



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias Biomédicas

“Clonación molecular de la región promotora del gen de la uteroglobina en dos especies de lagomorfos (*Romerolagus diazi* y *Lepus capensis*). Regulación de su transcripción por  $17\beta$ -estradiol”.

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**ADRIANA ACOSTA MONTES DE OCA**

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Rubén Gutiérrez Sagal.

CODIRECTORES DE TESIS:

Dra. Elizabeth Langley McCarron

Dr. Enrique Pedernera Astegiano

MÉXICO, D.F. Septiembre de 2012



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.

Clonación molecular de la región promotora del gen de la uteroglobina en dos especies de lagomorfos (Romerolagus diazi y Lepus capensis). Regulación de su transcripción por 17 $\beta$ -estradiol.

JURADO ASIGNADO PARA EXAMEN DE DOCTORADO EN CIENCIAS

PRESIDENTE: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

SECRETARIO: DR. RUBÉN GUTIÉRREZ SAGAL

VOCAL: DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

VOCAL: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

VOCAL: DRA. PATRICIA CASAS GONZÁLEZ

Lugar donde se realizó la tesis:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN MEDICINA REPRODUCTIVA,  
HOSPITAL DE GINECO-OBSTETRICIA No. 4 IMSS.

**TUTOR DE TESIS**

**DR. RUBÉN GUTIÉRREZ SAGAL**

## **AGRADECIMIENTOS**

Especialmente quiero agradecer al Dr. Rubén Gutiérrez Sagal por haberme brindado la oportunidad de trabajar junto a él, por darme su apoyo, pero más aún su confianza en todo momento. Así también a los miembros del comité tutorial, el Dr. Enrique Pedernera Astegiano y la Dra. Elizabeth Langley McCarron por todos sus comentarios durante la realización de este proyecto.

A los miembros de comité de exámen de grado por la revisión de la tesis,

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dra. María Imelda López Villaseñor

Dra. Marcela Lizano Soberón

Dra. Patricia Casas González

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

Al Fondo para la investigación en Salud y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber brindado el apoyo económico para el proyecto.

A mis padres Ramiro y María Martha por estar conmigo siempre, a pesar de todo y por su gran amor.

A mis hermanos Mónica, Silvia y Ramiro por su complicidad y por regalarme mi maravillosa infancia.

***DEDICADA A:***

***Dios por lo que tengo y lo que soy***

***Marco por ser siempre mi apoyo y también ser  
mi amor***

***Ian Adair por mostrarme lo bendecida que soy  
al haber llegado conmigo***

<b>INDICE</b>	<b>PAG.</b>
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	5
1.1. Procesos de regulación de la expresión génica eucariótica.....	6
1.2. Importancia del estudio de la regulación transcripcional.....	10
1.3. La uteroglobina.....	11
1.4. Características físico-químicas de la UG.....	12
1.5. Características genéticas de la UG.....	13
1.6. Expresión especie-específica de la UG.....	14
1.7. Regulación de la transcripción del gen de la UG por estrógenos.....	18
1.8. La UG en los mamíferos.....	20
<b>2. Justificación</b> .....	22
<b>3. Hipótesis</b> .....	24
<b>4. Objetivos</b> .....	26
<b>5. Materiales y Métodos</b> .....	28
5.1. Clonación de la región de flanco 5' del gen de la UG de zacatuche y liebre.....	29
5.2. Análisis de la estructura del promotor de la UG.....	30
5.3. Construcción de plásmidos reporteros (ver Fig. 5.1).....	31
5.4. Construcción del plásmido de expresión (ver Fig. 5.2).....	35
5.5. Mutagénesis sitio-dirigida.....	37
5.6. Construcciones quiméricas del promotor de la UG.....	39

5.7. Cultivo celular y ensayos de expresión transitoria.....	47
5.8. Curva dosis respuesta de estradiol.....	48
5.9. Inmuno-detección del receptor de estrógenos $\alpha$ .....	48
5.10. Análisis de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	49
Tabla 1.....	51
<b>6. Resultados.....</b>	<b>52</b>
6.1. Clonación y análisis de secuencia de la región flanqueante 5' del gen de la UG de zacatuche.....	53
6.2. Análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos entre zacatuche y conejo.....	55
6.3. El ERE de la región flanqueante 5' del gen de la UG de zacatuche es funcional.....	58
6.4. El 17 $\beta$ -estradiol induce la transcripción del promotor de la UG de zacatuche a través de su ERE.....	60
6.5. Interacción física entre el RE $\alpha$ con los EREs <i>in vitro</i> mediante análisis de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	63
6.6. Clonación y análisis de secuencia de la región flanqueante 5' del gen de la UG de liebre.....	67
6.7. Respuesta estrogénica del promotor de la UG de liebre.....	71
6.8. Existencia de una región con actividad inhibitoria de la acción de estrógenos en el promotor de la UG de hámster.....	74
6.9 Delimitación de la región regulatoria del promotor de la	

UG de liebre y hámster.....	76
6.10. Hallazgo de la secuencia inhibidora de la acción de estrógenos en el promotor de la UG de hámster.....	80
<b>7. Discusión.....</b>	<b>84</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>93</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>95</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>97</b>

## RESUMEN:

La importancia que tienen los estrógenos en diversos procesos fisiológicos y patológicos, ha motivado el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la expresión de genes inducidos por estrógenos. Los estrógenos actúan a nivel transcripcional mediante su interacción con receptores nucleares específicos. Estos complejos se unen a secuencias específicas de ADN ubicadas en los promotores de los genes blanco para regular su transcripción. Sin embargo, varios estudios han reportado la participación de otros factores de transcripción sobre la regulación transcripcional estrogénica, lo cual ha conducido a la investigación del papel del elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el contexto de una unidad de regulación transcripcional.

El presente trabajo, se enfocó en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación estrogénica de la transcripción, usando como modelos de estudio el promotor de la UG de dos especies representativas del orden *Lagomorpha*. Para esto, primero se clonaron los promotores de la UG de zacatuche y liebre, con el fin de contrastar su estructura. Posteriormente, se continuó con el análisis comparativo funcional del ERE; en el que por una parte, se hicieron transfecciones utilizando construcciones reporteras gobernadas por diferentes segmentos y versiones mutantes del promotor de la UG de cada especie. Y por otro lado, se emplearon EMSAS, para comparar la interacción física entre el receptor de estrógenos  $\alpha$  con el ERE de cada especie y el consenso. También se analizó el efecto del contexto promotor de la UG en la regulación transcripcional mediada por estrógenos, utilizando construcciones reporteras controladas por el promotor de la UG del hámster (ERE- en su forma silvestre), al que previamente se le añadió el ERE consenso o el ERE encontrado en liebre. Ya que ningún ERE adicionado, presentó respuesta estrogénica dentro de la estructura del promotor de la UG de hámster, se probaron construcciones quiméricas truncadas entre los promotores de la UG de hámster y de liebre, con la intención de encontrar alguna región que explicara la regulación especie-específica. Por último, se confirmó el papel del elemento inhibidor encontrado en el promotor de la UG del hámster, removiendo la secuencia represora del promotor de la UG del hámster con el ERE consenso.

A partir del análisis estructural de los promotores de la UG de zacatuche y liebre, se encontró que ambos presentan una alta homología entre ellos. En el promotor de la UG de zacatuche, se identificó un ERE con dos diferencias con respecto a la secuencia consenso y en el de liebre se encontró que el ERE solo contiene una diferencia que es idéntica a la ya reportada en el promotor de la UG de conejo. De la misma forma en que pasa con otros factores de transcripción, las diferencias sutiles presentes en el ERE con respecto a la secuencia consenso, pueden modificar de forma importante la unión del receptor de estrógenos con el ERE y por ende la actividad transcripcional del receptor. Sin embargo, el análisis funcional del promotor de la UG, reveló que aún cuando los EMSAS demuestran que la afinidad del receptor disminuye conforme el ERE pierde homología con el consenso, los EREs de liebre y conejo manifiestan una actividad transcripcional distinta a pesar de ser idénticos, indicando que las diferencias

que existen entre los promotores de cada especie, influyen de manera importante en el mecanismo de regulación transcripcional dependiente de estrógenos. Esto fue confirmado al no encontrar respuesta a estrógenos en la actividad transcripcional del promotor de la UG de hámster, aún cuando fue proveído tanto del ERE de liebre como del consenso. Una secuencia de 7 pb, que fue localizada mediante promotores quimera de la UG a 35 pb de los vestigios del ERE en el promotor de la UG de hámster, demostró ser el elemento responsable del efecto inhibitor observado sobre la actividad transcripcional promovida por estrógenos en el promotor de la UG de hámster. Aunque se desconoce la identidad de la proteína que interactúa con este elemento, su hallazgo puede ser de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes regulados por estrógenos y que puedan llegar a contener este elemento represor en su promotor.

## ABSTRACT:

The importance of estrogens in various physiological and pathological processes, has motivated the study of the molecular mechanisms involved in gene expression induced by estrogens. Estrogens are known to act at transcriptional level by interacting with specific nuclear receptors. These complexes bind to specific DNA sequences located in the promoters of target genes to regulate transcription. However, several studies have reported the involvement of other transcription factors in the estrogen-dependent transcriptional regulation, which has led to the investigation of the role of estrogen response element (ERE) in the context of a transcriptional regulatory unit.

This work focused on the study of the molecular mechanisms involved in estrogenic regulation of transcription, using as study models the UG promoter of two representative species of the order *Lagomorpha*. To accomplish this, we first cloned the zacatcucho and hare UG promoter, in order to compare its structure. Afterwards, we continued with the functional comparative analysis of ERE, in which on the one hand, transfections were realized by using reporter constructs governed by different segments and mutant versions of the UG promoter of each species. On the other hand, EMSAS were used to compare physical interactions between the estrogen receptor  $\alpha$  with the ERE of each species and consensus. We also analyzed the effect of UG promoter context in estrogen-dependent transcriptional regulation, with reporter constructs controlled by the hamster UG promoter (ERE- wild type), to which was previously added the consensus ERE or the ERE found in hare. Because no added ERE presented estrogenic response within the structure of the hamster UG promoter, transfections were carried out, using chimeric constructs truncated between hamster and hare UG promoters, with the intention of finding a region to explain the species-specific regulation. Finally, it was confirmed the inhibitory role of the element found in the hamster UG promoter, by removing of the repressor sequence of the hamster UG promoter with the consensus ERE.

From the structural analysis of zacatcucho and hare UG promoters, a high homology was found between them. In the zacatcucho UG promoter, was identified an ERE with two differences with respect to the consensus sequence, and in that of hare was found that the ERE contains only the same difference that reported in the rabbit UG promoter. Similarly to what happens with other transcription factors, subtle differences which can come to have the ERE with respect to the consensus sequence, may significantly alter the binding of estrogen receptor in the ERE and hence the receptor transcriptional activity. However, the functional analysis of the UG promoter, revealed that although EMSAS show that receptor affinity decreases as the ERE loses homology with consensus, the rabbit and hare EREs manifest a different transcriptional activity despite being identical, indicating that the differences between the promoters of each species influence in the mechanism of estrogen-dependent transcriptional regulation. This was confirmed, finding no response to estrogen in the transcriptional activity of the hamster UG promoter, despite being provided with the hare ERE or with the consensus. A sequence of 7 bp, which was located in the UG

chimera promoters, to 35 bp from the remains of the ERE in the hamster UG promoter, has proved the element responsible for the inhibitory effect observed on transcriptional activity promoted by estrogen in the hamster UG promoter. Although it is not known the identity of the protein that interacts with this element, its discovery can be of great relevancy in the understand of the molecular mechanisms that regulate the expression of estrogen target genes and that contain this repressor element in its promoter.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Procesos de regulación de la expresión génica eucariótica.**

El paso evolutivo de los organismos unicelulares a multicelulares implicó la especialización funcional de las células que los conforman, para la creación de los tejidos y órganos responsables de las tareas y necesidades vitales de dichos organismos. Para que esto fuera posible, cada célula tuvo que someterse a un proceso de diferenciación que inicia desde la fecundación y culmina en la formación de un organismo completamente desarrollado. Para que la diferenciación celular se lleve a cabo, es necesario que la expresión de la información genética sea regulada diferencialmente con el fin de que se generen diversos fenotipos capaces de manifestar distintos contextos y capacidades celulares. La modificación epigenética de la cromatina, la transcripción, la maduración del ARN mensajero (ARNm), la translocación del ARNm, la traducción y la modificación postraducciona de las proteínas son los principales procesos celulares involucrados en el control espacial y temporal de la expresión génica durante el ciclo de vida de todo organismo eucarionte multicelular (Blau, 1992).

El conjunto de modificaciones epigenéticas que alteran la topología y los niveles de organización de la cromatina, participan activamente en el silenciamiento o activación de los genes, modulando el acceso de proteínas reguladoras (elementos en *trans* o factores de transcripción) y de la maquinaria transcripcional a las secuencias promotoras de los genes (Arenas-Huertero y

Recillas-Targa, 2002). Se sabe que estos mecanismos epigenéticos son cambios “heredados” y específicos de cada tipo celular, independientes de cambios en la secuencia de ADN (Jiang *et al.*, 2004). El remodelamiento dinámico que sufre continuamente la cromatina es causado por modificaciones enzimáticas reversibles en los componentes de la cromatina, provocando alteraciones en la interacción dada entre el ADN y las histonas. Hasta la fecha se sabe que el ADN solo es blanco de la metilación reversible de islas o regiones ricas en dinucleótidos GC, pero las histonas pueden experimentar diversas modificaciones post-traduccionales como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ribosilación, deiminación y la isomerización de prolina (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002; Kouzarides, 2007).

La mayor parte del control de la expresión génica en los eucariontes recae sobre la regulación de la frecuencia del inicio de la transcripción. Una gran diversidad de factores y coreguladores se unen al ADN modulando la capacidad de la ARN polimerasa para unirse al promotor y para llevar a cabo la transcripción. Lo que quiere decir, que al aumentar la estabilidad de la interacción de la ARN polimerasa, la frecuencia y velocidad del inicio de la transcripción incrementan. Los genes eucarióticos contienen secuencias llamadas elementos en *cis*, que se localizan en sus promotores (regiones de flaqueo 5') y que tienen la capacidad de reclutar factores reguladores de la maquinaria transcripcional (Fuxreiter *et al.*, 2008).

Tomando como criterios la distancia al sitio de inicio de la transcripción (SIT) y sus características funcionales los promotores son conceptualmente divididos en tres regiones: el promotor basal, proximal y distal. El promotor basal por lo general cuenta con elementos de unión para factores ubicuos, los cuales mantienen una interacción más directa con la maquinaria transcripcional. Aproximadamente llegan hasta -30 ó -40 pares de bases (pb) corriente arriba del SIT. Estos elementos son las secuencias mínimas necesarias para iniciar la transcripción como por ejemplo, el elemento de reconocimiento a TFIIB (BRE) localizado aproximadamente a -32 pb, la caja TATA o caja de Hogness localizada entre -25 a -30 pb (Breathnach y Chambon, 1981), la secuencia iniciadora (INR) localizada entre -3 a +5 y una secuencia corriente abajo del SIT (DPE) que comúnmente es difícil de identificar (Burke y Kadonaga, 1996; Burke y Kadonaga, 1997). Por lo general, los promotores solo contienen dos o tres de estos elementos (Smale ST, 2001). El promotor proximal también es indispensable para iniciar la transcripción y por lo común se encuentra localizado de -30 a cientos de pb, corriente arriba del SIT. Los factores que interactúan con este promotor están más involucrados con la regulación específica de cada gen y con la frecuencia con que sucede el inicio de la transcripción y los dos elementos más representativos son la caja CAAT (CCAAT) localizada entre -60 y -80 y la caja GC (GGGCCGG) localizada frecuentemente adyacente a la caja CAAT (Pelham, 1982). El promotor distal contiene elementos que influyen significativamente, pero de manera indirecta en la unión a la maquinaria transcripcional. Estos elementos se encuentran localizados a distancias del orden de los miles de pb corriente arriba del SIT y comúnmente son agrupaciones de elementos en *cis* repetitivos,

que activan o inhiben la transcripción de forma exagerada; los cuales son conocidos como *enhancers* (Li y Noll, 1994; Merli *et al.*, 1996) o *silencers*, respectivamente. Otros elementos regulatorios a distancia son los *Insulators*, *Boundary* y *Regiones reguladoras de locus* (LCR) (Bell *et al.*, 2001; Labrador y Corces, 2002; Kuhn y Geyer, 2003).

La regulación transcripcional de cada gen es muy sofisticada, por lo que la interacción directa o indirecta de factores transcripcionales con elementos en *cis* ubicados en el promotor proximal o distal; determina en gran medida la expresión específica de cada proteína. Los conocimientos sobre la regulación transcripcional han ido cambiando con el paso del tiempo gracias a los avances de la investigación básica. El paradigma inicial de que factores transcripcionales individuales eran capaces de regular la expresión de una proteína se ha modificado durante los últimos treinta años al ir determinando que la cooperación de varios factores es esencial para la expresión transcripcional de cada gen, estableciendo así la existencia de las unidades de regulación transcripcional (Merika y Thanos, 2001; Kadonaga, 2004). Aunque no debemos olvidar que para que pueda existir una correcta regulación no solo es necesaria la inducción de la maquinaria transcripcional; sino de la participación de factores que inhiban la expresión cuando sea requerido (Chi Y *et al.*, 2001).

Por otra parte, el proceso conocido como maduración del ARNm (*alternative splicing*) es otro punto de regulación de la expresión génica en eucariotas, ya que la cantidad de producto génico depende de que tan rápido se

procese el ARN ARNm (McManus y Graveley, 2011). La expresión génica es también regulada a través del control de acceso a los canales de transporte o por la eficiencia de estos canales en la translocación del ARNm. El cruce del ARNm a través de la membrana nuclear es un proceso activo que requiere que el transcrito sea reconocido por los receptores que cubren el interior de los poros (Capelson y Hetzer, 2009). Por otro lado, es importante tomar en cuenta que muchas enzimas degradan el ARNm, por lo que la vida media de cada ARNm es también considerado como un factor determinante en la expresión génica final de cada gen (Ghosh y Jacobson, 2010). Por último la velocidad de traducción de cada ARNm, así como la presencia o nivel de expresión de las enzimas encargadas de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas producidas son de igual manera puntos de regulación que pueden modificar la expresión funcional de cada proteína (Gingold y Pilpel, 2011; Anbalagan *et al.*, 2011).

### ***1.2 Importancia del estudio de la regulación transcripcional.***

Como ya se mencionó anteriormente, la transcripción es el principal proceso de regulación de la expresión génica, por lo que múltiples esfuerzos han sido empleados en la investigación básica de los mecanismos moleculares involucrados en la producción constitutiva o específica de varios transcritos de relevancia celular, fisiológica, ontogénica y médica. Pero a pesar de los enormes avances logrados, tanto a nivel experimental como bioinformático, los elementos

reguladores de los genes aún no son completamente explicados y sólo un puñado de ellos han sido hasta ahora verificado experimentalmente (Wan *et al.*, 2008). Es por ésta razón que la identificación de los elementos reguladores de la transcripción que gobiernan la expresión de cada transcripto es considerado como un problema desafiante pero fundamental para la biología. Las investigaciones basadas en la comparación evolutiva de las regiones promotoras de los genes también han ayudado a determinar elementos en *cis*, que se han conservado a través de las especies debido al valor adaptativo de su función en la regulación transcripcional. Por otro lado, también han ayudado a entender la expresión diferencial de los genes entre especies, en función de la desaparición o aparición de elementos reguladores (Gutiérrez-Sagal y Nieto, 1998; Acosta *et al.*, 2007; Pérez-Solis *et al.*, 2010).

### **1.3 La uteroglobina.**

Debido a su versatilidad funcional y a la estrecha relación entre su promotor con la regulación hormonal (Shen *et al.*, 1983; Beier, 2000; Linnoila *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000), la Uteroglobina (UG) fue considerada para el presente estudio, como un gen que podría aportar información importante sobre el mecanismo de regulación transcripcional por estrógenos, el cual actualmente esta siendo considerado como uno de los más relevantes en diversos campos como la reproducción, neuroendocrinología y el cáncer.

La UG es una proteína globular y de secreción que fue identificada por primera vez en el fluido uterino de conejas en las primeras etapas de gestación (Beier, 1968; Krishnan y Daniel, 1967), estableciéndose como el miembro fundador de la familia de las secretoglobinas (Scgb) (Klug *et al.*, 2000). Debido a que se expresa en diferentes órganos y especies, se le han acuñado distintos nombres tales como blastokinina (Krishnan y Daniel, 1967), proteína de secreción de células clara (PSCC) (Singh *et al.*, 1985) y proteína de 16 kDa de células clara (CC16) (Umland *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1993).

En el útero las hormonas sexuales progesterona y estradiol regulan positivamente la transcripción del gen que codifica a la UG (Shen *et al.*, 1983) y aunque no se conoce con certeza la función de la UG; varios estudios han asociado la presencia de la UG con el desarrollo y la implantación de los blastocistos (Krishnan y Daniel, 1967; Riffo *et al.*, 2007), ya que es justamente alrededor del momento de la implantación, cuando esta proteína puede alcanzar los niveles de expresión de entre el 40 al 60% de las proteínas totales, en el fluido uterino de las conejas preñadas (Gutiérrez-Sagal *et al.*, 1993; Mayol y Longenecker, 1974).

#### **1.4. Características físico-químicas de la UG.**

A más de 40 años del descubrimiento de la UG, se ha acumulado una gran cantidad de información científica respecto a las características fisicoquímicas de

esta molécula. La UG es una proteína de bajo peso molecular (16 kDa) que se compone de dos subunidades idénticas de 70 aminoácidos cada una, que se encuentran unidas por dos puentes disulfuro de forma antiparalela y por otros enlaces no covalentes (Miele *et al.*, 1994). Los estudios de difracción de rayos X sobre la UG cristalizada y de resonancia magnética nuclear multidimensional, revelaron que los puentes disulfuro de esta proteína le facilitan estabilidad a los dímeros para formar una cavidad hidrofóbica en su interior (Bally y Delettré, 1989; Buehner y Beato, 1978; Mornon *et al.*, 1979; Morize *et al.*, 1987; Carlomagno *et al.*, 1997; Winkelmann *et al.*; 1998). Esta cavidad permite la unión de pequeñas moléculas hidrofóbicas como la progesterona (Fridlansky y Milgrom, 1976; Beato, 1976) y otros compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular como los bifenilos policlorados (Gillner *et al.*, 1988) y los retinoides (López de Haro *et al.*, 1994).

### **1.5 Características genéticas de la UG.**

Los estudios que abordan los aspectos básicos de la caracterización molecular del gen de la UG de conejo (Chandra *et al.*, 1981), han revelado que el gen existe como copia sencilla, mide aproximadamente 3 kpb de ADN y está conformado de tres exones intervenidos por dos intrones; de los cuales el primer exón mide 47 nucleótidos, el segundo exón mide 187 y el tercer exón mide 171 nucleótidos (Menne *et al.*, 1982). Los 63 nucleótidos iniciales de la región traducible del gen codifican un péptido señal de 21 aminoácidos (Atger *et al.*, 1980). La región promotora fundamental de este gen, se localiza en los primeros

400 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (SIT). Se sabe que esta región contiene sitios importantes para la actividad transcripcional basal como es una caja TATA no canónica (TACA) (Menne *et al.*, 1982), la cual también puede ser reconocida por el factor de transcripción Yin Yang-1 (YY1) (Klug y Beato, 1996); tres sitios de unión para el factor SP1/SP3 que van de -65 a -73, de -195 a -203 y de -223 a -231 pb corriente arriba del SIT (Hagen *et al.*, 1992; Dennig *et al.*, 1995; Scholz *et al.*, 1998). Y también dos sitios de unión para HNF3/Oct1 que se localizan de -94 a -102 y de -121 a -131 pb corriente arriba del SIT (Braun y Suske, 1998). Y es justamente en esta región donde se localiza el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) no canónico, cuya estructura va de -265 a -251 pb corriente arriba del SIT y es responsable de la respuesta del gen a los estrógenos (López de Haro *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990). Otros estudios más recientes han revelado que el gen posee secuencias reguladoras mucho más alejadas de la región promotora, como un poderoso *enhancer* localizado a -2700 pb corriente arriba del SIT, involucrado en la regulación del gen por progesterona (Scholz *et al.*, 1999).

### **1.6 Expresión especie-específica de la UG.**

El descubrimiento de esta proteína en las secreciones uterinas de la coneja, propició la búsqueda de una proteína similar en otras especies de mamíferos, principalmente en el humano. En 1986 se logró clonar el ADNc de la UG de liebre (*Lepus capensis*) una especie muy relacionada filogenéticamente

con los conejos (López de Haro y Nieto, 1986). Este estudio pronto reveló que ambas especies comparten muchas de sus características, como lo son sus propiedades físicas, su capacidad para unir progesterona, pero también presentan diferencias muy interesantes, entre las cuales está la débil regulación de la UG de liebre por hormonas sexuales. Desafortunadamente, el estudio de la UG de liebre fue interrumpido al poco tiempo de su inicio, quedando un gran vacío en aspectos fundamentales como la caracterización de la región flanqueante 5' y en consecuencia, los factores en *trans* y los elementos en *cis* involucrados en la regulación transcripcional del gen. El descubrimiento de la UG humana no fue sino hasta finales de la década de los ochentas. El ADNc y el gen completo (Singh *et al.*, 1988; Wolf *et al.*, 1992) resultaron muy similares a los que ya habían sido descritos, pero su baja expresión en el endometrio humano sorprendió a los investigadores, ya que no fue posible detectar la proteína con certeza por los métodos tradicionales de la época y hubo que recurrir a técnicas más resolutivas para su detección (v.g. RT-PCR). En humanos, la regulación de esta proteína por hormonas sexuales es hasta ahora incierta. Sin embargo, se ha demostrado que la mayor concentración de UG en el endometrio humano coincide con la fase lútea-media del ciclo menstrual, lo que sugiere una discreta regulación por progesterona (Muller-Schottle *et al.*, 1999). No existe ninguna evidencia de su regulación por estrógenos, de hecho el análisis de la estructura del gen indica que la UG humana no contiene ningún ERE en su región promotora.

Rápidamente se acumularon datos concernientes a la clonación de este

gen en otras especies de mamíferos. El orden filogenético *Rodentia* fue el más favorecido con la clonación del gen en cuatro de sus especies (rata, ratón, hámster y neotomodón) (Sagal y Nieto, 1998; Hagen *et al.*, 1990; Macías *et al.*, 2004; Ray *et al.*, 1993). A partir de estos estudios se pudo comprobar que la UG se mantiene altamente conservada en todas las especies (Margraf *et al.*, 1993; Ray *et al.*, 1993; Nordlund-Moller *et al.*, 1990; López de Haro y Nieto, 1986; Gutiérrez-Sagal y Nieto, 1998; Muller-Scottle *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 1996). Se piensa que la UG de cada especie estudiada proviene de un gen ancestral común y que su regulación genética diferencial observada entre las especies es causada en parte, por modificaciones evolutivas tales como deleciones o inserciones sobre su promotor (Mihal y Riedel, 1991).

La clonación del gen en estas especies de mamíferos puso de manifiesto que la abundante expresión de la UG de coneja durante los primeros días de la gestación y su potente regulación por estrógenos y progesterona, es una característica muy distintiva de esta especie. La regulación de la transcripción del gen de la UG por estrógenos y progesterona, ha sido utilizada como un modelo para evaluar compuestos con actividad progestacional, así como para estudiar la regulación de la transcripción por hormonas sexuales (Dennig *et al.*, 1995; Gutiérrez-Sagal *et al.*, 1993; Scholz *et al.*, 1998; Scholz *et al.*, 1999). Cabe señalar que en este último tema, se ha logrado obtener información valiosa sobre los elementos de respuesta a estrógenos y progesterona donde actúan estas hormonas, a través de sus receptores nucleares. Sin embargo, la información sobre este tema en los últimos años ha dejado de fluir, justo cuando el estudio de

otros genes regulados por hormonas ha revelado que más que elementos de respuesta hormonal (ERH), se trata de unidades de regulación transcripcional (Merika y Thanos, 2001; Kadonaga, 2004), en las que no sólo participan el receptor hormonal y su elemento de respuesta, sino también una gran cantidad de otras moléculas como coactivadores, correpresores, acetilasas y desacetilasas de histonas y sobre todo el contexto en el que se localizan los ERH dentro de las regiones de flanco 5' de los genes, que determinan en gran medida la respuesta a estas hormonas.

El gen de la UG es uno de los relativamente pocos genes regulados por estrógenos (Klinge, 2001) que se han descrito hasta ahora y sin lugar a dudas encierra en su estructura un excelente potencial para el estudio de la regulación por estrógenos. La determinación de los factores que conforman la unidad de regulación transcripcional involucrada en su respuesta a estrógenos, seguido de la determinación del papel que desempeñan estos factores *in vivo* y de su efecto en la estructura de la cromatina; son aspectos de gran trascendencia en el campo de la endocrinología molecular inscritos en el marco de las tendencias actuales en cuanto a regulación de la transcripción.

### **1.7 Regulación de la transcripción del gen de la UG por estrógenos.**

El estrógeno fisiológico más importante es el  $17\beta$ -estradiol, el cual se produce de manera primaria en los folículos ováricos en respuesta al estímulo de las gonadotropinas hipofisarias: la hormona estimulante del folículo y la hormona luteinizante.

Los estrógenos regulan la transcripción de genes blanco a través de receptores nucleares específicos de alta afinidad, perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares conocidos como receptores de estrógenos  $\alpha$  de 65 kDa y  $\beta$  con dos isoformas una de 55 y otra de 60 kDa (Green *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 1986; Kuiper *et al.*, 1996). Estos receptores se encuentran localizados en el citoplasma de las células, en un estado inactivo por la unión de proteínas de choque térmico como la hsp-90, la hsp-70 y algunas otras, que además evitan el completo plegamiento del receptor (Smith y Toft, 1993; Klinge *et al.*, 1997; Morishima *et al.*, 2000), estos receptores son activados cuando entran en contacto con la hormona, después de haber atravesado la membrana nuclear, permitiendo la formación de homo u heterodímeros del complejo hormona-receptor (Devin-Leclerc *et al.*, 1998). El complejo recién formado es fosforilado y ya translocado al núcleo se puede asociar con secuencias específicas de ADN en forma de palíndromes (AGGTCA<sub>n</sub>nnTGACCT), conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) que están localizados en la región de flanco 5' de los genes blanco (Klein-Hitpass *et al.*, 1986; Gruber *et al.*, 2004; Klinge, 2001).

Tal mecanismo puede provocar la inducción o represión sobre la expresión de genes específicos (Beato *et al.*, 1996; Beato y Klug, 2000). Sin embargo dicha regulación es un fenómeno muy complejo en el que participan diferentes coactivadores y correpresores (Yi *et al.*, 2005), tipo de ligando, tipo de célula, tipo de elemento de respuesta y sobre todo el contexto específico de cada promotor (Lee y Lee Kraus, 2001; Saville *et al.*, 2000).

Actualmente sabemos que el gen de la UG de conejo es regulado positivamente por estrógenos y que en esta regulación es fundamental el ERE que se localiza en la región promotora del gen. Este elemento (**AGGTCAccaTGCCCT**) difiere en una base del ERE canónico cuya estructura define un palíndrome perfecto (**AGGTCAnnnTGACCT**) (López de Haro *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990). En ninguna otra de las especies que se han estudiado hasta ahora, el gen de la UG posee un ERE y en consecuencia en ninguna de ellas los estrógenos modifican la actividad transcripcional del gen. Aun cuando se ha logrado clonar el gen en varias especies de mamíferos, solo la UG del endometrio de la coneja es regulada por los estrógenos, hecho que contrasta fuertemente con la UG de las otras especies. El estudio de la regulación estrogénica de la UG, tuvo otro avance en la última década del siglo XX, cuando se demostró la participación de otro factor de transcripción (SP1) en el funcionamiento de dicha regulación (Scholz *et al.*, 1998). Estos nuevos datos representaron un avance en la definición de una unidad de regulación transcripcional involucrada en la regulación por estrógenos. El funcionamiento de esta unidad es dependiente de la secuencia del promotor, ya que la unidad solo

funciona si el factor SP1 se une a dos secuencias ricas en GC adyacentes al ERE. No obstante, esta unidad de regulación es limitada ya que sólo funciona en cultivo primario de células de endometrio de coneja y no en otras líneas celulares en las que la transcripción del promotor de la UG se induce apropiadamente mediante el estímulo con estrógenos. En estas líneas celulares el factor SP1 aparentemente no interviene en la regulación estrogénica del gen (Dennig *et al.*, 1995). Estos estudios, indudablemente, han contribuido a comprender mejor la regulación estrogénica del promotor; sin embargo, tomando en consideración el avance logrado en cuanto genes regulados por estrógenos, quedan todavía muchas dudas que esclarecer en cuanto a la participación de otros factores de transcripción, de coactivadores y correpresores que en última instancia son los responsables del reclutamiento de las enzimas que modifican la estructura de la cromatina: las acetilasas y desacetilasas de histonas. También es de gran importancia el contexto del promotor en el que esta inmerso el ERE.

### **1.8 La UG en los mamíferos.**

El estudio de la UG en varias especies de mamíferos del orden *Rodentia*; así como también en el caballo, cerdo, humano y conejo, ha revelado que esta proteína se expresa de forma diferencial entre especies. Los promotores de la UG del orden *Rodentia* conservan parcialmente o carecen por completo de los elementos de respuesta a hormonas esteroides (Hagen *et al.*, 1990; Ray *et al.*, 1993; Gutiérrez-Sagal y Nieto, 1998; Macías *et al.*, 2004) que se presentan en el

conejo, hecho que se pensó era la causa principal del déficit de expresión de la UG en estas especies. Esta teoría fue reforzada posteriormente por la moderada expresión de la UG en el útero de mamíferos superiores como el cerdo, el caballo y el humano en donde el promotor de la UG carece también ya sea del ERE o del elemento de respuesta a progesterona (ERP) (Gutiérrez-Sagal y Nieto, 1998; Muller-Schottle *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 1988; Wolf *et al.*, 1992). Debido a lo anterior, el conejo es hasta ahora la única especie donde se puede observar un patrón de expresión espacio-temporal tan perfectamente definido para esta proteína bajo el control de hormonas sexuales. Estas características tan peculiares motivaron el estudio del promotor de la UG y su regulación por estrógenos en otras especies del mismo orden filogenético (*Lagomorpha*) al que pertenecen los conejos, como la liebre y el conejo de los volcanes o zacatuche (*Romerolagus diazi*). Esta última especie es endémica de una zona muy restringida localizada al sur de la ciudad de México, a una altitud que va de 2800 a 4000 metros sobre el nivel del mar (Velázquez, 1994). El zacatuche es considerado un fósil viviente, ancestro de los conejos modernos (Matthee *et al.*, 2004) y uno de los tres conejos reliquia del mundo (Cervantes *et al.*, 1990; Uchikawa y Suzuki, 1979). El estudio del promotor de la UG en estas especies, puede aportar información valiosa e interesante en cuanto a la determinación de regiones y *cis*-elementos importantes en la regulación estrogénica, además de los que ya han sido descubiertos (*v.g.* ERE).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El estudio de la regulación de la expresión genética por estrógenos ha sido tema de gran importancia y trascendencia en la investigación científica contemporánea puesto que los estrógenos regulan una gran cantidad de procesos fisiológicos involucrados en la reproducción exitosa de las especies y contribuyen a la homeostasis de varios órganos y sistemas entre los que se incluyen no sólo los órganos reproductores, sino también la glándula mamaria, el hígado, el hueso, y el sistema cardiovascular (Barkhem *et al.*, 2002; Couse y Korach, 1999; Muramatsu e Inoue, 2000). Además de regular procesos fisiológicos importantes, estas hormonas están involucradas en procesos fisiopatológicos que van desde su participación en el desarrollo de ciertos cánceres de la glándula mamaria (Ansell *et al.*, 2005; Frasor *et al.*, 2003) hasta la determinación de una gran cantidad de desórdenes endocrinológicos que perturban la salud y bienestar de millones de mujeres alrededor del mundo. Finalmente queda por mencionar el uso terapéutico que se da a estas sustancias en las sociedades post-industriales: es bien conocido el hecho de que los estrógenos en conjunto con las progestinas se utilizan ampliamente en el control de la fertilidad en una gran variedad de formulaciones y más recientemente, en las últimas décadas del siglo XX, los estrógenos se convirtieron en el tratamiento por excelencia para los trastornos psico-somáticos provocados por el inicio de la menopausia (McDonnell, 2003).

### **3. HIPÓTESIS**

Si el elemento de respuesta a estrógenos se encuentra en los promotores del gen de la uteroglobina del zacatuche (*Romerolagus diazi*) y de la liebre (*Lepus capensis*); entonces su expresión genética será regulada por la hormona  $17\beta$ -estradiol.

## **4. OBJETIVOS**

## **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación estrogénica de la transcripción del gen de la UG de zacatuche (*R. diazi*) y liebre (*L. capensis*).

## **4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

**4.2.1** Estudiar la estructura de la región promotora 5' del gen de la UG de zacatuche (*Romerolagus diazi*) y liebre (*Lepus capensis*).

**4.2.2** Obtener plásmidos que contengan el gen reportero de la luciferasa gobernados por el promotor de la UG de zacatuche y liebre.

**4.2.3** Estudiar la regulación de la expresión del gen de la UG de zacatuche y liebre mediada por  $17\beta$ -estradiol.

**4.2.4** Estudiar las regiones y los elementos genéticos del promotor de UG de zacatuche y liebre involucrados en su regulación estrogénica.

**4.2.5** Determinar la interacción de los factores de transcripción con los *cis*-elementos del promotor de la UG involucrados en la regulación estrogénica.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **5.1 Clonación de la región de flaqueo 5' del gen de la UG de zacatuche y liebre.**

La clonación de las regiones flanqueantes 5' de la UG de ambas especies se llevó a cabo por PCR (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando como moldes el ADN genómico de zacatuche que fue aislado a partir de muestras de hígado de zacatuche (donado a partir de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología de la UNAM; por el Dr. Fernando Cervantes) y el ADN genómico de liebre donado por el Dr. Antonio Nieto del Centro de Biología Molecular (Madrid, España).

Como iniciadores de polimerización se utilizó el oligonucleótido en sentido UG-R3 y el oligonucleótido en antisentido UG-R2-rev (Tabla 1) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), deducidos de regiones muy conservadas y pertenecientes al gen de la UG de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Cato *et al.*, 1984; Menne *et al.*, 1982). Las reacciones se amplificaron durante 30 ciclos [(30 s/ 94 °C), (2 min/ 52 °C), (3 min/ 72 °C)], seguido de un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 min. Las reacciones de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. El ADN amplificado de 869 pb correspondiente a zacatuche y de 886 pb correspondiente a liebre fue purificado mediante el sistema comercial *Gene Clean II Kit* (Bio 101, Carlsbad, CA, USA). Cada uno de los fragmentos se clonó en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) y se propagaron en bacterias *Escherichia coli* JM109 (Promega). Los plásmidos recombinantes (pZUG0.9 y pLUG0.9) se purificaron por lisis alcalina mediante el sistema comercial *Wizard*

*Plus SV Minipreps* (Promega). Los insertos de ADN genómico de cuatro clonas de cada plásmido fueron secuenciados en ambas cadenas, utilizando el sistema comercial *Big Dye Terminator* y el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## **5.2 Análisis de la estructura del promotor de la UG.**

Las secuencias de nucleótidos resultantes de la región flanqueante 5' del gen de la UG de ambas especies fueron analizadas con el programa BLAST (National Center for Biotechnology information. Bethesda, MD, USA) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Las regiones flanqueantes 5' del gen de la UG de ambas especies fueron alineadas con la secuencia del gen de UG de conejo (No. de acceso X01423), mediante el programa Clustalw2 (Larkin *et al.*, 2007) (European Bioinformatics Institute. Cambridge, UK) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) para determinar la homología.

Para establecer los *cis*-elementos conservados y los posibles *trans*-factores con los que interaccionan, se utilizó el programa TFSEARCH (Heinemeyer *et al.*, 1998) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH>).

### **5.3 Construcción de plásmidos reporteros (ver Fig. 5.1).**

Con el fin de comprender la regulación transcripcional de la UG mediada por estrógenos se diseñaron construcciones reporteras.

Construcciones con el promotor de la UG de zacatuche.

A partir del plasmido pZUG0.9 se amplificaron por PCR tres fragmentos de diferentes tamaños (Fig. 5.1), usando como iniciadores de polimerización los oligonucleótidos Rd-UG-pr5, Rd-UG-pr3, Rd-UG-pr6.1 y Rd-UG-pr2rev (Tabla 1). Se amplificaron fragmentos de aprox. 0.8, 0.3 y 0.21 kb, los cuales se purificaron (*Gene Clean II*) y fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Hind* III (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Posteriormente se ligaron al vector reportero pGL3-Enhancer (Promega), que fue digerido previamente con las mismas enzimas de restricción.

Los plásmidos que se obtuvieron (Fig. 5.1) contienen el gen de la luciferasa bajo el control transcripcional de cada uno de los fragmentos del promotor de la UG (pZUG0.8, pZUG0.3 y pZUG0.2). Posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* JM109 supercompetentes con los plásmidos para su propagación. La orientación y fidelidad de cada construcción fue corroborada mediante secuenciación (ABI PRISM 3700).

Utilizando el sistema *Endofree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) se obtuvieron los ADN plásmidos puros y libres de endotoxinas por medio de cromatografía de intercambio aniónico, los cuales se cuantificaron por espectrofotometría a 260 nm y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

#### Construcciones con el promotor de la UG de conejo.

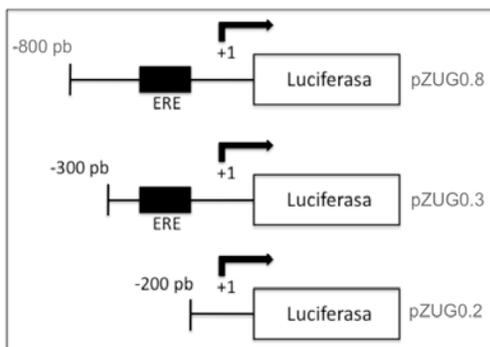
Utilizando el plásmido pUG16 como molde, se realizaron construcciones de longitudes similares del promotor de la UG de conejo (pCUG0.8, pCUG0.3 y pCUG0.2) utilizando la misma estrategia mencionada anteriormente (Fig. 5.1). El plásmido pUG16 contiene el gen completo de la UG de conejo (11.6 kb) y fue derivado del plásmido pUG17 (Cato *et al.*, 1984) (número de acceso X.01423.1). El plásmido pUG16 fue donado por el Dr. M. Beato (Instituto de Biología Molecular e Investigación de Tumores. Marburg, Alemania). Los oligonucleótidos utilizados fueron Rd-UG-pr5, Oc-UG-pr3, Oc-UG-pr6.1 y UG-pr2-rev (ver Tabla 1). La fidelidad de cada construcción fue corroborada por secuenciación de ADN.

#### Construcciones con el promotor de la UG de liebre.

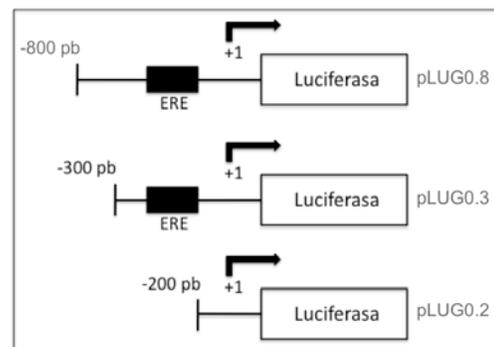
Utilizando como molde el plásmido pLUG0.9 y los oligonucleótidos RdUG-pr5, Lc-UG-pr3, Rd-UG-pr6.1 y Rd-UG-pr2-rev (ver Tabla 1), se amplificaron por PCR fragmentos de longitud similar pLUG0.8, pLUG0.3 y pLUG0.2 (Fig.5.1) a las de zacatuche; utilizando la misma estrategia. La fidelidad de cada construcción se corroboró por medio de secuenciación.

Construcción con el promotor de la UG de hámster.

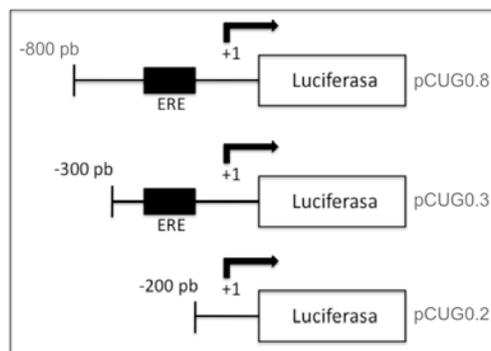
También se utilizó una construcción de 363 pb correspondiente al promotor de UG de hámster (*Mesocricetus auratus*); Esta construcción fue clonada anteriormente en el vector pGL3E de forma similar (Macías *et al.*, 2004).



Zacatuche (*Romerolagus diazi*)



Liebre (*Lepus capensis*)



Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Figura 5.1. Esquemática de las construcciones reporteras gobernadas por los promotores de la UG de las tres especies de lagomorfos.

#### **5.4 Construcción del plásmido de expresión (ver Fig. 5.2).**

El plásmido de expresión pSG5-HEGO donado por el Dr. P. Chambon (Instituto de Genética, Biología Molecular y Celular. Estrasburgo, Francia), se utilizó como molde para amplificar el ADNc del receptor de estrógenos  $\alpha$ . El PCR fue llevado a cabo utilizando la DNA polimerasa *Pfu* de alta fidelidad y los oligonucleótidos HEGO-fwd, HEGO-rev (ver Tabla 1). El ADNc se subclonó en el sitio *Eco* RV del vector de expresión pcDNA3.1/V5-HisB (Invitrogen). De esta manera se obtuvo el receptor de estrógenos  $\alpha$  con una bandera (epitope V5) en el extremo carboxilo terminal (Fig 5.2).

El plásmido fué transformado en las bacterias *E. coli* (JM109) y purificado (*Endofree Maxi Kit*). Se verificó la orientación y fidelidad por medio de secuenciación automática de ADN.

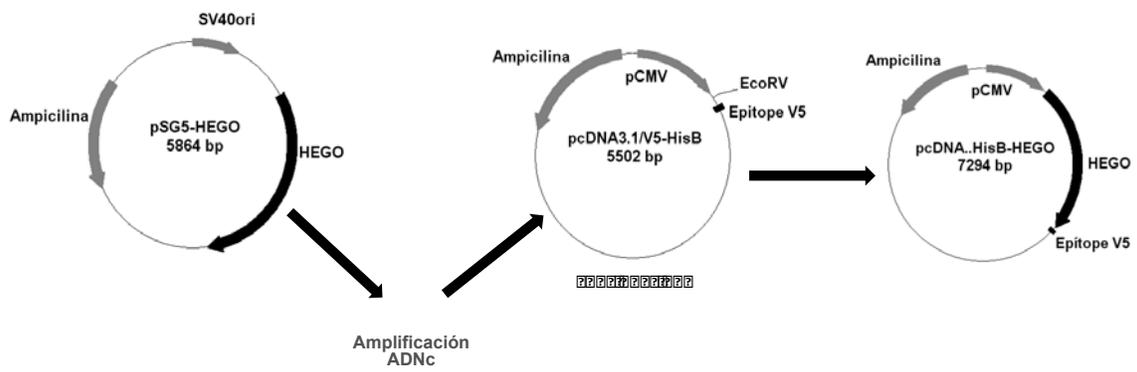


Figura 5.2. Esquematización del procedimiento de subclonación del receptor de estrógenos  $\alpha$  en el plásmido de expresión pcDNA3.1/ V5-HisB.

## 5.5 Mutagénesis sitio-dirigida.

### Mutación del ERE en pZUG0.3.

La construcción que contiene 0.3 kb del promotor de la UG de zacatuche clonada en el vector pGL3E contiene un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (AGGTCGccaTGCCCT) que difiere en una base al ERE de conejo (EREC) y en dos bases al elemento de respuesta consenso (ERE<sub>p</sub>). Esta construcción se usó como molde para crear dos construcciones mutantes en el ERE; una con el ERE consenso (pZUG0.3ERE<sub>p</sub>) (AGGTCAccaTGACCT) y otra con el ERE idéntico al de conejo (pZUG0.3EREC) (AGGTCAccaTGCCCT), utilizando los oligonucleótidos UG-ERE<sub>p</sub>, UG-ERE<sub>p</sub>-rev, UG-ERE y UG-ERE-rev (ver Tabla 1), mediante el sistema comercial *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

### Mutación del ERE en pCUG0.3.

La construcción con longitud de 0.3 kb del promotor de la UG de conejo contiene un ERE (AGGTCAccaTGCCCT) que difiere en una base al ERE consenso. Esta construcción fue usada como molde para crear dos construcciones mutantes del ERE, una con el ERE consenso (pCUG0.3ERE<sub>p</sub>) (AGGTCAccaTGACCT) y la otra con el ERE de zacatuche (pCUG0.3ERE<sub>z</sub>) (AGGTCGccaTGCCCT), utilizando los oligonucleótidos UG-ERE<sub>p</sub>, UG-ERE<sub>p</sub>-rev, Rd-UG-ERE y Rd-UG-

ERE-rev (ver Tabla 1).

#### Mutación del ERE en pLUG0.3.

El ERE (AGGTCAccaTGCCCT) que se encuentra en la construcción que contiene 0.3 kb del promotor de la UG de liebre es idéntico al ERE de conejo. El plásmido pLUG0.3 fue utilizado como molde para crear dos construcciones mutantes, una con el ERE consenso (pLUG0.3ERE<sub>p</sub>) (AGGTCAccaTGACCCT) y la otra con el ERE de zacatuche (pLUG0.3ERE<sub>z</sub>) (AGGTCGccaTGCCCCT), utilizando los oligonucleótidos UG-ERE<sub>p</sub>, UG-ERE<sub>p</sub>-rev, Rd-UG-ERE y Rd-UG-ERE-rev (ver Tabla 1).

La fidelidad de las construcciones mutantes se corroboró mediante secuenciación de ADN.

## **5.6 Construcciones quiméricas del promotor de la UG.**

Con el fin de determinar la región involucrada en la nula respuesta por estrógenos sobre la actividad transcripcional del promotor de la UG de hámster se diseñaron construcciones quiméricas a partir de los promotores de UG de hámster y de liebre los cuales contenían el ERE consenso (pHUG0.3EREp y pLUG0.3EREp). A cada una de las construcciones se les creó un sitio *Bgl* II localizado aprox -100 pb corriente arriba del SIT por medio de mutagénesis sitio-dirigida utilizando los oligonucleótidos HUG0.3-Bgl-s, HUG0.3-Bgl-as, LUG0.3-Bgl-s y LUG0.3-Bgl-as (Tabla 1). Después mediante digestiones enzimáticas en ambos plásmidos, se obtuvieron dos fragmentos con una longitud de 100 pb localizados entre los dos sitios *Bgl* II (Fig. 5.3). Así también se obtuvieron dos fragmentos abiertos de 5264 pb correspondientes al vector pGL3-E unido a los aproximadamente 200 pb restantes de cada uno de los promotores. Posteriormente se ligaron los fragmentos de 100 pb con los fragmentos de 5264 pb en combinación cruzada dando por resultado los plásmidos pHUG0.2/LUG0.1EREp y pLUG0.2/HUG0.1EREp (Fig. 5.4).

La fidelidad de las construcciones quiméricas se corroboró mediante secuenciación de ADN.

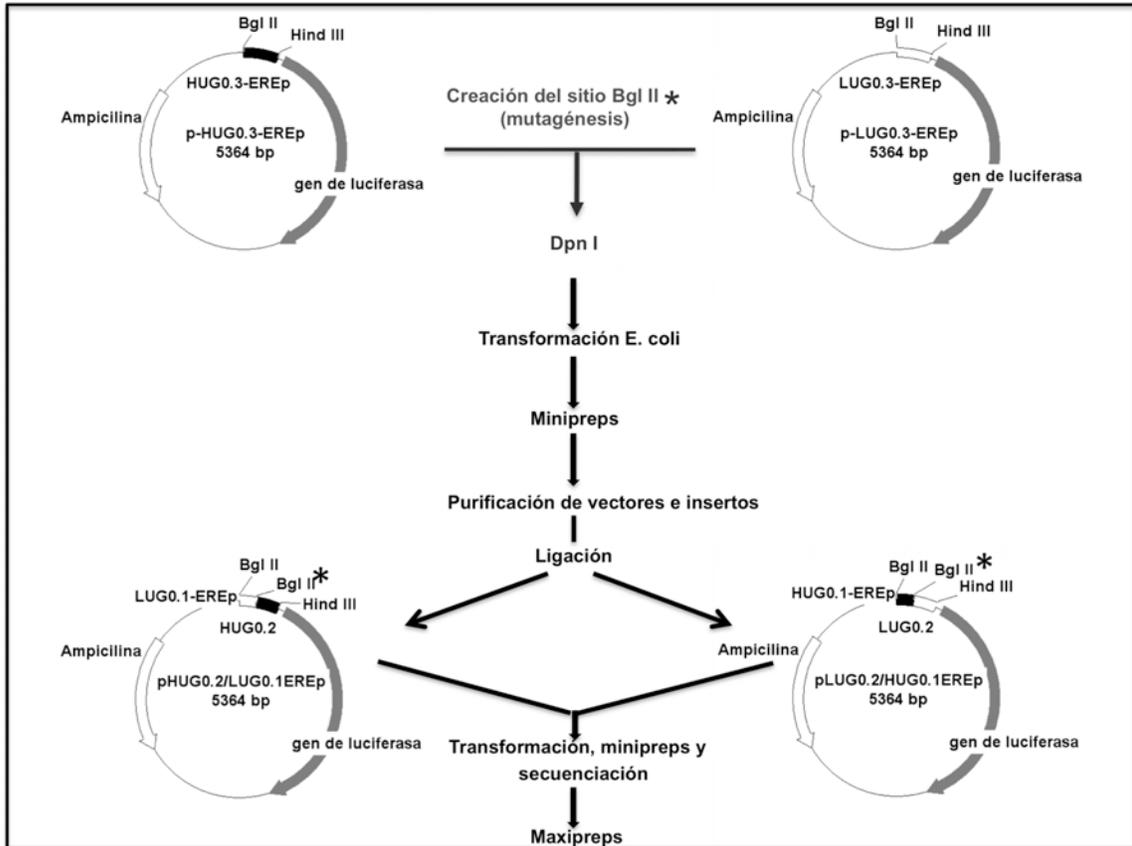


Figura 5.3. Diseño de las construcciones reporteras químicas del promotor de la UG de hámster y liebre.

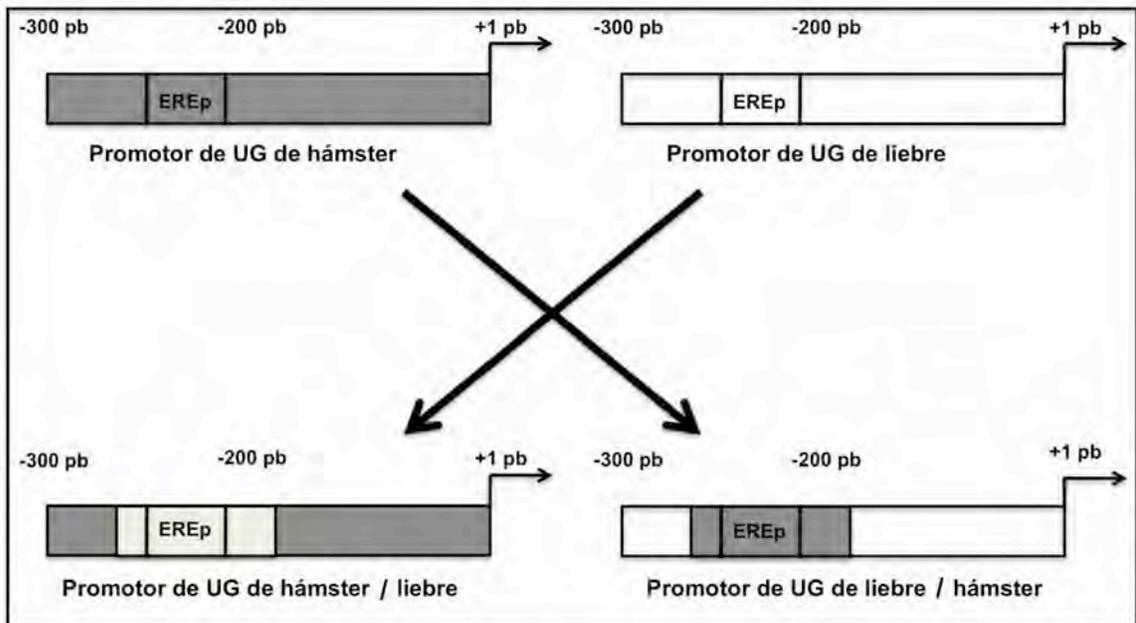


Figura 5.4. Esquemática de construcciones reporteras quiméricas entre los promotores de UG de liebre y hámster.

## Construcciones quiméricas truncadas del promotor de UG.

A partir de las construcciones pHUG0.2/LUG0.1EREp y pLUG0.2/HUG0.1EREp se diseñaron otras construcciones más reducidas, eliminando regiones en los 100 pb donde se encuentra el ERE de cada quimera; con el fin de acotar la región involucrada en la inhibición de la respuesta por estrógenos. Se obtuvieron 11 quimeras totales. Las construcciones pHUG0.2/LUG0.093, pHUG0.2/LUG0.060 se realizaron amplificando cada fragmento por PCR, ligándolos en el vector pGEMT, digiriendo los fragmentos con la enzima *Bgl* II y ligándolos en el vector pGL3E-HUG0.2/*Bgl* II. Las construcciones pLUG0.2/HUG0.068, pLUG0.2/HUG0.055, y pLUG0.2/HUG0.043 se realizaron de la misma forma ligándolos en el vector pGL3E-LUG0.2/*Bgl* II. Los oligonucleótidos utilizados fueron LUG-2/3-F, LUG-3-R, LUG-2-R, HUG-2/3F, HUG-3-R, HUG-2.5-R y HUG-2-R (ver Tabla 1).

Las construcciones pLUG0.2/HUG0.051 y pLUG0.2/HUG0.046 se obtuvieron por mutagénesis sitiodirigida utilizando como molde el plásmido pGL3E-LUG0.2-HUG0.068 EREp y los oligonucleótidos LUG/Q0.2-F, HUG-2.4-R y HUG-2.3-R (ver Tabla 1). Las construcciones pHUG0.2/LUG0.028 y pHUG0.2/LUG0.018 se obtuvieron hibridando los oligonucleótidos LUG-1-F con LUG-1-R y LUG-0-F con LUG-0-R (Ver Tabla 1), fosforilándolos y ligándolos al vector pGL3E-HUG0.2/*Bgl* II. Las construcciones pLUG0.2/HUG0.022 y pLUG0.2/HUG0.15) se obtuvieron de la misma forma ligando los oligonucleótidos HUG-1-F con HUG-1-R y LUG-0-F con LUG-0-R (ver Tabla 1) fosforilados al vector pGL3E-LUG0.2/*Bgl* II. La representación de las quimeras finales se esquematizan en la Fig. 5.5.

Con el fin de localizar el elemento “inhibidor” dentro del promotor de la UG de hámster, se realizaron dos construcciones reporteras por medio de mutagénesis sitio-dirigida; a partir de la construcción pLUG0.2/HUG0.068. Se utilizaron los oligonucleótidos HUG0.3EREp/del inhF, HKLFwt-F y HUG-DEL-COUP-rev (ver Tabla 1), delimitando la construcción, de tal forma que ahora los fragmentos eliminados del promotor de UG de hámster estuvieran unidos a los 200 pb pertenecientes a liebre y se obtuvieron las construcciones pLUG0.2/HUG0.029 y pLUG0.2/HUG0.047 (Fig. 5.6). A la primera construcción se le eliminó completamente el elemento **inhibidor**, así como otras secuencias. Por otra parte la segunda construcción se diseñó de tal forma que mantuviera dicho elemento **inhibidor**.

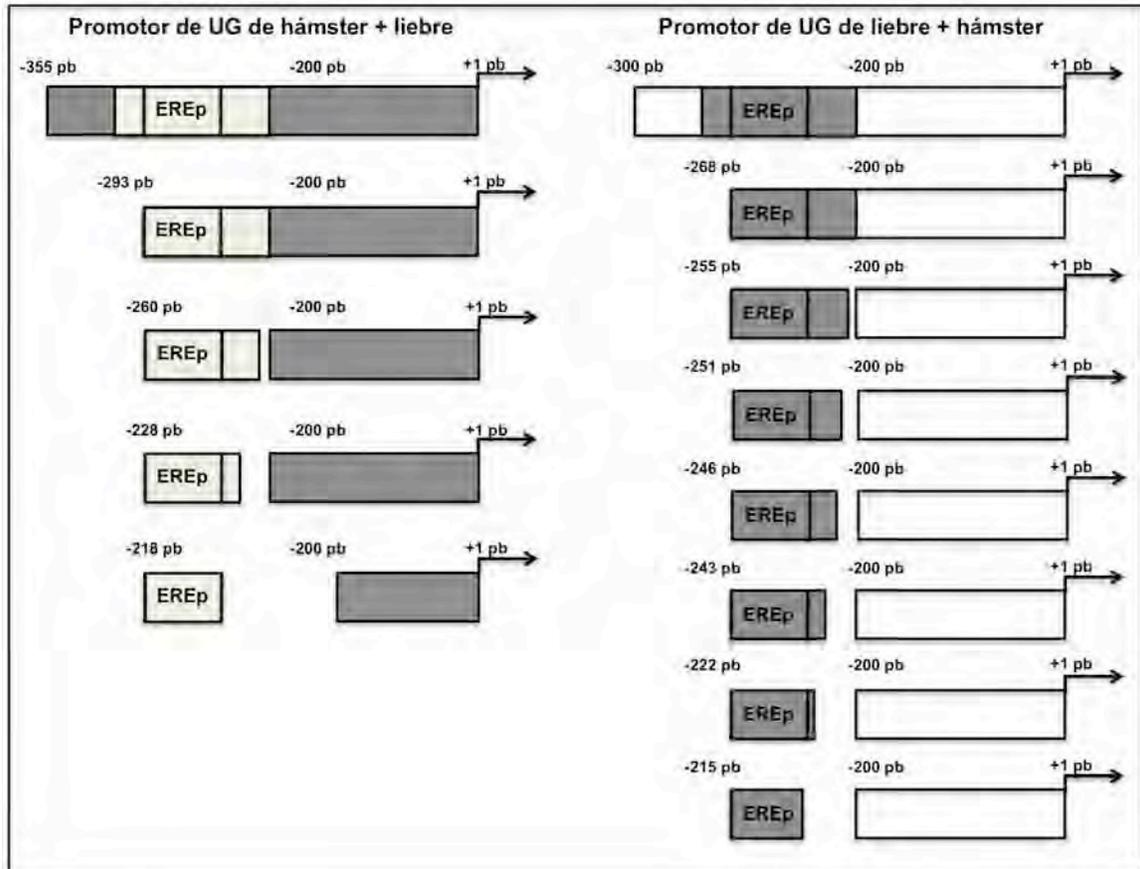


Figura 5.5. Representación esquemática de las construcciones gobernadas por los promotores quiméricos truncados, para liebre y hámster.

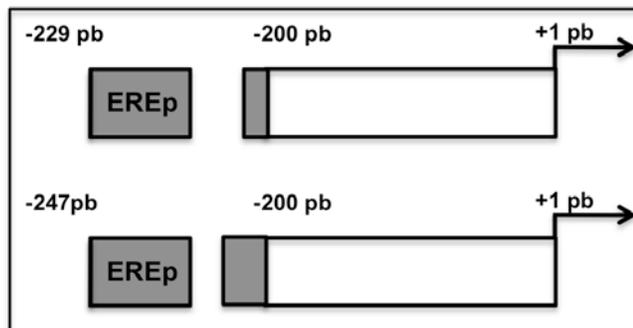


Figura 5.6. Representación esquemática de construcciones quiméricas truncadas a partir de quimeras entre el promotor de UG de liebre/hámster.

### Mutación del elemento “CCAAAAG” en pHUG0.3EREp.

Para demostrar que el elemento con secuencia “CCAAAAG” es el responsable de la nula regulación por estrógenos sobre el promotor de la UG de hámster, se utilizó el plásmido pHUG0.3EREp que sirvió como molde para mutar el elemento en *cis*. Se utilizaron los oligonucleótidos HUG0.3EREp/del-inh-F y HUG0.3EREp/del-inh-R (ver Tabla 1). El elemento CCAAAAG se eliminó por completo del promotor de UG de hámster que contiene artificialmente el EREp. Resultaron 4 diferentes construcciones con el elemento deletado: pHUG0.3-EREp/del inh1, pHUG0.3-EREp/del inh2, pHUG0.3-EREp/del inh3 y pHUG0.3-EREp/del inh4 (Fig. 5.7).

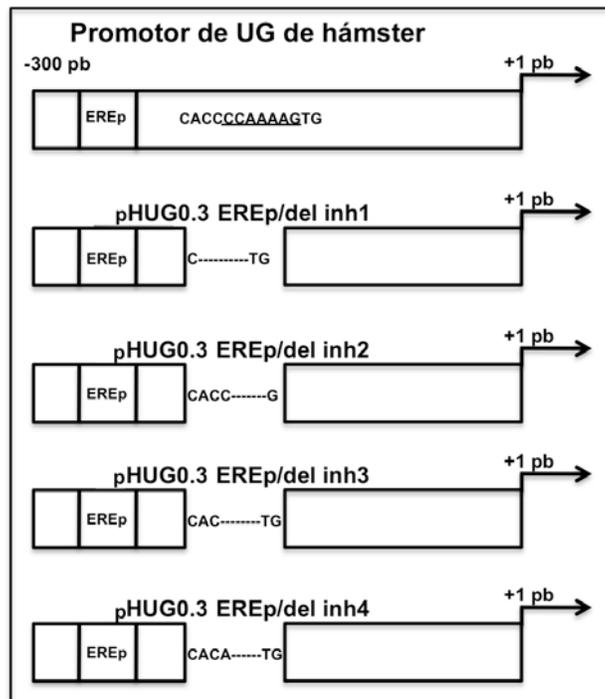


Figura 5.7. Esquema de las 4 diferentes construcciones con el elemento “inhibidor” truncado, diseñadas a partir del promotor de UG de hámster con el EREp.

### **5.7 Cultivo celular y ensayos de expresión transitoria.**

La línea celular MCF-7 es derivada de un adenocarcinoma de glándula mamaria humano, que expresa los dos receptores para hormonas estrogénicas. Esta línea celular se cultivó en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), sin antibióticos. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para los ensayos de expresión transitoria, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos (75,000 células/pozo), en medio DMEM sin rojo de fenol (Gibco-BRL), suplementado al 10% con SFB previamente tratado con carbón-dextrán (Hyclone, South Logan, UT, USA), sin antibióticos.

Al día siguiente, las células fueron transfectadas con 250 ng de cada construcción reportera, utilizando el lípido catiónico Superfect (Qiagen). Como control interno de eficiencia de la transfección las células se cotransfectaron con 50 ng del plásmido de expresión pRL-TK (luciferasa de renilla).

Después que la transfección cumplió 24 h, las células se estimularon con la hormona 17β-estradiol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) o con vehículo (etanol) en el caso del control. Un día después del estímulo, las células fueron lisadas y a partir de muestras de cada lisado se determinó la actividad de las enzimas luciferasas (de luciérnaga y renilla) utilizando el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) en un luminómetro Fentomaster FB15 (Zylux Corp., Maryville, TN, USA). Se llevaron a cabo tres ensayos independientes por duplicado.

### **5.8 Curva dosis respuesta de estradiol.**

Para determinar cual era la concentración más adecuada de hormona para ser utilizada en las transfecciones se utilizaron las construcciones reporteras de 300 pb del promotor de la UG de zacatuche y de conejo, para realizar una curva dosis respuesta, empleando cinco diferentes concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol ( $1 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M).

### **5.9 Inmuno-detección del receptor de estrógenos $\alpha$ .**

El receptor de estrógenos  $\alpha$  se obtuvo mediante la transcripción y traducción *in vitro* del vector de expresión pcDNA3.1/V5-HisB/HEGO utilizando el sistema de reticulocitos lisados de conejo TNT (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para verificar la adecuada traducción, se resolvió 3 $\mu$ l de la reacción de traducción en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% (EGPA-SDS) (Sambrook *et al.*, 1989) que fue transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) *immobilon-P* (Millipore, Bedford, MA), durante 35 min. a 20 mA. Después de bloquear la membrana, se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón específico contra el epítipo V5 (HRP-conjugated Anti V5 antibody) (Invitrogen), acoplado a la enzima peroxidasa de rábano. Se reveló la presencia del receptor mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL (GE, Piscataway, NJ, USA) e inmediatamente se expuso la membrana a una placa fotosensible (Kodak).

### **5.10 Análisis de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).**

Para desarrollar este experimento, se manejó la técnica descrita por Ausubel y col. (2000), utilizando los oligonucleótidos Rd-UG-ERE, UG-ERE (ver Tabla 1) de doble cadena (Invitrogen) que contenían la secuencia del ERE de cada una de las especies en estudio (zacatuche y liebre/conejo) (ver Tabla 1). También se utilizaron los oligonucleótidos UG-ERE<sub>p</sub> y UG-ERE-mut que contenían el ERE consenso (control positivo) y el ERE mutado que es incapaz de unir a los receptores estrogénicos (control negativo) (ver Tabla 1). Los oligonucleótidos de doble cadena se radio-marcaron en el extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol) (GE), utilizando la enzima polinucleótido cinasa de T4 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) por 30 min a 37°C (Sambrook *et al.*, 1989).

Después de una reacción de unión de 10 minutos a temperatura ambiente en buffer de unión [Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 0.5 mM, DTT 0.5 mM, poly (dl-dC) 0.05 mg/ml y glicerol al 4%] entre las sondas que contenían los diferentes EREs [(30 fmol) (~35,000 cpm)] con el RE traducido *in vitro* (3 $\mu$ l), las diferentes mezclas de unión se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas. Los geles se secaron con calor al vacío y fueron expuestos a películas radio-sensibles de 1 a 3 días. En algunas reacciones de unión se utilizaron los oligonucleótidos no marcados como competidores con una concentración de 100 veces más de exceso molar y para

los estudios de super-retardo se emplearon 2  $\mu$ g de anticuerpo policlonal de conejo, específico contra el receptor de estrógenos (MC-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) o 2 $\mu$ g de anticuerpo monoclonal contra el epítotope V5 (Invitrogen). Como control negativo se utilizó un anticuerpo monoclonal no relacionado, contra GATA-2 (CG2-96) (Santa Cruz Biotechnology).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usadas en este estudio			
Nombre	Secuencia	Tamaño (nt)	Aplicación
UG-R3	5' -TGGGAACCACCACCACTCAAGAGCAGT-3'	27	Clonación de ADN genómico
UG-R2-rev	5' -GAGAGCCAGGGTGACCAGGGCGAGGTGATGG-3'	32	Clonación de ADN genómico
Rd-UG-pr5	5' -GGACGAGCAAGATCTGAAGAG-3'	22	Reporteros: pZUG0.7, pCUG0.7 y pLUG0.7
Rd-UG-pr3	5' -GGTGACAAGATCTACGCTTGCTTCTG-3'	26	Reportero: pZUG0.3
Oc-UG-pr3	5' -GGTGACAAGATCTACCTTGCTTCTG-3'	26	Reportero: pCUG0.3
Lc-UG-pr3	5' -CTTCTGGGTGACAAGATCTATGCTTGCTTCTG-3'	32	Reportero: pLUG0.3
Rd-UG-pr6.1	5' -GGTGGCCAGGTGCGCAAGATCTCGGGTGC-3'	29	Reportero: pZUG0.2 y PLUG0.2
Oc-UG-pr6.1	5' -GCTAGGTACCAAGATCTCGGGGC-3'	25	Reportero: pCUG0.2
Rd-UG-pr2-rev	5' -GGAAGGCTCTAAGCTTGTCTGGTCCGC-3'	29	Reporteros: pZUG0.7, pZUG0.3 y pZUG0.2 pLUG0.7, pLUG0.3 y pLUG0.2
UG-pr2-rev	5' -GGAAGGCTCTAAGCTTGTCTGGATCCGG-3'	29	Reportero: pCUG0.7, pCUG0.3 y pCUG0.2
Rd-UG-ERE	5' -GGCCAGGTCGCCATGCCCTCGGG-3'	23	Mutagenesis and EMSA
Rd-UG-ERE-rev	5' -CCCGAGGGCATGGCGACCTGGCC-3'	23	Mutagenesis and EMSA
UG-ERE	5' -GGCCAGGTCACCATGCCCTCGGG-3'	23	Mutagenesis and EMSA
UG-ERE-rev	5' -CCCGAGGGCATGGTGACCTGGCC-3'	23	Mutagenesis and EMSA
UG-EREp	5' -GGCCAGGTCACCATGACCTCGGG-3'	23	Mutagenesis and EMSA
UG-EREp-rev	5' -CCCGAGGTCATGGTGACCTGGCC-3'	23	Mutagenesis and EMSA
LUG0.3-Bgl-s	5' -CCATTGTGTGAGATCTGTTTCAATAGGG-3'	28	Creación sitio Bgl II
LUG0.3-Bgl-as	5' -CCCTATTGAAACAGATCTCACACAATGG-3'	28	Creación sitio Bgl II
HUG0.3-Bgl-s	5' -CCTGTGTTGAGATCTGTTTCAATGGG-3'	27	Creación sitio Bgl II
HUG0.3-Bgl-as	5' -CCCATGAAACAGATCTCAACAACAGG-3'	27	Creación sitio Bgl II
LUG-2/3-F	5' -AGATCTAGGTCACCATGACCTCGG-3'	24	Reporteros: pHUG0.2/LUG0.093 y pHUG0.2/LUG0.060
LUG-3-R	5' -AGATCTCACACAATGGGTCCTCG-3'	24	Reportero: pHUG0.2/LUG0.093
LUG-2-R	5' -AGATCTGGAGTCTTGTGTGGGG-3'	24	Reportero: pHUG0.2/LUG0.060
HUG-2/3-F	5' -AGATCTAGGTCACCATGACCTCTG-3'	24	Reporteros: pLUG0.2/HUG0.068, pLUG0.2/HUG0.055 y pLUG0.2/HUG0.043
HUG-3-R	5' -AGATCTCAACAACAGGCCACTTTTG-3'	25	Reportero: pLUG0.2/HUG0.068
HUG-2.5-R	5' -AGATCTCTTTTGGGGTGTCCAGG-3'	23	Reportero: pLUG0.2/HUG0.055
HUG-2-R	5' -AGATCTCCAGGCAGTGGGGGGAG-3'	24	Reportero: pLUG0.2/HUG0.043
LUG/Q0.2-F	5' -AGATCTGTTTCAATAG-3'	16	Reportero: pLUG0.2/HUG0.051 y pLUG0.2/HUG0.046
HUG-2.4-R	5' -TGGGGTGTCCAGGCAG-3'	16	Reportero: pLUG0.2/HUG0.051
HUG-2.3-R	5' -TGTCCAGGCAGTGGGG-3'	16	Reportero: pLUG0.2/HUG0.046
LUG-1-F	5' -GATCTAGGTCACCATGACCTCGGGTCCGGGCACA-3'	34	Reportero: pHUG0.2/LUG0.028
LUG-1-R	5' -GATCTGTGCCCGCACCCGAGGTGATGGTGACCTA-3'	34	Reportero: pHUG0.2/LUG0.028
HUG-1-F	5' -GATCTAGGTCACCATGACCTCTGACTTA-3'	28	Reportero: pLUG0.2/HUG0.022
HUG-1-R	5' -GATCTAAGTCAGAGGTGATGGTGACCTA-3'	28	Reportero: pLUG0.2/HUG0.022
LUG-0-F	5' -GATCTAGGTCACCATGACCTA-3'	21	Reporteros: pLUG0.2/HUG0.015 y pHUG0.2/LUG0.018
LUG-0-R	5' -GATCTAGGTCATGGTGACCTA-3'	21	Reporteros: pLUG0.2/HUG0.015 y pHUG0.2/LUG0.018
HUG0.3EREp/del inhF	5' -TGGCTGTGTTGAGCTCAGT-3'	21	Reporteros: pLUG0.2/HUG0.029 y pHUG0.3 EREp/del inh 1,2,3 y 4
HUG-DEL-COUP-rev	5' -GAGGTCATGGTGACCTGGAC-3'	20	Reporteros: pLUG0.2/HUG0.029 y pLUG0.2/HUG0.047
HKLFwt-F	5' -GCCTGGACACCCAAAAGTG-3'	20	Reportero: pLUG0.2/HUG0.047
HUG0.3EREp/del inhR	5' -GGTGTCCAGGCAGTGGGGGG-3'	20	Reporteros: pHUG0.3 EREp/del inh 1,2,3 y 4
HEGO-fwd	5' -GCCACCATGACCATGACCTCCACACC-3'	27	Plásmido de expresión RE $\alpha$
HEGO-rev	5' -GACTGTGGCAGGAAACCTCTGCCTCCCC-3'	30	Plásmido de expresión RE $\alpha$
UG-ERE-mut	5' -GGCCAGCACGCCATGCGCTCGGG-3'	23	EMSA
UG-ERE-mut-rev	5' -CCCGAGGGCATGGCGTCTGGCC-3'	23	EMSA

## **6. RESULTADOS**

## **6.1 Clonación y análisis de secuencia de la región flanqueante 5' del gen de la UG de zacatuche.**

Con el fin de hacer la caracterización de la región de flaqueo 5' del gen de la UG de zacatuche, 868 pb fueron amplificados utilizando la técnica de PCR. El fragmento fue clonado en el vector pGEMT. Cuatro clonas independientes fueron seleccionados para determinar la secuencia de nucleótidos (Fig. 6.1). La región flanqueante 5' de este gen se expande 812 pb (-812 a -1), seguido del SIT putativo (AGA) deducido por comparación con el gen de la UG de conejo. Se identificó una caja TATA no canónica (TACA) idéntica a la del gen de la UG de conejo; que va de -32 a -29 pb. También se pudo identificar un fragmento del primer exón que codifica para los primeros tres aminoácidos (M, K y L) de la UG de zacatuche, precedido por la secuencia consenso Kozak localizada de +42 a +47 pb.

El análisis computacional para predecir sitios de unión para factores de transcripción, detectó un sitio de unión para miembros de la familia de los factores de transcripción GATA situado de -668 a -664 pb, un sitio de unión para el factor estimulante corriente arriba (USF) localizado de -512 a -507 pb, así como dos sitios de unión para el factor nuclear de hepatocitos (HNF-3) que van de -134 a -123 pb y de -102 a -91 pb respectivamente.

```

-812 CAGGGACGAGCAAACATCTGAAGAGAACAAGAAGGAATGGTCAGCGAGGGACAACAGGAAAGAACTGAGCCGTGGGAAAG -733
-732 CACGGGAGAGAATGGCTGAAGAAGGAAATGGCCAAGAGGGTCAAGGCCATTAGGAGGTCAAGGTTGATAAGGGCTGCAGGT -653
      GATA
-652 GCCCATCAAAGAGGGCCTCGGAAGGGTGAGCTTGAGGTCATTTCTAGGCCACAACAGACCCAGCCGGGCAGGGCATTGG -573
-572 CTCGGCCAGGTACGGGGTTTGGGTCTTTGGTGAGTGCTCTGGGAAAGTCTTTTTGCGTCCACGTGTTTCAGGCCAGGGTC -493
      USF
-492 TCCTCCAGGTCTGACCACAGCAATGCTCTGAACCCAGTGACCTTCATGGTTCAACGTCCTTGGAGGGGGGAAGCAGAGGA -413
-412 GCCCAGTGCAGCCGAGGATCCTGGGTGCTCCTGTCCTGTCCTCGGCCACTTGGGCCCTCAGCTTCTCCTGGGGTGACAGGA -333
-332 CACACGCTTGCTTCTGTTGGTCTGGGCTGCCCAATGCCCTGGTTCAAAGAGAAGACGCAGGTGGCCAGGTGCGCCATGCC -253
-252 CTCGGGTGCGGACACCCCTTGCCACCCCGCACAAGACTCCGGGCTCTCCCTCCCCCGAGGGACCCATTGTGTGAGT -173
-172 GCAGTTTCAATAGGGATGGAAGTGGATTGAGAAAAGGGAATATTTACTTATCCACCAAGCCAATGCCCAAGCAAATAA -93
      HNF-3 HNF-3
-92 TGCAGTCAAGTAAGTGGAACCCAGGCCCTGCCCTCTTCTATCTGGGCACTGCCCGGAGAAATACAAAAAGGCACCTGACGG -13
-12 CCGTCTCCCCAAGATCAGCGGACCCAGAGCCAGCCAGAGCCTTCCCATTCTgcccaccATGAAGCTCA +57
      M K L

```

Figura 6.1. Secuencia de nucleótidos de la región flanqueante 5' del gen de la UG de zacatuche. Los nucleótidos son enumerados a partir del SIT putativo, el cual se encuentra indicado por una flecha horizontal. Los sitios de unión putativos para factores de transcripción relevantes están subrayados y etiquetados. La caja TACA está subrayada y la secuencia consenso Kozak se indica con letras cursivas en minúscula. La secuencia de aminoácidos deducida está indicada debajo de la secuencia nucleotídica por el código de letra sencilla.

## **6.2 Análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos entre zacatuche y conejo.**

Las secuencias obtenidas de zacatuche y conejo fueron alineadas para determinar las similitudes y diferencias existentes entre estos promotores. Cabe mencionar que la secuencia de nucleótidos de la región flanqueante 5' del gen de la UG de conejo que se clonó a partir del plásmido pUG16, inesperadamente resultó con 5 diferencias nucleotídicas en las posiciones -347 (T/C), -293 (T/C), -266 (T/C), -232 (A/G) y -222 (C/T), con respecto a la secuencia original reportada por Cato y colaboradores en 1984 (Fig. 6.2). Las diferencias que se detectaron pueden deberse a que las técnicas de secuenciación actuales son más resolutivas que las utilizadas en aquella época.

Al alinear las regiones flanqueantes 5' del gen de la UG clonadas a partir de ambas especies, se obtuvo una homología del 93%, la cual aumenta hasta un 95%, si solo se incluyen los  $\approx$  390 nucleótidos de cada construcción (pZUG0.3 y pCUG0.3), confirmando su relación evolutiva (Fig. 6.2). Sin embargo cuando esta región es comparada con especies alejadas filogenéticamente como el humano y el hámster, la homología disminuye significativamente al 73% y 62% respectivamente.

Este alineamiento confirma la presencia de algunos elementos en *cis* anteriormente reportados en el promotor de la UG de conejo, como posibles blanco de factores de la transcripción basal, así como para la transcripción

inducida por hormonas esteroides. (Fig. 6.2). Se encontraron dos elementos para el factor SP1, localizados de -231 a -223 y de -203 a -195. Un elemento para SP1/SP3 (Dennig *et al.*, 1995; Scholz *et al.*, 1998) situado de -67 a -59. Dos elementos para el factor HNF-3 (Braun y Suske, 1998) localizados de -134 a -123 y de -102 a -91. Un sitio para la proteína endometrial nuclear dependiente de progesterona (TRBP 1 y 2) (García y Nieto, 1999) localizado de -22 a -17 y un sitio para el factor SOX-17 (García *et al.*, 2007) localizado de -184 a -177.

También se pudo observar en la región flanqueante 5' del gen de la UG de zacatuche un sitio de unión para el receptor de estrógenos (ERE) imperfecto (López de Haro *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990). Este elemento está localizado de -265 a -251 (Fig. 6.2) y difiere del ERE de conejo en un nucleótido (-260) y del ERE consenso en dos nucleótidos (Beato, 1989).

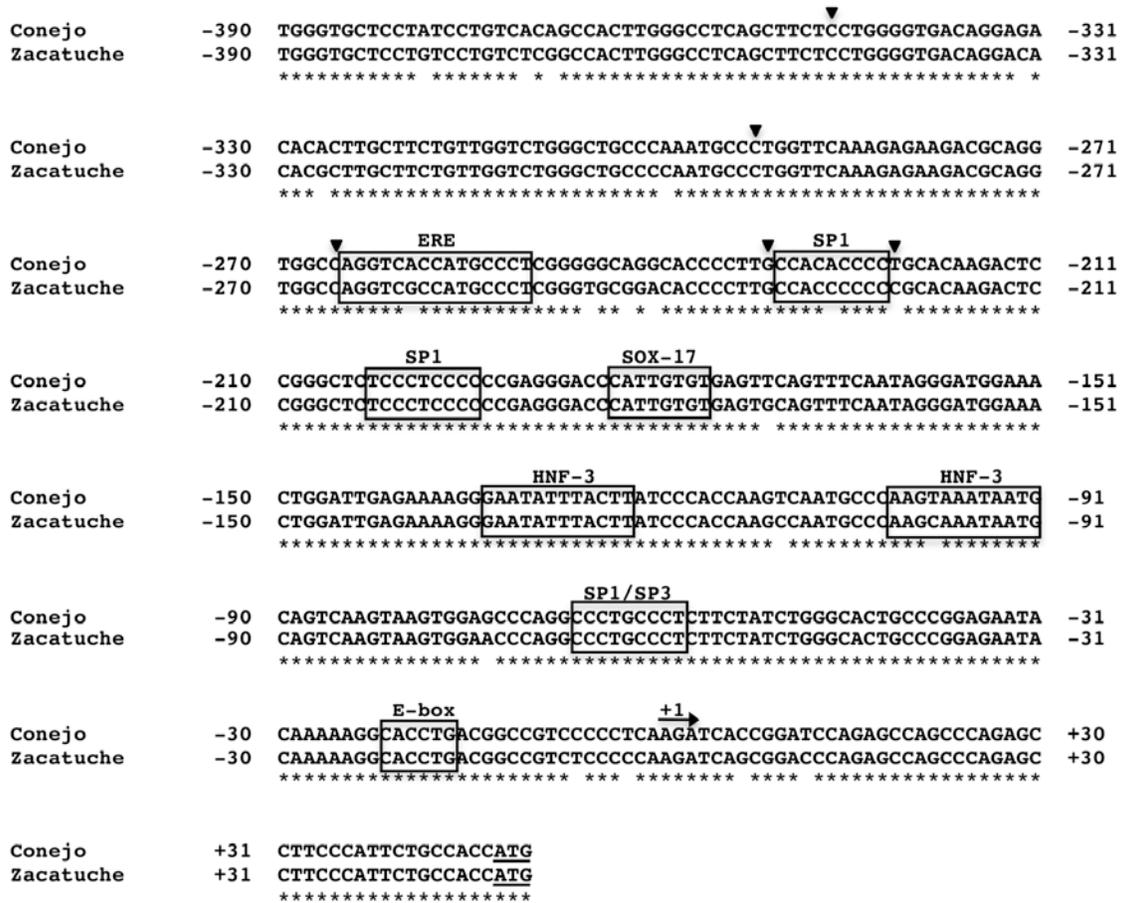


Figura 6.2. Alineamiento de las regiones del promotor del gen de la UG de conejo y de zacatucho. Las diferencias nucleotídicas entre el promotor de conejo reportado por Cato y col. en 1984 están indicadas con cabezas de flecha. Los sitios de unión para factores transcripcionales descritos para el promotor de conejo están marcados y encuadrados. El sitio de la transcripción putativo está indicado por una flecha horizontal. Los nucleótidos conservados (\*) y el sitio de inicio de la traducción ATG (subrayado) son indicados.

### **6.3 El ERE de la región flanqueante 5' del gen de la UG de zacatuche es funcional.**

Tomando en cuenta la conservación del ERE en el promotor de la UG de zacatuche, se procedió a determinar si la UG podía ser regulada por estrógenos en esta especie. Se examinó el efecto que causa el incremento progresivo ( $1 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ) de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) sobre la construcción reportera pZUG0.3 wt (-329 pb) que presenta el ERE con dos discrepancias nucleotídicas y sobre su contraparte pCUG0.3wt que contiene solamente una discrepancia nucleotídica; transfectando células MCF-7 (RE+).

Este ensayo mostró que el estradiol es capaz de activar los dos reporteros de manera dosis dependiente, alcanzando la actividad máxima con estradiol a  $1 \times 10^{-8}$  (Fig. 6.3). Sorprendentemente, la construcción reportera pZUG0.3 tuvo una actividad significativamente ( $P < 0.05$ ) mayor (1.72 veces de inducción) a la mostrada por el reportero pCUG0.3 (1.41 veces de inducción) a pesar de que el ERE correspondiente a conejo tiene mayor similitud al ERE consenso (Fig. 6.3).

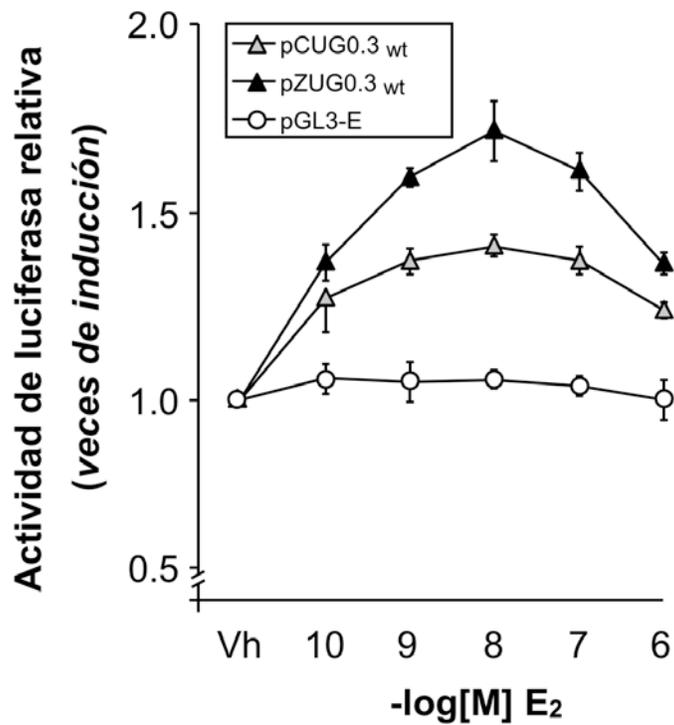


Figura 6.3. La transcripción del promotor de la UG de zacatuche es incrementada por 17 $\beta$ -estradiol. Células MCF-7 se transfectaron con pZUG0.3 o pCUG0.3 junto con el plásmido pRL-TK como control interno que siempre fue consistente, mostrando valores constantes. El vector vacío (pGL3E) se incluyó como control. Las células se estimularon con cantidades crecientes de E<sub>2</sub>. La actividad de la luciferasa se determinó en lisados celulares, 24 hr después del tratamiento hormonal. Los datos son presentados como veces de inducción, los cuales se obtuvieron dividiendo la respuesta de la luciferasa normalizada en presencia de E<sub>2</sub> entre la obtenida en ausencia de E<sub>2</sub> (Vh). Las transfecciones se realizaron por duplicado y las dispersiones indican la desviación estándar.

#### **6.4 El 17 $\beta$ -estradiol induce la transcripción del promotor de la UG de zacatuche a través de su ERE.**

Para determinar qué tan importante es el ERE sobre la actividad transcripcional mediada por estrógenos en el promotor de la UG de zacatuche, así como también el papel que juega el contexto del promotor se decidió probar por medio de ensayos de expresión transitoria, mutaciones sobre el ERE del promotor de la UG de zacatuche y compararlas con mutaciones similares del ERE del promotor de UG de conejo. Se mutó el ERE AGGTCGccaTGCCCT (EREz) del promotor de UG de zacatuche, para sustituirla por las secuencia del ERE de conejo (EREc) AGGTCAccaTGCCCT y del ERE consenso (EREp) AGGTCAccaTGACCCT con el fin de generar las construcciones pZUG0.3EREc y pZUG0.3EREp, respectivamente. Del mismo modo la secuencia AGGTCAccaTGCCCT (EREc) del promotor de UG de conejo se cambió por las secuencias EREz y EREp, para producir las construcciones pCUG0.3EREz y pCUG0.3EREp, respectivamente.

Los plásmidos silvestres y mutantes se transfectaron transitoriamente en las células MCF-7 y se estimularon con 17 $\beta$ -estradiol, como se describe en materiales y métodos. Los resultados (Fig. 6.4) muestran claramente que el ERE de zacatuche está involucrado en la regulación estrogénica del promotor de la UG y que un simple cambio nucleotídico del ERE (EREc) incrementa de manera significativa ( $P < 0,05$ ) la actividad del promotor (2.04 veces de inducción),

mientras que al mejorar su estructura palindrómica, cambiando dos nucleótidos (ERE<sub>p</sub>), se maximiza la respuesta del promotor al estímulo con estrógenos (4.35 veces de inducción). [(Fig. 6.4, compare pZUG0.3ERE<sub>c</sub> y pZUG0.3ERE<sub>p</sub> con pZUG0.3 (silvestre)].

Como se esperaba en el caso del promotor de la UG de conejo, cuando se le muta el ERE, convirtiendolo en ERE<sub>z</sub>, muestra una regulación estrogénica menor (1.27 veces) al ERE<sub>c</sub> silvestre (1.41 veces), mientras que la construcción reportera con el ERE<sub>p</sub> aumenta hasta 3.47 veces de inducción (Fig. 6.4).

Al observar que el contexto del promotor tiene una participación adicional sobre la regulación estrogénica ejercida por cada ERE probado, se procedió a investigar si los elementos adyacentes al ERE participan de alguna manera en la función de cada uno de estos dos promotores, al ser estimulados por 17 $\beta$ -estradiol.

Los datos obtenidos en estos ensayos, muestran que entre las construcciones de 0.8 y 0.3 kb de ambas especies, no existen diferencias significativas en la actividad estrogénica; indicando que en los aproximadamente 500 pb adyacentes al ERE corriente arriba, no existen elementos genéticos involucrados en la inducción estrogénica de estos promotores.

Con respecto a las construcciones de 200 pb de ambas especies; en donde no está presente el ERE, no se presenta actividad estrogénica, corroborandose así que la llave que enciende el mecanismo del efecto estrogénico es a través del ERE no canónico y que dentro de la región corriente abajo del ERE se encuentran las secuencias moduladoras de este efecto (Fig. 6.4).

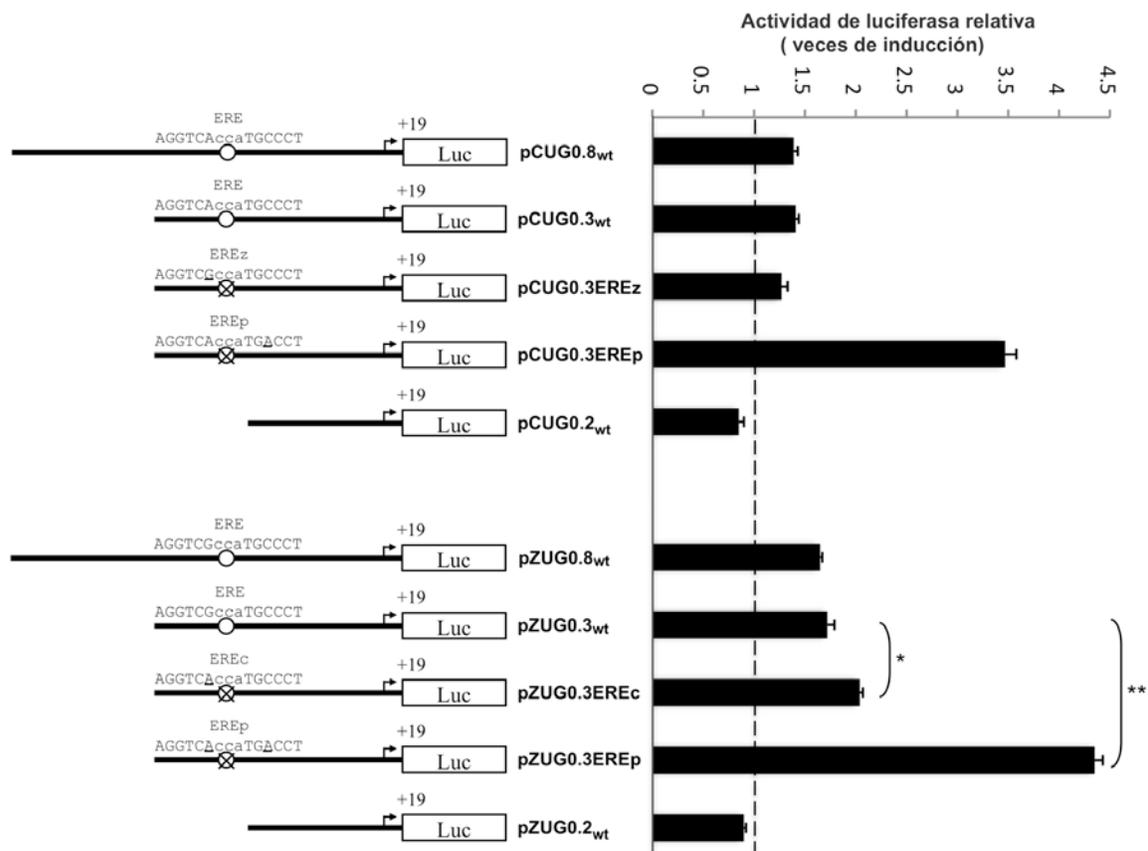


Figura 6.4. Comparación de la actividad transcripcional obtenida del promotor de la UG de conejo y zacatucho en base a las diferentes versiones del ERE. El lado izquierdo de la figura muestra esquemáticamente los plásmidos reporteros. Cada construcción reportera fue cotransfectada con el plásmido pRL-TK en células MCF-7. 24 hrs después de la transfección, las células se estimularon con vehículo o  $E_2$  ( $1 \times 10^{-8}$  M). Los datos promedio ( $\pm$ DE) se presentan como veces de inducción sobre el control tratado con vehículo y se derivan de un experimento representativo. Las diferencias de la actividad transcripcional fueron calculadas por la prueba T de Student \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## **6.5 Interacción física entre el RE $\alpha$ con los EREs *in vitro*, mediante análisis de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).**

Para comprobar y analizar la interacción del receptor de estrógenos  $\alpha$  con cada uno de los EREs, primeramente fue necesario obtener la proteína mediante la transcripción-traducción *in vitro* del receptor como se describe en los Materiales y Métodos. La traducción del receptor fue corroborada mediante la inmunodetección de la figura 6.5.

El anticuerpo específico para el epítipo V5, detectó el RE $\alpha$  con un peso de 65 kDa. (Fig. 6.5).

Las sondas que se utilizaron en estos ensayos y sus correspondientes contrapartes no radiactivas y mutantes se enlistan en la tabla 1.

La incubación de las reacciones de unión del RE $\alpha$  traducido *in vitro* con las sondas que contienen las tres variantes antes mencionados para el ERE (UG-EREp, UG-ERE y Rd-UG-ERE), dio como resultado un patrón de 5 bandas que corresponden a los diferentes complejos de unión (ADN-proteína) de cada sonda con varias proteínas específicas e inespecíficas (Fig. 6.6ABC, carril 2). Sin embargo, la formación de los dos complejos más grandes (bandas superiores), se ve suprimida cuando se le adiciona a la reacción de unión, 100 veces en exceso la sonda fría; mientras que la producción de los tres complejos de menor tamaño (bandas inferiores) solo es disminuida ligeramente (Fig 6.6ABC, carril 3). Pero cuando el competidor en exceso de la reacción de unión se sustituye por

una sonda fría sin un ERE funcional (mutante), la formación de los complejos no se ve afectada (Fig. 6.6ABC, carril 4) a la par de la primera reacción observada en el carril 2. Por otra parte, si el competidor frío contiene el ERE consenso, nuevamente los complejos superiores son los principalmente desplazados (Fig. 6.6ABC, carril 5). El hecho de que los dos complejos superiores no puedan ser desplazados por la sonda mutante fría, nos indica que son generados a partir interacciones específicas y con una afinidad que va disminuyendo con respecto al número de imperfecciones existentes en el elemento. Posteriormente, en las pruebas de súper-retardo es posible notar, que los dos complejos superiores disminuyen su movilidad electroforética debido a la adición e interacción de los anticuerpos contra el RE $\alpha$  y el epítipo V5 con estos complejos (Fig. 6.6ABC, carriles 6 y 8), mientras que el anti-GATA no altera su movilidad al no existir interacción (Fig. 6.6ABC, carril 7).

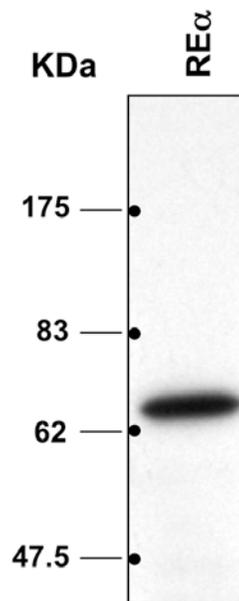


Figura 6.5. Inmunodetección del receptor de estrógenos  $\alpha$  transcrito y traducido *in vitro*. La banda de 65 kDa del RE  $\alpha$  fue obtenida a través del anticuerpo monoclonal de ratón contra el epítipo V5. A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

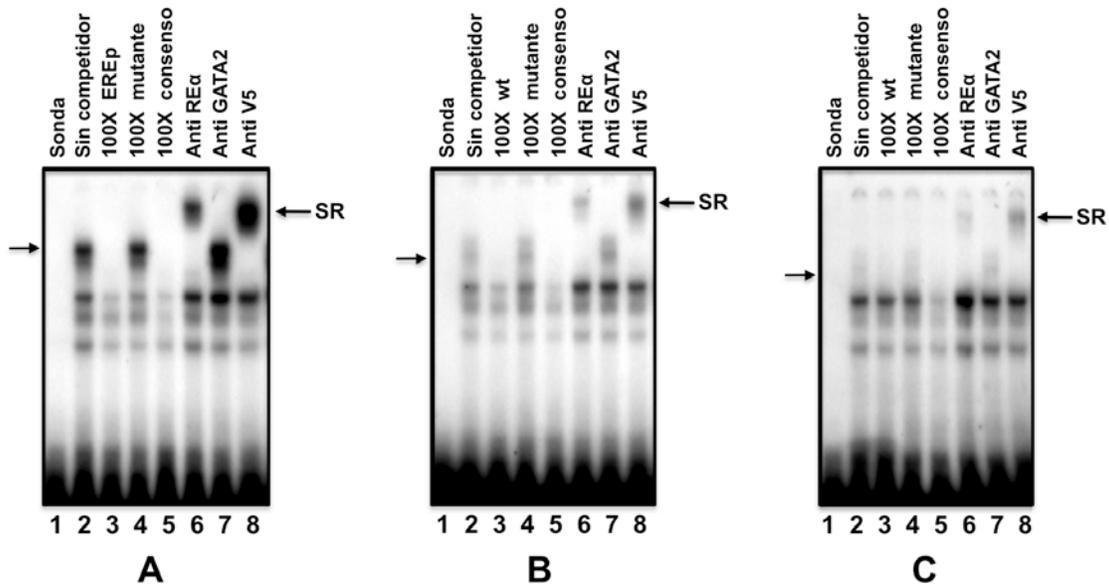


Figura 6.6. Ensayos de retardo y super-retardo en la movilidad electroforética de los EREs de la UG. A) EREp. B) EREc. C) EREz. La sonda marcada, fue incubada con (línea 2-8) o sin (línea 1) el RE $\alpha$  traducido *in vitro*. Para establecer la unión específica, la competencia fue realizada con los oligonucleótidos sin marcar (línea 3), EREmut-UG (línea 4) y EREconsenso-UG (línea 5) a un exceso molar de 100 veces. Para los ensayos de super-retardo, los anticuerpos para el RE $\alpha$  (línea 6), para el epítipo V5 (línea 8) o para la proteína no relacionada (línea 7) fueron adicionados. La banda que representa el complejo específico ADN-proteína y el complejo super-retardado (SR) se indican con una flecha. Se realizaron procedimientos idénticos en los tres ensayos, excepto por el uso de los oligonucleótidos marcados y competidores específicos sin marcar.

Con éste análisis se confirma la presencia e interacción que se esperaba del RE  $\alpha$  con los EREs y es posible explicar porque el ERE del promotor de la UG de zacatuche, reduce la respuesta estrogénica del promotor de UG de conejo, al ser estimulado con  $17\beta$ -estradiol.

## **6.6 Clonación y análisis de secuencia de la región flanqueante 5' del gen de la UG de liebre.**

Al percatarnos de que el contexto del promotor en que se encuentre el ERE, también participa de forma importante sobre la propia regulación estrógenica del ERE en el gen de la UG, se decidió caracterizar la estructura y función de la región flanqueante 5' del gen de la UG de la liebre (*Lepus capensis*), con el fin de verificar que el mecanismo de regulación estrogénica aquí observado para el gen de la UG, es característico del orden *lagomorpha* o que existen otros elementos específicos de especie involucrados.

Se amplificaron 886 pb de la región flanqueante 5' del gen de la UG de liebre mediante PCR para posteriormente clonar y secuenciar el producto ligado en el vector pGEMT (Fig. 6.7). La región flanqueante 5' clonada, contiene 812 pb (-812/-1) de promotor con un sitio de la transcripción putativo (AGA). La localización y secuencia de la caja TATA no canónica (TACA) es idéntica a la del gen de la UG de conejo (-32 a -29). También se identificó que el fragmento del primer exón codifica los aminoácidos MKL de la UG y que son precedidos por la secuencia Kozak a +42 pb. Se detectó un sitio de unión para GATA localizado de -685 a -680 pb, un sitio de unión para USF que se localiza de -527 a -522 pb, dos sitios de unión para el factor HNF3 localizados de -134 a -123 pb y de -102 a -91 pb respectivamente (Fig. 6.7).

```

-829 CAGGGACGAGCAAACATCTGAAGAGAACAAGAAGAAATGGTCAGCGAGGGAAAACAGGAAAAGAACCAGCCGTGGGAAAAGC -748
-747 AGGGGAGAGAATGGCTGAAGGAGGAAACGGCCAAGAGGGTCAAGGCCATTAGGAGGTCAGGGTGATAAGGACTGCAGGTGCC -666
                                     GATA
-665 CATCGAAGAGGCCCTTGGAAGGGCAGAGCTTGAGGGCATTCTAGGCCACAGCAGACCCAGCCGGGCAGGGCATTGGCTCG -584
-583 GCCAGGTATGGGGTTTGGGTCTTCGGTGGGTGCTCTGGGAAGTCTTTTTCCGTCCACGTGTTCAGGCCAGGGTGTCTCTCC -502
                                     USF
-501 AGGTCTGACCACAGCAATGCTCTGAACCCAGTGACCTTCATGGCTCAACGTCCAGCCACCTTCCTTGGAGGGGGGAAGCAGA -420
-419 GGAGCCCAAGTGCAGCCGCAGGATCCTGGGTGCTCCTGTCTGTCTCGGCCACTTGGACCTCAGCTTCTCCTGGGGTGACAGG -338
-337 ACACATGCTTGTCTTGTGGTCTGGGCTGCCCAATGCCCTGGTTCAAAAGGAAGCCGAGGTGGCCAGGTCACCATGCC -256
-255 TCGGGTGCGGGCACCCCTTGCCACCTCCCCCACACACAAGACTCCGGGCTCTCCCTCCCCCGAGGGACCCATTGTGTGAG -174
-173 TTCAGTTTCAATAGGGACGGAACCTGGATTGAGAAAAGGGAATGTTTACTTATCCCAAGCAATGCCCAAGTAAATATT -92
                                     HNF-3                                     HNF-3
-91 GCAGTCAAGTAAGTGGAGCCAGGCCCTGCCCTCTTCTATCTGGGCACTGCCCGGAGAATACAAAAGGCACCTGACGGCTG -10
      +1
-9  TCTCCCCAAGATCACCGGATCCAGAGCCAGCCCCGAGCCTTCCCGTCTTgcccaccATGAAGCTCA +57
                                     M K L

```

Figura 6.7. Secuencia nucleotídica de la región flanqueante 5' del gen de la UG de liebre. Los nucleótidos son numerados a partir del SIT putativo, que se encuentra indicado por una flecha horizontal. Los sitios de unión putativos para factores de transcripción están subrayados y etiquetados. La caja TACA está subrayada y la secuencia consenso Kozak se indica con letras cursivas en minúscula. La secuencia de aminoácidos deducida está indicada debajo de la secuencia nucleotídica por el código de letra sencilla.

La secuencia del promotor de la UG de liebre fue alineada con las secuencias de zacatuche y conejo con el fin de determinar la homología. El alineamiento de la región flanqueante 5' del gen de la UG entre las tres especies mostró una alta homología. Si se toma en cuenta la secuencia que va desde el sitio de inicio de la traducción hasta -829 pb, existe una homología del 95% entre liebre y zacatuche, así como del 93% entre liebre y conejo (Fig.6.8). Los elementos que se encontraron en común en los tres lagomorfos son: 1) dos elementos para el factor SP1, que se localizan de -235 a -227 y de -203 a -195; 2) un elemento para SP1 ó SP3 que se encuentra de -67 a -59; 3) dos sitios de unión para HNF-3 situados de -134 a -123 y de -102 a -91; 4) un sitio de unión para TRBP 1 y 2 localizado de -22 a -17 y 5) un sitio para el factor SOX-17 ubicado de -184 a -177 pb. En cuanto al ERE, la misma secuencia de unión para el receptor de estrógenos encontrado en conejo, se conserva ubicado de -269 a -255 en el promotor de la UG de liebre (Fig. 6.8).



### **6.7 Respuesta estrogénica del promotor de la UG de liebre.**

Para poder analizar la respuesta estrogénica tanto del promotor de la UG de liebre y de su ERE individualmente, se realizaron ensayos de expresión transitoria con tres construcciones reporteras gobernadas por 0.2, 0.3 y 0.8 kb del promotor de UG de liebre y con dos versiones mutantes de la construcción de 0.3 kb que contienen por una parte el ERE zacatuche (pLUG0.3EREz) y por otra el ERE perfecto (pLUG0.3EREp). Así también, fueron usadas tres construcciones dirigidas por 0.3 kb del promotor de hámster (pHUG0.3) en sus versiones: silvestre sin ERE, mutante con ERE conejo-liebre y mutante ERE canónico.

Como primera observación de estos ensayos, es importante mencionar que con el promotor de la UG de liebre fue posible obtener una actividad notablemente superior (2.8 veces de inducción, Fig. 6.9) a la alcanzada por sus contrapartes de zacatuche y conejo (1.72 y 1.41 veces de inducción, Fig. 6.4). Este resultado fue inesperado, ya que la secuencia del ERE de liebre es idéntica a la del promotor de UG conejo y con el que se obtuvo la menor actividad transcripcional de las tres especies de lagomorfos. Con este análisis se reafirma que el contexto del promotor tiene un papel muy importante sobre la regulación diferencial observada entre estas especies.

Como ya se había observado en las otras dos especies analizadas, al aumentar el número de imperfecciones en el ERE de liebre, se puede perder

significativamente ( $P < 0.05$ ) la actividad transcripcional (2.1 veces de inducción) y al mejorar el elemento para obtener un EREp, se incrementa drásticamente esta actividad (5.9 veces de inducción) [Fig. 6.9, compare pLUG0.3EREz y pLUG0.3EREp con pLUG0.3 (silvestre)]. Esto confirma una vez más, que las variaciones en la estructura de ERE, es una forma en que la evolución ha participado para establecer un nivel de respuesta a la inducción por estrógenos, en el gen de la UG de cada especie.

Con respecto a las construcción de 0.8 (pLUG0.8) no se observó diferencia en la actividad estrógenica del promotor al compararla con la construcción de 300 pb (pLUG0.3), sugiriendo la nula existencia de elementos adyacentes de importancia para esta regulación; mientras que la construcción pLUG0.2 que carece del ERE, no presento actividad transcripcional regulada por estrógenos. (Fig. 6.9).

Por otro lado, al analizar la actividad transcripcional de las construcciones reporteras regidas por 300 pb del promotor de la UG de hámster, el cual carece por completo de un ERE, fue posible comprobar que este promotor se encuentra bloqueado para la regulación estrogénica no solo a nivel del elemento de respuesta, sino también por el contexto del mismo promotor; ya que como se puede observar en la figura 6.9, las construcciones reporteras pHUG0.3 que contienen tanto el ERE de conejo-liebre (pHUG0.3EREc-l) como el ERE consenso (pHUG0.3EREp) son incapaces de activar la transcripción de la UG (Fig. 6.9. Compare pHUG0.3 con pHUG0.3EREc-l y con pHUG0.3EREp).

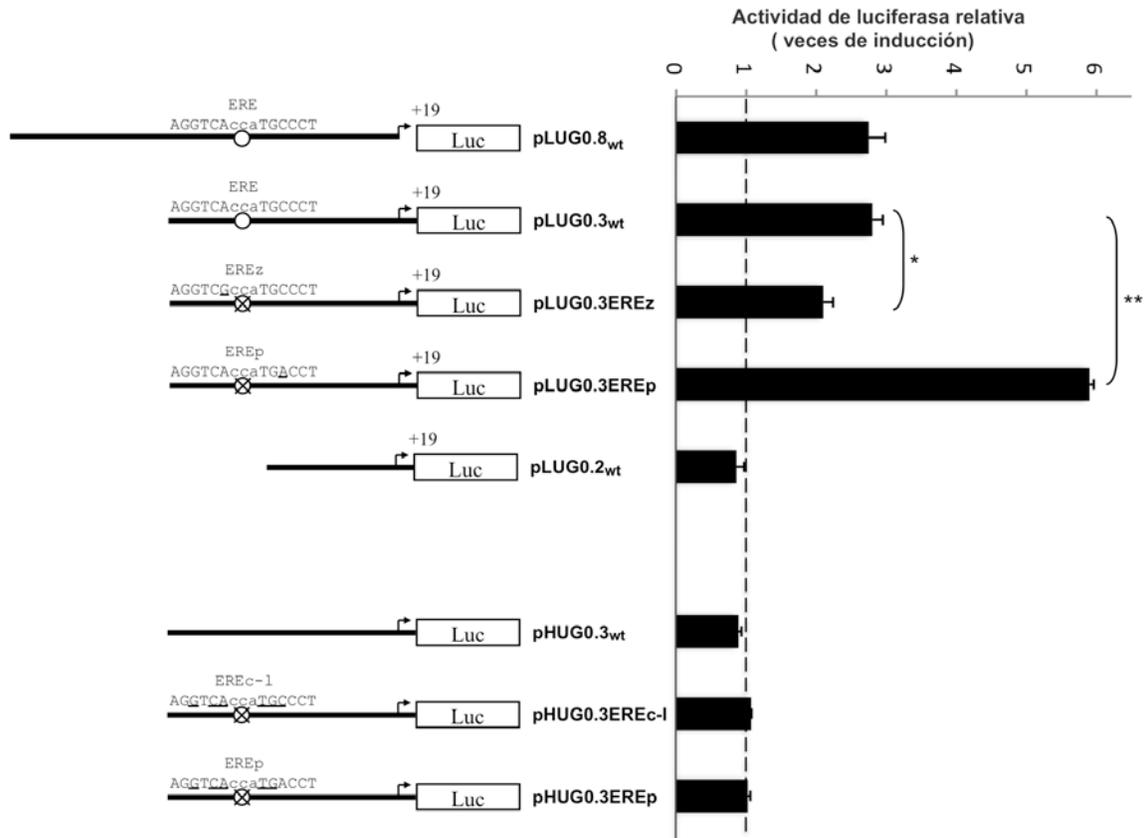


Figura 6.9. Efecto del intercambio de las diferentes versiones del ERE en la actividad transcripcional del promotor de la UG de liebre y hámster. El lado izquierdo de la figura muestra esquemáticamente los plásmidos reporteros. Cada construcción reportera fué cotransfectada con el plásmido pRL-TK en células MCF-7. 24 hrs después de la transfección, las células se estimularon con vehículo o  $E_2$  ( $1 \times 10^{-8}$  M). Al día siguiente la actividad relativa de las luciferasas se determinaron en lisados celulares. Los datos promedio ( $\pm$ DE) se presentan como veces de inducción sobre el control tratado con vehículo y se derivan de un experimento representativo. Las diferencias de la actividad transcripcional fueron calculadas por la prueba T de Student \* $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ .

### **6.8 Existencia de una región con actividad inhibitoria de la acción de estrógenos en el promotor de la UG de hámster.**

Dado que el promotor de la UG de hámster, aún contando con un ERE canónico, no responde al estímulo con estrógenos, (Fig. 6.9), se procedió a determinar la región involucrada en esta regulación substituyendo una región de 100 pb del promotor del hámster que contiene el ERE canónico por su equivalente en el promotor de liebre (ver Fig. 5.4). Estas construcciones quiméricas se analizaron nuevamente en la línea celular MCF-7 y se estimularon con estrógenos. Los resultados que se presentan en la Fig. 6.10 indican que la regulación estrogénica se encuentra en los 100 pb que se localiza alrededor del ERE, ya que el promotor de la UG de hámster, insensible al estímulo con estrógenos, responde adecuadamente a los estrógenos cuando el fragmento de liebre que contiene el ERE<sub>p</sub>, substituye el fragmento equivalente del hámster (Fig. 6.10, compare pHUG0.3-ERE<sub>p</sub> con pHUG0.2/LUG0.1-ERE<sub>p</sub>). Se obtuvo la misma información cuando el fragmento de 100 pb de hámster con el ERE canónico substituye a su contraparte en el promotor de liebre; ya que el fragmento de hámster insensibilizó al promotor de la liebre a la acción del estradiol (Fig. 6.10, compare pLUG0.3-ERE<sub>p</sub> con pLUG0.2/HUG0.1-ERE<sub>p</sub>).

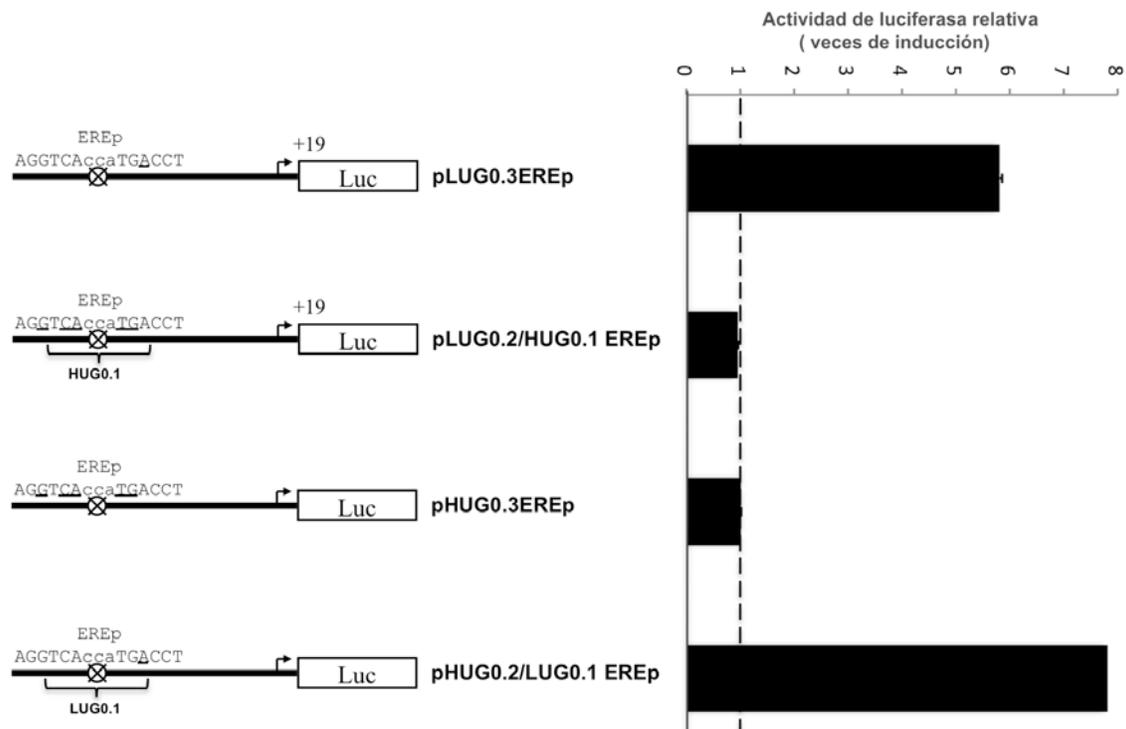


Figura 6.10. Efecto de los 100 pb del promotor de la UG de hámster en la regulación por estrógenos del promotor de la UG de liebre. El lado izquierdo de la figura muestra esquemáticamente los plásmidos reporteros. Cada construcción reportera fue cotransfectada con el plásmido pRL-TK en células MCF-7. 24 hrs después de la transfección, las células se estimularon con vehículo o  $E_2$  ( $1 \times 10^{-8}$  M). Al día siguiente la actividad relativa de las luciferasas se determinaron en lisados celulares. Los datos promedio ( $\pm$ DE) se presentan como veces de inducción sobre el control tratado con vehículo y se derivan de un experimento representativo. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

### **6.9 Delimitación de la región regulatoria del promotor de la UG de liebre y hámster.**

Como los resultados mostrados en la figura 6.10 sugieren que en los 100 pb de las quimeras se encuentran elementos putativos involucrados en la regulación transcripcional por estrógenos del promotor de la UG, se realizaron varias construcciones truncadas a partir de los promotores quiméricos pHUG0.2/LUG0.1-ERE<sub>p</sub> y pLUG0.2/HUG0.1-ERE<sub>p</sub>, para delimitar los elementos que inhiben la acción de estrógenos. Los resultados obtenidos de los ensayos de expresión transitoria en células MCF-7 estimuladas con estradiol, se presentan en la Fig. 6.11 y 6.12 e indican que en los 100 pb correspondientes al promotor de liebre que progresivamente se fueron truncando (pHUG0.2/LUG0.093, pHUG0.2/LUG0.060, pHUG0.2/LUG0.028, pHUG0.2/LUG0.018), no existe ningún elemento importante para la regulación estrogénica, puesto que no se registró ningún cambio significativo en la actividad transcripcional (ver Fig. 6.11). Sin embargo, cuando se prueban los 100 pb trucados correspondientes al promotor de hámster (pLUG0.2/HUG0.068, pLUG0.2/HUG0.055, pLUG0.2/HUG0.051, pLUG0.2/HUG0.046, pLUG0.2/HUG0.043, pLUG0.2/HUG0.022, pLUG0.2/HUG0.15), se puede observar la intervención de un fragmento importante (ver Fig. 6.12). Al parecer este fragmento se encuentra localizado entre -243 y -251 pb corriente arriba del SIT de la quimera pLUG0.2/HUG0.068. Se pensó que esta “región” podía ser el *core* o formar parte del elemento inhibidor en hámster, ya que se recupera la actividad transcripcional regulada por

estrógenos al eliminar los primeros 25 pb de hámster unidos inmediatamente a los 200 pb correspondientes al promotor de liebre, efecto que permanece de la misma forma cuando se le van eliminando los otros dos fragmentos restantes a la quimera, quedando únicamente el EREp (Fig.6.12, compare pLUG0.2-HUG0.068 con pLUG0.2/HUG0.043, pLUG0.2/HUG0.022 y pLUG0.2/HUG0.015).

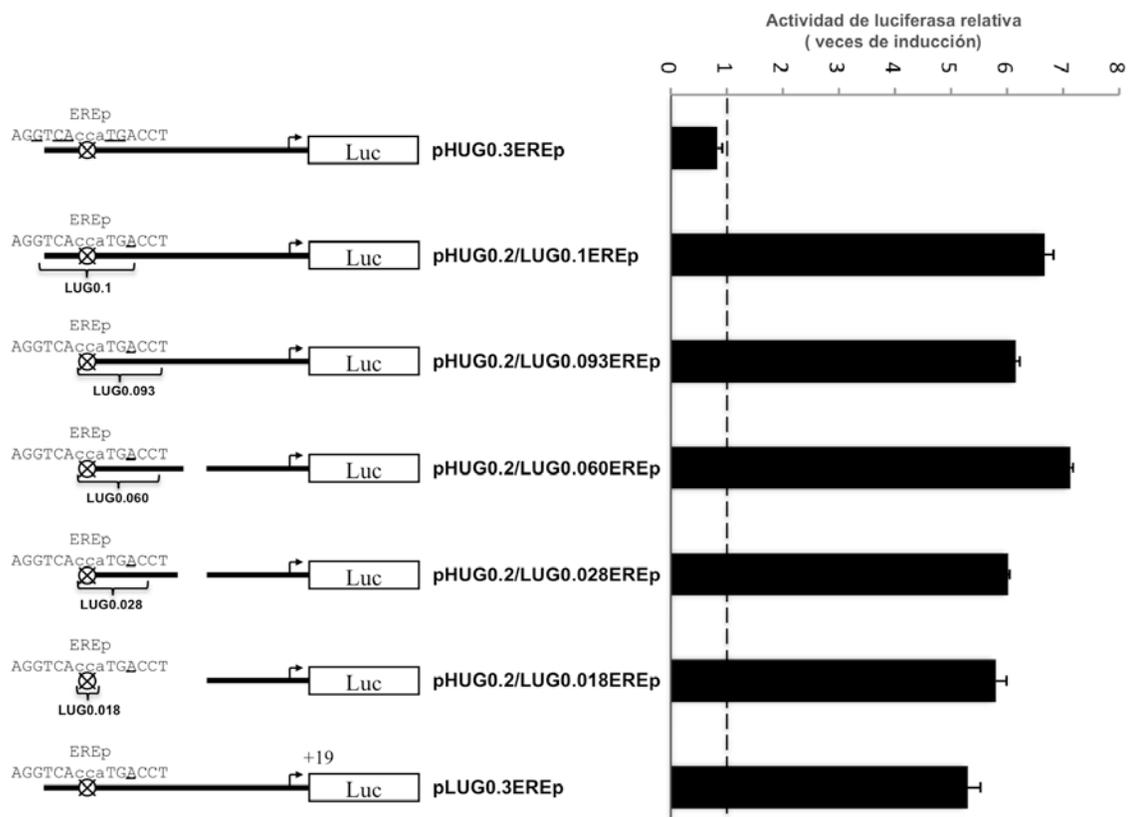


Figura 6.11 Actividad de los fragmentos truncados del promotor de la UG de liebre sobre la regulación transcripcional mediada por estrógenos. Los datos promedio ( $\pm$ DE) se presentan como veces de inducción sobre el control tratado con vehículo y son derivados de por lo menos tres experimentos independientes.

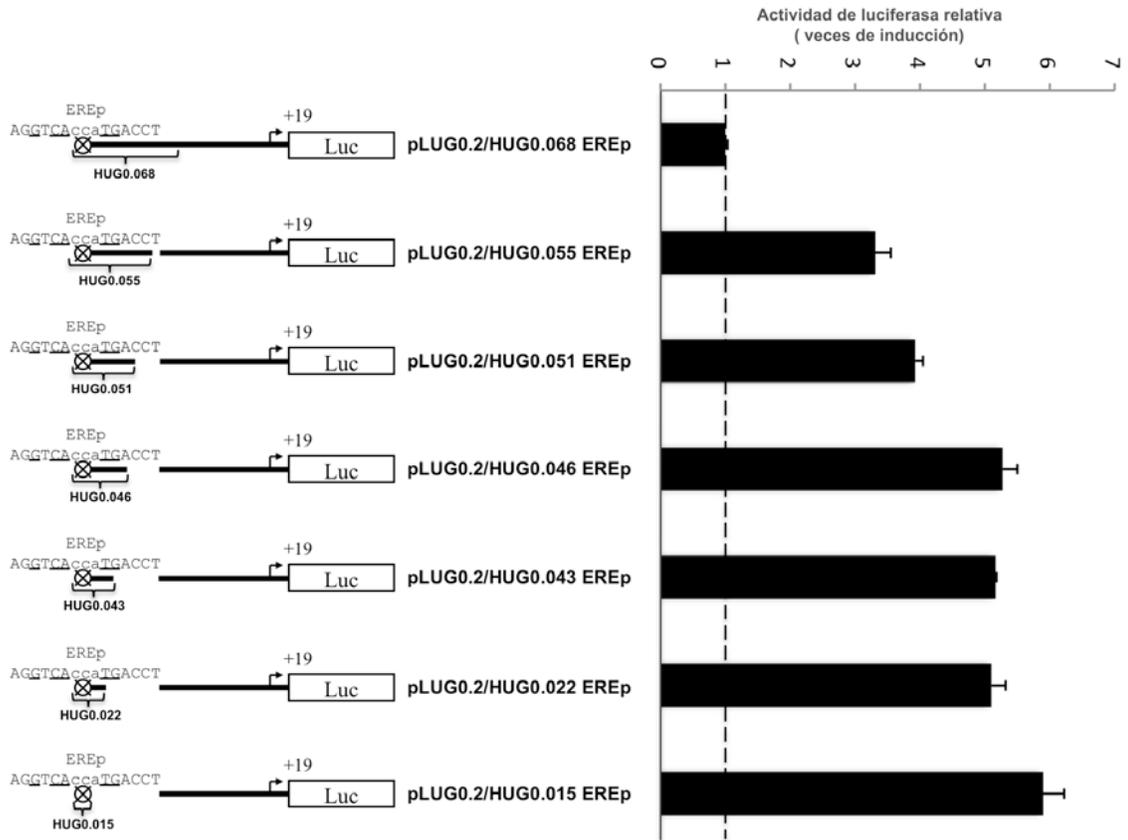


Figura 6.12. Actividad de los fragmentos truncados del promotor de la UG de hámster que involucra una regulación transcripcional negativa mediada por estrógenos. Los datos promedio ( $\pm$ DE) se presentan como veces de inducción sobre el control tratado con vehículo y son derivados de por lo menos tres experimentos independientes.

### **6.10 Hallazgo de la secuencia inhibidora de la acción de estrógenos en el promotor de la UG de hámster.**

Debido a que los resultados demostraron que en el promotor de UG de hámster, existe por lo menos un elemento involucrado en la inhibición de la transcripción inducida por estrógenos, se decidió delimitar más la construcción pLUG0.2-HUG0.068 para producir las 2 construcciones pLUG0.2-HUG0.029 y pLUG0.2-HUG0.047 (Fig. 5.6). La primera construcción a la cual se le eliminaron 39 nucleótidos se realizó con el fin de eliminar completamente el “elemento regulador” y a la segunda construcción se le eliminaron 21 nucleótidos de tal forma que pudiera conservar dicho elemento . Estas construcciones quiméricas se probaron en transfecciones transitorias en la línea celular MCF-7 estimulada con estradiol. Demostrando nuevamente la existencia de una inhibición sobre la regulación transcripcional mediada por estrógenos, ya que se puede observar que al eliminar el fragmento involucrado se recupera la actividad transcripcional alcanzando 4.5 veces de inducción( Ver Fig. 6.13).

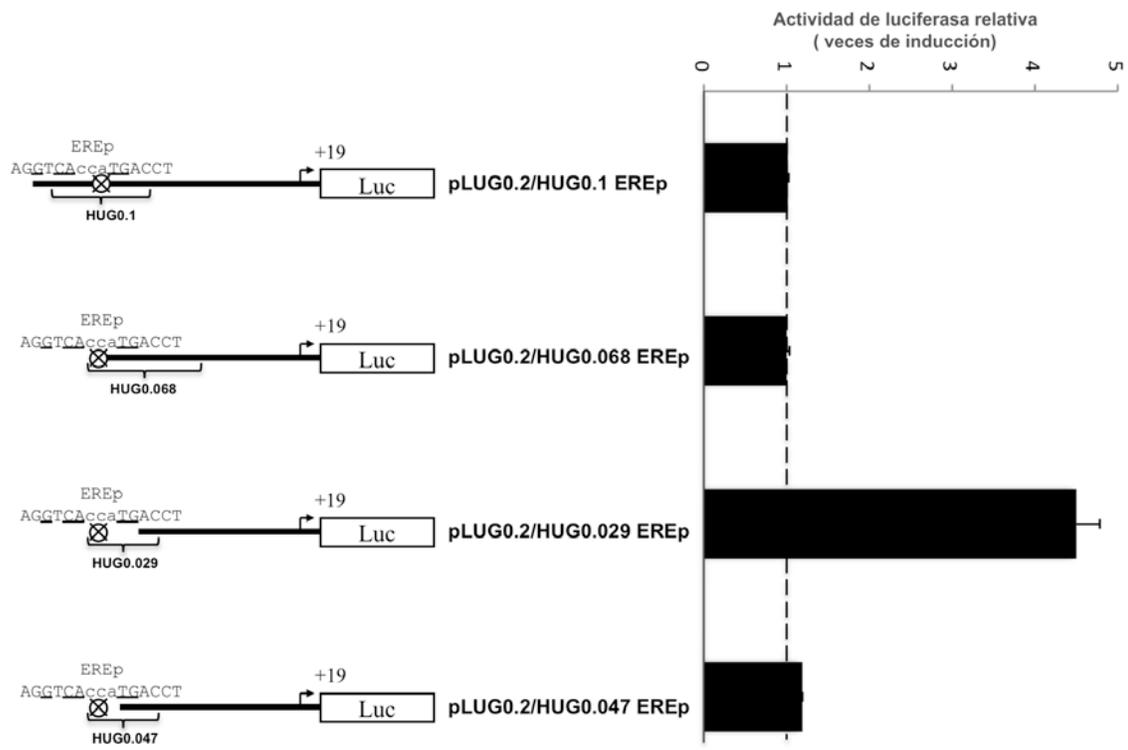


Figura 6.13. Región involucrada en la inhibición de la transcripción mediada por estrógenos, localizada en el promotor de la UG de hámster. Los datos promedio ( $\pm$ DE) se presentan como número de veces de inducción sobre el control tratado con vehículo y son derivados de por lo menos tres experimentos independientes.

Al observar los resultados anteriores se logró determinar la región inhibidora en el promotor de la UG de hámster de forma más estrecha; sin embargo se trato de acortar un poco más el fragmento, con el fin de deducir la secuencia involucrada en la regulación estrogénica negativa. Se utilizaron las 4 construcciones con diferencias en la secuencia "CCAAAAG" del promotor de 300 pb de la UG de hámster que contiene el EREp (ver Fig. 5.7), probándolas en ensayos de expresión transitoria. Dando por resultado una completa regulación estrogénica sobre la actividad transcripcional cuando se mutaba este elemento alcanzando en todas las construcciones mutantes más de 5.5 veces de inducción. Sugiriendo fuertemente que esta secuencia es la responsable de que el promotor de la UG de hámster sea completamente insensible a la acción de estrógenos aún cuando cuente con un ERE consenso (Ver Fig. 6.14).

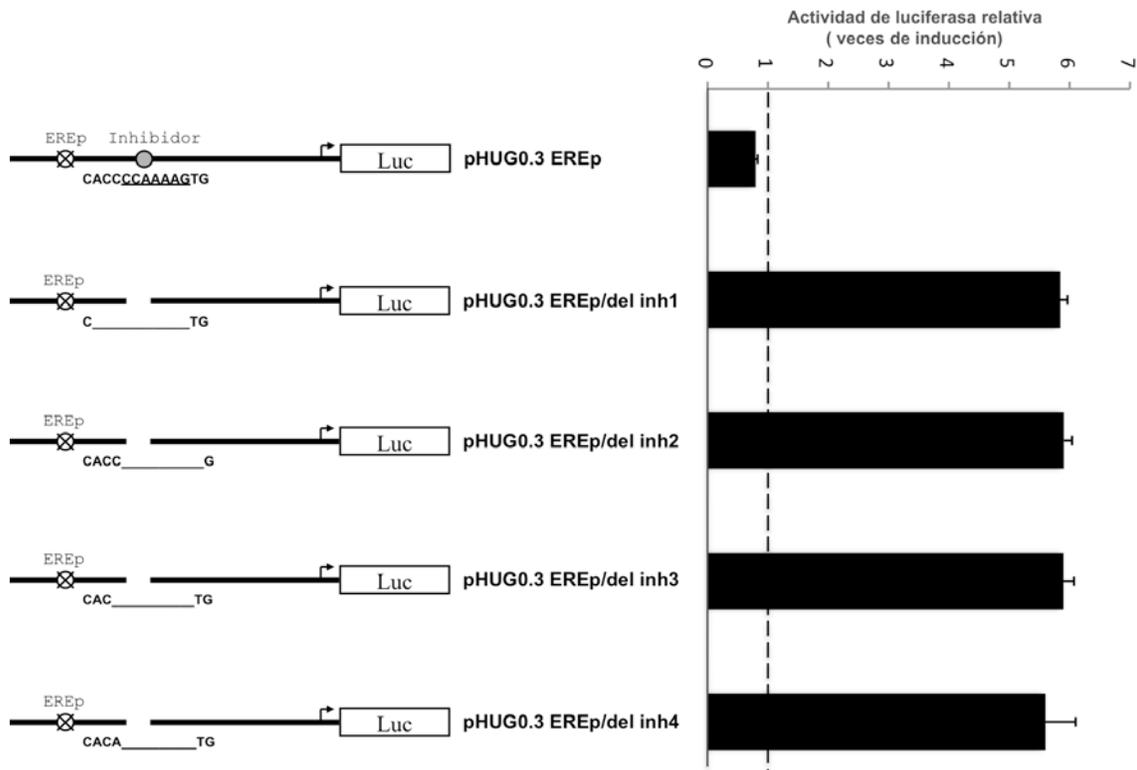


Figura 6.14. Efecto inhibitor en la transcripción mediada por estrógenos, por la secuencia CCAAAG sobre construcciones reporteras del promotor de la UG de hámster-EREp. Los resultados se expresan como número de veces de inducción y representan las medias  $\pm$  DE de tres determinaciones. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

## **7. DISCUSIÓN**

Desde que la UG fue descubierta en el útero de conejas preñadas (Beier, 1968; Krishnan y Daniel 1967), este gen se ha logrado clonar a partir de varias especies de mamíferos (Mukherjee *et al.*, 2007). Así también, se ha reportado la expresión de esta proteína en diversos tejidos, encontrando que presenta una regulación diferencial y especie específica (López de Haro *et al.*, 1988; Goswami y Feigelson, 1974; Manyak *et al.*, 1988). Esto motivó a varios grupos de investigación para determinar los mecanismos que expliquen la expresión diferencial de esta proteína.

El promotor de la UG contiene dos clusters de elementos de respuesta que responden a glucocorticoides (Cato *et al.*, 1984), a progesterona (Bailly *et al.*, 1986) y a andrógenos (Beato *et al.*, 1989). Se sabe que éstas hormonas son capaces de potenciar la expresión de la proteína en sus órganos blanco, en la mayoría de las especies estudiadas (Fernández-Renau *et al.*, 1984; Hagen *et al.*, 1990; López de Haro y Nieto, 1985; Gutiérrez-Sagal *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 2002; Cato *et al.*, 1984). Sin embargo, la expresión de la UG regulada por estrógenos solo se ha podido detectar en conejo, siendo la única especie hasta ahora estudiada que exhibe un ERE funcional en su promotor (López de Haro *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990). Debido a esto, la expresión regulada por estrógenos del gen de la UG, impulsó el estudio de este gen en otras especies relacionadas, con el fin de ofrecer datos interesantes para la biología de la reproducción. Se decidió estudiar este gen en dos especies del orden *Lagomorpha*; el ancestral zacatuche (*Romerolagus diazi*) una especie en peligro de extinción, considerado

como una de las especies de conejos más primitivas del mundo (Velázquez *et al.*, 1993), así como también la liebre (*Lepus capensis*), que es una especie mas relacionada filogenéticamente al conejo.

Las secuencias de la región flanqueante 5' clonada del gen de la UG de liebre y zacatuche resultaron tener un 93% de homología con la secuencia previamente reportada del promotor homólogo en el conejo (Cato *et al.*, 1984). Curiosamente, la homología entre las secuencias del promotor de UG de zacatuche y liebre es del 95%; especies que por cierto se encuentran filogenéticamente más alejadas. Las dos regiones clonadas contienen varios elementos en *cis* regulatorios del conejo que se conservan en el promotor de la UG de liebre y zacatuche, como los elementos para SP1, SOX17, HNF-3, E-box (Fig. 6.8), incluyendo también el ERE (López de Haro *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990).

Los promotores de la UG de las dos especies no solo han conservado evolutivamente la secuencia y localización del ERE que se presenta en el promotor de la UG de conejo, sino que también son capaces de responder al  $17\beta$ -estradiol *in vitro* (Fig. 6.4 y 6.9, respectivamente) y de unir al receptor de estrógenos  $\alpha$  (Fig. 6.6b, 6.6c). Inesperadamente, se encontró que el promotor de la UG de zacatuche tiene una mayor respuesta al estrógeno que el promotor de la UG de conejo, muy a pesar de que la secuencia de su ERE difiere más del EREp (Fig. 6.4). Por otro lado, el promotor de la UG de liebre mantiene un ERE

idéntico al de conejo y es capaz de responder con mayor intensidad al estradiol que el promotor de las otras dos especies de lagomorfos (Fig. 6.9). Esta respuesta diferencial al estradiol entre éstas tres especies, seguramente involucra la influencia de la arquitectura de cada promotor, lo cual determina en gran medida la unión de *trans*-factores que pueden modificar la respuesta al estímulo estrogénico (Hofmann y Schmitz, 2002). Esto ya ha sido reportado específicamente para este gen, así como para otros genes regulados por estrógenos (Mukherjee *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1998).

En 1998 Scholz y colaboradores demostraron en estudios de inducción por estrógenos *in vivo*, que el factor SP1 y el RE se unen simultáneamente a sus respectivos sitios de unión en el promotor de la UG de conejo; aunque no se logró demostrar una respuesta estrogénica cooperativa *in vitro* (Scholz *et al.*, 1999).

Los promotores de la UG de zacatuche y de liebre conservan los tres sitios de unión para SP1 (Fig. 6.8), que fueron identificados como elementos funcionales de importancia para la transcripción dependiente de estrógenos del gen de la UG de conejo (Dennig *et al.*, 1995; Scholz *et al.*, 1998). El primer sitio para SP1, que también puede ser reconocido por el factor SP3, se encuentra localizado a -59 pb corriente arriba del SIT y es idéntico en las tres especies, por lo cual en este caso, seguramente no aporta ningún cambio en la regulación transcripcional, al igual que el segundo sitio que se encuentra localizado a -195 pb corriente arriba del SIT. Sin embargo, el tercer sitio de unión para SP1 es diferente en las tres especies. Este sitio en el caso de conejo y de zacatuche se encuentra localizado a -223 pb y presentan una homología del 79.5 % y del

84.9%, respectivamente. El sitio para SP1 del promotor de liebre se localiza a -227 pb corriente arriba del SIT y presenta una homología del 82.2% con respecto a la secuencia consenso. A través de programas informáticos de predicción de elementos en *cis* putativos para factores de transcripción se puede observar que la secuencia para SP1 de zacatuche presenta una mayor versatilidad para reclutar este factor, ya que distintas combinaciones nucleotídicas dentro del mismo elemento son compatibles con la secuencia consenso para SP1. A pesar de que las diferencias existentes entre zacatuche y conejo para este elemento en particular pudieran parecer irrelevantes, podrían influir significativamente en la regulación transcripcional dependiente de estrógenos de esta proteína. Para determinar la relevancia de las diferencias en el elemento SP1 para la transcripción inducida por estrógenos, se deben llevar a cabo más estudios.

Estos promotores también conservan dos sitios de unión para los factores transcripcionales HNF-3  $\alpha$  y  $\beta$  orientados en direcciones opuestas (Fig. 6.8); que ya se ha reportado que son capaces de transactivar el gen de la UG de rata (Bingle y Gitlin, 1993; Sawaya *et al.*, 1993) y de conejo, pero en este caso teniendo una cooperación con el factor transcripcional SP1 (Braun y Suske, 1998). Estos sitios también presentan diferencias sutiles entre especies, las cuales también podrían contribuir en la regulación diferencial por estrógenos de la proteína. El primer sitio para HNF-3 se localiza a -91 pb corriente arriba del SIT, en las tres especies y tiene una homología de 96% en conejo, 100% en zacatuche y 94.8% en liebre. Y el segundo sitio se localiza a -123 pb y presenta una homología de 92.5% en conejo y zacatuche y de 86.1% en liebre con respecto a la secuencia consenso.

Los EREs que pueden responder de forma importante a los estrógenos han sido relacionados con la secuencia palindrómica perfecta de 13 pb, encontrada en el gen de la vitelogenina A2 de la rana africana (*Xenopus laevis*) (Klein-Hitpass *et al.*, 1988). Sin embargo, la evolución molecular del gen de la UG en estas especies de lagomorfos, ha favorecido la permanencia del ERE con estructuras palindrómicas imperfectas como en el caso de la mayoría de los genes que son regulados por estrógenos, siendo los palíndromes perfectos muy poco frecuentes (Gruber *et al.*, 2004; Driscoll *et al.*, 1998). En este estudio las mutaciones que se crearon para acercarse más a la estructura palindrómica del ERE tanto en zacatuche como en liebre promovieron una mejoría en la respuesta a estrógenos. La recreación de la única imperfección en el ERE del promotor de la UG de conejo en el promotor de la UG de zacatuche incrementa la actividad transcripcional de 1.72 a 2.04 (ver Fig. 6.4). De la misma forma, la recreación de un EREp, tanto en zacatuche como en liebre maximiza la respuesta de 1.72 a 4.35 y de 2.8 a 5.9, respectivamente (ver Fig. 6.4 y 6.9). Con estos resultados se puede confirmar que una estructura perfecta en el ERE es de esencial importancia para la transcripción estrogénica en estos genes, fortaleciendo la idea de que la secuencia palindrómica del ERE es esencial para la perfecta unión del RE (Fig. 6.6a). Sin embargo, el contexto de cada promotor y los elementos en *trans* que pudieran estar actuando como activadores o represores modulan la respuesta estrogénica. Esto es evidenciado en los ensayos de expresión transitoria donde el ERE de conejo dentro del promotor de la UG de zacatuche responde mejor al estradiol que cuando se encuentra en su propio promotor (Fig.

6.4). De la misma forma, se pudo confirmar este hecho, cuando decidimos agregarle artificialmente ya sea el ERE de conejo o el consenso en el promotor del hámster, el cual no conserva el ERE naturalmente. Estos promotores son incapaces de mantener alguna actividad transcripcional inducida por estrógenos (Fig. 6.9), sugiriendo la existencia de un poderoso inhibidor que bloquea completamente la inducción por estradiol. Con el fin de poder elucidar esta región o elemento en *cis* que trabaja como inhibidor, realizamos construcciones quiméricas entre los promotores de la UG del hámster y la liebre donde se localizó una región importante en el promotor del hámster (Fig. 6.10). Al truncar gradualmente esta región por ambos lados sin modificar el EREp artificial, se pudo delimitar una pequeña secuencia como el posible elemento inhibidor ya que en los ensayos de expresión transitoria se observa la completa regulación de la actividad transcripcional inducida por estrógenos, alcanzando hasta 5.9 veces de inducción (Fig. 6.12 y 6.13).

Cuatro mutaciones distintas realizadas en este elemento inhibidor localizado a -188 pb corriente arriba del SIT del promotor de la UG de hámster con el EREp artificial; confirman que la secuencia CCAAAG es la responsable de la represión observada sobre la actividad transcripcional dependiente de estrógenos (Fig. 6.14).

El promotor de UG de humano tampoco presenta de forma natural el ERE, de modo que también se realizó un estudio similar al de hámster; incorporándole el elemento consenso. Aunque en este caso, los resultados muestran que este promotor sí fue capaz de responder al estradiol alcanzando hasta 4.2 veces de

inducción (datos no mostrados). Al realizar la búsqueda del elemento “inhibidor” de hámster en el promotor de la UG de humano no se obtuvo resultado alguno; sugiriendo nuevamente que este elemento es el involucrado de la nula regulación estrogénica en el promotor de hámster.

Al hacerle un análisis computacional en varios programas, a la secuencia inhibidora, para intuir que factor podría interactuar con ésta, resultó la posibilidad de que la proteína BRCA1 pudiera estar implicada. Se sabe que BRCA1 es una proteína supresora de tumor de cáncer de mama y de ovario (Kleiman *et al.*, 2005). Aunque no se sabe con exactitud el o los mecanismos que emplea esta proteína para funcionar como supresora de tumores, se sabe que participa en varios procesos entre los que se destacan la transcripción, la reparación por daño al ADN y la ubiquitinación (Starita y Parvin, 2003). Aunque no se ha estudiado mucho como BRCA1 interactúa directamente con el ADN, se sabe que existe una secuencia consenso con la cual interactúa *in vitro* (Cable *et al.*, 2003). El elemento inhibidor presente en hámster muestra una homología de 87% con esta proteína. También se encontraron elementos de unión para el factor RUNX1 y para NKX2.5, ambos con una homología del 81% con respecto a sus secuencias consenso. Queda por determinar qué factor es el que interactúa con este elemento capaz de inhibir por completo la regulación transcripcional mediada por estrógenos. Sin embargo, al parecer este mismo elemento está presente en varios promotores con regulación estrogénica negativa o sin efecto estrogénico y los cuales mantienen el ERE como el gen relacionado con la hsp-70 de rata (Krawczyk *et al.*, 1992), el gen de la prolactina de rata (Murdoch *et al.*, 1995), y

los genes de las alfa 2-globulinas de rata (Van Dijck y Verhoeven, 1992).

La participación que se lleva a cabo entre factores transcripcionales ha despertado un gran interés en las últimas décadas; donde el estudio de la UG ha socorrido aspectos fundamentales sobre la regulación transcripcional, donde cada combinación particular da como consecuencia una expresión específica. Con este estudio, la transcripción inducida por estrógenos del gen de la UG se amplía ahora con dos especies de lagomorfos, indicando que los promotores del gen de la UG conservan el ERE y responden correctamente a estrógenos. Así como también el hallazgo de un importante elemento en *cis* capaz de bloquear la respuesta estrogénica contribuye a entender mejor cuales son los mecanismos mediante los cuales un gen determinado es apto o no para responder al estradiol de una manera controlada.

## **8. CONCLUSIONES.**

- Los promotores de la UG de zacatuche y liebre mantienen una alta homología con el promotor de conejo.
- Los promotores de la UG de zacatuche y liebre presentan un ERE funcional.
- El ERE del promotor de la UG de zacatuche que presenta dos diferencias interactúa débilmente con el receptor de estrógenos alfa; ésta interacción aumenta conforme el ERE se acerca a la secuencia consenso.
- El contexto del promotor de la UG de ambas especies determina la actividad transcripcional especie-específica regulada por estrógenos.
- El promotor de la UG de hámster presenta un poderoso elemento capaz de inhibir la actividad transcripcional mediada por estrógenos.

## **9. PERSPECTIVAS**

Los estrógenos tienen un papel central en el acontecimiento de diversos procesos fisiológicos y patológicos en los mamíferos, como son el desarrollo y función de los sistemas reproductivos, la homeostásis ósea, la protección de la integridad funcional de los sistemas nervioso y cardiovascular; así como en el control del ciclo celular de diferentes estirpes celulares. Ya que los efectos biológicos de estas hormonas son principalmente del tipo genómico, el desequilibrio en los niveles de estrógenos o en la expresión de sus receptores celulares, puede desencadenar enfermedades de alto riesgo como es el cáncer en los humanos. Debido a esto, la investigación de la regulación transcripcional dependiente de estrógenos, ha generado grandes expectativas para el desarrollo de nuevos tratamientos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, óseas o tumorales. El presente estudio, se enfocó en aportar nuevos conocimientos básicos que ayuden a explicar los mecanismos moleculares involucrados a nivel transcripcional, que regulan la expresión génica especie-específica dependiente de estrógenos. En el futuro, el efecto del nuevo elemento represor estrógeno aquí documentado, podría ser explorado en la expresión de otros genes inducidos por estrógenos, con el fin de poder conocer sus alcances fisiológicos.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

Acosta A, Zariñan T, Macías H, Pasapera AM, Pérez-Solis MA, Olivares A, Ulloa-Aguirre A, Gutiérrez-Sagal R., 2007. Regulation of Clara cell secretory protein gene expression by the CCAAT-binding factor NF-Y. *Arch Biochem Biophys.* 459: 33-39.

Anbalagan M, Huderson B, Murphy L, Rowan BG., 2012. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal.* (Epub 2012 Feb 27).

Ansell PJ, Lo SC, Newton LG, Espinosa-Nicholas C, Zhang DD, Liu JH, Hannink M, Lubahn DB., 2005. Repression of cancer protective genes by 17beta-estradiol: ligand-dependent interaction between human Nrf2 and estrogen receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol.* 243: 27-34.

Arenas-Huertero F, Recillas-Targa F., 2002. Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cancer. *Gac Méd Méx.* 138: 547-555.

Atger M, Perricaudet M, Tiollais P, Milgrom E., 1980. Bacterial cloning of the rabbit uteroglobin structural gene. *Biochem Biophys res Commun.* 93: 1082-1088.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, k. S., 2000. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc. Massachusetts, USA.

Bailly A, Le Page C, Rauch M, Milgrom E., 1986. Sequence-specific DNA binding of the progesterone receptor to the uteroglobin gene: effects of hormone, antihormone and receptor phosphorylation. *EMBO J.* 5: 3235-3241.

Bally R, Delettré J., 1989. Structure and refinement of the oxidized P21 form of uteroglobin at 1.64 Å resolution. *J Mol Biol.* 206: 153-170.

Barkhem T, Haldosén LA, Gustafsson JA, Nilsson S., 2002. Transcriptional synergism on the pS2 gene promoter between a p160 coactivator and estrogen receptor-alpha depends on the coactivator subtype, the type of estrogen response element, and the promoter context. *Mol Endocrinol.* 16: 2571-2581.

Beato M., 1976. Binding of steroids to uteroglobin. *J Steroid Biochem.* 7: 327-334.

Beato M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56: 335-344.

Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP., 1989. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem.* 32: 737-747.

Beato M, Chávez S, Truss M., 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids.* 61: 240-251.

Beato M, Klug J., 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update.* 6: 225-236.

Beier HM., 1968. Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta.* 160: 289-291.

Beier HM., 2000. The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. *Ann N Y Acad Sci.* 923: 9-24.

Bell AC, West AG, Felsenfeld G., 2001. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science.* 291(5503): 447-450.

Berg T, Cassel TN, Schwarze PE, Nord M., 2002. Glucocorticoids regulate the CCSP and CYP2B1 promoters via C/EBPbeta and delta in lung cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 293: 907-912.

Bernard A, Dumont X, Roels H, Lauwerys R, Dierynck I, DeLey M, Stroobant V, de Hoffmann E., 1993. The molecular mass and concentrations of protein 1 or Clara cell protein in biological fluids: a reappraisal. *Clin Chim Acta.* 223: 189-191.

Bingle CD, Gitlin JD., 1993. Identification of hepatocyte nuclear factor-3 binding sites in the Clara cell secretory protein gene. *Biochem J.* 295: 227-232.

Blau HM., 1992. Differentiation requires continuous active control. *Annual Review of Biochemistry.* 61: 1213-1230.

Braun H, Suske G., 1998. Combinatorial action of HNF3 and Sp family transcription factors in the activation of the rabbit uteroglobin/CC10 promoter. *J Biol Chem.* 273: 9821-9828.

Breathnach R, Chambon P., 1981. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* 50: 349-383

Buehner M, Beato M., 1978. Crystallization and preliminary crystallographic data of rabbit uteroglobin. *J Mol Biol.* 120: 337-341.

Burke TW, Kadonaga JT., 1996. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 10(6): 711-724.

Burke TW, Kadonaga JT., 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11(22): 3020-3031.

Cable PL, Wilson CA, Calzone FJ, Rauscher FJ 3rd, Scully R, Livingston DM, Li L, Blackwell CB, Futreal PA, Afshari CA., 2003. Novel consensus DNA-binding sequence for BRCA1 protein complexes. *Mol Carcinog.* 38: 85-96.

Capelson M, Hetzer MW., 2009. The role of nuclear pores in gene regulation, development and disease. *EMBO Rep.* 10: 697-705.

Carlomagno T, Mantile G, Bazzo R, Miele L, Paolillo L, Mukherjee AB, Barbato G., 1997. Resonance assignment and secondary structure determination and stability of the recombinant human uteroglobin with heteronuclear multidimensional NMR. *J Biomol NMR.* 9: 35-46.

Cato AC, Geisse S, Wenz M, Westphal HM, Beato M., 1984. The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription. *EMBO J.* 3: 2771-2778.

Cervantes FA, Lorenzo C, Hoffmann RS., 1990. *Romerolagus diazi*. *Mammalian Species.* 360:1-7.

Chandra T, Bullock DW, Woo SL., 1981. Hormonally regulated mammalian gene expression: steady-state level and nucleotide sequence of rabbit uteroglobin mRNA. *DNA.* 1: 19-26.

Chi Y, Huddleston MJ, Zhang X, Young RA, Annan RS, Carr SA, Deshaies RJ., 2001. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev.* 15(9): 1078-1092.

Couse JF, Korach KS., 1999. Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol.* 60: 143-148.

Dennig J, Hagen G, Beato M, Suske G., 1995. Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem.* 270: 12737-12744.

Devin-Leclerc J, Meng X, Delahaye F, Leclerc P, Baulieu EE, Catelli MG., 1998. Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm. *Mol Endocrinol.* 12: 842-854.

Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA., 1998. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem.* 273: 29321-29330.

Fernández-Renau D, Lombardero M, Nieto A., 1984. Glucocorticoid-dependent uteroglobin síntesis and uteroglobulin mRNA levels in rabbit lung explants cultured in vitro. *Eur J Biochem.* 144: 523-527.

Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS., 2003. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cell: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* 144: 4562-4574.

Fridlansky F, Milgrom E., 1976. Interaction of uteroglobin with progesterone, 5 $\alpha$ pregnane-3,20-dione and estrogens. *Endocrinology.* 99: 1244-1251.

Fuxreiter M, Tompa P, Simon I, Uversky VN, Hansen JC, Asturias FJ., 2008. Malleable machines take shape in eukaryotic transcriptional regulation. *Nat Chem Biol.* 4: 728-737.

García C, Calvo E, Nieto A., 2007. The transcription factor SOX17 is involved in the transcriptional control of the uteroglobin gene in rabbit endometrium. *J Cell Biochem.* 102: 665-679.

García C, Nieto A., 1999. Two progesterone-dependent endometrial nuclear

factors bind to an E-box in the rabbit uteroglobin gene promoter: involvement in tissue-specific transcription. *Arch Biochem Biophys.* 362: 301-308.

Ghosh S, Jacobson A., 2010. RNA decay modulates gene expression and controls its fidelity. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 1: 351-361.

Gillner M, Lund J, Cambillau C, Alexandersson M, Hurtig U, Bergman A, Klasson-Wehler E, Gustafsson JA., 1988. The binding of methylsulfonyl-polychlorobiphenyls to uteroglobin. *J Steroid Biochem.* 31: 27-33.

Gingold H, Pilpel Y., 2011. Determinants of translation efficiency and accuracy. *Mol Syst Biol.* 7: 481.

Goswami A, Feigelson M., 1974. Differential regulation of a low-molecular-weight protein in oviductal and uterine fluids by ovarian hormones. *Endocrinology.* 95: 669-675.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 320: 134-139.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J., 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 231: 1150-1154.

Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC., 2004. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab.* 15: 73-78.

Gutiérrez-Sagal R, Pérez-Palacios G, Langley E, Pasapera AM, Castro I, Cerbón MA., 1993. Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Mol Reprod Dev.* 34: 244-249.

Gutiérrez-Sagal R, Nieto A., 1998. Cloning and sequencing of the cDNA coding for pig pre-uteroglobin/Clara cell 10 kDa protein. *Biochem Mol Biol Int.* 45: 205-213.

Hagen G, Wolf M, Katyal SL, Singh G, Beato M, Suske G., 1990. Tissue-specific expression, hormonal regulation and 5'-flanking gene region of the rat Clara cell 10 kDa protein: comparison to rabbit uteroglobin. *Nucleic Acids Res.* 18: 2939-2946.

Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G., 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 20: 5519-5525.

Hashimoto S, Nakagawa K, Sueishi K., 1996. Monkey Clara cell 10 kDa protein (CC10): a characterization of the amino acid sequence with an evolutionary comparison with humans, rabbits, rats, and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15: 361-366.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA., 1998. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26: 362-367.

Hofmann TG, Schmitz ML., 2002. The promoter context determines mutual repression or synergism between NF-kappaB and the glucocorticoid receptor. *Biol Chem.* 383: 1947-1951.

Jiang YH, Bressler J, Beaudet AL., 2004. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 5: 479-510.

Kadonaga JT., 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell*. 116: 247-257.

Kleiman FE, Wu-Baer F, Fonseca D, Kaneko S, Baer R, Manley JL., 2005. BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes Dev*. 19: 1227-1237.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU., 1986. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*. 46: 1053-1061.

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC., 1988. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res*. 16: 647-663.

Klinge CM, Brolly CL, Bambara RA, Hilf R., 1997. Hsp70 is not required for high affinity binding of purified calf uterine estrogen receptor to estrogen response element DNA in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 63: 283-301.

Klinge CM., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 29: 2905-2919.

Klug J, Beato M., 1996. Binding of YY1 to a site overlapping a weak TATA box is essential for transcription from the uteroglobin promoter in endometrial cells. *Mol Cell Biol*. 16: 6398-6407.

Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, Miele L, Pattabiraman N, Singh G., 2000. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann NY Acad Sci*. 923: 348-354.

Kouzarides T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128: 693-

705.

Krawczyk Z, Schmid W, Harkonen P, Wolnirzek P., 1992. The ERE-like sequence from the promoter region of the testis specific hsp70-related gene is not estrogen responsive. *Cell Biol Int Rep.* 16: 937-948.

Krishnan RS, Daniel JC Jr., 1967. "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science.* 158: 490-492.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 5925-5930.

Kuhn EJ, Geyer PK., 2003. Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol.* 15(3): 259-265.

Labrador M, Corces VG., 2002. Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell.* 111(2): 151-154.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23: 2947-2948.

Lee KC, Lee Kraus W., 2001. Nuclear receptors, coactivators and chromatin: new approaches, new insights. *Trends Endocrinol Metab.* 12: 191-197.

Li X, Noll M., 1994. Compatibility between enhancers and promoters determines the transcriptional specificity of gooseberry and gooseberry neuro in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 13(2): 400-406.

Linnoila RI, Szabo E, DeMayo F, Witschi H, Sabourin C, Malkinson A., 2000. The

role of CC10 in pulmonary carcinogenesis: from a marker to tumor suppression. *Ann N Y Acad Sci.* 923: 249-267.

López de Haro MS, Nieto A., 1985. Glucocorticoids induce the expression of the uteroglobin gene in rabbit foetal lung explants cultured in vitro. *Biochem J.* 225: 255-258.

López de Haro MS, Nieto A., 1986. Nucleotide and derived amino acid sequences of a cDNA coding for pre-uteroglobin from the lung of the hare (*Lepus capensis*). *Biochem J.* 235: 895-898.

López de Haro MS, Alvarez L, Nieto A., 1988. Testosterone induces the expression of the uteroglobin gene in rabbit epididymis. *Biochem J.* 250: 647-651.

López de Haro MS, García C, Nieto A., 1990. Localization of an estrogen receptor binding site near the promoter of the uteroglobin gene. *FEBS Lett.* 265: 20-22.

López de Haro MS, Pérez Martínez M, García C, Nieto A., 1994. Binding of retinoids to uteroglobin. *FEBS Lett.* 349: 249-251.

Macías H, Pasapera AM, Pérez-Solis MA, Ulloa-Aguirre A, Gutiérrez-Sagal R., 2004. cDNA sequence, 5'-flanking region, and promoter activity of the *Neotomodon alstoni alstoni* Clara cell secretory protein gene. *Arch Biochem Biophys.* 427: 170-179.

Manyak MJ, Kikukawa T, Mukherjee AB., 1988. Expression of a uteroglobin-like protein in human prostate. *J Urol.* 140: 176-182.

Margraf LR, Finegold MJ, Stanley LA, Major A, Hawkins HK, DeMayo FJ., 1993. Cloning and tissue-specific expression of the cDNA for the mouse Clara 10 kD protein: comparison of endogenous expression to rabbit uteroglobin promoter-

driven transgene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 9: 231-238.

Matthee CA, van Vuuren BJ, Bell D, Robinson TJ., 2004. A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five intercontinental exchanges during the Miocene. *Syst Biol.* 53: 433-447.

Mayol RF, Longenecker DE., 1974. Development of a radioimmunoassay for blastokinin. *Endocrinology.* 95: 1534-1542.

McDonnell DP., 2003. Mining the complexities of the estrogen signaling pathways for novel therapeutics. *Endocrinology.* 144: 4237-4240.

McManus CJ, Graveley BR., 2011. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr Opin Genet Dev.* 21: 373-379.

Menne C, Suske G, Arnemann J, Wenz M, Cato AC, Beato M., 1982. Isolation and structure of the gene for the progesterone-inducible protein uteroglobin. *Proc Natl Acad Sci.* 79: 4853-4857.

Merika M, Thanos D., 2001. Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 11: 205-208.

Merli C, Bergstrom DE, Cygan JA, Blackman RK., 1996. Promoter specificity mediates the independent regulation of neighboring genes. *Genes Dev.* 10(10): 1260-1270.

Miele L, Cordella-Miele E, Mantile G, Peri A, Mukherjee AB., 1994. Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: the uteroglobin family of proteins. *J Endocrinol Invest.* 17: 679-692.

Mihal K, Riedel N., 1991. One gene encoding three proteins with different functions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5: 1-3.

Morishima Y, Kanelakis KC, Silverstein AM, Dittmar KD, Estrada L, Pratt WB., 2000. The Hsp organizer protein hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90-based chaperone system. *J Biol Chem.* 275: 6894-6900.

Morize I, Surcouf E, Vaney MC, Epelboin Y, Buehner M, Fridlansky F, Milgrom E, Mornon JP., 1987. Refinement of the C222(1) crystal form of oxidized uteroglobin at 1.34 Å resolution. *194:* 725-739.

Mornon JP, Bally R, Fridlansky F, Milgrom E., 1979. Characterization of two new crystal forms of uteroglobin. *J Mol Biol.* 127: 237-239.

Mukherjee AB, Zhang Z, Chilton BS., 2007. Uteroglobin: a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily. *Endocr Rev.* 28: 707-725.

Muller-Schottle F, Classen-Linke I, Alfer J, Krusche C, Beier-Hellwig K, Sterzik K, Beier HM., 1999. Expression of uteroglobin in the human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 5: 1155-1161.

Muller-Schottle F, Bogusz A, Grötzinger J, Herrler A, Krusche CA, Beier-Hellwig K, Beier HM., 2002. Full-length complementary DNA and the derived amino acid sequence of horse uteroglobin. *Biol Reprod.* 66: 1723-1728.

Muramatsu M, Inoue S., 2000. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun.* 270: 1-10.

Murdoch FE, Byrne LM, Ariazi EA, Furlow JD, Meier DA, Gorski J., 1995. estrogen receptor binding to DNA: affinity for nonpalindromic elements from the

rat prolactin gene. *Biochemistry*. 34: 9144-9150.

Nordlund-Moller L, Andersson O, Ahlgren R, Schilling J, Gillner M, Gustafsson JA, Lund J., 1990. Cloning, structure, and expression of a rat binding protein for polychlorinated biphenyls. Homology to the hormonally regulated progesterone-binding protein uteroglobin. *J Biol Chem*. 265: 12690-12693.

Pérez-Solis MA, Macías H, Acosta-MontesdeOca A, Pasapera AM, Fierro R, Ulloa-Aguirre A, Gutiérrez-Sagal R., 2010. Molecular cloning and functional analysis of the FSH receptor gene promoter from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Endocrine*. 37: 98-105.

Ray MK, Magdaleno S, O'Malley BW, DeMayo FJ., 1993. Cloning and characterization of the mouse Clara cell specific 10 kDa protein gene: comparison of the 5'-flanking region with the human rat and rabbit gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 197: 163-171.

Riffo M, González KD, Nieto A., 2007. Uteroglobin induces the development and cellular proliferation of the mouse early embryo. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 307: 28-34.

Sagal RG, Nieto A., 1998. Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster uteroglobin/Clara cell 10-KDa gene (ug/cc10): tissue-specific and hormonal regulation. *Arch Biochem Biophys*. 350: 214-222.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor.

Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S., 2000. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem*. 275:

5379-5387.

Sawaya PL, Stripp BR, Whitsett JA, Luse DS., 1993. The lung-specific CC10 gene is regulated by transcription factors from the AP-1, octamer, and hepatocyte nuclear factor 3 families. *Mol Cell Biol.* 13: 3860-3871.

Scholz A, Truss M, Beato M., 1998. Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium. *J Biol Chem.* 273: 4360-4366.

Scholz A, Truss M, Beato M., 1999. Hormone-dependent recruitment of NF-Y to the uteroglobin gene enhancer associated with chromatin remodeling in rabbit endometrial epithelium. *J Biol Chem.* 274: 4017-4026.

Schultz JR, Petz LN, Nardulli AM., 2003. Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 201: 165-175.

Shen XZ, Tsai MJ, Bullock DW, Woo SL., 1983. Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription. *Endocrinology.* 112: 871-876.

Singh G, Katyal SL, Ward JM, Gottron SA, Wong-Chong ML, Riley EJ., 1985. Secretory proteins of the lung in rodents: immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 33: 564- 568.

Singh G, Katyal SL, Brown WE, Phillips S, Kennedy AL, Anthony J, Squeglia N., 1988. Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein. *Biochim Biophys Acta.* 950: 329-337.

Slater EP, Redeuhl G, Theis K, Suske G, Beato M., 1990. The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element. *Mol Endocrinol.*

4: 604-610.

Smale ST., 2001. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev.* 15 (19): 2503-2508.

Smith DF, Toft DO., 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol.* 7: 4-11.

Starita LM, Parvin JD., 2003. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol.* 15: 345-350.

Uchikawa K, Suzuki H., 1979. *Cheyletiella mexicana* sp.nov (Acarina Cheyletiellidae) parasite on *Romerolagus diazi* (Mammalia, Leporidae). *Tropical Medicine.* 21: 21-27.

Umland TC, Swaminathan S, Furey W, Singh G, Pletcher J, Sax M., 1992. Refined structure of rat Clara cell 17 kDa protein at 3.0 Å resolution. *J Mol Biol.* 224: 441- 448.

Van Dijck P, Verhoeven G., 1992. Interaction of estrogen receptor complexes with the promoter region of genes that are negatively regulated by estrogens: the alpha 2u-globulins. *Biochem Biophys Res Commun.* 182: 174-181.

Velázquez A, Cervantes FA, Galindo-Leal C., 1993. The volcano rabbit *Romerolagus diazi*, a peculiar lagomorph. *Lutra.* 36: 62-70.

Velázquez A., 1994. Distribution and population size of *Romerolagus diazi* on El Pelado volcano México. *J. Mammal.* 75: 743-749.

Wan L, Dayong L, Donglei Z, Xue L, Wenjiang JF, Lihuang Z, Minghua D, Fengzhu S, Minping Q., 2008. Conservation and implications of eukaryote

transcriptional regulatory regions across multiple species. *BMC Genomics*. 9: 623.

Wang F, Hoivik D, Pollenz R, Safe S., 1998. Functional and physical interactions between the estrogen receptor Sp1 and nuclear aryl hydrocarbon receptor complexes. *Nucleic Acids Res*. 26: 3044-3052.

Winkelmann R, Geschwindner S, Haun M, Rüterjans H; 1998. Solution structure of the recombinant oxidized rabbit uteroglobin using homonuclear and heteronuclear multidimensional NMR. *Eur J Biochem*. 258: 521-532.

Wolf M, Klug J, Hackenberg R, Gessler M, Grzeschik KH, Beato M, Suske G., 1992. Human CC10, the homologue of rabbit uteroglobin: genomic cloning, chromosomal localization and expression in endometrial cell lines. *Hum Mol Genet*. 1: 371- 378.

Yi P, Wu RC, Sandquist J, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, Means AR, O'Malley BW., 2005. Peptidyl-prolyl isomerase 1 (pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol Cell Biol*. 25: 9687-9699.

Zhang Z, Kundu GC, Zheng F, Yuan CJ, Lee E, Westphal H, Ward J, DeMayo F, Mukherjee AB., 2000. Insight into the physiological function(s) uteroglobin by gene-knockout and antisense-transgenic approaches. *Ann N Y Acad Sci*. 923: 210-233.