

00551  
4



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

UNAM  
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

BIOQUÍMICAS

Autógrafa a la Dirección General de Bibliotecas  
para difundir en formato electrónico e impreso  
el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

"Estudio funcional de dos elementos de  
regulación localizados en el costado 3' del  
grupo de genes  $\alpha$ -globina de pollo"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

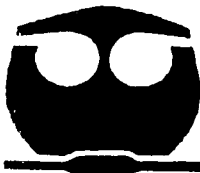
P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO BRIONES ORTA

DIRECTOR DE LA TESIS: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA.

MÉXICO, D.F.

2003



1  
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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Félix Recillas Targa en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, de la U.N.A.M. El alumno fue apoyado con una beca-crédito otorgada por el CONACyT para la realización de los estudios de maestría en el programa de Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la U.N.A.M. El proyecto fue apoyado por los donativos del CONACyT (No. 33863N) y de DGAPA, UNAM (No. 203200).

**A Marco Antonio Briones Torres,  
la persona más honesta, trabajadora  
e inteligente que he conocido,  
me siento afortunado de haber  
compartido contigo un  
trcho de este camino.  
Gracias.**

*...S' interdire les ombres portées; ne pas permettre que la buée d'une haleine s'étale sur le tain du miroir; prendre seulement ce qu'il y a de plus durable, de plus essentiel en nous, dans les émotions des sens ou dans les opérations de l'esprit, comme point de contact avec ces hommes qui comment nous croquèrent des olives, burent du vin, s'engluèrent les doigts de miel, luttèrent contre le vent aigre et la pluie aveuglante et cherchèrent en été l'ombre d'un platane, et jouirent, et pensèrent, et vieillirent et moururent.*

**Mémoires d'Hadrien  
Marguerite Yourcenar**

## **Agradecimientos:**

A mi hermana Zigrith, un incentivo para seguir adelante y la alegría de mi vida, te quiero uno y dos montones. A Eréndira, que es como una hermana y me llevó a seguir en este camino (auchhh), por tus libros compartidos y la permanencia. Blanquita, por su apoyo y escucharme siempre. Dora, Bart, Saidaly y Pierre parce que ils sont une fête dans ma vie. Al Genaro por admitirme en su banda. A los peluches conformados por la oruga, la neta y el peluche. A los Briones, por hacerme sentir una pieza más del numeroso rompecabezas que es este clan, por tratarme como un hijo, sobrino, un hermano y amigo a pesar de estar lejos y no verlos tanto como quisiera, no digo nombres porque llenaría esta hoja, solo menciono a la Güita Antonia, matriarca admirable que amalgama a toda la familia. A mi tía Julia y familia, gracias por todo su cariño. A mis compañeros de la maestría Grethel y Andrea que hicieron menos pesadas las clases. A la familia Orta, a David donde esté y a mi abuela "Tuna" cuya fortaleza me sorprendente.

Al Dr. Félix Recillas Targa por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y mostrar un gran interés académico con el mismo. A la Biól. Georgina Guerrero Avendaño por su asistencia técnica en el laboratorio durante el desarrollo de esta tesis. A mis compañeros de laboratorio: Inti, Martín, Héctor, Fabiola y Francisco, por el ambiente de trabajo que se formó con ellos. Gracias en especial a Viviana por su amistad, por lo que aprendí de ella y a la que extrañare.

A mi comité tutorial, que tuve la suerte que estuviera conformado por la Dra. Herminia Loza que es una excelente maestra, tutora, consejera; además quién leyó este trabajo varias veces y discutió conmigo muchas veces cada línea. A la Dra. Alicia González Manjarrez, que siempre tuvo sugerencias para este el desarrollo de trabajo, por el apoyo invaluable que recibí para mi preparación y por su sentido del humor.

Al Dr. Jaime Mas Oliva por el apoyo y consejo que siempre me da y abrirme siempre las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Marina Macías, que en estos últimos meses me dio las facilidades para finalizar este proyecto para al mismo tiempo integrarme a su laboratorio.

Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, un lugar único en el país pese a quién le pese, y en donde me he formado y prácticamente vivido durante más de 10 años.

A los que se me olvidan una disculpa, a los rebeldes que rompen con esquemas un gran aplauso; ...a te per hieri e per domani.

**"Who are you?" said the Caterpillar  
This was not an encouraging opening for a  
conversation. Alice replied, rather shyly, "I-I hardly  
know, Sir, just at present – at least I know who I was  
when I got up this morning, but I think I must have  
been changed several times since then."**

**Alice's Adventures in Wonderland  
Lewis Carroll**

**"...pero el examen reveló que no tenía fiebre, ni dolor en ninguna parte, y lo único concreto que sentía era la necesidad urgente de morir. Le bastó con un interrogatorio insidioso, primero a él y después a la madre, para comprobar una vez más que los síntomas del amor son los mismos del cólera. Prescribió infusiones de flores de tilo para entretener los nervios y sugirió un cambio de aires para buscar consuelo en la distancia, pero lo que anhelaba Florentino Ariza era todo lo contrario: gozar de su martirio"**

**El amor en los tiempos del cólera  
Gabriel García Márquez**

**"Sólo quedan los puros viejos y las mujeres solas, o con un marido que anda donde sólo Dios sabe dónde...Vienen de vez en cuando como las tormentas de que le hablaba; se oye un murmullo en todo el pueblo cuando regresan y uno como gruñido cuando se van... Dejan el costal del bastimento para los viejos y plantan otro hijo en el vientre de sus mujeres y ya nadie vuelve a saber de ellos sino al año siguiente, y a veces nunca...Es la costumbre. Allí le dicen la ley pero es lo mismo. Los hijos se la pasan trabajando para lo padres como ellos trabajaron para los suyos y como quién sabe cuántos atrás de ellos cumplieron con su ley..."**

**El llano en llamas  
Juan Rulfo.**

# ÍNDICE

	página
Abreviaturas .....	8
Resumen .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	10
1.1 GENERALIDADES .....	10
1.2 ELEMENTOS DE CONTROL .....	11
1.2.1. Promotores .....	11
1.2.2. "Enhancers" .....	14
1.2.3. Silenciadores .....	16
1.2.4. "Locus Control Regions" (LCRs) .....	17
1.3 FACTORES TRANSCRIPCIONALES ESPECÍFICOS ASOCIADOS A LA REGULACIÓN ERITROIDE .....	19
1.3.1. Factor transcripcional GATA-1 .....	19
1.3.2. Cofactor transcripcional FOG .....	21
1.3.3. Factor transcripcional NF-E2 .....	23
1.3.4. Factor transcripcional EKLF .....	25
1.3.5. Factor transcripcional YY1 .....	27
1.4. FAMILIAS MULTIGÉNICAS $\alpha$ Y $\beta$ GLOBINA DE POLLO .....	30
1.4.1. Familia multigénica $\alpha$ -globina de pollo y antecedentes particulares ..	31
1.5. Planteamiento del problema .....	36
1.6. Objetivos .....	36
1.6.1. Objetivos generales .....	36
1.6.2. Objetivos particulares .....	36
2. HIPÓTESIS .....	37
3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
4.1. Extracción de DNA genómico de células eritroides de pollo ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) .....	39
4.2. Diseño de oligonucleótidos específicos .....	40
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	42
4.4. Subclonación de productos de PCR .....	42
4.5. Mutaciones de los sitios consenso de unión a factores transcripcionales .....	44

4.6. Transfecciones .....	47
4.6.1. Transfección transitoria en eritrocitos de embriones de pollo de 10 días (RBC) .....	47
4.6.2. Transfección transitoria en pre-eritroblastos de pollo (línea celular 6C2) .....	48
4.6.3. Transfección estable en pre-eritroblastos de pollo (línea celular 6C2) .....	49
4.7. Cuantificación de la actividad enzimática de los genes reporteros .....	50
4.7.1. Cuantificación de la actividad enzimática de la Cloramfenicol Acetiltransferasa (CAT) .....	50
4.7.2. Cuantificación de la actividad de $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -Gal) .....	51
4.7.3. Cuantificación de la actividad de la proteína verde fluorescente (GFP) .....	51
4.8. Geles de retardo .....	52
4.9. Extractos de proteínas nucleares de pollo .....	54
4.9.1. Extractos nucleares de eritrocitos (RBC) .....	54
4.9.2. Extractos nucleares de pre-eritroblastos (células 6C2) .....	55
5. RESULTADOS .....	57
5.1. DNA genómico de pollo .....	57
5.2. Reacción en cadena de la polimerasa .....	57
5.3. Clonación y subclonación de los diferentes elementos de regulación .....	58
5.4. Mutaciones de los sitios consenso de unión a factores transcripcionales..	61
5.5. Transfecciones .....	61
5.5.1. Transfecciones transitorias en eritrocitos (RBC) .....	61
5.5.2. Transfecciones transitorias en pre-eritroblastos (células 6C2) .....	65
5.5.3. Transfecciones estables en pre-eritroblastos (células 6C2) .....	67
5.6. Interacciones proteína-DNA .....	68
6. DISCUSIÓN .....	75
6.1. Modelos para el funcionamiento del "enhancer" .....	84
7. CONCLUSIONES .....	88
8. PERSPECTIVAS .....	89
9. BIBLIOGRAFÍA .....	92
10. APÉNDICE .....	99



## Abreviaturas

$\mu$ F – micro Faradays

Acetil-CoA - acetil-coenzima A

cpm - cuentas por minuto

CAT – cloramfenicol acetiltransferasa

D.O. - densidad óptica

GFP - proteína verde fluorescente

h - hora

HAT – acetilasas de histonas

HDAC – desacetilasas de histonas

kb – kilo pares de bases

LCR – “Locus Control Region”

min - minuto

pb - pares de bases

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

RBC – eritrocitos de embriones de 10 días

rpm - revoluciones por minuto

SH - Sitio de Hipersensibilidad al corte por parte de la endonucleasa DNasa I

sn - sobrenadante

t.a. - temperatura ambiente

TFIID – Factor de Trascricpción II D

V - voltz

vol – volumen

## RESUMEN

La célula eucarionte tiene diferentes mecanismos de control de la expresión de los genes que conforman su genoma, ya que cada uno de ellos necesita ser expresado en un tiempo y lugar específico. Dentro de los mecanismos que participan en el control de la expresión de los genes se encuentran los elementos de control a distancia como los "enhancers", los silenciadores y los "insulators" o delimitadores. En estos elementos se encuentran sitios consenso de unión para factores transcripcionales que pueden actuar como activadores y como represores de la transcripción. Los genes globina son un modelo ideal para el estudio de la regulación transcripcional, ya que hay genes globina embrionarios y adultos que se expresan en distintas etapas del desarrollo. En el dominio  $\alpha$ -globina se localizan el gen embrionario  $\pi$  y los genes adultos  $\alpha^A$  y  $\alpha^D$ . En el costado 3' de este dominio en estudios previos se identificaron regiones con una actividad de "enhancer" y un silenciador, existiendo un tercer elemento llamado 4<sup>a</sup> caja de homología en la que no se observó ninguna actividad. Del presente trabajo, empleando como promotor al del gen  $\alpha^D$  y el gen reportero de la cloranfenicol acetiltransferasa se concluyó que el elemento silenciador tiene una actividad de silenciamiento clásica y no se trata de un elemento delimitador. Los resultados también sugieren que la 4<sup>a</sup> caja de homología no forma parte integral del "enhancer" y parece participar en la regulación de la actividad de este elemento. La concentración de los factores transcripcionales que se están uniendo a la 4<sup>a</sup> caja de homología parece correlacionar con el estado de actividad del "enhancer". Cuando los genes globina están transcripcionalmente activos el factor GATA-1 es abundante y sus niveles descienden cuando los genes globina están silenciados. Lo contrario ocurre con el nivel de concentración del factor YY1, que es más abundante cuando los genes globina están silenciados y cuya concentración desciende cuando los genes globina se están expresando.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. GENERALIDADES

La complejidad evolutiva del genoma eucarionte requiere de varios niveles de regulación de la expresión genética para permitir el desarrollo de una célula huevo hasta un organismo completo. Son múltiples los mecanismos de regulación necesarios para la expresión coordinada de distintos genes permitiendo que una célula totipotente realice los diversos procesos de diferenciación que desembocaran en la especialización celular.

Para que un gen sea transcrito primero es necesario atraer y ensamblar el complejo de iniciación de la transcripción (RNA polimerasa II y los factores generales de la transcripción). Esto se lleva a cabo en los promotores de los genes y representa un primer nivel de regulación de la expresión de un gen. Por otra parte en el control fino y específico de expresión de un gen participan los elementos de control a distancia, tales como los "enhancers", silenciadores, "Locus Control Region" (LCR) e "insulators", los cuales modulan los niveles, el tejido y el tiempo en el que debe ocurrir la transcripción.

Otro punto importante en la regulación de la expresión de los genes eucariontes durante el desarrollo y que hasta hace poco tiempo fue considerado, es la estructuración del DNA. El DNA eucarionte se estructura con un conjunto de proteínas conocidas como histonas y que forman un octámero de proteínas denominado nucleosoma. A este conjunto de proteínas y DNA se le denomina cromatina.

La función primaria de la cromatina es la de compactar al DNA para poder ser contenido en el interior del núcleo. Hoy en día existen evidencias convincentes que muestran que la regulación genética no puede ser entendida sin tomar en cuenta a la estructura de la cromatina, y que ésta representa uno de los primeros

niveles de regulación. Por lo anterior, resulta importante investigar la relación entre la regulación transcripcional de un gen, los elementos de control localizados a distancia y la estructura de su cromatina.

## **1.2. ELEMENTOS DE CONTROL**

Además de los promotores, la expresión regulada de un gen requiere de elementos adicionales conocidos como "enhancers", los cuales fomentan su activación. Su contraparte, los silenciadores tienen una actividad negativa sobre la transcripción de un gen. Otros elementos de regulación a distancia como los LCR (del inglés "Locus Control Region"). Todos estos elementos de control permiten una expresión genica específica, pero también facilitan una rápida respuesta a diferentes necesidades de expresión causada por estímulos celulares externos.

### **1.2.1. Promotores**

Los promotores no habían sido considerados como un elemento de regulación fina de la transcripción hasta hace algunos años (Blackwood y Kadonaga, 1998). El elemento central del promotor en la mayoría de los genes se localiza entre las posiciones -35 y +35 en relación con el sitio de inicio de la transcripción y está compuesto por secuencias ricas en AT, con el consenso TATAAA conocido como la caja TATA (Breathnach y Chambon, 1981). En el tiempo en que la caja TATA fue descrita, todos los elementos centrales del promotor la presentaban y se concluyó que los promotores de todos los genes eran iguales o sin diferencias que hicieran pensar que los promotores tuvieran un papel significativo en la regulación transcripcional fina de los genes. A lo largo de los años se comprobó que los promotores podían o no poseer cajas TATA e incluso elementos distintos como las secuencias iniciadoras (Inr), demostrando así que la estructura de un promotor es más compleja de lo que se había supuesto.

Además se fueron descubriendo otros elementos de regulación más complejos que complementan la especificidad regulatoria del promotor

En *Drosophila melanogaster*, hay ejemplos donde parece haber dos tipos de elementos centrales del promotor: en el primer tipo se encuentran los que tienen caja TATA entre las posiciones +25 y +30, con un elemento Inr que sobrelapa el sitio de inicio. El segundo tipo tiene el elemento Inr junto con otro elemento llamado "downstream promoter element" (DPE), que se localiza en la posición -30 (Burke *et al.*, 1998; Kutach y Kadonaga, 2000). La caja TATA, el Inr y el DPE sirven como un sitio de reconocimiento para el factor general de transcripción IID (TFIID) y en particular para la proteína de unión a TATA ("TATA-binding-protein" o TBP) y diversos factores asociados a TBP ("TBP-associated factors" o TAFs), que son parte fundamental de la maquinaria basal de la transcripción (Burke *et al.*, 1998; Smale *et al.*, 1998). Experimentos recientes del grupo de Kadonaga (Butler y Kadonaga, 2001) han dado solidez a la propuesta de que hay diferencias entre los elementos centrales de los promotores que influyen en la manera en que son regulados por los elementos de control a distancia. Los resultados validan la hipótesis de que el promotor de un gen puede estar influenciado por varios "enhancers" y que varios promotores pueden estar bajo la influencia de un solo "enhancer". También se sugiere que los "enhancers" parecen tener preferencias por ciertas clases de promotores y pueden estimular la transcripción de solo un subgrupo de genes que están bajo su influencia. A diferencia de *Drosophila*, en donde parece haber solo los dos tipos de elementos centrales del promotor antes descritos, en mamíferos se ha propuesto que los elementos centrales de los promotores son más diversos.

El estudio de los componentes que forman parte de los elementos centrales del promotor ha sido difícil pues son pocos los sitios de inicio de la transcripción que se han definido y estudiado en detalle en mamíferos. La información disponible para mamíferos permite hacer las siguientes observaciones: 1) sólo un pequeño porcentaje de los promotores tiene exclusivamente caja TATA; 2) otra

pequeña proporción de promotores tienen cajas TATA asociadas con elementos Inr; 3) los elementos DPE existen pero es difícil identificarlos; 4) muchos promotores, incluyendo aquellos que se encuentran en regiones ricas en el dinucleótido CG (islas CpG), parecen carecer de cualquiera de los tres elementos antes mencionados (Smale, 2001).

Nuestro laboratorio se interesa en el estudio de la organización de la estructura de la cromatina en organismos eucariotes y tiene como modelo experimental los genes  $\alpha$  y  $\beta$  globina de pollo. En particular, los promotores de los genes globina tienen una variedad de motivos de unión a factores transcripcionales en su secuencia de DNA, incluyendo la caja TATA, y las secuencias CCAAT y CACCC. Estos elementos también contienen una o más secuencias de unión al factor eritroide específico GATA-1. Se sabe que los elementos CACCC y el factor GATA-1 trabajan conjuntamente en las zonas regulatorias de los genes eritroide específicos. En experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* se ha corroborado que interactúan y su acción conjunta tiene consecuencias positivas en la activación de la expresión de un gen (Gregory *et al.*, 1996; Merika y Orkin, 1995).

Por otra parte, la participación de las proteínas de la familia "Krüppel-like" en la regulación de los genes globina depende del contexto del promotor. Sus miembros incluyen a las proteínas ubicuas Sp1, YY1, EKLF y BKLf/TEF-2 (Crossley *et al.*, 1996). Es interesante señalar que estos sitios de unión están presentes a lo largo del locus y no únicamente en los sitios de regulación, por ejemplo los sitios de unión para los factores YY1 y GATA-1, están dispersos a lo largo del locus  $\beta$ -globina sugiriendo que sitios lejanos pueden interactuar formando complejos entre ellos. Otros elementos de regulación pueden encontrarse no sólo en el promotor sino en los costados 5' o 3' en relación con los genes  $\alpha$  y  $\beta$  globina. La interacción de estos sitios con el promotor vuelve a la regulación de los genes globina un asunto complejo, sobre todo por la expresión diferencial de los factores y cofactores transcripcionales a lo largo del desarrollo,

la estructura de su cromatina, así como por la gran cantidad de factores que están involucrados.

### 1.2.2. "Enhancers"

Los "enhancers" fueron originalmente descritos como secuencias de DNA que incrementan la transcripción de los genes de una manera independiente de su orientación o distancia con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Khoury y Gruss, 1983). Por definición la organización de un "enhancer" es modular ya que existen distintos sitios de unión a factores nucleares que se asocian en este elemento y cuya combinación permite regular la actividad del "enhancer" en un tiempo y tejido específico (Blackwood y Kadonaga, 1998). A pesar de que hay un gran número de estudios, aún se desconoce cual o cuales son los mecanismos de acción de estos elementos de regulación, especialmente *in vivo*. Los modelos generales propuestos para la interacción entre el "enhancer" y el promotor son los siguientes:

- 1) El promotor y su correspondiente "enhancer" interactúan a distancia mediante la formación de un "loop" o asa en la cual la estructura de la cromatina probablemente está involucrada, trayendo y favoreciendo el contacto físico entre ambos elementos (Bulger y Groudine, 1999; Dorsett, 1999).
- 2) Mediante el mecanismo conocido como "tracking" o encarrilamiento, que se inicia en el "enhancer", donde la maquinaria transcripcional se ensambla y posteriormente se desliza por el DNA hasta encontrar a su promotor (Bulger y Groudine, 1999).
- 3) El mecanismo de "linking" o relevo, en el cual los contactos entre las proteínas que se encuentran en el promotor y las que se unen al "enhancer" se hacen indirectamente a través de cofactores formando un puente entre ambos elementos (Bulger y Groudine, 1999; Dorsett, 1999).

Los posibles factores que podrían estar involucrados en el funcionamiento de los "enhancers" para incrementar la transcripción de los genes sobre los que actúan son las siguientes:

*Interacciones proteína-proteína:* se piensa que los "enhancers" son funcionales mediante interacciones proteína-proteína entre factores que se unen al "enhancer" y factores que forman parte de la maquinaria transcripcional en el promotor, lo que facilitaría el inicio de la transcripción (Wang y Gjaever, 1988; Blackwood y Kadonaga, 1998; Bulger y Groudine, 1999).

*Modificaciones covalentes de proteínas:* los "enhancers" podrían promover modificaciones postraduccionales de ciertas proteínas, como son la fosforilación o la acetilación, lo que cambiaría el papel que desempeña ciertos factores sobre la actividad de transcripción (Hebbes *et al.*, 1994; García-Ramírez *et al.*, 1995)

*Estructura de la cromatina:* se ha observado que los "enhancers" parecen funcionar en el DNA asociado con proteínas y no en el DNA desnudo, por lo que la organización topológica de la cromatina parece promover la interacción entre los factores transcripcionales y el DNA. Por otro lado los "enhancers" parecen contrarrestar la actividad represora de la cromatina generando sitios de hipersensibilidad al corte por la enzima DNasa I (SH, del inglés "Site of Hypersensitivity"). Estos sitios son lugares donde la cromatina esta menos compacta, más expuesta al corte por nucleasas y más accesible para los factores de transcripción que se unen al DNA (Laybourn y Kadonaga, 1992; Blackwood y Kadonaga, 1998).

*Remodelaje de nucleosomas:* los "enhancers" podrían reclutar complejos de remodelaje de la cromatina que participan en el desplazamiento y reorganización de los nucleosomas para relajar la estructura de la cromatina y facilitar la unión de factores de transcripción a sus secuencias blanco en el DNA (Hartzog y Winston, 1997).

*Tensión helicoidal:* se ha sugerido que la topología del DNA, es decir el estado de superenrollamiento o relajación del DNA, puede jugar un papel para transmitir la actividad del "enhancer", aunque no sería un requisito indispensable para la activación transcripcional (Freeman y Garrard, 1992)



**Localización nuclear:** recientemente se ha propuesto que los "enhancers" dirigen la localización de un promotor a zonas en el núcleo donde hay una mayor concentración de factores transcripcionales y lo separan de regiones de cromatina transcripcionalmente reprimidas, como la heterocromatina centromérica. Además, la interacción entre los "enhancers" y algunas estructuras en el núcleo, como la matriz nuclear, puede inducir una topología favorable para la activación regulada de un gen (Francastel *et al.*, 1999; Recillas-Targa y Razin, 2001).

### 1.2.3. Silenciadores

Los silenciadores son elementos que tienen un efecto negativo sobre la transcripción, independientemente de la posición y orientación en que se encuentren reprimiendo activamente la transcripción, ya que interfieren con el ensamblaje de los factores generales de la transcripción de un gen homólogo o heterólogo (Brand *et al.*, 1985; Ogbourne y Antalis, 1998). Además de los silenciadores clásicos se han definido secuencias denominadas elementos reguladores negativos, cuya actividad represora es dependiente de la posición en que se localicen y cuyo mecanismo de silenciamiento no interfiere con el funcionamiento de la maquinaria basal de transcripción. El mecanismo de silenciamiento de los elementos reguladores negativos es reclutar proteínas que bloquean la unión de factores transcripcionales a sus sitios blanco en el DNA o afectar procesos postranscripcionales importantes para la expresión de un gen, como la edición de intrones, poliadenilación, inicio de la traducción y la elongación, entre otros (Clark y Docherty, 1993).

Los silenciadores y su actividad de represión transcripcional contribuyen de manera importante a la regulación de los genes de globinas. Se han identificado silenciadores para los siguientes genes globina humanos: el  $\beta$  (Berg *et al.*, 1989), el  $\epsilon$  (Cao *et al.*, 1989; Raich *et al.*, 1992; Trepicchio *et al.*, 1993; Li y Stamatoyannopoulos, 1994) y el  $\delta$  (Vitale *et al.*, 1994). El silenciamiento del gen  $\epsilon$

globina humano ha sido el más estudiado. Este gen se expresa en el embrión desde los primeros días hasta que, entre la semana 5-10 de gestación ocurre un relevo en la expresión de este gen embrionario por el gen  $\gamma$  (Stamatoyannopoulos y Nienhuis, 1994). El silenciador del gen  $\epsilon$  fue descrito en la región entre -392 y -177 pb en el costado 5' del mismo gen. Por medio de ensayos con transfecciones transitorias esta región fue restringida entre -247 y -290 pb (Cao *et al.*, 1989; Gutman *et al.*, 1992). En experimentos de interacción proteína-DNA tipo "footprinting" realizados para tratar de definir los sitios de unión a factores involucrados en la actividad de silenciamiento, se encontró una secuencia parecida al sitio de unión del factor ABF-1, que también se traslapaba con un sitio consenso de unión al factor YY1, factor importante para la regulación de la expresión del gen  $\epsilon$ : (Peters *et al.*, 1993). En el presente trabajo un mecanismo similar parece estar involucrado en la regulación de la actividad del "enhancer" del extremo 3' del grupo de genes  $\alpha$ - globina.

#### 1.2.4. "Locus Control Region" (LCR)

El LCR se define con base en la presencia de un conjunto de SHs. Los LCR son tejido específicos y tienen una influencia positiva sobre la transcripción de los genes de los dominios en que se localizan. El LCR del locus  $\beta$ -globina humano fue el primero en ser identificado y se describió como una región localizada entre 8 a 22 kb río arriba a partir del primer gen del dominio, el gen embrionario  $\epsilon$  (Tuan *et al.*, 1985; Forrester *et al.*, 1987; Grosveld *et al.*, 1987). El primer indicio de que este elemento tenía una relación con la expresión de los genes globina se dio cuando se encontraron deleciones naturales en esta región en pacientes con talasemias. Estas deleciones abarcan una gran región genómica en el costado 5' del locus  $\beta$ -globina y provocan una seria disminución en los niveles de expresión de los genes globina, a pesar de que estos no presentaban mutaciones, lo que sugiere un efecto debido a la ausencia de una región activadora o reguladora (Kioussis *et al.*, 1983; Curtin *et al.*, 1985; Driscoll *et al.*, 1989). Otro dato

importante se derivó a partir de la producción de ratones transgénicos para los genes  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\beta$  humanos. Estos ratones fueron incapaces de alcanzar niveles normales en la transcripción de los transgenes lo cual parecía indicar que la región 5' no codificante de los genes globina, que no fue incluida en la construcción, participaba de manera crítica en la regulación de la expresión de esos genes. La zona regulatoria coincidía con una región donde se agrupaban al menos seis SHs. Un experimento que corroboró la importancia de esta región fue la generación de un transgen que comprendía al gen  $\beta$ -globina acoplado al LCR. Esta construcción presentó un nivel de expresión constante, independiente del sitio de integración, tejido específica y relacionada directamente con el número de copias integradas, sugiriendo una actividad dominante del LCR (Grosveld *et al.*, 1987).

Los LCRs están asociados con una actividad tipo "enhancer" complementada con un proceso de apertura o remodelaje de la cromatina en el ámbito de un dominio (Bulger y Groudine, 1999). Recientemente se han propuesto nuevos mecanismos para explicar la forma en que actúan los LCRs:

"*Looping*". Este mecanismo propone que el LCR forma un "loop" o asa, reclutando a diversos factores incluyendo a la maquinaria de transcripción, permitiendo una mayor interacción a distancia entre el promotor de un gen dado y el LCR (Bulger y Groudine, 1999)

"*Tracking*". En este modelo se propone el reclutamiento de factores de transcripción en la zona del LCR, para después desplazarse a través de la cromatina como si estuvieran "encarrilados", con la ayuda de complejos de remodelaje de la cromatina (Bulger y Groudine, 1999). Este es uno de los modelos con menos evidencias experimentales que lo apoyen.

"*Linking*". Este modelo surge de estudios de genética del gen *Chip* en *Drosophila* y propone que las interacciones a distancia se dan a través de uniones proteína-proteína intermedias con factores que no se unen al DNA y que parecen ser una especie de relevo que favorece la comunicación a distancia, teniendo como consecuencia una acción positiva y regulada sobre la activación transcripcional (Bulger y Groudine, 1999; Dorsett, 1999)

*Transcritos intergénicos.* En el dominio  $\beta$ -globina se ha encontrado que se transcriben regiones no codificantes, denominados transcritos intergénicos, que tienen una relación directa con la apertura de la cromatina y que se inician a partir del LCR.

En resumen son varios los elementos que son necesarios para regular la transcripción de un gen. En primer lugar tenemos al promotor que constituye una región esencial para este proceso ya que es la encargada de reclutar la maquinaria basal de transcripción. Después encontramos a los elementos de regulación a distancia, como los "enhancers", silenciadores y los LCRs, cuya finalidad es interactuar con el promotor para modular los niveles de transcripción en un momento específico del desarrollo.

### **1.3. FACTORES TRANSCRIPCIONALES ESPECÍFICOS ASOCIADOS A LA REGULACIÓN ERITROIDE**

#### **1.3.1. Factor transcripcional eritroide específico GATA-1**

El factor GATA-1 es el factor transcripcional específico y clave en la diferenciación eritroide. Perteneció a la familia de factores GATA que reconocen la secuencia consenso (A/T)GATA(A/G) y poseen dominios de unión al DNA altamente conservados del tipo de dedos de zinc: Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (Evans *et al.*, 1989; Trainor *et al.*, 1990; Omichinski *et al.*, 1993). Los factores de la familia GATA en vertebrados tienen dos dedos de zinc, en *Caenorhabditis elegans* la proteína elt-1 tiene también dos dedos de zinc mientras en hongos sólo presentan un solo dedo de zinc. En particular en pollo, el factor GATA-1 constituye una proteína básica de 38 kDa con dos dedos de zinc (Evans y Felsenfeld, 1989; Omichinski *et al.*, 1993).

Dentro de la familia de factores GATA se han determinado seis miembros: GATA-1, GATA-2 y GATA-3, que son factores transcripcionales esenciales en el proceso de hematopoyesis, mientras que GATA-4, GATA-5 y GATA-6 son factores transcripcionales reguladores del desarrollo en corazón, pulmón e intestino (Tang *et al.*, 2001). GATA-1 fue el primero en ser identificado, inicialmente como una proteína nuclear eritroide, nombrada Eryf1 y posteriormente GATA-1 (Evans *et al.*, 1988). GATA-1 se expresa en altos niveles en células eritroides, células cebadas y megacariocitos, y a bajos niveles en células progenitoras totipotenciales y en las células de Sertoli en testículos de ratón joven (Weiss y Orkin, 1995b). Se ha demostrado que GATA-1 es esencial para la maduración de precursores eritroides y de megacariocitos, en los primeros la ausencia del factor causa apoptosis (Pevny *et al.*, 1995; Weiss y Orkin, 1995a), mientras que en los megacariocitos la falta de GATA-1 tiene que ver con hiperproliferación (Shivdasani *et al.*, 1997) por lo tanto, el factor GATA-1 se encuentra relacionado con división o muerte, dependiendo del contexto celular. El sitio de unión al factor GATA-1, además de encontrarse en la mayoría de los promotores de genes eritroides, se ha encontrado en promotores de megacariocitos, células cebadas y células endoteliales. Estos sitios de unión también se localizan en los "enhancers" de genes globina, en los genes de las cadenas  $\alpha$  y  $\delta$  del receptor de células T (que es regulado por GATA-3) y en diversos LCRs de origen eritroide como el del dominio  $\beta$ -globina humano (Orkin, 1992).

Por otra parte el gen *GATA-1* en ratón está localizado en el cromosoma X y su expresión se encuentra regulada por dos promotores alternativos, el distal llamado IT y el proximal denominado IE. El promotor IT parece que define la especificidad de la expresión de *GATA-1* en células de Sertoli, mientras que el sitio IE dirige la expresión en células hematopoyéticas (Tsai *et al.*, 1991). Una región de 900 pb en el costado 5' de IE es suficiente para conservar la especificidad en la expresión. Por otra parte experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado, contrariamente a lo que se esperaba, que los transcritos a partir del promotor IT aumentan durante la diferenciación de células eritroides, lo

cual también está asociado al aumento en la expresión de otros factores eritroides importantes como EKLF, SCL y NF-E2, evento que precede a una disminución en los niveles de GATA-2, EpoR y Myb, genes que no se asocian a diferenciación eritroide (Vannucchi *et al.*, 1999). Otros elementos que también contribuyen a la actividad del promotor del gen *GATA-1* son dos cajas proximales CACCC separadas por 17 pb y dos sitios de unión GATA que unen al factor GATA-1 de una manera asimétrica (Tsai *et al.*, 1991), lo que significa que la regulación del gen *GATA-1* involucra al mismo factor GATA-1. Recientemente se ha demostrado que GATA-1 no es indispensable para la activación o mantenimiento de la expresión del gen, en consecuencia a esta región se pueden unir otros factores de la familia GATA, por lo que debe existir una interconexión entre GATA-1 y los diferentes miembros de esta familia para regular la expresión hematopoyética de este factor (McDevitt *et al.*, 1997).

### 1.3.2. Cofactor transcripcional FOG

Por medio del sistema de doble híbrido Tsang y colaboradores (1997) utilizaron el dominio de unión a DNA de la proteína GATA-1 para tratar de identificar alguna proteína asociada a este factor. Los resultados demostraron la interacción de GATA-1 con una nueva proteína que poseía múltiples dedos de zinc, la cual se nombró FOG-1 (del inglés: "Friend of GATA-1"). Este factor es coexpresado con GATA-1 durante el desarrollo embrionario en megacariocitos y células eritroides en ratón (Tsang *et al.*, 1997). Su homólogo en *Drosophila* es la proteína "U-shaped" que interacciona con el factor GATA llamado "Pannier" (Haenlin *et al.*, 1997). La proteína FOG-1 tienen nueve dedos de zinc, de los cuales los dedos 1, 5, 6 y 9 son parecidos a los del factor general de transcripción TFIIIA (con una estructura Cys-Cys:His-His). Estas estructuras peptídicas son capaces de interactuar con GATA-1 a través del dedo de zinc de la región amino terminal de este factor (Fox *et al.*, 1999). La múltiple interacción de FOG-1 con GATA-1 a través de varios dedos de zinc hace suponer que, a lo largo de la evolución, FOG-1 duplicó sus dedos de zinc multiplicando su capacidad de

interaccionar con GATA-1, con lo cual logró controlar mejor su unión a este factor y de esta manera modular de una mejor forma la actividad de GATA-1. Esto se confirma con los resultados en los que se demuestra que cada dedo de zinc contribuye de manera independiente a regular la activación dependiente de GATA-1 (Fox *et al.*, 1999). Otra propuesta es que estos dominios de interacción duplicados pudieran servir a FOG para unir al mismo tiempo a diferentes factores GATA y de esta forma crear un puente de interacción entre dos sitios de unión a GATA lejanos (Fox *et al.*, 1999). El modelo anterior es interesante, aunque no explica por que mutaciones en una línea celular hematopoyética en donde FOG-1 solo puede interactuar con una sola molécula de GATA-1 a la vez, fueron capaces de completar su maduración eritroide. Por lo tanto queda por determinar si otras regiones fuera del sitio de unión a GATA-1 en FOG-1 son importantes en su actividad, ya que podrían permitir la unión de otros cofactores (Cantor y Orkin, 2001).

La interacción entre GATA-1 y FOG-1 es imprescindible para la diferenciación terminal de eritrocitos y para la maduración de megacariocitos en ratón tanto *in vitro* como *in vivo* (Tsang *et al.*, 1997; Crispino *et al.*, 1999). Crispino y colaboradores (1999) observaron que, células deficientes en GATA-1 y que normalmente pueden completar su maduración eritroide cuando se transfectan con una construcción con el gen *GATA-1*, no maduran cuando *GATA-1* tienen una mutación en el dominio de interacción con FOG-1. Por otra parte, la sobreexpresión del factor FOG que tenía una mutación compensatoria que le permitía interaccionar con el factor *GATA-1* mutado, rescataba el fenotipo, confirmando que la interacción de *GATA-1* y *FOG-1* es clave para la maduración eritroide. Una mutación similar en *GATA-1* fue encontrada en el humano, lo que provoca en el individuo una severa anemia y trombocitopenia, es decir una disminución de los niveles de hemoglobina y del número de plaquetas en la sangre (Nichols *et al.*, 2000). La influencia de *FOG-1* sobre la actividad de *GATA-1* es variable, ya que en algunos casos va acompañada de un sinergismo en la activación transcripcional de *GATA-1*, como lo demuestran experimentos con transfecciones

transitorias en células de mamífero en las que hay una *trans*-activación en células hematopoyéticas de ratón del promotor de p45 NF-E2, debida a un interacción entre FOG-1 y GATA-1 (Tsang *et al.*, 1997). En otros promotores FOG-1 puede actuar como co-represor como en el caso del promotor de EKLF y el de la hormona de crecimiento (Fox *et al.*, 1999). Aunque FOG-1 por si mismo tiene cierta actividad represora, su actividad como co-represor aumenta cuando se asocia con la proteína co-represora CtBP (Fox *et al.*, 1999).

Es importante señalar que la clase de dedos de zinc que se encuentra en las proteínas EKLF y Sp1, tienen la capacidad de interactuar con los dedos de zinc de las regiones carboxilo y amino terminales de GATA-1 (Merika y Orkin, 1995). Estas interacciones son muy importantes en la regulación específica de la expresión de genes eritroides.

### 1.3.3. Factor transcripcional NF-E2

Este factor fue descubierto analizando al promotor del gen eritroide de la porfobilinógeno deaminasa y el segundo sitio de hipersensibilidad a la DNasa I (SH2) del LCR en el locus  $\beta$  globina humano (Mignotte *et al.*, 1989; Talbot y Grosveld, 1991). La secuencia a la que se une este factor es parecida a la del factor AP-1 [(T/C)TGCTGA(C/G)TCA(T/C)] y se nombró NF-E2 (del inglés "Nuclear Factor Erythroid 2"). NF-E2 es una proteína formada por dos subunidades, p45 y p18. Ambas subunidades pertenecen a la familia de proteínas del tipo cremalleras de leucina básicas, que se sabe se unen al DNA como dimeros (Andrews *et al.*, 1993a; Andrews *et al.*, 1993b; Ney *et al.*, 1993). La subunidad p45 es la más grande, se expresa únicamente en tejidos hematopoyéticos y está relacionada con la proteína cnc (del inglés "cap'n collar") en *Drosophila*, la *skn-1* en *C. elegans* y en mamíferos con las proteínas Nrf1/LCRF1 (Caterina *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1993) y Nrf2 (Moi *et al.*, 1994). La subunidad p18 de menor tamaño, se expresa en numerosos tejidos y está



relacionada por su dominio de unión al DNA con las proteínas de la retina NRL y la oncoproteína de pollo v-Maf (Andrews *et al.*, 1993a; Igarashi *et al.*, 1994). Ratones con una mutación tipo "knock out" para p45 se desarrollan casi normalmente, esto se debe a que otras proteínas del grupo de AP-1 pueden compensar algunas de las funciones de p45. La mayor anormalidad en estos animales es una severa trombocitopenia debida a que se detiene la maduración de los megacariocitos (Shivdasani *et al.*, 1995). Se sabe que otros miembros de las proteínas Maf se pueden unir a la subunidad p45, aunque el dímero p18/p45 es el que interacciona con mayor afinidad con el sitio NF-E2 en el DNA, siendo la subunidad p18 la responsable de una especificidad mayor a la unión del complejo NF-E2 al DNA (Behringer *et al.*, 1990). Las mutantes para p18 también tienen un desarrollo normal hasta llegar a la etapa adulta con megacariocitos y células eritroides normales (Kotkow y Orkin, 1996), lo que sugiere que otro miembro de las proteínas Mafs podría sustituir a p18. En resumen NF-E2 es un componente clave en la regulación eritroide y se encuentra asociado a numerosos elementos de control en los loci globina.

Recientemente se ha descubierto en líneas celulares eritroleucémicas de ratón, que p18 y p45 están presentes en el núcleo celular y presentan baja capacidad de unión al DNA, debido a que se localizan en diferentes compartimentos nucleares. La subunidad p18 se localiza en el compartimento de heterocromatina centromérico, mientras que p45 ocupa el compartimento de eucromatina. Coincidiendo con la etapa de diferenciación, p18 se relocaliza hacia el compartimento de eucromatina, siendo éste el paso limitante para la formación del dímero p18/p45. Esta relocalización de p18 del compartimento de heterocromatina hacia el compartimento de eucromatina coincide con la activación del locus  $\beta$ -globina y su relocalización (Francastel *et al.*, 2001).

### 1.3.4. Factor transcripcional EKLF

El factor EKLF (del inglés: "Erythroid Krüppel-like factor") se une a la secuencia CACC que se localiza generalmente en promotores eritroides. A este sitio también puede unirse el factor Sp1 y otros factores relacionados, pero a diferencia de estas proteínas, la expresión de EKLF está restringida a células eritroides y algunos precursores hematopoyéticos (Miller y Bieker, 1993; Southwood *et al.*, 1996). Este hallazgo fue importante ya que no se había encontrado una proteína eritroide específica que reconociera al sitio CACC y dado que Sp1 es un factor ubicuo, EKLF era un candidato clave para participar activamente en la diferenciación eritroide.

La proteína presenta tres dedos de zinc tipo Cys-Cys:His-His en el carboxilo terminal, que se parecen a los encontrados en FOG-1 (Miller y Bieker, 1993). Experimentos muestran que EKLF activa la transcripción del promotor  $\beta$ -globina en ensayos de transfecciones transitorias a través de un dominio de *trans*-activación rico en prolinas. La activación de la transcripción por EKLF aumenta de una manera dramática cuando se incluye el sitio SH2 del LCR, sugiriendo que EKLF puede facilitar la interacción a distancia entre el SH2 del LCR y el promotor (Donze *et al.*, 1995). EKLF puede ser fosforilada en residuos de serina y treonina, pero no en los de tirosina. Una mutación que impide la fosforilación en la treonina 41 disminuye la capacidad de EKLF para activar la transcripción, lo que sugiere que la fosforilación puede ser importante para la interacción de EKLF con otros factores (Ouyang *et al.*, 1998). La mutación tipo "knock out" de EKLF en ratones conlleva a una profunda talasemia (anemia severa) y es letal a los 15 días de gestación, a pesar de que la expresión de las globinas  $\alpha$  y  $\gamma$  en el saco vitelino no se ven afectadas (Nuez *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1995). Esto demuestra que la especificidad de EKLF por los sitios de unión es variable, ya que todos los genes globina tienen en su promotor el sitio de unión a este factor, pero solo la transcripción para el gen  $\beta$  se ve afectada. También demuestra que Sp1 u otros

factores relacionados a EKLF no pueden compensar su ausencia. La secuencia de unión de EKLF *per se* y las secuencias aledañas al mismo son importantes para tener una mayor o menor afinidad al factor. Por ejemplo, se ha observado que la proteína DRED que se une a una secuencia AGGTCA, nombrada directa repetida (DR) impide que EKLF se una a su secuencia en el promotor  $\epsilon$ , lo que provoca el silenciamiento de la transcripción de este gen globina embrionario (Tanimoto *et al.*, 2000). Mutaciones puntuales en la caja CACC están asociadas a un incremento en los niveles de la hemoglobina fetal lo cual demuestra el papel de EKLF en el cambio de expresión de las globinas fetales a adultas. Esto está relacionado con la incapacidad del gen  $\beta$  para competir con el gen  $\gamma$  por el LCR para generar una estructura cromatinica abierta alrededor de los genes  $\beta$ -globina adultos. Datos relacionados con la estructura de la cromatina en el ratón con la mutación tipo "knock out" para EKLF, muestran que el promotor  $\beta$ -globina es más resistente al corte por la DNasa I lo que sugiere una estructura más compacta de la cromatina (Wijgerde *et al.*, 1996). Un punto importante relacionado con la función de EKLF es su interacción con otras proteínas que forman el complejo coactivador remodelador de la cromatina EKLF (E-RC1, del inglés: "EKLF Coactivator Remodeling Complex"), un complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP. La proteína Brg-1 es una ATPasa que forma parte de E-RC1 y la actividad reguladora de EKLF es dependiente de la acción *in vitro* de este complejo de remodelaje en la cromatina (Armstrong *et al.*, 1998).

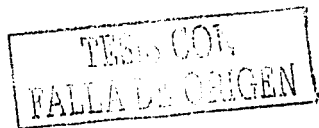
Se ha demostrado que EKLF también puede asociarse con acetilasas de histonas (HATs del inglés: "Histone acetil-transferases") que acetilan a esta proteína, y desacetilasas de histonas (HDACs del inglés: "Histone deacetilases") que tienen la función contraria. En particular se ha descrito su interacción con el complejo de acetilasas de histonas p300/CBP (Ogrizko *et al.*, 1996) que acetila a EKLF en la lisina que se encuentra en o cerca de su sitio de localización nuclear (Zhang y Bieker, 1998). La interacción de p300 con EKLF es fuerte, como lo demuestran resultados de co-inmunoprecipitación en células eritroides y está asociada con un incremento en la actividad de *trans*-activación de EKLF, pero no

se sabe si este aumento es el resultado de un incremento en la interacción de EKLF acetilado con E-RC1 o si la interacción de EKLF con las HATs hace que estas últimas sean reclutadas al promotor, estableciendo un puente proteína-proteína (Zhang y Bieker, 1998).

### 1.3.5. Factor transcripcional YY1

El factor YY1, también conocido como factor  $\delta$ , Nf-E1 y UCRBP, es un factor de transcripción ubicuo y multifuncional que puede ser tanto activador como represor de la transcripción en diversos genes (Yao *et al.*, 2001). YY1 tiene la capacidad de unirse por medio de cuatro dedos de zinc tipo Cys-Cys:His-His a la secuencia nucleotídica CGCCATNTT localizada en varios promotores, tanto de genes virales como celulares, regulando la expresión de proteínas importantes en diferenciación celular y crecimiento como son c-Myc, c-Fos, p53,  $\alpha$ -actina, interferon gamma, el P5 de adenovirus y las oncoproteínas E6 y E7 de virus del papiloma humano (VPH) (Yao *et al.*, 2001). YY1 es un factor altamente conservado en diferentes especies como humano, ratón, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, entre otras (Seto *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1998). La mutación tipo "knock out" de YY1 da como resultado una deficiente implantación del embrión provocando su muerte, lo cual muestra la importancia de este factor durante las etapas tempranas del desarrollo (Donohoe *et al.*, 1999).

YY1 posee dos dominios de represión, uno rico en lisinas y glicinas entre los residuos 170 al 200 y el otro que corresponde a un dedo de zinc, localizado en la región carboxilo-terminal (Yang *et al.*, 1996), además tiene un dominio de activación independiente en la región amino terminal. Esta organización estructural parece correlacionar con la actividad dual de YY1 como un factor activador y represor de la transcripción. Se ha propuesto que para tener alguna de las dos actividades la concentración del factor (Bushmeyer *et al.*, 1995), su interacción con otros factores transcripcionales (Bauknecht *et al.*, 1996) y las secuencias que

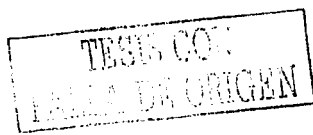


rodean su sitio de unión son factores importantes para establecer que tipo de actividad va desempeñar (Shrivastava *et al.*, 1993). Sin embargo, no se tiene una idea clara acerca de los componentes o factores claves que regulan la función de este factor transcripcional. YY1 es una proteína que puede ser fosforilada y que parece estar presente ubicuamente a lo largo del ciclo celular e independientemente del estado de diferenciación celular, sugiriendo que su actividad pudiera ser regulada a nivel postraduccional (Austen *et al.*, 1997).

La interacción de YY1 con otros factores transcripcionales como un posible mecanismo de regulación, concuerda con el descubrimiento de su asociación a numerosas proteínas, entre las cuales se encuentran factores de la maquinaria basal de transcripción, como TBP (Austen *et al.*, 1997), TFIIB (Usheva y Shenk, 1994), activadores como Sp1 (Lee *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1993), c-Myc (Shrivastava *et al.*, 1993), ATF/CREB (Zhou *et al.*, 1995), C/EBP (Bauknecht *et al.*, 1996) y con varios cofactores como E1A (Lewis *et al.*, 1995), TAFII55 (Chiang y Roeder, 1995), las HATs p300 y CBP (Austen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1995) y las desacetilasas de histonas HDAC1, HDAC2 y HDAC3. En particular la interacción con las HATs y HDACs permite proponer al mecanismo de acetilación y desacetilación de histonas, como un factor determinante de regulación de su actividad. Se ha demostrado que la interacción de YY1 con p300 está asociada funcionalmente con activación, mientras que su interacción con HDAC2 con represión (Yang *et al.*, 1996). La acetilación de YY1 por p300 y PCAF y su desacetilación HDACs ha sido demostrada (Yao *et al.*, 2001). p300 y PCAF acetilan a YY1 en el dominio de represión que se encuentra entre los residuos 170 a 200. PCAF además acetila a YY1 en el dominio de unión a DNA que está en la región carboxilo-terminal. La acetilación en el dominio entre los residuos 170 a 200 está asociada con la represión transcripcional y convierte a YY1 en un blanco para las desacetilasas. Sin embargo, el dominio de la región carboxilo-terminal no se desacetila y al parecer estabiliza la interacción de las HDACs a través de otras proteínas no identificadas y disminuye su actividad de unión al DNA de YY1 (Yao *et al.*, 2001).

Hasta aquí se han descrito brevemente algunas de las principales características de importantes factores involucrados en la regulación eritroide como son GATA-1, EKLF, NF-E2, FOG y YY1. Hasta hace algún tiempo todos estos factores estaban tradicionalmente asociados a una actividad positiva de *trans*-activación, es decir, eran considerados activadores transcripcionales. Estudios en los últimos años han cambiado la visión que se tenía de estos factores, pues dependiendo del contexto en que se encuentre el sitio de unión de estos factores, su concentración, el tipo celular y el momento específico del desarrollo van a funcionar como activadores, co-activadores, represores o co-represores. Como ejemplo podemos citar la interacción del factor GATA-1 con YY1, donde dicha asociación da como resultado la represión del gen globina humano  $\beta$  (Raich *et al.*, 1995). Otro ejemplo sería el factor EKLF que es considerado generalmente como un activador de la expresión del gen globina adulto  $\beta$ . Este factor tiene la capacidad de interactuar con la proteína mSin3A la cual recluta a la desacetilasa de histonas HDAC1 lo cual convierte a EKLF en un represor, a través de la inducción de una estructura de la cromatina altamente compacta (Chen *et al.*, 2001). Otro punto muy importante son los niveles de proteína de cada uno de estos factores, ya que la concentración de los factores puede variar a lo largo del desarrollo, lo que resulta en diferencias en su papel regulatorio. Las variaciones en la concentración de factores y el efecto que tienen sobre la regulación eritroide son de los temas que se abordan en este trabajo.

Con lo anterior se puede deducir que las interacciones entre los diferentes factores y los mecanismos de regulación específicos para cada uno de ellos reflejan lo complejo que son los mecanismos de regulación y lo mucho que falta por investigar para tener un panorama completo de la regulación de la expresión de los genes eritroides a lo largo del desarrollo y en el contexto de la estructura de la cromatina.



#### 1.4. FAMILIAS MULTIGÉNICAS $\alpha$ y $\beta$ GLOBINA DE POLLO.

Las familias multigénicas  $\alpha$  y  $\beta$  globina de pollo se encuentran en diferentes cromosomas, la primera se localiza en el minicromosoma 14 y la segunda en el cromosoma 1. Cada locus contiene genes globina embrionarios y adultos que se expresan diferencialmente a lo largo del desarrollo (Minie *et al.*, 1992; Recillas-Targa *et al.*, 1995; Recillas-Targa, 2000). La ventaja de este sistema modelo es que a diferencia del sistema humano o de ratón, los genes se restringen a embrionarios y adultos no existiendo genes fetales, además de que las células se mantienen nucleadas a lo largo de todas las etapas de diferenciación.

El dominio  $\alpha$ -globina de pollo está compuesto por un gen embrionario  $\pi$  y dos genes adultos  $\alpha^A$  y  $\alpha^D$ , siendo el  $\alpha^A$  el que se expresa mayoritariamente.  $\alpha^A$  y  $\alpha^D$  también se expresan en la etapa embrionaria, aunque en niveles bajos, siendo la expresión mayoritaria la del gen embrionario  $\pi$  (Fig. 1). En el dominio  $\beta$ -globina se encuentran los genes embrionarios  $\rho$  y  $\epsilon$ ; y los genes adultos  $\beta^A$  y  $\beta^H$ . Los heterodímeros que se asocian para formar las hemoglobinas en etapa embrionaria son  $\pi/\rho$  y la  $\pi/\epsilon$ ; las cuales se encuentran presentes hasta el quinto día de desarrollo embrionario. A partir del quinto día ocurre un cambio en la expresión de los genes globina, en el dominio  $\alpha$  se silencia  $\pi$  y aumenta la expresión de  $\alpha^A$  y  $\alpha^D$ , mientras que en el dominio  $\beta$ -globina se silencian  $\rho$  y  $\epsilon$ , activándose la expresión de  $\beta^A$  y  $\beta^H$ , formándose los heterodímeros  $\alpha^A/\beta^A$ ,  $\alpha^A/\beta^H$ ,  $\alpha^D/\beta^A$  y  $\alpha^D/\beta^H$  (Fig. 1).

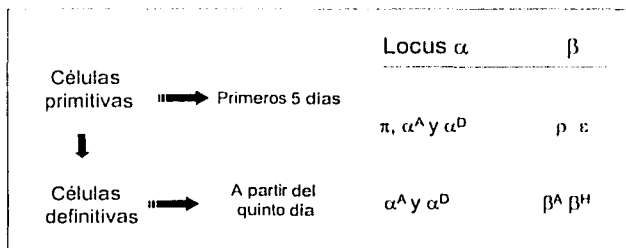
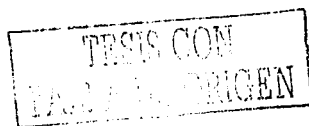


Figura 1. Patrón de expresión de los genes globina en el pollo. Se muestran los genes localizados en el dominio  $\alpha$  y  $\beta$ , las células y el tiempo en el que estos se expresan.

### 1.3.1. Familia multigénica $\alpha$ -globina de pollo y antecedentes particulares.

El dominio  $\alpha$ -globina de pollo se localiza en una región de DNA que abarca 25 kb (Fig. 2; Felsenfeld, 1993; Recillas-Targa *et al.*, 1995; Recillas-Targa, 2000). En el costado 5' del gen embrionario  $\pi$  existe una serie de SHs con una función tipo LCR, es decir, la de fomentar la abertura de la cromatina y favorecer la expresión específica de los genes globina a lo largo del desarrollo (Recillas-Targa *et al.*, 1995; Higgs, 1998). En busca de elementos de regulación en el costado 3' del dominio  $\alpha$ -globina se realizó una comparación de esta región entre las secuencias del pollo y de pato (Recillas-Targa *et al.*, 1993b), con base en la predicción que sugiere que elementos importantes para la regulación de la expresión de los genes  $\alpha$ -globinas estarían conservados en ambos organismos. El resultado del alineamiento de estas dos secuencias homólogas estableció tres zonas altamente conservadas que fueron posteriormente caracterizadas funcionalmente (Recillas-Targa *et al.*, 1993). Lo anterior se realizó subdividiendo la región 3' y midiendo el efecto que las diferentes construcciones tenían sobre la actividad del gen reportero de la enzima cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) bajo el control del promotor SV40. Los experimentos que se realizaron fueron transfecciones transitorias en células HD3, que corresponden a una línea celular transformada de pollo y que se encuentra en el estado de eritroblasto, donde los genes globina son transcripcionalmente activos (Recillas-Targa *et al.*, 1993b). En la región donde se identificaron tres sitios consenso de unión para el factor GATA-1, se detectó una clara actividad tipo "enhancer". La unión del factor GATA-1 a estas secuencias y la actividad de "enhancer" fue confirmada por dos grupos de investigación independientes (Fig. 3A; Knezetic y Felsenfeld, 1989; Recillas-Targa *et al.*, 1993a). Paralelamente, usando como modelo al pato, se identificó una región conservada de 1.3 kb en el costado 3' del dominio de genes  $\alpha$ -globina, la cual también tiene una actividad de tipo "enhancer", lo que concuerda con la predicción evolutiva y el análisis de las secuencias de esta región entre pato y pollo (Fig. 2; Recillas-Targa *et al.*, 1993b). Los cuatro segmentos de alta homología arriba de la región del "enhancer" mostraron una actividad de





silenciamiento, reduciendo la actividad del gen reportero tanto en promotores homólogos como heterólogos de pollo. Los experimentos *in vitro* de interacción proteína-DNA tipo "footprinting" han revelado que dentro de esta región hay por lo menos tres regiones de interacción proteína-DNA, que se denominaron SF1 (del inglés: "Silencer Factor"), SF2 y SF3 ( Fig. 2; Recillas-Targa *et al.*, 1993b).

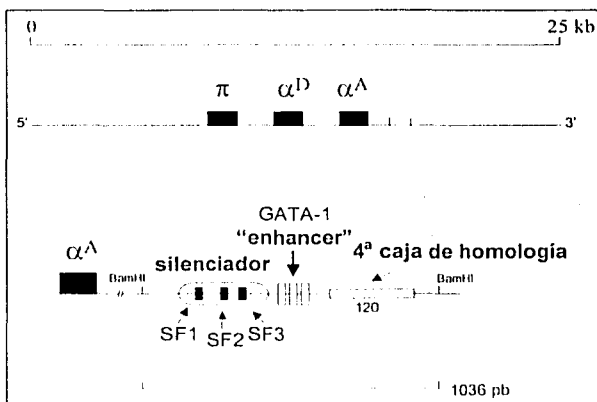


Figura 2. Esquema del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y la región 3'. En la parte superior se muestran los genes globina, siendo  $\pi$  el gen embrionario y  $\alpha^D$  y  $\alpha^A$  los genes adultos que se expresan a partir de los días 4-5 del desarrollo. En la parte inferior, el fragmento de DNA de 1 kb muestra al silenciador con los sitios de unión a los factores SF1 (ver texto), SF2 y SF3 y al "enhancer" compuesto por tres sitios de unión al factor eritroide específico GATA-1. La denominada 4ª caja de homología corresponde a un fragmento de 120 pb que tiene una alta homología con las secuencias de pato, lo que sugiere una región conservada (Recillas-Targa *et al.* 1993b; 1995).

Los experimentos de "footprinting" realizados con la región que abarca la 4ª caja de homología permitieron identificar la unión de por lo menos tres factores nucleares, lo que sugirió la formación de un complejo multipéptido en esta zona (Fig. 3; Recillas-Targa *et al.*, 1993a; 1995). En este punto cabe señalar que el alineamiento de las secuencias de pato y pollo permitió definir a la 4ª caja de homología. Como demostraremos más adelante en este trabajo, el fragmento de 120 pb es parte integral del elemento "enhancer".

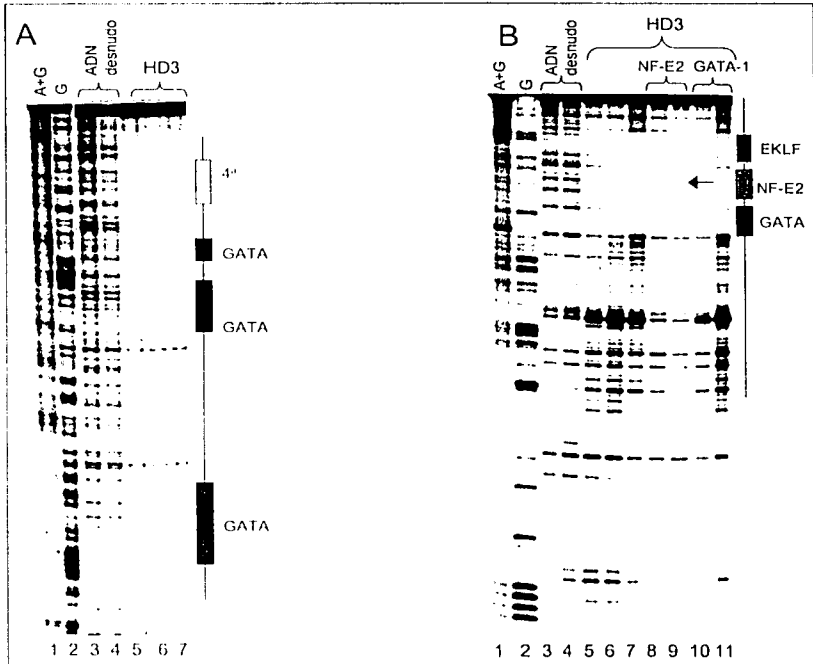
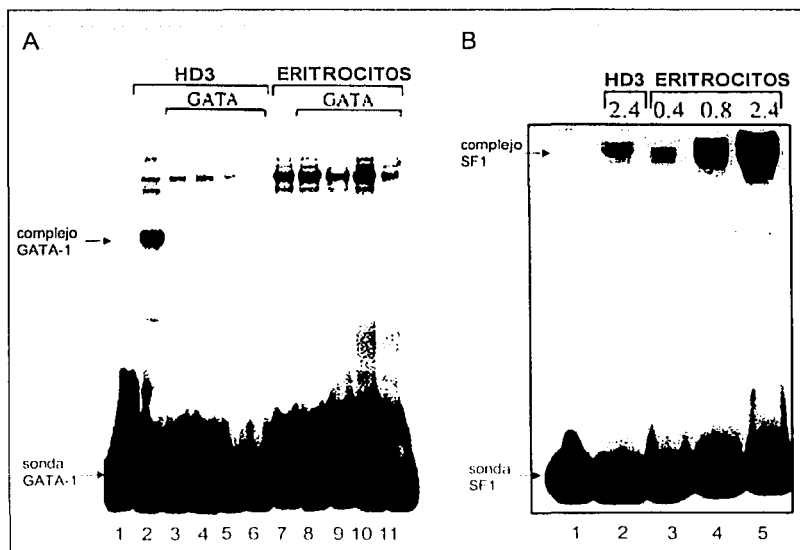


Figura 3. A. "Footprint" de la región del "enhancer" y la 4ª caja de homología. En los carriles 1 y 2 se encuentran las reacciones de Maxam & Gilbert de secuencia de A+G y G respectivamente, en los carriles 3 y 4 la digestión con concentraciones crecientes de DNasa I y en los carriles 5 y 6 la protección a la digestión por los extractos protéicos nucleares de células HD3 que corresponde a los tres sitios GATA-1 del "enhancer" y a la región de la 4ª caja de homología. B. "Footprint" de la región de la 4ª caja de homología, se puede observar como en la figura A los carriles de la secuencia y de digestión a la DNasa I. En los carriles 5, 6 y 7 se observa la protección a la digestión que define el footprint a los sitios de unión de los factores EKLf, NF-E2 y GATA-1. En los carriles 8 y 9 se compitió con un oligonucleótido no marcado radioactivamente con la secuencia consenso para el factor NF-E2 (Recillas-Targa, datos no publicados), lo que hace que reaparezca la banda de digestión en esta región (flecha). En los carriles 10 y 11, cuando se compite con un oligonucleótido consenso para el factor GATA-1 (sonda para el factor GATA-1 del gen  $\beta$ -globina adulto humano) y no reaparece no solo la banda que corresponde al sitio de unión de este factor sino también para los de los sitios NF-E2 y EKLf (carril 11). Figura tomada de Recillas-Targa (datos no publicados). En el carril 10 se utilizó una concentración de oligonucleótido menor que en 11 que no es suficiente para observar ningún efecto.

Complementado estos resultados se hicieron geles de retardo en los que se usó una sonda consenso para el factor GATA-1. Los resultados mostraron que la abundancia del factor GATA-1 es diferente en la línea celular HD3 (Fig. 4), correspondiente a la etapa de eritroblasto, donde las células no están diferenciadas y los genes globina se preparan para ser expresados, en comparación a eritrocitos terminalmente diferenciados, donde los genes globina ya están completamente silenciados (Fig. 4; Recillas Targa *et al.*, 1995). Como se puede apreciar en la Fig. 4A en presencia de extractos nucleares de células HD3 el complejo mayoritario fue el formado por el factor GATA-1 mientras que en eritrocitos terminalmente diferenciados el complejo GATA-1 es apenas perceptible. Esto correlaciona con la actividad transcripcional de los genes y con la actividad positiva de GATA-1 en la transcripción de genes eritroides, ya que en HD3 los genes se encuentran transcripcionalmente activos mientras que en eritrocitos terminalmente diferenciados los genes globina están silenciados y la concentración del factor GATA-1 disminuye notoriamente (Fig. 4A, comparar carriles 2 y 7). En esta misma figura se puede observar un segundo complejo en la parte superior, cuya abundancia está en relación inversa a la que se observó para el complejo de retardo formado por GATA-1. En HD3 el complejo es escaso y por el contrario en eritrocitos el complejo es más abundante. La proteína que estaría formando este segundo complejo no se ha identificado y pensamos que pudiera ser una proteína que compita o module la unión del factor GATA-1 al sitio de unión a GATA-1 en este fragmento de DNA que corresponde a la 4ª caja de homología (Recillas-Targa *et al.*, 1995).

En la Fig. 4B. se puede observar el gel de retardo para el factor SF1 que se une a la región del silenciador. Contrariamente a lo que sucede con el complejo GATA-1 en este caso el complejo más abundante se encuentra en eritrocitos y en HD3 la concentración del complejo es menor, lo cual correlaciona con la actividad de silenciamiento antagonista a GATA-1 tanto en función como en concentración.



**Figura 4. Geles de retardo para los factores GATA-1 y SF1.** A. Gel de retardo en el que se muestra la concentración diferencial del complejo GATA-1 (flecha, carril 2) en eritroblastos (HD3) en donde es abundante y eritrocitos terminalmente diferenciados donde apenas se observa el complejo formado por el factor GATA-1 (carril 7). En el resto de los carriles se puede observar la competencia y alta afinidad del factor por parte de la sonda del factor por la sonda fría para GATA-1. B. Para el factor SF1, que se une al silenciador se ve la relación contraria en cuanto a la abundancia para una misma concentración de extractos de células HD3 y eritrocitos, siendo el factor muy abundante en este último tipo celular (Figura tomada de Recillas-Targa *et al.*, 1993a).

El análisis más detallado de la secuencia para la región reguladora del costado 3' muestra que hay sitios potenciales de unión para el factor EKLF, NF-E2, un cuarto sitio para la unión del factor GATA-1 que se encuentra al lado de un posible sitio de unión al factor YY1 (que se estudia en este trabajo). Como se describirá en la siguiente sección todos estos factores participan de manera importante en la regulación de los genes globina y tienen relación directa con nuestro trabajo, por lo que se ampliará su análisis.

## 1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio nos interesamos por la relación entre la estructura de la cromatina y su efecto modulador en la regulación de la expresión de los genes globina a lo largo del desarrollo. Para estudiar estos aspectos se empleó como modelo experimental los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  globina de pollo, los cuales constituyen una familia multigénica cuyos genes se expresan diferencialmente a lo largo del desarrollo para producir distintos tipos de hemoglobinas (Minie *et al.*, 1992; Recillas-Targa *et al.*, 1995; Recillas-Targa, 2000). Para poder abordar el estudio de la estructura de la cromatina sobre la regulación de expresión génica, primero es necesario una caracterización funcional fina de los elementos de regulación que se encuentran en esta región. En el costado 3' del locus  $\alpha$ -globina se han identificado un elemento silenciador al lado de un elemento de regulación tipo "enhancer". Con base en los resultados previos y a esta organización única, estamos interesados en conocer como es que se regula la actividad de estos dos elementos con actividad antagónica y que están tan próximos uno del otro.

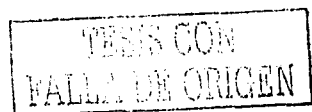
## 1.6. OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivo General

- Caracterizar la actividad de los elementos silenciador y "enhancer" que se localizan en el costado 3' del grupo de genes  $\alpha$ -globina de pollo.

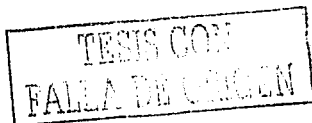
### 1.6.2 Objetivos Particulares

- a) Definir la actividad de delimitador o silenciamiento del elemento silenciador.
- b) Comparar la actividad transcripcional del "enhancer" en distintas etapas de diferenciación eritroide.
- c) Determinar la relevancia en la regulación de la expresión genética de los factores de transcripción que se unen a la 4ª caja de homología
- d) Definir los sitios de unión, alternativos o nuevos, de factores protéicos la 4ª caja de homología.



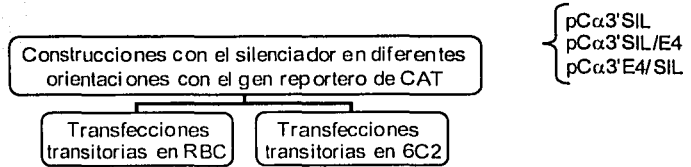
## 2. HIPÓTESIS

Si en el costado 3' del locus  $\alpha$ -globina de pollo existe un elemento con actividad de silenciador junto a un elemento con actividad tipo "enhancer" debe de existir algún mecanismo que regule la actividad de estos elementos sobre la expresión de los genes  $\alpha$ -globina de pollo en un momento específico del desarrollo. La abundancia diferencial de los factores que se unen a esta región y/o la actividad represora o activadora de ciertos factores transcripcionales e incluso la acción de remodeladores de la estructura de la cromatina durante la diferenciación eritroide pueden estar determinando la acción de estos elementos sobre la expresión diferencial de los genes  $\alpha$ -globina de pollo en etapas específicas del desarrollo.

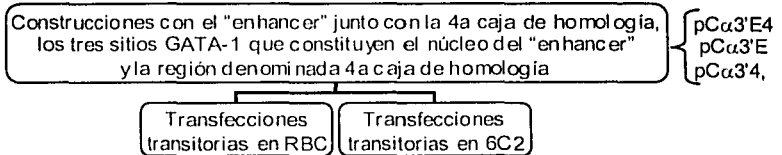


### 3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

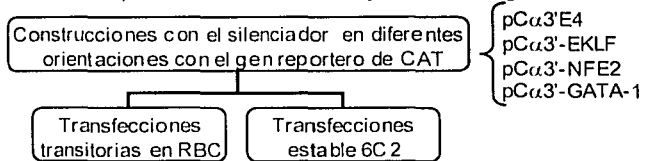
a) Definir la actividad delimitante o de silenciamiento del elemento silenciador.



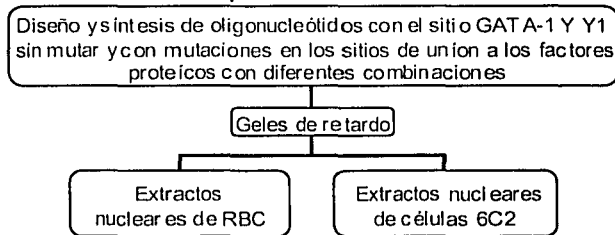
b) Determinar si la 4ª caja de homología es parte integral del elemento "enhancer".



c) Determinar los efectos sobre la actividad del "enhancer" de los factores de transcripción eritroides que tienen sitios en 4ª caja de homología



d) Definir si en una región aledaña al sitio de unión del factor GATA-1 de la 4a caja de homología existe un sitio de unión para el factor YY1

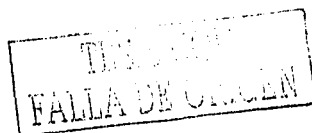


## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos que se utilizaron en este proyecto provienen de la compañía Sigma-Aldrich (a menos que se especifique otro proveedor). Los detalles para la preparación de las soluciones y buffers están en la parte final de la tesis en el Apéndice.

### 4.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE CÉLULAS ERITROIDES DE POLLO (*Gallus gallus domesticus*)

La extracción de DNA genómico se realizó con solventes orgánicos a partir de sangre total de embriones de pollo de 10 días. Los embriones de pollo línea Bacock ligera fueron adquiridos de la granja "Aves Libres de Patógenos Específicos" (ALPESA), ubicada en Tehuacán, Puebla. Los huevos fueron incubados a 37°C y después de 10 días, el estado de desarrollo del embrión fue comprobado anatómicamente. Se utilizaron 20 embriones a los que se les extrajo la sangre de venas ubicadas en la cámara de aire de los huevos. La sangre se mezcló con 25 ml de PBS (sin calcio; ver Apéndice) y se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min a 4°C para lavar las células. Este paso se repitió dos veces. El pellet de células sanguíneas se resuspendió en 15 ml de buffer ACD (ver Apéndice) y se incubó 1 h a 37°C con el objetivo de lisar a las células. Se añadieron 75 µl de proteinasa K (20 mg/ml), para tener una concentración final de 100 µg/ml. Se incubó 2 h a 50°C agitando cada 20 min. Para eliminar las proteínas y restos celulares del homogeneizado se agregó un volumen (vol) igual de fenol:cloroformo:isoamilico (24:24:1 vol/vol, Ultrapure BRL-Life Technologies). Se agitó durante 20 min en vortex y se transfirió a un tubo Corex de 30 ml. Se centrifugó a 8000 rpm durante 30 min y la fase acuosa se pasó a un tubo limpio. La limpieza con fenol:cloroformo:isoamilico se realizó tres veces. La fase acuosa se precipitó con 1/10 vol/vol de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol 100% frío. Se mezcló por inversión y se incubó toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 1 h y el pellet se lavó con 20 ml de etanol al 70%. El sobrenadante (sn) se decantó y el pellet se





secó a temperatura ambiente (t.a). El pellet se resuspendió en 500 µl de buffer TE y se transfirió a un tubo eppendorff, se incubó con 5 µl de RNAsa (40 mg/ml) a 37°C durante 2 h y se realizaron dos lavados con un mismo vol de fenol:cloroformo:isoamilico, agitando durante 5 min y centrifugando a máxima velocidad durante 20 min. Posteriormente se agregó 1/10 parte de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol 100%, se mezcló por inversión y se incubó –70°C durante toda la noche para precipitar el DNA. Finalmente se centrifugó a máxima velocidad durante 20 min y se decantó el sn. El pellet se lavó con etanol 70% dos veces y se dejó secar a t.a. El DNA se resuspendió en 400 µl de TE, se dividió en varias alícuotas y se almacenó a –70°C.

## 4.2. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

Con base en la secuencia reportada por Recillas y col (1993b) se diseñaron oligonucleótidos sintéticos para la región de 1036 pb, que comprende al silenciador-"enhancer" en el costado 3' del locus  $\alpha$ -globina. Estos fueron diseñados para amplificar a la región entera y también subregiones que contuvieran por separado a los diferentes elementos de la misma. Todos los oligonucleótidos tenían el sitio de restricción para la enzima de restricción *Bam*HI en el extremo 5', lo que sirvió para la clonación posterior del producto de amplificación. Los oligonucleótidos que se diseñaron se listan en la Tabla 1.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)	% GC
A120P3	CGG <b>GGATCC</b> GACCTGGGGCAGCAGATAGCCCTCG	89	68
A120P4	CGG <b>GGATCC</b> GACCCGTGGTAACCCGAGGCCG	89	73
A7	CGG <b>GGATCC</b> TGCAGCAGGTTGAGCAG	82	65
AE1	CGG <b>GGATCC</b> CGCGAGGGTGAAGCTGTGCTG	88	70
AE2	CGG <b>GGATCC</b> GAGGCTATCTGCTGCCACG	87	68
AS1L1	CGG <b>GGATCC</b> CATGCACCTCCTTACCCCATG	84	62
AS1L2	CGG <b>GGATCC</b> CAGCACAGCTTCACCCCTGCG	87	68

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para amplificar los diferentes elementos de regulación del costado 3' del locus  $\alpha$ -globina en pollo. En la primera columna se encuentra el nombre del oligonucleótido y en la segunda la secuencia en sentido 5'-3'. Las combinaciones utilizadas se esquematizan en la Fig. 5. El sitio *Bam*HI se encuentra en negritas.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Life Technologies. Las reacciones de PCR (PCR, del inglés: "Polymerase Chain Reaction") fueron diseñadas empleando los oligonucleótidos necesarios para amplificar las regiones de interés mostradas en la Fig. 5. Las diferentes regiones amplificadas fueron: SIL/E4, que contiene el silenciador, el "enhancer" y la 4ª caja de homología; SIL, que tiene solo el silenciador; E4, con el "enhancer" y la 4ª caja de homología y 4, con la región de la 4ª caja de homología únicamente (Fig. 5).

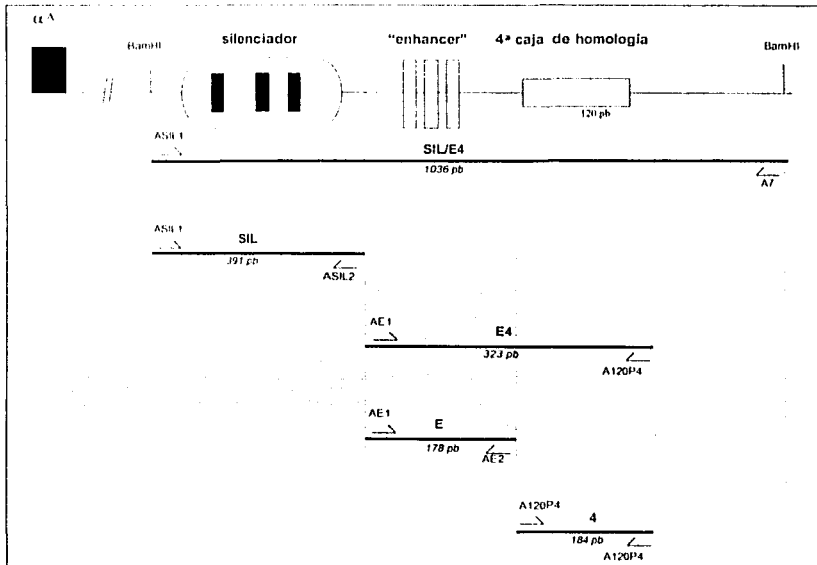


Figura 5. Esquema de los diferentes pares de oligonucleótidos empleados para amplificar cada una la regiones de interés en el costado 3' del locus  $\alpha$ -globina. En la parte superior de cada región está el nombre de cada fragmento y en la parte inferior el tamaño en pb del producto de amplificación. Cada oligonucleótido tiene un sitio *Bam*HI en sus extremos para facilitar su clonación posterior. La flecha representa la posición de los oligonucleótidos utilizados.

#### 4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las diferentes PCRs se realizaron empleando como cebadores a los oligonucleótidos antes mencionados. El DNA genómico que se usó para la PCR se digirió dos horas con las enzimas de restricción *Bam*HI o *Eco*RI. Se utilizó 1 µg de DNA genómico por reacción, 0.1 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 5 µl de buffer de PCR 10 X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, KCl 500 mM sin MgCl<sub>2</sub>), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 1 U de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL) y el agua desionizada estéril necesaria para un vol final de 50 µl. Se usó el termociclador GenAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) con el siguiente programa:

- 1) 5 min 95 °C. } 1 ciclo
- 2) 1 min 95 °C }  
1 min 55 °C } 25 ciclos  
1 min 75 °C }
- 3) 10 min 75 °C } 1 ciclo
- 4) finalizar la reacción 4 °C.

El número de ciclos fue de 25 y este programa se usó para todas las reacciones de PCR.

#### 4.4. SUBCLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

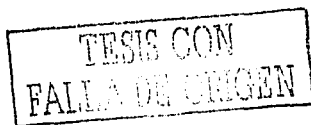
La reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa 1.5 % (Fig. 9) y los productos de PCR correspondientes se aislaron y purificaron mediante el método de Qiaex (Qiagen), que consiste en fundir el pedazo de gel de agarosa y mediante una resina que tiene afinidad por el DNA, éste se purifica de la agarosa y otras impurezas. Los productos se cuantificaron y se digirieron con *Bam*HI. El vector de clonación fue el pGEM-11Z (Promega) con el gen de resistencia a ampicilina, el cual fue linearizado con *Bam*HI y posteriormente fue desfosforilado para clonar los

productos de PCR. La ligación se hizo con un exceso de DNA del fragmento digerido con respecto al vector en un vol final de 20  $\mu$ l a 4 °C toda la noche. Al día siguiente la reacción se dejó a t.a. 1 h y se transformó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes preparadas por el método de CaCl<sub>2</sub> (Sambrook y Russell, 2001). Para transformar se tomaron 40  $\mu$ l de células competentes y se mezclaron con 5  $\mu$ l de la reacción de ligación, se incubó esta mezcla por 40 min; posteriormente se dió un choque térmico a 42 °C por 45 segundos, posteriormente se incubaron en hielo 2 min, se les agrega 1 ml de medio LB y se pusieron en agitación por una hora a 37 °C, finalmente las bacterias se cultivaron en cajas de medio LB con ampicilina a una concentración de 200  $\mu$ g/ml y se incubaron a 37 °C toda la noche. Cada colonia obtenida se sembró en 3 ml medio LB líquido con ampicilina a una concentración de 200  $\mu$ g/ml y se incubaron toda la noche para hacer una purificación de DNA plasmídico con el método de minipreparación por lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). Para confirmar la clonación del fragmento de interés en el plásmido se hicieron digestiones con la enzima *Bam*HI de 15 colonias obtenidas. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa 1.5 %, observando si había una banda que pudiera ser resultado de la liberación del fragmento de interés y verificando si el peso correspondía al esperado. De cada clona positiva se hicieron dobles digestiones para verificar que era el fragmento de interés y para determinar la orientación de cada clona. Para cada construcción se escogió una clona en donde el fragmento se hubiera clonado en orientación 5'-3' y otra clona con la orientación 3'-5', con el objeto de determinar si la orientación era un elemento importante en la influencia de cada región reguladora sobre la actividad del gen reportero. De cada clona en diferente orientación se hizo una purificación a mayor escala del plásmido por medio del método de columnas midiprep (Qiagen). Una clona de cada construcción fue secuenciada en un secuenciador automático en la Unidad de Biología Molecular, IFC UNAM. Lo anterior permitió corroborar la ausencia de errores en la secuencia de los fragmentos de DNA amplificados por PCR.

Todas las construcciones se sub-clonaron posteriormente en el vector pCAT Basic Vector (Promega), que tiene el gen reportero para la enzima cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) y que además tiene clonado en el sitio *Sma*I de la región múltiple de clonación el promotor del gen  $\alpha^D$ , este vector se nombró pCAT $\alpha^D$  (donado por el Dr. Sergey Razin, Instituto de Biología del Gen de la Academia de Ciencias de Rusia). Para tener las construcciones en este nuevo vector, las construcciones del vector pGEM-11Z se digirieron con *Bam*HI, se purificó el fragmento y se ligó en el vector pCAT $\alpha^D$  digerido con *Bam*HI y defosforilado. Estas construcciones se usaron para los experimentos funcionales por el método de transfección transitoria en diversas líneas celulares de pollo. Los plásmidos fueron transfectados tanto de forma circular como linearizada con la enzima *Xmn*I, con el objeto de poder comparar si esta variable tenía alguna importancia en la actividad de la construcción.

#### 4.5. MUTACIONES DE LOS SITIOS CONSENSO DE UNIÓN A FACTORES TRANSCRIPCIONALES

Las mutaciones se concentraron en la región E4 (ver Fig. 5), específicamente en la 4ª caja de homología, para los sitios consenso de unión EKLF, NF-E2 y GATA-1 (Fig. 6). Los cambios de secuencia fueron de dos o tres pares de bases definidas previamente en la literatura por su incapacidad para seguir uniendo a dichos factores. Las mutaciones se realizaron por el método de traslapamiento ("overlapping"), el cual consistió en diseñar oligonucleótidos que tuvieran la secuencia mutada en el centro del oligonucleótido tanto en dirección 5'-3' como en dirección 3'-5'. Los oligonucleótidos mutados estaban flanqueados por otro par de oligonucleótido localizados externamente, que originalmente fueron usados para la amplificación de la región E4. Los oligonucleótidos utilizados en la mutación se enlistan en la Tabla 2.



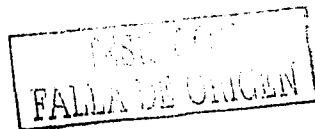
		(Tm °C)
<b>EKLF</b>	5' GCAGATAGCCTCGGGTGGGTA AACCTGC 3'	
<b>MABeklf01</b>	3' CGTCTATCGGAGCaaaACCATTTTGGACG 5'	77
<b>MABeklf02</b>	5' GCAGATAGCCTCGGtttGGTAAAACCTGC 3'	74
<b>NF-E2</b>	5' CCTGCCAGGTGCTGAGTA ACTGCAGTCTG 3'	
<b>MABnfe01</b>	3' GGACGGTCCACGAtccATTGACGTCAGAC 5'	81
<b>MABnfe02</b>	5' CCTGCCAGGTGCTagGTA ACTGCAGTCTG 3'	76
<b>GATA</b>	5' GATCCTGCCAGGTATCTTCATGCAGAGATG 3'	
<b>MABgata01</b>	3' CTAGGACGGTCCATtcAAGTACGTCCTCTAC 5'	70
<b>MABgata02</b>	5' GATCCTGCCAGGTAagTTCATGCAGAGATG 3'	75

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de los sitios de unión de factores transcripcionales de la 4ª caja de homología.** Para cada recuadro, en el primer renglón de la columna 1 se indica el nombre del factor y columna 2 la secuencia de este sitio en la 4ª caja de homología (sin mutar). En el segundo y cuarto renglón se encuentran los nombres de los oligonucleótidos utilizados para realizar las mutaciones y en la columna 2 las secuencias correspondientes. En el renglón 3 se indican las temperaturas de alineamiento (Tm) para cada oligonucleótido. Las bases mutadas se muestran en la secuencia original en un recuadro y las mutaciones en los oligonucleótidos se muestran con letras minúsculas y negritas.

Se hicieron tres reacciones de PCR's secuenciales para cada una de las mutaciones, cada una teniendo un oligonucleótido en los extremos de la región y un oligonucleótido interno. Para la mutación en EKLF la primera PCR se realizó con el oligonucleótido en dirección 5'-3' AE1 y en dirección 3'-5' MABeklf01, la segunda con el oligonucleótido 5'-3' MABeklf02 y el oligonucleótido 3'-5' A120P4. Para el sitio NF-E2 se usó el oligonucleótido 5'-3' AE1 y el 3'-5' MABnfe01, la segunda fue con el oligonucleótido 5'-3' MABnfe02 y el oligonucleótido 3'-5' A120P4. Para la mutación en el sitio GATA-1 la primera PCR se hizo con el oligonucleótido 5'-3' AE1 y el oligonucleótido 3'-5' MABgata01 y la segunda fue con el oligonucleótido 5'-3' MABgata02 y el 3'-5' A120P4. Las combinaciones de oligonucleótidos para las diferentes PCR's están resumidas en la Tabla 3.

FACTOR	PCR1	PCR2
EKLF	5'-3' AE1 3'-5' MABgata01	5'-3' MABgata02 3'-5' A120P4
NF-E2	5'-3' AE1 3'-5' MABnfe01	5'-3' MABnfe02 3'-5' A120P4
GATA-1	5'-3' AE1 3'-5' MABeklf01	5'-3' MABeklf02 3'-5' A120P4

**Tabla 3. Combinaciones de oligonucleótidos usadas en la PCR1 y PCR2 para generar las mutaciones puntuales en los sitios de unión al DNA de diferentes factores transcripcionales.** Los factores son el EKLF, NF-E2 y GATA-1 como se indica en la primera columna.



La técnica de traslapamiento se basó en la posibilidad de los oligonucleótidos de unirse a la secuencia original y servir de cebadores para DNA polimerasa amplificar a pesar de que no se aparean las bases mutadas por no ser complementarias, por esta razón sólo se pudo introducir la mutación para tres pares de bases como máximo. En la PCR1 y 2 se amplifica el producto con la mutación deseada generando un fragmento incompleto, dado que las PCRs se hicieron con el oligonucleótidos de un extremo y otro interno. Finalmente en la PCR3 no se utilizaron oligonucleótidos, pues los fragmentos incompletos sirven como cebadores para la reacción y se completa la región. Los oligonucleótidos AE1 y A120P4, son los mismos que se utilizaron originalmente para la clonación del elemento E4 y tienen los sitios de restricción *Bam*HI, por lo que se siguió la misma metodología de clonación para fragmentos de PCR descrita antes, para obtener las mutaciones en el vector pCAT $\alpha^D$ . Se diseñó un oligonucleótido para secuenciar las mutaciones en el vector pCAT $\alpha^D$  que fue 5' GGGGAGGTGTGGGAGGTTTT 3' (Unidad de síntesis de oligonucleótidos, IBT). La metodología para generar las mutaciones se representa en la Fig. 6.

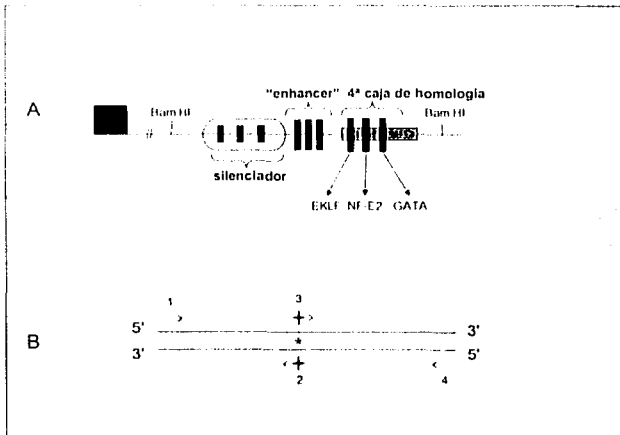


Figura 6. A. Mutagenesis por traslapamiento. Ubicación de los sitios de unión de factores EKLF, NF-E2 y GATA, cuyo sitio de unión se mutó. B. Esquema de generación de mutaciones puntuales por el método de traslapamiento. La PCR1 se hace con el par de oligonucleótidos 1 y 2, la PCR dos con el par de oligonucleótidos 3 y 4, finalmente la PCR3 se hace con el combinando la PCR1 y 2, para tener al final completa la región mutada con los sitio de restricción *Bam*HI.

## 4.6. TRANSFECCIONES

Todas las transfecciones fueron hechas por electroporación y el DNA utilizado se purificó por columnas (Qiagen), lo cual permitió transfectar las construcciones obtenidas de manera transitoria. Las condiciones utilizadas fueron las reportadas en la literatura o ajustadas para cada tipo celular por medio de la transfección transitoria del vector pGE $\alpha$ D (generado por Héctor Rincón, miembro de nuestro laboratorio) y que utiliza el "enhancer" clonado en este trabajo y al gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor  $\alpha$ D, además de la resistencia a geneticina. Este vector se transfectó bajo diferentes voltajes (V) y capacitancias ( $\mu$ F), posteriormente se midió la fluorescencia en un citómetro de flujo y se evaluó que los valores de V y  $\mu$ F fueran óptimos para cada transfección y cada tipo celular.

### 4.6.1. Transfección transitoria en eritrocitos de embriones de pollo de 10 días (RBC).

Las condiciones empleadas para este tipo celular fueron las reportadas por Recillas-Targa y colaboradores (1999). Los eritrocitos de embriones de pollo de 10 días de gestación fueron cosechados en 30 ml de una solución PBS 1X, EDTA 5 mM. Las células se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos a t.a. Se lavaron dos veces con PBS 1X y se descartó el sn. En una área estéril las células se resuspendieron en 10 ml de medio L-15 (Gibco BRL) sin complementar a t.a. Para contar el número de células se empleó un método colorimétrico, se tomaron 5  $\mu$ l de la suspensión anterior se mezclaron con 745  $\mu$ l de buffer de lisis (ver apéndice) en un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron a 12000 rpm por 2 min. El paso anterior se repitió 3 veces tomando 5  $\mu$ l de la parte superior, de la mitad y de la parte inferior de la suspensión. Se leyó la densidad óptica del sn. a 412 nm y se promediaron las lecturas. El promedio de las lecturas de absorbancia se multiplicó por 150, que fue el factor de dilución y por 10 que es el vol total. Este valor se multiplicó por  $8.56 \times 10^6$  para obtener el número de células totales, esta cantidad de células corresponde al número de células por absorbancia a 412 nm y que ha sido



previamente estandarizado (Hesse *et al.*, 1986). Para cada transfección se usaron  $1 \times 10^8$  células en un vol de 500  $\mu$ l de medio L-15, por lo que una vez que se cuantificaron las células totales se agregó más medio L-15 para resuspenderlas y ajustarlas en el vol adecuado. Cada transfección se hizo al menos por triplicado. Las cubetas de electroporación que se usaron fueron de 0.4 cm (Bio-Rad) para células eucariontes, se pusieron a enfriar en hielo y se añadió 500  $\mu$ l de L-15 con  $1 \times 10^8$  células. Se agregó 6  $\mu$ g del DNA de plásmido con el gen reportero y 6  $\mu$ g de plásmido control pTK- $\beta$ gal (Promega) para normalizar las transfecciones. En cada experimento de transfección, además de las construcciones, se pusieron tres cubetas a las que no se les agregó ningún plásmido y que sirvieron de referencia para las actividades o ruido de fondo. El electroporador que se uso fue el Gene Pulser II (Bio-Rad), el pulso fue de 450 V y 500  $\mu$ F y de capacitancia, sin resistencia. Las células electroporadas se pusieron en hielo y se transfirieron un tubo de 1.5 ml, se agregó 1 ml de L-15 complementado (ver apéndice). Cada electroporación se incubó 37 °C por 48 h. Al termino de la incubación se centrifugaron las células y se lavaron 2 veces. Se prepararon extractos totales de células con 300  $\mu$ l del buffer de lisis del método de  $\beta$ -galactosidasa ("reporter lysis buffer", Promega). A los extractos se les determinó la actividad de CAT y de  $\beta$ -galactosidasa.

#### **4.6.2. Transfección transitoria en pre-eritroblastos de pollo (línea celular 6C2)**

Las células se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM complementado (ver apéndice) y se dividieron un día antes de la transfección poniéndolas en un plato nuevo y agregando medio nuevo. Las células se cosecharon centrifugando a 900 rpm. La pastilla de células se lavó 2 veces en 10 ml de PBS a 4 °C (ver apéndice). Al final se resuspendió en 10 ml de PBS y se tomó 10  $\mu$ l para contar las células en el citómetro, si era necesario se hacía una dilución. Se prepararon cubetas para cada una de las transfecciones y se colocaron en hielo. Las células se resuspendieron en el vol adecuado para obtener una densidad celular de  $2 \times 10^7$

células/500  $\mu$ l para cada transfección. Se tomaron 500  $\mu$ l de la suspensión de células y se puso en una cubeta de electroporación. Se agregaron 6  $\mu$ g de DNA y se mezcló con las células, se incubó 10 min en hielo. El electroporador se fijó a 200 V y 950  $\mu$ F, se les dió un pulso y se incubaron 15 min en hielo. Las células se pasaron a una caja de cultivo de 10 cm con 10 ml de medio  $\alpha$ -MEM complementado y se incubaron por 48 h. Cada transfección se cosechó centrifugando a 2500 rpm y se lavó 1 vez con PBS, centrifugando nuevamente y desechando el sn. Se prepararon los extractos de la misma forma que en RBC y se les midió la actividad de CAT y de  $\beta$ -galactosidasa. La capacitancia se fijó en 300 V y 950  $\mu$ F de voltaje. El protocolo fue el mismo que para 6C2 excepto por los parámetros antes mencionados y se siguió el mismo procedimiento para obtener los extractos celulares.

#### **4.6.3. Transfección estable en pre-eritroblastos de pollo (línea celular 6C2)**

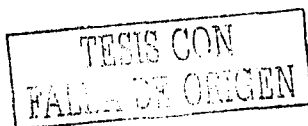
Se usaron  $1-2 \times 10^7$  células puestas a dividir un día antes, se transfectaron 5  $\mu$ g de los plásmidos correspondientes a cada construcción linearizados, además de 3  $\mu$ g de plásmido linearizado pGE $\alpha$ D con resistencia a geneticina. Los vectores fueron evaluadas en un gel de agarosa para corroborar su calidad e integridad. Las células se lavaron dos veces en PBS a 4 °C, centrifugando a 2500 rpm. En este paso se contaron las células y se resuspendieron en el vol adecuado para tener  $2 \times 10^7$  células/500  $\mu$ l. Se tomaron 500  $\mu$ l de la suspensión de células y se pusieron en cada una de la cubetas de electroporación. Posteriormente se agregó el DNA incubando 10 min en hielo. Las condiciones de transfección fueron 200 V y 950  $\mu$ F. Después del pulso se incubaron 15 min en hielo para que las células se recuperaran del pulso eléctrico. Las células se pusieron en una caja de cultivo con 10 ml de medio  $\alpha$ -MEM (sin geneticina) y se incubaron por 48 h. Después de este tiempo se comenzó la selección de las células por medio de la geneticina, para lo cual las células se lavaron con 10 ml de medio  $\alpha$ -MEM dos veces y se

resuspendieron en 10 ml de  $\alpha$ -MEM + geneticina a una concentración de 1 mg/ml. Durante dos semanas las células se lavaron cada dos o tres días centrifugando a una velocidad de 1000 o 1500 rpm para eliminar la mayor parte de los restos celulares provenientes de las células muertas por la droga usada para la selección y se resuspendieron nuevamente en 10 ml de  $\alpha$ -MEM + geneticina a la concentración antes mencionada. Pasado el tiempo de selección las células semiconfluentes se lavaron y se resuspendieron en 3 ml de  $\alpha$ -MEM + geneticina. Se tomó 1 ml de la suspensión anterior y se agregó a tres cajas más 9 ml de medio  $\alpha$ -MEM sin geneticina. Las tres cajas para cada transfección fueron las repeticiones para cada construcción. Los cultivos se dejaron crecer a confluencia y cada uno se cosechó en 3 ml de PBS, de estos 3 ml se tomó 1 ml para hacer extractos celulares y cuantificar la actividad de CAT, otro ml se congeló para guardar cada clona y otro ml sirvió para obtener DNA genómico para realizar una hibridación tipo Southern y corroborar la presencia de la construcción transfectada.

#### **4.7. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LOS GENES REPORTEROS**

##### **4.7.1. Cuantificación de la actividad de Cloramfenicol Acetiltransferasa (CAT)**

Se incubaron 100  $\mu$ l de extractos celulares 15 min a 65 °C para inactivar a las desacetilasas endógenas y se transfirieron a un vial de centelleo, se agregó 100  $\mu$ l de sustrato de CAT (ver apéndice) a cada transfección. Se agregaron 5 ml de líquido de centelleo para muestras no acuosas y se incubó la mezcla en un baño a 37 °C por 24 h. La actividad de CAT se midió en un contador de centelleo para el isótopo  $^3\text{H}$  en cuentas por minuto (cpm) y al final se normalizó por medio de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de los extractos de cada muestra.

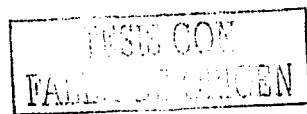


#### **4.7.2. Cuantificación de la actividad de $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -Gal)**

Se tomaron 50  $\mu$ l de extractos celulares totales y se inactivaron las proteínas con actividad de galactosidasas eucariontes incubando los extractos a 55  $^{\circ}$ C por una hora. Los extractos inactivados se mezclaron con 100  $\mu$ l de buffer Z con DTT y 30  $\mu$ l de ONPG (ver Apéndice), toda la mezcla se incubó en un tubo de 1.5 ml tapado para evitar la evaporación durante toda la noche a 37  $^{\circ}$ C. (además de las muestras experimentales se hace un blanco con 30  $\mu$ l de ONPG y 150  $\mu$ l de buffer Z). Al final de las 24 horas de incubación la reacción se detiene agregando 75  $\mu$ l de carbonato de sodio 1 M. La absorbancia de las muestras se midió en una placa de elisa a 420 nm.

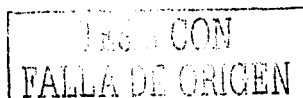
#### **4.7.3. Cuantificación de la actividad de la proteína verde fluorescente (GFP)**

La actividad de GFP se midió por medio de un citómetro de flujo, que permite detectar tanto la forma como la fluorescencia que emite una célula. En este caso los parámetros de fueron ajustados para detectar a la población viable de eritrocitos en una muestra. Una vez determinada la población células viable (puntos en el gráfico) se ajustaron los parámetros del sensor de fluorescencia verde (FL1-Height). Primero se cuantifica la autofluorescencia de la muestra de células sin transfectar para detectar los niveles basales de fluorescencia (en el eje FL1-Height, que cuantifica la fluorescencia verde, la población se encuentra en el rango de  $10^0$  y  $10^1$ ; Fig. 15 A). Posteriormente se mide la fluorescencia de las células transfectadas con el reportero. El aumento de la fluorescencia de la población de células se detecta por el corrimiento de los puntos que conforman la población de células hacia la derecha (invadiendo la zona gris), que se debe a la presencia de la GFP en la población de células (Fig. 15 B, C y D).

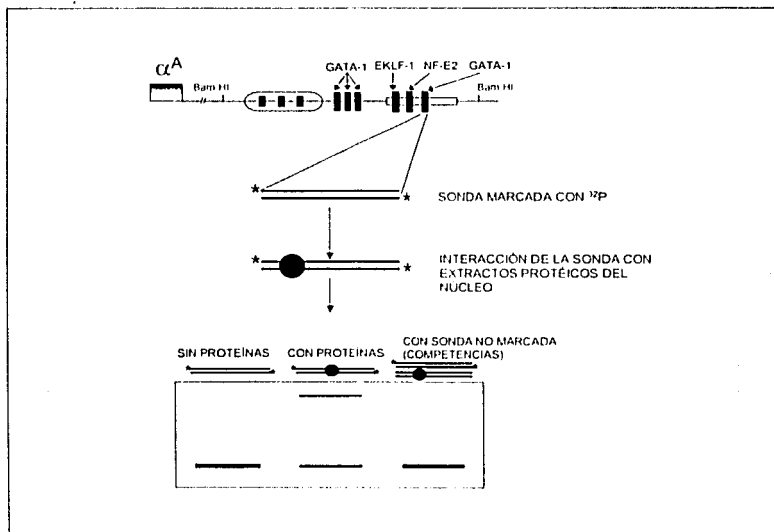


#### 4.8. GELES DE RETARDO

Para demostrar el efecto de factores nucleares que interaccionan con la región del "enhancer", así como su abundancia, se hicieron geles de retardo con extractos nucleares de diferentes estados de diferenciación eritroide. El marcaje de la sonda de interés se realizó como se describe a continuación. El oligonucleótido 5'-3' y el oligonucleótido 3'-5' de la zona que de interés se marcaron por separado con  $\gamma$ -ATP  $^{32}\text{P}$ . La mezcla de reacción se preparó con 4  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, 2.5  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido (de una solución a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , para tener 50 ng finales), 0.5  $\mu\text{l}$  de T4 polinucleótido cinasa (sin diluir), 2  $\mu\text{l}$  del "forward buffer kinase" 5X, 1  $\mu\text{l}$  de  $\gamma$ -ATP 250  $\mu\text{Ci}$  para un vol final de 10  $\mu\text{l}$ . Se incubó 30 min a 37 °C y 30 min a 60 °C para inactivar la cinasa. Posteriormente ambos oligonucleótidos se incuban para formar una secuencia de doble cadena, para lo cual se mezclaron 10  $\mu\text{l}$  de cada uno de los dos oligonucleótidos marcados y se agregó 20  $\mu\text{l}$  de "buffer de apareamiento" (ver apéndice). La mezcla se incubó a 60 °C por 30 min y después a t.a. por 10 min. La sonda marcada radioactivamente con ambos oligonucleótidos alineados se purificó de la marca no incorporada por medio de un gel de acrilamida 10% (29:1 acrilamida-bisacrilamida) y urea 8% (para detalles consultar apéndice en la parte de purificación de la sonda), todo esto mejoró la calidad de los retardos en los geles. Una vez que se concluyó la preparación de la sonda para las diferentes regiones a analizar se procedió a realizar el gel de retardo. Para cada punto experimental se hizo la siguiente mezcla de reacción haciendo los cálculos para tener un vol final de 20  $\mu\text{l}$  por cada muestra: primero se agregó el  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada y 10  $\mu\text{l}$  del Buffer GSB 2X 1  $\mu\text{l}$  DTT 1 M y 1  $\mu\text{l}$  de poli-dIdC a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Amersham). En cada gel de retardo el primer carril correspondió a la sonda sin extractos protéicos, para todas las demás muestras se agregaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína a menos que se especifique otra concentración. Para las competencias se agregaron diferentes concentraciones de sonda fría a las muestras con los extractos nucleares, la concentración de sonda fría fueron de 50 a 200 ng de oligonucleótidos complementados pero sin marcar, estas muestras se incubaron 15 min en hielo y 15 min a t.a. Después de esta



incubación, para las competencias se agregó la sonda marcada y se incubó con las muestras 15 min en hielo y 15 min a t.a., para el caso de las muestras que no se iban a competir se agregó en este momento la sonda marcada, con los extractos nucleares pero sin sonda fría, con los mismos tiempos de incubación. El gel de acrilamida 6 % (ver apéndice) se preparó previamente, se lavaron todos los pozos antes de comenzar a cargar el gel, después de haber hecho una precorrida de 45 min a temperatura ambiente. Para una sonda de 30 pb el gel se corrió a 150 V por 1.5 a 2 h. El procedimiento para la realización de un gel de retardo se esquematiza en la Fig. 7.



**Figura 7. Procedimiento para realizar un gel de retardo para el sitio GATA-1 de la 4ª caja de homología.** Los oligonucleótidos son marcados radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ , alineados y puestos a interactuar con extractos nucleares proteicos. En un gel de acrilamida se corren diferentes condiciones que sirven como controles. En el primer carril la sonda no tuvo contacto con proteínas, lo que permite saber cual es la migración de la sonda libre en el gel; en el segundo carril se encuentra la sonda que se incubó con los extractos proteicos, si hay proteínas capaces de unirse a la región de DNA que se está estudiando, se forma un complejo entre la sonda y la proteína que hace que la sonda migre más lento con respecto a la sonda libre; por último se representa una competencia con sonda no marcada (fría) y que permite definir si la unión de la proteína a la sonda es específica.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados corresponden a los sitios de unión de GATA-1 y el posible sitio de unión a YY1 en la región de la 4ª caja de homología. También se empleó la sonda YY1 que corresponde al sitio consenso de unión de ese factor transcripcional, utilizado para comprobar la presencia de éste factor en nuestro sistema. La sonda GATA contiene el sitio de unión al factor GATA-1 de la 4ª caja de homología, en la sonda -GATA están mutadas las bases importantes para la unión al factor GATA-1 (ver Tabla 3). La sonda -YY1 tiene una mutación para el sitio hipotético de unión para el factor YY1 en la 4ª caja de homología que dedujo nuestro grupo, pero dejando intacto al sitio GATA-1 (Fig. 20). El diseño de las secuencias para todos los oligonucleótidos se basó en lo descrito en la literatura y por la compañía Santa Cruz Biotechnology. Un resumen de los oligonucleótidos empleados para preparar las sondas se encuentra en la Tabla 4.

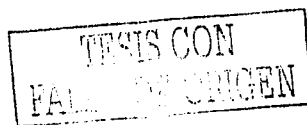
Sonda	oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)
GATA	A1G	5' CGCGGATCCTGCCAGGTATCTTCATGCAGAGATG 3'	83
	A2G	3' CTAGGACGGTCCATAGAAGTACCTCTCTACCTAGGCCG 5'	78
-GATA	MABgata02	5' GATCCTGCCAGGTAAgTTCATGCAGAGATG 3'	75
	MABgata01	3' CTAGGACGGTCCATtEAAATACCTCTCTAC 5'	70
-YY1	AYY1A	5' GATCCTGCCAGGTATCTTtCGGCAGAGATG 3'	77
	AYY1B	3' CTAGGACGGTCCATAGAaAgCGCTCTCTAC 5'	72
	YY1A	5' CGCTCCGGGCCATCTTtCGCGCGTGT 3'	89
YY1	YY1B	3' GCGAGGGCCCGGTAAAGCCCGGACCA 5'	88

**Tabla 4. Oligonucleótidos empleados como sondas para los genes de retardo.** Cada sonda fue preparada con un par de oligonucleótidos en dirección 5'-3' y 3'-5'. Se marcaron radioactivamente con <sup>32</sup>P y después fueron apareadas para formar doble cadena como se menciona en Materiales y Métodos y en el apéndice.

## 4.9 EXTRATOS DE PROTEÍNAS NUCLEARES DE POLLO

### 4.9.1. Extractos nucleares de eritrocitos (RBC)

La sangre de embriones de pollo de diez días de desarrollo se colectó en buffer PBS con 2 mM EDTA (frío) y se centrifugó 10 min 2000 rpm. Posteriormente se lavó 2 veces en 5 vol de PBS + 2 mM EDTA, se resuspendió en 20 vol de PBS 0.67 X + 2 mM EDTA y se incubó en hielo 10 min. La suspensión de células se centrifugó 10 min a 2000 rpm y se resuspendió en 5 vols de buffer A y se incubó



en hielo. Se lisaron las células con 12 a 15 golpes en un homogeneizador "Dounce" de 40 ml usando el pistón B. Se monitoreo que las células se rompieran observando la integridad y pureza de los núcleos al microscopio. El lisado se centrifugó 20 min a 14500 rpm y el pellet se resuspendió en 3 ml de buffer C por cada  $5 \times 10^9$  células, lentamente con una pipeta. El pellet resuspendido se transfirió una vez más al homogeneizador y se dieron 12 golpes, se agitó lentamente por 30 minutos en hielo en el mismo homogeneizador (es importante no acortar este paso). Se centrifugó 30 min en un rotor SS-34 a 14500 rpm El sobrenadante se dializó en 6 litros de buffer D (o contra más de 50 volúmenes), se le cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad) y se almacenó en nitrógeno líquido.

#### 4.9.2. Extractos nucleares de pre-eritroblastos (células 6C2)

Se usaron 6 cajas de 15 cm de diámetro con células 6C2 confluentes. Las células se centrifugaron a 800 rpm, se lavaron con 30 ml de PBS 1X y se contaron, obteniendo  $1 \times 10^9$  células totales aproximadamente. Se volvieron a centrifugar, se resuspendieron y lavaron en 10 ml de buffer RSB (ver apéndice). A partir de este paso las siguientes manipulaciones se realizaron a 4 °C. Posteriormente las células se resuspendieron en 30 ml de buffer RSB + 0.3% Tritón X-100 y se lisaron con un homogeneizador Dounce de 40 ml, con el pistón B aplicando 25 golpes y verificando al microscopio la lisis celular y la liberación de los núcleos. El homogeneizado celular se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min en un rotor SS-34. El botón que contenía los núcleos se resuspendió en 20 ml de buffer RSB y se aplicaron 4 golpes con el homogeneizador. Se centrifugó 10 min a 1200 rpm en rotor SS-34, el botón se resuspendió en buffer RSB (1 ml por núcleos de  $2 \times 10^9$  células) y se agregó lentamente NaCl 2 M hasta tener una concentración final de 0.3 M de NaCl y se agitó lentamente 30 min a 4°C. A esta fuerza iónica las proteínas no histónicas se extraen dejando al complejo histona-cromatina como un residuo insoluble. Posteriormente se centrifugó a 52000 rpm por 45 min en un rotor 60 Ti. El sobrenadante se dializó en 2 litros de buffer E +



100 mM NaCl (ver apéndice) toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 52000 rpm por 30 min. Por cada 7.5 ml de sobrenadante se añadieron 3.4 g de sulfato de amonio muy lentamente (concentración final de 0.3 g/ml) y se dejaron las proteínas nucleares precipitándose toda la noche a 4°C en agitación lenta. Después se centrifugó a 6500 rpm en el rotor SS-34 por 30 min y el botón se resuspendió en 2 ml de buffer E + 100 mM NaCl sin glicerol y se dializó toda la noche en 2 litros de Buffer E + 100 mM NaCl y 20% glicerol. Por último se centrifugó el dializado por 30 min en tubos de 1.5 cm a máxima velocidad y al sn se le cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad), se alicuotó y se almacenó a -70°C.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DNA GENÓMICO DE POLLO

La concentración determinada por la absorbancia de la una alícuota a 260 nm fue de 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La correlación de la absorbancia a 260/280 nm fue de 1.92. Para observar que DNA estuviera integro y la pureza de la preparación, una muestra sin digerir y digestiones con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* se corrieron en un gel de electroforesis de agarosa al 0.8 % (Fig. 8). En el DNA sin digerir se observó una sola banda sin productos de degradación y en las digestiones las enzimas cortaron el DNA eficientemente (Fig. 8).

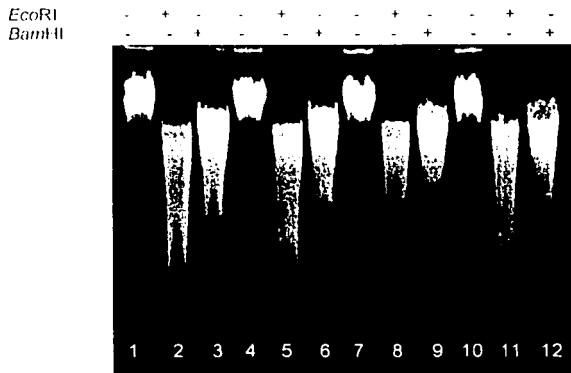


Figura 8. DNA genómico de pollo. En los carriles 1, 4, 7 y 10 se presenta una muestra de las diferentes alícuotas que se obtuvieron del DNA sin digerir (-), en los carriles 2, 5, 8 y 11 el DNA genómico digerido con la enzima *EcoRI* y en los carriles 3, 6, 9 y 12 con *BamHI*. Se puede notar que en el DNA sin digerir no se ven señales de degradación, lo que demuestra que el DNA está integro, en los carriles con las muestras incubadas con alguna enzima de restricción la digestión es eficiente, lo que demuestra que el DNA esta libre de impurezas. Gel de agarosa 0.8% TBE.

### 5.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Por medio de la técnica de PCR y empleando los oligonucleótidos y condiciones descritos en la sección de Materiales y Métodos y el DNA genómico

de pollo digerido con *Bam*H1 y *Eco*RI como molde se amplificaron las regiones descritas en la Fig. 5: 1) la región de 1036 pb que corresponde a los elementos regulatorios del costado 3' (SIL/E4); 2) la región de 391 pb que corresponde al silenciador (SIL); 3) la región de 323 pb que abarca al "enhancer" junto con la 4ª caja de homología (E4); 4) el producto de 178 pb que corresponde a la región del "enhancer" (E) y 5) el producto de 184 pb que corresponde a la 4ª caja de homología (4). Todos los productos de PCR que se mencionaron anteriormente se muestran en la Fig. 9 excepto para el producto E que se obtuvo posteriormente y cuya imagen no se muestra.

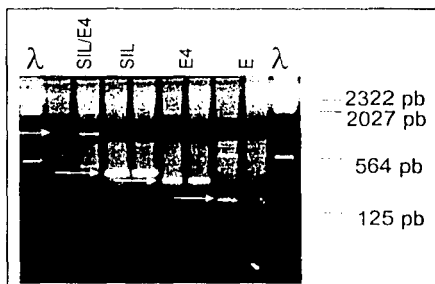


Figura 9. Productos de PCR correspondientes a los elementos SIL/E4, SIL, E4 y E, cada uno de ellos está señalado (flechas blancas). En el primer y último carril se puso el marcador de tamaño  $\lambda$ -HindIII, las flechas de la derecha señalan las bandas de este marcador y el tamaño correspondiente a cada una de ellas. Gel de agarosa 1.5 % TBE. Para cada producto hay dos carriles, en el primero se amplificó de DNA genómico digerido de *Eco*RI y en el segundo de DNA genómico digerido con *Bam*HI

### 5.3. CLONACIÓN Y SUBCLONACIÓN DE LOS DIFERENTES ELEMENTOS DE REGULACIÓN.

Cada reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% y el peso del producto de amplificación correspondió con el esperado. La banda de interés se purificó y clonó en el vector de clonación pGEM-11Z (Promega), generando los plásmidos pG3'-SIL/E4, pG3'-SIL, pG3'-E4, pG3'-E y pG3'-4. Cada clona fue secuenciada para corroborar su identidad y fidelidad en su secuencia (datos no mostrados). Un resultado que cabe mencionar es que la secuencia obtenida

amplificando a este molde de DNA fue casi idéntica, salvo por 3 pares de bases a la reportada por Recillas *et al.* (1989).

Una vez que se comprobó la integridad de cada región de interés se procedió a subclonar cada fragmento en el vector pCAT $\alpha^D$  (los detalles del procedimiento se dan en Materiales y Métodos). De esta manera se generaron los siguientes plásmidos: pC $\alpha$ 3'SIL/E4, pC $\alpha$ 3'SIL, pC $\alpha$ 3'E4, pC $\alpha$ 3'E y pC $\alpha$ 3'4 (Fig. 10). Por medio de digestiones en diferentes sitios se determinó la orientación de cada una de las clonas, empleando ambas orientaciones en este estudio (Fig. 10). Lo anterior para la construcción SIL/E4 era importante, ya que permitiría determinar si el silenciador tenía una actividad de silenciamiento clásica, es decir, independiente de la posición donde se encontrara, o si por el contrario tiene alguna propiedad de bloqueo de "enhancer", es decir, de interferir con la actividad transcripcional, solo si se encontrara entre el gen reportero y el "enhancer" (delimitador) como se representa en el modelo de la figura 11.

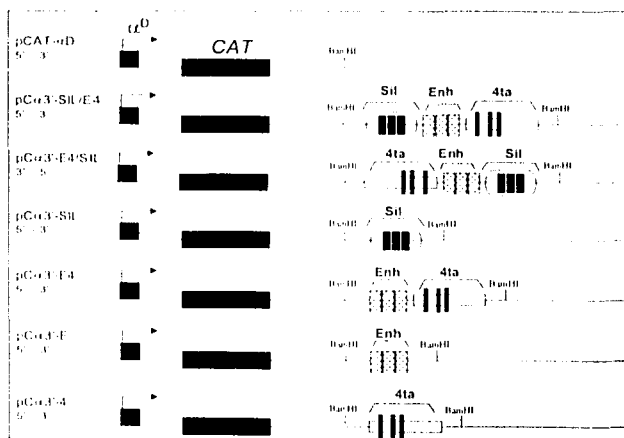
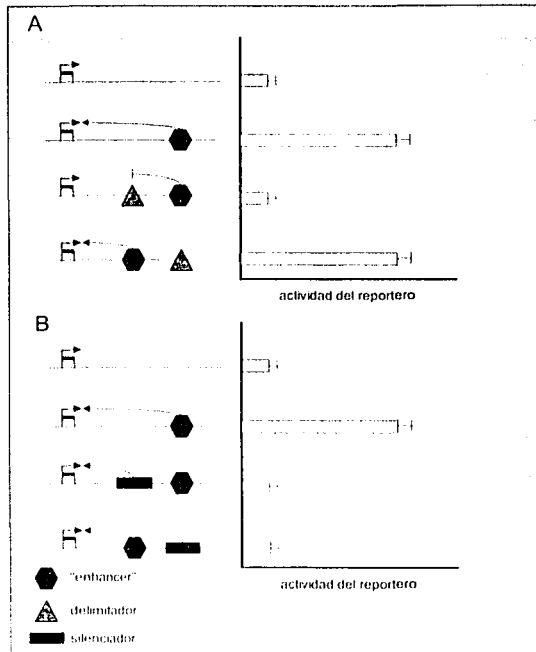


Figura 10. Esquema de las diferentes construcciones obtenidas en el vector pCAT $\alpha^D$ , que contiene el gen reportero que codifica la enzima CAT bajo el promotor  $\alpha^D$ . Cada una de las construcciones se clonó en la dirección 5'-3' y 3'-5'.



**Figura 11. Representación de un experimento para definir la actividad de bloqueo de "enhancer" o de silenciamiento clásico.** A. Modelo de un elemento delimitador. La primera construcción representa el control con la actividad basal del reportero, en la segunda construcción se localiza un "enhancer" que incrementa la transcripción del gen, en la tercera un elemento delimitador se encuentra entre el gen reportero y el "enhancer" y no hay incremento en la actividad del gen reportero por la interferencia del delimitador, por último cuando el delimitador se encuentra en un extremo y el "enhancer" se encuentra sin ningún obstáculo para interactuar con el gen reportero, la actividad del gen reportero se recupera. B. Modelo de un silenciador. La primera construcción representa el control con la actividad basal del reportero, en la segunda construcción se localiza un "enhancer" que incrementa la transcripción del gen, en la tercera el silenciador se encuentra entre el "enhancer" y el reportero, inhibiendo la actividad de este último. En la última construcción el "enhancer" podría interactuar con el reportero, pero el silenciador puede inhibir su actividad ya que no es importante su posición con respecto al gen reportero para inhibir su transcripción.

## 5.4. MUTACIONES DE LOS SITIOS CONSENSO DE UNIÓN A FACTORES TRANSCRIPCIONALES

La metodología de traslapamiento usada en el presente trabajo permitió cambiar los sitios consenso de unión de factores transcripcionales EKLF, NF-E2 y GATA1 de una forma eficiente, ya que solo se cambiaron las bases deseadas, como lo corroboró la secuenciación de estas construcciones (Fig. 12). De esta manera se generaron otras tres construcciones que fueron: pC $\alpha$ 3'-EKLF, pC $\alpha$ 3'-NFE2 y pC $\alpha$ 3'-GATA. Las construcciones con las mutaciones fueron posteriormente fueron transfectadas para comparar su actividad con respecto a la secuencia original.

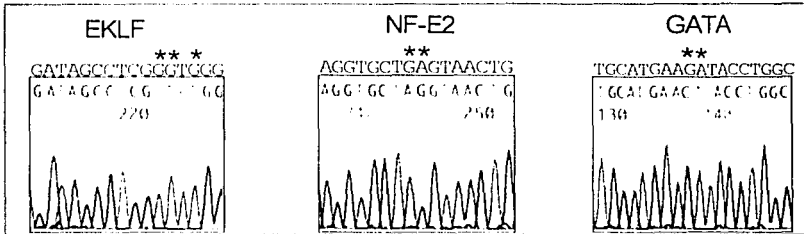


Figura 12. Secuenciación de las clonas obtenidas con las mutaciones en los sitios para los factores EKLF, NF-E2 y GATA. Los asteriscos indican las bases que se cambiaron para mutar el sitio, arriba la secuencia sin mutar y en el recuadro la secuencia obtenida después de realizar la mutagénesis, para todos los casos fue en las bases deseadas.

## 5.5. TRANSFECCIONES

### 5.5.1. Transfecciones transitorias en eritrocitos (RBC)

Los resultados generados de las transfecciones transitorias para cada una de las construcciones permitieron una mejor caracterización de la actividad de los elementos de tipo silenciador y "enhancer" del extremo 3' del dominio  $\alpha$ -globina en pollo. Primeramente se establecieron las condiciones del ensayo para la actividad de CAT, que son las reportadas en la sección de Materiales y Métodos.

Posteriormente se hicieron varios ensayos de transfección y se obtuvieron como resultado final los datos observados en la Fig. 13.

Los resultados indicaron que la construcción pC $\alpha$ 3'-E, que abarcaba los tres sitios de GATA-1 y que se habían definido como el elemento central del "enhancer" posee la mayor parte de la función activadora, comprobándose que se encuentra el "enhancer" en esta región. Una pequeña diferencia que no es importante se observa en la construcción pC $\alpha$ 3'-E4 que incluye a la 4ª caja de homología.

Los resultados sugieren que el elemento silenciador tiene una actividad de silenciamiento clásica es decir, no importa el lugar donde se encuentre con respecto al elemento "enhancer", su efecto es disminuir los niveles de actividad del reportero (Fig. 13, construcciones 5 y 6).

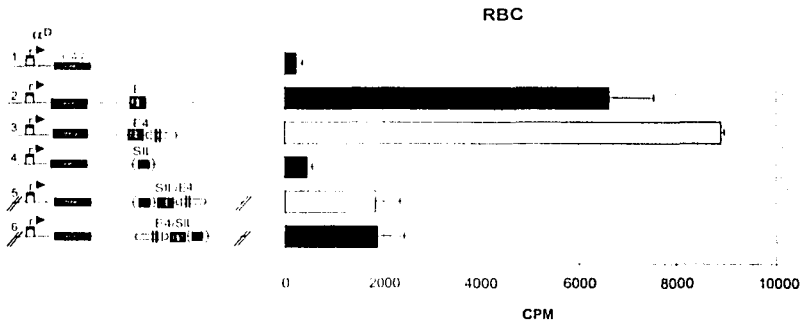


Figura 13. Actividad de CAT para de cada uno de los elementos de regulación del costado 3' del dominio  $\alpha$ -globina de pollo. Transfecciones transitorias en eritrocitos de embriones de 10 días en los que se observa la actividad del elemento "enhancer" al incrementar la actividad del gen reportero. También se pudo observar que el elemento silenciador tenía una actividad de silenciamiento clásica, pues no tenía actividad de bloqueo de "enhancer". Las construcciones de arriba para abajo son: 1) pCAT $\alpha^D$ , 2) pC $\alpha$ 3'E, 3) pC $\alpha$ 3'E4, 4) pC $\alpha$ 3'SIL, 5) pC $\alpha$ 3'SIL/E4 y 6) pC $\alpha$ 3'E4/SIL. Las transfecciones se realizaron en células eritroides de embriones de pollo de 10 días, con 6  $\mu$ g de cada construcción con el gen reportero de CAT y 6  $\mu$ g de pTK- $\beta$ gal, este último sirve para normalizar los datos de actividad con base en la eficiencia de la transfección midiendo la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Las dos últimas construcciones (5 y 6) fueron transfectadas usando plásmidos linealizados. n=4.

Posteriormente se hicieron transfecciones con las secuencias mutadas para los sitios de unión de los factores EKLF, NF-E2 y GATA-1, asociadas al elemento "enhancer" y a la 4ª caja de homología para determinar el efecto que pudieran tener con respecto a la misma región sin mutar (Fig. 6). La construcción que contenía la mutación para el factor EKLF, pC $\alpha$ 3'-EKLF, no tuvo efecto significativo sobre los niveles de actividad de la construcción pC $\alpha$ 3'E4 (Fig. 14, construcción 5). La mutación para el factor NF-E2 en el plásmido pC $\alpha$ 3'-NFE2 disminuye un 20% la actividad transcripcional si se compara con la construcción pC $\alpha$ 3'E4 (Fig. 14, construcción 6). De manera interesante el efecto más importante sobre los niveles de actividad del reportero se observó para la mutación del sitio GATA-1 de la región de la 4ª caja de homología, con la construcción pC $\alpha$ 3'-GATA-1 (Fig. 14, construcción 7), ya que los niveles de CAT disminuyeron prácticamente a la mitad. Esto concuerda con lo esperado ya que, como se describió en la introducción GATA-1 es uno de los factores más importantes en la regulación eritroide y de manera muy importante en la regulación positiva de genes eritroide específicos. Estos datos mostraron que el sitio GATA-1 en la 4ª caja de homología tienen una importancia mayor a la esperada y que su contribución a la actividad del "enhancer" es relevante. La forma en que interpretamos este resultado es que posiblemente la 4ª caja de homología es importante para la modulación de la actividad del "enhancer", en este caso solo se observa el efecto de la mutación en el sitio GATA-1, con lo que se corrobora la importancia que tiene este factor en la activación de genes eritroides, en particular en esta región donde EKLF y NF-E2 también están presentes, tal vez interaccionando entre ellos y con GATA-1, por lo cual sería importante en un futuro diseñar combinaciones de dobles y triples mutaciones.

Con el objetivo de ver cual es la contribución de la 4ª caja de homología sobre la actividad del reportero se realizaron otra serie de transfecciones con la construcción pC $\alpha$ 3'4, que incluye únicamente a la 4ª caja de homología sin el elemento "enhancer". El resultado muestra que este elemento tiene una actividad



neutra como había sido reportado previamente por Recillas y colaboradores (1993b) (Fig. 14, construcción 4).

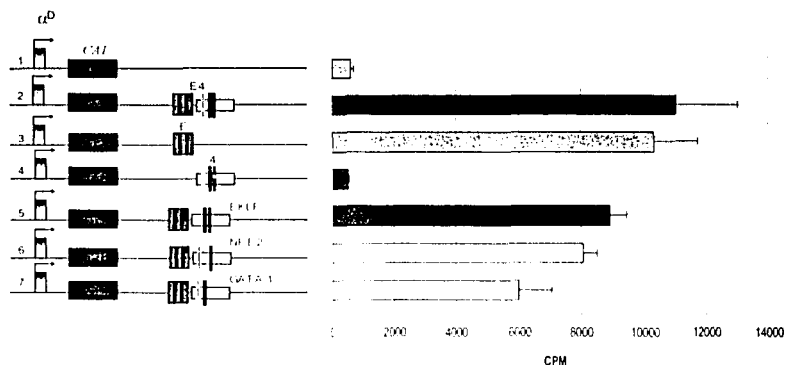
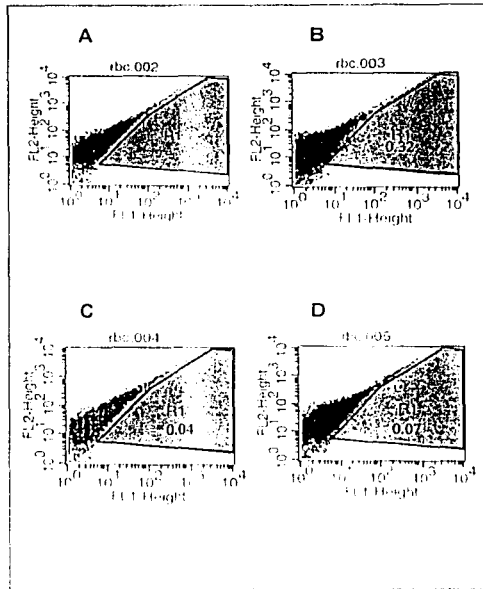


Figura 14. Actividad de CAT para las mutaciones de los sitios de unión de los factores EKL, NF-E2 y GATA-1. Las construcciones usadas de arriba para abajo son: 1) pCAT $\alpha^D$ , 2) pC $\alpha$ 3'E4, 3) pC $\alpha$ 3'E, 4) pC $\alpha$ 3'4, 5) pC $\alpha$ 3'-EKL, 6) pC $\alpha$ 3'-NFE2 y 7) pC $\alpha$ 3'-GATA en RBC. Como se puede observar la única mutación con un efecto significativo sobre los niveles de actividad del reportero fue la mutación en el sitio de unión a GATA-1, las demás permanecen casi en el mismo nivel de actividad. La construcción con la 4<sup>a</sup> caja de homología presenta los mismos niveles de actividad que el control n=3

Para comprobar que las condiciones usadas en la transfección de las construcciones en RBC fueron adecuadas, se hizo una construcción con el "enhancer" y el promotor  $\alpha^D$  y empleando como reportero al gen de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés: Green Fluorescent Protein), nombrada como pGE $\alpha^D$ . La fluorescencia de las células se midió con un citómetro de flujo y se evaluaron distintas condiciones de transfección fueron variando los valores de capacitancia y voltaje, para confirmar que con 450 V y 500  $\mu$ F, condiciones que se utilizaron para el gen reportero de CAT, se alcanza la mayor eficiencia de transfección (Fig. 15).



**Figura 15.** Determinación de la eficiencia de transfección en diferentes condiciones cuantificando la fluorescencia de GFP. El aumento en la fluorescencia debido a GFP se mide por el corrimiento hacia la derecha que tienen los puntos hacia la zona gris. En este experimento control se observa que la mayor actividad de GFP se obtuvo en las condiciones de transfección utilizadas para el ensayo de CAT. **A.** Control para determinar los niveles de autofluorescencia de RBC, no se transfectó ningún plásmido aunque si se dió el pulso eléctrico a 450 V y 500  $\mu$ F, en este caso no se observa actividad de fluorescencia. **B.** Transfección con 6  $\mu$ g del plásmido pGE $\alpha$ D, el porcentaje de transfección es 0.32% con 450 V y 500  $\mu$ F, que son las condiciones usadas para las transfecciones en este tipo celular. **C** , **D.** Transfecciones utilizando 500 V y 500  $\mu$ F y 350 V y 950  $\mu$ F respectivamente

### 5.5.2. Transfecciones transitorias en pre-eritroblastos (células 6C2).

Las células 6C2 son una línea de pre-eritroblastos de pollo que pertenece a un estadio de diferenciación eritroide previo a las RBC. En esta línea los genes globina no se están expresando por lo que los factores que controlan la expresión o activación de los genes globina en esta etapa no se encuentran presentes o si

están presentes (como en el caso de GATA-1) no alcanzan los niveles requeridos para la activación regulada de los genes. Se procedió a ensayar las mismas construcciones en este tipo celular con la finalidad de estudiar la actividad de esta región y de los fragmentos mutados en el estado de diferenciación eritroide, previo a la activación de los genes globina, y medir la actividad de CAT para las células transfectadas. Los resultados mostraron que el "enhancer" no tiene ningún efecto sobre los niveles de actividad del reportero en este tipo celular.

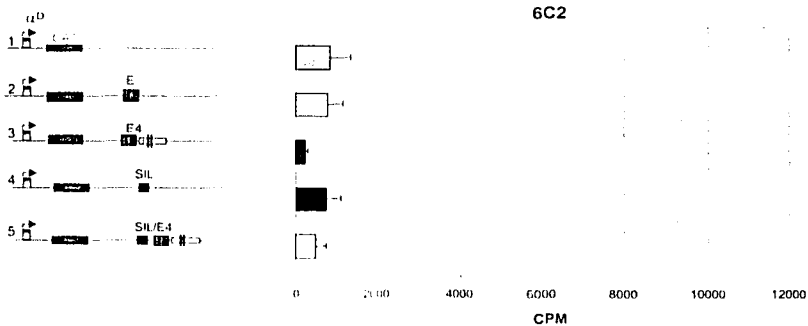
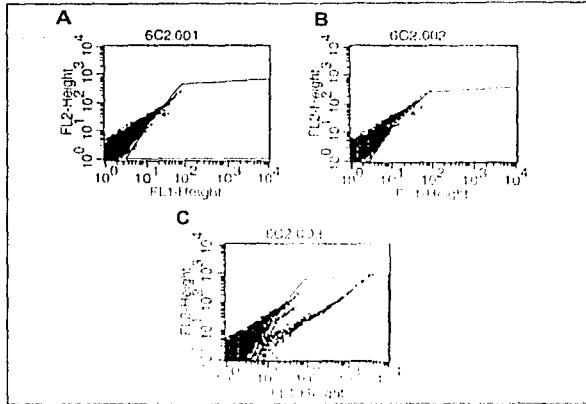


Figura 16. Resultados de las transfecciones transitorias en pre-eritroblastos de pollo (línea celular 6C2). Actividad de CAT en pre-eritroblastos de pollo, un estado de diferenciación en el que el "enhancer" es inactivo. Las construcciones usadas fueron 1) pCAT $\alpha^D$ , 2) pC $\alpha^3$ 'E, 3) pC $\alpha^3$ 'E4, 4) pC $\alpha^3$ 'SIL y 5) pC $\alpha^3$ 'SIL/E4. n=3.

Ya que los resultados observados podrían deberse a una pobre eficiencia de transfección en este tipo celular, se evaluó la eficiencia de transfección empleando a la GFP con el plásmido pGE $\alpha^D$  y de otro promotor y "enhancer" que no fueran eritroide específicos. Los resultados mostraron que no se obtiene ninguna actividad con el "enhancer" E4 y el promotor  $\alpha^D$  (Fig. 17 B). En las mismas condiciones de transfección pero utilizando el promotor y el "enhancer del citomegalovirus", que son activos en una gran variedad de tipos celulares, se obtuvo un aumento significativo en la fluorescencia (Fig. 17 C).



**Figura 17. Determinación de las condiciones de transfección eficientes por GFP fluorescencia por el método de citometría de flujo en células 6C2.** Los puntos en la parte sombreada representa la parte de la población celular que se transfectó y que tiene fluorescencia emitida por GFP. **A.** Control para determinar los niveles de autofluorescencia de la células. No se transfectó ningún plásmido aunque las células recibieron una descarga eléctrica a 200 V y 950  $\mu$ F. **B.** Transfección con 5  $\mu$ g del plásmido pGEmD a 200 V y 950  $\mu$ F, que son las condiciones usadas para las transfecciones transitorias. **C.** Transfecciones utilizando con el plásmido pGCMV que contiene el promotor y el "enhancer" para el citomegalovirus a 200 V y 950  $\mu$ F.

### 5.5.3. Transfecciones estables en pre-eritroblastos (células 6C2)

Una forma de confirmar los resultados obtenidos en pre-eritroblastos fue realizar transfecciones estables en este estado de diferenciación eritroide, ya que por tratarse de una línea celular y no de un cultivo primario, como las transfecciones en RBC, se podía hacer este tipo de experimento. Los resultados muestran que no hay ninguna influencia del "enhancer" sobre la transcripción del gen reportero y todas las construcciones tienen niveles de actividad de CAT parecidas al control (Fig. 18).

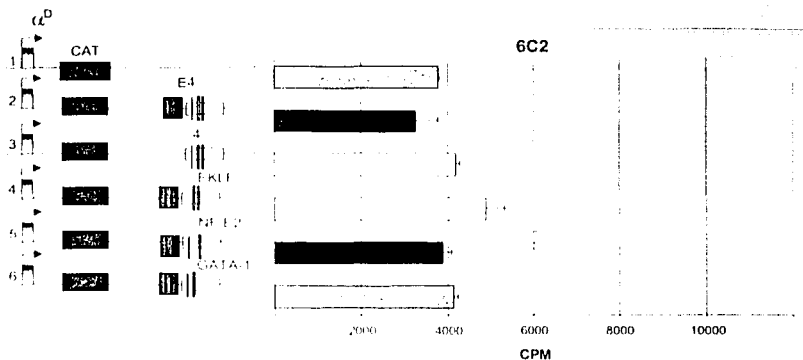


Figura 18. Transfecciones estables en pre-eritroblastos de pollo. En este experimento las construcciones se integran al DNA de la célula de manera estable, confirmando las observaciones que se hicieron en transfecciones transitorias (Fig. 16), ya que ambas se efectuaron en el mismo estado de diferenciación celular 1) pCAT $\alpha^D$ , 2) pCa3'E4, 3) pCa3'4, 4) pCa3'-EKLF, 5) pCa3'-NFE2 y 6) pCa3'-GATA en RBC n=3

## 5.6. INTERACCIONES PROTEÍNA-DNA.

El siguiente objetivo del trabajo fue caracterizar los factores protéicos que se unen a la región de control 3' del grupo de genes globina de pollo. En particular estudiamos la 4<sup>a</sup> caja de homología que, como ya se estableció por los resultados funcionales puede ser una región reguladora de la actividad del "enhancer". Como se sabe, en esta región existen sitios consenso de unión para los factores EKLF, NF-E2 y GATA-1 y pudieran existir otros sitios de unión a otros factores no identificados, que también pudieran tener un papel en la regulación diferencial de la expresión de los genes de ese dominio (Fig. 3).

Se realizaron gels de retardo con extractos de células 6C2 (pre-eritroblastos) y de embriones de pollo de 10 días de gestación (RBC) que están activamente expresando a las globinas, usando la sonda GATA-1 que tiene el sitio de unión al factor GATA-1 de la región de la 4<sup>a</sup> caja de homología. Estos experimentos mostraron que en células 6C2 existen dos complejos de retardo de

un peso molecular alto y que parecen estar en relación inversa a la concentración del factor GATA-1 (Fig. 19, carriles 5-7). En RBC el complejo GATA-1 es abundante y los otros complejos de alto peso molecular casi no se observan. En células 6C2 el complejo GATA-1 es poco abundante y los otros complejos de alto peso molecular están en mayor abundancia (Fig. 19, comparar los carriles 2 con el 5 y 8 con el 12). La sonda fría GATA-1 (Fig. 19; carriles 9-11 y 13-15) compete ambos complejos.

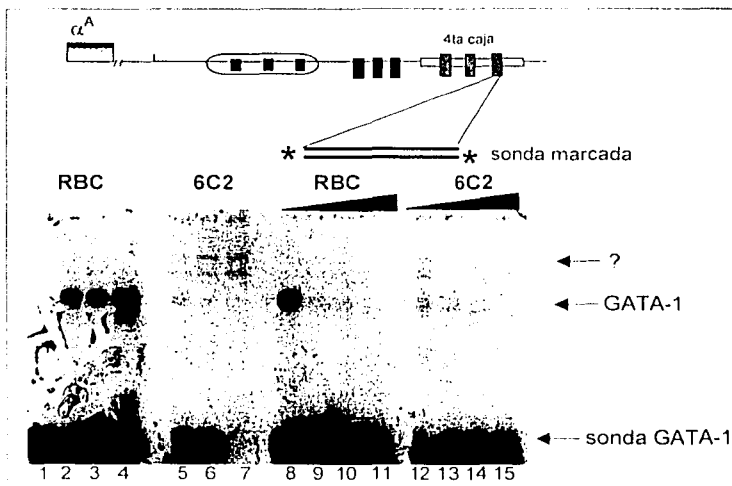
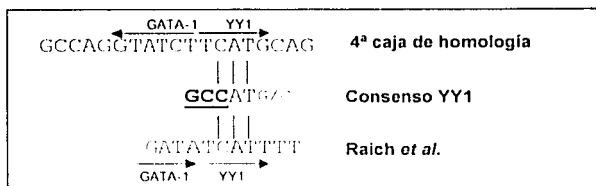


Figura 19. Gel de retardación para sonda de 4<sup>a</sup> caja de homología en la región de GATA-1. En los carriles 2, 3 y 4 se usó una concentración de 1, 3 y 6 µg de proteína de células RBC respectivamente, en los carriles 5, 6 y 7 se usó 3, 6 y 14 µg de proteína respectivamente de células 6C2. En los carriles 8-11 y 12-15 se observa la competencia para RBC y 6C2 al agregar una concentración creciente de sonda fría GATA-1.

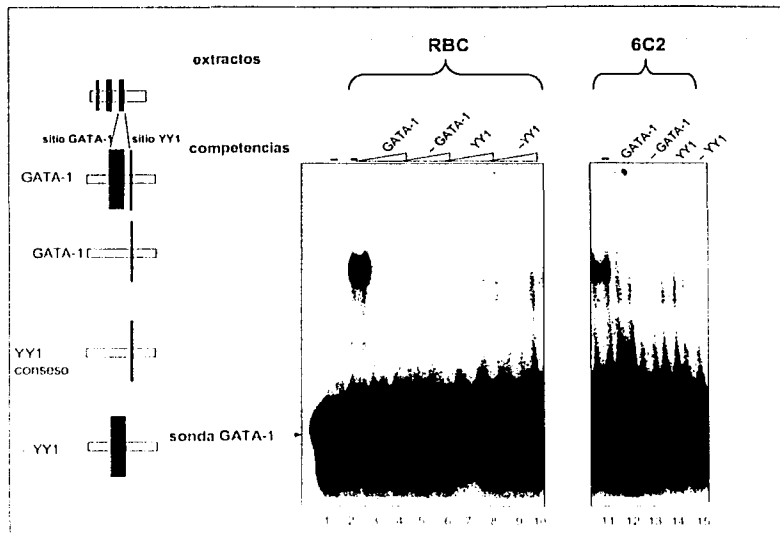
El análisis detallado de la secuencia de la sonda GATA (Fig. 20) permitió identificar un posible sitio de unión para el factor YY1, aledaño al sitio de reconocimiento del factor GATA-1. Este sitio es parecido al consenso reportado para GATA-1 para oligonucleótidos consenso para este factor (Santa Cruz Biotechnologies) y al sitio GATA-1 reportado por Raich y colaboradores (1995)

para promotor del gen  $\epsilon$  humano, en el cual se observaron un sitio GATA-1 seguido de tres nucleótidos conservados de la secuencia consenso para YY1.



**Figura 20. Análisis de secuencia en del sitio GATA-1 en la región de la 4ª caja de homología.** En la primera línea se muestra el sitio YY1 de la 4ª caja de homología, al lado del sitio GATA-1, las flechas indican la dirección de los sitios. En el segundo renglón se muestra el consenso para el factor YY1, los sitios importantes para su unión se encuentran subrayados y en negritas. En el tercer renglón se muestra el arreglo del sitio YY1 al lado de un sitio GATA-1, en el promotor del gen  $\epsilon$  humano. Las líneas verticales indican las bases que son iguales entre el sitio YY1 de la 4ª caja de homología, el consenso YY1 y el YY1 del promotor del gen  $\epsilon$ .

Con el objeto de demostrar que el factor YY1 se une al posible sitio de unión YY1 que se encuentra al lado del sitio de unión del factor GATA-1 en la 4ª caja de homología, se diseñaron sondas para competir al complejo formado por el factor GATA-1 y disociar la interacción de los distintos factores que reconocen a esta secuencia. Las sondas diseñadas se muestran en el lado izquierdo de la Fig. 21 y fueron descritas en la sección de Materiales y Métodos (Tabla 4). Utilizando la sonda marcada GATA-1 se observó que el complejo GATA-1 es más abundante en RBC que en células 6C2 (Fig. 21, comparar carriles 2 y 11). La sonda GATA-1 fría, así como las sondas -GATA-1, YY1 y -YY1 fueron capaces de competir por el complejo GATA-1, usando extractos de RBC y de células 6C2 (Fig. 21, carriles 3-10 y 12-15).



**Figura 21. Gel de retardo con la sonda GATA-1 y competidores, con extractos de RBC y con pre-eritroblastos (6C2).** Las sondas empleadas en las competencias se esquematizan a la izquierda. La sonda GATA contiene el sitio de unión al factor GATA-1 de la 4ª caja de homología, en la sonda -GATA están mutadas las bases importantes para la unión al factor GATA-1 (ver Tabla 3). La sonda -YY1 tienen una mutación deducida nuestro grupo para el sitio hipotético de unión de este factor, pero dejando intacto al sitio GATA-1 (Fig. 16). El diseño de las secuencias para todos los oligonucleótidos se basó en lo descrito en la literatura y por la compañía Santa Cruz Biotechnology.

Para determinar si el factor YY1 está interactuando con la sonda GATA-1 de la 4ª caja de homología, se utilizó el anticuerpo contra YY1 humano a diferentes concentraciones, y la sonda GATA-1 con extractos nucleares de RBC (H-414, sc-1703, Santa Cruz Biotechnologies). En todas las concentraciones utilizadas se formó un complejo de superretardo (Fig. 22).



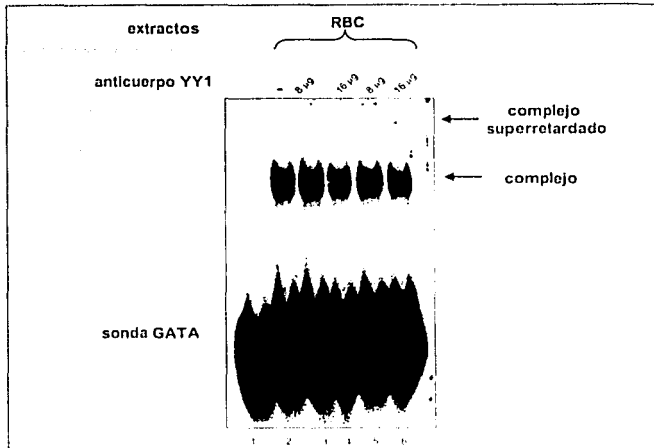


Figura 22. Gel de retardo para la sonda GATA con el anticuerpo YY1. En el gel se puede observar el complejo sin anticuerpo (complejo GATA-1) y el complejo de superretardo debido a la interacción del anticuerpo con la sonda GATA-1.

El complejo de superretardo se trató de competir con las sondas frías GATA y -GATA, para ver si la formación de este complejo GATA-1 y el anticuerpo YY1 humano era específico. Ambas sondas fueron capaces de competir al complejo de retardo (Fig. 23, carriles 4 y 5).

Como el anticuerpo empleado era específico para el factor YY1 humano, era necesario asegurar que el complejo de superretardo se debía a la interacción específica del anticuerpo humano con el factor YY1 de pollo, y no una interacción inespecífica del anticuerpo YY1 con otra proteína de pollo. Por lo anterior se realizaron algunos controles adicionales usando la sonda YY1 consenso. Los experimentos de retardo se hicieron con extractos nucleares de RBC y de células HeLa (una línea celular humana derivada de un cáncer cérvico uterino). Con la sonda YY1 consenso se observó la formación de un complejo de retardo que se cree es YY1, tanto con extractos de RBC como de células HeLa (Fig. 23, carriles 7 y 9). También se observó la formación de un complejo de superretardo con el anticuerpo contra YY1 humano (Fig. 23, carriles 8 y 10).

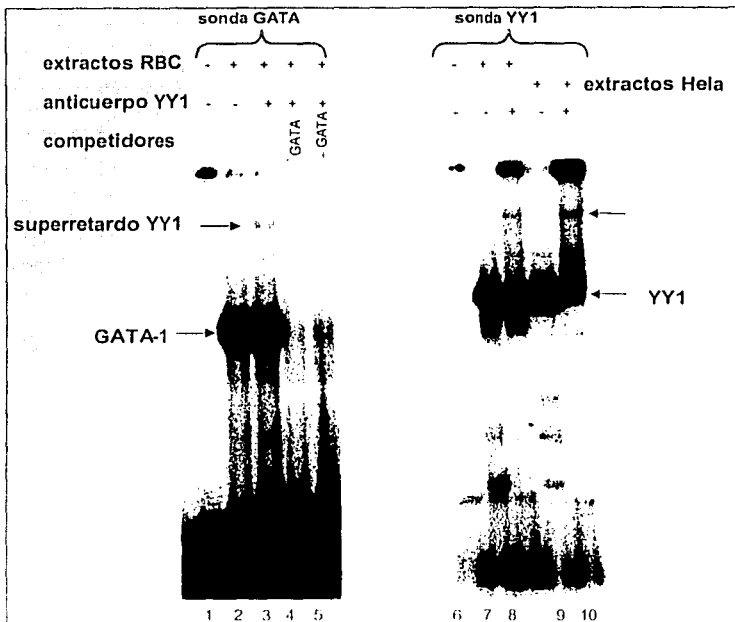


Figura 23. Superretardo para las sondas GATA y YY1 con el anticuerpo específico para YY1 humano. En el carril 1 se observa la sonda libre, en el carril 2 se observa el complejo GATA-1 con extractos de RBC utilizando a la sonda GATA-1 de la 4ª caja de homología. En el carril 3 se observa el complejo de superretardo con el anticuerpo YY1 (flecha). En los carriles 4 y 5 se observan las competencias del complejo de superretardo con las sondas frías GATA y -GATA. Con la sonda YY1 en los carriles 7 y 9 se forma el complejo YY1 (flecha) con extractos de RBC y de células HeLa respectivamente. Un complejo de superretardo se observa en los carriles 8 y 10.

Posteriormente se determinó la concentración del factor YY1 por medio de geles de retardo con extractos nucleares de RBC y células 6C2, que representan dos estadios de diferenciación eritroide. Para esto se utilizó la sonda YY1, que tiene el sitio consenso para la unión de este factor. Además, por medio de competencias con sondas frías se podría apoyar la interacción GATA-1 con YY1 (Fig. 24). Cuando la sonda consenso YY1 se puso a interactuar con extractos nucleares de RBC se formó un complejo que se propone pueda ser YY1 (Fig. 24,

carril 2). La misma sonda YY1 no marcada compete al posible complejo YY1 (Fig. 24, carril 3). Las competencias con factor -YY1 y GATA-1 fueron negativas (Fig. 24, carriles 4 y 5). La sonda -GATA-1 es la única que compete por el complejo YY1 cuando se utilizaron los extractos de RBC (Fig. 24, carril 6). La sonda -YY1 con extractos de células 6C2 no pudo competir por el complejo YY1 (Fig. 24, carriles 9-11). Por otra parte, la sonda GATA-1 compitió ligeramente por el complejo YY1 (Fig. 24, carriles 12-14). Por último, con la sonda -GATA-1 se observó una mayor competencia por el complejo YY1 con extractos de células 6C2 (Fig. 24, carriles 15-17), como también se había observado con extractos RBC (Fig. 24, carril 6).

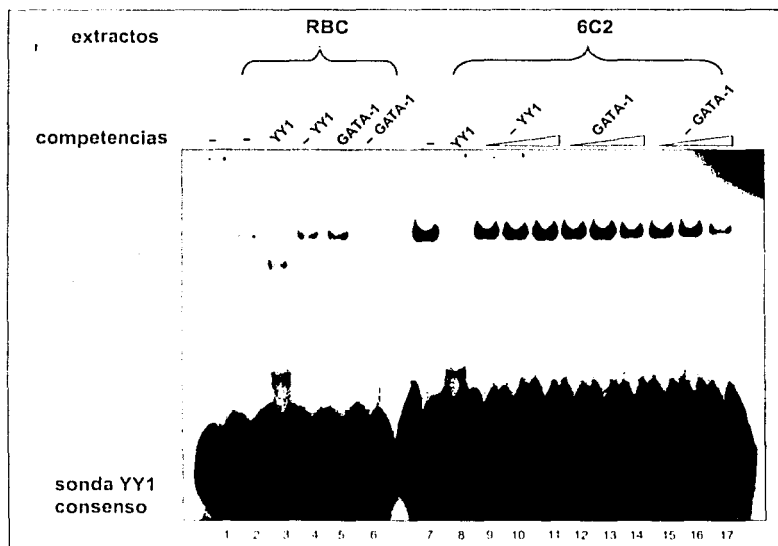


Figura 24. Gel de retardación para la sonda YY1, con extractos RBC y 6C2. En el gel se puede observar el complejo para el factor YY1 en el carril 2 y 7, y las competencias del mismo con la sonda YY1, -YY1, GATA-1 y -GATA-1 que ya se describieron en la Fig. 21.

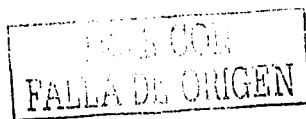
## 6. DISCUSIÓN

### *Extracción de DNA genómico de pollo, PCR y construcciones del gen reportero CAT con regiones regulatorias*

El DNA genómico de pollo que se obtuvo a partir de sangre fue de la calidad necesaria para utilizarlo en las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto lo sugiere el coeficiente de absorbancia 260/280 nm que fue de 1.92, que indica que la muestra no tenía contaminaciones de proteínas ni de carbohidratos. En el DNA genómico sin digerir no se observaron productos de degradación lo que indicó que el material obtenido estaba íntegro y la eficiencia de corte por parte de las enzimas de restricción confirma la pureza de la preparación. La digestión de DNA genómico con enzimas de restricción también sirvió para volver más accesible la región de interés a la DNA polimerasa y más eficiente la reacción de PCR. Para los fragmentos SIL/E4, SIL y E4 la mayor amplificación se obtuvo con el DNA digerido con *BamHI*. En el caso del fragmento E se nota una mejor amplificación con la digestión con *BamHI*. Cabe mencionar que en cada reacción se obtuvieron otras bandas además de la del tamaño esperado que pueden deberse a que los oligonucleótidos se alinearon y amplificaron otras regiones, pero en cada caso los productos inespecíficos son menos abundantes que el producto esperado. Las diferencias encontradas entre la secuencia obtenida en este trabajo y la reportada previamente por Recillas-Targa y colaboradores (1993b) se pueden deber a la variación normal de secuencias que hay de un organismo a otro, en este caso la línea de pollo utilizada.

*La 4ª caja de homología no es parte integral del "enhancer" y el silenciador tiene una actividad de silenciamiento clásica.*

En cuanto a los resultados de las transfecciones se corrobora lo reportado en la literatura acerca de que la zona que abarcaba los tres sitios GATA-1, denominada "enhancer", tiene la mayor actividad positiva sobre la transcripción del reportero (Recillas-Targa *et al.*, 1993b; Fig. 13, carril 2). El pequeño incremento



que se observó en la construcción E4, donde se incluyó a la 4ª caja de homología respecto a la construcción E que solo comprende el "enhancer" no es significativo (Fig. 13 y 14, construcciones 2 y 3). Lo anterior sugiere que la 4ª caja de homología puede ser importante en la regulación de la actividad del "enhancer" y que no funciona como una región de activación por sí sola, ya que la construcción 4, que solo incluye la 4ª caja de homología no tiene ninguna actividad sobre el reportero (Fig. 14, construcción 4). Los resultados también mostraron que el elemento silenciador transfectado en la construcción pC $\alpha$ 3'SIL, no tiene ninguna influencia sobre la actividad del reportero, ya que se mantuvo dentro de los mismos niveles de actividad del plásmido control pCAT $\alpha$ <sup>D</sup> que contiene solo al promotor  $\alpha$ <sup>D</sup> (Fig. 13, construcción 4).

En el ensayo para determinar la actividad de bloqueo de "enhancer" por parte del elemento silenciador una diferencia importante fue el empleo de plásmidos circulares y linearizados con la enzima de restricción PstI. En plásmidos circulares se observó lo que podía ser una actividad de bloqueo de "enhancer", donde el delimitador sólo inhibe la actividad transcripcional si se encuentra entre el gen reportero y el "enhancer". Cuando el gen reportero y el "enhancer" no tenían al silenciador entre ambos, sino que éste se encontraba a un costado, no se observó ninguna actividad de silenciamiento. En plásmidos linearizados no se observó el efecto de bloqueo de "enhancer" y no importaba si el silenciador se encontraba entre el gen reportero y el "enhancer" o a un costado, siempre había una actividad negativa sobre la actividad del reportero lo que indicaba la propiedad de un silenciador clásico (Fig. 13, experimentos 5 y 6). Esto se explica porque el elemento silenciador o el "enhancer" en un plásmido circular pueden ejercer su efecto tanto por el costado 5' como por el costado 3' (Recillas-Targa *et al.*, 1999), por lo que, la linearización de los plásmidos era imprescindible para delimitar la actividad bidireccional, tanto del silenciador como la del "enhancer", por lo que es necesario linearizar los plásmidos que se usan en este tipo de experimentos para tener resultados confiables. Cabe señalar que en el laboratorio hay resultados que señalan que no hay diferencias significativas en el nivel de degradación entre un

plásmido linearizado y un plásmido circular (Recillas-Targa *et al.*, 1999), por lo que consideramos que las diferencias observadas entre estas dos condiciones para el ensayo de bloqueo de "enhancer" posiblemente no pueden atribuirse a esta variable (Fig. 13).

De los sitios de unión a factores eritroide específicos localizados en la 4ª caja de homología, el sitio GATA-1 parece ser uno de los más importantes para la regulación de la activación transcripcional pues cuando se muta disminuyen notoriamente los niveles de actividad del reportero en presencia del "enhancer" (Fig. 14, construcción 7). La mutación en el sitio EKLF no tiene un efecto aparente sobre los niveles de actividad del reportero, mientras que la mutación en el sitio de unión para el factor NF-E2 presenta un efecto mínimo.

Los resultados de transfecciones transitorias y estables en células 6C2 muestran que el elemento "enhancer" es inactivo en pre-eritroblastos (Fig. 16 y 18). Esta inactividad se puede deber a que en este estado de diferenciación eritroide no se encuentran los factores necesarios para la actividad del "enhancer" y que éstos son de una clase eritroide específica. Lo anterior se apoya en el hecho de que utilizando el promotor y el "enhancer del citomegalovirus se tiene una actividad de fluorescencia (Fig 17 C) y por el contrario, cuando usan el promotor  $\alpha^D$  y el "enhancer" E no se obtiene ninguna actividad, lo cual también sugiere que las condiciones de transfección utilizadas son las adecuadas para la línea celular 6C2 y la inactividad de E no se debió a una transfección inadecuada. Lo anterior sugiere que un promotor y "enhancer" no eritroides pueden tener actividad, pero si estos elementos son eritroides no son funcionales.

Cabe señalar que cada una de las construcciones se transfectaron en ambas orientaciones sin que se observara alguna diferencia significativa, por lo que la orientación no es un factor importante para la actividad del "enhancer", del silenciador o de la 4ª caja de homología.

En resumen los resultados sugieren que: 1) el silenciador tiene una actividad de silenciamiento clásico y no una actividad de bloqueo de "enhancer"; 2) la actividad del "enhancer es dependiente del estado de diferenciación celular, incrementando la actividad del gen reportero en RBC, lo cual correlaciona con un estadio celular donde los genes globina están transcripcionalmente activos; 3) por otro lado en pre-eritroblastos el "enhancer" no es activo, lo cual concuerda con un estado de diferenciación en donde no se transcriben los genes globina; y 4) la 4ª caja de homología puede servir como un elemento modulador de la actividad de este elemento. Propuesta que deberá ser sustentada experimentalmente en un futuro.

*El factor GATA-1 tiene una abundancia diferencial en diferentes etapas del desarrollo eritroide, que correlacionan con la actividad transcripcional de los genes globina.*

Utilizando la sonda del GATA-1 de la 4ª caja de homología se forman dos complejos, uno que corresponde al factor GATA-1, como lo corroboran las competencias contra este factor efectuadas en trabajos anteriores (Recillas-Targa *et al.*, 1993a) y otros dos de mayor peso molecular. Hay una correlación entre la concentración de ciertos factores y la activación o silenciamiento de los genes globina en distintas etapas del desarrollo. El complejo GATA-1 es más abundante cuando los genes globina están transcribiéndose activamente (Fig. 19, carriles 2-4) mientras que el complejo de retardo de mayor peso molecular, que está formado por un factor distinto que se une a la sonda GATA-1, se observa en células donde los genes globina no se expresan (Fig. 19, carriles 5-7). Este factor pudiera estar desempeñando un papel en el silenciamiento de los genes globina dado que al unirse a una región cercana al sitio GATA-1, impediría que el factor GATA-1 interactuara con este sitio y activara la transcripción de los genes globina, aún cuando esté presente. La formación de ambos complejos es específica como lo muestran las competencias con la sonda GATA-1 fría, tanto con extractos de RBC (Fig. 19, carriles 9-11) como con extractos de pre-eritroblastos (células 6C2, Fig. 19, carriles 13-15). Cabe recordar que en eritrocitos terminalmente

diferenciados donde tampoco se expresan los genes globina, el complejo de mayor peso molecular es más abundante, mientras que el complejo GATA-1 es minoritario. Lo anterior sugiere una variación en los niveles de este factor que correlaciona con un estado en el que los genes globina están silenciados, tanto en pre-eritroblastos como en eritrocitos terminalmente diferenciados (Fig. 4A; carril 7, Recillas-Targa, 1993b)

*La 4ª caja de homología podría presentar un sitio de unión al factor YY1 al lado del sitio GATA-1.*

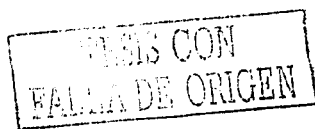
El factor YY1 tiene la capacidad de activar o silenciar la expresión de genes eritroides (Yao *et al.*, 2001). Si se comparan la secuencia consenso de unión para el factor YY1 y el posible sitio YY1 de la 4ª caja de homología, se observa que comparten cuatro pb de las cinco que son importantes en la secuencia consenso del sitio de unión a YY1. Por otra parte Raich y colaboradores (1995) reportaron un sitio de unión a YY1 aledaño a la secuencia de unión de GATA-1 en el costado 5' del silenciador del gen  $\alpha$  humano y que tiene un arreglo similar al que hemos identificado para GATA y YY1 en la 4ª caja de homología (Fig. 20). En los experimentos de geles de retardo usando como sonda marcada GATA-1 se observó la formación del complejo GATA-1 (Fig. 19, carril 2) y la competencia eficiente de esta misma sonda GATA-1 no marcada radioactivamente (Fig. 21, carriles 3 y 4). Lo anterior estuvo de acuerdo a lo observado en experimentos anteriores (Fig. 19, carriles 9-11). También hubo una competencia utilizando a todas las otras sondas, en el caso de la sonda -GATA-1 que tiene una mutación en el sitio GATA-1, se esperaba que no compitiera el complejo GATA-1, pero fue capaz de hacerlo, lo que se puede deber a una posible interacción entre los factores GATA-1 y YY1, pero que a la fecha no hemos demostrado (Fig. 21, carriles 5 y 6). La sonda YY1 que lleva el sitio consenso de unión del factor YY1 también es capaz de competir al complejo GATA-1, lo que indirectamente apoyaría la propuesta anterior (Fig. 21, carriles 7 y 8). Por último la sonda -YY1 que tiene mutado el sitio YY1 que proponemos existe en la 4ª caja de homología y que deja intacto el sitio GATA-1 compete al complejo GATA-1 como se esperaba



(Fig. 21, carriles 9 y 10). Las diferencias en la abundancia del factor GATA-1 en distintos estados de diferenciación eritroide sugieren que este factor y YY1 pudieran estar compitiendo para unirse a esta región.

Los datos anteriores son consistentes y se repitieron varias veces, aunque no son prueba suficiente para asegurar que existe una interacción entre los factores GATA-1 y YY1. Para dar más pruebas que apoyen la propuesta anterior se necesitarían realizar experimentos de coinmunoprecipitación u otras técnicas de estudio de interacción proteína-proteína, por lo que la interacción entre GATA-1 y YY1 aún no se demuestra y aquí se presenta como una posible explicación para los resultados anteriores. La propuesta anterior es interesante dado el papel de YY1 como activador y represor, y que se ha demostrado, puede estar asociado a la presencia del factor GATA-1 (Raich *et al.*, 1995; Merika y Orkin, 1995).

La formación del complejo de superretardo a partir del complejo GATA-1 utilizando la sonda GATA-1 apoya fuertemente el hecho de que el factor YY1 puede interactuar en la región del sitio GATA-1 que se encuentra en la 4ª caja de homología. La interacción del anticuerpo YY1 con el complejo GATA-1 no causa una disminución significativa de la señal que si se observó cuando se usó una mayor concentración de anticuerpo YY1 (16 µg, Fig. 22, carriles 4 y 6). Lo anterior pudiera deberse a que YY1 es poco abundante en el complejo y la mayor parte está formado por el factor GATA-1. La competencia del complejo de retardo por el anticuerpo ocurre con la sonda YY1. En este caso se forma un complejo de mayor peso molecular que suponemos es el complejo formado por el factor YY1 unido a la sonda y se puede observar con extractos de RBC y con extractos de células HeLa (Fig. 23, carriles 7 y 9). Cuando se agregó el anticuerpo a este complejo se observó una disminución significativa del complejo de retardo ya que el mismo está formado principalmente por YY1 (Fig. 23, carriles 8 y 10). El complejo de superretardo es más evidente con los extractos de células HeLa (Fig. 23, carril 10) que en células de pollo (Fig. 23, carril 8). Lo anterior se puede explicar por el hecho de que el anticuerpo utilizado era específico para YY1



humano y por lo tanto la afinidad del anticuerpo por la proteína de origen humano es mayor. Las competencias que se hicieron del complejo de superretardo YY1 usando la sonda GATA-1 con las sondas GATA-1 y -GATA-1 sugieren que la formación de este complejo se debe a la interacción del factor YY1 y no a otra proteína que no sería competida por estas sondas y apoyan la idea de que el factor YY1 es capaz de unirse a la región GATA-1 de la 4ª caja de homología, ya sea contactando al posible sitio YY1 por medio de interacciones proteína-proteína con GATA-1 (Fig. 23, carriles 4 y 5). En resumen, los resultados sugieren que el complejo de retardo que se forma cuando se usa el anticuerpo YY1 con la sonda GATA-1 y extractos nucleares de RBC, se debe a la presencia del factor YY1 en el complejo proteico GATA-1, y que posiblemente este factor está uniéndose a un sitio de la sonda del GATA-1 que se encuentra en la 4ª caja de homología (Fig. 22, carriles 3-6; Fig. 23, carril 3).

Por los experimentos de retardo con la sonda YY1 consenso en los que se observa que se formó un complejo de retardo (Fig. 24, carriles 2 y 7) y apoyados por los resultados de superretardo que se obtuvieron con el anticuerpo contra YY1, proponemos que el factor YY1 esta formando parte del complejo (Fig. 23, carriles 3, 8 y 10). YY1 parece ser más abundante en células 6C2 (Fig. 24, carril 7), que corresponde al estadio de diferenciación de pre-eritroblastos donde los genes globina no se expresan, que en extractos de RBC (Fig. 24, carril 2) donde los genes globina se están expresando activamente. Lo anterior sugiere que YY1 pudiera jugar un papel importante en la regulación de la expresión de los genes globina en el pollo, pudiendo existir una correlación de la concentración de este factor y una actividad de silenciamiento, que es dependiente del estado de diferenciación eritroide.

Las competencias usando la sonda YY1 marcada y competida consigo misma sugieren que la formación de este complejo es específica con extractos de RBC y de células 6C2 (Fig. 20, carril 3 y 8). No podemos explicar la formación de una banda de menor peso que se observa, pero es un resultado que no es

consistente, ya que en otros experimentos no aparece. Las sondas GATA-1 y -GATA-1 con extractos de células 6C2 compiten mejor al complejo YY1 (Fig. 24, carriles 12-14 y 15-17 respectivamente) que en extractos de RBC (Fig. 24, carriles 5 y 6 respectivamente), lo cual sugiere que la variación de la concentración posiblemente es la causa por la que no todas las sondas compiten de manera eficiente al complejo YY1. En RBC donde GATA-1 es abundante las sondas frías -YY1 y GATA-1 se unen a la proteína GATA-1, por lo que la sonda que queda libre es insuficiente para poder competir al complejo YY1 y no se observa una competencia del mismo (Fig. 24, carriles 4 y 5). De las sondas GATA-1 y -YY1, esta última, que no tiene el sitio YY1 y solo tiene al sitio de unión de GATA-1, suponemos es competida preferencialmente por el factor GATA-1. La sonda -GATA-1 es la única que no se une a la proteína GATA-1 y puede competir eficientemente por el complejo YY1 (Fig. 24, carril 6). En células 6C2, donde aparentemente el factor YY1 es más abundante y hay una menor concentración de la proteína GATA-1 son ligeramente más claras las competencias tanto con la sonda GATA-1 (Fig. 24, carriles 12-14) como con la sonda -GATA-1 (Fig. 24, carriles 15-17). Se discutió anteriormente la razón por la cual posiblemente -YY1 no compite al complejo YY1 a pesar de que tiene un sitio GATA-1, aunque por los resultados con la sonda GATA-1 en la que todas las sondas frías compiten al complejo GATA-1 se esperaba que todas las sondas compitieran de igual manera al complejo YY1. Posiblemente las proteínas GATA-1 y YY1, que en la sonda GATA-1 estarían involucradas en la formación del complejo GATA-1, interaccionarían de manera diferente en la sonda con la secuencia consenso para YY1. Basándose en los resultados anteriores, la interacción propuesta entre los factores GATA-1 y YY1 solamente es sugerida por un solo grupo de experimentos, aunque no es consistente con los experimentos de la sonda YY1 competida con la sonda GATA-1. Por lo tanto hacen falta más experimentos, ya sean geles de retardo con la doble mutante en la sonda GATA-1 (para el sitio GATA-1 y el sitio YY1), para demostrar como es que estos factores se están uniendo a esta región. Los resultados que se obtengan se podrían complementar con experimentos de superretardo usando un anticuerpo GATA-1. Por último también serían necesarios

ensayos de coimmunoprecipitación de proteínas, utilizando anticuerpos contra YY1 y GATA-1. Todo lo anterior demostraría la interacción entre los factores GATA-1 y YY1, que en este trabajo solo es una propuesta para explicar los resultados obtenidos. Si se obtuvieran resultados positivos acerca de la unión de YY1 a esta región y de su interacción con GATA-1, sería interesante estudiar el papel que juega este factor en la modulación de la actividad del "enhancer", por medio de transfecciones con construcciones que tengan la mutación en el sitio YY1 en la 4ª caja de homología. Cabe recordar que la posible asociación de GATA-1 con el factor YY1 se sugiere solamente en el silenciamiento del gen  $\beta$ : del locus  $\beta$ -globina en humano, como ya se mencionó anteriormente (Raich *et al.*, 1995; Merika y Orkin, 1995).

Los resultados anteriores sugieren que en la región de la 4ª caja de homología se encuentran interaccionando más factores transcripcionales, que los que previamente se habían identificado (Recillas-Targa *et al.*, 1993a). El regulador maestro de la expresión eritroide, el factor GATA-1 estaría interaccionando con otros factores transcripcionales, lo cual modularía su actividad en un momento dado del desarrollo. Otro aspecto importante que debe tomarse en cuenta como parte del mecanismo de regulación por GATA-1 serían las diferencias de concentración que tiene este factor en distintas etapas de diferenciación eritroide. Otro aspecto de relevancia tiene que ver con la homodimerización del factor GATA-1, así como la posible formación de heterodímeros con el factor Sp1 y proteínas relacionadas como EKLF (Fig. 25; Crossley *et al.*, 1995). El factor SF1 también se une al silenciador y es abundante cuando los genes globina no se están transcribiendo por lo que pudiera abatir cualquier influencia positiva del "enhancer" sobre la transcripción de los genes globina, aún cuando concentraciones mínimas de GATA-1 estuvieran presentes. Las interacciones entre los factores y la formación de complejos entre ellos reclutarían activadores o represores, los cuales pueden interaccionar con complejos remodeladores de la cromatina y al final tendrían un efecto sobre los niveles de transcripción de los genes globina. Por otra parte la activación o silenciamiento de los genes globina

no dependerá únicamente de la actividad del elemento "enhancer" o silenciador, sino que el promotor de cada gen sería importante para la regulación de la transcripción (Butler y Kadonaga, 2001). Cabe señalar que el dominio  $\alpha$ -globina es una zona constitutivamente abierta de la cromatina, altamente sensible al corte por la DNasa I (Craddock *et al.*, 1995; Vyas *et al.*, 1992, Recillas-Targa, 2000; Recillas-Targa y Razin, 2001) y en el costado 3' del locus  $\alpha$ -globina pudieran estar presentes genes cuya expresión sea constitutiva u otros genes eritroides que no se vean afectados por la presencia de los elementos de regulación asociados hasta el momento a este locus. En el laboratorio se ha identificado un nuevo sitio de hipersensibilidad ~4 kb río abajo del "enhancer"-silenciador, que puede representar el límite 3' del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

#### 6.1. MODELOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL "ENHANCER"

A continuación se proponen algunos modelos de como podría estar siendo regulado el elemento "enhancer" en el costado 3' del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

La acetilación y desacetilación de GATA-1, EKLF y YY1 por parte de HATs y HDACs (Boyes *et al.*, 1998; Ogryzko *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) es crucial para modular la actividad que sobre la transcripción tienen estos factores. El efecto que tienen la acetilación o desacetilación por lo que evaluar cual es su efecto sobre la actividad del "enhancer" (Fig. 25, modelo 1 y 3).

En años recientes la interacción proteína-proteína del factor GATA-1 con el cofactor peptídico FOG, contribuye a la regulación tanto positiva como negativa de la transcripción de genes eritroides en los que GATA-1 esta involucrado. Por lo anterior sería importante establecer si esta interacción tiene un papel en la regulación de la función del "enhancer" y el efecto que tiene ésta en la expresión de los genes globina (Fig. 25, modelo 2).

El modelo más interesante involucra la posible asociación o competencia entre GATA-1 y YY1. Visualizamos tres escenarios posibles: 1) cuando los genes globina necesitan ser silenciados en un determinado momento del desarrollo, el factor GATA-1 es poco abundante, a niveles que no permiten alcanzar una actividad óptima del "enhancer", permitiendo la unión del factor YY1 al sitio aledaño a la secuencia GATA-1 de la 4ª caja de homología; 2) en otro estado del desarrollo, cuando los genes necesitan ser activados el factor GATA-1 es abundante y se une preferentemente a su secuencia de unión; y 3) el factor YY1 pudiera interactuar o incluso ser reclutado por GATA-1 favoreciendo o estabilizando su unión al DNA. Posteriormente y con base a la bifuncionalidad de YY1 se puede modular la actividad del "enhancer" mediante el reclutamiento de remodeladores positivos y negativos de la estructura de la cromatina como lo son las HATs y las HDACs (Yang *et al.*, 1996; Fig. 25, modelo 3).

Además no se descarta la posibilidad de que otros factores transcripcionales que hasta el momento no se han identificado pudieran estar interaccionando en la región de la 4ª caja de homología y del "enhancer", como lo sugiere la presencia de numerosos sitios de unión CCACC, que están distribuidos en esta zona (Fig. 25, modelo 4). Actualmente no podemos olvidar que las interacciones proteína-DNA y la acción de cofactores puede determinar de manera específica el reclutamiento de remodeladores de la estructura de la cromatina.

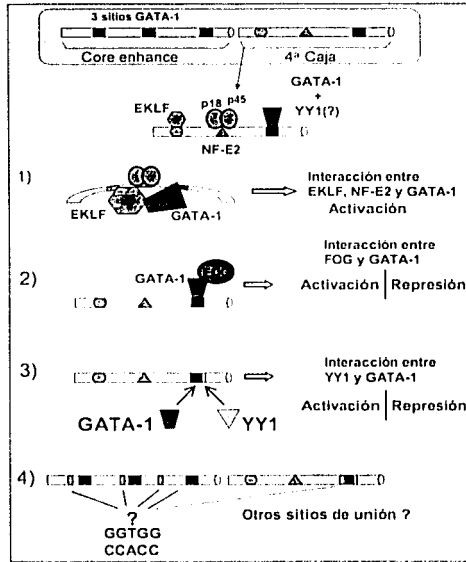


Figura 25. Modelos de la posible regulación de la actividad del "enhancer".

Por otro lado otra variable asociada a la regulación de la actividad del factor GATA-1 es la presencia de factores de la misma familia GATA y que también pueden unirse a los mismo sitios, como puede ser el factor GATA-2 (Ikonomi *et al.*, 2000). En este sentido las variaciones en los niveles de proteína entre los diferentes factores GATA serían importantes para activar o reprimir a un gen. Lo anterior ha sido claramente demostrado en etapas muy primitivas de la diferenciación eritroide (Leonard *et al.*, 1993a; Leonard *et al.*, 1993b). Experimentos con transfecciones transitorias en los que se incrementaron los niveles de la proteína GATA-1 disminuyen la expresión del gen embrionario  $\epsilon$ ; pero no de los genes fetales  $\gamma$  y  $\zeta$  en el dominio  $\beta$ -globina humano; por otra parte un aumento en los niveles de la proteína GATA-2 incrementa los niveles de expresión de los genes  $\epsilon$ ; y  $\gamma$ . Por lo tanto otros factores de la familia GATA pudieran estar participando para regular la unión del factor GATA-1 a esta zona.

Por último la importancia de este tipo de estudios radica en tratar de entender más sobre los mecanismos de regulación que llevan a la expresión de los genes en diferentes contextos, es decir, en un momento determinado del desarrollo de un organismo, en un tejido en particular y tomando en cuenta a la estructura de la cromatina. Como un problema de ciencia básica resulta muy interesante el planteamiento anterior, pero también se pueden deducir argumentos para el apoyo de este tipo de estudios directamente involucrados con la búsqueda de tratamientos contra las talasemias, que son un tipo de anemias causada por la expresión anormal de los genes globina. Las talasemias se caracterizan por una disminución en la producción de una o varias de las cadenas de hemoglobina (Hb). Esta disminución en la producción de un tipo de hemoglobina causa una severa anemia afectando a individuos que se encuentran principalmente en el Mediterráneo, África y Asia (Weatherall, 1998). Para la búsqueda de un tratamiento adecuado, primero se tienen que entender cuales son los elementos importantes en la regulación que permite alcanzar los niveles correctos de expresión de los genes globina.



## 7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó la actividad de un elemento de regulación transcripcional con actividad de "enhancer" y otro con actividad de silenciador, ambos ubicados en una región de 1 kb en el costado 3' del locus  $\alpha$ -globina de pollo.

Con este trabajo es que se se demostró que el silenciador no posee actividad de bloqueo de "enhancer", ya que no importa la posición donde se encuentre presenta una actividad de silenciamiento clásica.

En el estudio de la región del "enhancer" los resultados mostraron que la actividad principal de este elemento se encuentra concentrada en los tres sitios de unión al factor GATA-1 y al agregar la 4<sup>a</sup> caja de homología no se incrementa la actividad transcripcional del reportero de manera significativa, además de que por si misma no tiene ninguna actividad.

Los experimentos de interacción proteína DNA sugieren la presencia de un sitio de unión al factor YY1 cerca del sitio de unión del factor GATA-1 en la 4<sup>a</sup> caja de homología. Esta sería una nueva asociación de otro factor transcripcional importante en la regulación de la expresión de genes eritroides. La interacción entre el factor GATA-1 y YY1 es solo sugerida y haría falta más trabajo para demostrar este punto.

## 8. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos permiten proponer una serie de experimentos a futuro para tratar de entender más a detalle el mecanismo de acción del "enhancer" y del silenciador, así como definir su actividad conjunta a lo largo del desarrollo.

- Transfectar las construcciones en células HD3, que corresponden a una línea celular transformada de eritroblastos, es decir, a un estado de diferenciación más avanzado que a las células 6C2. En este estado de diferenciación se esperaría que el "enhancer" se encuentre activo aunque no a los niveles de los eritrocitos de embriones de pollo de 10 días de gestación (RBC). Esta línea celular tiene la peculiaridad de poder inducir su diferenciación mediante un cambio de temperatura y por lo tanto evaluar un estado de diferenciación eritroide más avanzado, en el que la actividad del "enhancer" aumente y se acerque a los niveles de activación observados en RBC. Datos preliminares de nuestro laboratorio demuestran que el "enhancer" es efectivamente activo en eritroblastos, que corresponde a la línea celular HD3.
- En este momento se cuenta en el laboratorio con un plásmido de expresión del DNAC de GATA-1. Co-transfección de este plásmido permitiría variar los niveles de la proteína GATA, lo cual sería de mucha utilidad para corroborar el papel de como activador transcripcional en la región 3' del locus  $\alpha$ -globina. Lo que se planea hacer es transfectar esta construcción en células 6C2 donde sabemos que los niveles de la proteína GATA-1 son bajos y donde sabemos que el "enhancer" es inactivo. Lo que se espera observar es un incremento en los niveles de actividad del gen reportero a medida que se aumentan la cantidad del plásmido transfectado y por lo tanto los niveles de GATA-1.

- Transfectar las construcciones de una manera estable en células que se encuentran en la etapa de eritroblasto, ya que de esta manera el experimento estaría en un ambiente más cercano al cromatínico e *in vivo*, ya que las construcciones estarían integradas al genoma de las células y no en un plásmido episomal.
- La generación de construcciones con dobles o triples mutaciones para los sitios EKLF, NF-E2 y GATA permitirá probablemente entender mejor que combinaciones de interacciones entre los factores son relevantes para la actividad del "enhancer".
- La clonación del DNAc de FOG-1 de pollo, que es un importante regulador en la actividad de GATA-1, el cual no se ha clonado ni estudiado en pollo. La expresión de FOG-1 en diferentes estados de diferenciación eritroide permitiría variar los niveles de esta proteína y comenzar a estudiar que papel tiene FOG-1 en la actividad de GATA-1 de pollo.
- La identificación y clonación del factor SF1, que se une al silenciador y cuya secuencia de unión al DNA no posee homología con sitios de unión a factores conocidos. Proponemos el uso de técnicas de bioquímica mediante columnas de afinidad hechas con la secuencia de unión de este factor a partir de extractos nucleares de RBC terminalmente diferenciados, donde esta proteína es más abundante. Una vez purificada la proteína se podría secuenciar el amino o carboxilo terminal, lo que permitiría conocer su secuencia parcial y comenzar la clonación del gen que codifica por la proteína SF1.
- Realizar coimmunoprecipitaciones de usando extractos de células 6C2, RBC y HD3 utilizando anticuerpos contra las diferentes proteínas que se sugiere están involucradas en la regulación de la región, como pudieran ser GATA-1, GATA-2, FOG, EKLF, NF-E2 y YY1. Los resultados podrían ayudar a entender el tipo y la combinatoria de asociaciones que se están llevando a cabo y correlacionarlas con la actividad del elemento "enhancer"

Con los resultados que se obtengan de estos experimentos se esperan avances significativos a largo plazo, que permitirían generar un modelo más confiable para explicar la relación funcional entre el elemento "enhancer" y el silenciador en el contexto del dominio  $\alpha$ -globina de pollo. Además la información que se generó en este trabajo será de utilidad para nuestro laboratorio, ya que hay dos proyectos complementarios en los que también se está estudiando la región 3' del dominio. Un proyecto tiene contemplado el estudio de estructura de la cromatina y su influencia sobre la actividad del "enhancer" y del silenciador; en el otro proyecto se pretenden generar mutaciones gruesas y finas mediante un sistema de recombinación homóloga en el contexto del cromosoma, es decir, del dominio  $\alpha$ -globina completo en el pollo y ver el efecto que estas modificaciones causan en la regulación de la expresión de los genes globina.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, N, Kolkow, K., Ney, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Orkin, S. 1993a. The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(24):11488-11492.
- Andrews, N., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M., Tempst, P. y Orkin, S. 1993b. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*. 362(6422):722-728.
- Armstrong, J., Bieker, J. y Emerson, B. 1998. A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF *in vitro*. *Cell*. 95(1):93-104.
- Austen, M., Luscher, B. y Luscher-Firzlaff, J. 1997. Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CPB)-binding protein. *J Biol Chem*. 272(3):1709-1717.
- Bauknecht, T., See, R. y Shi, Y. 1996. A novel C/EBP beta-YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. *J Virol*. 70(11):7695-7705.
- Behringer, R., Ryan, T., Palmiter, R., Brinster, R. y Townes, T. 1990. Human gamma- to beta-globin gene switching in transgenic mice. *Genes Dev*. 4(3):380-389.
- Berg, P., Williams, D., Qian, R., Cohen, R., Cao, S., Mittelman, M. y Schechter, A. 1989. A common protein binds to two silencers 5' to the human beta-globin gene. *Nucleic Acids Res*. 17(21):8833-8852.
- Blackwood, E. y Kadonaga, J. 1998. Going the distance: a current view of enhancer actino. *Science*. 281(5373):61-63
- Brand, A., Breeden, L., Abraham, J., Sternglanz, R. y Nasmyth, K. 1985. Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell*. 41(1):41-48.
- Breathnach, R. y Chambon, P. 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem*. 50:349-383.
- Brown, J., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. y Kassis, J. 1998. The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell*. 1(7):1057-1064.
- Bulger, M. y Groudine, M. 1999. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*. 13(19):2465-2477
- Burke, T., Willy, P., Kutach, A., Butler, J. y Kadonaga, J. 1998. The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:75-82.
- Bushmeyer, S., Park, K. y Alchison, M. 1995. Characterization of functional domains within the multifunctional transcription factor, YY1. *J Biol Chem*. 270(50):30213-30220.
- Butler, J. y Kadonaga, J. 2001 enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev*. 15(19):2515-2519.
- Cantor, A. y Orkin, S. 2001. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev*. 11(5):513-519.

- Cao, S., Gutman, P., Dave, H. y Schechter, A. 1989. Identification of a transcriptional silencer in the 5'-flanking region of the human epsilon-globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86(14):5306-5309.
- Caterina, J., Donze, D., Sun, C., Ciavatta, D. y Townes, T. 1994. Cloning and functional characterization of LCR-F1: a bZIP transcription factor that activates erythroid-specific, human globin gene expression. *Nucleic Acids Res*. 22(12): 2383-2391.
- Chan, J., Han, X. y Kan, Y. 1993. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(23):11371-11375.
- Chen, X. y Bieker, J. 2001. Unanticipated repression function linked to erythroid Kruppel-like factor. *Mol Cell Biol*. 21(9):3118-3125.
- Chiang, C. y Roeder, R. 1995. Cloning of an intrinsic human TFIIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science*. 267(5197):531-536.
- Clark, A. y Docherty, K. 1993. Negative regulation of transcription in eukaryotes. *Biochem J*. 296(3):521-541.
- Craddock, C., Vyas, P., Sharpe, J., Ayyub, H., Wood, W. y Higgs, D. 1995. Contrasting effects of alpha and beta globin regulatory elements on chromatin structure may be related to their different chromosomal environments. *EMBO J*. 14(8):1718-1726.
- Crispino, J., Lodish, M., MacKay, J. y Orkin, S. 1999. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell*. 3(2):219-228.
- Crossley M, Merika M, Orkin, S. 1995. Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol*. 15(5):2448-2456.
- Crossley, M., Whitelaw, E., Perkins, A., Williams, G., Fujiwara, Y. y Orkin, S. 1996. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLf/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol Cell Biol*. 16(4):1695-1705.
- Curtin, P., Pirastu, M., Kan, Y., Gobert-Jones, J., Stephens, A. y Lehmann, H. 1985. A distant gene deletion affects beta-globin gene function in an atypical gamma delta beta-thalassemia. *J Clin Invest*. 76(4):1554-1558.
- Donohoe, M., Zhang, X., McGinnis, L., Biggers, J., Li, E. y Shi, Y. 1999. Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol Cell Biol*. 19(10):7237-7244.
- Donze, D., Townes, T. y Bieker, J. 1995. Role of erythroid Krüppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*. 270(4):1955-1959.
- Dorsett, D. 1999. Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. 9(5):505-514.
- Driscoll, M., Dobkin, C. y Alter, B. 1989. Gamma delta beta-thalassemia due to a *de novo* mutation deleting the 5' beta-globin gene activation-region hypersensitive sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86(19):7470-7474.
- Evans, T. y Felsenfeld, G. 1989. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*. 58(5):877-885.
- Evans, T., Reitman M. y Felsenfeld, G. 1988. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(16):5976-5980.
- Felsenfeld, G. 1993. Chromatin structure and the expression of globin-encoding genes. *Gene*. 135(1-2):119-124.

- Forrester, W., Takegawa, S., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. y Groudine, M. 1987. Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids. *Nucleic Acids Res.* 15(24):10159-10177.
- Fox, A., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. y Crossley, M. 1999. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J.* 18(10): 2812-2822.
- Francastel, C., Magis, W. y Groudine, M. 2001. Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(21):12120-12125.
- Francastel, C., Walters, M., Groudine, M., Martin, D. 1999. A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centrometric heterochromatin. *Cell.* 99(3):259-269.
- Freeman, L. y Garrard, W. 1992. DNA supercoiling in chromatin structure and gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2(2):165-209.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. y Ausio, J. Modulation of chromatin folding by histone acetylation. 1995. *J Biol Chem.* 270(30):17923-17928.
- Gregory, R., Taxman, D., Seshasayee, D., Kensinger, M., Bieker, J. y Wojchowski, D. 1996. Functional interaction of GATA1 with erythroid Krüppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. *Blood.* 87(5):1793-1801.
- Grosveld, F., van Assendelft, G., Greaves, D. y Kollias, G. 1987. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell.* 51(6):975-985.
- Gutman, P., Cao, S., Dave, H., Mittelman, M. y Schechter, A. 1992. Binding of erythroid and non-erythroid nuclear proteins to the silencer of the human epsilon-globin-encoding gene. *Gene.* 110(2):197-203.
- Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y. y Simpson, P. 1997. Transcriptional activity of pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with the factor encoded by the u-shaped gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11(22):3096-3108.
- Hartzog, G. y Winston, F. 1997. Nucleosomes and transcription: recent lessons from genetics. *Curr Opin Genet Dev.* 7(2):192-198.
- Hebbes, T., Clayton, A., Thorne, A. y Crane-Robinson, C. 1994. Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* 13(8):1823-1830.
- Hesse, J., Nickol, J., Lieber, M. y Felsenfeld, G. 1986. Regulated gene expression in transfected primary chicken erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(12):4312-4316.
- Higgs, D. 1998. Do LCRs open chromatin domains? *Cell.* 95(3):299-302.
- Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. 1994. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature.* 367(6463):568-572.
- Ikononi, P., Noguchi, C., Miller, W., Kassahun, H., Hardison, R. y Schechter, A. 2000. Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. *Gene.* 261(2):277-287.
- Khoury, G. y Gross, P. 1983. Enhancer elements. *Cell.* 33(2):313-314.
- Kioussis, D., Vanin, E., deLange, T., Flavell, R. y Grosveld, F. 1983. Beta-globin gene inactivation by DNA translocation in gamma beta-thalassaemia. *Nature.* 306(5944):662-666.

- Knezetic, J. y Felsenfeld, G. 1989. Identification and characterization of a chicken  $\alpha$ -globin enhancer. *Mol Cell Biol.* 9: 893-901.
- Kolkow, K. y Orkin, S. 1996. Complexity of the erythroid transcription factor NF-E2 as revealed by gene targeting of the mouse p18 NF-E2 locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(8):3514-3518.
- Kutach, A. y Kadonaga, J. 2000. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol.* 20(13):4754-4764.
- Laybourn, P. y Kadonaga, J. 1992. Threshold phenomena and long-distance activation of transcription by RNA polymerase II. *Science.* 257(5077):1682-1685.
- Lee, J., Galvin, K. y Shi, Y. 1993. Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(13):6145-6149.
- Lee, J., Galvin, K., See, R., Eckner, R., Livingston, D., Moran, E. y Shi, Y. 1995. Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300. *Genes Dev.* 9(10):1188-1198.
- Leonard, M., Brice, M., Engel, J. y Papayannopoulou, T. 1993a. Dynamics of GATA-1 transcription factor expression during erythroid development and differentiation. *Blood.* 82 (107):1-9.
- Leonard, M., Lim, K., Brice, M., Engel, J. 1993b. Expression of the chicken GATA factor family during early erythroid development and differentiation. *Development.* 119: 519-531.
- Lewis, B., Tullis, G., Seto, E., Horikoshi, N., Weinmann, R. y Shenk, T. 1995. Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor. *J Virol.* 69(3):1628-1636.
- Li, Q. y Stamatoyannopoulos, J. 1994. Position independence and proper developmental control of gamma-globin gene expression require both a 5' locus control region and a downstream sequence element. *Mol Cell Biol.* 14(9):6087-6096.
- McDevitt, M., Fujiwara, Y., Shivdasani, R. y Orkin, S. 1997. An upstream, DNase I hypersensitive region of the hematopoietic-expressed transcription factor GATA-1 gene confers developmental specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(15):7976-7981.
- Merika, M. y Orkin, S. 1995. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol.* 15(5):2437-2447.
- Mignotte, V., Wall, L., deBoer, E., Grosveld, F. y Romeo, P. 1989. Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res.* 17(1):37-54.
- Miller, I. y Bieker, J. 1993. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* 13(5):2776-2786.
- Minie, M., Kimura, T. y Felsenfeld, G. 1992. The developmental switch in embryonic  $\rho$ -globin expression is correlated with erythroid lineage-specific differences in transcription factor levels. *Development.* 115(4):1149-1164.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. y Kan, Y. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(21):9926-9930.



- Ney, P., Andrews, N., Jane, S., Safer, B., Purucker, M., Weremowicz, S., Morton, C., Goff, S. y Orkin, S. y Nienhuis, A. 1993. Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner. *Mol Cell Biol.* 13(9):5604-5612.
- Nichols, K., Crispino, J., Poncz, M., White, J., Orkin, S., Maris, J. y Weiss M. 2000. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet.* 24(3):266-270.
- Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. y Grosveld, F. 1995. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature.* 375(6529):316-318.
- Ogbourne, S. y Antalis, T. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem.* 331(1):1-14.
- Ogryzko, V., Schiltz, R., Russanova, V., Howard, B. y Nakatani, Y. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell.* 87(5):953-959.
- Omichinski, J., Clore, G., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S. y Gronenborn, A. 1993. NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science.* 261(5120):438-446.
- Orkin, S. 1992. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood.* 80(3):575-581.
- Orkin, S. 1995. Regulation of globin expression in erythroid cells. *Eur. J. Biochem.* 231(2):271-281.
- Ouyang, L., Chen, X. Y Bieker, J. 1998. Regulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein II site within its interaction domain *J Biol Chem.* 273(36):23019-23025.
- Perkins, A., Sharpe, A. y Orkin, S. 1995. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature.* 375(6529):318-322.
- Peters, B., Merezinskaya, N., Diffley, J. y Noguchi, C. 1993. Protein-DNA interactions in the epsilon-globin gene silencer. *J Biol Chem.* 268(5):3430-3437.
- Pevny, L., Lin, C., D'Agati, V., Simon, M., Orkin, S. y Costantini F. 1995. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development.* 121(1):163-172.
- Raich, N., Clegg, C., Grofti, J., Romeo, P. y Stamatoyannopoulos, G. 1995. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene *EMBO J.* 14(4):801-809.
- Raich, N., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G y Enver, T. 1992. Demonstration of a human epsilon-globin gene silencer with studies in transgenic mice *Blood* 79(4):861-864.
- Recillas-Targa, F. 2000. the chicken  $\alpha$  y  $\beta$ -globin gene domains and their chromatin organization. *Cell Mol Biol. Lett.* 5, 451-467.
- Recillas-Targa, F. y Razin, S. 2001. Chromatin domains and regulation of gene expression: Familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. *Crit Rev Euk Gene Exp.* 11(1-3):227-242.
- Recillas-Targa, F., Bell, A. y Felsenfeld, G. 1999. Positional enhancer-blocking activity of the chicken  $\beta$ -globin insulator in transiently transfected cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(25):14354-14359.
- Recillas-Targa, F., De Moura Gallo, C. y Scherrer, K. 1993a. Analysis of the distribution of protein binding DNA motives in the vicinity of the 3'-side chicken  $\alpha$ -globin enhancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 190(3):1163-1172.

- Recillas-Targa, F., de Moura Gallo, C., Huesca, M., Scherrer, K. y Marcaud, L. 1993b. Silencer and enhancer elements placed at the 3'-side of the chicken and duck  $\alpha$ -globin gene domains. *Gene*. 129(2):229-237.
- Recillas-Targa, F., Razin, S., De Moura Gallo, C., Marcaud, L. y Scherrer, K. 1995. Silencer and enhancer elements and the framing structures of the chicken  $\alpha$ -globin gene domain. *In Molecular Biology of Hemoglobin Switching*. Editor: Professor George Stamatoyannopoulos. Intercept, 203-215 pp.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Tomo A.116 p.
- Seto, E., Lewis, B y Shenk, T. 1993. Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature*. 365(6445):462-464.
- Seto, E., Shi, Y. y Shenk T. 1991. YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription *in vitro*. *Nature*. 354(6350):241-245.
- Shi, Y., Seto, E., Chang, L. y Shenk, T. 1991. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell*. 67(2):377-388.
- Shivdasani, R., Fujiwara, Y., McDevitt, M. y Orkin, S. 1997. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*. 16(13):3965-3973.
- Shivdasani, R., Rosenblatt, M., Zucker-Franklin, D., Jackson, C., Hunt, P., Saris, C. y Orkin, S. 1995. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*. 81(5):695-704.
- Shrivastava, A., Saleque, S., Kalpana, G., Artandi, S., Goff, S. y Calame, K. 1993. Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science*. 262(5141):1889-1892.
- Smale, S. 2001. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev*. 15(19):2503-2508.
- Smale, S., Jain, A., Kaufmann, J., Emami, K., Lo, K. y Garraway, I. 1998. The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within melazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 63:21-31.
- Southwood, C., Downs, K. y Bieker, J. 1996. Erythroid Krüppel-like factor exhibits an early and sequentially localized pattern of expression during mammalian erythroid ontogeny. *Dev Dyn*. 206(3):248-259.
- Stamatoyannopoulos, G. y Nienhuis, A. 1994. Hemoglobin Switching. *In The Molecular Basis of Blood Diseases* (G. Stamatoyannopoulos, A.W. Nienhuis, P. Leder and P.W. Majerus, eds). W.B. Saunders, Philadelphia. 107-155
- Talbot, D. y Grosveld, F. 1991. The 5'SH2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *EMBO J*. 10(6):1391-1398.
- Tang, X., Liu, D. y Liang, C. 2001. Regulation of the transcription factor GATA-1 at the gene and protein level. *Cell Mol Life Sci*. 58(14):2008-2017.
- Tanimoto, K., Liu, Q., Grosveld, F., Bungert, J. y Engel, J. 2000. Context-dependent EKLF responsiveness defines the developmental specificity of the human epsilon-globin gene in erythroid cells of YAC transgenic mice. *Genes Dev*. 14(21):2778-2794.
- Trainor, C., Evans, T., Felsenfeld, G. y Boguski, M. 1990. Structure and evolution of a human erythroid transcription factor. *Nature*. 343(6253):92-96.
- Trepicchio, W., Dyer, M. y Baron, M. 1993. Developmental regulation of the human embryonic beta-like globin gene is mediated by synergistic interactions

- among multiple tissue- and stage-specific elements. *Mol Cell Biol.* 13(12):7457-7468.
- Tsai, S., Strauss, E. y Orkin, S. 1991. Functional analysis and *in vivo* footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev.* 5(6):919-931.
  - Tsang, A., Visvader, J., Turner, C., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M., Crossley, M. y Orkin, S. 1997. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell.* 90(1):109-119.
  - Tuan, D., Solomon, W., Li, Q. y London, I. 1985. The "beta-like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(19):6384-6388.
  - Usheva, A. y Shenk, T. 1994. TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell.* 76(6):1115-1121.
  - Vannucchi, A., Linari, S., Lin, C., Koury, M., Bondurant, M. y Migliaccio, R. 1999. Increased expression of the distal, but not of the proximal, Gata1 transcripts during differentiation of primary erythroid cells. *J Cell Physiol.* 180(3):390-401
  - Vitale, M., Di Marzo, R., Calzolari, R., Acuto, S., O'Neill, D., Bank, A. y Maggio, A. 1994. Evidence for a globin promoter-specific silencer element located upstream of the human delta-globin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 204(1):413-418
  - Vyas, P., Vickers, M., Simmons, D., Ayyub, H., Craddock, C. y Higgs, D. 1992. Cis-acting sequences regulating expression of the human alpha-globin cluster lie within constitutively open chromatin. *Cell.* 69(5):781-793.
  - Wang, J. y Gjaever, G. Action at a distance along a DNA. 1988. *Science.* 240(4850):300-304.
  - Weatherall, D. 1998. Thalassemia in the next millennium. *Ann N Y Acad Sci.* 850:1-9.
  - Weiss, J. y Orkin, S. 1995a. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995. 92(21):9623-9627.
  - Weiss, M. y Orkin, S. 1995b. GATA expression factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol.* 23(2):99-107.
  - Wijgerde, M., Gribnau, J., Trimborn, T., Nuez, B., Philipsen, S., Grosveld, F. y Fraser, P. 1996. The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev.* 10(22):2894-2902.
  - Yang, W., Inoue, C., Zeng, Y., Bearss, D. y Seto, E. 1996. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(23):12845-12850.
  - Yao, Y., Yang, W. y Seto, E. 2001. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol.* 21(17):5979-5991.
  - Zhang, W. y Bieker, J. 1998. Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(17):9855-9860.
  - Zhou, Q., Gedrich, R. y Engel, D. 1995. Transcriptional repression of the c-fos gene by YY1 is mediated by a direct interaction with ATF/CREB. *J Virol.* 69(7):4323-4330.

## 10. APÉNDICE

Todos los reactivos utilizados como se menciona anteriormente son de la compañía Sigma-Aldrich, a menos que se indique lo contrario.

- **DNA GENÓMICO DE POLLO**

### **Proteinasa K**

solución 20 mg/ml

### **ACD ( buffer de lisis)**

Ácido cítrico	4.8 g
Citrato de sodio	13.2 g
Glucosa	14.7 g

En 50 ml de H<sub>2</sub>O desionizada disolver en el orden que se indica, posteriormente aforar a 100 ml.

### **PBS (sin calcio) 10X**

NaCl	80.7 g
KCl	2.01 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.04 g

Disolver en 800 ml y ajustar pH de 7.2 a 7.4  
Ajustar vol a 1000 ml

- **TRANSFECCIONES**

### **Buffer de lisis para cuantificar RBC.**

Triton X-100 0.5%

NaCl 200 mM

Disolver en H<sub>2</sub>O desionizada.

### Medio L-15 complementado

Para preparar 20 ml de medio L-15 complementado:

- 1 ml de suero fetal bovino inactivado a 56°C por 30 min (Gibco BRL)
- 400 µl de suero de pollo inactivado (Gibco BRL)
- 200 µl de ampicilina/estreptomicina (Gibco BRL)
- 18.4 ml de L-15 (Gibco BRL)

### Medio $\alpha$ -MEM para células 6C2

Para un litro de  $\alpha$ -MEM, al que previamente se ha ajustado el pH entre 7.2 a 7.4 y se ha esterilizado por filtración agregar lo siguiente:

- 10% suero bovino fetal inactivado 100 ml (Gibco BRL)
- 2% suero de pollo 20 ml (Gibco BRL)
- ampicilina/estreptomicina 10 ml solución 10000 U/ml (Gibco BRL)
- 1 mM HEPES 1 ml solución 1 M pH 7.2 (Gibco BRL)
- 50 µM 2-mercaptoetanol 900 µl solución 55 mM (Gibco BRL)

Homogeneizar todo y almacenar hasta su uso a 4°C.

### • GELES DE RETARDO

#### Gel de acrilamida al 6 %

	para 50 ml (1gel)	100 ml (2 geles)
Acrilamida 30 %	10 ml	20 ml
TBE 5X	2.5 ml	5 ml
PSA	350 µl	700 µl
TEMED	15 µl	30 µl
H <sub>2</sub> O	37 ml	74 ml

• El TEMED se añade al final (es el que inicia la polimerización). Dejar polimerizar la acrilamida que sobra para tener una referencia de cuando esta listo el gel. Preparar el TBE 0.25 X aproximadamente 500 ml. Lavar todos los pozos antes de comenzar la precorrida a 150 V por una hora, cargando el primer pozo con colorante, en este lapso preparar las muestras.

### Acrilamida 30 %

	para 100 ml
Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g

\* La solución se puede calentar un poco para disolver la acrilamida, poner casi el vol final (100 ml). Aforar al vol final y pasar la solución por un papel filtro. Preparar 1 litro de TBE 0.25 X.

### Substrato CAT

Concentración Final		tomar del stock
Tris pH 8.0	0.3 M	3 ml Tris pH 8.0 1M
Cloramfenicol	3 mM	140 $\mu$ l solución 250 mM en etanol 100%
acetil-CoA (acetil-CoA)	25 $\mu$ M	250 $\mu$ l acetil-CoA 1mM
acetil-CoA [ $H^3$ ]	0.2 $\mu$ Ci	80 $\mu$ l 0.25 mCi/ml (Amersham)

Al final ajustar el vol a 10 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

### Gel shift buffer 2x (GSB 2x)

HEPES	40 mM pH 7.9
KCl	100 mM
MgCl	100 mM
Glicerol	10 %
DTT	1 mM

• Agregar por cada reacción 10  $\mu$ l de GSB 2X, 1  $\mu$ g de poly dI-dC (Pharmacia ) y 1  $\mu$ l de DTT 1 M para cada muestra. (Hacer una mezcla para todas las muestras con el GSB + poly dI-dC + DTT).

### Síntesis de la sonda radioactiva

Gel de acrilamida 10%-Urea 8%	100 ml
Urea	8 g
Acrilamida 30%	33.25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	65.87 $\mu$ l
TBE 5%	25 ml
PSA	700 $\mu$ l
TEMED	30 $\mu$ l

- Precorrer el gel 1 h a 150 V.
- Cargar la sonda en el gel y correr la muestra por 2 h.
- El gel se pone a exponer con un film 2 min, se revela. Con base en el film se corta del gel la parte que corresponde a la sonda en doble cadena (tiene un mayor peso) y se separa de los oligonucleótidos de cadena sencilla.
- Continuar con el proceso de la elución de la sonda.

### Buffer de elución.

Acetato de amonio	0.5 M
Acetato de magnesio	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0.1%

\* La banda de gel de acrilamida que contiene al fragmento se incuba toda la noche con 200  $\mu$ l de buffer de elución a 37 °C, posteriormente la mezcla se centrifuga a máxima velocidad en una microcentrifuga y el sn se pone a precipitar con 1/10 parte de acetato de Na 3 M pH 5.2, 2 vol de EtOH 100% y 1  $\mu$ l de glicógeno como acarreador, a -20 °C durante toda la noche. La mezcla se centrifuga a máxima velocidad en una microcentrifuga 20 min a 4° C. El pellet se resuspende en 40  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, este vial se pone a cuantificar en un tubo para el contador de centelleo y se lee la radioactividad en cpm. La lectura se diluye en el vol necesario para tener 10000 cuentas por  $\mu$ l.

### Buffer de apareamiento

Tris HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM

### Extractos nucleares

Para extractos, después de la lisis celular a todos los buffers se les agrega los siguientes inhibidores de proteasas:

PMSF 0.25 mM  
Leupeptina 5  $\mu$ g/ml

### Buffer E

Hepes pH 7.6	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	0.1 mM
ditiotretitol (DTT)	1 mM
glicerol	20%

### Buffer RSB

Tris-HCl pH 7.6	10 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM

**Buffer A:**

HEPES pH 7.9	10 mM	
NaCl	10 mM	
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	
DTT	1mM	} añadir al final
pepstatina	0.7 µg/ml	
leupeptina	0.5 µg/ml	
PMSF	0.5 mM	

**Buffer B:**

HEPES	0.3 M
KCl	1.4 M
MgCl <sub>2</sub>	0.03 M

**Buffer C:**

HEPES pH 7.9	20 mM	
NaCl	0.42 M	
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	
EDTA	0.2 mM	
Glicerol	25%	
DTT	1mM	} añadir al final
pepstatina	0.7 µg/ml	
leupeptina	0.5 µg/ml	
PMSF	0.5 mM	

**Buffer D:**

HEPES pH 7.9	20 mM	
NaCl	0.1 M	
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	
EDTA	0.2 mM	
Glicerol	20%	
DTT	1mM	} añadir al final
pepstatina	0.7 µg/ml	
leupeptina	0.5 µg/ml	
PMSF	0.5 mM	