R. C., J. P. Javerzat, N. J. Redhead, and G. Cranston.** 1994. Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell* **76**:157-69.
4. **Amor, D. J., P. Kalitsis, H. Sumer, and K. H. Andy Choo.** 2004. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends in Cell Biology* **14**:359-65.
5. **Anguita, E., J. Hughes, C. Heyworth, G. Blobel, W. Wood, and D. Higgs.** 2004. Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *The EMBO Journal* **23**:2841-52.
6. **Anguita, E., C. A. Johnson, W. G. Wood, B. M. Turner, and D. R. Higgs.** 2001. Identification of a conserved erythroid specific domain of histone acetylation across the alpha-globin gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:12114-9.
7. **Aparicio, O. M., B. L. Billington, and D. E. Gottschling.** 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**:1279-87.
8. **Aparicio, O. M., and D. E. Gottschling.** 1994. Overcoming telomeric silencing: a trans-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes & Development* **8**:1133-46.
9. **Bachman, K. E., B. H. Park, I. Rhee, H. Rajagopalan, J. G. Herman, S. B. Baylin, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 2003. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* **3**:89-95.
10. **Baur, J., W. Wright, and J. Shay.** 2004. Analysis of mammalian telomere position effect. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **287**:121-36.
11. **Baur, J. A., Y. Zou, J. W. Shay, and W. E. Wright.** 2001. Telomere Position Effect in Human Cells. *Science* **292**:2075-77.
12. **Bender, M. A., M. Bulger, J. Close, and M. Groudine.** 2000. β -globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous [beta]-globin locus in mice do not require the locus control region. *Molecular Cell* **5**:387-93.
13. **Bender, M. A., R. Byron, T. Ragozy, A. Telling, M. Bulger, and M. Groudine.** 2006. Flanking HS-62.5 and 3'HS1, and regions upstream of the LCR are not required for β -globin transcription. *Blood* **108**:1395-401.
14. **Bender, M. A., M. G. Mehaffey, A. Telling, B. Hug, T. J. Ley, M. Groudine, and S. Fiering.** 2000. Independent formation of DnaseI hypersensitive sites in the murine beta -globin locus control region. *Blood* **95**:3600-04.
15. **Bernstein, E., E. M. Duncan, O. Masui, J. Gil, E. Heard, and C. D. Allis.** 2006. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA

- and are enriched in facultative heterochromatin. *Molecular and Cellular Biology* **26**:2560-69.
16. **Beug, H., G. Doederlein, C. Freudenstein, and T. Graf.** 1982. Erythroblast cell lines transformed by a temperature-sensitive mutant of avian erythroblastosis virus: a model system to study erythroid differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology* **1**:195-207.
 17. **Beug, H., S. Palmieri, C. Freudenstein, H. Zentgraf, and T. Graf.** 1982. Hormone-dependent terminal differentiation in vitro of chicken erythroleukemia cells transformed by ts mutants of avian erythroblastosis virus. *Cell* **28**:907-19.
 18. **Beug, H., A. von Kirchbach, G. Doderlein, J. F. Conscience, and T. Graf.** 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* **18**:375-90.
 19. **Bhattacharyya, M. K., and A. J. Lustig.** 2006. Telomere dynamics in genome stability. *Trends in Biochemical Sciences* **31**:114-22.
 20. **Blasco, M. A.** 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews in Genetics* **6**:611-22.
 21. **Bottardi, S., A. Aumont, F. Grosveld, and E. Milot.** 2003. Developmental stage-specific epigenetic control of human {beta}-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. *Blood* **102**:3989-97.
 22. **Brasset, E., and C. Vaury.** 2005. Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes. *Heredity* **94**:571-6.
 23. **Brown, J. M., J. Leach, J. E. Reittie, A. Atzberger, J. Lee-Prudhoe, W. G. Wood, D. R. Higgs, F. J. Iborra, and V. J. Buckle.** 2006. Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *Journal of Cellular Biology* **172**:177-87.
 24. **Bulger, M.** 2005. Hyperacetylated chromatin domains: Lessons from heterochromatin. *Journal of Biological Chemistry* **280**:21689-92.
 25. **Bulger, M., and M. Groudine.** 1999. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes & Development* **13**:2465-77.
 26. **Bulger, M., and M. Groudine.** 2002. TRAPping enhancer function. *Nature Genetics* **32**:555-6.
 27. **Bulger, M., T. Sawado, D. Schubeler, and M. Groudine.** 2002. ChIPs of the beta-globin locus: unraveling gene regulation within an active domain. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**:170-7.
 28. **Burgess-Beusse, B., C. Farrell, M. Gaszner, M. Litt, V. Mutskov, F. Recillas-Targa, M. Simpson, A. West, and G. Felsenfeld.** 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **99**:16433-37.
 29. **Bustin, M., F. Catez, and J.-H. Lim.** 2005. The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Molecular Cell* **17**:617-25.
 30. **Cantor, A. B.** 2005. GATA transcription factors in hematologic disease. *International Journal of Hematology* **81**:378-84.
 31. **Capelson, M., and V. G. Corces.** 2004. Boundary elements and nuclear organization. *Biological Cell* **96**:617-29.

32. **Catez, F., H. Yang, K. J. Tracey, R. Reeves, T. Misteli, and M. Bustin.** 2004. Network of dynamic interactions between histone H1 and High-Mobility-Group proteins in chromatin. *Molecular and Cellular Biology* **24**:4321-28.
33. **Cavalli, G., and R. Paro.** 1998. Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **10**:354-60.
34. **Chai, W., Q. Du, J. W. Shay, and W. E. Wright.** 2006. Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Molecular Cell* **21**:427-35.
35. **Cho, D. H., C. P. Thienes, S. E. Mahoney, E. Analau, G. N. Filippova, and S. J. Tapscott.** 2005. Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Molecular Cell* **20**:483-9.
36. **Choo, K. H.** 2000. Centromerization. *Trends in Cell Biology* **10**:182-8.
37. **Cryderman, D. E., E. J. Morris, H. Biessmann, S. C. Elgin, and L. L. Wallrath.** 1999. Silencing at Drosophila telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles. *The EMBO Journal* **18**:3724-35.
38. **de la Serna, I. L., Y. Ohkawa, and A. N. Imbalzano.** 2006. Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nature Review in Genetics* **7**:461-73.
39. **de Lange, T.** 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* **19**:2100-10.
40. **Dean, A.** 2006. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends in Genetics* **22**:38-45.
41. **Dean, W., D. Lucifero, and F. Santos.** 2005. DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**:98-111.
42. **Deininger, P. L., and M. A. Batzer.** 2002. Mammalian retroelements. *Genome Research* **12**:1455-65.
43. **Dekker, J.** 2003. A closer look at long-range chromosomal interactions. *Trends in Biochemical Sciences* **28**:277-80.
44. **Dillon, N., and R. Festenstein.** 2002. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends in Genetics* **18**:252-61.
45. **Dobosy, J. R., and E. U. Selker.** 2001. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**:721-7.
46. **Doerfler, W.** 2005. On the biological significance of DNA methylation. *Biochemistry (Mosc)* **70**:505-24.
47. **Elgin, S. C. R., and S. I. S. Grewal.** 2003. Heterochromatin: silence is golden. *Current Biology* **13**:R895-910.
48. **Ellis, J., K. C. Tan_Un, A. Harper, D. Michalovich, N. Yannoutsos, S. Philipsen, and F. Grosveld.** 1996. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *The EMBO Journal* **15**:562-8.
49. **Epner, E., A. Reik, D. Cimbara, A. Telling, M. A. Bender, S. Fiering, T. Enver, D. I. Martin, M. Kennedy, G. Keller, and M. Groudine.** 1998. The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Molecular Cell* **2**:447-55.

50. **Fan, Y., T. Nikitina, J. Zhao, T. J. Fleury, R. Bhattacharyya, E. E. Bouhassira, A. Stein, C. L. Woodcock, and A. I. Skoutchi.** 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* **123**:1199-209.
51. **Farrell, C. M., A. G. West, and G. Felsenfeld.** 2002. Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human beta-globin loci. *Molecular and Cellular Biology* **22**:3820-31.
52. **Felsenfeld, G.** 1993. Chromatin structure and the expression of globin-encoding genes. *Gene* **135**:119-24.
53. **Felsenfeld, G., J. Boyes, J. Chung, D. Clark, and V. Studitsky.** 1996. Chromatin structure and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:9384-8.
54. **Felsenfeld, G., B. Burgess-Beusse, C. Farrell, M. Gaszner, R. Ghirlando, S. Huang, C. Jin, M. Litt, F. Magdinier, V. Mutskov, Y. Nakatani, H. Tagami, A. West, and T. Yusufzai.** 2004. Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **69**:245-50.
55. **Felsenfeld, G., and M. Groudine.** 2003. Controlling the double helix. *Nature* **421**:448-53.
56. **Feng, Y.-Q., R. Warin, T. Li, E. Olivier, A. Besse, A. Lobell, H. Fu, C. M. Lin, M. I. Aladjem, and E. E. Bouhassira.** 2005. The human β -Globin Locus Control Region can silence as well as activate gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **25**:3864-74.
57. **Ferreira, R., K. Ohneda, M. Yamamoto, and S. Philipsen.** 2005. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology* **25**:1215-27.
58. **Filippova, G. N., C. P. Thienes, B. H. Penn, D. H. Cho, Y. J. Hu, J. M. Moore, T. R. Klesert, V. V. Lobanekov, and S. J. Tapscott.** 2001. CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nature Genetics* **28**:335-43.
59. **Fischle, W., B. S. Tseng, H. L. Dormann, B. M. Ueberheide, B. A. Garcia, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, H. Funabiki, and C. D. Allis.** 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**:1116.
60. **Flint, J., C. Tufarelli, J. Peden, K. Clark, R. J. Daniels, R. Hardison, W. Miller, S. Philipsen, K. C. Tan-Un, T. McMorrow, J. Frampton, B. P. Alter, A. M. Frischauf, and D. R. Higgs.** 2001. Comparative genome analysis delimits a chromosomal domain and identifies key regulatory elements in the alpha globin cluster. *Human Molecular Genetics* **10**:371-82.
61. **Fraser, P.** 2006. Transcriptional control thrown for a loop. *Current Opinion in Genetics & Development* **In Press, Corrected Proof**.
62. **Gaszner, M., and G. Felsenfeld.** 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Review in Genetics* **7**:703-13.
63. **Gause, M., P. Morcillo, and D. Dorsett.** 2001. Insulation of enhancer-promoter communication by a gypsy transposon insert in the *Drosophila* cut gene: cooperation between suppressor of hairy-wing and modifier of mdg4 proteins. *Molecular and Cellular Biology* **21**:4807-17.

64. **Geiman, T. M., and K. D. Robertson.** 2002. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *Journal of Cellular Biochemistry* **87**:117-25.
65. **Gerasimova, T. I., and V. G. Corces.** 2001. Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization. *Annual Review of Genetics* **35**:193-208.
66. **Geyer, P. K.** 1997. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Current Opinion in Genetics and Development* **7**:242-8.
67. **Goetze, S., A. Baer, S. Winkelmann, K. Nehlsen, J. Seibler, K. Maass, and J. Bode.** 2005. Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Molecular and Cellular Biology* **25**:2260-72.
68. **Gonzalo, S., I. Jaco, M. F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller, and M. A. Blasco.** 2006. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature Cellular Biology* **8**:416-424.
69. **Graf, T.** 2002. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* **99**:3089-101.
70. **Grosveld, F., P. Rodriguez, N. Meier, S. Krpic, F. Pourfarzad, P. Papadopoulos, K. Kolodziej, G. P. Patrinos, A. Hostert, and J. Strouboulis.** 2005. Isolation and characterization of hematopoietic transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci* **1054**:55-67.
71. **Groudine, M., H. Holtzer, K. Scherrer, and A. Therwath.** 1974. Lineage-dependent transcription of globin genes. *Cell* **3**:243-7.
72. **Groudine, M., M. Peretz, and H. Weintraub.** 1981. Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryos. *Molecular and Cellular Biology* **1**:281-8.
73. **Groudine, M., and H. Weintraub.** 1981. Activation of globin genes during chicken development. *Cell* **24**:393-412.
74. **Hahn, S.** 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature Structural and Molecular Biology* **11**:394-403.
75. **Hanazono, Y., K. Terao, and K. Ozawa.** 2001. Gene transfer into nonhuman primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells* **19**:12-23.
76. **Hashimshony, T., J. Zhang, I. Keshet, M. Bustin, and H. Cedar.** 2003. The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nature Genetics* **34**:187-92.
77. **Henikoff, S.** 2005. Histone modifications: Combinatorial complexity or cumulative simplicity? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:5308-09.
78. **Henikoff, S., and K. Ahmad.** 2005. Assembly of variant histones into chromatin. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* **21**:133-53.
79. **Henikoff, S., T. Furuyama, and K. Ahmad.** 2004. Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends in Genetics* **20**:320-35.
80. **Hernandez-Hernandez, A., P. Ray, G. Litos, M. Ciro, S. Ottolenghi, H. Beug, and J. Boyes.** 2006. Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *The EMBO journal* **25**:3264-74.
81. **Hiragami, K., and R. Festenstein.** 2005. Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **62**:2711-26.

82. **Hu, X., M. Bulger, J. N. Roach, S. K. Eszterhas, E. Olivier, E. E. Bouhassira, M. T. Groudine, and S. Fiering.** 2003. Promoters of the murine embryonic beta-like globin genes *Ey* and *betah1* do not compete for interaction with the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:1111-5.
83. **Huo, X., and J. Zhang.** 2005. Important roles of reversible acetylation in the function of hematopoietic transcription factors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**:103-12.
84. **Igor F. Zhimulev, E. S. B.** 2003. Intercalary heterochromatin and genetic silencing. *BioEssays* **25**:1040-51.
85. **Jeffrey, M. C.** 2005. Heterochromatin - many flavours, common themes. *BioEssays* **27**:17-28.
86. **Jiang, G., F. Yang, C. Sanchez, and M. Ehrlich.** 2004. Histone modification in constitutive heterochromatin versus unexpressed euchromatin in human cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **93**:286-300.
87. **Kamakaka, R. T., and S. Biggins.** 2005. Histone variants: deviants? *Genes & Development* **19**:295-316.
88. **Kang, S.-H. L., P. P. Levings, F. Andersen, P. J. Laipis, K. I. Berns, R. T. Zori, and J. Bungert.** 2004. Locus control region elements HS2 and HS3 in combination with chromatin boundaries confer high-level expression of a human β -globin transgene in a centromeric region. *Genes to Cells* **9**:1043-53.
89. **Kimura, A., and M. Horikoshi.** 2004. Partition of distinct chromosomal regions: negotiable border and fixed border. *Genes to Cells* **9**:499-508.
90. **Kingsley, P. D., J. Malik, R. L. Emerson, T. P. Bushnell, K. E. McGrath, L. A. Bloedorn, M. Bulger, and J. Palis.** 2006. "Maturation" globin switching in primary primitive erythroid cells. *Blood* **107**:1665-72.
91. **Kioussis, D., and R. Festenstein.** 1997. Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals. *Current Opinion in Genetics and Development* **7**:614-9.
92. **Kitajima, K., J. Zheng, H. Yen, D. Sugiyama, and T. Nakano.** 2006. Multipotential differentiation ability of GATA-1-null erythroid-committed cells. *Genes & Development* **20**:654-659.
93. **Klochkov, D., H. Rincon-Arango, E. S. Ioudinkova, V. Valadez-Graham, A. Gavrillov, F. Recillas-Targa, and S. V. Razin.** 2006. A CTCF-Dependent Silencer Located in the Differentially Methylated Area May Regulate Expression of a Housekeeping Gene Overlapping a Tissue-Specific Gene Domain. *Molecular and Cellular Biology* **26**:1589-97.
94. **Klose, R. J., and A. P. Bird.** 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* **31**:89-97.
95. **Knezetic, J. A., and G. Felsenfeld.** 1989. Identification and characterization of a chicken alpha-globin enhancer. *Molecular and Cellular Biology* **9**:893-901.
96. **Kosak, S. T., and M. Groudine.** 2004. Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes & Development* **18**:1371-84.
97. **Kosak, S. T., and M. Groudine.** 2002. The undiscovered country: chromosome territories and the organization of transcription. *Developmental Cell* **2**:690-2.
98. **Kransdorf, E. P., S. Z. Wang, S. Z. Zhu, T. B. Langston, J. W. Rupon, and G. D. Ginder.** 2006. MBD2 is a critical component of a methylcytosine binding protein complex isolated from primary erythroid cell. **In Press, Corrected Proof.**

99. **Kulesa, H., J. Frampton, and T. Graf.** 1995. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes & Development* **9**:1250-62.
100. **Labrador, M., and V. G. Corces.** 2002. Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell* **111**:151-4.
101. **Lamonica, J. M., C. R. Vakoc, and G. A. Blobel.** 2006. Acetylation of GATA-1 is required for chromatin occupancy. *In Press, Corrected Proof.*
102. **Lehnertz, B., Y. Ueda, A. A. Derijck, U. Braunschweig, L. Perez-Burgos, S. Kubicek, T. Chen, E. Li, T. Jenuwein, and A. H. Peters.** 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology* **13**:1192-200.
103. **Lemon, B., and R. Tjian.** 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Development* **14**:2551-69.
104. **Levings, P. P., and J. Bungert.** 2002. The human β -globin locus control region. A center of attraction. *European Journal of Biochemistry* **269**:1589-99.
105. **Levings, P. P., Z. Zhou, K. F. Vieira, V. J. Crusselle-Davis, and J. Bungert.** 2006. Recruitment of transcription complexes to the beta-globin locus control region and transcription of hypersensitive site 3 prior to erythroid differentiation of murine embryonic stem cells. *FEBS Journal* **273**:746-55.
106. **Li, E.** 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews in Genetics* **3**:662-73.
107. **Li, Q., S. Harju, and K. R. Peterson.** 1999. Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends in Genetics* **15**:403-8.
108. **Ling, J. Q., T. Li, J. F. Hu, T. H. Vu, H. L. Chen, X. W. Qiu, A. M. Cherry, and A. R. Hoffman.** 2006. CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science* **312**:269-72.
109. **Litt, M. D., M. Simpson, M. Gaszner, C. D. Allis, and G. Felsenfeld.** 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* **293**:2453-5.
110. **Lomvardas, S., G. Barnea, D. J. Pisapia, M. Mendelsohn, J. Kirkland, and R. Axel.** 2006. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* **126**:403-13.
111. **Lomvardas, S., and D. Thanos.** 2001. Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo. *Cell* **106**:685-96.
112. **Lorincz, M. C., D. Schubeler, and M. Groudine.** 2001. Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized histone H3 deacetylation. *Molecular and Cellular Biology* **21**:7913-22.
113. **Lowry, J. A., and J. P. Mackay.** 2006. GATA-1: one protein, many partners. *International Journal of Biochemical and Cellular Biology* **38**:6-11.
114. **Martin, C., and Y. Zhang.** 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Review in Molecular and Cellular Biology* **6**:838-49.
115. **Martin, D. I., and E. Whitelaw.** 1996. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays* **18**:919-23.
116. **McKittrick, E., P. R. Gafken, K. Ahmad, and S. Henikoff.** 2004. From The Cover: Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:1525-30.

117. **Michel, B., P. Komarnitsky, and S. Buratowski.** 1998. Histone-like TAFs are essential for transcription in vivo. *Molecular Cell* **2**:663-73.
118. **Misteli, T.** 2005. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays* **27**:477-87.
119. **Misteli, T.** 2004. Spatial positioning: A new dimension in genome function. *Cell* **119**:153.
120. **Mutskov, V., and G. Felsenfeld.** 2004. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO Journal* **23**:138-49.
121. **Mutskov, V. J., C. M. Farrell, P. A. Wade, A. P. Wolffe, and G. Felsenfeld.** 2002. The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes & Development* **16**:1540-54.
122. **Narlikar, G. J., H. Y. Fan, and R. E. Kingston.** 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**:475-87.
123. **Neff, T., F. Shotkoski, and G. Stamatoyannopoulos.** 1997. Stem cell gene therapy, position effects and chromatin insulators. *Stem Cells* **15 Suppl 1**:265-71.
124. **Nelson, C. J., H. Santos-Rosa, and T. Kouzarides.** 2006. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**:905-21.
125. **Osborne, C. S., L. Chakalova, K. E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J. A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser.** 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genetics* **36**:1065.
126. **Pal-Bhadra, M., B. A. Leibovitch, S. G. Gandhi, M. Rao, U. Bhadra, J. A. Birchler, and S. C. Elgin.** 2004. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* **303**:669-72.
127. **Palis, J., and G. B. Segel.** 1998. Developmental biology of erythropoiesis. *Blood Reviews* **12**:106-14.
128. **Paro, R., H. Strutt, and G. Cavalli.** 1998. Heritable chromatin states induced by the Polycomb and trithorax group genes. *Novartis Foundation Symposium* **214**:51-61; discussion 61-6, 104-13.
129. **Pavri, R., B. Zhu, G. Li, P. Trojer, S. Mandal, A. Shilatifard, and D. Reinberg.** 2006. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* **125**:703-17.
130. **Pedram, M., C. N. Sprung, Q. Gao, A. W. I. Lo, G. E. Reynolds, and J. P. Murnane.** 2006. Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Molecular and Cellular Biology* **26**:1865-78.
131. **Peters, A. H., J. E. Mermoud, D. O'Carroll, M. Pagani, D. Schweizer, N. Brockdorff, and T. Jenuwein.** 2002. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nature Genetics* **30**:77-80.
132. **Peters, A. H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, and T. Jenuwein.** 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**:323-37.
133. **Peters, A. H., and D. Schubeler.** 2005. Methylation of histones: playing memory with DNA. *Current Opinion in Cell Biology* **17**:230-8.

134. **Pikaart, M. J., and G. Felsenfeld.** 1996. Expression and codon usage optimization of the erythroid-specific transcription factor cGATA-1 in baculoviral and bacterial systems. *Protein Expression and Purification* **8**:469.
135. **Pikaart, M. J., F. Recillas_Targa, and G. Felsenfeld.** 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes and Development* **12**:2852-62.
136. **Pringleau, M. N., P. Nony, M. Simpson, and G. Felsenfeld.** 1999. An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken beta-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO Journal* **18**:4035-48.
137. **Rakyan, V. K., J. Preis, H. D. Morgan, and E. Whitelaw.** 2001. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *The Biochemical Journal* **356**:1-10.
138. **Razin, S. V., C. M. Farrell, and F. Recillas-Targa.** 2003. Genomic domains and regulatory elements operating at the domain level. *International Reviews in Cytology* **226**:63-125.
139. **Recillas-Targa, F., A. C. Bell, and G. Felsenfeld.** 1999. Positional enhancer-blocking activity of the chicken beta-globin insulator in transiently transfected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:14354-9.
140. **Recillas-Targa, F., and S. V. Razin.** 2001. Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression* **11**:227-42.
141. **Recillas-Targa, F., V. Valadez-Graham, and C. M. Farrell.** 2004. Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *Bioessays* **26**:796-807.
142. **Recillas_Targa, F., M. J. Pikaart, B. Burgess_Beusse, A. C. Bell, M. D. Litt, A. G. West, M. Gaszner, and G. Felsenfeld.** 2002. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:6883-8.
143. **Reinberg, D., G. Orphanides, R. Ebright, S. Akoulitchev, J. Carcamo, H. Cho, P. Cortes, R. Drapkin, O. Flores, I. Ha, J. A. Inostroza, S. Kim, T. K. Kim, P. Kumar, T. Lagrange, G. LeRoy, H. Lu, D. M. Ma, E. Maldonado, A. Merino, F. Mermelstein, I. Olave, M. Sheldon, R. Shiekhhattar, L. Zawel, and et al.** 1998. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**:83-103.
144. **Rincon-Arango, H., V. Valadez-Graham, G. Guerrero, M. Escamilla-Del-Arenal, and F. Recillas-Targa.** 2005. YY1 and GATA-1 interaction modulate the chicken 3'-side α -globin enhancer activity. *Journal of Molecular Biology* **349**:961-75.
145. **Robertson, G., D. Garrick, W. Wu, M. Kearns, D. Martin, and E. Whitelaw.** 1995. Position-dependent variegation of globin transgene expression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:5371-5.
146. **Rupon, J. W., S. Z. Wang, K. Gaensler, J. Lloyd, and G. D. Ginder.** 2006. Methyl binding domain protein 2 mediates γ -globin gene silencing in adult human

- {beta}YAC transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **In Press, Corrected Proof.**
147. **Saitoh, N., A. C. Bell, F. Recillas_Targa, A. G. West, M. Simpson, M. Pikaart, and G. Felsenfeld.** 2000. Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken beta-globin domain. *EMBO Journal* **19**:2315-22.
 148. **Sawado, T., J. Halow, M. A. Bender, and M. Groudine.** 2003. The β -globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription initiation to elongation. *Genes & Development* **17**:1009-18.
 149. **Schotta, G., M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, and T. Jenuwein.** 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Development* **18**:1251-62.
 150. **Schubeler, D., C. Francastel, D. M. Cimborra, A. Reik, D. I. Martin, and M. Groudine.** 2000. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes & Development* **14**:940-50.
 151. **Schubeler, D., M. Groudine, and M. A. Bender.** 2001. The murine beta-globin locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:11432-7.
 152. **Schweizer, J., P. Valenza_Schaerly, F. Goret, and C. Pourcel.** 1998. Control of expression and methylation of a hepatitis B virus transgene by strain-specific modifiers. *DNA and Cell Biology* **17**:427-35.
 153. **Shahbazian, M. D., K. Zhang, and M. Grunstein.** 2005. Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1. *Molecular Cell* **19**:271-7.
 154. **Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole, R. A. Casero, and Y. Shi.** 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**:941.
 155. **Shimizu, R., and M. Yamamoto.** 2005. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol* **16**:129-36.
 156. **Shyu, Y. C., T. L. Lee, C. Y. Ting, S. C. Wen, L. J. Hsieh, Y. C. Li, J. L. Hwang, C. C. Lin, and C. K. Shen.** 2005. Sumoylation of p45/NF-E2: nuclear positioning and transcriptional activation of the mammalian beta-like globin gene locus. *Molecular and Cellular Biology* **25**:10365-78.
 157. **Singal, R., R. Ferris, J. A. Little, S. Z. Wang, and G. D. Ginder.** 1997. Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:13724-29.
 158. **Singal, R., and J. M. vanWert.** 2001. De novo methylation of an embryonic globin gene during normal development is strand specific and spreads from the proximal transcribed region. *Blood* **98**:3441-6.
 159. **Stamatoyannopoulos.** 2005. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental Hematology* **33**:259-64.
 160. **Sutter, N. B., D. Scalzo, S. Fiering, M. Groudine, and D. I. Martin.** 2003. Chromatin insulation by a transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:1105-10.

161. **Tamaru, H., X. Zhang, D. McMillen, P. B. Singh, J. Nakayama, S. I. Grewal, C. D. Allis, X. Cheng, and E. U. Selker.** 2003. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature Genetics* **34**:75-9.
162. **Targa, F. R., C. V. de Moura Gallo, M. Huesca, K. Scherrer, and L. Marcaud.** 1993. Silencer and enhancer elements located at the 3'-side of the chicken and duck alpha-globin-encoding gene domains. *Gene* **129**:229-37.
163. **Targa, F. R., C. V. de Moura Gallo, and K. Scherrer.** 1993. Analysis of the distribution of protein binding DNA motives in the vicinity of the 3'-side chicken alpha-globin enhancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **190**:1163-72.
164. **Targa, F. R., M. Huesca, and K. Scherrer.** 1992. Preliminary characterization of a nuclear factor interacting with the silencer element at the 3'-side of the chicken alpha-globin gene domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **188**:416-23.
165. **Trojer, P., and D. Reinberg.** 2006. Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. *Cell* **125**:213.
166. **Tsukada, Y.-i., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang.** 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**:811-24.
167. **Turek-Plewa, J., and P. P. Jagodzinski.** 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular and Molecular Biology Letters* **10**:631-47.
168. **Vakoc, C. R., D. L. Letting, N. Gheldof, T. Sawado, M. A. Bender, M. Groudine, M. J. Weiss, J. Dekker, and G. A. Blobel.** 2005. Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Molecular Cell* **17**:453-62.
169. **Vakoc, C. R., S. A. Mandat, B. A. Olenchok, and G. A. Blobel.** 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular Cell* **19**:381-91.
170. **Valadez-Graham, V., S. V. Razin, and F. Recillas-Targa.** 2004. CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Nucleic Acids Research* **32**:1354-62.
171. **Vaquero, A., M. Scher, D. Lee, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg.** 2004. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular Cell* **16**:93-108.
172. **Varga-Weisz, P. D., and P. B. Becker.** 2006. Regulation of higher-order chromatin structures by nucleosome-remodelling factors. *Current Opinion in Genetics & Development Chromosomes and expression mechanisms* **16**:151-156.
173. **Verschure, P. J., I. van der Kraan, W. de Leeuw, J. van der Vlag, A. E. Carpenter, A. S. Belmont, and R. van Driel.** 2005. *In vivo* HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. *Molecular and Cellular Biology* **25**:4552-64.
174. **Vieira, K. F., P. P. Levings, M. A. Hill, V. J. Crusselle, S. H. Kang, J. D. Engel, and J. Bungert.** 2004. Recruitment of transcription complexes to the beta-globin gene locus *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **279**:50350-7.
175. **Wade, P. A., D. Pruss, and A. P. Wolffe.** 1997. Histone acetylation: chromatin in action. *Trends in Biochemical Sciences* **22**:128-32.

176. **Wallace, J. A., and T. L. Orr-Weaver.** 2005. Replication of heterochromatin: insights into mechanisms of epigenetic inheritance. *Chromosoma* **114**:389-402.
177. **Weintraub, H., A. Larsen, and M. Groudine.** 1981. Alpha-Globin-gene switching during the development of chicken embryos: expression and chromosome structure. *Cell* **24**:333-44.
178. **West, A. G., and P. Fraser.** 2005. Remote control of gene transcription. *Human Molecular Genetics* **14 Spec No 1**:R101-11.
179. **West, A. G., S. Huang, M. Gaszner, M. D. Litt, and G. Felsenfeld.** 2004. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Molecular Cell* **16**:453-63.
180. **Woodcock, C., A. Skoultchi, and Y. Fan.** 2006. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Research* **14**:17.
181. **Wysocka, J., C. Allis, and S. Coonrod.** 2005. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in Biosciences* **11**:344-55.
182. **Yan, C., and D. D. Boyd.** 2006. Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Molecular and Cellular Biology* **26**:6357-71.
183. **Yi, Z., O. Cohen-Barak, N. Hagiwara, P. D. Kingsley, D. A. Fuchs, D. T. Erickson, E. M. Epner, J. Palis, and M. H. Brilliant.** 2006. Sox6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis. *PLoS Genetics* **2**:e14.
184. **Zhao, H., A. Kim, S. H. Song, and A. Dean.** 2006. Enhancer blocking by chicken beta -globin 5' HS4: Role of enhancer strength and insulator nucleosome depletion. *Journal of Biological Chemistry*. **In Press, Corrected Proof**.
185. **Zheng, J., K. Kitajima, E. Sakai, T. Kimura, N. Minegishi, M. Yamamoto, and T. Nakano.** 2006. Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells. *Blood* **107**:520-7.
186. **Zhu, H., T. M. Geiman, S. Xi, Q. Jiang, A. Schmidtman, T. Chen, E. Li, and K. Muegge.** 2006. Lsh is involved in de novo methylation of DNA. *EMBO Journal* **25**:335-45.