

00377
39



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA EN EL SITIO ALFA
DEL SILENCIADOR TRANSCRIPCIONAL MÍNIMO DEL
GÉN DE LA INVOLUCRINA HUMANA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

BIOL. MARISOL SANDOVAL RÍOS

DIRECTORA DE TESIS: DR. ESTHER LÓPEZ-BAYGHEN PATIÑO



MÉXICO, D.F.



JUNIO, 2003

COORDINACIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**PAGINACION
DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas -
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso -
contenido de mi trabajo recepcional -
NOMBRE: Sandoval Ríos Marisol

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

FECHA: 06-26-03
FIRMA: [Firma]

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de abril de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Sandoval Ríos Marisol, con número de cuenta 501093642, con la tesis titulada: "Interacciones DNA-proteína en el sitio alfa del Silenciador Transcripcional Mínimo del gen de la involucrina humana.", bajo la dirección de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño.

Presidente:	Dra. María Isabel Soto Cruz
Vocal:	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Secretario:	Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño
Suplente:	Dra. María del Rocío Reyes Montes
Suplente:	Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de mayo de 2003.

[Firma]
Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Este trabajo fue realizado en el
Laboratorio de Regulación Transcripcional en Eucariontes del
Departamento de Genética y Biología Molecular
del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados,
del Instituto Politécnico Nacional,
bajo la dirección de la
Dra. Esther López-Bayghen Patiño.**

**ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO GRACIAS AL APOYO
CONCEDIDO POR CONACYT (PROYECTO 30579-M)**

**DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO LA AUTORA FUE BECARIA
DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(NO. DE REGISTRO 167177)**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. María del Rocío Reyes Montes
Depto de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Armando R. Tovar Palacios
Departamento de Nutriología Molecular
Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán."

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

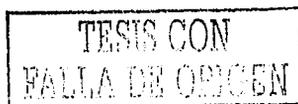
*Para poder diseñar y construir grandes proyectos, debemos contar de igual manera con grandes guías, gracias por ser y seguir siendo mi gran guía Dra. Esther, se que trabajando juntas llegaremos a donde queramos.

*Aunado un gran asesoramiento y una importante experiencia, desemboca en la realización de grandes proyectos, gracias por brindarme esta magia Dra. Rocio y Dr. Armando.

*Porque con su profesionalismo y dedicación hace de los experimentos grandes proyectos, agradezco de gran corazón a la Q.F.B. Matilde Corona Reyes.

*Sabes, con tus enseñanzas y consejos profesionales pudimos obtener valiosos resultados que en su conjunto permitieron construir este proyecto, especialmente expreso mi agradecimiento al M. en C. Alejandro Millan Vega por regalarme parte de sus secretos científicos y por estar siempre conmigo a lo largo de esta etapa.

*Si la vida se forma de bellos momentos, ahora se que los laboratorios se forman de grandes experimentos y de grandes aventuras entre amigas. Gracias Maty, Miri, Moni, Marcia y Traudy por hacer de este laboratorio un gran lugar de trabajo, y compañerismo, por compartir conmigo todos los momentos de Luna, no lo creen?.



AGRADECIMIENTOS

*La importante asistencia técnica de Gerardo Marmolejo nos ha permitido llevar a cabo cada uno de los valiosos experimentos, gracias Gersito.

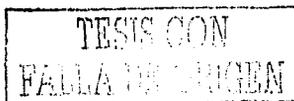
*Agradezco a Guadalupe Aguilar encargada de la Unidad de Ácidos Nucleicos, DGBM, por el apoyo para la elaboración de oligonucleótidos y su eficiencia en el trabajo.

*Gracias a todos los integrantes del laboratorio 23 por toda su gran ayuda, se que de repente doy mucha lata, pero creanme que todo es por la Ciencia.

*A la dulce niña Gaby, por la gran calidad de trabajo que realiza y por sus especiales charlas que me regala.

*Por todo el asesoramiento administrativo recibido de Ma. Paz y Lilia, gracias por estar siempre al pendiente de "la niña del CINVESTAV. "

*Al equipo de trabajo de la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud: Arnulfo Apango, Pedro Hernández, Alberto Martínez, Evangelina Ramos, Martha Evelin Mena, José Luis Zarco e Imelda Saldaña, por su amable y eficiente trabajo.



AGRADECIMIENTOS

*Día con día vamos cumpliendo nuestros sueños y anhelos, ahora en estos momentos, juntos hemos cumplido uno más de nuestros sueños, gracias papás por estar conmigo y por anhelar estos momentos tanto como yo.

*Meris, Lili y Luisito, ya lo estamos logrando, nuestros sueños siguen creciendo y ahora hay nuevas metas que cumplir juntos, gracias por toda su comprensión y cariño.

*Claudia, Elizabeth, Horte, Gammita, Everardo y René, siempre amigos, gracias por compartir conmigo todas aquellas emociones vividas a lo largo de este sueño, te acuerdas Clau de las maravillosas experiencias de los cursos, eso si no hay que olvidarlo.

*Guille, toda la confianza que me brindas, consejos, una valiosa amistad y las largas charlas que aún tenemos, están intercaladas en este también tu sueño, así que no te prometo dejarte dormir temprano, gracias.

*A todas aquellas personas que me dieron sabios consejos y estuvieron siempre dispuestos a ayudarme, gracias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

	Página
• RESUMEN	1
• ABSTRACT	2
• INTRODUCCIÓN	3
Características de la epidermis	3
Factores que regulan la proliferación y diferenciación epitelial	4
Elementos que regulan la transcripción genética	5
Factores que intervienen en la regulación genética de los queratinocitos	6
Características generales del gen de la Involucrina Humana (Hi)	8
Regulación transcripcional del gen Hi	9
Promotor-Potenciador Proximal	9
Potenciador Distal	10
Silenciador Transcripcional	11
Elemento Silenciador Mínimo	12
El factor de transcripción Octa-2 reconoce al Elemento Silenciador Mínimo	13
Región octamérica alfa del Elemento Silenciador Mínimo	14

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

	Página
• OBJETIVOS	16
• MATERIALES Y MÉTODOS	17
Cultivos Celulares	17
Ensayos Bioquímicos:	17
Extractos nucleares	17
Oligonucleótidos	17
Marcaje de oligonucleótidos	19
Ensayos de Retardamiento y Competencia	19
Ensayos de interacción Proteína-Proteína	20
Ensayo de inmunoprecipitación	20
Inmunodetección en fase sólida	20
Ensayos Funcionales	21
Plásmidos	21
Ensayos de transfección transitoria y ensayos CAT	21
• RESULTADOS	23
Factores de transcripción de la familia NF-1 interactúan en la región octamérica alfa del Elemento Silenciador Mínimo del gen de Hi	23
NF-1 en el contexto del funcionamiento del gen de Hi	36

	Página
• DISCUSIÓN	40
• CONCLUSIONES	48
• LITERATURA CITADA	49

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

La involucrina humana es una de las proteínas de la cubierta cornificada, que se forma en los queratinocitos de la epidermis, a fin de permitir la función de barrera protectora e impermeable que forma la piel. La expresión del gen de la involucrina humana (Hi) es tejido-específica y dependiente del proceso de diferenciación celular. La Región Reguladora del gen Hi consta de 2456 pb y presenta tres regiones funcionalmente importantes: un Promotor/Potenciador Proximal (PPP), un Silenciador Transcripcional (ST) y un Potenciador Distal (PD). La represión transcripcional del gen de Hi, en queratinocitos no diferenciados, está mediada por la región del Silenciador. Se delimitó un fragmento de 52 pb que mantiene la actividad del Silenciador al que se nombró Elemento Silenciador Mínimo (ESM). El factor de transcripción Octa-2 interacciona específicamente con el ESM y su unión es esencial en la actividad represora ejercida por el ESM. El principal objetivo de este trabajo fue el investigar cuál o cuáles son los factores de transcripción, diferentes a Octa-2, que reconocen al ESM, específicamente aquéllos relacionados con la región denominada alfa (fragmento izquierdo del ESM). Se determinó que la región alfa es un sitio de interacción para factores de transcripción de la familia NF-1 y que estos factores pueden establecer una interacción directa con el factor Octa-2. Así mismo, pudo establecerse que el factor Octa-2 también interacciona con el factor c-Fos. Estas interacciones pueden ser de gran importancia para la regulación del gen de Hi, NF-1 podría actuar como un co-represor junto con Octa-2 y la interacción de Octa-2 con c-Fos, podría impedir que el factor AP-1 ejerciera su efecto positivo sobre el PPP del gen Hi. Apoyando esta hipótesis, encontramos que en ausencia de NF-1, la actividad de la región completa se incrementa. En conclusión, NF-1 participa formando parte de los factores que reconocen el ESM y pueden mediar su efecto silenciador.

TEXTO CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

The human involucrin is an important protein of the epithelial cornified layer. The human involucrin gene (Hi) is expressed only in keratinocytes during their differentiation process. The human involucrin 5' non-coding region contains three regulatory domains: a proximal enhancer/promoter (PEP), a transcriptional silencer (TS), and a distal enhancer (DE). The transcriptional silencer is regulating in a negative fashion the proximal enhancer/promoter in multiplying human keratinocytes. The minimal region with transcriptional silencer activity was defined to 52 bp segment named as the Minimal Silencer Element (MSE). The Oct-2 transcription factor is one of the proteins that interact with the minimal silencer element. This transcription factor acts as a transcriptional repressor depending on the MSE presence. In this study we determined that members of the NF-1 family are interacting with the minimal silencer element, specifically with the alpha region. Moreover, NF-1 present a direct interaction with the Oct-2 transcription factor, also we detected that Oct-2 present a direct interaction with the c-Fos transcription factor. Those interactions can be very important in regulating negatively the human involucrin gene expression along the multiplying stage, when the gene is silent. NF-1 may has an important role in the negative transcriptional regulation because we found that in the absence of this protein, the Hi promoter experience an increase in activity. All this data suggest a scenario in which NF-1 and Oct-2 acting together as co-repressors bound to the ESM, can be avoiding AP-1 positive effect over the promoter.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

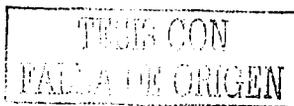
El estudio de la expresión genética es de gran importancia para poder explicar como los genes eucarióticos están siendo regulados transcripcionalmente bajo circunstancias muy específicas. Por otra parte, la diferenciación celular es uno de los principales procesos que llevan a cabo los organismos eucarióticos, siendo este proceso definido por una cascada de cambios en la expresión de genes que regulan el crecimiento y la diferenciación celular de forma específica, desarrollando características estructurales y funcionales que son únicas para cada tipo de células (Karp 1996).

La piel ha sido uno de los modelos centrales para el estudio de la regulación transcripcional de genes que participan durante el proceso de diferenciación celular. El estudio del gen de la involucrina humana (Hi), nos brinda un excelente modelo para el entendimiento de los mecanismos moleculares que rigen la regulación transcripcional de los genes que participan en este proceso (Eckert y cols., 1997).

Características de la epidermis

La piel está constituida principalmente por dos capas: la capa externa de células epiteliales llamada epidermis, donde el principal tipo de células responsables de la construcción de barreras protectoras son los queratinocitos epidermales, y la interna o dermis formada de tejido conectivo, vasos sanguíneos, nervios y otras estructuras especializadas (Fuchs y cols., 1994, Schallreuter y cols., 1995, Eckert y cols., 1997). En la epidermis se pueden distinguir cuatro estratos celulares:

Estrato basal, consiste de una capa sencilla celular que está sujeta por la lámina basal mediante uniones tipo hemidesmosomas. Esta capa contiene la población celular en constante división que proporciona un suministro continuo de nuevas células para repoblar la epidermis.



Estrato espinoso, caracterizado por la presencia de conexiones extensas de desmosomas entre las células. En este estrato se inicia la expresión de algunos genes que son considerados como marcadores tempranos de la diferenciación de los queratinocitos, como los genes de la involucrina y la transglutaminasa 1 (TG-1).

Estrato granuloso, en este estrato se inicia la síntesis de una serie de proteínas estructurales importantes como son: la loricrina, filagrina y la cistatina. Estas proteínas se depositan en gránulos citoplasmáticos y se van depositando en la región submembranal, siendo usadas para ensamblar estructuras de queratinocitos terminales, incluyendo la membrana cornificada. Así mismo las células de la capa granular contienen todos los organelos y actividades típicas asociadas con la función del metabolismo celular.

Estrato córneo, en el cuál las células cornificadas (corneocitos) representan el estado terminal en la diferenciación de queratinocitos. Las células mueren y se convierten en escamas planas, fuertemente unidas entre sí mediante desmosomas, tienen una gran cantidad de fibras de queratinas a lo largo del citoplasma, las cuales quedan rodeadas por la cubierta cornificada. Estas células se apilan en varias capas formando lo que se conoce como estrato cornificado, una estructura altamente resistente a la degradación que tiene como función la protección contra los rayos UV y agentes infecciosos, así como también evitar la desecación. La composición de billones de queratinocitos terminales o corneocitos, forman la epidermis superficial protectora.

Factores que regulan la proliferación y diferenciación epitelial

El desarrollo y funcionalidad de la epidermis depende del balance adecuado entre las tasas de proliferación y diferenciación de los queratinocitos (Eckert y cols., 1997).

Los factores que regulan la proliferación de los queratinocitos son considerados como estimuladores de crecimiento, encontrando que el factor de crecimiento

similar a la insulina (IGF - I y IGF - II), y los factores de crecimiento epidermal (EGF), aumentan la migración y proliferación de queratinocitos, así mismo el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), estimula tanto la proliferación como la diferenciación de los mismos. Por otro lado, los factores de crecimiento transformantes (TGF β 1 y 2) suprimen la proliferación de células epiteliales, promoviendo la diferenciación celular. Así mismo, los glucocorticoides como la hidrocortisona, son potenciadores de la diferenciación celular de los queratinocitos (Eckert y cols., 1997, Gniadecki 1998).

Algunos de los genes que se expresan durante la diferenciación celular de los queratinocitos de manera coordinada son: el gen de la loricrina, filagrina, cistatina y el gen de la involucrina, cuyos productos son de gran importancia para la formación de la cubierta cornificada (Dale y cols., 1985). Estos genes se localizan en el cromosoma 1q21 humano y se han agrupado en una familia multigénica conocida como "Complejo de Diferenciación Epitelial" (Volz y cols., 1993). La expresión de este grupo de genes se activa en los estratos suprabasales de la epidermis, una vez que el proceso de diferenciación ha comenzado y se sabe que la alteración en la expresión de alguno de ellos está relacionada con trastornos de la piel como la psoriasis (Bernard y cols., 1985) y con procesos carcinogénicos (Pei y cols., 1996).

Elementos que regulan la transcripción genética

Existen diferentes clases de elementos en el ADN involucrados en la regulación transcripcional, los elementos que controlan la transcripción basal de un gen (factores generales de transcripción) y los elementos que la modulan, aumentándola (potenciadores) o reprimiéndola (silenciadores) (Ogbourne y Antalis 1998). Dentro de los primeros encontramos secuencias generales presentes en la mayoría de los genes como la caja TATA y las secuencias de inicio de la transcripción, las cuales interaccionan con proteínas ubicuas como TBP (proteína que se une a la caja TATA) y las TAF's (proteínas asociadas a TBP), constituyendo lo que se conoce como la maquinaria basal de la transcripción

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Ogbourne y Antalis 1998). Por otro lado, los elementos moduladores (potenciadores y silenciadores), son secuencias localizadas sobre la misma cadena de ADN del gen que afectan, que pueden situarse a distancias variables del sitio de inicio de la transcripción, ya sea en el extremo 3' o 5' de la región codificante (Blackwood y cols., 1998). Estos elementos son reconocidos por proteínas denominadas factores transcripcionales, los cuales juegan un papel muy importante en la expresión de los genes, debido a que contienen diferentes dominios. Se requiere de un dominio particular para reconocer y enlazarse a una secuencia específica localizada en el ADN y otro dominio diferente para interactuar con las proteínas de la maquinaria basal de transcripción, modificando su actividad, es decir, la tasa con la que se inicia un nuevo transcrito de acuerdo con los cambios propios del programa celular y/o de las señales externas que recibe la célula (Boulikas 1994).

Factores que intervienen en la regulación genética de los queratinocitos

En relación con la regulación genética de la epidermis, existe una serie de reportes en los que se analizan las regiones reguladoras de varios genes que se expresan en los queratinocitos. Los datos obtenidos de estos reportes indican que las regiones reguladoras de estos genes tienen elementos comunes de regulación, caracterizados principalmente por la presencia de sitios de interacción para los factores de transcripción AP-1 (Proteína Activadora 1), Sp-1 (Proteína Estimuladora 1), YY-1 (Ying-Yang 1), AP-2 (Proteína Activadora 2) y los factores con dominio POU (Pit-Oct-Unc) (Eckert y cols., 1997).

Los factores de la familia AP-1 son efectores de diversas señales extracelulares que afectan la diferenciación de los queratinocitos (Mufson y cols., 1982, Rutberg y cols., 1996, Efimova y cols., 1998). Datos experimentales demuestran que los miembros de la familia AP-1 participan en la regulación de la transcripción de varios genes que se expresan específicamente en queratinocitos y cuya expresión es dependiente de la diferenciación celular (Eckert y cols., 1997). Los factores de la familia AP-1 regulan la expresión de los genes de la filagrina, transglutaminasa 1 y la involucrina en respuesta a la diferenciación celular y la expresión

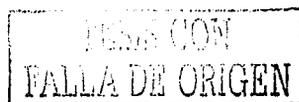


dependiente de diferenciación celular de genes como el de la filagrina e involucrina (Jang 1996, DiSepio 1995, Eckert y cols., 1997).

El factor de transcripción AP-2 también participa en la regulación de algunos genes durante el proceso de diferenciación celular de los queratinocitos. Se han encontrado elementos de respuesta para este factor en varios genes específicos de queratinocitos (Leask y cols., 1991). AP-2 se une a un elemento de respuesta en el promotor del gen de la transglutaminasa aumentando su transcripción y se sabe también que AP-2 participa en la expresión específica de tejido de los genes de algunas queratinas (Magnaldo y cols., 1993).

El factor de transcripción Sp-1 está implicado en la regulación de la transcripción de los queratinocitos, se sabe que los niveles de esta proteína varían en diferentes tipos celulares (Saffer y cols., 1991), siendo particularmente altos en queratinocitos. Recientemente, se demostró que la sobreexpresión de esta proteína en tipos celulares no epiteliales, induce la expresión del gen de la involucrina, el cual se expresa de manera específica en queratinocitos (Banks y cols., 1999). Además, se ha observado que durante la diferenciación de los queratinocitos, hay cambios importantes en los niveles de esta proteína, lo que sugiere su participación en la regulación de genes en respuesta al proceso de diferenciación celular (Apt y cols., 1996).

La familia de factores de transcripción con dominio POU está formada por factores que en su gran mayoría son específicos de tejido y que se caracterizan por poseer una serie de aproximadamente 150-160 aminoácidos denominados dominio POU y participan de manera importante en el desarrollo de varios tejidos (Wegner y cols., 1993). En la piel se encuentran dos miembros de esta familia denominados Skn/la y Skn/li, los cuales se expresan exclusivamente en los estratos suprabasales de la epidermis (Andersen y cols., 1993). Además, en la epidermis también se expresan otros dos factores de esta familia denominados Octa, que se expresan de manera ubicua (Kambe y cols., 1993) y Tst-1 que se expresa además



de la epidermis en células gliales y neuronales (He y cols., 1991). Se ha demostrado que algunos de estos factores se unen a secuencias localizadas dentro de las regiones reguladoras de genes como el de la queratina 10 y el de la involucrina humana modificando su transcripción (Eckert y cols., 1997).

Características generales del gen de la Involucrina Humana (Hi)

El gen Hi es activado tempranamente durante el proceso de diferenciación de los queratinocitos y su expresión es exclusiva. Este gen codifica para una proteína estructural de 68 kDa, la cual es fundamental para la formación de la cubierta cornificada de los epitelios estratificados (Eckert y cols., 1986). Esta proteína se localiza exclusivamente en los estratos suprabasales de los epitelios estratificados como el de la conjuntiva ocular, la lengua, la traquea, la vagina y la piel. En la epidermis esta proteína empieza a sintetizarse en el estrato espinoso, una vez que ha iniciado el proceso de diferenciación celular de los queratinocitos.

El gen Hi está constituido por aproximadamente 6000 pb, de éstos cerca de 3300 pb constituyen la región codificadora del gen. Esta región está formada por dos exones separados por un intrón de 1188 pb; el exón grande está formado por 2107 nucleótidos, mientras que el pequeño contiene 43 nucleótidos. La región no codificadora 5' (Región Reguladora) está formada por 2456 nucleótidos; en esta región se encuentra la caja TATA y todos los elementos que le confieren a este gen su expresión tejido y estrato específicos. Mediante ensayos funcionales fueron delimitados tres elementos control dentro de la región reguladora: un Promotor/Potenciador Proximal (PPP) dependiente de AP-1, un Silenciador Transcripcional (ST) y un Elemento Potenciador Distal (PD) que media la respuesta a calcio (Carroll y cols., 1992, Carroll y cols., 1993, Crish y cols., 1993, Welter y cols., 1995, López-Bayghen y cols., 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

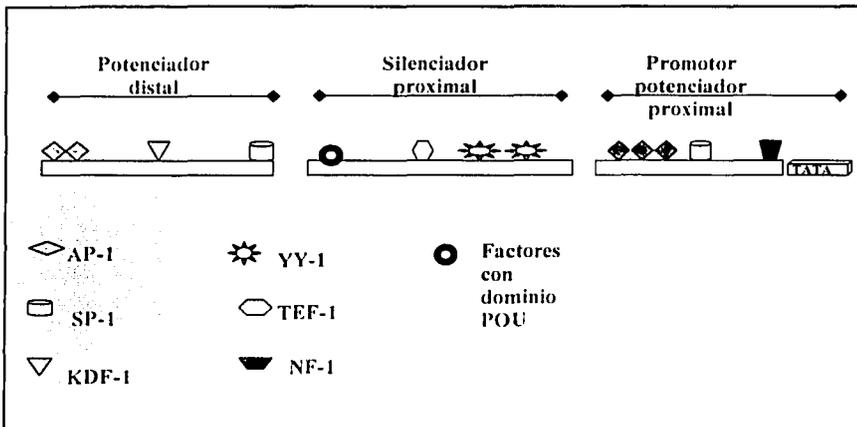


Figura. A. Mediante análisis moleculares se han descrito tres elementos funcionales dentro de la Región Reguladora del gen de la involucrina humana: un Promotor Potenciador Proximal, un Silenciador Transcripcional y un Potenciador Distal. Los factores transcripcionales presentes, participan en la regulación de la expresión de este gen.

Regulación transcripcional del gen Hi

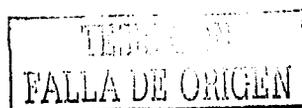
La regulación de la expresión del gen Hi en respuesta a la diferenciación celular implica la participación de los tres elementos control, un Promotor/Potenciador Proximal (PPP o PEP, "Proximal Enhancer Promoter"), un Silenciador Transcripcional (ST o TS "Transcriptional Silencer") y un Potenciador Distal (PD o DE "Distal Enhancer"). Así mismo se sabe que existen dos mecanismos responsables de esta regulación: a) la represión de la transcripción de este gen en las células del estrato basal, mediada por el ST y b) el incremento de la transcripción en respuesta a las señales que inducen diferenciación, mediada por los elementos contenidos tanto en el PEP como en el DE (López-Bayghen y cols., 1996).

Promotor-Potenciador Proximal: La región del Promotor-Potenciador Proximal abarca 159 pb que se localizan por arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Dentro de esta región se encuentra la caja TATA y una serie de secuencias consenso que son el sitio de interacción para diversos factores de transcripción como son: NF-1, Sp1/Sp3, AP-1 y C/EBP (fig. A). En sitios cercanos a la caja TATA se encuentran las secuencias consenso para los factores de transcripción NF-1 (5'-CAACCT-3') y Sp1 (5'-GGAGGG-3'), factores importantes que participan en la transcripción basal de varios promotores eucarióticos (Robidiux y cols., 1992). Estos factores también se encuentran participando de manera específica en la activación transcripcional del gen Hi durante la diferenciación celular (Welter y cols., 1995, López-Bayghen y cols., 1996, Rauscher y cols., 1998).

Como se mencionó anteriormente, se han identificado varias secuencias consenso de interacción para el factor de transcripción AP-1 (López-Bayghen y cols., 1996, Welter y cols., 1996). Específicamente en el sitio AP-1, localizado en el nucleótido -126 se ha determinado la interacción de las proteínas junB, junD y Fra-1 (Welter y cols., 1995). Las proteínas de la familia AP-1 se encuentran también participando de manera muy importante en la regulación de la transcripción de otros genes estructurales expresados diferencialmente en células epiteliales, como por ejemplo genes que codifican para las citoqueratinas: K1 (Lu B. 1994), K5 (Casatorres J. 1994), K6 y K8 (Tamai Y. 1991), K18 (Tamai Y. 1991), K19 (Hu, y cols., 1994), profilagrina (Jang y cols., 2000) y lorricrina (Disepio y cols., 1995). Así mismo AP-1 participa en la regulación del gen de la transglutaminasa y en la regulación de los promotores del virus del papiloma humano tipo 16 y 18 (HPV 16 y 18) (Lu Bo y cols., 1994, Chen y cols., 1997 y Eckert y cols., 1997). En queratinocitos las proteínas AP-1 participan al regular la transcripción de la mayoría de los genes que codifican para las proteínas que son marcadores de diferenciación.

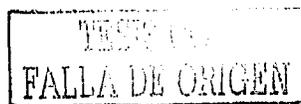
Potenciador Distal: El Potenciador Distal comprende 1200 pb que va del nucleótido -2500 al nucleótido -1300. Estudios funcionales demuestran que esta región es la responsable de la respuesta al proceso de diferenciación mediado por calcio y de conferirle una expresión específica en células epiteliales (Welter y cols., 1995, LaPres y Hudson 1996, López-Bayghen y cols., 1996, Banks y cols.,



1999). En esta región se han encontrado varios elementos de unión para AP-1, los cuales son funcionalmente importantes para la actividad de este potenciador (Welter y cols., 1995). Así mismo, en el PD se identificaron dos elementos de control: un elemento activador fuerte (localizado entre -2140 y -2088) responsable de conferir una expresión epitelio-específica y un elemento activador débil (localizado entre -2473 y -2216) que funciona independientemente del tipo celular. El elemento activador fuerte contiene un sitio de interacción para AP-1 y un sitio Sp-1. Estos factores se unen simultáneamente al DNA formando un complejo terciario que produce un efecto importante de activación, la unión de Sp-1 es un requisito para la óptima unión de AP-1. La interacción de Sp-1 contribuye a la expresión epitelio-específica y al parecer es una proteína importante para la activación del gen Hi, debido a que hay un aumento en la concentración del factor cuando las células se diferencian (Banks y cols., 1999). Dentro del elemento activador fuerte se ha localizado otro sitio de unión para AP-1 ubicado entre -2114 y -2105, el cual es muy importante para la respuesta mediada por calcio. Este sitio se ha relacionado tanto a la activación por calcio, TPA y lípidos como el CS. En este sitio interaccionan los factores de la familia AP-1 tales como: Fra-1, Fra-2, junB y junD, los cuales aumentan su concentración y afinidad cuando las células inician el proceso de diferenciación (Welter y cols., 1995, Ng, DC. y cols., 2000, Hanley K. 2001).

Por otra parte, dentro de esta misma región se encontró otro elemento de respuesta a la diferenciación celular, denominado factor de diferenciación de los queratinocitos (KDF-1), al parecer este factor tiene relación con el factor de transcripción AP-2 (LaPres J. Y L. Hudson, 1996).

Silenciador Transcripcional: La región del Silenciador Transcripcional se encuentra localizada entre las bases -651 a -159, aproximadamente 600 pb por arriba del PPP. Dentro de esta región se han encontrado dos sitios de unión para el factor de transcripción YY-1. Este factor se ha caracterizado como un factor multifuncional con actividad de represor, activador o como parte de la maquinaria

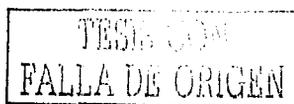


basal de transcripción, dependiendo del gen del que se trate y del contexto celular (Seto y cols., 1991, Shirivastava A. y K. Calame, 1994, López-Bayghen y cols., 1996). Otro de los factores de transcripción que presenta un sitio de interacción dentro de esta región es TEF-1. Se sabe que la sobreexpresión de esta proteína reprime al PPP del gen Hi (Takahashi y cols., 1995). Por otra parte, los factores de la familia con dominio POU suprimen la transcripción basal del promotor de Involucrina. Ensayos en los que se cotransfectó una construcción que contiene la región reguladora completa del gen Hi, con construcciones que sobreexpresan distintos factores de la familia con dominio POU, se encontró que la sobreexpresión de los factores Octa-1, Octa-2, Brn4 y Skn1a reprimieron de manera importante al promotor del gen (Welter y cols., 1996). Estas proteínas pueden interactuar con factores de la maquinaria basal de la transcripción; por ejemplo, con el extremo amino de TBP, por lo que su efecto de represión pudiera ser independiente de la unión al DNA (Zwilling y cols., 1994). Específicamente con respecto al factor de transcripción Octa-2, empleando ensayos bioquímicos, se sabe que esta proteína presenta mayor afinidad por una secuencia octamérica cuando extractos nucleares provienen de queratinocitos en estado de multiplicación (Andersen y cols., 1997). Esto sugirió que Octa-2 podría participar de manera importante en la represión de algunos promotores de genes que se expresan durante el proceso de la diferenciación celular.

Elemento Silenciador Mínimo

Mediante la realización de una serie de eliminaciones del extremo 5' del Silenciador Transcripcional del gen Hi a partir del plásmido p2.6CAT, el cual contiene la región completa 5' no codificante del gen Hi, se determinó una secuencia mínima con actividad silenciadora (Carrol y cols., 1993, Crish y cols., 1993, López-Bayghen y cols., 1996).

Posteriormente empleando ensayos funcionales se delimitó una secuencia de 52 pb, comprendida entre los nucleótidos -335 y -386, la cual mantuvo la actividad de silenciador al clonar este fragmento frente al PPP y reprimiendo su actividad un



80% aproximadamente. De esta manera se determinó que este fragmento contiene todos los elementos necesarios para ejercer un efecto represor sobre el PPP del gen Hi. por lo que se denominó a este fragmento el Elemento Silenciador Mínimo (ESM) (Azua, E. 2001, tesis doctoral).

Dentro del ESM se identificaron dos secuencias similares a la secuencia octamérica consenso ATGCAAAT y una secuencia similar al motivo TAATGARAT, ambas reconocidas por factores de transcripción de la familia con dominio POU. Las secuencias octaméricas fueron denominadas α , β y δ respectivamente (fig. 1A, sección de resultados).

El factor de transcripción Octa-2 reconoce al Elemento Silenciador Mínimo
Empleando al ESM en ensayos de retardamiento se determinó la interacción específica de proteínas de la familia con dominio POU y, mediante ensayos de super-retardamientos se determinó que el factor de transcripción Octa-2 es una de las proteínas que reconoce al ESM y que la interacción de esta proteína está dada entre los nucleótidos -372 y -335 (región donde están comprendidas las secuencias octaméricas β y δ) (Azua E. 2001, tesis doctoral).

La actividad funcional que presenta Octa-2 al interaccionar con el ESM es de gran importancia, debido a que se ha reportado una supresión de la transcripción mediada por el ESM cuando es co-transfectado Octa-2 en un ambiente sobrepresado con diversos plásmidos que tienen la Región Reguladora del gen Hi. Así mismo se ha descrito que las proteínas Octa-1 y Octa-2 presentan una actividad represora sobre la actividad transcripcional de algunos genes, particularmente del gen Hi. (Welter y cols., 1996, Chapman C. y Latchman. 1998).

Mediante la realización de una serie de mutaciones en las secuencias octaméricas α , β y δ del ESM se inhibió la interacción de Octa-2 en esta región, determinando así funcionalmente que Octa-2 reconoce la secuencia comprendida entre los nucleótidos -372 y -335, uniéndose específicamente a las regiones nombradas

como octámeros β y δ , esta unión es muy importante para ejercer una actividad represora sobre el PPP, debido a que las secuencias octaméricas β y δ al ser mutadas mostraron un incremento considerable en su actividad transcripcional, demostrando que al evitar la unión de Octa-2 al ESM, éste pierde completamente su efecto sobre el PPP. De esta manera se concluyó que el factor de transcripción Octa-2 es un elemento represor en esta secuencia y es capaz de reprimir la actividad del promotor-potenciador proximal del gen de la involucrina humana. Así mismo, se ha determinado que existen otros factores proteicos interactuando en el ESM, que podrían estar ejerciendo una actividad represora de la transcripción del gen Hi mediada por el ESM. (Azuara E. 2001, tesis doctoral).

Región octamérica alfa del Elemento Silenciador Mínimo

Como se mencionó anteriormente mediante un análisis de secuencias consenso para factores de transcripción que pudieran estar presentes en la secuencia del ESM, se determinaron tres secuencias octaméricas, a las cuales se les nombró α , β y δ (Azuara E. 2001, tesis doctoral). Hablando específicamente de la región octamérica alfa, localizada en el extremo izquierdo del ESM y cuya secuencia es: AACCTTCCATTTTCATGCCCT, se determinó, mediante ensayos de retardamiento y super-retardamiento, que no hay sitios de interacción de las proteínas de la familia Octa dentro de esta región. Por otra parte un aspecto muy importante que se ha determinado para esta región octamérica con respecto a la actividad del ESM, es que se requiere específicamente de esta secuencia para que el ESM pueda ejercer su efecto silenciador, ya que cuando la región octamérica alfa fue eliminada, la actividad del promotor del gen de la involucrina humana recuperó su actividad hasta un 85%, lo cual indica que las proteínas que reconocen secuencias consenso dentro de la región octamérica alfa o bien que llevan a cabo interacciones con otras proteínas que reconocen secuencias consenso en las regiones octaméricas β y δ son de gran importancia para la funcionalidad del ESM (López-Bayghen, comunicación personal).

Partiendo de estos antecedentes y considerando la importancia de conocer los mecanismos moleculares que mantienen reprimido transcripcionalmente al gen de la Involucrina humana cuando los queratinocitos humanos se encuentran en un estado de proliferación, decidimos investigar como punto central cuál o cuáles son los factores de transcripción, diferentes a Octa-2, que reconocen al ESM, específicamente a la región octamérica alfa, así mismo determinar su relevancia funcional en el contexto del funcionamiento de la Región Reguladora del gen Hi.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO GENERAL

Analizar que factores de transcripción reconocen específicamente a las secuencias dentro de la región octamérica alfa del Elemento Silenciador Mínimo del gen de la Involucrina humana y determinar su relevancia funcional dentro del contexto de la Región Reguladora del gen Hi.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar las interacciones DNA-proteína entre los factores de transcripción, diferentes a Octa-2, y el Elemento Silenciador Mínimo del gen Hi mediante ensayos bioquímicos de retardamiento y competencia, empleando extractos nucleares de queratinocitos humanos.
- Determinar qué tipo de interacción se da entre aquellos factores de transcripción que específicamente reconocen a la secuencia octamérica alfa del ESM.
- Analizar el efecto funcional de los factores de transcripción identificados como aquellos que reconocen específicamente a la secuencia octamérica alfa en el contexto del funcionamiento de la Región Reguladora del gen Hi, mediante ensayos de transfección transitoria en queratinocitos humanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

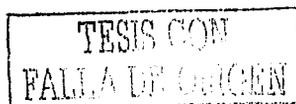
MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares: Cultivos primarios de queratinocitos obtenidos a partir de prepucios de niños recién nacidos se crecieron en medio Keratinocyte-SFM (K-SFM Life Technologies, Inc.), con 50 mg/lit de extracto de pituitaria bovina, 5 µg/lit de factor de crecimiento epidermoide (EGF), 100mg/ml penicilina-estreptomicina y gentamicina en una atmósfera de 5% de CO². La línea celular C33-A, derivada de adenocarcinoma cervical humano, se creció en una mezcla de medio F-12/D-MEM, en proporción 1:1 (Life Technologies Inc) con 7% de suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies Inc) y antibióticos (gentamicina, ampicilina y estreptomicina), a una concentración de 100 µg/ml totales.

Ensayos Bioquímicos

Extractos nucleares: Se prepararon extractos nucleares de queratinocitos en estado basal mediante la técnica descrita por Schreiber (1989). Todos los tampones contenían inhibidores de proteasas ("Complete protease inhibitors cocktail", Boehringer Mannheim). Las células se cosecharon utilizando un tampón Tris-Dulbeco (TD) (0.7 M NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM Na₂HP0₄, 50 mM Trizma-base pH 7.45); posteriormente las células se centrifugaron y la pastilla obtenida se resuspendió en el tampón A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT; 0.5 mM PMSF). Se agregó NP40 al 10%, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en el buffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Se agitaron durante 15 minutos a 4 °C y se centrifugaron para obtener los sobrenadantes. La cuantificación de proteínas se realizó usando el método de Bradford (Bradford, 1976). Los extractos que se obtuvieron se almacenaron a -70 °C.

Oligonucleótidos: Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de retardamiento y competencia se sintetizaron en un sintetizador de oligonucleótidos (Applied BioSystems 391 DNA) del Departamento de Genética y Biología



Molecular del CINVESTAV. Para desbloquear y purificar los oligonucleótidos, las columnas con los oligonucleótidos acoplados, se incubaron en una solución de hidróxido de amonio al 25% a 55 °C por 16 hr. Posteriormente el líquido se concentró al vacío ("Speed Vac") con la finalidad de purificar los oligonucleótidos, la pastilla se resuspendió en buffer de corrida para secuenciación (Formamida desinozida 98%, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.025% de Azul de cianol y 0.025% azul de bromofenol) y se sometió a electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% y Urea 7 M. La banda correspondiente al oligonucleótido deseado se visualizó usando una lámpara de luz UV (300-320 nm) y empleando una pantalla con indicador fluorescente. Se escindió la banda del gel y se eluyó por difusión simple empleando un buffer con acetato de magnesio 10 mM, SDS 0.1% y acetato de amonio 0.5 M por 16 hr. El líquido de elución en donde se encontraron los oligonucleótidos se sometió a precipitación con acetato de sodio 7.5 M y etanol absoluto y se centrifugó por 30 min a 4 °C. La concentración de los oligonucleótidos se determinó por espectrofotometría de luz UV (260 nm). Una vez purificados, se hibridaron las cadenas complementarias, incubando ambos oligonucleótidos durante 5 minutos a 85 °C y permitiendo un enfriamiento lento a temperatura ambiente. Los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes:

CREB	5'- CTAGAGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG -3'
CREBM	5'- CTAGAGAGATTGCCTGTGGTCAGAGAGCTAG -3'
AP2	5'- CTAGGATCGAACTGACCGCCCGGGCCCGT -3'
AP2M	5'- CTAGGATCGAACTGACCGCTTGGCGCCCGT -3'
NF-1	5'- CTAGTTTTGGATTGAAGCCAATATGATAA -3'
NF-1M	5'- CTAGTTTTGGATTGAATAAAATATGATAA -3'
Sp-1	5'- CTAGATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC -3'
Sp1-M	5'- CTAGATTCGATCGGTTGGGGGCGACC -3'

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Oct-1	5'- CTAGTGTGCAATGCAAATTCACCTAGAA -3'
Oct-1M	5'- CTAGTGTGCAATGCAAGCCACCTAGAA -3'
α (alfa)	5'- CCCAAGCTTAACTTTCCATTTTCATGC -3'
α M	5'- CCCAAGCTTAAAGCTTCCATTCGATGC -3'
β (beta)	5'- AGCTTGAAAGTGAATCTTTTG -3'
GR	5'- CTAGAGAGGATCTGTACAGGATGTTCTAGAT -3'
E2F	5'- CTAGTAGTTTTCGCGCTTAAAT -3'
AP-1	5' - CTAGCGCTTGATGACTCAGCCGGAA -3'

Marcaje de oligonucleótidos: El marcaje de los oligonucleótidos de doble cadena se realizó empleando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Se marcaron de 40 a 100 ng de DNA, en un volumen final de 10 μ l donde se adicionó 1 μ l de cada nucleótido (10 mM de los nucleótidos dGTP, dTTP, dCTP) y 10 μ Ci de dATP(α P32), así mismo se adicionó 1 μ l de buffer de marcaje TM 10X (50 mM de NaCl pH 7.6). La mezcla se incubó con 1 U de enzima Klenow (Life Technologies) por 30-45 min a temperatura ambiente. Finalmente se diluyó la sonda marcada a una concentración final de 1 ng/ μ l.

Ensayos de Retardamiento y Competencia: Extractos nucleares de queratinocitos basales se incubaron en solución de unión de proteínas BDG 1X (12 Mm HEPES, pH 7.8, 10% de glicerol, 0.05 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM ditiventral, 2 mM de espermidina) y 0.3-1 μ g de poly-d(I-C) (Pharmacia Biotech) durante 10 minutos a 4 °C, posteriormente se agregó 1 ng del oligonucleótido marcado con dATP(α P32) y se incubó la mezcla 10 minutos a 4 °C. Las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 7%, empleando un voltaje de 140 V. Los geles se secaron al vacío y se expusieron en placas radiográficas (Kodak Eastman). En el caso de los ensayos de competencias, las mezclas de reacción se preincubaron con concentraciones distintas de oligonucleótidos fríos, durante 10 minutos a 4 °C antes de agregar el oligonucleótido marcado radiactivamente.

Ensayos de interacción Proteína-Proteína: Para los ensayos de interacción proteína-proteína, las mezclas de reacción de los complejos DNA-proteínas se incubaron con diferentes concentraciones de deoxicolato de sodio, el cual es un detergente aniónico que tiene la función de desintegrar interacciones proteína-proteína.

Ensayo de inmunoprecipitación

Cultivos primarios de queratinocitos humanos y cultivos primarios de células C33-A en un estado de confluencia del 85% fueron cosechados con 1.5 ml de PBS frío, el cual contuvo inhibidor de proteasas PMSF 1 mM, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C, la pastilla obtenida se resuspendió en 100 µg de regulador RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EGTA 1 mM, NaCl 158 mM, NaF 25 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 2.5 µg.µl⁻¹ y Leupeptina 2.5 2.5 µg.µl⁻¹) para lisar las células y determinar la concentración de proteínas empleando el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las proteínas se solubilizaron con solución reguladora RIPA y con detergentes (Tritón 2% y SDS 0.2%) en proporción 1:1, durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se depositó en un tubo eppendorf que contenía 1 µl del anticuerpo anti-Oct-2 acoplado a agarosa (Santa Cruz Biotechnology), posteriormente se sometió a agitación toda la noche a 4 °C para permitir la formación de los complejos antígeno-anticuerpo acoplados a la matriz de agarosa. Las esferuelas de agarosa se colectaron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 1 hora a 4 °C y se realizaron 2 lavados con 1 ml de regulador RIPA que contenía Tritón 1% y PMSF 1 mM. El inmunoprecipitado fue eluido en 10 µl de regulador de muestra 3X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 6%, 2-mercaptoetanol 300 mM, Azul de bromofenol 0.3% y glicerol 30%), finalmente las muestras se hirvieron durante 5 min.

Inmunodetección en fase sólida

Las proteínas obtenidas de los inmunoprecipitados fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y se transfirieron a una membrana biológica PVDF (Polivinilideno di-fluoruro) en cámara húmeda (Bio-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

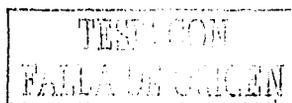
Rad). La eficiencia de la transferencia se determinó por tinción de la membrana con rojo de Ponceau. Los sitios irrelevantes se cubrieron por incubación de la membrana a una solución de bloqueo (leche descremada 5%, Tween-20 0.1% en TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados (TBS-Tween-20 0.1%). La membrana se expuso a un anticuerpo policlonal de conejo con una dilución 1:5000 (anti-Oct-2, anti-NF-1, anti-c-Fos o anti-c-Jun) según fuera el caso. El exceso del anticuerpo correspondiente se eliminó mediante 3 lavados (TBS-Tween-20 0.1%), la membrana se incubó en una solución de un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó como se mencionó anteriormente y las bandas relevantes se detectaron por autorradiografía, empleando quimioluminiscencia ECL (Amersham).

Plásmidos

El plásmido p2.6CAT contiene la región reguladora del gen Hi (2506 pb) (López-Bayghen y cols., 1996) y se basa en el uso del gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transferasa). La construcción pRSVNF-1, donada amablemente por el Dr. Jean Louis Danan (Brigitte y cols., 1994), contiene al promotor del Virus de Sarcoma de Rous (RSV) y como gen reportero a NF-1. Estos plásmidos se utilizaron para los ensayos de cotransfección. Los plásmidos que se utilizaron como control durante los ensayos de transfección transitoria son: el plásmido pCAT-CONTROL (Promega), el cual contiene al promotor y potenciador de SV40, por lo que se expresa fuertemente en células epiteliales (López-Bayghen, comunicación personal). El plásmido β -gal, contiene al promotor RSV y al gen reportero β -gal.

Ensayos de transfección transitoria y ensayos CAT

Cultivos secundarios de queratinocitos humanos, crecidos al 70-80% de confluencia se transfectaron con 10 μ g de DNA plasmídico total, utilizando Lipofectamina para la transfección (Life Technologies, Inc), siguiendo el método de transfección descrito anteriormente (López-Bayghen y cols., 1996). La mezcla de



DNA-lipofectamina, en 1 ml de medio KSFM sin suplementos, se incubó a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Posteriormente las células se lavaron con solución de PBS y se adicionó medio de cultivo, incubando de 48 a 72 horas. Las células se cosecharon 48 horas post-transfección en tampón TEN (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 15 mM de NaCl). Estas células se lisaron empleando 5 ciclos de lisis (congelación a -70 °C-descongelación a 37 °C, en 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0. La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) y con base a ello se normalizaron los extractos celulares entre sí. Volúmenes normalizados de los extractos nucleares se incubaron con 0.25 µCi de (¹⁴C) cloranfenicol (Amershan Corp.) y con 4 µl de acetyl-CoA (20 mM) (Sigma). Las reacciones de acetilación se llevaron a cabo a 37 °C durante 16 horas. Las muestras se extrajeron con acetato de etilo y se cargaron en placas de cromatografía en capa fina (Sigma Chemicals Co.). La cromatografía se realizó utilizando una mezcla de solventes cloroformo-metanol (97:3). La radiactividad contenida en las placas de cromatografía se cuantificó para determinar el porcentaje de conversión en cloranfenicol acetilado utilizando el analizador de imágenes AMBIS (Scanalytics CSPI). Así mismo durante los ensayos de transfección transitoria se realizó un tratamiento con un derivado el fármaco curcumina a 50 mM y 250 mM, con la finalidad de eliminar al actor de transcripción NF-1 del contexto celular y evaluar en estas condiciones la actividad CAT.

RESULTADOS

Factores de transcripción de la familia NF-1 interactúan en la región octamérica alfa del Elemento Silenciador Mínimo del gen de Hi.

Dentro de la región denominada ESM (fig. 1A), existen una serie de secuencias consenso para factores de transcripción, reconocidas por factores que bajo ciertas condiciones, presentan una función inhibitoria de la regulación transcripcional del gen Hi (Takahashi y cols., 1995). En este trabajo planteamos nuevos factores candidatos que pudieran funcionar como represores para el gen Hi. Se analizó específicamente la región octamérica alfa del ESM (fig. 1B), iniciando con una búsqueda computacional de las posibles secuencias de reconocimiento, similares a secuencias consenso ya reportadas, empleando para ello la base de datos TRANSFAC (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/>; Heinemeyer y cols., 1999). De acuerdo con este análisis se encontró que diversos factores de transcripción podían interactuar con la región octamérica alfa, como son: factores de transcripción de la familia NF-1, factores de transcripción de la familia AP-2, factores de la familia octa y factores de la familia CREB (fig. 1B). Las proteínas de la familia NF-1 han sido descritas como represores de la actividad transcripcional de algunos genes (Rajas y cols., 1998; Zhao y cols., 1999), de ahí que decidimos iniciar la caracterización molecular de las interacciones DNA-proteína y proteína-proteína dentro de la región del ESM, analizando inicialmente si NF-1 se encontraba entre los factores nucleares obtenidos a partir de queratinocitos en

estado de multiplicación y si este factor era capaz de reconocer la región octamérica alfa del ESM.

A



*Realizado en el Programa Pattern search 1.1
 Minimum matching window 5 minimum length 6

B

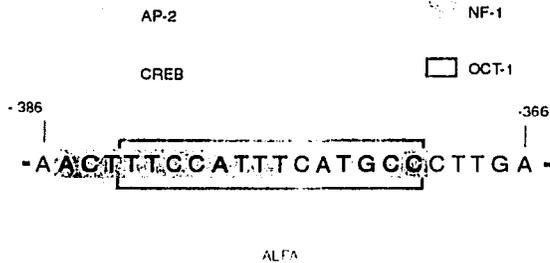
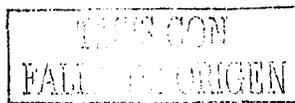


Figura 1. (A) Análisis de secuencias consenso del ESM. La región del ESM se analizó empleando el programa Pattern Search 1.1, con la finalidad de obtener las secuencias consenso para factores de transcripción.
(B) Análisis de la secuencia alfa del ESM del gen de H1. La secuencia alfa se analizó empleando la base de datos TRANSFAC. Se muestran las diversas secuencias consenso para factores de transcripción obtenidas.



Se sintetizaron oligonucleótidos con la secuencia alfa del ESM, con el fin de obtener una sonda de DNA de doble cadena para iniciar los ensayos de retardamiento en gel (fig. 2A), utilizando extractos nucleares de queratinocitos cosechados durante la fase de crecimiento exponencial. Como competidores se utilizaron una serie de oligonucleótidos que contenían secuencias consenso para diversos factores de transcripción (fig. 2A). Estos competidores permitieron identificar a qué familia de factores de transcripción pertenecían las proteínas que forman parte de los complejos señalados en la figura 2B. De esta manera pudimos determinar que en la región alfa, los factores de la familia NF-1 efectivamente podrían estar interaccionando con la secuencia octamérica. Para determinar la especificidad de las interacciones se hicieron competencias con un exceso molar de 100 a 300 veces de los oligonucleótidos homólogos y heterólogos no marcados. De esta forma se definieron los complejos I, II, III, IV y V como específicos para el oligonucleótido alfa. El complejo IV se compitió eficientemente con un exceso molar del oligonucleótido no marcado que contiene la secuencia consenso NF-1 y no así con el mismo exceso molar del oligonucleótido con la secuencia consenso mutada, NF-1M, o los oligonucleótidos no relacionados Sp-1 y GR (figs. 2B y 3). Este resultado nos indicó que hay factores de la familia NF- que reconocen específicamente la región octamérica alfa del ESM del gen Hi.

Oligonucleótidos	Secuencias
NF-1	5' CTAGTTTTGGATTGAAGCCAATATGATAA 3'
NF-1M	5' CTAGTTTTGGATTGAAATAAATATGATAA 3'
AP-2	5' CTAGGATCGAACTGACCGCCCGCGGCCGT3'
AP-2M	5' CTAGGATCGAACTGACCGCTTTCGGCCCGT 3'
SP-1	5' CTAGATTCGATCGGGCGGGCGAGC 3'
SP-1M	5' CTAGATTCGATCGGTTTCGGGCGGACC 3'
OCT-1	5' CTAGTGTGCAATGCAAATTCAGTAGAA 3'
OCT-1M	5' CTAGTGTGCAATGCAAGCCACTAGAA 3'
CREB	5' CTAGAGAGATGCCTCAGTCAGAGAGCTAG 3'
CREBM	5'CTAGAGAGATGCCTGTGGTCAGAGAGCTAG 3'
GR	5' CTAGAGAGGATCTGTACAGGATGTTCTAGAT 3'
ALFA	5' CCCAAGCTTAACTTTCCATTTCATGC3'
ALFAM	5' CCCAAGCTTAAAGCTTCCATTTCATGC 3'
BETA	5' AGCTTGAAGTGAATCTTTTG 3'

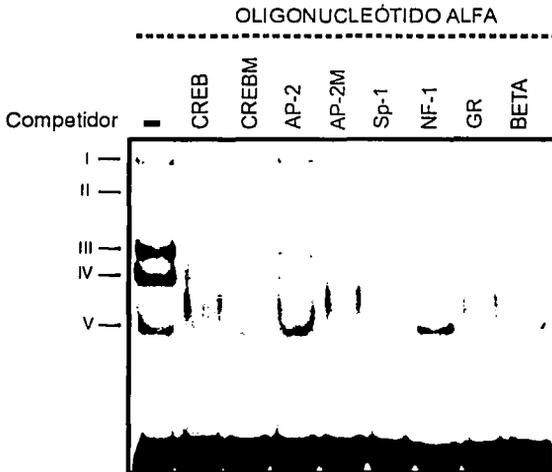


Figura 2. Ensayos de retardamiento y competencia utilizando el oligonucleótido ALFA marcado radiactivamente.
 Panel A: Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados para marcaje o competencia.
 Panel B: El oligonucleótido ALFA se incubó con extractos nucleares de queratinocitos en multiplicación. Se definieron cinco complejos y fueron competidos con un exceso molar de 100 veces del competidor no marcado que se señala en cada caso. (-) oligonucleótido libre.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

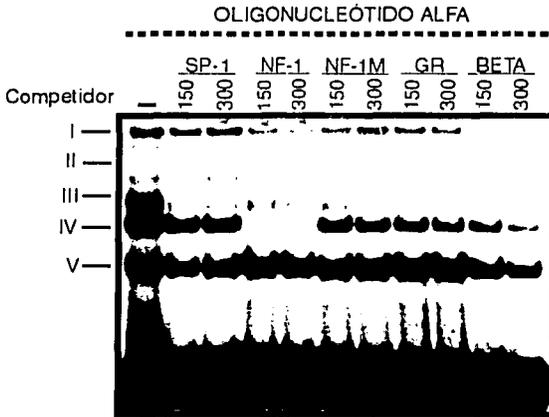


Figura 3. Factores relacionados con la familia NF-1 reconocen a la región octamérica alfa del ESM. Ensayos de retardamiento y competencia utilizando el oligonucleótido ALFA marcado radiactivamente y extractos nucleares de queratinocitos en multiplicación. Los complejos definidos se compitieron con un exceso molar de 150-300 veces del competidor no marcado indicado. (-) oligonucleótido libre.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Adicionalmente, se realizó la competencia inversa, empleando al oligonucleótido NF-1 marcado radiactivamente y haciendo la competencia con un exceso de 100-200 veces molar del oligonucleótido alfa (fig. 4). El oligonucleótido alfa fue capaz de competir los complejos DNA-proteína formados con la sonda NF-1. Esto no sucede con el mismo exceso molar del oligonucleótido que contiene la secuencia alfa mutada (alfaM), lo cual nos confirma que los factores que forman complejos con la sonda NF-1 son los mismos factores que interaccionan con el oligonucleótido alfa en la secuencia octamérica presente en él.

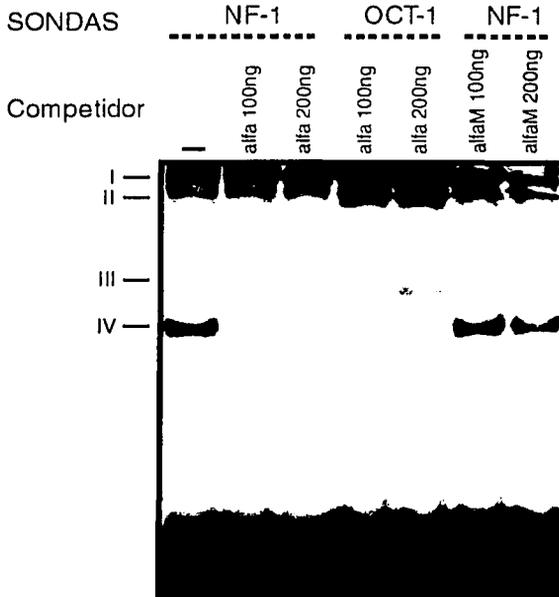


Figura 4. Ensayos de retardamiento y competencia utilizando los oligonucleótidos NF-1 y Oct-1 marcados radiactivamente y empleando extractos nucleares de queratinocitos basales. Se utilizó como competidores a los oligonucleótidos alfa o alfa mutado en la secuencia octamérica, con un exceso molar de 100-200 veces.

Por otra parte, se hicieron ensayos de competencia con el oligonucleótido Oct-1 marcado radiativamente, utilizando como competidor al oligonucleótido alfa, en un exceso molar de 100-200 veces con respecto a Oct-1. Con extractos nucleares de queratinocitos se definieron IV complejos, de los que sólo el complejo IV fue competido eficientemente por el oligonucleótido alfa (Figura 4, parte central). Este resultado nos define que hay factores de la familia con dominios POU que reconocen a la región octamérica alfa del ESM, o bien podría sugerir que existen interacciones proteína-proteína entre los factores de la familia Octa y NF-1.

Ya que los resultados obtenidos hasta el momento nos indicaban posibles interacciones proteína-proteína presentes en la región octamérica alfa del ESM y a su vez se confirmó que los factores de la familia NF-1 interaccionan en esta región, decidimos realizar ensayos de retardamiento y competencias en presencia de deoxicolato de sodio, el cual es un detergente aniónico que desintegra las interacciones proteína-proteína. Utilizamos el oligonucleótido alfa marcado radiativamente, en ensayos de retardamiento, en presencia de deoxicolato de sodio a diferentes concentraciones, para definir cuales de los complejos observados inicialmente corresponden a interacciones DNA-proteína y cuales pudieran corresponder a interacciones proteína-proteína. Se observó que la combinación del oligonucleótido alfa marcado y extractos nucleares de queratinocitos en multiplicación, en presencia de deoxicolato de sodio, resultó en V complejos que al ir aumentando paulatinamente las concentraciones del deoxicolato de sodio los complejos II, III, IV y V, fueron desintegrándose (fig. 5).

Esto nos indicó que el tipo de interacción para estos últimos complejos es proteína-proteína, mientras que para el complejo I, el cual se mantuvo estable a diferentes concentraciones de deoxicolato de sodio, indica que las proteínas que integran este complejo interactúan directamente con el DNA.

Por otra parte en los ensayos de competencia en presencia de deoxicolato, se observó que NF-1 sólo compete eficientemente al complejo IV, corroborando nuevamente los resultados obtenidos (figs. 2 y 3), mientras que Octa-1 compete eficientemente los complejos III y IV, indicando que las proteínas que reconocen a estos oligonucleótidos pudieran estar interactuando entre ellas, o bien, que las mismas proteínas estuvieran reconociendo las secuencias consenso presentes en los diferentes oligonucleótidos (fig. 6).

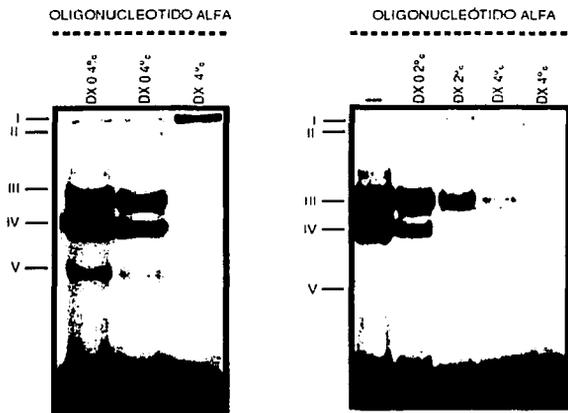


Figura 5. Interacciones proteína-proteína en la región alfa. Ensayos de retardamiento utilizando el oligonucleótido ALFA marcado radiactivamente, en presencia de deoxicolato de sodio utilizado en las concentraciones indicadas, y extractos nucleares de queratinocitos basales. Los complejos obtenidos fueron paulatinamente desintegrándose conforme se aumentaron las concentraciones.

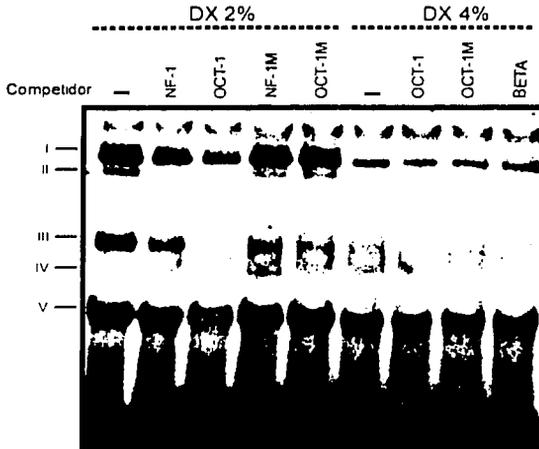


Figura 6. Los factores de transcripción NF-1 y Oct-1 que reconocen a la región octamérica alfa interactúan entre ellos. Ensayos de retardamiento y competencia utilizando el oligonucleótido ALFA marcado radiactivamente y en presencia de deoxicilato de sodio. El complejo IV, específico para NF-1 es compartido con el oligonucleótido Oct-1.

De acuerdo con los resultados obtenidos, a partir de los ensayos de retardamiento y competencia, proponemos que existen interacciones proteína-proteína entre los factores de transcripción que reconocen a la región octamérica alfa del ESM del gen Hi (fig. 6). Así mismo, sugerimos que los complejos III y IV, son el producto de una interacción proteica entre Oct-2 y NF-1, siendo Oct-2 el factor que media la unión del complejo al DNA.

Teniendo como antecedente el hecho de que las proteínas de la familia Octa pueden interactuar con una serie de diferentes factores de transcripción como las proteínas AP-1 (Jang y cols., 2000), Sp-1 (Janson y Pettersson, 1990), receptores de vitamina D (Liu y Freedman, 1994) y el receptor de glucocorticoides (Prefontaine y cols., 1999), formando heterocomplejos y regulando la actividad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

transcripcional de varios genes, decidimos averiguar si los factores de la familia NF-1 se unen directamente con miembros de la familia Octa, específicamente con el factor de transcripción Octa-2, el cual reconoce específicamente al ESM presente en la Región Reguladora del gen Hi (Azuara E. 2001, tesis doctoral). Por otra parte, decidimos investigar si Octa-2 a su vez podría interaccionar con otros factores de transcripción importantes en la regulación transcripcional del gen Hi, como son c-Fos y c-Jun. Con este propósito se realizaron ensayos de inmunoprecipitación e inmunodetección en fase sólida empleando los anticuerpos anti-Oct-2, anti-NF-1, anti-c-Fos y anti-c-Jun. Inicialmente como una medida de control, el anticuerpo anti-Oct-2 se probó con extractos totales y nucleares de queratinocitos en multiplicación. El anticuerpo reconoció dos isoformas de Octa-2 (fig. 7). Una isoforma de aproximadamente 97 kDa y la otra de aproximadamente 66 kDa, presente en los extractos totales y nucleares de queratinocitos.

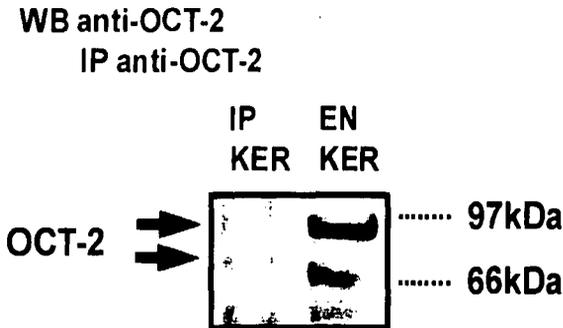


Figura 7. Diferentes isoformas de Oct-2 se detectaron en queratinocitos humanos en multiplicación.
Análisis de inmunoprecipitación e inmunodetección en fase sólida de Oct-2 utilizando extractos totales y nucleares de queratinocitos en multiplicación. Para ambos casos se empleó el mismo anticuerpo, anti-Oct-2. Las flechas indican las isoformas de Oct-2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Siguiendo con el análisis, se hicieron los ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Oct-2 y extractos nucleares y totales de queratinocitos en multiplicación; así mismo se incluyeron extractos de otras células epiteliales como C33-A y HeLa como células no epiteliales (fig. 8). Cuando se realizó el ensayo de inmunodetección en fase sólida utilizando el anticuerpo anti-NF-1, el anticuerpo reconoció una banda de aproximadamente 55 KDa, la cual esta relacionada con NF-1, esta banda estuvo presente en los extractos de todas las células probadas. De acuerdo con este resultado proponemos que el factor de transcripción Octa-2 podría interactuar con el factor de transcripción NF-1.

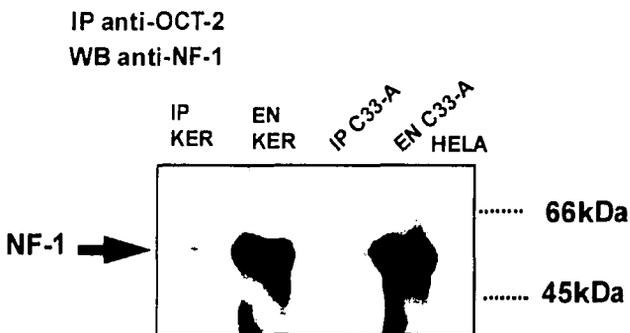


Figura 8. El factor de transcripción Oct-2 interactúa con factores de transcripción de la familia NF-1. Análisis de inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti-Oct-2, e inmunodetección en fase sólida (WB), empleando el anticuerpo anti-NF-1. Se utilizaron extractos nucleares provenientes de queratinocitos en multiplicación y células C33-A (EN) y extractos totales provenientes de queratinocitos en multiplicación, células C33-A y células HeLa. La flecha indica la presencia de NF-1 (55 KDa).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los ensayos de inmunoprecipitación realizados con el anticuerpo anti-Oct-2, empleando la misma estrategia, pero ahora realizando el ensayo de inmunodetección en fase sólida con los anticuerpos anti-c-Fos y anti-c-Jun, mostraron que el anticuerpo anti-c-Fos reconoció una banda de aproximadamente 50 KDa, tamaño que corresponde al factor de transcripción c-Fos en queartinocitos (fig. 9). En las células C33-A, la concentración relativa del factor parece ser menor, esto se debió posiblemente a variaciones en las cantidades relativas de cada factor en cada sistema celular. Cuando se empleó el anticuerpo anti-c-Jun, no hubo ningún reconocimiento de alguna proteína proveniente de la inmunoprecipitación (fig. 10). Estos resultados sugieren que el factor de transcripción Octa-2 presenta una interacción con el factor de transcripción c-Fos, pero no con el factor de transcripción c-Jun.

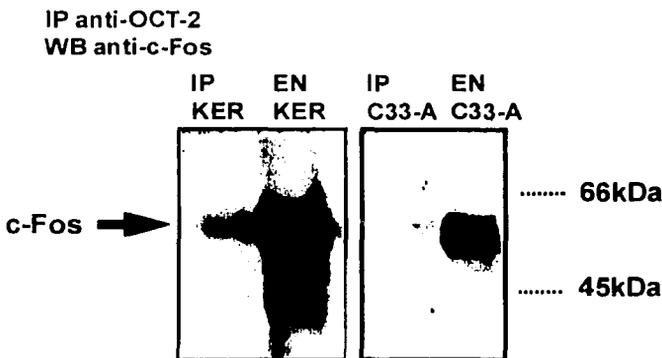


Figura 9. El factor de transcripción Oct-2 presenta una interacción con el factor de transcripción c-Fos. Análisis de inmunoprecipitación, empleando el anticuerpo anti-Oct-2, e inmunodetección en fase sólida, empleando el anticuerpo anti-c-Fos, utilizando extractos nucleares y totales provenientes de queratinocitos en multiplicación y células C33-A. La flecha indica la presencia de c-Fos (60 KDa).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

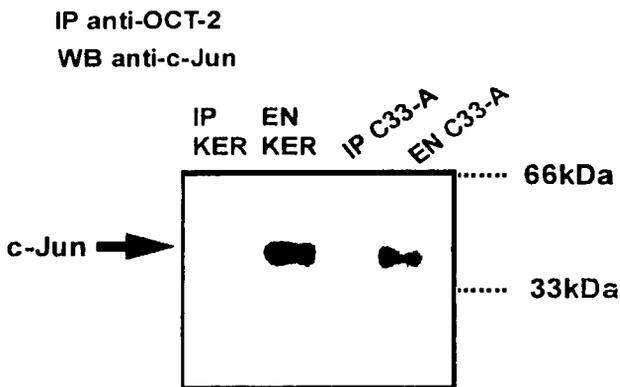


Figura 10. El factor de transcripción Oct-2 no presenta Interacción con el factor de transcripción c-Jun. Análisis de inmunoprecipitación, empleando el anticuerpo anti-Oct-2, e inmunodetección en fase sólida, empleando el anticuerpo anti-c-Jun, utilizando extractos nucleares y totales provenientes de queratinocitos en multiplicación y células C33-A. La flecha indica la presencia de c-Jun (60 KDa).

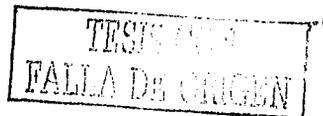
De acuerdo a estos resultados, determinamos que los factores de la familia NF-1 reconocen específicamente a la región octamérica alfa del ESM presente en la Región Reguladora del gen Hi. Así mismo, proponemos que la familia NF-1 presenta interacciones proteína-proteína dentro de esta misma región y éstas interacciones están dadas entre el factor de transcripción Octa-2 y NF-1. Por otra parte, se determinó a su vez que Octa-2 presenta interacciones proteína-proteína

con el factor de transcripción c-Fos, mientras que para el factor de transcripción c-Jun éste no fue el caso.

Existen una serie de reportes que indican que proteínas de la familia con dominio POU, entre las que se encuentran Octa-1 y Octa-2, presentan una actividad represora en la transcripción de algunos genes, particularmente del gen Hi (Welter y cols., 1996; Chapman y Latchman, 1998). De acuerdo con estos datos y apoyándonos en los resultados presentados aquí, se sugiere que Octa-2 al reconocer al ESM y posteriormente establecer las interacciones proteína-proteína definidas con NF-1 y c-Fos, reprimen al gen Hi en los queratinocitos humanos durante el estado basal.

NF-1 en el contexto del funcionamiento del gen de Hi

Para determinar el papel de NF-1 en el contexto del funcionamiento de la Región Reguladora del gen Hi, se determinó el efecto de la sobreexpresión del factor NF-1, mediante ensayos funcionales de transfección transitoria. La construcción p2.6CAT que contiene la Región Reguladora completa del gen Hi y la construcción pRSV-NF-1, se cotransfectaron en queratinocitos humanos en cultivo. Por otra parte, la construcción p2.6CAT también se transfectó en estas células, en condiciones tales, en las que se eliminó la expresión de NF-1 mediante la utilización de un derivado del fármaco curcumina (en una concentración de 50 mM y 250 mM respectivamente). El efecto observado fue un aumento en la



actividad transcripcional cuando se eliminó a NF-1 del sistema, al comparar la actividad cuando sólo se transfeció la construcción p2.6CAT en ausencia del fármaco, es decir, cuando NF-1 se encontraba presente (fig. 11). Dadas las diferencias observadas, es de gran importancia destacar que al parecer factores de la familia NF-1 son represores para el gen de la Involucrina humana al reconocer al ESM, originando la represión transcripcional del gen durante el estado de proliferación de los queratinocitos humanos. Por otra parte, la sobreexpresión de NF-1 no afectó la actividad del 2.6CAT (fig. 11). De acuerdo con este resultado, consideramos que sería de gran interés el poder aumentar la actividad transcripcional de la construcción p2.6CAT y de esta manera poder evaluar el efecto de la sobreexpresión de NF-1 en estas condiciones, de tal manera que pudiéramos confirmar aún más cual es el efecto de NF-1 en el contexto del funcionamiento de la regulación transcripcional del gen Hi. Durante el proceso de diferenciación de los queratinocitos participan una serie de factores externos como el calcio, ésteres de forbol, glucocorticoides y vitamina D, que estimulan la diferenciación. El calcio participa de manera importante en la regulación de las diferentes proteínas que participan en el proceso de diferenciación. Específicamente se ha observado que los niveles del RNAm de involucrina se incrementan al aumentar las concentraciones de calcio en cultivos (Eckert, 1986). Al inducir los cultivos de queratinocitos con calcio en nuestro sistema, y posteriormente realizar los ensayos de transfección, se puede incrementar la actividad de la construcción 2.6CAT (López-Bayghen y cols., 1996), por lo que que manteniendo este ambiente celular evaluaríamos la sobreexpresión de NF-1.

En la Figura 12 se presenta un esquema que resume los resultados presentados aquí.

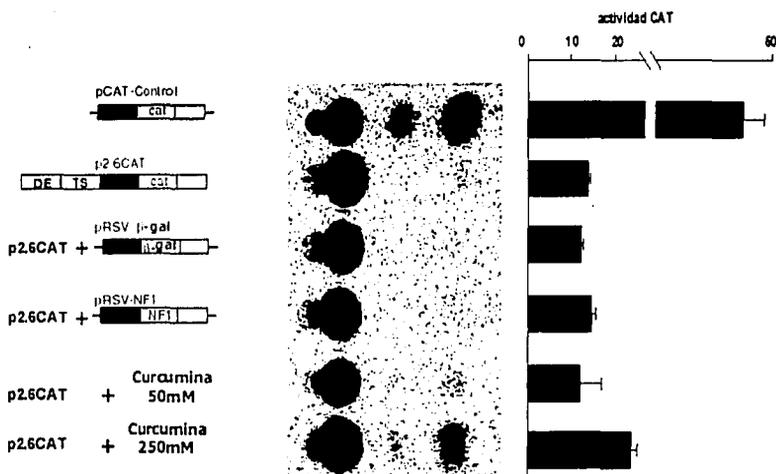


Figura 11. La eliminación de NF-1 aumenta la actividad transcripcional del gen de HI. La construcción p2.6CAT que contiene la región reguladora del gen de HI, se transfeció en queratinocitos basales usando lipofectamine y las células fueron tratadas con curcumina a 50mM y 250mM. Las actividades están expresadas como actividad relativa, donde la actividad CAT que presentó cada construcción se comparó con la actividad CAT de la construcción p2.6CAT. Los resultados que se presentan se obtuvieron mediante la realización de tres experimentos independientes.

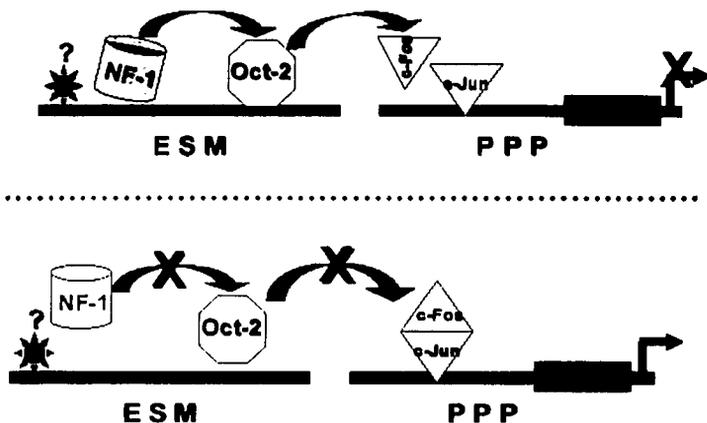


Figura 12. Factores de la familia NF-1 ejercen una represión independiente de la unión al ESM mediante una interacción directa con Octa-2. El reconocimiento de Octa-2 en el ESM mantiene silente al gen de la involucrina humana en queratinocitos no diferenciados. Octa-2 establece una interacción directa con NF-1, resultando una represión sumatoria independiente de la unión al DNA. Así mismo Octa-2 interacciona de manera directa con c-Fos, inhibiendo la unión de este factor activador a su secuencia consenso en el promotor-potenciador, lo cual resulta en el abatimiento de la actividad transcripcional del gen de Hi. Por otra parte cuando las células se diferencian, Octa-2 al parecer disminuye su afinidad por el ESM, de tal manera que no se presenta la interacción directa con NF-1 y c-Fos. Ahora c-Fos reconoce su secuencia consenso en el Promotor-Potenciador. Esta serie de cambios conllevan a una activación transcripcional del gen de Hi en queratinocitos en estado de diferenciación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El estudio de la regulación transcripcional de genes que participan en el proceso de diferenciación de los queratinocitos epiteliales ha sido de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos moleculares que de alguna manera determinan la especificidad de la expresión genética durante los estados de multiplicación y diferenciación de la célula. Como se ha mencionado anteriormente, el gen de la Involucrina humana es considerado como un marcador temprano de la diferenciación epitelial, por lo tanto este gen sólo se expresa en las células diferenciadas, mientras que cuando las células se encuentran en multiplicación, la expresión del gen se encuentra reprimida o es mínima. De tal manera que, en sistemas donde en ciertas etapas, la expresión de los genes se encuentra silente, los represores se encargarán de restringir la expresión de los genes de manera muy específica en ciertos estratos celulares epidermales.

Estudios previos en los que se ha iniciado la caracterización de los mecanismos que reprimen al gen Hi en queratinocitos en multiplicación, se delimita una secuencia localizada entre los nucleótidos -386 y -335 denominada Elemento Silenciador Mínimo (ESM), cuya actividad es modulada durante el proceso de diferenciación y funciona de manera tejido específico. Esta región presenta tres secuencias octaméricas, denominados α , β y δ , reconocidos por el factor de transcripción Octa-2. El factor de transcripción Octa-2 resultó responsable de parte de la represión del gen Hi (Azuara E. 2001, tesis doctoral).

Hablando específicamente de la región octamérica alfa, los estudios bioquímicos que se presentan aquí permiten definir que factores de la familia NF-1 interaccionan en esta región y que a su vez presenta interacciones proteína-proteína con los factores que reconocen a esta región, como Octa-2. Es muy importante destacar que la región octamérica alfa tiene un papel esencial en la actividad del ESM y como tal, ejerce un efecto represor sobre el Promotor-Potenciador Proximal del gen Hi. Su eliminación genera un aumento en la actividad transcripcional en ensayos de transfección transitoria.

Los estudios de inmunoprecipitación e inmunodetección en fase sólida consolidaron la idea de las interacciones proteína-proteína entre el factor de transcripción Octa-2 y los factores de transcripción NF-1 y c-Fos. Considerando que Octa-2 ejerce un efecto represor sobre el promotor del gen Hi, proponemos que al interactuar con NF-1, el efecto resultante sea fundamental para un efecto sinérgico de una represión independiente de la unión al DNA por parte de NF-1, y que en conjunto regulan la funcionalidad del ESM mientras las células no expresan involucrina. Al respecto se ha descrito que algunos miembros de la familia de factores de transcripción POU, reprimen la expresión del gen Hi, identificando sitios consenso para estos factores en la Región Reguladora de este gen. Aunque existen interacciones de algunos de estos factores con esta secuencia, estas interacciones no son necesarias para la represión mediada por factores POU (Welter y cols., 1996). Esto podría indicar que estos factores no requieren de un sitio de interacción con el DNA para reprimir la expresión del gen Hi, sino que tal vez podrían ejercer una represión independiente de la unión al DNA o actuar interactuando con otros factores que se encuentran unidos al DNA (Welter y cols., 1996; Monzon y cols., 1996).

Por otro lado, la sobreexpresión de NF-1 no indujo algún cambio significativo en la actividad de la Región Reguladora de Hi, sin embargo, la eliminación de NF-1 en el sistema aumentó la actividad del promotor del gen Hi en queratinocitos humanos. Esto nos indica que en nuestro sistema epitelial, este factor tiene un efecto represor en la regulación transcripcional del gen. Resultados que nos confirman nuevamente la participación de NF-1 en la regulación del gen Hi.

Por otra parte, se ha reportado que las proteínas de la familia AP-1 se encuentran participando en la regulación de la transcripción de genes que se expresan de manera específica durante la diferenciación de las células epiteliales. Así mismo estas proteínas participan de manera muy importante en la regulación de la actividad del promotor del gen Hi (López-Bayghen y cols., 1996, Welter y cols., 1996). La familia AP-1 se constituye por el heterodímero Fos/Jun, este

complejo reconoce secuencias consenso en el promotor del gen *Hi* y su interacción es indispensable para la actividad del promotor. Además se sabe que hay una distribución diferencial de los factores *c-Fos* y *c-Jun* en los distintos estratos de la epidermis, siendo más altos en los estratos superiores, donde la síntesis de involucrina es mayor (Welter y R. Eckert, 1995; Eckert y cols., 1997). Al establecer que existe una interacción entre el factor de transcripción Octa-2 con *c-Fos* (fig. 11), sugerimos que cuando los queratinocitos se encuentran en estado de multiplicación, el factor represor Octa-2 se une con el dominio activador de *c-Fos* y bloquea entonces su función activadora y de reconocimiento a su secuencia consenso, lo cual evita que se forme el heterodímero *Fos/Jun*, y por lo tanto el complejo no reconoce su sitio de unión en el promotor. De esta manera, sugerimos que éste podría ser uno de los mecanismos generales por el cual la transcripción del gen de la involucrina humana se mantiene reprimida mientras las células epiteliales se encuentran en estado de proliferación.

Los factores de transcripción de la familia NF-1 participan de manera importante en la transcripción basal de una serie de promotores eucarióticos (Robidiux y cols., 1992). Así mismo, se ha descrito su participación en la regulación de genes que están involucrados en el desarrollo, diferenciación y proliferación celular. La familia NF-1 es codificada por cuatro genes (NF-1 clase A, NF-1 clase B, NF-1 clase C, y NF-1 clase D, también conocida como clase X.). Estos genes están altamente conservados en humanos y pollos (Gronostajski, R. 1986; Kruse y cols., 1994; Meisterernst y cols., 1989; Rupp y cols., 1990; Santoro y cols., 1988). Los transcritos primarios sufren un procesamiento alternativo, lo que origina diferentes isoformas del producto de cada gen, dando como resultado una serie de diferentes actividades para cada proteína (Santoro y cols., 1988; Nebi y Cato, 1995; Wenzelides y cols., 1995). Las proteínas de la familia NF-1 presentan un dominio amino terminal altamente conservado y es el dominio de unión al DNA. El dominio de transactivación, localizado en el extremo carboxilo terminal, es la región más variable de los dominios de esta familia de proteínas (Meisterernst y cols., 1989; Mermod y cols., 1989). Todas las proteínas NF-1 se unen como

homodímeros y heterodímeros al DNA y reconocen particularmente la secuencia consenso 5' -TGGG/CN₅GCCAA -3'. Así mismo, la familia NF-1 se expresa de manera constitutiva e interacciona con alta afinidad en sus sitios de unión al DNA (Kruse y Sippel, 1994).

Las proteínas de la familia NF-1 fueron aisladas previamente de las células HeLa y participan de manera importante en la replicación del DNA del adenovirus JC (JCV) en estas células (Nagata y cols., 1983; Nagata y cols., 1982). Por otra parte, se ha descrito que estas proteínas se unen a cajas CCAAT, además de presentar una expresión estrato-específica (Paonessa y cols., 1988; Santoro y cols., 1988). Algunos otros estudios han descrito frecuentemente que los miembros de la familia NF-1 están involucrados en la expresión de genes celulares (Aoyama y cols., 1990; Curtois y cols., 1990; Hennighausen y cols., 1985; Jones y cols., 1987; Nowock y cols., 1985; Rossi y cols., 1988), genes relacionados con el proceso de diferenciación celular (Kulkarni y Gronostajski, 1996; Ways y cols., 1994) y en la replicación de algunos virus (Chong y cols., 1991; Gloss y cols., 1989; Hay, R. 1985; Hennighausen y Fleckenstein, 1986; Jeang y cols., 1987; Nilsson y cols., 1989; Shaul y cols., 1986; Sundsfjord y cols., 1990; Tamura y cols., 1988), incluyendo al virus JC (JCV) (Amemiya y cols., 1989).

Continuando con los estudios sobre los sitios de reconocimiento de las proteínas de la familia NF-1, se determinó que se han encontrado sitios de interacción de estas proteínas en las regiones promotoras de una serie de genes celulares y de algunos genes virales (DeVries y cols., 1985; Gronostajski, R. 1986; Gronostajski y cols., 1985; Leegwater y cols., 1985; Meisterernst y cols., 1988). Específicamente algunos sitios de unión para la familia NF-1 fueron localizados en la región del promotor-potenciador del virus JCV, siendo de manera importante para la replicación de este virus en células gliales (Amemiya y cols., 1989; Amemiya y cols., 1992; Tamura y cols., 1988). Por otra parte, se ha reportado que las proteínas de la familia NF-1 son expresadas de manera diferencial, se sabe que el factor de transcripción NF-1 clase D, se expresa específicamente en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

niveles más altos que los factores clase A, clase B y clase C, en cerebro fetal humano (Sumner y cols., 1996). Otros estudios han demostrado que los niveles de expresión del factor NF-1 clase D, varía en diferentes tipos celulares, disminuyendo en células del riñón y en células epiteliales (Apt y cols., 1994). Hablando específicamente del factor de transcripción clase D, se demostró que la expresión de este factor es de gran importancia en la regulación de la multiplicación del virus JCV, mientras que los factores NF-1 clase A, clase B y clase C no mostraron relevancia en la regulación (Chiara y cols., 2001). De igual manera en células hematopoyéticas se demostró que la expresión del factor NF-1 clase D es esencial para la transcripción temprana del virus JCV (Chiara y cols., 2001).

Los factores de transcripción de la familia NF-1 presentan un comportamiento diferencial en cuanto al nivel de expresión y al patrón de unión con otros factores de transcripción o con su unión directa al DNA, comportamiento relacionado con el estado de diferenciación de la célula (Chiara y cols., 2001). Se han realizado estudios en los cuales se examinaron los niveles de RNAm que codifican para las diferentes proteínas de la familia NF-1, el resultado fue que específicamente los niveles de expresión de las diferentes clases de proteínas de esta familia variaron en los estados de diferenciación celular. Interesantemente los niveles de expresión en células progenitoras hematopoyéticas, inducidas a diferenciación, de las proteínas NF-1 clase A, clase C y clase D fueron menores, mientras que la clase B presentó un nivel de expresión mayor. Así mismo, cuando se midieron los niveles de expresión en células hematopoyéticas no tratadas, el nivel de RNAm para la proteína NF-1 clase C fue mayor en comparación con el resto de las proteínas (Chiara y cols., 2001). De esta manera se ha determinado que los niveles de expresión de los diferentes factores de transcripción de la familia NF-1 son específicos y esto es en relación al tipo y estado de diferenciación celular. Al parecer la expresión de las diferentes clases de proteínas de la familia NF-1 difiere durante los diversos procesos fisiológicos,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incluyendo el desarrollo embrionario de ratón (Chaudhry y cols., 1997) y durante el estado de diferenciación celular (Kulkarni y Gronostajski, 1996).

Los factores de transcripción de la familia NF-1 se han estudiado principalmente en células gliales, células precursoras hematopoyéticas y células linfoides (Monaco y cols., 1996). También se han descrito aspectos importantes sobre la participación de proteínas de esta familia en la regulación transcripcional al interactuar cooperativamente o negativamente con otros factores de transcripción (Jackson y cols., 1993; Truss y cols., 1995). Previamente se ha descrito que miembros de la familia Sp1 y NF-1 son responsables de la actividad del promotor del gen de elastina (Degterev y Foster, 1999), específicamente miembros de la familia NF-1, resultaron ser activadores positivos del promotor del gen.

Hasta el momento los estudios realizados sobre las proteínas de la familia NF-1 se han concentrado en su asociación con la activación transcripcional, sin embargo algunas variantes de esta familia pueden actuar como represores de la transcripción (Apt y cols., 1994; Nebl y Cato, 1995; Rein y cols., 1995; Liu y cols., 1997). La participación de las proteínas de la familia NF-1 en la regulación transcripcional negativa es aún muy poco comprendida, se sabe, que factores de transcripción de la familia NF-1 participan de manera represora en la actividad del promotor GH de rata al interactuar con un silenciador proximal delimitado (Roy y cols., 1994; Guérin y cols., 1993). Así mismo, se ha descrito que las proteínas NF-1 presentan interacciones con otras proteínas (aún no identificadas) para conferir una represión tejido-específico (Roy y cols., 1994). Por otra parte, se ha determinado el papel relevante de estas proteínas en el silenciamiento del gen PIT/GHF1 humano (Rajas y cols., 1998). Mediante ensayos de transfección transitoria (eliminando los sitios de unión NF-1), se determinó un aumento en la actividad transcripcional del gen PIT/GHF1, la actividad del promotor se recuperó en un 80%. Datos que confirman el efecto regulador negativo que presentan los sitios NF-1 (Rajas y cols., 1998). Siguiendo con este análisis, se determinó que la actividad silenciadora del gen PIT/GHF1 no solamente fue mediada por NF-1, al

parecer las proteínas NF-1 interactúan con proteínas que presentan sitios de unión cercanos a los de NF-1 (GRE o Pit-1/GHF-1), sitios localizados río abajo de la región reguladora proximal o en la región promotora (Rajas y cols., 1998).

De esta manera, la regulación transcripcional llevada a cabo por los factores de transcripción de la familia NF-1 es sumamente interesante, por una parte tenemos su capacidad de unirse al DNA como homodímeros o heterodímeros, con proteínas de la misma familia o con otros factores de transcripción. Por otra parte, se ha reportado que los factores NF-1 reconocen diversos elementos activadores y de manera más restringida elementos silenciadores (Rajas y cols., 1998). Es sorprendente que la expresión y función específica de estos factores difiera de acuerdo al tipo celular y a su capacidad de interactuar con una serie de factores de transcripción, lo cual resulta en una capacidad de ejercer una función activadora o represora de la transcripción.

Nuestros resultados son consistentes con los de otros autores al demostrar que factores de la familia NF-1 pueden presentar una función represora en la regulación transcripcional de ciertos genes, en nuestro caso la familia NF-1 presentó un efecto represor sobre la Región Reguladora del gen de la involucrina humana. Los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a proponer que los factores de transcripción de la familia NF-1 tienen una actividad relevante en la regulación transcripcional del gen de la involucrina humana. Basándonos en todos estos resultados, sugerimos que los mecanismos moleculares que posiblemente se estén llevando a cabo cuando el gen Hi se encuentra reprimido en condiciones en las que los queratinocitos están proliferando, son los siguientes: cuando los queratinocitos se encuentran en estado de proliferación, la actividad del promotor del gen Hi se encuentra suprimida, esta supresión está dada por el reconocimiento específico del factor de transcripción Octa-2 en el ESM. Octa-2 establece una interacción directa con NF-1, lo cual conduce a un efecto sinérgico de represión entre ambos factores, a su vez Octa-2 establece una interacción directa con c-Fos, ésta interacción bloquea la función activadora de c-Fos al no

poder formar el heterodímero con c-Jun, se impide el reconocimiento de este complejo en el promotor del gen Hi y por lo tanto no puede ejercer su efecto activador. Cuando los queratinocitos son inducidos hacia el proceso de diferenciación, se propone que el factor Octa-2 disminuye su afinidad de interacción con el ESM, así mismo, el factor NF-1 pierde afinidad por su interacción con la región octamérica alfa, lo cual conduce a un rompimiento de interacción directa entre Octa-2 y NF-1. Por otro lado, es muy probable que Octa-2 pierda la capacidad de establecer su interacción con c-Fos, resultando en la formación del heterodímero Fos/Jun, constituyendo al complejo AP-1, y entonces este complejo, siendo responsable de la actividad del promotor del gen Hi, puede reconocer su secuencia consenso en esta región y activar la transcripción (fig. 12). Es muy importante mencionar que cuando los queratinocitos se encuentran en estado de diferenciación, se inicia la síntesis de una serie de factores de transcripción como son: Fra1, Fra2, JunB, JunD, los cuales presentan una función activadora y que por ende, llevan al desplazamiento de los factores de transcripción represores, al reconocimiento de secuencias activadoras y al ensamble de la maquinaria de inicio de la transcripción, que tiene como resultado la expresión de involucrina en los estratos espinoso y granuloso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

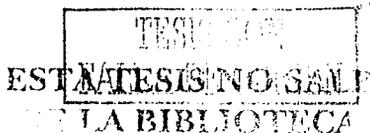
CONCLUSIONES

- La secuencia octamérica alfa del ESM, presente en la región reguladora del gen Hi, es reconocida por factores de transcripción de la familia NF-1.
- El tipo de interacción que presentan los factores de la familia NF-1 en la región octamérica alfa del ESM es de tipo proteína-proteína.
- El factor de transcripción Oct-2 interactúa con los factores de la familia NF-1.
- El factor de transcripción Oct-2 presenta una interacción de tipo proteína-proteína con el factor de transcripción c-Fos.
- El factor de transcripción Oct-2 no presentó una interacción con el factor de transcripción c-Jun, dentro del contexto de células de tipo epitelial.
- Los factores de transcripción NF-1 parecen tener un papel represor en el contexto del funcionamiento de la Región Reguladora del gen Hi, ya que en su ausencia, se incrementa la actividad transcripcional.
- Con base en los resultados que se presentan en este estudio, proponemos que la regulación negativa del gen Hi durante la fase de proliferación celular, puede depender en parte de un represor; fundamental durante los procesos de diferenciación celular y que permite restringir de manera específica la expresión de los genes epidermales. Al parecer los eventos moleculares que determinan la especificidad de la expresión transcripcional del gen Hi resultan de un control del proceso de diferenciación de los queratinocitos humanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LITERATURA CITADA

- Amemiya, K., R. Traub., L. Durcham y E. Mayor. 1989. Interaction of a nuclear factor-1-like protein with the regulatory region of the human polyomavirus JC virus. *J. Biol. Chem.* 264: 7025-7032.
- Amemiya, K., R. Traub., L. Durcham y E. Mayor. 1992. Adjacent nuclear factor-1 and activator protein binding sites in the enhancer of the neurotropic JC virus. *J. Biol. Chem.* 276: 14204-14211.
- Andersen, B., M. Schonemman., S. Flynn., R. Pearse., H. Singh y M. Rosenfeld. 1993. Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2 related factors expressed in epidermis. *Science.* 260: 78-82.
- Andersen, B., W. Weinberg y M. Rosenfeld. 1997. Functions of the POU domain genes Skn-1a and Tst-1/Oct6/SCIP in epidermal differentiation. *Genes and Development.* 11: 1873-1884.
- Apt, D., Y. Liu y H. Bernard. 1994. Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NF1/CTF in a cell-type specific manner. *Nucleic Acids Re.* 22: 3825-3833.
- Apt, D., R. M. Watts., G. Suske y H. U. Bernard. 1996. SP-1/SP-3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology.* 224(1): 281-291.
- Aoyama, A., T. Tamura y K. Mikoshiba. 1990. Regulation of brain specific transcription of the mouse myelin basic protein gene: function of the NF-1-binding site in the distal promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167: 648-653.
- Azuara-Liceaga, E. Tesis Doctoral. En proceso. 2001.
- Banks, E., J. Chris y R. Eckert. 1999. Transcription factor SP-1 activates involucrin promoter activity in non-epithelial cell types. *Biol Chem. J.* 337: 507-512.
- Bernard, B., S. Robinson., S. Vandaele., J. Mansbridge y M. Dramon. 1985. Abnormal mutation pathway of keratinocytes in psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* 112 6: 647-653.
- Blackwood, E y D. Kadonaga. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science.* 5373: 61-63.
- Boulikas, T. 1994. A compilation and classification of DNA binding sites for protein transcription factor from vertebrates. *Crit. Euk. Gene Exp.* 283: 117-321.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.



Brigitte, B. y J. Danan. 1994. Members of the CAAT / enhancer protein, hepatocyte nuclear factor-1 and nuclear factor-1 families can differentially modulate the activities of the rat α -fetoprotein promoter and enhancer. *J. Biochem.* 301: 49-55.

Carrol, J. M. y L. Taichman. 1992. Characterization of the human involucrin promoter using a transient β -galactosidase assay. *J. Of Cell Science.* 103: 925-930.

Carrol, J. M., K. Albers., J. Garlic., R. Harrington y L. Taichman. 1993. Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 10270-10274.

Casatorres J., J. Navarro., M. Blessing y J. Jorcano. 1994. Analysis of the control of expresión and tissue specificity of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes. Fundamental role of AP-1 element. *J. Biol Chem.* 269: 20489-20496.

Chapman, C. M. y D. S. Latchman. 1998. The different alternatively spliced isoforms of the Oct-2 transcription factor repress the involucrin promoter in a cell type-specific manner. *Mol Biol Rep* 25(4):253-257.

Chaudhry, A., G. Lyons y R. Gronostajski. 1997. Expression patterns of the four nuclear factor 1 genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev. Dyn.* 208: 313-325.

Chen, T., R. Wu., F. Catro-Munozledo y T. Sun. 1997. Regulation of k3 keratin gene transcription by Sp1 and AP2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 17: 3056-3064.

Chiara, M., B. Sabath., L. Dirham y E. Major. 2001. JC Virus Multiplication in Human Hematopoietic Progenitor Cells Requires the NF-1 Class D Transcription Factor. *J. Virol.* 75: 9687-9695.

Chong, T., D. Apt., B. Gloss., M. Isa y H. Bernard. 1991. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF-1 and AP-1 participate in epithelial cell-specific expression. *J. Virol.* 65: 5933-5943.

Crish, J. F., T. M. Zaim y R. L. Eckert. 1993. The distal regulatory region of the human involucrin promoter is required for expression in epidermis. *J. Biol. Chem.* 273(46): 3046C-30465.

Curtois, S., D. Lafontaine., F. Lemaigre., S. Durvieux y G. Rousseau. 1990. Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 57-64.

Dale B. A., K. Resing y J. Lonsdale-Eccles. 1985. Filaggrin: a Keratin filament associated protein. *Acad. Sci.* 297: 365-371.

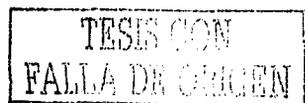
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Degterev, A. y A. Foster. 1999. The role of NF-1 factors in regulation of elastin gene transcription. *Matrix Biology*. 18: 295-307.
- DeVries, E., W. Van Driel., M. Tromp., J. Van Boom y P. Van der Vliet. 1985. Adenovirus DNA replication in vitro: site-directed Mutagenesis of the nuclear factor I binding site of the Ad 2 origin. *Nucleic Acids Res.* 13: 4935-4952.
- DiSepio, D., A. Jones., M. A. Longley., D. Bundman., J. A. Rothnagel y D. R. Roop. 1995. The proximal promoter of the mouse loricrin gene contains a functional AP1 element and directs keratinocyte-specific but not differentiation-specific expression. *J. Biol. Chem.* 270(18): 10792-10799.
- Eckert, R. L. y H. Green. 1986. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* 40:583-589.
- Eckert, R. L., J. F. Crish, E. B. Banks y J. F. Welter. 1997. The epidermis genes on-genes off. *J. Invest. Dermatol.* 109:501-509.
- Efimova, T., P. LaCelle., J. Welter y R. Eckert. 1998. Regulation of human involucrin promoter activity by a protein Kinase C, Ras, MEK1, MEK3, p38/RK, AP-1 signaling transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 273(38): 24387-24395.
- Fuchs, E. y C. Byrne. 1994. The epidermis: rising to the surface. *Curr Op Gen Dev* 4:725-736.
- Gloss, B., M. Yeo-Gloss., M. Meisterernst., L. Rogge., E. Winnacker y H. Bernard. 1989. Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancer of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res.* 17: 3517-3532.
- Gniadecki, R. 1998. Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen. Pharmacol.* 5:619-622.
- Gronostajski, R., S. Adhya., K. Nagata., R. Guggenheimer y J. Hurwitz. 1985. Site-specific DNA binding of nuclear factor I. Analysis of cellular binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 5: 964-971.
- Gronostajski, R. 1986. Analysis of nuclear factor I binding to DNA using degenerate oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 14: 9117-9132.
- Guérin, S., J. Anzivino., R. Roy y D. Moore. 1993. *Eur. J. Biochem.* 213: 399-404.
- Hanley, K., L. Word., Ng DC, He SS, P. Lau., A. Moser., PM. Elias., DD. Bikle., ML. Williams y KR. Feingold. 2001. Cholesterol sulfate stimulates involucrin transcription in keratinocytes by increasing Fra-1, Fra-2 y Jun D. *J. Lipid Res.* 42: 390-398.
- Hay, R. 1985. The origin of adenovirus DNA replication: minimal DNA sequence requirement in vivo. *EMBO J.* 4: 421-426.
- Heinemeyer, T., X. Chen., H. Karas., A. Kel., O. Kel., I. Liebich., T. Meinhardt., I. Reuter., F. Schacherer y Wingender. 1999. Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 27: 318-322.

TESIS CON
FALDA DE ORIGEN

- Hennighausen, L., U. Siebenlist., D. Danner., P. Leder., D. Rawlins., P. Rosenfeld y T. Kelly. 1985. High-affinity binding site for a specific nuclear protein in the human IgM gene. *Nature* 314: 289-292.
- Hennighausen, L. y B. Fleckenstein. 1986. Nuclear factor 1 interacts with five DNA elements in the promoter region of the human cytomegalovirus mayor immediate early gene. *EMBO J.* 5: 1367-1371.
- He, X., R. Guerrero., DM. Simmons., RE. Park., CJ. Lin., LW. Swanson y MG. Rosenfeld. 1991. Tst-1, a member of the POU domain gene family, binds the promoter of the gene encoding the cell surface adhesion molecule Po. *Mol. Cell. Biol.* 3:1739-1744.
- Hu, L. y L. Gudas. 1994. Activation of keratin 19 gene expresión by a 3' enhancer containing an AP1 site. *J. Biol. Chem.* 269: 183-191.
- Jackson, D., K. Rowader., K. Stevens., C. Jiang., P. Milos y S. Zaret. 1993. Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2401-2410.
- Jang, S., N. Karaman-Jurukovska., MI. Morasso., PM. Steinert y NG. Markova. 2000. Complex interactions between epidermal POU domain and activator protein 1 transcription factors regulate the expression of the profilaggrin gene in normal human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 15295-15304.
- Jang, S. I., P. M. Steinert y N. G. Markova. 1996. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J. Biol. Chem.* 271(39): 24105-24114.
- Janson, L. y U. Pettersson. 1990. Cooperative interaction between transcription factors Sp1 and OTF-1. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 87: 4732-4736.
- Jiang, K., D. Rawlins., P. Rosenfeld., J. Shero., T. Kelly y G. Hayward. 1987. Multiple tandemly repeated binding sites for cellular nuclear factor 1 that surround the mayor immediate promoters of simian and human cytomegalovirus. *J. Virol.* 61: 1559-1570.
- Jones, K., T. Kadonaga., P. Rosenfeld., T. Nelly y R. Tjian. 1987. A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell.* 4: 79-89.
- Kambe, F., S. Tsukahara, T. Kato y H. Seo. 1993. The POU domain protein Oct-1 is widely expressed in adult rat organs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1171: 307-310.
- Karp, G. 1996. *Biología Celular y Molecular*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 746p.
- Kruse, U. y A. Sippel. 1994. Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homo and heterodimers. *FEBS Lett.* 348:46-50.
- Kulkarni, S. y R. Gronostajski. 1996. Altered expresión of the developmentally regulated NF1 gene family during phorbol ester-induced diferenciación of human leukemic cells. *Cell Growth Differ.* 7: 501-510.

- LaPres, J. J. y L. G. Hudson. 1996. Identification of a functional determinant of differentiation-dependent expression in the involucrin gene. *J. Biol. Chem.* 271(38): 23154-23160.
- Leask, A., C. Byrne y E. Fuchs. 1991. Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7948-7952.
- Leegwater, P., W. Van Driel y P. Van der Vliet. 1985. Recognition site of nuclear factor I, a sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* 4: 1515-1521.
- Liu, M. y L. Freedman. 1994. Transcriptional synergism between the vitamin D3 receptor and other nonreceptor transcription factors. *Mol. Endocrinol.* 8: 1593-604.
- Liu, Y., H. Bernard y D. Apt. 1997. NF1-B3, a novel transcriptional repressor of the nuclear factor I family, is generated by alternative RNA processing. *J. Biol. Chem.* 272: 10739-10745.
- López-Bayghen, E., A. Vega., A. Cadena., S. E. Granados., L. F. Jave., P. Gariglio y L. M. Alvarez-Salas. 1996. Transcriptional analysis of the 5' noncoding region of the human involucrin gene. *J. Biol. Chem.* 271(1):512-520.
- Lu B., J. Rothnagel y D. Roop. 1994. Differentiation-specific expresión of human keratin 1 is mediated by a composite AP-1/Steroid hormone element. *J. Biological Chem.* 269: 7443-7449.
- Magnaldo T., R. Vidal., M. Ohtsuki., I. Freedberg y M. Blumenberg. 1993. On the role of AP2 in epithelial-specific gene expression. *Gene Expr.* 3: 307-315.
- Meisterernst, M., I. Gander., L. Rogge y E. Winnacker. 1988. A quantitative analysis of nuclear factor 1/DNA interaction. *Nucleic Acids Res.* 16: 4419-4435.
- Meisterernst, M., L. Rogge., R. Foeckler., M. Karaghiosoff y E. Winnacker. 1989. Structural and functional organization of a porcine gene coding for nuclear factor 1. *Biochemistry.* 28: 8191-8200.
- Mermod, N., E. O'Neill., T. Kelly y R. Tjian. 1989. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell.* 58: 741-753.
- Monaco, M., W. Atwood., M. Gravell., C. Tornatore y E. Mayor. 1996. JC Virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J. Virol.* 70: 7004-7012.
- Monzon, R., L. LaPres y L. Hudson. 1996. Regulation of involucrin gene expresión by retinoic acid and glucorticoids. *Cell Growth Differentiation.* 7: 1751-1759.
- Mufson, R. A., M. L. Steinberg y V. Defendi. 1982. Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the differentiation of simian virus 40-infected human keratinocytes. *Cancer Res.* 42: 4600-4605.



- Nagata, K., R. Guggenheimer y J. Hurwitz. 1983. Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 6177-6181.
- Nagata, K., R. Guggenheimer., T. Enomoto., J. Lichy y J. Hurwitz. 1982. Adenovirus DNA replication *in vitro*: identification of a host factor that stimulates sintesis of the preterminal protein-dCMP complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 6438-6442.
- Nebi, G. y A. Cato. 1995. NF1/X proteins: a class of NF1 family of transcription factors with positive and negative regulatory domains. Cell. Mol. Res. 41: 85-95.
- Ng Dean C., S. Shafece., D. Lee y D. Bikle. 2000. Requirement of an AP1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. J. Biol. Chem. 275: 24080-24088.
- Nilsson, P., B. Hallberg., A. Thornell y T. Grundstroem. 1989. Mutant analysis of protein interactions with a nuclear factor 1 binding dite in the SL3-3 virus enhancer. Nucleic Acids Res. 17: 4061-4075.
- Nowock, J., U. Borgmeyer., A. Peuschel., R. Rupp y A. Sippel. 1985. The TGGCA-binding protein binds to hte MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer. Nucleic Acids Res. 13: 2045-2061.
- Ogbourne S y T. Antalis. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eucaryotes. Biochem. J. 331: 1-14.
- Paonessa, G., F.Gaunari., R. Frank y R. Cortese. 1988. Purification of a NF-1-like DNA dinding protein from rat liver and cloning the corresponding cDNA. EMBO J. 7: 3115-3123.
- Pei X. 1996. HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. Carcinogenesis. 7: 1395-1401.
- Prefontaine G., R. Walther., W. Giffin., M. Lemieux., L. Pepe y R. Haché. 1999. Selective binding of steroid hormone receptors ro octamer transcription factors determines transcriptional synergism at the mouse mammary tumor virus promoter. J. Biol. Chem. 274: 26713-26719.
- Rajas, F., D. Mireille., M. de la Hoya., V. Peggy y J. L. Castrillo 1998. Nuclear factor 1 regulates the distal silencer of the human PIT/GHF1 gene. J. Biochem. 33: 77-84.
- Rauscher, F. J., D. R. Coen, T. Curran, T. J. Bos, P. K. Vogt, D. Bohmann, R. Tjian y R. Franza Jr. 1998. Fos-associated protein p39 is the product of the jun protooncogene. Science. 240: 1010-1016.
- Rein, T., R. Forster., A. Krause., E. Winnacker. y H. Zorbas. 1995. Organization of the alpha-globin promoter and possible role of nuclear factor 1 in an alpha-globin-inducible and a noninducible cell line. J. Biol. Chem. 270: 19643-19650.
- Robidoux, S., P. Gossenlin y M. Harvey. 1992. Transcription of the mouse secretory protease inhibitor p12 gene is activated by the developmentally regulated positive transcription factor Sp1. Mol Cell Biol. 12: 3796-3806.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Rossi, P., G. Karsenty., A. Roberts., N. Roche., M. Sporn y B. De Crombrugge. 1988. A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor-beta. *Cell*. 52: 405-414.
- Rossi, A., S. Jang., R. Ceci., P. Steinert y N. Markova. 1998. Effect of AP-1 transcription in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 110(1): 34-40.
- Roy, R.J., L. Vallieres., S. Leclerc y S.L., Guerin. 1994. The rat growth hormone proximal silencer contains a novel DNA-binding site for multiple nuclear proteins that represses basal promoter activity. *Eur. J. Biochem.* 225(1): 419-432.
- Rupp, R., U. Kruse., G. Multhaup., U. Gobel., K. Beyreuther y A. Sippel. 1990. Chicken NF1/TGGCA proteins are encoded by at least the independent genes, NF1-A, NF1-B, NF1-C with homologues in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 18: 2607-2616.
- Rutberg, S., E. Saez., A. Glick., A. Dulgosz., B. Spiegelman y S. Yuspa. 1996. Differentiation of mouse keratinocyte is accompanied by PKC-dependent changes in AP-1 proteins. *Oncogene*. 13: 167-176.
- Saffer, J., S. Jackson y M. Annarella. 1991. Developmental expression of SP-1 in the mouse. *Mol. Cell Biol.* 11: 2189-2199.
- Santoro, C., N. Mermod., P. Andrews y R. Tjian. 1988. A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature*. 334: 218-224.
- Schallreuter, K. U. y J. M. Wood. 1995. The human epidermis. *Proc. Nutr. Soc.* 54(1):191-195.
- Scheiber, E. P. Matthias., M. Muller y W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extract, prepared from small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17: 6419.
- Seto, E., Y. Shi y T. Shenk. 1991. YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature*. 354: 241-245.
- Shaul, Y., R. Ben-Levy y T. De Medina. 1986. The high affinity binding site for nuclear factor I next to the hepatitis B virus S gene promoter. *EMBO. J.* 5: 1967-1971.
- Shrivastava, A. y K. Calame. 1994. An analysis of genes regulated by the multifunctional transcriptional regulator YY1. *Nucleic Acids Res.* 22: 5151-5155.
- Sumner, C., T. Shinohara., L. Durham., R. Traub., E. Major y K. Amemiya. 1996. Expression of multiple classes of the nuclear factor-1 family in the developing human brain: differential expression of two classes of NF1 genes. *J. Neurovirol.* 2: 87-100.
- Sundsford, A., T. Johansen., T. Flaegstad., U. Moens., P. Villand., S. Subramani y T. Traavik. 1990. At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *J. Virol.* 64: 3864-3871.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Tamai Y., Y. Takemoto., M. Matsumoto., T. Morita., A. Matsushiro y M. Nozaki. 1991. Sequence of EndoA gene encoding mouse cytokeratin and its methylation state in the CpG-rich region. *Gene*. 104: 169-176.
- Tamura, T., T. Inoue., K. Nagata y K. Mikoshiba. 1988. Enhancer of human polyoma JC virus contains nuclear factor-1-binding sequences: análisis using mouse brain nuclear extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 419-425.
- Takahashi H., H. Kobayashi., S. Matsuo y H. Lizuka. 1995. Repression of involucrin gene expression by transcriptional enhancer factor 1 (TEF-1). *Arch. Dermatol. Res.* 287(8): 740-746.
- Truss, M., J. Bartsch., A. Schelbert., R. Hache y M. Beato. 1995. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* 14: 1737-1751.
- Volz A., B. P. Korge., J. H. Compton., A. Ziegler., P. M. Steinert y D. Mischke. 1993. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics*. 18: 92-99.
- Ways, D., W. Qin., T. Garriss., J. Chen., E. Hao., D. Cooper., S. Usala., P. Parker y P. Cook. 1994. Effects of chronic phorbol ester treatment on protein kinase C activity, content, and gene expression in the human monoblastoid U937 cell. *Cell Growth Differ.* 5: 161-169.
- Wegner, M., D. Drolet y M. Rosenfeld. 1993. POU domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 488-489.
- Welter, J. F. y R. L. Eckert. 1995. Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene*. 11: 2681-2687.
- Welter, J. F., H. Galli., J. F. Chris y R. L. Eckert. 1996. Regulation of Human Involucrin Promoter activity by POU domain proteins. *J. Biol. Chem.* 271(25): 14727-14733.
- Wenzelides, S., H. Altmann., W. Wendler y E. Winnacker. 1995. CTF5- a new transcriptional activator of the NF1/CTF family. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 2416-2421.
- Yonus, J. y B. Glichrest. 1992. Modulation of mRNA levels during human keratinocyte differentiation. *J. Cell. Physiol.* 152: 232-239.
- Zhao, W., T. Chow y T. Broker. 1999. A Distal Element in the HPV-11 Upstream Regulatory Region Contributes to Promoter repression in Basal Keratinocytes in Squamous Epithelium *Biology*. 253: 219-229.
- Zwilling, S., A. Annweiler y T. Wirth. 1994. The POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 1655-1662.