

11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DE LA
DEOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA TERMINAL EN CELULAS
LINFOIDES HUMANAS"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA INMUNOLOGIA**

P R E S E N T A:

BIOL. OSCAR PERALTA ZARAGOZA

**DIRECTOR DE TESIS: DR. VICENTE MADRID MARINA
ASESOR DE TESIS: DR. FELIX RECILLAS TARGA**

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

MEXICO., D. F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

**SI VOLVIERA A NACER,
YIVIRIA MAS INTENSAMENTE.....**

BORGUES

DEDICATORIA

* A HILDA MARGARITA ZARAGOZA MUÑOZ, CON EL AFECTO, GRATITUD Y ADMIRACION QUE SIENTO HACIA ELLA, POR SUS ENSEÑANZAS, ESPIRITU INCANSABLE Y POR SU CONFIANZA EN MI, GRACIAS POR SER MI MADRE.

* A MI ESPOSA CLAUDIA GOMEZ DE PERALTA, POR SU ENTUSIASTA MOTIVACION Y SU CONSTANTE APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, ASI COMO EN MI VIDA PERSONAL, MIL GRACIAS

* A MIS HERMANOS: JOAQUIN, ALEJANDRO, ARMANDO, DAVID Y MARIO; QUE SIN EL REGALO INCONDICIONAL DE APOYO Y AMOR QUE DE ELLOS RECIBI, POSIBLEMENTE NUNCA HUBIERA PERSEVERADO EN MI EMPEÑO.

AGRADECIMIENTOS

* AGRADEZCO AL DR FELIX RECILLAS SUS VALIOSAS SUGERENCIAS, ASI COMO SU APOYO INCONDICIONAL Y AMISTAD QUE ME BRINDO DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

* DE MANERA MUY ESPECIAL, LE EXPRESO MIS MAS SINCEROS Y PROFUNDOS AGRADECIMIENTOS A MI MAESTRO, AMIGO Y GUIA: DR. VICENTE MADRID MARINA, YA QUE DE NO HABER SIDO POR EL CUIDADOSO ESMERO QUE PUSO EN MI FORMACION, ASI COMO POR SUS VALIOSAS SUGERENCIAS, SUS COMENTARIOS, POR SU APRECIABLE AFECTO, PERO SOBRE TODO POR SU EXCELENTE CALIDAD HUMANA; LA REALIZACION DE ESTA TESIS NO HUBIERA PODIDO LLEGAR A SU CONCLUSION.

* LES EXPRESO MIS AGRADECIMIENTOS A LOS DRS: RAUL BARRERA RODRIGUEZ, JOSE RAMOS CASTAÑEDA, Y JOAQUIN SANCHEZ CASTILLO; POR SUS VALIOSAS SUGERENCIA EN LA CORRECCION DEL MANUSCRITO FINAL.

* AGRADEZCO DE IGUAL MANERA A CADA UNO DE LOS MIEMBROS DEL JURADO: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA, DR. JAIME MAS OLIVA, DR. VICENTE MADRID MARINA, DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA Y DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ; POR SUS VALIOSAS RECOMENDACIONES PARA ESTA TESIS.

* NO QUISIERA OMITIR MIS AGRADECIMIENTOS A TODAS Y CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE ME BRINDARON SU APOYO DE ALGUNA U OTRA MANERA, Y QUE FUERON DECISIVAS EN ALGUN MOMENTO DURANTE LA REALIZACION DE ESTA TESIS. A TODOS ELLOS Y SIN EXCEPCIÓN ALGUNA, "MUCHAS GRACIAS".

* FINALMENTE, SE AGRADECE A LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA) A TRAVES DEL PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN SALUD (PUIS), Y AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TEGNOLOGIA (CONACYT); POR EL APOYO BRINDADO A TRAVES DE SUS PROGRAMAS DE BECA, BECA-CREDITO, Y FINANCIAMIENTO (1018-M9111) PARA LA COMPRA DE MATERIAL, REACTIVO Y EQUIPO; DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO Y LA OBTENCION DEL GRADO QUE AQUÍ SE PRESENTA.

JURADO

PRESIDENTE: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA.

SECRETARIO: DR. JAIME MAS OLIVA.

VOCAL: DR. VICENTE MADRID MARINA.

SUPLENTE: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA.

SUPLENTE: DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ.

CONTENIDO

I).	RESUMEN	8
II).	INTRODUCCION	10
	Metabolismo de enzimas púricas	11
	Rearreglos génicos	12
	Ontogenia de los linfocitos	13
	Gen de TdT	15
	Señales que regulan la expresión de TdT	16
	Activación transcripcional por AP-1	16
	Justificación	17
III).	HIPOTESIS	19
IV).	OBJETIVO GENERAL	19
V).	OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
VI).	MATERIALES Y METODOS	20
	Reactivos	20
	Células	20
	Aislamiento de RNA y análisis mediante Northern blot	21
	Reacción en cadena de la polimerasa	22
	Oligonucleótidos: AP-1Cons y AP-1-TdT	23
	Estrategia de clonación	23
	Preparación de extractos nucleares	24
	Electroforesis con movilidad retardada	25
VII).	RESULTADOS	27
	Análisis de la expresión del RNAm de c-fos y c-jun por activación de PKC	27
	Interacción DNA/proteína en la región reguladora del gen humano de TdT con extractos nucleares de células leucémicas y células linfoides humanas	28
	Interacción DNA/proteína en la región reguladora del gen humano de TdT con extractos nucleares de células HeLa	30
	Elementos similares a AP-1 presentes en la región reguladora 5' del gen de TdT	32
	Especificidad de los elementos similares a AP-1 del gen de TdT ...	33
	El elemento similar a AP-1 del gen de TdT es competido por el	

elemento regulador AP-1 consenso	34
VIII). DISCUSION	36
IX). CONCLUSIONES	44
X). PERSPECTIVAS	46
XI). REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47

I). RESUMEN

La enzima recombinasa deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), es una DNA polimerasa independiente de molde, que cataliza la incorporación de deoxinucleótidos en el extremo 3'-hidroxilo de DNA. Se considera que ésta enzima es activa sólo en estadios tempranos de maduración de linfocitos y en algunas células leucémicas. Se ha reportado que TdT aumenta la diversidad de unión de los segmentos génicos de inmunoglobulinas y del receptor de antígenos de los linfocitos T. Previamente identificamos que la activación de la proteína cinasa C inhibe la expresión del gen de TdT. Por otro lado, la activación de la proteína cinasa C induce la síntesis de las proteínas Fos y Jun, que son los principales componentes implicados en la actividad del factor transcripcional AP-1; el cual interactúa con las secuencias de reconocimiento AP-1 en el DNA. Esto sugiere que la regulación de la expresión negativa de TdT puede ser mediada, en parte, por el factor transcripcional AP-1. Por tal motivo, en el presente trabajo estudiamos el mecanismo molecular que regula la expresión del gen de TdT en células linfoides humanas a través del análisis de los elementos reguladores AP-1 presentes en la región reguladora 5' de TdT.

Para ello, subclonamos la región reguladora 5' del gen humano de TdT, a partir de tejidos linfoides normales y obtuvimos un fragmento de DNA de 600 pb, que corresponde a la región reguladora proximal del gen de TdT (-600 a -1 pb). Por digestión enzimática con Rsa I generamos los subfragmentos I, II y III de DNA de 166, 94 y 340 pb respectivamente; y por digestión con Acc I generamos los subfragmentos A y B de 397 y 203 pb respectivamente. Mediante experimentos de electroforesis de movilidad retardada con proteínas nucleares de células que expresan o no el gen de TdT identificamos dos complejos DNA/proteína en las células que no expresan el gen de TdT, los cuales se unen al subfragmento de 340 pb. Estos datos sugieren la presencia de complejos proteínicos posibles moduladores de la expresión de TdT. Por otra parte, el análisis de la secuencia del fragmento de DNA de 600 pb, reveló que los primeros de 397 pb antes del sitio de

inicio de la transcripción, es una región rica en secuencias similares al elemento regulador AP-1, y que son reconocidas por algún miembro de la familia de factores transcripcionales AP-1. Este dato sugiere que estas secuencias pueden tener una influencia relevante en la expresión del gen de TdT. Para probar ésta hipótesis, realizamos los experimentos de electroforesis con movilidad retardada ahora con el subfragmento de 397 pb y con un oligonucleótido que comprende una de estas secuencias similares a AP-1, y con extractos nucleares de células HeLa, como una fuente rica de proteínas nucleares AP-1. Las proteínas de unión específica al subfragmento de 397 pb son sugestivas para pensar en complejos DNA/proteína y las que se unen al oligonucleótido AP-1-TdT tienen el mismo patrón de desplazamiento electroforético que los complejos que se unen al elemento regulador consenso AP-1. Además, estos complejos compiten específicamente por el elemento regulador consenso AP-1. En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la expresión del gen humano de TdT pueden participar elementos reguladores similares a AP-1 presentes en la región reguladora 5' proximal de TdT. Más aún, con las evidencias de que la activación de la proteína cinasa C inhibe la expresión de TdT, por lo tanto, proponemos que la regulación de la expresión de TdT puede ser reprimida, en parte, por elementos reguladores AP-1.

II). INTRODUCCION

El desarrollo de los linfocitos comprende una compleja combinación de eventos genéticos y respuestas a estímulos. Este proceso ocurre en un orden secuencial definido y parece requerir migraciones celulares, rearrreglos génicos, actividades enzimáticas, contactos célula-célula y procesos de selección positiva y negativa; todos los cuales requieren de la inducción y/o represión de distintos genes en un orden tiempo-específico. Muchos avances se han realizado en la caracterización bioquímica de estadios intermedios de diferenciación de linfocitos T y B, sin embargo, nuestro entendimiento de los eventos moleculares que ocurren durante estos procesos, aún es escaso.

Las células linfoides se desarrollan a través de varios estadios secuenciales durante la maduración de una célula embrionaria a un linfocito maduro. Diversos eventos ocurren en éste proceso como variaciones de actividades enzimáticas y rearrreglos génicos. Las actividades de diversas enzimas se han usado como marcadores de las diferenciación de células linfoides. Se sabe que las actividades de algunas enzimas púricas cambian durante el curso de la diferenciación de los linfocitos. Los timocitos tienen alta actividad de adenosina deaminasa (ADA) y la diferenciación celular conlleva a la disminución en la actividad de ADA (1). La actividad de la purina nucleósido fosforilasa (PNP) es baja en timocitos y en células pre-B, sin embargo; aumenta conforme maduran los linfocitos (2). La 5'-nucleotidasa (5'-NT) tiene baja actividad en timocitos, la cual aumenta en linfocitos maduros de sangre periférica y de nódulos linfoides; cambios similares ocurren en los linfocitos B (3). Las deficiencias genéticas de estas enzimas puede resultar en una inmunodeficiencia primaria que compromete la propia vida del individuo (4). La deficiencia de ADA produce inmunodeficiencia severa combinada con un desorden del desarrollo normal de la inmunidad humoral y celular (5). La deficiencia de PNP resulta en una pérdida selectiva de la inmunidad celular (6); y la deficiencia de 5'-NT esta asociada con la diferenciación anormal de los

linfocitos T y B (7). Por otra parte, se sabe que la polimerasa deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT; Terminal transferasa nucleosido-trifosfato; DNA-deoxinucleotidil exotransferasa; EC 2.7.7.31) es uno de los mejores marcadores de la diferenciación de los linfocitos, además de que es el marcador mejor caracterizado en el diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (leucemia linfoblástica aguda) (8).

METABOLISMO DE LAS ENZIMAS PURICAS. La actividad de TdT se encuentra elevada en células linfoides inmaduras y disminuye conforme progresa la maduración celular. TdT utiliza como substratos a los metabolitos generados por las enzimas puricas (ADA, PNP y 5'-NT). Este comportamiento sugiere que TdT tiene una función importante durante la diferenciación de los linfocitos T y B. El estudio de las actividades enzimáticas de ADA, 5'-NT y PNP revela una relación estrecha en el mantenimiento del reservorio metabólico de los deoxinucleótidos trifosfatados (dATP y dGTP) intracelulares en timocitos humanos (3). Los niveles elevados de éstos metabolitos tienen efectos citotóxicos si se acumulan en las células en cantidades no permisibles. Entre las funciones que realiza TdT, se encuentra la reutilización de estos metabolitos para aumentar la diversidad inmunológica de Igs y del TcR, a través de la incorporación de los mismos al marco de lectura de los genes que codifican para estas proteínas. Así como también evita el daño celular por la acumulación de estos deoxinucleótidos (3).

Nuestro grupo ha estudiado algunas señales que participan en la regulación del gen de TdT y hemos identificado que la expresión génica de TdT, ADA y PNP están coordinadamente regulados por la acción de los ésteres de forbol en células linfoides humanas (9,10). Los ésteres de forbol son capaces de mimetizar la acción del DAG (diacilglicerol) en los eventos de transducción de señal e inducir la activación de la proteína cinasa dependiente de Ca^{++} y diacilglicerol (PKC). Estos eventos participan en la activación transcripcional de la mayoría de los

genes regulables. Estos resultados correlacionan con otros hallazgos y han permitido proponer que éste patrón de regulación coordinada también está presente en LLA (11).

REARREGLOS GENICOS. El rearreglo de los genes que codifican para Igs y TcR, constituye un proceso finamente regulado donde participan señales específicas y la maquinaria de recombinación molecular (12). Se ha identificado a TdT como un componente importante de ésta maquinaria de recombinación, por lo que la función de TdT en estos eventos parece ser primordial en el contexto de la maduración celular.

TdT fue identificada en 1971 en células de pacientes con LLA (12). Esta enzima es una polimerasa tejido-tiempo-específica bien caracterizada y tiene una importante función en la generación de la diversidad inmune (13). TdT es un complejo heterodimérico con varias isoformas, con un peso molecular que oscila entre 32 y 58 kDa (14). El dominio del sitio activo de ésta proteína está conservado en todas las isoformas y los residuos de la región de 224 a 237 de la estructura primaria, constituyen el dominio de unión al sustrato (14). TdT es una enzima nuclear con propiedades de DNA-polimerasa la cual cataliza la adición de deoxinucleótidos en el extremo 3'-hidroxilo del DNA y funciona de manera independiente de un molde (13). Esta actividad está restringida a pre-linfocitos de médula ósea, timo y ciertas células leucémicas (8). Durante la vida fetal, las células que expresan TdT son primeramente detectadas en timo, pero no en hígado, bazo, o médula ósea; y solamente se expresa en médula y bazo hasta el día del nacimiento (15). La actividad de TdT ha sido demostrada en la adición de nucleótidos (regiones "N") no codificados en línea germinal, entre las uniones D/J, V/DJ o V/J durante el rearreglo de segmentos génicos que codifican para Igs o TcR (16-18). La inserción azarosa de nucleótidos en las regiones N se piensa que es un evento significativo en el aumento de la diversidad del repertorio inmune (19,20). Existen evidencias concluyentes de que la actividad de TdT es responsable para la formación de

las regiones N durante el proceso de recombinación (21,22). En estos estudios los ratones deficientes en TdT fueron generados por inactivación del gen de TdT por medio de recombinación homóloga. En estos animales knockout de TdT carecen de regiones N entre los segmentos V, D y J de las secuencias de Igs y TcR. Con estos datos Komori et al han postulado que TdT es un componente tejido-específico de la recombinasa de V(D)J.

ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS. En los linfocitos T, la secuencia de rearrreglos del TcR y la aparición de los receptores alfa/beta y gamma/delta durante el desarrollo tímico, ha sido estudiado en detalle en ratones. En el día 14 de gestación, ocurre el primer rearrreglo de los genes gamma/delta y los RNAm se expresan abundantemente en el día 15 (23, 24). El rearrreglo de los segmentos D-beta con J-beta se inician en el día 14 y los transcritos V-D-J/beta se detectan después del día 15.5 (25). Los transcritos de la cadena alfa aparecen el día 16 y aumentan hasta el nacimiento (día 20) (25). Estos datos sugieren que el TcR-gamma/delta es el primer receptor en aparecer. En el día 17.5 hay un número similar de linfocitos T gamma/delta y alfa/beta, mientras que al nacimiento el porcentaje de linfocitos alfa/beta es mayor (26). Muchas evidencias sugieren que el orden de estos eventos es similar en el humano (27,28). Por ejemplo, el análisis de los rearrreglos y transcritos de los genes del TcR en LLA sugiere que el TcR-gamma/delta se rearregla antes que el TcR-alfa/beta (29). Se ha propuesto que en timocitos humanos los genes gamma/delta se rearreglan primero, y si éste evento falla, la célula continuará con el rearrreglo de los genes alfa/beta (la exclusión alélica ocurre únicamente para los genes beta). Estas evidencias sugieren que algunos timocitos pueden utilizar rearrreglos sucesivos, en el esfuerzo de expresar un TcR funcional. Nosotros hemos reportado que los rearrreglos de los genes que codifican para el TcR humano, es un proceso de relevante importancia para la maduración de los linfocitos T (30) y que las señales de calcio y activación de PKC participan en la expresión

diferencial del TcR (31,32) La diversidad del TcR se localiza en la tercera región de complementariedad determinada, lo que permite proponer un modelo para el reconocimiento de antígenos, en donde las regiones V-alfa/beta se unen a las alfa-hélice del complejo principal de histocompatibilidad, mientras que las uniones entre V-D-J interactúan con el péptido antigénico. Son estas regiones de unión entre los segmentos génicos V-D-J que codifican para TcR, los sitios de reconocimiento para TdT (regiones "N") donde se realiza la adición de los deoxinucleótidos. Por lo tanto, la función de TdT es importante para la maduración de los linfocitos T y para el aumento de la diversidad inmune. Además, éste modelo enfatiza la importancia de la diversidad en las uniones de los segmentos génicos y explica las distintas afinidades que tienen los receptores por los antígenos.

En la maduración de los linfocitos B, en el precursor celular (en hígado fetal o médula ósea de adulto), ocurren los rearrreglos de los segmentos génicos de Igs. El primer rearrreglo ocurre con los segmentos D y J (linfocito pro-B) y el segundo rearrreglo ocurre entre los segmentos V con D-J. de los genes que codifican para la cadena pesada de Ig (15). Si el rearrreglo V-D-J es funcional, se produce exclusión alélica para los genes de cadena pesada. La célula con rearrreglos del gen de cadena pesada (linfocito pre-B), expresa Igs citoplasmáticas (19). Después del rearrreglo funcional de genes de cadena pesada, sigue el rearrreglo de genes de cadena ligera (segmentos V-J) (primero los segmentos kappa y después los lambda con exclusión alélica). Una vez realizados los rearrreglos funcionales de los genes de cadena pesada y ligera, los linfocitos B expresan IgM en la superficie (linfocito B inmaduro). La expresión simultánea de IgM e IgD en superficie conllevará al estado de linfocito maduro, los cuales antes del contacto con el antígeno se denominan linfocitos vírgenes. La diversidad del marco de lectura de los transcritos V-D-J rearrreglos para Igs, aumenta de manera significativa por la actividad de TdT al adicionar deoxinucleótidos entre las uniones de los segmentos V-D-J (18,19). Por lo que nuevamente, la

función de TdT tiene una importancia relevante en el desarrollo de los linfocitos B y en el aumento del repertorio de la diversidad inmune.

GEN DE TdT. Se ha reportado la organización y la secuencia completa de DNA del gen humano de TdT (33). El gen se ha localizado en el cromosoma 10 q23-q25 y su secuencia ha revelado un tamaño de 49.2 kb, que comprende una región reguladora basal 5' de aproximadamente 700 pb con varios elementos reguladores (promotor basal); un marco abierto de lectura con 11 exones, 10 intrones; y un RNAm con una secuencia líder de 250 nucleótidos (33). El análisis de la secuencia del promotor, tomado del "Genebank", muestra varios elementos regulables (FIGURAS 1A y 1B). Los genes humano y murino de TdT han sido materia de intensos estudios. En ambas especies TdT es codificado por un solo gen (33). El promotor del gen murino de TdT contiene un elemento iniciador (Inr) que comprende el sitio de inicio de transcripción que se superpone con la región reguladora 5' que carece de secuencias TATA (34). El elemento Inr dirige la transcripción basal del gen murino de TdT sin conferir especificidad de tejido (34). La especificidad de tejido ha sido identificada en otra secuencia localizada 60 pb antes del sitio de inicio de la transcripción, donde se encuentran los elementos LyF-1 y Ets (35).

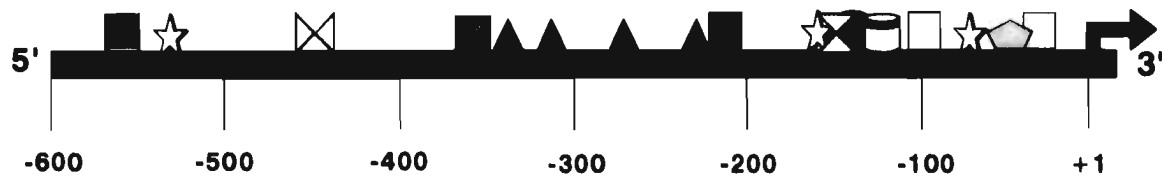
La secuencia reguladora 5' del gen humano de TdT muestra una homología limitada en relación a otros promotores de eucariontes. Se ha determinado un promotor basal que no contiene secuencias TATA ni sitios ricos en GC de unión para SP-1 (36). Además, se han identificado en éste promotor, un elemento primario que comprende de la región de -34 a -14 nucleótidos que confiere el 80% de la actividad promotora; y un elemento secundario funcionalmente responsable del 20% restante de la actividad promotora, y que abarca de -14 a +21 nucleótidos (36). No se descarta la posibilidad de la existencia de otros elementos reguladores, aún no identificados en la

**SECUENCIA REGULADORA 5' DEL GEN
HUMANO DE TdT**

- 600	GAGCAGTTAG	AAGCAACAGA	GCAATTAGAA	TACGGATCTG	GAAAACATAG
			NF-1		CAAT
- 550	TTCCAAGTGA	AATAAAAAGG	TGAT <u>TGGCAA</u>	AATGAGAAAT	<u>GTAACAATGC</u>
					E1gG-1
- 500	CATTTATGTA	AAGTCAAAAC	AACCACAAGC	AGAATATAAC	ACCC <u>ATGCAA</u>
- 450	<u>ATAACAGACA</u>	TCCAGTACAG	TGTAATGATT	GTCTACAAAA	GGAGGAGAAT
			CAAT		
- 400	GCAAGTGAGT	TGGGAGGTTT	AAAGGG <u>GATC</u>	<u>AATAA</u> AATAA	GACCACAGAA
	AP-1-TdT			AP-1-TdT	
- 350	GGGC <u>TCAGT</u>	<u>ACATTTAGAA</u>	ATAAATAACA	TGCAAACAAT	<u>GATGCTTCCC</u>
		AP-1-TdT			
- 300	TACCTTCCTC	ACGAGG <u>TTAC</u>	<u>TCTGAGGAGC</u>	TAATGAGATT	GTGCGTATGA
		AP-1-TdT		CAAT	
- 250	AAACAAAAGT	TAAT <u>TGACTG</u>	<u>TCTTCATTAT</u>	GATCTCCATA	<u>TTGGACAAAT</u>
				NF-1	NF-E1 IgG-2
- 200	<u>GAACTGAACA</u>	GAGATAAAAA	TTCCCCATCA	CACTT <u>TGGCA</u>	<u>GGAAGCTGTT</u>
			CREB		
- 150	<u>GCCAG</u> GGCAG	CACCTGTGAA	GCCCTGGC <u>CT</u>	<u>GGCTTCAGAG</u>	TCTGCT <u>TGGTG</u>
	LyF.1		LyF-1	NF-1	Ets
- 100	<u>AGATGACA</u> TC	AAAACCCTTC	GT <u>GTAGGAGG</u>	<u>GTGGCAGTCT</u>	<u>CCCTCCCTTC</u>
- 50	<u>TG</u> GAGACACC	ACCAGATGGG	CCAGCCAGAG	GCAGCAGCAG	CCTCTTCCCA

-1

FIGURA 1A. Secuencia y análisis por computadora de los elementos reguladores de la región reguladora basal 5' del gen humano de TdT.



ELEMENTO		SECUENCIA
AP-1	▲	TGACTCA
CAT	■	CAAT
CREB	◐	CTGGCT
Ets	◑	CAGGAAGTTG
E1gG-1	⊠	ATGCAAAT
E1gG-2	⊡	GGAAGCTGTT
LyF-1	□	TTTTGGGAGAAA
NF-E1	●	WGATAMM
NF-1/CTF	☆	TGGCA

FIGURA 1B. Esquema representativo de los elementos reguladores presentes en la region reguladora 5' del gen humano de TdT.

región reguladora 5' del gen humano de TdT y que pueden influir en el proceso de la regulación transcripcional de éste gen.

SEÑALES QUE REGULAN LA EXPRESION DE TdT. No obstante del progreso realizado para conocer la organización y entender la función del gen de TdT, el mecanismo molecular que regula la expresión de éste gen en el contexto celular, aún no se conoce totalmente. Hay evidencias experimentales de que varios compuestos que aumentan los niveles de AMPc intracelular inducen la síntesis de TdT en líneas de linfocitos B transformadas (37). Además, se ha reportado el aumento de la expresión de TdT en timocitos normales y no transformados tanto *in vivo* como *in vitro* después del tratamiento con timosina (38) y timopoyetina (39), los cuales aumentan los niveles de AMPc intracelular e inducen la expresión de TdT. Nosotros hemos reportado evidencias de que los ésteres de forbol regulan de manera coordinada la expresión génica de las enzimas púricas y de TdT (9,11). Además demostramos que señales mediadas por dexametasona y AMPc también regulan la expresión del gen de TdT (79,80). Existen datos que demuestran que la expresión del gen de TdT en células normales y leucémicas, parece estar regulado a nivel transcripcional y en ésta regulación participa la activación de PKC (40,41). Estos hallazgos sugieren el hecho de que la expresión del gen humano de TdT es un proceso finamente regulado en donde tiene una importante función la activación de PKC. Hay que tener presente que la activación de PKC induce la expresión de los genes que codifican para el complejo AP-1, del cual a continuación se mencionaran algunos aspectos de interés.

ACTIVACION TRANSCRIPCIONAL POR AP-1. El factor transcripcional AP-1 es un complejo proteínico, nuclear, heterodimérico; compuesto principalmente por los productos de los proto-oncogenes c-fos y c-jun (42). El factor AP-1 está involucrado en la regulación de la

proliferación celular inducida por factores de crecimiento (42) o en la formación de tumores inducidos por ésteres de forbol (43, 44). Los miembros de las familias de proteínas Fos y Jun pueden formar homodímeros, pero su estado funcional es en forma de heterodímeros, unidos por un dominio de zipper de leucinas. Estos heterodímeros inducen cambios conformacionales a todo el complejo para que un dominio básico de cada una de las proteínas reconozca la secuencia consenso TGACTCA. (45). Esta secuencia o secuencias similares a ésta, que tiene una alta homología y que pertenecen a la familia de AP-1; se encuentran presentes en la mayoría de los genes regulables, por lo que representan uno de los mecanismos tempranos de regulación transcripcional de un gen. El factor transcripcional AP-1 también tiene una importante función en la regulación transcripcional de los genes de citocinas que contienen elementos de activación AP-1 (46). Se ha reportado que en la regulación de genes de citocinas, AP-1 media la transcripción a través de la unión específica al DNA, de manera independiente o en asociación con el factor NF-AT (47). Además, existen evidencias donde se describe que en linfocitos activados a través de CD28, ocurre una regulación diferencial de la expresión de c-fos y c-jun (48). En éste reporte se concluye que la expresión de c-jun en ausencia de c-fos, puede evitar la activación inapropiada de linfocitos T, causada por el ligando de CD28 en ausencia del estímulo antigénico apropiado. Todos estos hallazgos en conjunto sugieren que muchos de los genes que participan en la respuesta inmune tienen una regulación mediada a través de los factores transcripcionales AP-1 y sus correspondientes elementos reguladores.

JUSTIFICACION

La fosforilación de proteínas es el mecanismo regulador de muchos eventos celulares en respuesta a cambios en la actividad metabólica y a las condiciones extracelulares. De los eventos de transducción de señal, la activación de PKC en la fosforilación de diferentes substratos en

residuos de serina o treonina, ha sido uno de los eventos más estudiados (49). Se conoce que la activación de PKC induce la expresión de c-fos y c-jun (49) y recientemente se ha reportado que TdT es un sustrato de PKC (50) Estos datos apoyan el hecho de que la fosforilación de TdT podría tener una función importante en la vía de control que regula la activación transcripcional y la síntesis de ésta proteína durante el proceso de diferenciación de las células linfoides.

Como ya se mencionó anteriormente, el gen de TdT es expresado exclusivamente en estadios tempranos del desarrollo de linfocitos T y B, y es reprimido cuando las células son maduras. Este patrón restringido de regulación nos permite estudiar tanto los eventos que ocurren durante la inducción así como en la terminación de la activación transcripcional en diferentes estadios de maduración de los linfocitos. Por lo tanto, la intención del presente trabajo es estudiar parte de los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la expresión génica de TdT humano, a través del análisis de los elementos reguladores similares a AP-1 presentes en la región promotora basal de TdT.

III). HIPOTESIS

La activación de PKC induce la expresión, entre otras muchas proteínas, de Fos y Jun (complejo transcripcional AP-1); que a su vez regulan la expresión de muchos genes inducibles a través de su interacción con los elementos reguladores AP-1. Además, se conoce que la expresión del gen humano de TdT es inhibida por la activación de PKC. Por lo tanto, nosotros proponemos que la regulación de la expresión del gen de TdT, puede ser mediada en parte, a través de elementos reguladores AP-1 presentes en la región reguladora 5' del gen humano que codifica para TdT.

IV). OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente estudio es contribuir a los conocimientos de los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la expresión del gen humano de TdT, en líneas linfoides y células humanas normales.

V). OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1). Subclonar la región reguladora 5' no codificante del gen humano de TdT.
- 2). Analizar los elementos reguladores presentes en la región reguladora 5' no codificante del gen humano de TdT.
- 3). Identificar la formación de complejos DNA/proteína que correspondan a miembros de la familia AP-1 y que puedan modular la expresión del gen humano de TdT.

VI). MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y REACTIVOS. A continuación se describen algunos de los reactivos empleados en el presente trabajo. El [gamma-³²P]-dATP (3000 Ci/mmol) fue comprado de Dupont-New England Nuclear. La enzima DNA polimerasa I fragmento klenow y los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) fueron obtenidos de Pharmacia Fine Chemical. El Ditioneitol (DTT) y PMSF fueron comprados de Gibco-BRL. El EDTA, EGTA, MgCl₂, glicerol, KCl, NaCl, y otros reactivos, fueron comprados de Sigma Chemical. La acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amonio y TEMED, fueron obtenidos de BIO-RAD. Las enzimas T4 DNA polinucleótido cinasa, T4 DNA ligasa y otras enzimas de restricción como Bam HI, Rsa I, Acc I, Eco RI, Pst I; fueron obtenidas de Gibco-BRL. El poli d-dC fue comprado de Pharmacia. La enzima Taq DNA polimerasa fue adquirida de Perkin Elmer. Los restantes reactivos no citados fueron adquiridos de la más alta calidad, ultrapuros o de aplicación en biología molecular para la realización de los experimentos correspondientes.

CELULAS. Las líneas celulares empleadas en éste trabajo fueron: Las células "DND41" que es una línea de células linfoblastoide humana de estirpe T de LLA, fue proporcionada por el Dr. Tak W. Mak (Instituto del Cáncer, Universidad de Toronto, Canadá). Las células "HYON" que es una línea de células pre-B de LLA, fue obsequiada por la Dra. M. Letarte (División de Inmunología, Hospital del Niño Enfermo, Toronto, Canadá). La línea de células de leucemia promielocítica "HL-60" fue donada por el Dr. M Freedman (División de Hematología, Hospital del Niño Enfermo, Toronto, Canadá). Las células "HeLa", que es una línea celular de cáncer cérvico uterino infectadas con HPV-18, fueron proporcionadas por el Dr. A. García Carrancá (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México). Las tonsilas y los timos humanos, fueron obtenidos del área de cirugía del Instituto Nacional de la Nutrición. Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron a partir de individuos adultos sanos del Instituto Nacional de Salud Pública. Las células

normales y las líneas celulares fueron separados por centrifugación en gradiente por Ficoll-Hypaque y mantenidas en medio RPMI 1640 o en medio DMEM, suplementados con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio, L-glutamina, antibiotico-antimicótico, y en una atmósfera de 5% de CO₂, a 37 °C; a una densidad celular de 2.5 a 5 x 10⁶ células/ml.

AISLAMIENTO DE RNA Y ANALISIS MEDIANTE NORTHERN BLOT.

El RNA total de las líneas celulares y de las células normales, bajo las diferentes condiciones experimentales, se aisló con isotiocianato de guanidinio de acuerdo a Chomczynsky et al (51). El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Beckman DU-40. 10 ug del RNA se separaron por electroforesis en condiciones de desnaturalización en gel de agarosa al 0.9% y formaldehído 0.66 M de acuerdo a Lehrach et al (52). La integridad del RNA se determinó por la presencia de las dos bandas distintivas del RNA ribosomal 18S y 28S, que se visualizaron con luz ultravioleta en los geles teñidos con bromuro de etidio, y se midió por densidad óptica la concentración de cantidades iguales de RNA para cada una de las condiciones experimentales. Se realizó la transferencia a membranas de nylon según lo describe Thomas et al (53). Las membranas se secaron a temperatura ambiente y se homearon al vacío a 80 °C por 1 hr. A continuación, las membranas se prehibridaron durante toda la noche a 42 °C en formamida 50%, SSC 4X (1X SSC = 0.15M NaCl y 0.015M citrato de sodio, pH 7.0), solución de Denhart 5X (1X de solución Denhart = 200 ug/ml Ficoll, 200 ug/ml polivinilpirrolidina y 200 ug/ml albúmina de suero bovino fracción V), fosfato de sodio 50 mM pH 6.5, SDS 1% y 200 ug/ml DNA desnaturalizado de esperma de arenque. La hibridación se realizó por 16 hr a 42 °C en la misma solución con la adición de las sondas de cDNA de C-fos, C-jun, SRF (Serum response factor), y β-actina; marcadas con [alfa-³²P]-dCTP con hexámeros de deoxi oligonucleótidos como iniciadores aleatorios (random primer) y la DNA

polimerasa I fragmento Klenow. Las membranas se lavaron por 2 hr con 3 cambios de SSC 0.1X, 50 mM fosfato de sodio pH 6.5 y 1% SDS a 68 °C; y se expusieron a películas radiográficas a -70 °C con pantalla intensificadora durante 24 hr.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó de acuerdo al método descrito por Mullis (54) y se usó para amplificar la región reguladora 5' no codificante del gen de TdT. 10 ug de DNA de timocitos humanos (20 ul) fue colocado en 200 ul de una solución que contiene 10 mM de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 30 pmoles de los oligonucleótidos que delimitan la región reguladora basal 5' de TdT, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂ y 100 ul de aceite mineral. La mezcla fue calentada a 94 °C por 90 segundos antes de adicionar 5 U de Taq DNA polimerasa. Para amplificar la secuencia de DNA de interés se usaron 35 ciclos con las siguientes condiciones: 1.5 min a 94 °C para desnaturalizar el DNA de doble cadena, 2 min a 67 °C para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos al molde; y 3 min a 72 °C para la reacción de polimerización. Se diseñaron y sintetizaron los oligonucleótidos 5' y 3' de la región reguladora basal 5' del gen de TdT, con extremos de reconocimiento para Bam HI, en el sintetizador de oligonucleótidos "Applied Biosystems DNA Synthetizer" del Instituto Nacional de Salud Pública. El oligonucleótido 5' corresponde de la región -600 a -580 y se nombró como oligonucleótido 1 (Oligonucleótido 1: 5'-GGATCCGGAGCAGTTAGAAGCAACAGAGC-3'). El oligonucleótido 3' corresponde de la region de -21 a -1 y se nombró oligonucleótido 2 (Oligonucleótido 2.: 5'-GGATCCGGGAAGAGGCTGCTGCTGCC-3'). Las secuencias marcadas corresponden al sitio de reconocimiento por la enzima Bam HI. El producto de amplificación por PCR fue un fragmento de DNA de 600 pb que se verificó exponiendo a luz ultravioleta un gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio. La secuencia de éste fragmento correspondió a la secuencia originalmente reportada (33).

OLIGONUCLEOTIDOS: AP-1 CONSENSO Y AP-1-TdT. La síntesis de los oligonucleótidos de doble cadena de DNA para el elemento regulador AP-1 consenso (denominado aquí como AP-1Cons) y para la secuencia que comprende el elemento regulador similar a AP-1 presente en la región reguladora basal 5' del gen de TdT (denominado aquí como AP-1-TdT), se realizó con el equipo de "DNA Synthetizer Applied Biosystems". Las secuencias de los oligonucleótidos AP-1Cons fueron: Oligonucleótido 5' 5'-TCCTTCGTCAGTCAGCGGGA-3' y oligonucleótido 3' 5'-TCCCGTGACTGACGGAAGGA-3'. Las secuencias de los oligonucleótidos AP-1-TdT fueron: Oligonucleótido 5' 5'-AAGGGCCTCAGTACATTTAG-3' y oligonucleótido 3' 5'-GTAAATGTACTGAGGCCCTT-3'. Las secuencias marcadas indican el sitio de reconocimiento por el factor transcripcional AP-1 en el oligonucleótido AP-1Cons, y en el oligonucleótido AP-1-TdT la secuencia que es similar a AP-1 (55).

ESTRATEGIA DE CLONACION. Las construcciones generadas en éste trabajo fueron derivadas de los vectores de clonación pBR322 y de expresión pBLCAT2. El fragmento de DNA de 600 pb limitado con extremos Bam HI, (producto de amplificación de PCR), fue clonado en el vector pBluescript para generar la construcción pBluesTdT. Con ésta construcción se transformaron bacteria *E. coli* de la cepa DH5- α y las colonias eficientemente transformadas fueron seleccionadas por crecimiento en medio sólido que contiene IPTG (análogo de lactosa y desreprime la expresión de *lacZ*) y el cromógeno X-gal (que es hidrolizado por la actividad de β -galactosidasa). El fragmento de DNA de 600 pb fue insertado en el sitio Bam HI dentro del gen *lacZ* de pBluescript, por lo que las bacterias transformadas crecieron en el medio sólido formando colonias blancas. La presencia del plásmido se confirmó por la realización de minipreparaciones. Las colonias blancas positivas fueron crecidas a gran escala en medio líquido y se realizó la extracción de plásmidos (56). El inserto de DNA de 600 pb se aisló de pBluesTdT mediante

digestión enzimática con Bam HI y la secuencia del mismo fue verificada por secuenciación por el método de Sanger (57). Por otra parte, el mismo fragmento de DNA de 600 pb fue insertado en el vector pBLCAT2 en el sitio Bam HI y se generó la construcción pBLCATdT. Los procedimientos de clonación y aislamiento de plásmido fueron los mismo que para la construcción pBluesdTdT (FIGURA 2).

PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES. Los extractos nucleares fueron preparados de acuerdo al método de Dignam (58), a partir de células que expresan y que no expresan el gen de TdT, y de células HeLa. Las células en cultivo se lavaron con PBS pH 7.2 (1X de PBS = 2.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, y 138 mM NaCl), y se colectaron por centrifugación a 4 °C por 15 min en 5 ml de buffer de lisis "A" que contiene 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF y 4 mg/ml de inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina y pepstatina). Posteriormente se agregaron 500 ul de una solución al 10% NP-40 y se agitó vigorosamente por 10 segundos. Después la fracción nuclear se separó por centrifugación a 14 000 rpm durante 30 seg. El precipitado se resuspendió en 5 ml del buffer de lisis "C" que contiene 20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 4 mg/ml de inhibidores de proteasas. El homogeneizado se mantuvo en agitación constante por 15 min., se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min y se colectó el sobrenadante que contenía las proteínas nucleares. Se cuantificó la concentración de proteínas de acuerdo al método de Bradford (59). Los extractos nucleares se congelaron en alícuotas separadas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

EXPERIMENTOS DE ELECTROFORESIS CON MOVILIDAD RETARDADA (EMSA). Los experimentos de unión de proteínas al DNA y de electroforesis

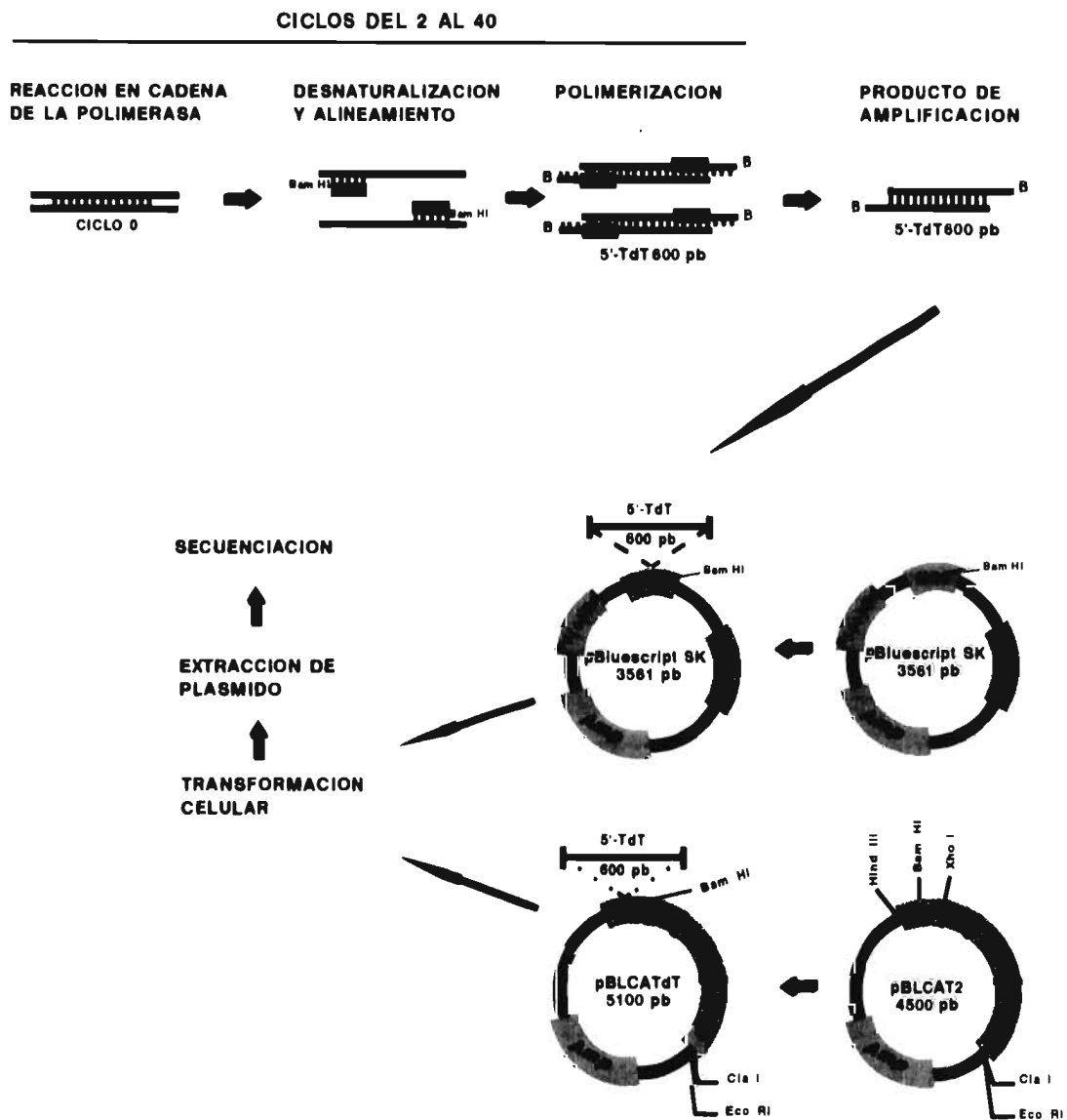


FIGURA 2. Estrategia de clonacion de la region reguladora 5' del gen humano de TdT

con movilidad retardada (electrophoresis mobility shifting assay "EMSA"), son una adecuada estrategia para el análisis de interacciones DNA/proteínas. Los EMSA fueron realizados como previamente se reportó (60) Se analizó el mapa de restricción del fragmento de DNA de 600 pb y se generaron tres subfragmentos por digestión enzimática con Rsa I. El subfragmento I comprendió de las bases -600 a -434 con un tamaño de 166 pb; el subfragmento II comprendió de -434 a -340 con un tamaño de 94 pb; y el subfragmento III comprendió de -340 a -1 con un tamaño de 340 pb. Además, se generaron dos subfragmentos por digestión con Acc I. El subfragmento A que comprendió de -1 a -397 con un tamaño de 397 pb y el subfragmento B que comprendió de -398 a -600 con un tamaño de 203 pb. Los subfragmentos I, II, III, A y B de la región reguladora 5' del gen humano de TdT, previamente defosforilados por tratamiento con fosfatasa alcalina, fueron marcados radiativamente por incorporación de [gamma-³²P]-dATP en el extremo 5'-PO₄, usando la T4 DNA polinucleótido cinasa. Los oligonucleótidos AP-1Cons y AP-1-TdT fueron de igual manera marcados radiativamente con la misma estrategia. Los subfragmentos I, II y III fueron incubados con 5 ug de extractos nucleares de células que expresan y que no expresan el gen de TdT. Mientras que los subfragmentos A y B, así como los oligonucleótidos, fueron incubados con 5 ug de extractos nucleares de células HeLa. La reacción de unión de proteínas nucleares al DNA se realizó con buffer de unión que contiene 20 mM HEPES pH 7.9, 4 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5% glicerol y 200 ng/ul poli dI-dC. Esta mezcla de reacción se incubó en hielo por 15 min. A continuación, los complejos DNA/proteína fueron identificados por electroforesis en gel de poliacrilimida al 6% con bajas concentraciones iónicas de buffer TBE que contiene 6 mM Tris-HCl pH 7.5, 3.3 mM acetato de sodio y 1 mM EDTA. Los geles fueron pre-corridos por 30 min a 200 Volts y las electroforesis se realizaron a 300 volts por 2 hr a 4 °C con re-circulación de buffer TBE. Los geles fueron secados y expuestos a películas radiográficas con pantalla intensificadora a -70 °C durante 24 hr. Las autorradiografías se

analizaron en un densitómetro laser BIO-RAD modelo GS-700 para determinar los niveles de especificidad.

VII). RESULTADOS

ANALISIS DE LA EXPRESION DEL RNAm DE C-FOS Y C-JUN INDUCIDOS POR ACTIVACION DE PKC EN CELULAS LINFOIDES HUMANAS.

Estímulos externos como hormonas, factores de crecimiento y de diferenciación; regulan la expresión de los genes mediante la unión de estos a sus respectivos receptores, los cuales generan una cascada de eventos de transducción de señal que tiene efecto en el nivel de expresión de los genes involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Con la estimulación del TcR se activan dos vías de transducción de señal: la del PIP2 y la de tirosina cinasa. Esta estimulación induce un rápido, largo y sostenido aumento de $[Ca^{2+}]_i$, así como la activación de PKC (61). Estos eventos se han reportado en diferentes tipos celulares como respuesta a la estimulación de receptores (62). Al comienzo de la estimulación, se induce la activación de PLC la cual hidroliza al fosfolípido de membrana PIP2 y genera los segundos mensajeros IP3 y DAG (63). Estos segundos mensajeros son los responsables directos del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la activación de PKC, respectivamente. Existen evidencias que apoyan el hecho de que los ésteres de forbol (TPA) y los ionóforos de calcio (ionomicina) son capaces de mimetizar las señales celulares correspondientes a la activación de PKC y al aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (10). Estos eventos de transducción de señal concluyen finalmente en la activación o represión transcripcional de muchos genes. Entre los genes que son activados por estos eventos, se encuentran los que codifican para las proteínas Fos y Jun; y que constituyen los principales componentes del factor transcripcional AP-1.

Con el fin de demostrar que c-fos y c-jun son inducidos por la activación de la PKC, en la FIGURA 3 se observa el efecto sobre los niveles de expresión del RNAm de c-fos y c-jun de linfocitos estimulados con TPA e ionomicina. Como puede apreciarse, la expresión del RNAm tanto

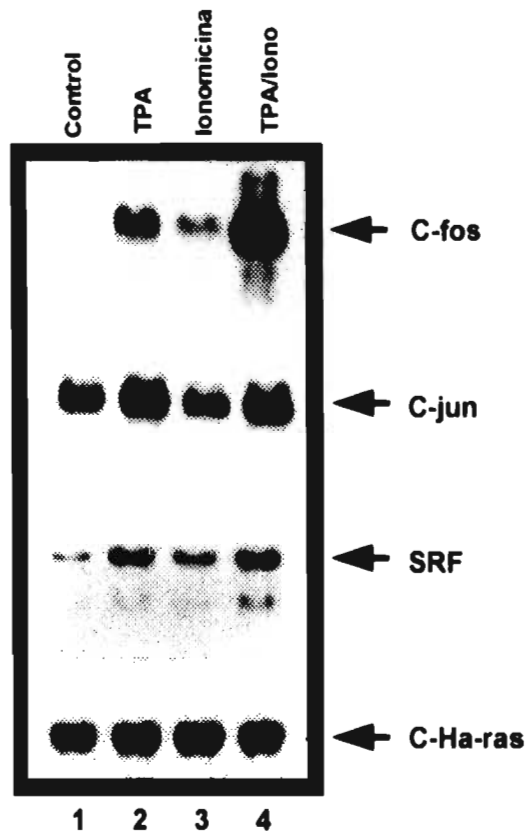


FIGURA 3. ANALISIS POR NORTHERN BLOT DE C-FOS Y C-JUN INDUCIDOS POR ACTIVACION DE PKC. Las células linfoides fueron incubadas por 4 hr en ausencia (carril 1), o presencia de TPA (carril 2), de ionomicina (carril 3), y la combinación de TPA/ionomicina (carril 4). El RNA se aisló y se hibridó con las sondas correspondientes como se indica en materiales y métodos.

para c-fos como para c-jun se incrementa con el tratamiento con TPA, mientras que la acción de la ionomicina tiene poco o ningún efecto sobre la expresión del RNAm de estos mismos genes. Sin embargo, al realizar el tratamiento simultáneo con TPA/ionomicina, se observó que los niveles del RNAm aumentan substancialmente en comparación con el nivel de expresión basal. A manera de un control positivo, se observó que el nivel de expresión del RNAm de SRF (serum response factor) aumenta al realizar la estimulación de las células con TPA y con ionomicina. C-Ha-ras se utilizó como control interno, ya que éste gen se expresa de manera constitutiva en las células. Nosotros concluimos de estos datos que la expresión de los genes que codifican para la proteínas del complejo AP-1 (c-fos y c-jun) son regulados positivamente por la activación de PKC a través de la cascada de eventos de fosforilación, en respuesta al estímulo de PLC y la generación de IP3 y DAG. Estos resultados corroboran que la activación de PKC induce la expresión de los miembros de la familia de proteínas AP-1, evidencia previamente demostrada en fibroblastos (55). A continuación, nos propusimos analizar si los elementos reguladores AP-1 (sitio donde se unen Fos y Jun), así como los factores transcripcionales AP-1; tienen alguna función en la regulación de la expresión génica de TdT.

INTERACCIONES DNA/PROTEINA EN LA REGION REGULADORA 5' DEL GEN HUMANO DE TdT CON EXTRACTOS NUCLEARES DE CELULAS LEUCEMICAS Y CELULAS LINFOIDES HUMANAS. A partir de la obtención de la secuencia completa del gen humano de TdT (34); se clonó la región reguladora basal 5', utilizando los oligonucleótidos con extremos Bam HI que delimitan ésta región. De la amplificación por PCR, se obtuvo el fragmento de DNA esperado de 600 pb (FIGURA 4). Este fragmento fue clonado en el sitio Bam HI del vector pBluescript para generar la construcción pBluesTdT (FIGURA 5) con la que se transformaron bacterias y se obtuvieron tres clones positivas llamadas TdT12, TdT35 y TdT45.

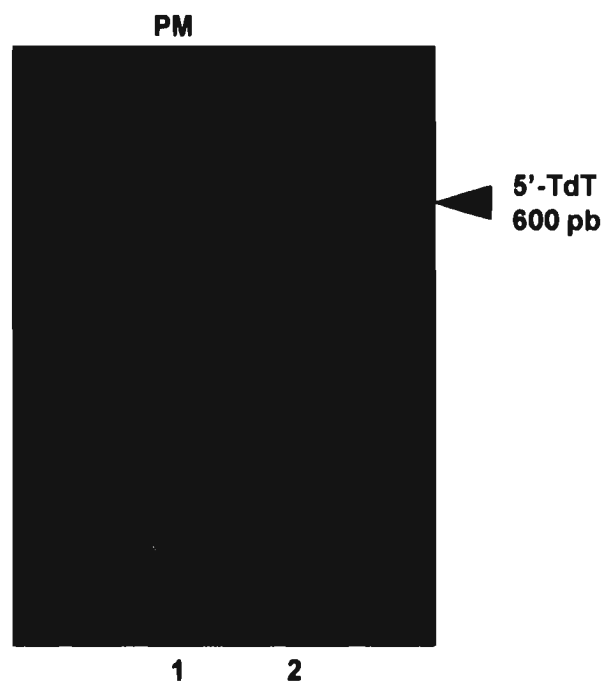


FIGURA 4. ANALISIS EN GEL DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACION POR PCR DE LA REGION REGULADORA DEL GEN HUMANO DE TdT. Se realizó la amplificación por PCR de la región reguladora 5' del gen humano de TdT, utilizando los oligonucleótidos 5' y 3' que delimitan ésta secuencia. El producto esperado de PCR tiene un peso de 600 pb. PM indica el marcador de peso molecular ϕ X174/Hae III.

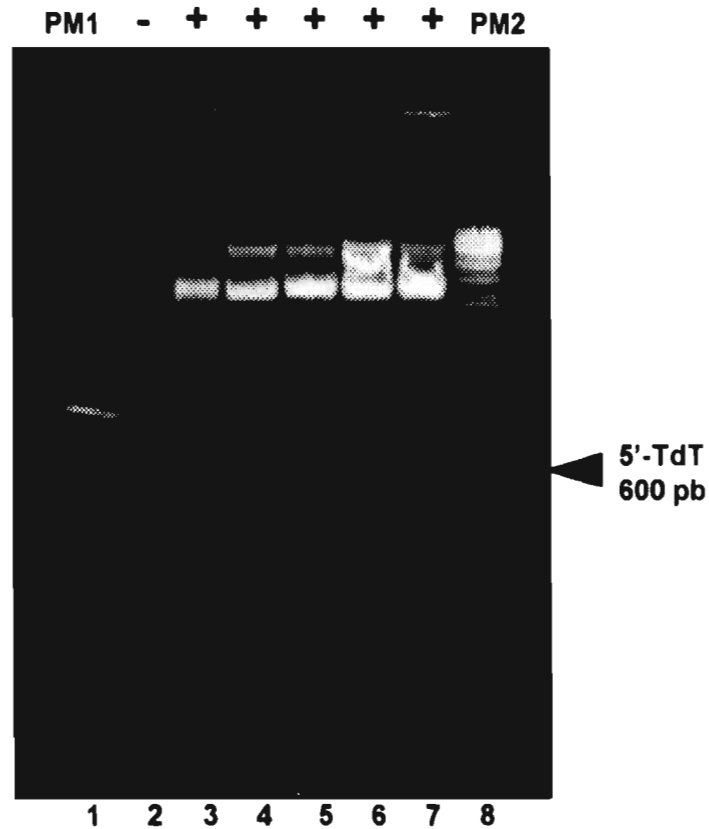


FIGURA 5. ANALISIS DE DISTINTAS CLONAS TRANSFORMADAS CON LA CONSTRUCCION pBluesTdT. A partir de la extracción de plásmido, se aisló la construcción pBluesTdT y se incubó en ausencia (carril 2, -) o presencia (carriles 3, 4, 5, 6, 7, +) de Bam HI, y se verificó la presencia del inserto de 600 pb que corresponde a la región 5' del gen humano de TdT, previamente amplificado por PCR. PM1 corresponde al marcador de peso molecular ϕ X174/Hae III y PM2 indica el marcador de peso molecular λ /Hind III.

Se realizó la extracción de plásmido y se verificó la presencia de la construcción pBluesTdT. Un procedimiento similar de clonación se realizó para generar la construcción pBLCATdT (FIGURA 6). Además se realizó la secuenciación del inserto de 600 pb de la clona TdT12 por el método de Sanger (55) y ésta fue idéntica a la secuencia previamente reportada (34), y de ésta manera tuvimos la certeza de que efectivamente estamos trabajando con un fragmento de DNA que correspondía a la región reguladora del gen de TdT

A continuación se realizó la digestión con la enzima Rsa I del fragmento de 600 pb y se generaron tres subfragmentos: el subfragmento I con 166 pb correspondió del sitio -600 al -435; el subfragmento II con 94 pb comprendió del sitio -434 al -340; y el subfragmento III con 340 pb correspondió del sitio -340 al -1. Estos subfragmentos fueron marcados con [gamma-³²P]-dATP e incubados en presencia de extractos nucleares de células que expresan y que no expresan el gen de TdT y se analizó el patrón de migración electroforética por EMSA. Por ésta estrategia se identificó la formación de dos complejos DNA/proteína que se formaron en el subfragmento III y que aparecieron de manera distinta en función de la naturaleza de los extractos nucleares que se utilizaron (FIGURA 7). También se realizaron los experimentos de EMSA para los subfragmentos I y II para probar su habilidad de interacción con proteínas nucleares, pero no fue posible identificar la formación de complejos DNA/proteína similares a los identificados en el subfragmento III. No obstante, se observó la formación de posibles complejos DNA/proteína en la parte inferior (y superior para el subfragmento II) del gel, los cuales se formaron de manera homogénea cuando se utilizaron los diferentes extractos nucleares. Estos supuestos complejos que se formaron en los subfragmentos I y II no fueron tema de estudio para éste trabajo, ya que la formación de los mismos se presenta para todos los tipos celulares aquí estudiados y no muestran diferencias en células que expresan y que no expresan el gen de TdT. Sin embargo, no se descarta una posible

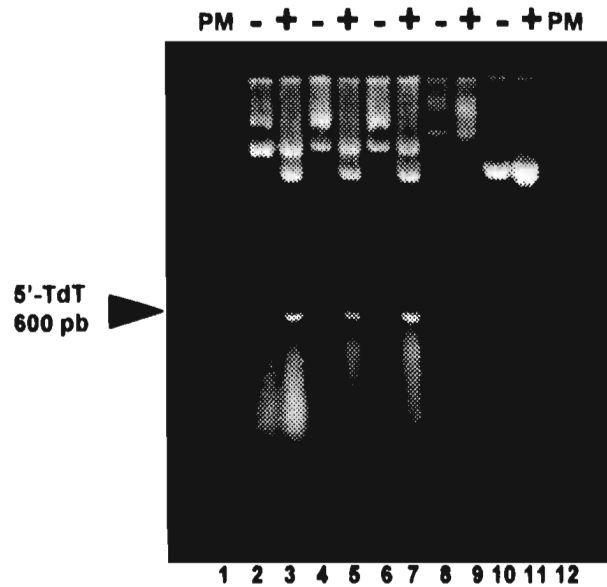


FIGURA 6. ANALISIS DE DISTINTAS CLONAS TRANSFORMADAS CON LA CONSTRUCCION pBLCATdT. A partir de la extracción de plásmido, se aisló la construcción pBLCATdT y se incubó en ausencia (carriles 2, 4, 6, 8, 10, -) y presencia (carrile 3, 5, 7, 9, 11, +) de Bam HI, y se verificó la presencia del inserto de 600 pb que corresponde a la región reguladora 5' del gen humano de TdT, previamente amplificada por PCR. PM indica el marcador de peso molecular ϕ X174/Hae III.

función que puedan tener en el contexto de regulación de la expresión del gen de TdT. (**FIGURA 7, Fragmentos I y II**).

A diferencia de los complejos formados en los subfragmentos I y II, se observó que los dos complejos DNA/proteína identificados en el subfragmento III se formaron cuando se utilizaron los extractos nucleares de las células que no expresan el gen de TdT (HL-60, células tonsilares y linfocitos T y B), y se pudo apreciar la formación de un solo complejo cuando se utilizaron extractos nucleares de células que sí expresan el gen de TdT (DND41, HYON, células de timo) (**FIGURA 7, Fragmento III**). Aunque con los extractos de células de timo se observó la formación de los dos complejos DNA/proteína identificados para células que no expresan TdT, cabe hacer la aclaración que en éste tipo celular existen poblaciones heterogéneas de linfocitos y que por lo tanto se pueden encontrar células que expresan y no el gen de TdT. El patrón de formación de complejos DNA/proteína en el subfragmento III, nos llamó la atención por el hecho de que cuando se utilizaron los extractos nucleares de las células que no expresan el gen de TdT aparecen los dos complejos, y únicamente aparece uno de ellos cuando se utilizaron los extractos de células que sí expresan TdT. Con estos datos, concluimos que la formación de estos complejos de DNA/proteína en el subfragmento III de 340 pb, sugiere la presencia de proteínas reguladoras (factores transcripcionales) que reconocen secuencias específicas en el DNA y que por el hecho de estar presentes en las células que no expresan TdT, pueden tener alguna función de regulación transcripcional negativa.

INTERACCIONES DNA/PROTEINA EN LA REGION REGULADORA 5' DEL GEN HUMANO DE TdT CON EXTRACTOS NUCLEARES DE CELULAS HeLa. El análisis por computadora de la región reguladora 5' del gen humano de TdT, reveló que en la región que corresponde al promotor basal de éste gen (primeros 400 nucleótidos antes del

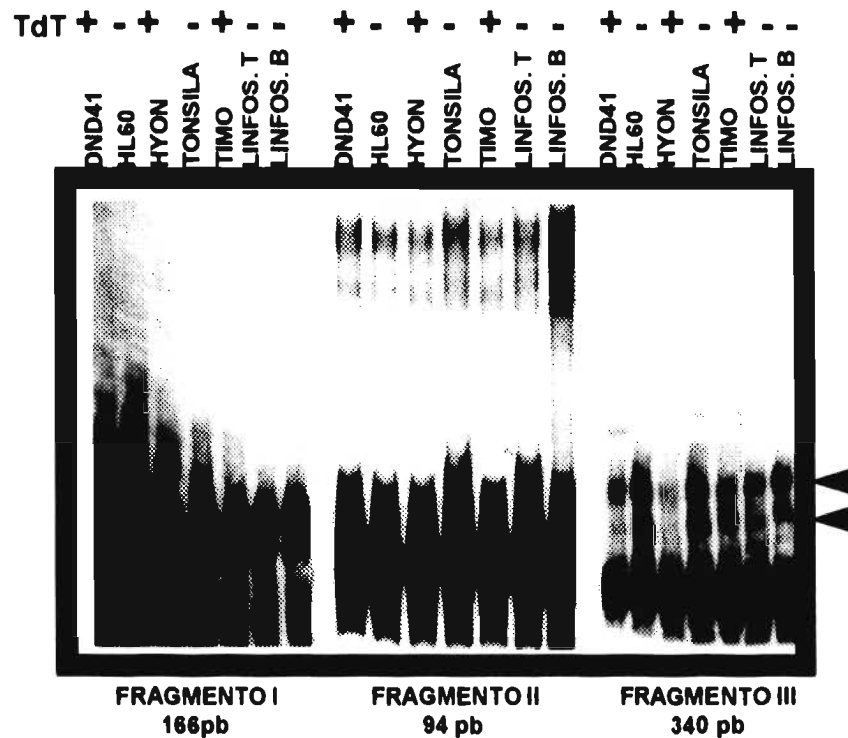


FIGURA 7. ANALISIS POR EMSA DE LA REGION REGULADORA 5' DEL GEN DE TdT CON EXTRACTOS NUCLEARES DE CELULAS HUMANAS NORMALES Y LEUCEMICAS. Los subfragmentos I, II y III de la región reguladora 5' del gen humano de TdT, generados por digestión con Rsa I, fueron marcados radioactivamente e incubados con los diferentes extractos nucleares de células leucémicas T (DND41), células mieloides (HL60), células pre-B (HYON), timocitos, células de tonsilas, linfocitos T y linfocitos B. Las flechas indican los complejos DNA/proteína.

sitio de inicio de la transcripción), se encuentran varios elementos reguladores similares a AP-1, los cuales comparten una alta homología con las secuencias consenso AP-1 ya reportadas. Para interpretar la función de éstos elementos similares a AP-1 presentes en la región reguladora de TdT, se diseñó la siguiente estrategia. A partir de la obtención de la secuencia completa del gen humano de TdT (34); se clonó la región reguladora basal 5' por PCR y se obtuvo el fragmento de DNA esperado de 600 pb (FIGURA 4). A continuación se realizó la digestión de éste fragmento con la enzima Acc I y se generaron dos subfragmentos: el subfragmento A con 397 pb que correspondió del sitio -1 al -397 donde se encuentran los elementos similares a AP-1; y el subfragmento B con 203 pb que correspondió del sitio -.398 al -600. Estos subfragmentos fueron marcados con [γ - 32 P]-dATP e incubados en presencia de extractos nucleares de células HeLa, como fuente rica de proteínas nucleares AP-1; y se analizó el patrón de desplazamiento electroforético por EMSA. Mediante ésta estrategia se identificó la formación de un complejo de retardamiento que correspondió a complejos DNA/proteína presentes en el subfragmento A. (FIGURA 8A). Así mismo se realizaron los experimentos de EMSA para el subfragmento B, para probar su habilidad de interacción con proteínas nucleares, y de igual manera se apreció la formación de un complejo de DNA/proteína, sin embargo; al realizar la competencia inespecífica con el competidor poli dI-dC, observamos que la formación del complejo en el subfragmento B se compitió de manera parcial a concentraciones mayores de 1600 ng de poli dI-dC, lo que sugirió la formación de complejos inespecíficos para el subfragmento B. Estas observaciones se fortalecieron por el análisis densitométrico que se realizó a éste complejo de DNA/proteína en las condiciones de competencia antes descritas (FIGURA 8B). Los datos de densitometría fueron comparados con el complejo formado en el subfragmento A de 397 pb, de igual manera en condiciones de competencia con poli dI-dC; en donde el complejo de retardamiento permaneció aún con las condiciones de competencia (FIGURA 8, carriles 7 a 12. FIGURA 8B). Con estos

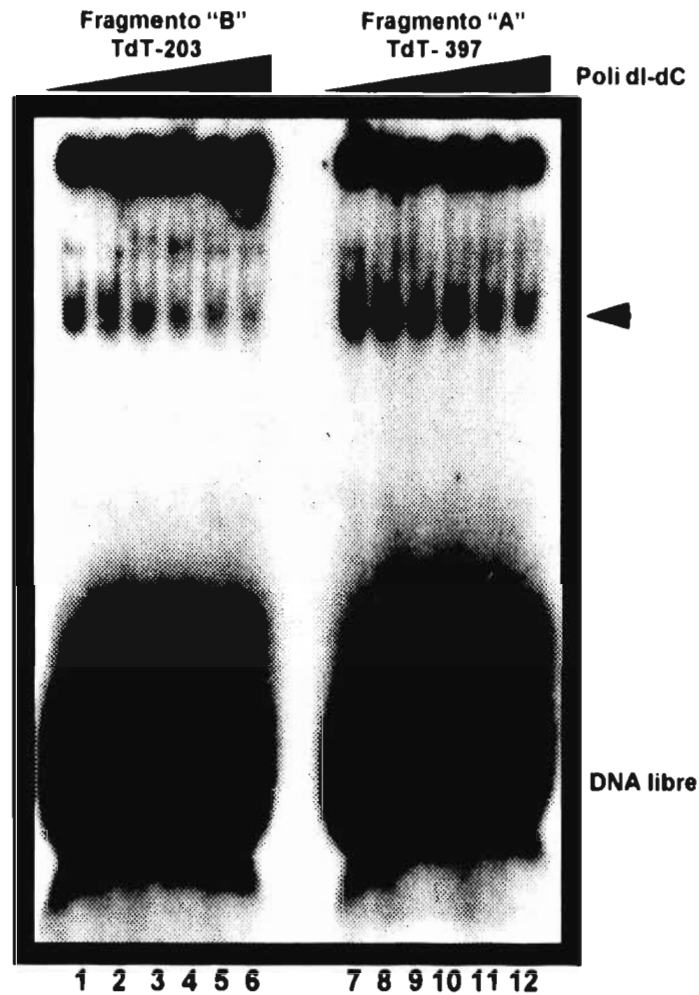


FIGURA 8A. ANALISIS POR EMSA DE LA REGION REGULADORA 5' DEL GEN DE TdT CON EXTRACTOS NUCLEARES DE CELULAS HeLa. Los fragmentos A y B de la región reguladora 5' del gen humano de TdT, generados por digestión con Acc I, fueron marcados radioactivamente e incubados con extractos nucleares de células HeLa. A continuación se realizó el análisis por EMSA. La flecha indica la formación del complejo DNA/proteína. TdT-203 corresponde al fragmento de 203 pb (carriles 1 a 6) y TdT-397 corresponde al fragmento de 397 pb (carriles 7 a 12).

DENSITOMETRIA DE EMSA DE COMPETENCIA INESPECIFICA
DE TdT-203 Y TdT-397

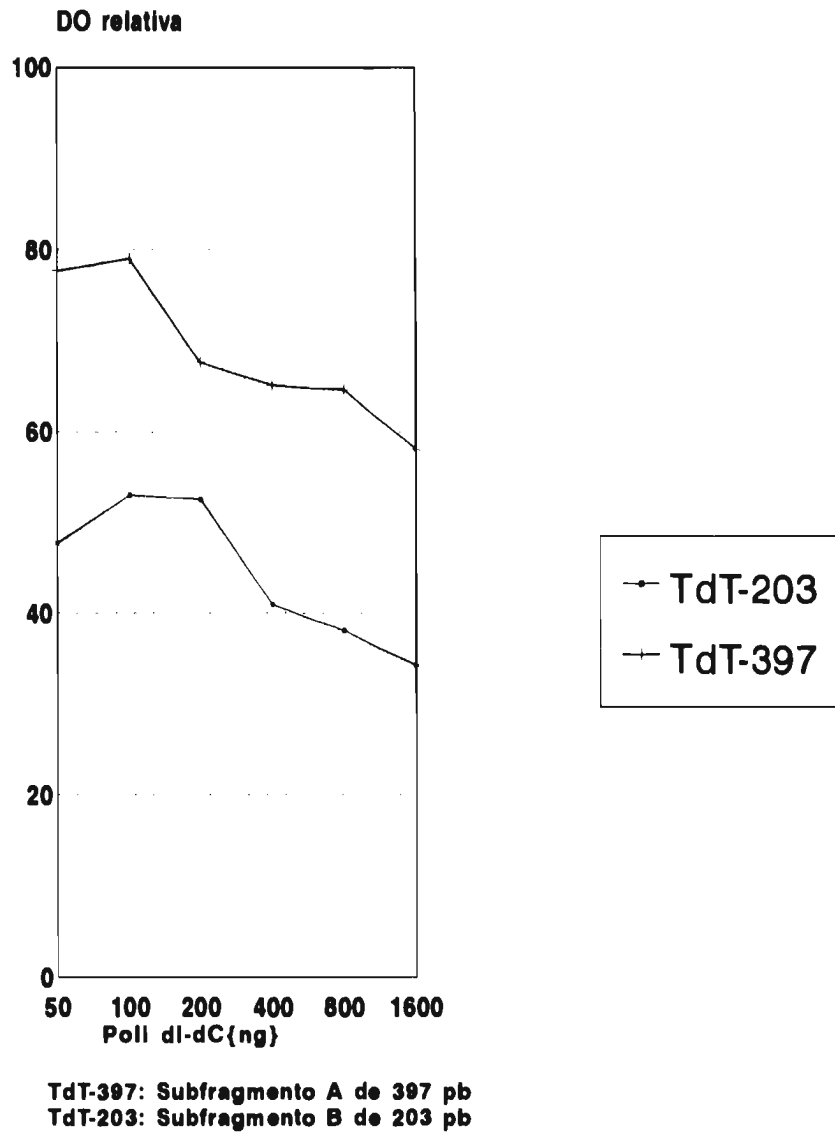
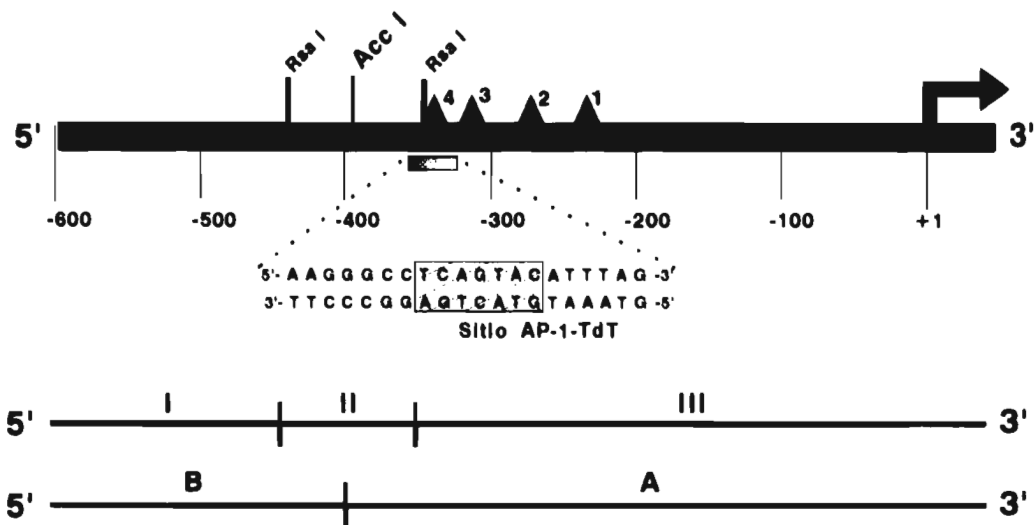


FIGURA 8B. Analisis densitometrico de EMSA de competencia inespecifica de los subfragmentos TdT-203 y TdT-397 pb.

datos, nosotros concluimos que existe una correlación entre el análisis por computadora de los elementos similares a AP-1 presentes en la región reguladora basal del gen humano de TdT y los hallazgos experimentales de EMSA en donde se identificó la formación de complejos DNA/proteína cuando se utilizaron una fuente rica en proteínas nucleares AP-1 y la región reguladora 5' del gen de TdT. Probablemente estas proteínas se unen a la secuencia donde se encuentran los elementos similares a AP-1.

ELEMENTOS SIMILARES A AP-1 PRESENTES EN LA REGION REGULADORA 5' DEL GEN DE TdT. Como se mencionó anteriormente, se conoce que el complejo proteínico Fos-Jun modula la expresión de muchos genes por interacción con elementos reguladores AP-1 presentes en la región no codificante 5' de la mayoría de los genes inducibles (64). Con base en el análisis por computadora de la región reguladora 5' del gen humano de TdT, se identificó que el subfragmento A tiene secuencias similares a sitios AP-1. Estas secuencias fueron denominadas como sitios AP-1-TdT (FIGURA 8 y 9). Además, como previamente se identificó por experimentos EMSA, existen proteínas que se unen de manera específica a éste subfragmento A de DNA. Para investigar la función de estos complejos DNA/proteína y la función de los elementos AP-1-TdT, se realizaron los experimentos de EMSA utilizando un oligonucleótido que aquí denominamos AP-1-TdT de 20 pb, que contiene una secuencia similar a AP-1, y que está ubicada en el subfragmento A (-351 a -332 ver métodos). (FIGURA 10). Además, simultáneamente se realizó el experimento de EMSA de un elemento regulador AP-1 consenso, utilizando un oligonucleótido que aquí denominamos AP-1Cons de 20 pb. Ambos oligonucleótidos fueron marcados radioactivamente con [gamma-³²P]-dATP e incubados en presencia de extractos nucleares de células HeLa. De estos experimentos de EMSA, se identificaron complejos de retardamiento de DNA/proteína con un patrón electroforético de AP-



SECUENCIA	SITIO	ORIENTACION	HOMOLOGIA ()
1). TGACTGT	-236/-230	5' → 3'	II, III (85)
2). TTACTCT	-284/-278	5' → 3'	II (85)
3). TGATGCT	-311/-305	5' → 3'	II (71)
4). TCAGTAC	-345/-339	5' → 3'	IV (71)

Secuencias consenso: I) TGACTCA. II) TGACTCT. III) TGACTGA.
IV) TCAGTCA.

FIGURA 9. Esquema de los elementos similares a AP-1 presentes en la region reguladora 5' del gen humano de TdT. Acc I y Rsa I representa los sitio de digestion. Se indica el oligo AP-1-TdT y los subfragmentos I, II, III, A y B.

1-TdT que fue similar al patrón de electroforesis de AP-1Cons (FIGURA 10, carriles 2 y 3). Estos complejos de retardamiento corresponden a complejos DNA/proteína. Para el oligonucleótido AP-1Cons, se observó la formación de varias bandas que podría suponerse que corresponden a complejos DNA/proteína, sin embargo, por experimentos de competencia que otros grupos han realizado para AP-1Cons (55), se ha demostrado que las diferentes bandas que se aprecian corresponden a interacciones inespecíficas y únicamente un complejo de éstos es el que corresponde a una interacción específica DNA/proteína. De igual manera, se aprecian varios complejos de retardamiento para AP-1-TdT, y para identificar cual de estos complejos es específico y cuales inespecíficos, se realizó los experimentos de competencia correspondientes para AP-1-TdT. Con estos hallazgos nosotros concluimos que tanto para AP-1-TdT como en AP-1Cons, se formaron los complejos de DNA/proteína los cuales tuvieron una migración electroforética muy similar y que podrían tratarse de proteínas muy semejantes de unión al DNA, lo cual sugiere que elementos AP-1 presentes en el fragmento de DNA de la región reguladora 5' de TdT, tienen una función importante en la expresión de éste gen.

ESPECIFICIDAD DE LOS ELEMENTOS SIMILARES A AP-1 DEL GEN

DE TdT. En los experimentos de electroforesis con movilidad retardada de AP-1-TdT, identificamos varios complejos DNA/proteína. En función de estas observaciones nos propusimos investigar cual de estos complejos DNA/proteína podrían ser interacciones inespecíficas y cual correspondería a complejo(s) específico(s), usando como competidor inespecífico poli dI-dC no marcado radioactivamente. Para identificar la especificidad de unión en la formación de estos complejos DNA/proteína en la secuencia AP-1-TdT, realizamos los experimentos de EMSA de competencia inespecífica y analizamos la especificidad de unión a AP-1-TdT con extractos nucleares de células HeLa *in vitro*. Se demostró que cuando se incrementó la concentración del

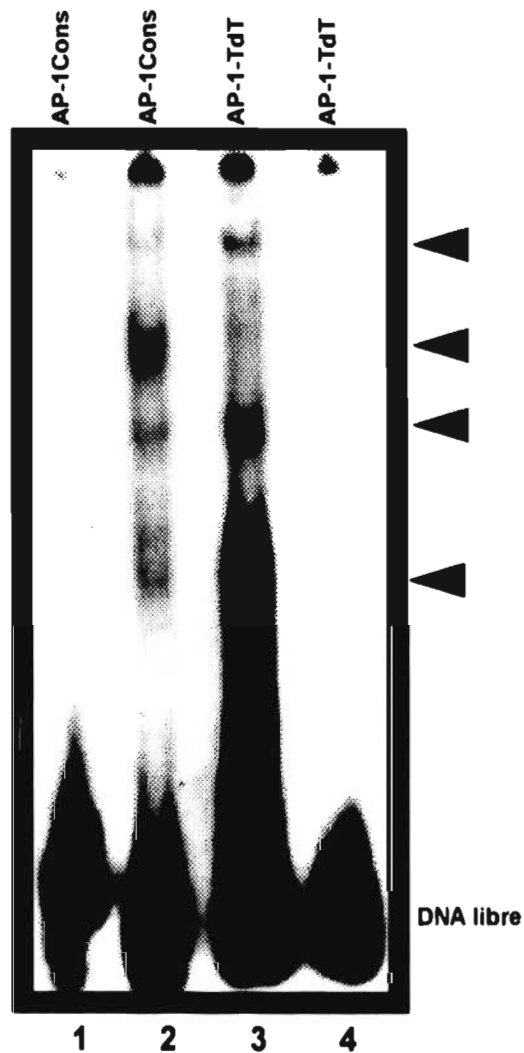


FIGURA 10. ANALISIS POR EMSA DE ELEMENTOS SIMILARES A AP-1 PRESENTES EN LA REGION REGULADORA 5' DEL GEN DE TdT. Un oligo de 20 pb que contiene una secuencia consenso AP-1 (AP-1Cons, carriles 1, 2) y un oligo de 20 pb que comprende la región reguladora 5' del gen humano de TdT (-351 a -332) que contiene un elemento similar a AP-1 (AP-1-TdT, carriles 3, 4) fueron marcados radioactivamente e incubados en ausencia (carriles 1, 4) y presencia (carriles 2, 3) de extractos nucleares de células HeLa para los experimentos de EMSA. Las flechas indican la formación de los complejos DNA/proteína.

competidor, los complejos inespecíficos con una migración electroforética más lenta, fueron competidos total y eficientemente (**FIGURA 11, parte superior del gel**). Aunque uno de los complejos (parte central de la figura 11), disminuye su formación y pegado al DNA a medida que aumenta la concentración de poli dI-dC, no desaparece totalmente sino por el contrario se mantiene a altas concentraciones del competidor inespecífico no marcado, lo cual sugiere que éste complejo puede ser específico para el gen de TdT. Para verificar que el complejo con una migración más rápida correspondió efectivamente al complejo específico de DNA/proteína de AP-1-TdT, se realizaron también los experimentos de EMSA de competencia, usando como competidor específico autólogo el propio oligonucleótido AP-1-TdT no marcado. En el análisis del EMSA de competencia específica (**FIGURA 12, parte central del gel**), identificamos que el complejo con migración más rápida previamente observado, decreció cuando la concentración de AP-1-TdT no marcado fue incrementada. Además se determinó que éste complejo fue totalmente eliminado cuando la concentración del competidor específico autólogo se incrementó por un exceso ambia de 2.2×10^{-5} M, lo que representa 100 veces más la concentración del oligonucleótido marcado. Con estos datos, nosotros concluimos que solo un complejo específico está involucrado en la formación del complejo DNA/proteína en el oligonucleótido AP-1-TdT. Este oligonucleótido comprende una secuencia muy similar a los elementos AP-1 consensos y al formar complejos con proteínas de extractos de células que son ricos en factores transcripcionales AP-1, suponemos por lo tanto que las proteínas que interactúan con el fragmento de DNA de TdT, probablemente pertenecen a la familia de proteínas AP-1.

EL ELEMENTO SIMILAR A AP-1 DEL GEN DE TdT ES COMPETIDO POR EL ELEMENTO REGULADOR AP-1 CONSENSO. Varios estudios han demostrado que una clase de proteínas de unión al DNA, relacionadas al factor transcripcional AP-

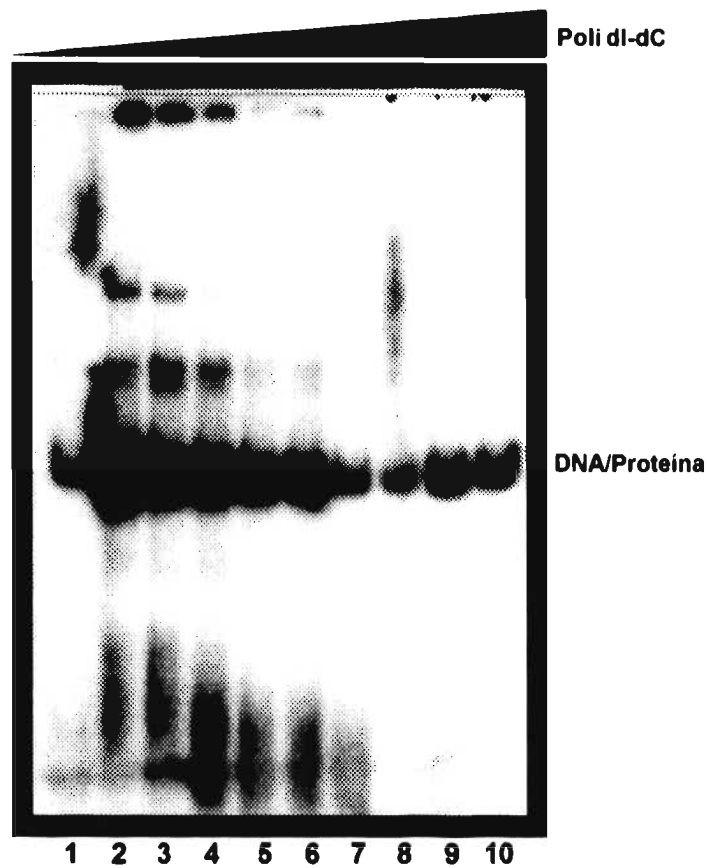


FIGURA11. ANALISIS POR EMSA DE COMPETENCIA INESPECIFICA DE AP-1-TdT. El oligo AP-1-TdT marcado radioactivamente fue incubado con extractos nucleares de células HeLa y con concentraciones crecientes del competidor inespecífico Poli dl-dC para los experimentos de EMSA, con las siguientes condiciones experimentales: Carril 1, sin extractos nucleares. Carriles 2 al 10, en presencia de extractos nucleares y con 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, y 2000 ng de Poli dl-dC.

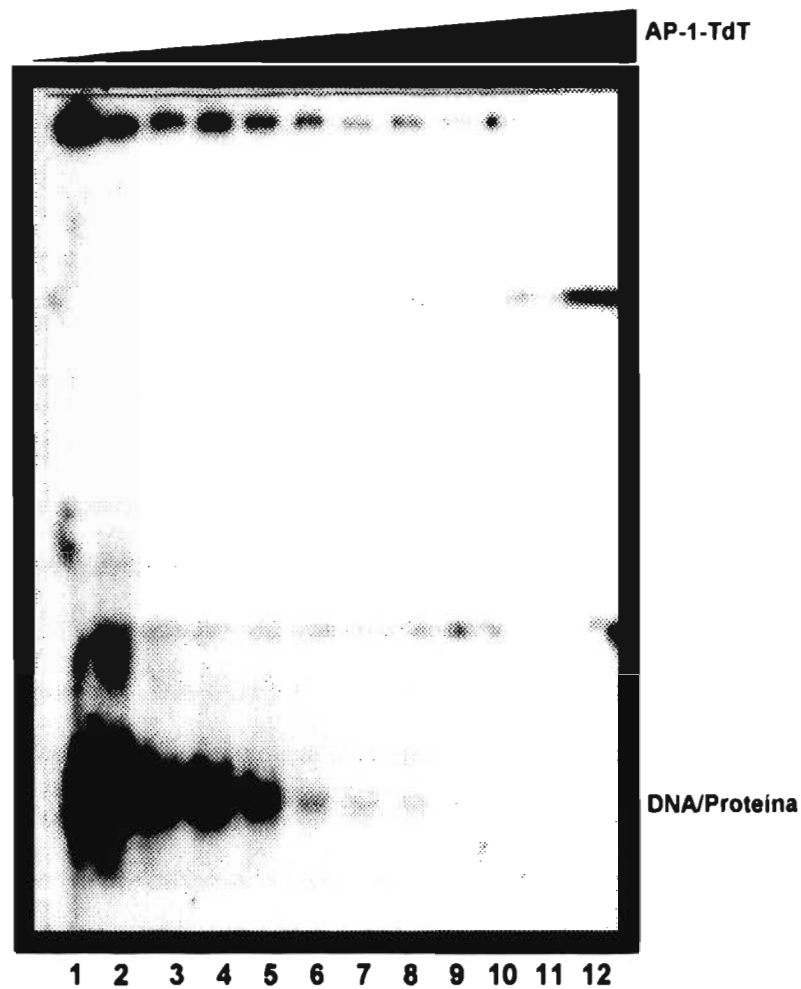


FIGURA 12. ANALISIS POR EMSA DE COMPETENCIA ESPECIFICA DE AP-1-TdT. El oligo AP-1-TdT marcado radioactivamente fue incubado con con extractos nucleares de células HeLa y con concentraciones crecientes del competidor autólogo específico AP-1-TdT. Las condiciones del EMSA fueron las siguientes: Carril 1, sin extractos nucleares. Carriles 2 al 12, en presencia de extractos nucleares y con 0, 5, 10, 50, 100, 200, 600, 800, 1000, 1500 y 3000 ng de AP-1-TdT no marcado.

1 (55), contiene varios miembros que tienen una función importante en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo de los linfocitos. Los miembros de la familia de proteínas AP-1 presentan un dominio el cual media la unión al DNA. Además, se ha reportado que varios genes de la familia de AP-1 codifican para factores transcripcionales específicos de secuencia (42). Un subgrupo de ésta familia de proteínas está involucrado en la regulación de muchos genes durante el desarrollo de los linfocitos. De la información anterior, nosotros nos cuestionamos si algún miembro de la familia de proteínas AP-1 pudiera estar participando en la formación del complejo específico DNA/proteína identificado en AP-1-TdT.

En los experimentos de electroforesis con movilidad retardada, las únicas secuencias similar entre AP-1Cons y AP-1-TdT fueron TCAGTCA y TCAGTAC respectivamente. Para demostrar que la secuencia presente en AP-1-TdT tiene o no afinidad por las mismas proteínas que interactúan con la secuencia de los elementos reguladores AP-1 consenso, se realizaron los experimentos de EMSA de competencia usando como competidor el oligonucleótido AP-1Cons no marcado radioactivamente, con extractos nucleares de células HeLa. Como se muestra en la FIGURA 13, carriles 3 y 4; se observó que el complejo específico que se formó cuando se utilizó AP-1-TdT con los extractos nucleares de las células HeLa, el complejo DNA/proteína desapareció, lo que significa que fue competida la interacción de las proteínas que participan en éste complejo, cuando se incubó previamente la reacción de unión con el competidor AP-1Cons no marcado. Con estos resultados concluimos que la misma proteína(s) (factores transcripcionales) participan en la formación del complejo específico DNA/proteína al interactuar con los oligonucleótidos AP-1Cons y AP-1-TdT. Además, existe la posibilidad de que estas proteínas correspondan a algún miembro de la familia de AP-1. Estos hallazgos sugieren que un elemento regulador de la familia de AP-1 y sus correspondiente(s) factor(es) transcripcional(es) pueden participar en los mecanismos moleculares de la regulación de la expresión del gen humano de TdT.

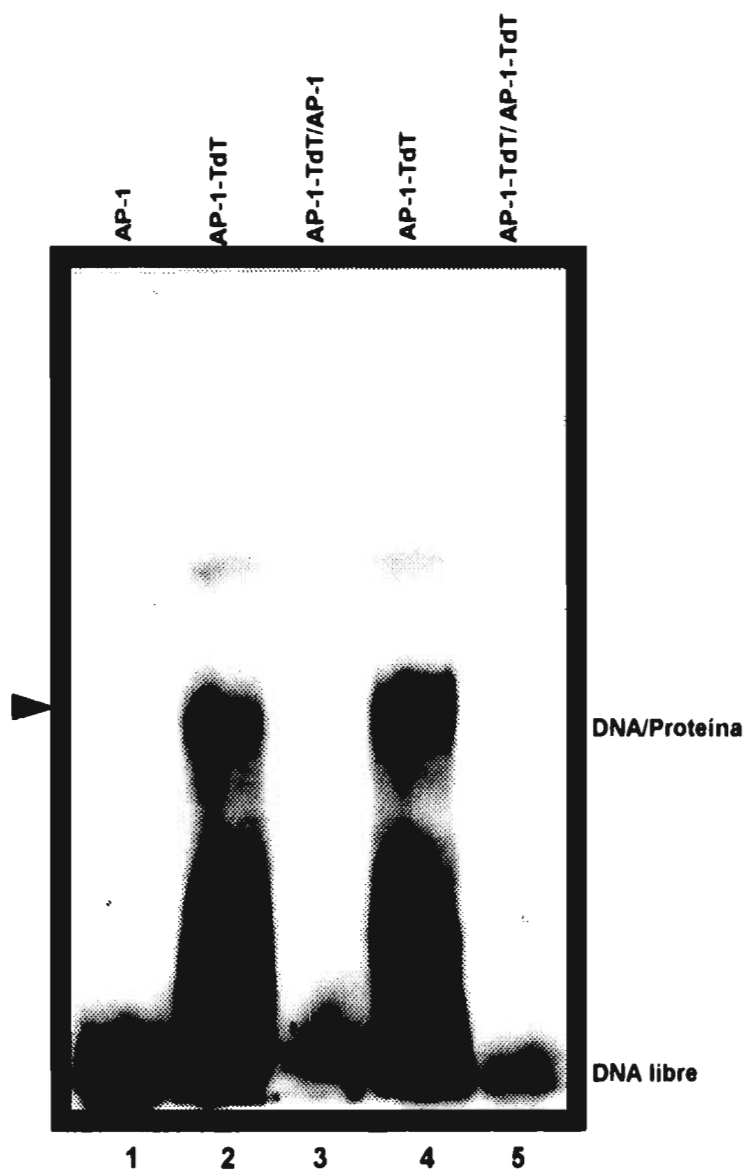


FIGURA 13. ANALISIS DE EMSA DE COMPETENCIA DE AP-1-TdT CON AP-1 CONSENSO. Las condiciones del EMSA fueron las siguientes: Se realizaron los experimentos de retardamiento para el oligo AP-1Cons en ausencia de extractos nucleares (carril 1) y para el oligo AP-1-TdT en presencia de extractos nucleares de células HeLa (carriles 2 y 4). Además se realizaron los respectivos EMSA de competencia con el oligo AP-1Cons (carril 3) y con el oligo AP-1-TdT (carril 5) no marcados. La flecha indica el complejo DNA/proteína.

VIII). DISCUSION

La regulación de la activación transcripcional es un mecanismo importante para el control de la expresión de genes. Los promotores que dirigen la transcripción de genes que son transcritos por la RNA polimerasa II, pueden dividirse en dos clases: Promotores que contienen secuencias TATA (65), y promotores que carecen de ellas pero que contienen elementos iniciadores (Inr) (34). Estos últimos son dependientes del reconocimiento de un solo sitio de inicio de la transcripción (66). Las excepciones de estas dos clases de promotores son aquellos que carecen de secuencias TATA y/o de elementos Inr, y que inician la transcripción en varios sitios (67). La mayoría de los promotores de eucariotes contienen una secuencia TATA la cual usualmente está localizada entre los nucleótidos -30 a -25 antes del sitio de inicio de la transcripción. Una proteína de unión a la secuencia TATA (TBP) y que comparte secuencias de reconocimiento con la RNA polimerasa II, así como otros factores activadores adicionales (TAFs) (66,68); dirigen la localización precisa del sitio de inicio de la transcripción de un gen. Además de los genes que contienen secuencias TATA, existen otros genes que son transcritos por la RNA polimerasa II y que carecen de secuencias TATA en la región reguladora (34). En diversos estudios se ha reportado que varios de los genes que no contienen secuencias TATA, contienen un elemento Inr ubicado en la región promotora y que comprende al sitio de inicio de la transcripción. El elemento Inr es responsable para la especificidad y del sitio de inicio de la transcripción (34). En estos promotores el elemento Inr tiene una importante función en la correcta ubicación de la RNA polimerasa II.

El gen murino de TdT carece de secuencias TATA y sitios de unión para SP-1, pero contienen un elemento Inr que es responsable de la transcripción basal del gen. El gen humano de TdT también carece de secuencias consenso TATA. Recientemente se ha reportado que TFIID esta involucrado en la función del promotor basal del gen humano de TdT y que su función es independiente de SP-1 (36). TFIID está compuesto de TBP que se une a la secuencia TATA, y de

varios factores activadores asociados (66,68). Los promotores que contienen secuencias TATA requieren solo de TBP para la iniciación de la transcripción. Por el contrario, la transcripción de los promotores que carecen de secuencias TATA, se ha demostrado que requieren del complejo TFIID completo e intacto para la transcripción (68). Los resultados de estudios de inactivación de TBP sugieren que TBP es necesaria pero no suficiente para la transcripción de los promotores que carecen de secuencias TATA y que contienen elementos Inr (69). El elemento Inr en el gen humano de TdT no es análogo a otros promotores que carecen de secuencias TATA, pero éste Inr tiene una función promotora similar a la del gen murino de TdT, ya que se ha demostrado que la adición de TBP purificada con extractos inactivados de TFIID, fue suficiente para restaurar la transcripción (69). Este efecto dramático de TBP en la transcripción del promotor de TdT fue observado en ausencia de una interacción estable DNA/TBP, y que puede ser detectado por EMSA o por footprinting. La activación transcripcional por la adición de TBP a extractos en los cuales TFIID se encuentra inactivado, sugiere que TBP es el único componente del complejo TFIID necesario para la actividad promotora basal del gen humano de TdT. Estos hallazgos indican que el promotor humano de TdT es el primer promotor natural descrito que carece de secuencias consenso TATA, en el cual únicamente TBP es capaz de mantener la transcripción.

Con las evidencias anteriores se ha propuesto un modelo para interpretar el mecanismo de activación del promotor del gen humano de TdT. La transcripción basal en los linfocitos es mediada por la interacción entre los componentes del complejo de transcripción, la RNA polimerasa II y el elemento promotor primario ubicado en -34 a -14 pb. Este elemento primario induce el 80% de la actividad promotora. TBP y probablemente otros factores activadores, hacen contacto con el DNA en la secuencia ACCCT del elemento promotor primario. Después de la unión de TFIID al elemento primario, factores asociados a TBP (TFIIA y TFIIB) se unen a TFIID seguido por la unión de la RNA polimerasa II, TFIIF, TFIIE y TFIIH; para completar la formación del complejo de preiniciación de la

transcripción. A la secuencia GGGTG, que se ubica en el elemento secundario del promotor basal en el elemento Inr; se le unen componentes o factores de unión de Inr. La unión de la RNA polimerasa II y del complejo de preiniciación, dirigen el lugar preciso de un solo sitio de inicio de la transcripción (36).

El conocimiento que se tiene de los eventos moleculares que ocurren durante la activación transcripcional del gen humano de TdT es relativamente abundante (70-72). Sin embargo, en relación a los eventos que participan en la represión de la transcripción de TdT, aun existen procesos que no se conocen en su totalidad. Como se discutió anteriormente, se conoce que las proteínas TBP tienen una función importante en el inicio de la transcripción del promotor del gen humano de TdT (36). Además se ha propuesto un modelo para entender mejor este proceso. El diseño experimental que aquí se presenta es de particular importancia, porque identificamos complejos DNA/proteína en la región reguladora 5' del gen humano de TdT con extractos nucleares ricos en proteínas AP-1 que interactúan con secuencias que comparte una alta homología con elementos reguladores AP-1 consenso. Por lo tanto, el promotor del gen humano de TdT representa un buen sistema de estudio para entender parte de los mecanismos moleculares de regulación, ya que parece tener características especiales de este proceso.

Estudios previos en nuestro laboratorio han permitido identificar que la expresión del RNAm de TdT disminuye cuando las células linfoides son incubadas en presencia TPA (11). Con este antecedente y con base en los reportes de que los ésteres de forbol inducen la activación de PKC, la cual induce la activación transcripcional de los genes que codifican para c-fos y c-jun (principales componentes del factor transcripcional AP-1); nos propusimos investigar si elementos reguladores AP-1 se encontraban presentes en la región reguladora del gen de humano de TdT. Nosotros identificamos en el promotor del gen TdT, varios elementos similares a AP-1 que pueden influir en la actividad transcripcional. Con los experimentos de EMSA *in vitro* descritos aquí, demostramos

que al oligonucleótido AP-1-TdT se unen proteínas reguladoras a partir de extractos celulares ricos en proteínas AP-1. AP-1-TdT comprende una región del promotor basal 5' de TdT y contiene una secuencia similar a un elemento AP-1 consenso. Además, con los experimentos de EMSA de competencia utilizando como competidor la secuencia consenso de AP-1 (AP-1Cons), nosotros demostramos que el oligonucleótido compete por las proteínas nucleares en la formación de los complejos DNA/proteína; lo que indica que estas proteínas son de naturaleza muy similar a las que reconocen el oligonucleótido AP-1Cons. Con estos resultados, sugerimos que estas proteínas que se unen al DNA probablemente pertenecen a la familia de factores transcripcionales AP-1. El oligonucleótido AP-1-TdT incluye la secuencia TCAGTAC y en AP-1Cons se encuentra la secuencia TCAGTCA, ésta última se ha reportado como una secuencia consenso de la familia de elementos AP-1 (42). La homología que existe entre ambas secuencias y la similitud en el patrón de movilidad electroforética que determinamos al identificar los complejos DNA/proteína que se forman para ambas secuencias, nos sugiere que probablemente los factores transcripcionales que están participando en el reconocimiento del DNA, puedan ser miembros de la familia de factores transcripcionales AP-1.

C-fos fue primeramente identificado como el oncogen responsable para la inducción del sarcoma osteogénico por el virus de sarcoma murino Finkel-Biskin-Jenkins (FBJ-MuSV) (74,75). Subsecuentemente, también fue identificado en dos retrovirus aislados de manera independiente, en el virus FBR-MuSV (75,76) y en el virus de sarcoma de pollo NK24 (77). En relación a c-jun, éste fue originalmente descubierto e identificado como el oncogen que se encuentra en el virus de sarcoma de aves ASV-17 (78). Ambos oncogenes son capaces de inducir la transformación celular *in vitro* y en tumores *in vivo*. Los oncogenes c-fos y c-jun codifican para proteínas que pertenecen a una clase de factores de transcripción caracterizados por un dominio de dimerización compuesto por un zipper de leucinas y un dominio adyacente amino terminal de unión al DNA, rico en

aminoácidos básicos (73). Aunque existen varios miembros de la familia de proteínas Jun (c-Jun, JunB y JunD) y de la familia Fos (c-Fos, Fra 1, Fra 2, Fos B y Fos B2); propiamente c-Jun y c-Fos son los principales componentes del factor transcripcional AP-1. Las proteínas de la familia Jun pueden formar homodímeros, pero tienen mayor capacidad para dimerizar con los miembros de la familia de Fos, lo que facilita la unión a la secuencia consenso TGACTCA en el DNA. Sin embargo, Fos y Jun pueden también dimerizar con miembros de la familia de proteínas de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y estos heterodímeros tienen una afinidad preferencial por la secuencia consenso TGACGTCA de CRE. C-Jun también interactúa con el receptor de glucocorticoides, afectando la regulación transcripcional dependiente de hormonas. La dimerización bien definida y el contacto específico con el DNA, reduce el número de dominios de activación transcripcional bien reconocidos

En función de la homología que existe entre las secuencias TCAGTCA y TCAGTAC de AP-1Cons y AP-1-TdT respectivamente y en base a los hallazgos de que las proteínas de AP-1 pueden dimerizar con proteínas de unión a CREB; existe la posibilidad de que los complejos de DNA/proteína aquí identificados correspondan a un miembro de otra familia de elementos reguladores diferentes a la familia AP-1, y que por ser similares en su interacción con el DNA, pudieron ser identificados como complejos DNA/proteína, tanto para el oligonucleótido AP-1-TdT como para el AP-1Cons. Para eliminar esta posibilidad y tener la certeza de que se trata de un factor transcripcional y elemento regulador en particular, se requiere de la realización de experimentos de EMSA en donde se utilicen proteínas purificadas de la familia AP-1 como fuente de extractos nucleares, o bien, se empleen anticuerpos dirigidos contra epítopo conservados de estas mismas proteínas; y analizar el patrón de formación de complejos DNA/proteína que se formaría bajo tales condiciones experimentales..

En relación a la formación de los complejos entre los miembros de la familia de factores de transcripción AP-1, existen complejos que no activan la transcripción, sino por el contrario inducen

represión de genes si se unen a sitios de reconocimiento en la región promotora. Se ha reportado que la proteína JunD regula de manera negativa el crecimiento celular, lo que sugiere que los factores de transcripción c-Jun y JunD pueden funcionar de una manera opuesta (78). Nosotros identificamos la formación de dos complejos DNA/proteína en las células que no expresan el gen de TdT. De estos complejos, establecimos por experimentos de EMSA de competencia, que un complejo específico compite de manera eficiente con una secuencia consenso de AP-1. Si éste complejo se forma cuando la células no expresan el gen de TdT, y además es competido por una secuencia consenso AP-1, existe una posibilidad alternativa que podría explicar éste hallazgo. Es probable que los factores transcripcionales que participan en la formación del complejo específico DNA/proteína en AP-1-TdT pertenezcan a la familia de factores transcripcionales AP-1, como por ejemplo JunD o similares a JunD. La función que tienen éstas proteínas en el reconocimiento del DNA, en el contexto de células que no expresan el gen de TdT, de igual manera que JunD, sería la de reprimir de la transcripción del gen de TdT en células que no expresan éste gen. En consecuencia, con estos resultados, proponemos que las proteína(s) que se unen a la secuencia TCAGTAC en AP-1-TdT, pueden formar parte de la familia de proteínas AP-1, las cuales pueden tener funciones negativas en la activación transcripcional del gen humano de TdT. Nosotros suponemos que probablemente estén participando JunD o proteínas similares a JunD. No obstante se requiere de los experimentos antes mencionados para confirmar o descartar ésta hipótesis.

Con estos hallazgos, nosotros proponemos un modelo en el cual se interpreta el mecanismo de regulación transcripcional para el gen humano de TdT (FIGURA 14). En éste modelo, la estimulación de una célula linfóide se realiza a partir de sus receptores de membrana específicos. Esta primera señal desencadena la cascada de eventos de transducción de señal en donde participa la activación de PKC. La activación de PKC también puede realizarse por estimulación con TPA.. Los eventos de transducción de señal se continúan con fosforilaciones de

subsecuentes substratos, entre los que se encuentran la activación de cinasas que fosforilan a los miembros de la familia de proteínas AP-1 (JNKK, JNK). La fosforilación de la proteínas AP-1 permite que estas pasen de un estado inactivo a un estado activo y de ésta manera sean capaces de internalizarse en el núcleo donde reconocerán de manera específica secuencias reguladoras en el DNA. Estos factores transcripcionales solo se encontrarán activos en células que no expresan el gen de TdT, lo cual puede sugerirse por el hecho de que identificamos complejos DNA/proteína cuando se realizaron los experimentos de EMSA con diferentes fragmentos de la región reguladora de TdT y con extractos nucleares de células que no expresan TdT. El reconocimiento de la secuencia TCAGTAC en la región promotora basal del gen humano de TdT por parte de estas proteínas reguladoras, producirá un efecto negativo en la regulación de la expresión de TdT y por lo tanto la proteína no se sintetizará para estos tipos celulares. A pesar de que éste modelo que aquí proponemos se encuentra basado en los hallazgos obtenidos por éste estudio e intenta interpretar parte del proceso de regulación génica, no hay que dejar de considerar que los eventos moleculares que participan en la regulación génica son altamente complicados y tiempo-tejido-específico regulados, por lo que contemplar solo al factor transcripcional AP-1 como el responsable de la regulación negativa del gen de TdT, equivaldría a tener una perspectiva muy reducida del fenómeno.

A pesar de que se conoce que la expresión de TdT ocurre durante el desarrollo de los linfocitos, el auténtico proceso de control transcripcional de éste gen, debe incluir mecanismos de expresión restringidos a células linfoides y de manera específica para las células pre-B y pre-T. Tales elementos de control como secuencias enhancers, supresoras, aisladoras, o silenciadores; pueden estar presentes varios kilobases alejados de la secuencia del promotor basal analizada en el presente estudio. La expresión linfocito-específica o estado-específica del gen de TdT puede ser detectada *in vitro*, pero para comprender éste proceso *in vivo* y de manera más integrada, se requiere probablemente de reconstrucciones de cromatina así como de la asociación

de histonas y de la presencia de la maquinaria de recombinación con el DNA molde, además de usar secuencias de DNA desnudas (sin proteínas asociada) o de oligonucleótidos que incluyan secuencias importantes de interés.

IX). CONCLUSIONES

A partir de los hallazgos anteriormente presentados, llegamos a las siguientes conclusiones:

* Los ésteres de forbol (TPA) aumentan la expresión del RNAm de c-fos y c-jun (AP-1) en células linfoides, probablemente a través de la activación de PKC.

* Se identificaron dos complejos DNA/proteína en las células que no expresan el gen de TdT y que se unen 340 nucleótidos antes del sitio de inicio de la transcripción. Uno de estos complejos se presenta abundantemente en las células que no expresan TdT. El segundo complejo se forma también en las células que no expresan TdT pero es menos abundante en las células que si expresan TdT.

* En la región de -397 a -1 del gen de TdT, se localizan secuencias similares a AP-1 que forman complejos DNA/proteína cuando se utilizan extractos nucleares ricos en proteínas AP-1; lo que sugiere que factores transcripcionales reconocen secuencias génicas reguladoras.

* Se demostró por experimentos de EMSA que el elemento AP-1-TdT, que comprende secuencias similares a AP-1, tiene un patrón de migración electroforética muy similar al elemento regulador AP-1 consenso. Además, las proteínas que se unen a AP-1-TdT compiten de manera específica y eficiente cuando se utiliza AP-1 consenso como competidor.

* Es probable que los factores transcripcionales que aquí identificamos interactúen con secuencias de DNA que tienen alta homología con elementos reguladores AP-1, pero que no pertenecen a ésta familia, o alternativamente que pertenecen a la familia de proteínas AP-1 semejantes a JunD y que tengan funciones represoras de la transcripción.

* La regulación de la expresión del gen humano de TdT puede ser modulada negativamente en parte, por elementos similares a AP-1 presentes en la región reguladora 5'

proximal del gen de TdT, la cual corresponde a la región promotora basal de éste gen. Sin embargo, se requiere de estudios funcionales para demostrar la función de AP-1-TdT.

X). PERSPECTIVAS

Con los resultados presentados en ésta Tesis, se contemplan las siguientes perspectivas a realizar:

Se generaran diferentes fragmentos o deleciones de la región reguladora 5' del gen humano de TdT, los cuales se utilizarán para hacer las construcciones génicas en un vector que exprese el producto de la enzima β -galactosidasa, y con estas construcciones transfectar células eucarióticas (que no expresan β -galactosidasa) tanto TdT negativas y TdT positivas, con la finalidad de medir la función promotora de estos fragmentos con el gen reportero de β -galactosidasa. Esta estrategia nos permitirá circunscribir las secuencias en la región 5' de TdT con función promotora y correlacionarlas con los hallazgos aquí reportados en relación a la identificación de los complejos de DNA/proteína que se forman para AP-1-TdT.

Se realizaran los experimentos de SEMSA (super electrophoresis mobility shifting assays) utilizando anticuerpos dirigidos contra epítopes conservados de la proteína jun (anti-jun) para fortalecer la evidencia de que en los complejos de DNA/proteína de AP-1-TdT, participan miembros de ésta familia de proteínas, o bien, que se trate de otras proteínas diferentes. Así como también se realizaran los experimentos de EMSA con proteínas purificadas de la familia de AP-1.

Con la finalidad de tener una aproximación más biológica de los eventos que están ocurriendo durante el proceso de regulación génica de TdT, se contempla realizar la transfección del gen de TdT en un sistema celular en el cual se encuentra deletada parte de la maquinaria molecular de AP-1 y que no realizan la síntesis de TdT; y se evaluará el nivel y calidad de expresión de TdT en éste modelo. Con la información que se genere, además de las señales de transducción que participan en la regulación de la expresión (9,11,79,80), se fortalecerán las funciones e importancia que tienen los factores transcripcionales AP-1 en la regulación de la expresión génica de TdT.

XI). REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1). Chechik BE., Schroder WP, and Minowada J. (1981). An immunomorphological study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes and hamatopoietic cell lines. *J Immunol.* 126:1003-1007.

2). Tritsh GL., and Minowada J. (1978). Differences in purine metabolizing enzyme activity in human leukemic T-cell, B-cell and null cell lines. *J Natl Can Inst.* 60:1301-1304.

3). Cohen A, Lee LWW, Dosh HM, and Gelfand EW.(1980). The expression of deoxyguanosine toxicity in T lymphocytes at different stages of maturation. *J Immunol.* 125:1578-1582.

4). Martin DWJr, and Gelfand EW. (1981). Biochemistry of immunodevelopment diseases. *Ann Rev Biochem.* 50:845-877.

5). Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, and Meuwissen HJ. (1972). Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired immunity. *Lancet* 2:1067-1069.

6). Giblett ER, Amman AJ, Wara DW, Sandman R, and Diamond L.K. (1975). Nucleoside phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity. *Lancet* 1:1010-1013

7). Edwards L., Magilav D, Cassidy J, and Fox, IH. (1978). Lymphocyte 5'-nucleotidase T deficiency in agammaglobulinemia. *Science* 201:628.

8). Hoffbrand AV, Drexler HG, Ganeshaguru K., Piga A., and Wickremasinghe R. (1986). Biochemical aspects of acute leukaemia. *Clin Haematol.* 15:669-694.

9). Martínez-Valdez H, and Cohen A. (1988). Coordinate regulation of adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase, and terminal deoxynucleotidyl transferase mRNA levels by phorbol esters in human thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:6900-6903.

10). Martínez-Valdez H, Doherty PJ, Thompson E, Benedict SH, Gelfand EW, and Cohen A. (1988). Antagonistic effects of calcium ionophores and phorbol esters on T-cell receptor mRNA levels in human thymocytes. *J Immunol.* 140:361-366.

11). Madrid-Marina V, Martínez-Valdez H, and Cohen A. (1990). Phorbol esters induce changes in adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase, and terminal deoxynucleotidyl transferase mRNA levels in human leukemic cells. *Cancer Res.* 50:2891-2894.

12). Bollum FJ. (1974). Terminal deoxynucleotidyl transferase. In *The Enzymes.* (Boyer, P.D. ed.) Acad. Press N.Y. 11:145-177.

13). Bollum FJ. (1979). Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. *Blood* 54:1203-1215.

14). Pandey V, and Modak JM. (1988). Biochemistry of terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Biol Chem.* 263:3744-3751.

- 15). Gregoire K.E, Goldschneider I, Barton RW, and Bollum F.J. (1979). Ontogeny of terminal deoxynucleotidyl transferase in lymphohematopoietic tissues of rat and mouse. *J Immunol.* 123:1347.
- 16). Kallenbach SN, Doyen M, Fanton A., and Rougeon F. (1992). Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:2799-2803.
- 17). Yancopoulos GD, and Alt F.W. (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Ann Rev Immunol.* 4:339.
- 18). Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, Thomas E, Boss MA, Landau N, Alt FW, and Baltimore D. (1984). Insertion of N-regions into heavy-chain genes is correlated with the expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in B cells. *Nature* 311:752.
- 19). Landau R, Schatz D, Rosa M, and Baltimore D. (1987). Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B cell line infected with terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol Cell Biol.* 7:3237.
- 20). Alt WF, Blackwell KT, and Yancopoulos DG. (1987). Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238:1079-1087.
- 21). Komori T, Okada A, Stewart V, and Alt WF. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science.* 261:1171-1175.
- 22). Giffillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, and Mathis D. (1993). Mice lacking TdT: Mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science.* 261:1175-1178.
- 23). Lefranc MP, Forster A, and Rabbits TH. (1986). Genetic polymorphism and exon changes of the constant region of the human T cell rearranging gene gamma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:95596-95600.
- 24). Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B, and Mak TW. (1985). Organization and sequence of the diversity, joining and constant region genes of the human T cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:8624-8628.
- 25). Brenner MB, McLean J, Scheft H, Riberdy J, Ang SL, and Seidman JG. (1987). Two forms of the T cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 325:689-694.
- 26). Hata S, Brenner MB, and Krangel MS. (1987). Identification of putative human T cell receptor delta complementary DNA clones. *Science.* 238:678-682.
- 27). Raulet DH, Garman RD, Saito H, and Tonegawa S. (1985). Developmental regulation of T cell receptor gene expression. *Nature.* 314:103-107.
- 28). Born W, Rathbun G, Tucker P, and Kappler J. (1986). Synchronizer rearrangement of T-cell gamma and beta chain gene in fetal thymocyte development. *Science.* 234: 479-482.

ESTE TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 29). Foroni Y, Laffan M, Boehm T, Rabbits TH, Catovsky D, and Lazzatto L. (1989). Rearrangement of the T cell receptor gamma genes in human T cell leukemias. *Blood*. 73: 559-565.
- 30). Peralta Zaragoza O, Barrera Rodriguez R, y Madrid Marina V. (1996). Estructura y función del receptor de antígenos de los linfocitos T: Papel en las enfermedades infecciosas. *Rev Inv Clin*. 48:69-79.
- 31). Madrid-Marina V, Peralta-Zaragoza O, Olvera J, Aguilar-Gaytan R, y Meza M.A. (1993). Regulación de la expresión génica del receptor de linfocitos T en leucemia linfoblástica aguda humana. *Rev Fac Med UNAM*. 36(1):13-17.
- 32). Peralta-Zaragoza O, Martínez Valdez H, and Madrid-Marina V. (1996). Regulation of gamma/delta T-cell antigen receptor expression by intracellular calcium in acute lymphoblastic leukemia cell line DND41. *Arch Med Res*. 27(3):305-310.
- 33). Riley LK, Morrow JK, Danton MJ, and Coleman MS. (1988). Human terminal deoxynucleotidyl transferase: Molecular cloning and structural analysis of the gene and 5'-flanking region. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:2489-2493.
- 34). Smale TS, and Baltimore D. (1989). The initiator as a transcription control element. *Cell*. 57: 103-113.
- 35). Ernst P, Hahm K, and Smale S. (1993). Both LyF-1 and an Ets protein interact with a critical promoter element in the murine terminal transferase gene. *Mol Cell Biol*. 13: 2982-2992.
- 36). Sorscher HD, Yang B, Bhaumik D, Trangas T, Phillips VA, Chancellor EK, and Coleman SM. (1994). Initiation of transcription at the human terminal deoxynucleotidyl transferase gene promoter: A novel role for the TATA binding protein. *Biochem*. 33: 11025-11032.
- 37). Siden EJ, Gifford A, and Baltimore D. (1985). Cyclic AMP induced terminal deoxynucleotidyl transferase in immature B-cell leukemia lines. *J Immunol*. 135: 1518-1522.
- 38). Pazmino NH, Ihle JN, and Goldstein AL. (1978). Induction in vivo and in vitro of terminal deoxynucleotidyl transferase by thymosin in bone marrow cells from athymic mice. *J Exp Med*. 147:708-719.
- 39). Low TLK, Hu SH, and Goldstein AL. (1981). Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta4: A thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocytes populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78:1162-1171.
- 40). Tillinghast JP, Russell JH, Fields L.E, and Loh DY. (1989). Protein kinase C regulation of terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Immunol*. 143:2378-2383.
- 41). Trangas T, and Coleman MS. (1989). Tissue-specific expression of human terminal deoxynucleotidyl transferase is regulated at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Comm*. 164:750-757.
- 42). Angel P, and Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta*. 1072:129-157.

- 43). Dong Z, Birrer MJ, Watts RG, Matrisian LM, and Colburn NH. (1994). Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cell. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:609-613.
- 44). Peralta-Zaragoza O, y Madrid-Marina V. (1991). Mecanismo de regulación de la expresión de los proto-oncogenes nucleares: Implicaciones en la proliferación celular y en la activación de los linfocitos T. *Rev Mex Reumatol*. 6:156-164.
- 45). Curran T, Rausher FJ, Cohen DR and Franza BR Jr. (1988). Beyond the second messenger: Oncogene and transcription factors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 53 pt 2:769-777.
- 46). Rao A. (1994). NF-AT T α : a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine gene. *Immunol Today*. 15:274-281.
- 47). Nolan GP. (1994). NF-AT-AP-1 and rel-bZIP: Hybrid vigor and binding under the influence. *Cell* 77:795-798.
- 48). Chatta SG, Spies GA, Chang S, Mize JG, Linsley SP, Ledbetter AJ, and Morris RD. (1994). Differential regulation of proto-oncogenes c-jun and c-fos in T lymphocytes activated through CD28. *J Immunol* 153:5393-5401.
- 49). Nishizuka Y. Studies and Perspectives of Protein Kinase C. *Science* 233:305-312.
- 50). Trubiani O, Bollum FJ, and Primio RD. (1995). Terminal deoxynucleotidyl transferase is a nuclear PKC substrate. *FEBS Lett*. 374(3):367-370.
- 51). Chomczynsky P, and Sacchi N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162:156-159.
- 52). Lehrach J, Diamond D, Wosney J, and Boedtker H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions a critical examination. *Biochem*. 16: 4743-4751.
- 53). Thomas P. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77:5201-5205.
- 54). Oster C. (1988). Polymerase chain reaction. *Biotech*. 6:162-167.
- 55). Ransone LJ, and Verma IM. (1990). Nuclear proto-oncogene Fos and Jun. *Ann Rev Cell Biol*. 6:539-557.
- 56). Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor laboratory press.
- 57). Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:5463-5467.
- 58). Dignam JD, Lebovitz RM, and Roeder RG. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nuc Ac Res*. 11:1475-1489

- 59). Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254, 1976.
- 60). Mitchell P, and Tjian R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371-377.
- 61). Weiss A, and Imboden JB. (1987). Cell surface molecular and early events involved in human T lymphocytes activation. *Adv Immunol.* 41:1-38.
- 62). Goldsmith M, and Weiss A. (1988). Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T cell activation. *Science* 240:1031-1049.
- 63). Berridge MJ. (1987). Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem.* 56:159-193.
- 64). Pardee AB, Dubrow RD, Hamlin TL, and Klatzien RE. (1978). Animal cell cycle. *Annu Rev Biochem.* 47:715
- 65). Breathnach R, and Chambon P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split gene coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* 50:349-383.
- 66). Hernández N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor?. *Gene Dev.* 7:1291.1308.
- 67). Zeinze BG, Greenfield AOS, and Smale ST. (1992). Similar mechanisms for transcription initiation mediated through a TATA box or an initiator element. *J Biol Chem.* 267:2823-2830.
- 68). Tanese N, and Tjian R. (1993). Coactivators and TAFs: A new class of eukaryotic transcription factors that connect activators to the basal machinery. Cold Spring Harbor Laboratory Press 179-185.
- 69). Pugh BF, and Tjian R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter require a multisubunit TFIID complex. *Gene Dev.* 5, 1935-1945.
- 70). Bhaumik D, Yang B, Trangas T, Bartlett SJ, Coleman SM, and Sorcher HD. (1994). Identification of a tripartite basal promoter which regulates human terminal deoxynucleotidyl transferase gene expression. *J Biol Chem.* 269:15861-15867.
- 71). Yang B, Gathy NK, and Coleman SM. (1994). Mutational analysis of residues in the nucleotide binding domain of human terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Biol Chem.* 269:11859-11868.
- 72). Garraway PI, Semple K, and Smale ST. (1996). Transcription of the lymphocyte-specific terminal deoxynucleotidyl transferase gene requires a specific core promoter structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:4336-4341.
- 73). Baker SJ, Kerppola TK, Luk D, Vandenberg MT, Marshak DR, Curran T, and Abate C. (1992). Jun is phosphorylated by several protein kinases at the same sites that are modified in serum-stimulated fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 12:4694-4705.

74). Curran T, Peters G, Van-Beveren C, Teich NM, and Verma IM. (1982). FBJ murine osteosarcoma virus: Identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J Virol.* 44:674-682.

75). Jenuwein T, Muller D, Curran T, and Muller R. (1985). Extended life span and tumorigenicity of nonestablished mouse connective tissue cells transformed by the fos oncogene of FBR-MuSV. *Cell.* 412:629-637.

76). Fujiwara KT, Ashida K, Nishina H, Iba H, Miyajima N, Nishizawa M, and Kawai S. (1987). The chicken c-fos gene: Cloning and nucleotide sequence analysis. *J Virol.* 61:4012-4018.

77). Maki Y, Bas TJ, Davis C, Starbuck M, and Vogt PK. (1987). Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:2848-2852.

78). Pfar MD, Mehta F, Spyrou G., Lallemand D, and Yaniv M. (1994). Mouse JunD negative regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell.* 77:520-529.

79). Fernández-Mejía C, Peralta-Zaragoza O, Cerezo-Roman J, Navarro-Duque, Barrera-Rodríguez R, and Madrid-Marina V. (1995). Regulation of gene expression adenosine deaminase, purine nucleosidase phosphorylase and terminal deoxynucleotidyl transferase by dexamethasone and cAMP in human leukemic cells. *Adv Exp Med Biol Plenum Press NY.* 370:249-252.

80). Fernández-Mejía C, Peralta-Zaragoza O, Barrera-Rodríguez R, and Madrid-Marina V. (1997). Dexamethasone and cAMP regulate the expresion of purine enzymes and terminal deoxinucleotidyl transferase in leukemic cells. *Int J Biochem.* (Enviado).