



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE TRES MUTANTES DE HNF4 α
IDENTIFICADAS EN PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES DE
APARICION TEMPRANA.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA.

PRESENTA:

YAYOI XOCHITL SEGURA KATO

DERECTOR DE TESIS : Dra. María Teresa Tusié Luna.



MEXICO, D.F. 2004.



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
 Instituto en Investigaciones Biomédicas
 Coordinación de Enseñanza

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTÓNOMA DE
 MÉXICO

Dr. José Narro Robles
Director de la Facultad de Medicina
Presente

Estimado Dr. Narro:

Por medio de la presente nos permitimos comunicarle que la Coordinación de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica propone el siguiente Jurado para el examen profesional de la alumna: Yayoi Xochitl Segura Kato, quien presenta la Tesis " Caracterización funcional de tres mutantes de HNF4alpha identificadas en pacientes mexicanos con diabetes de aparición temprana "

La conformación del jurado es la siguiente:

- Presidente. Dra. Carmen Gómez Eichelmann
- Vocal. Dra. María Teresa Tusié Luna
- Secretario Dra. Socorro C Durán Vargas
- Suplente. Dr. Roberto Hernández Fernández
- Suplente. Dr. Felix Recillas Targa

Agradezco su atención y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

" Por mi Raza hablará el Espíritu"

Ciudad. Universitaria, D.F., a 19 de mayo de 2003

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre.
Coordinador de Enseñanza.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Yayoi Xochitl Segura Kato

FECHA: 24 de febrero de 2004

FIRMA:



El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Teresa Tusié Luna, en las instalaciones del laboratorio que ella dirige, ubicado en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), y que pertenece al Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Dra. María Teresa Tusié Luna

Yayoí Xóchitl Segura Kato

Este trabajo está dedicado a:

Mis padres:

Antonio Segura Miranda y Tatsuko Kato Ishii

Mis hermanas:

Hikaru Citlali y Aiko Xochipilli

Mi sobrino:

Daniel Hyde

Mis abuelitos:

*Noé Segura Román † y Oliva Miranda Guzmán
Ichitaro Kato y Masako Kato*

Mis tíos, primos y sobrinos.

Todos mis amigos.

Gracias a todos por su cariño y apoyo, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa Tusié Luna, por la aportación y dirección de este proyecto de tesis, por brindarme espacio, equipo y material para realizar este trabajo, y por su gran apoyo y confianza. Muchas gracias.

Al Biól. Aarón Domínguez López, compañero del laboratorio de la Unidad de Biología y Medicina Molecular, por la aportación del proyecto, por brindarme sus conocimientos y su confianza en la realización del presente trabajo.

A los integrantes del jurado, Dra. Carmen Gómez Eichelmann, Dra. Socorro Durán Vargas, Dr. Roberto Hernández Fernández y Dr. Félix Recillas Targa, que amablemente revisaron el trabajo escrito. Muchas gracias por sus valiosas sugerencias.

Al Biól. Salvador Ramírez Jiménez y al Dr. Angel Miliar García de la Unidad de Biología y Medicina Molecular, por su apoyo y asesoría en el trabajo experimental.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, al Biól. José Luis Ventura Gallegos y a la Lic. en I.B.B. Lucia López Bojorquez del Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular, y a la Dra. Elizabeth Langley Mc. Carron y al Q.F.B. Enrique Sánchez Alcántara del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por las facilidades de equipo y material de laboratorio, y por el apoyo y asesoría brindados en el trabajo experimental.

A los investigadores que se desempeñaron como mis tutores durante las rotaciones en laboratorios y a mis profesores del Instituto de Investigaciones Biomédicas, gracias por la enseñanza transmitida durante mi formación académica.

A los compañeros y amigos de la Unidad de Biología y Medicina Molecular. En especial a Maribel, a Rocío y a Raúl, gracias por la amistad y el apoyo brindados.

CONTENIDO

Abreviaturas

| | |
|---|----------|
| 1. Resúmen | 1 |
| 2. Abstract | 2 |
| 3. Introducción | 3 |
| 3.1 Generalidades de HNF4 α | 3 |
| 3.2 El gen <i>HNF4α</i> humano | 6 |
| 3.3 Función de HNF4 α | 8 |
| 3.3.1 Genes blanco de HNF4 α | 8 |
| 3.3.2 HNF4 α en el desarrollo embrionario temprano | 9 |
| 3.3.3 Función de HNF4 α en el tejido hepático | 10 |
| 3.3.4 HNF4 α en las células β pancreáticas | 11 |
| 3.4 Eventos moleculares en la función biológica de HNF4 α | 12 |
| 3.4.1 Localización celular | 12 |
| 3.4.2 Homodimerización | 13 |
| 3.4.3 Unión al DNA | 13 |
| 3.4.4 Actividad transcripcional de HNF4 α | 15 |
| 3.4.4.1 La activación transcripcional mediada por AF-2 | 15 |
| 3.4.4.2 El dominio de <i>trans</i> -activación AF-2 de HNF4 α | 16 |
| 3.4.4.3 Unión a ligando | 16 |
| 3.4.4.4 Co-activadores que interactúan con el dominio AF-2 | 18 |
| 3.4.4.5 Represión de la actividad transcripcional del dominio AF-2 | 18 |
| a) Co-represores | 18 |
| b) Represión de AF-2 por el dominio F de HNF4 α | 19 |
| 3.4.4.6 Dominio de <i>trans</i> -activación AF-1 | 19 |
| 3.4.4.7 Interacción de HNF4 α con el complejo de la maquinaria basal | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.5 La diabetes tipo MODY1 causada por mutaciones en el gen <i>HNF4α</i> humano | 21 |
| 3.5.1 La diabetes mellitus | 21 |
| 3.5.2 Factores genéticos en la diabetes mellitus tipo 2 | 23 |
| 3.5.3 La diabetes juvenil tipo adulto o tipo MODY | 25 |
| 3.5.4 La diabetes tipo MODY1 | 27 |
| 3.5.4.1 Mutaciones en el gen <i>HNF4α</i> | 27 |
| 3.5.4.2 Fenotipo de los pacientes MODY1 | 27 |
| 3.5.4.3 Estudios funcionales de las mutantes naturales identificadas en el gen <i>HNF4α</i> | 29 |
| 3.5.4.4. Efecto mutación-fenotipo | 31 |
| 3.5.5 Relación entre los factores de transcripción <i>HNF4α</i> y <i>HNF1α</i> | 32 |
| 4. Antecedentes | 36 |
| 5. Justificación | 39 |
| 6. Hipótesis | 42 |
| 7. Objetivos | 43 |
| 7.1 Objetivo general | 43 |
| 7.2 Objetivos específicos | 43 |
| 8. Materiales y métodos | 44 |
| 8.1 Introducción | 44 |
| 8.2 Cultivo celular | 45 |
| 8.3 Ensayos de <i>trans</i> -activación | 45 |
| 8.3.1 Plásmidos | 45 |
| a) Plásmido de expresión | 45 |
| b) Plásmido reportero | 46 |
| 8.3.2 Transfección transitoria | 46 |
| 8.3.3 Ensayo de luciferasa | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 8.3.4 Análisis estadístico | 46 |
| 8.4 "Western blot" | 47 |
| 8.4.1 Preparación de extractos de proteínas nucleares | 47 |
| 8.4.2 Ensayo de "western blot" | 48 |
| 9. Resultados | 49 |
| 10. Discusión | 52 |
| 10.1 Efecto de las mutaciones D126H y D126Y | 52 |
| 10.1.1 En células β pancreáticas | 52 |
| 10.1.2 En células hepáticas | 53 |
| 10.1.3 Los efectos funcionales de las mutantes D126H y D126Y son tejido específicos | 54 |
| 10.1.4 Las mutantes D126Y y D126H tienen defectos en la unión al DNA | 55 |
| 10.2 Efecto funcional de la mutante de HNF4 α R154Q | 56 |
| 10.3 Las células de origen hepático y pancreático en el estudio de las mutantes HNF4 α | 57 |
| 11. Conclusiones | 59 |
| 12. Perspectivas | 60 |
| 13. Referencias | 62 |
| 14. Apéndices | 74 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ADP | Difosfato de adenosina |
| AF-1 | Función de activación 1 |
| AF-2 | Función de activación 2 |
| Aldo B | Aldolasa B |
| AMPc | Monofosfato de adenosina cíclico |
| AP-1 | Proteína de activación 1 |
| Apo | Apolipoproteína |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| C/EBP | Proteína de unión al potenciador CCAAT |
| CBP | Proteína de unión a CREB |
| COUP-TF | Factor de transcripción-proteína de unión al promotor del gen de la ovoalbúmina de pollo |
| CREB | Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc |
| CYP3A | Citocromo P450 subfamilia 3A |
| DBD | Dominio de unión al DNA |
| DMEM | Medio mínimo esencial Dulbecco |
| DTT | Ditiotreitol |
| GATA-6 | Proteína de unión a GATA-6 |
| GK | Glucocinasa |
| Glut 2 | Transportador de glucosa 2 |
| GRIP1 | Proteína asociada al receptor del glutamato 1 |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperrazinaetanosulfónico |
| HLA | Antígeno de leucocitos humano |
| HNF | Factor nuclear de hepatocitos |
| IgG-HRP | Inmunoglobulina G-peroxidasa de rábano |
| INS | Insulina |
| IPF1 | Factor promotor de insulina 1 |
| IR | Receptor de insulina |

| | |
|---------------------------|---|
| IRS | Substrato del receptor de insulina |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilo Dalton |
| KH_2PO_4 | Fosfato de potasio monobásico |
| LBD | Dominio de unión a ligando |
| L-FABP | Proteína transportadora de ácidos grasos hepática |
| Lp(a) | Lipoproteína a |
| L-PK | Proteína cinasa hepática |
| LPL | Lipoproteína lipasa |
| MED | Mediador de la regulación transcripcional de la RNA polimerasa II |
| MODY | Diabetes juvenil tipo adulto |
| MTP | Proteína microsomal transportadora de triglicéridos |
| Na_2HPO_4 | Fosfato sódico dibásico |
| NFKB-p65 | Factor nuclear kappa B-p65 |
| OGDH | Oxoglutarato deshidrogenasa |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| PC | Cofactor positivo |
| PCAF | Factor asociado a p300/CBP |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PI-3 cinasa | Fosfatidilinositol 3 cinasa |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PMSF | Fenilmetilsulfonilfluoruro-inhibidor de proteasa |
| PPAR | Receptor activador de proliferación peroxisomal |
| PVDF | Fluoruro de polivinilideno |
| PXR | Receptor pregnano X |
| RBP | Proteína de unión al retinol |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RXR | Receptor retinoide X |
| SBF | Suero fetal bovino |

| | |
|-------------|--|
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SMCC | Complejo cofactor SRB/MED |
| SMRT | Mediador silenciador para los receptores retinoide y tiroide |
| Sp1 | Proteína de especificidad 1 |
| SRB | Supresor de la RNA polimerasa |
| SRC | Co-activador del receptor de esteroides |
| TAF | Factores asociados a TBP |
| TBP | Proteína de unión a TATA |
| TFII | Factores de transcripción II |
| TFN | Transferrina |
| TGF β | Factor de crecimiento transformante beta |
| TRAP | Proteína asociada al receptor tiroide |
| TTR | Transtirretina |
| TWEEN 20 | Polisorbato 20 |
| UCP2 | Proteína desacoplante mitocondrial 2 |
| V | Volts |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |
| VP-16 | Proteína viral 16 |
| WT | Tipo silvestre |

Abreviaturas de los aminoácidos.

En el presente trabajo se utilizó como abreviatura de los aminoácidos los símbolos de una letra asignados por la IUPAC.

| Abreviatura Símbolo de una letra | Aminoácido |
|---|-----------------------------|
| A | Alanina |
| C | Cisteína |
| D | Ácido aspártico o aspartato |
| E | Ácido glutámico o glutamato |
| F | Fenilalanina |
| G | Glicina |
| H | Histidina |
| I | Isoleucina |
| K | Lisina |
| L | Leucina |
| M | Metionina |
| N | Asparagina |
| P | Prolina |
| Q | Glutamina |
| R | Arginina |
| S | Serina |
| T | Treonina |
| V | Valina |
| W | Triptófano |
| Y | Tirosina |

Nomenclatura utilizada para designar a las mutantes de HNF4 α .

En el presente trabajo se utilizó el sistema de nomenclatura para mutaciones basada en aminoácidos definida por "The Nomenclature Working Group":

- Se utilizan los símbolos de una letra para designar a los aminoácidos.
- Para indicar el cambio de un aminoácido por otro, el formato es: D126H (aspartato en el codón 126 sustituido por histidina). El aminoácido tipo silvestre es indicado antes y el aminoácido mutante después del número de codón.
- Los codones de paro son designados por una X. Por ejemplo, R154X (arginina codón 154 sustituida por un codón de terminación).
- Las deleciones de aminoácidos se designan como el siguiente ejemplo: K99fsdelAA, que indica que en el codón 99 para lisina ocurre una deleción en el marco de lectura (fs, "frame shift") de dos nucleótidos de adenina.
- Las inserciones de aminoácidos son designadas como: V328-329ins, donde se denota que un codón para valina está insertado en el intervalo entre los codones 328 y 329 de la secuencia de referencia de la proteína.

1. RESÚMEN

Las mutaciones en el factor nuclear de hepatocitos 4a (HNF4 α) son causa de la diabetes juvenil tipo adulto 1 o MODY1 (de las siglas en inglés de Maturity Onset Diabetes of the Young 1), una forma monogénica de la diabetes caracterizada por una aparición temprana y un patrón de herencia autosómico dominante. Los pacientes MODY1 se caracterizan por presentar defectos primarios tanto en el páncreas como en el hígado. En un estudio realizado por Aguilar-Salinas y colaboradores (2001), se identificaron dos pacientes mexicanos con diabetes de aparición temprana portadores de mutaciones en el gen *HNF4 α* . Un paciente era portador de la mutación R154Q, mientras el otro paciente presentaba las mutaciones D126H y D126Y. Ambos pacientes tenían defectos en la secreción de insulina y presentaban niveles séricos de triglicéridos bajos (fenotipo asociado al defecto hepático en los pacientes MODY1). Los cambios encontrados afectan residuos conservados en los dominios de unión al DNA y de *trans*-activación. Con el fin de investigar las propiedades de estas mutantes en tejidos hepáticos y pancreáticos, en el presente trabajo se analizó sus potenciales de *trans*-activación en ensayos de transfección transiente usando un gen reportero dependiente de HNF4 α en la línea celular β pancreática RINm5F y la línea celular hepática HepG2. Adicionalmente se ensayó la actividad transcripcional de estas mutantes en la línea celular renal de mono COS-7. Los resultados mostraron que la actividad transcripcional de las mutantes de HNF4 α D126H y D126Y estaba afectada en las células β pancreáticas y hepáticas. Sin embargo, la combinación de estas mutantes presentó defectos sólo en las células hepáticas. La mutante R154Q presentó una actividad reducida únicamente en las células hepáticas. No se observaron defectos importantes en la *trans*-activación de las tres mutantes al usarse las células COS-7. Estos resultados llevaron a concluir que D126H, D126Y y R154Q son mutantes de HNF4 α con pérdida de función en hepatocitos. Estos resultados pueden asociarse a los defectos hepáticos observados en los pacientes portadores de las mutaciones. En cambio, los resultados en las células β pancreáticas son más difíciles de correlacionar a lo observado en los pacientes diabéticos, ya que ni la combinación de D126H y D126Y ni R154Q muestran defectos en la *trans*-activación. Las diferencias en el potencial de *trans*-activación de estas mutantes en las diferentes líneas celulares pueden deberse a la presencia de co-factores de la actividad de HNF4 α tejido específicos.

2. ABSTRACT

Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) are the cause of maturity-onset diabetes of the young 1 (MODY1), a monogenic form of diabetes characterized by an early age of onset and autosomal dominant inheritance. MODY1 patients display primary defects in pancreas and liver function. In a study carried out by Aguilar-Salinas and colleagues (2001), two Mexican patients with early-onset diabetes carrying mutations in HNF4 α gene were identified. One of them carried the R154Q mutation, while the other patient carried both the D126H and D126Y mutations. Both patients displayed an insulin secretory defect and had low triglyceride levels (a phenotype associated to hepatic defect in MODY1 patients). The identified mutations affect conserved amino acid residues in HNF4 α DNA binding and transactivation domains. In the present study, to investigate the properties of these mutants in liver and pancreatic tissues, their transactivation potentials were analyzed in transient transfection assays using a HNF4 α dependent reporter gene in β pancreatic cell line RINm5F and in the hepatic cell line HepG2. Also, the transactivation activity of these mutants was tested in the monkey kidney cell line COS-7. The results showed that the activity of the HNF4 α D126H and D126Y mutants was impaired in both β pancreatic and hepatic cells. However, the combination of these mutants resulted in transactivation impairment only in hepatic cells. R154Q mutant displayed a reduced transactivation activity only in hepatic cells. No transactivation defects were observed for the three mutants when using COS-7 cells. These findings suggest that D126H, D126Y and R154Q are HNF4 α mutants with loss-of-function in hepatic cells. These results can be associated with the liver defects observed in the patients carrying these mutations. The results in the pancreatic β cell line are more difficult to translate to what it is found in the diabetic patients, since neither the combination of D126H and D126Y or the expression of the R154Q mutant itself showed transactivation impairment in these cells. Differences in the transactivation potential of these mutants in different cell lines, might be due to the presence of tissue-specific co-factors of the HNF4 α activity.

3. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles altos de glucosa en la sangre (The Expert Committee on Diagnosis and Classification on Diabetes Mellitus, 2001). La identificación de algunas formas monogénicas de la diabetes mellitus, como la condición llamada diabetes juvenil tipo adulto o diabetes tipo MODY (de las siglas en inglés de Maturity Onset Diabetes of the Young), han demostrado la importancia de los factores genéticos en el desarrollo de esta enfermedad. La diabetes tipo MODY se caracteriza por un patrón de herencia autosómico dominante, un establecimiento temprano, y un defecto primario en células β pancreáticas. A la fecha, se han identificado seis distintos genes como causales de la diabetes tipo MODY (Velho y Froguel, 1998). Uno de estos genes corresponde al gen *HNF4 α* , que codifica para el factor nuclear de hepatocitos 4 α . Desde que se descubrió que una mutación en este gen co-segregaba con la diabetes de aparición temprana en una familia caucásica norteamericana (Yamagata *et al.*, 1996a), varios grupos de investigación se han dado a la tarea de identificar y caracterizar mutaciones en *HNF4 α* en pacientes diabéticos de distintas poblaciones. En México, se han identificado tres mutaciones en *HNF4 α* en pacientes con diabetes de aparición temprana (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001). Este trabajo de tesis presenta un estudio funcional de estas tres mutaciones. Estos estudios son necesarios para entender la implicación de estas mutaciones en el desarrollo de la diabetes tipo MODY.

3.1 Generalidades del factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF4 α)

El factor nuclear de hepatocito 4 α (HNF4 α) o receptor nuclear 2A1 (NR2A1) es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas (Sladek *et al.*, 1990).

HNF4 α fue inicialmente identificado como una proteína de 54 kDa enriquecida en los extractos nucleares de hígado de rata que se unía a elementos de respuesta requeridos para la transcripción de varios genes específicos del hígado. Después de purificarse y determinarse la secuencia de aminoácidos de la proteína HNF4 α , se pudo establecer que presentaba una estructura modular común a la de los receptores nucleares de hormonas (Sladek *et al.*, 1990).

La estructura de HNF4 α consiste de seis dominios funcionales denominados de la letra A a la F. Los dominios A y B localizados en el extremo amino terminal de la proteína contienen el módulo de *trans*-activación autónomo constitutivo (independiente de la unión a ligando) AF-1. El dominio de unión al DNA, corresponde a los 66 residuos del dominio C que conforman los dos módulos de dedos de zinc, y una extensión carboxilo terminal de 9 residuos situada en la región amino terminal del dominio D que contiene las cajas T y A. El dominio D corresponde a una bisagra estructural flexible entre los dominios de unión al DNA y de unión a ligando. El dominio multifuncional E contiene el dominio de unión a ligando, la interfase de dimerización, el módulo AF-2 con actividad de *trans*-activación dependiente de ligando que comparte con el dominio D, y regiones que interactúan con otras proteínas co-activadoras de la transcripción. Finalmente, en el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio F que contiene una secuencia represora de la *trans*-activación de AF-2 (Figura 1) (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997; Iyemere *et al.*, 1998).

HNF4 α también ha sido identificado en *Drosophila* (Zhong *et al.*, 1993), en humano (Chartier *et al.*, 1994, Drewes *et al.*, 1996), en ratón (Hata *et al.*, 1995) y en *Xenopus* (Holewa *et al.*, 1996). La comparación de sus secuencias indican una alta conservación de HNF4 α entre las distintas especies. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de las proteínas humana y de rata tienen una similitud del 96% (Chartier *et al.*, 1994).

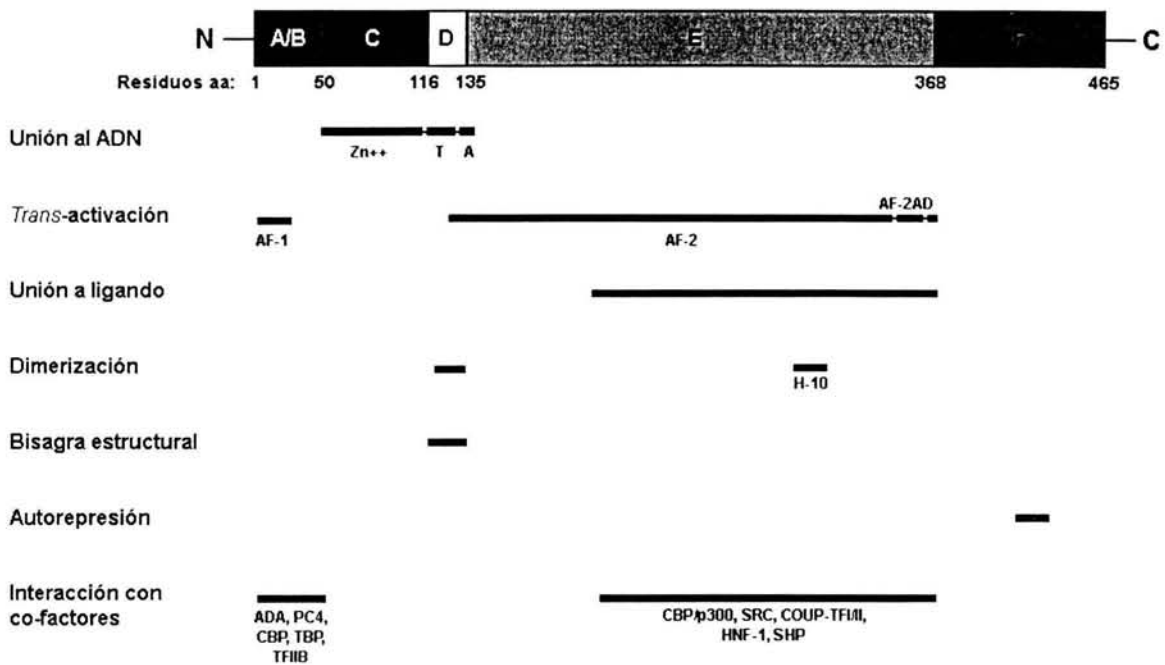


Figura 1. Esquema de la proteína HNF4 α 2 (465 aa o residuos de aminoácidos) indicando sus dominios funcionales (A-F). Abajo se indican las regiones de la proteína involucradas en la unión al DNA (Zn⁺⁺, dedos de zinc; T, caja T; y A, caja A), en la *trans*-activación (AF-1 y AF-2), en la unión al ligando, en la dimerización (H-10, hélice 10), en la interacción con co-factores (indicándose algunos ejemplos), la región de bisagra estructural, y la región del dominio F represor.

En el mamífero adulto, HNF4 α se expresa específicamente en hígado, riñón, intestino y páncreas (Zhong *et al.*, 1994), y en los invertebrados en estructuras homólogas (Zhong *et al.*, 1993). También, se ha demostrado que HNF4 α está presente en el desarrollo embrionario de varios organismos. Por ejemplo, en el ratón, durante la embriogénesis este factor aparece en el endodermo primario al día 4.5 de gestación, y después, al día 8.5 de gestación en el divertículo del hígado, en el estómago y en tejido nefrogénico (Nakehi *et al.*, 1998). Así mismo, en *Xenopus* y en *Drosophila*, HNF4 α se expresa muy tempranamente como un componente materno del cigoto, desaparece después de la celularización, y vuelve a aparecer en el cigoto, para estar presente durante todo el proceso de la embriogénesis (Holewa *et al.*, 1996; Holewa *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1993).

3.2 El gen HNF4 α humano

El gen que codifica para el HNF4 α humano se localiza en el cromosoma 20, banda q12.9-13.2. Consiste de 13 exones (varios corresponden a exones alternativos) y su organización genómica abarca más de 70 kb (Figura 2.A). La regulación de la expresión del gen es dirigida por dos promotores, uno próximo al gen (P1), y otro localizado a 45.5 kb “río arriba” del promotor P1 (promotor P2) (Figura 2.A) (Thomas *et al.*, 2001). En el promotor P1 se han identificado elementos de respuesta para HNF1 α , HNF6, HNF1 β , GATA-6, Sp1, y COUP-TFII. En las células HepG2 se ha demostrado que la transcripción basal del gen *HNF4 α* está regulado por la acción combinada de estos factores (Hatzis y Talianidis, 2001). Bajo el control del promotor P1 se generan seis distintas isoformas (HNF4 α 1 a HNF4 α 6) debidas al procesamiento de “splicing” alternativo en los extremos amino y carboxilo terminales del gen (Sladek *et al.*, 1990; Hata *et al.*, 1992, 1995; Chartier *et al.*, 1994; Drewes *et al.*, 1996; Kritis *et al.*, 1996; Furuta *et al.*, 1997). La isoforma HNF4 α 7 es producto del promotor P2. Los factores de transcripción HNF1 α , HNF1 β , e IPF1 son los principales reguladores de este segundo promotor (Nakhei *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001). Todas las variantes tienen en común el dominio de unión al DNA (Viollet *et al.*, 1997; Nakhei *et al.*, 1998). HNF4 α 1 y HNF4 α 2 han sido las isoformas mejor caracterizadas, especialmente HNF4 α 2, que es la isoforma predominante en los tejidos adultos humanos del hígado, riñón, intestino y páncreas (Furuta *et al.*, 1997). El papel de las demás isoformas apenas comienza a entenderse, al parecer tienen funciones y distribución tisular distintas. En la figura 2.B se muestran las estructuras peptídicas de las 7 isoformas de HNF4 α .

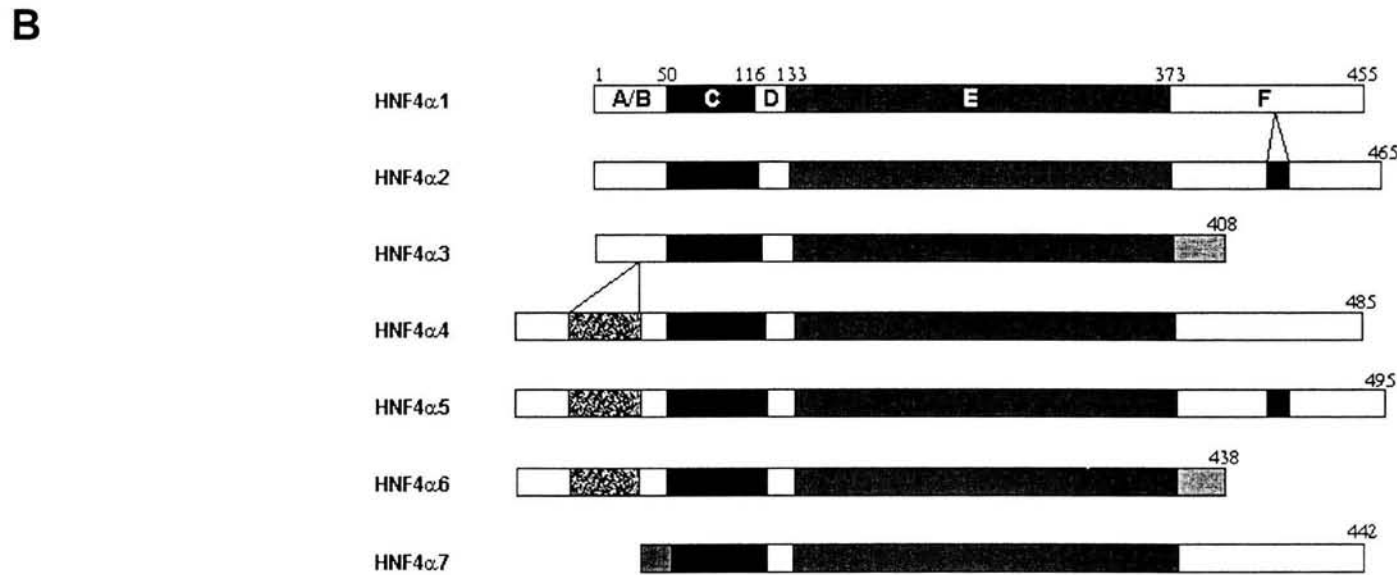
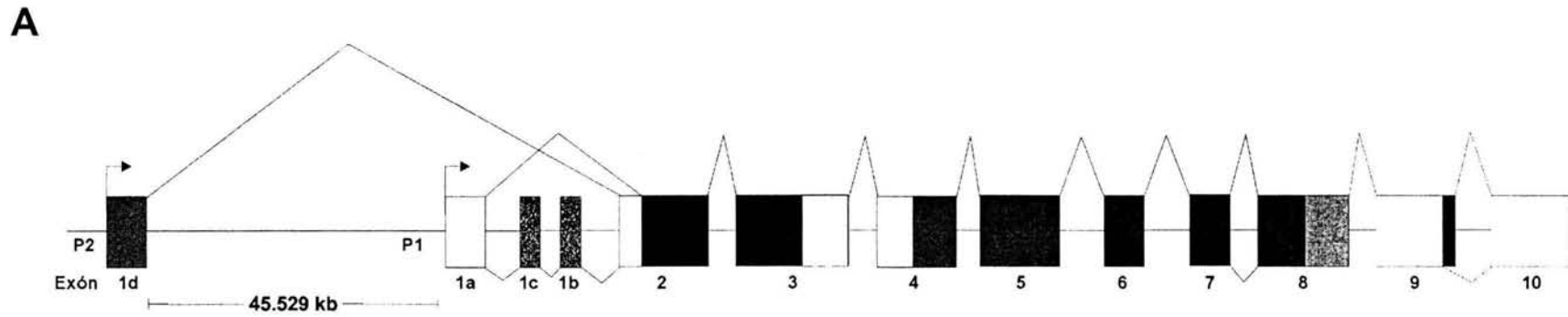


Figura 2. A) Representación esquemática de la estructura exón-intrón del gen *HNF4 α* humano. Los exónes 1a-d son las formas alternativas del exón 1. Se indican los sitios de "splicing". P1 y P2 corresponden a los promotores 1 y 2 del gen *HNF4 α* . B) Las siete isoformas de *HNF4 α* originadas por "splicing" alternativo. *HNF4 α 1* representa la isoforma inicialmente identificada. *HNF4 α 2* es una variante que contiene una inserción de 10 aminoácidos en el dominio F como producto de un exón 9 más largo. *HNF4 α 3* se caracteriza por un carboxilo terminal diferente y más corto. *HNF4 α 4* contienen una región amino terminal con aminoácidos producto de los exones 1b y 1c. *HNF4 α 5* contiene aminoácidos de los exones 1b y 1c y del exón 9 largo identificado en *HNF4 α 2*. *HNF4 α 6* contiene en su región amino terminal aminoácidos de los exones 1b con 1c, y la región carboxilo terminal truncada de *HNF4 α 3*. *HNF4 α 7* resulta del "splicing" del exón 1d al exón 2 regulado por el promotor P2. Figuras modificadas de Thomas *et al.* (2001) y Furuta *et al.* (1997).

3.3 Función de HNF4 α

HNF4 α es un activador transcripcional que funciona mediante su unión a elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco.

3.3.1 Genes blanco de HNF4 α

Se han identificado más de 55 distintos genes blanco potenciales con una secuencia consenso para HNF4 α , siendo el hígado el tejido en donde se expresan la mayoría de ellos (Sladek y Seidel, 2001). Muchos son genes involucrados en el metabolismo de nutrientes, (lípidos y esteroides, glucosa, aminoácidos, xenobióticos), algunos codifican para proteínas involucradas en el transporte de lípidos, del retinol y de proteínas séricas, y otras en la diferenciación del hígado, para la función inmune, y algunos factores de transcripción. Sin embargo, se ha demostrado que otros factores como HNF4 β , HNF4 γ , COUP-TF, RXR y PPAR pueden interactuar con los elementos de respuesta para HNF4 α , por lo que la activación de estos genes puede no ser exclusiva de HNF4 α (Sladek y Seidel, 2001). Mediante experimentos como la delección condicional tejido específica del gen *HNF4 α* en ratones, o la regulación positiva o negativa de la expresión de *HNF4 α* en líneas celulares mediante la manipulación génica, ha podido determinarse la función de HNF4 α y la identidad de varios genes controlados directamente por este factor de transcripción en algunos tejidos (Tabla 1). En estos estudios, se ha encontrado que HNF4 α es un factor de transcripción importante en la expresión génica requerida para la función del endodermo visceral durante el desarrollo embrionario, y en el metabolismo de los hepatocitos y de las células β pancreáticas durante su diferenciación y en su estado diferenciado (Duncan *et al.*, 1997; Hayhurst *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000b).

| Endodermo visceral | Hígado fetal | Hígado adulto | Células β pancreáticas diferenciadas |
|--|---|---|--|
| AFP Aldo B Apo AI Apo AIV Apo B Glut 2 HNF1 α L-FABP L-PK PXR RBP TFN TTR | Aldo B Apo AI Apo B Apo CII Apo CIII CYP3A L-FABP RBP TFN | Apo AIV Apo B Apo CII Apo CIII CYP3A HNF1 α L-FABP MTP PXR | Aldo B E1-OGDH Glut2 HNF1 α INS L-PK UCP2 |

Tabla 1. Producto de los genes regulados por HNF4 α en el endodermo visceral, en el hígado fetal y adulto, y en células β pancreáticas INS-1. AFP: α -fetoproteína; Aldo B: Aldolasa B; Apo: Apolipoproteína; CYP3A: citocromo P450 subfamilia 3A; E1-OGDH: Subunidad E1 de la 2 oxoglutarato deshidrogenasa; Glut 2: transportador de glucosa 2; HNF1 α : factor nuclear de hepatocitos 1 α ; INS: insulina; L-FABP: proteína transportadora de ácidos grasos hepática; L-PK: piruvato cinasa hepática; MTP: proteína microsomal transportadora de triglicéridos; PXR: receptor pregnano X; RBP: proteína de unión al retinol; TFN: transferrina; TTR: transtirretina; UCP2: proteína desacoplante mitocondrial 2.

3.3.2 HNF4 α en el desarrollo embrionario temprano

Durante los días de gestación 4.5 al 8.5 del desarrollo embrionario temprano murino, la expresión de *HNF4 α* se limita al endodermo visceral. El endodermo visceral junto con el ectodermo corresponden a las dos capas, externa e interna respectivamente, por las cuales está constituido el embrión murino antes de la gastrulación (diferenciación y migración del ectodermo para producir tres capas germinales ectodermo, endodermo embrionario y mesodermo, de las cuales se deriva el feto). La importancia del endodermo visceral en la gastrulación fue conocida por el estudio de los embriones de ratón *HNF4 α -/-*. Estos embriones no tienen una gastrulación normal y mueren a los nueve días de gestación, sin embargo, pueden ser rescatados con la complementación específica de endodermo visceral *HNF4 α +/+* tetraploide (Li *et al.*, 2000). Un estudio con cuerpos embrioides conteniendo endodermo visceral *HNF4 α -/-*, demostró la identidad de varios genes directamente regulados por HNF4 α en este tejido

(Tabla 1) (Shih *et al.*, 2000). Al parecer, el papel de HNF4 α en el endodermo visceral es el de un principal regulador de la expresión de varios factores secretados por este tejido (alfafetoproteína, apolipoproteínas, transtirretina, proteína de unión al retinol y transferrina), importantes para generar el ambiente requerido en el proceso de la gastrulación (Duncan *et al.*, 1997).

3.3.3 Función de HNF4 α en el tejido hepático

Los embriones de ratón *HNF4 α* ^{-/-} rescatados con endodermo visceral tipo silvestre sobreviven hasta el 12^o día de gestación. En este estado del desarrollo, los pre-hepatocitos han iniciado la diferenciación, pero aún no adoptan la morfología ni la función de los hepatocitos maduros. Empleando el tejido hepático de estos ratones, se estudió el papel de HNF4 α en los estados tempranos de la diferenciación hepática. En este estudio, se observó que a pesar de no encontrarse defectos morfológicos en los hígados y en los hepatoblastos (precursores de los hepatocitos adultos) de los ratones *HNF4 α* ^{-/-}, se encontraba suprimida la expresión de varios genes cuyos productos son esenciales para la función del hígado maduro (Tabla 1). Estos genes corresponden a proteínas séricas y a proteínas involucradas en el transporte, glicólisis, y metabolismo de lípidos. También se encuentran los genes que codifican para los factores de transcripción HNF1 α y PXR, importantes en la fisiología y función del hepatocito. Por ejemplo, PXR es requerido para la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos como los citocromos P450 (Li *et al.*, 2000). En otro estudio, intentando explorar el papel de HNF4 α en estados más tardíos de la hepatogénesis, esto es, en la generación del epitelio hepático polarizado, Spath y Weiss (1998) encontraron que la expresión forzada de *HNF4 α* en células hepáticas des-diferenciadas inducía la expresión de genes de citoqueratinas y caderina E, permitiendo así a las células formar epitelio hepático en cultivo. De estos dos estudios, se concluyó que en el desarrollo hepático, HNF4 α es requerido para la diferenciación completa del fenotipo hepático, y para el establecimiento de la polaridad celular dentro del parénquima hepático.

Para determinar la función de HNF4 α en el hepatocito maduro, Hayhurst y colaboradores (2000) emplearon el sistema Cre-loxP para generar ratones con hepatocitos HNF4 α -/-. Se observó que la homeostasis de lípidos en estos ratones se encontraba afectada: se observó un aumento en los niveles intracelulares de lípidos en los hepatocitos, una disminución importante en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos, y un incremento en los niveles séricos de ácido biliar. Consistente con estos fenotipos, se encontró afectada la expresión de varios genes hepáticos que codifican productos con actividades específicas en los procesos de transporte y metabolismo de lípidos (Tabla 1). Por ejemplo, la acumulación de lípidos en los hepatocitos puede deberse a defectos en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), ya que los niveles de expresión de los genes *ApoB* y *MTP*, cuyos productos son proteínas esenciales en la exportación de VLDL en el hígado, se encontraban importantemente reducidos.

3.3.4 HNF4 α en las células β pancreáticas

Lamentablemente no existen estudios semejante a los realizados en el hígado para otros tejidos que expresan HNF4 α . Sin embargo, la ausencia de la función de HNF4 α se ha analizado en el páncreas utilizando como modelo experimental líneas celulares de células β pancreáticas. En un estudio con células INS-1 (línea celular de insulinoma de rata) se expresaron condicionalmente proteínas HNF4 α dominante negativas que suprimen la actividad del factor endógeno, en los resultados se vio afectada la expresión varios genes importantes en el metabolismo de las células β pancreáticas (Tabla 1). Como posible efecto de la disminución en la expresión estos genes, se observó un metabolismo mitocondrial afectado, lo cual condujo a una secreción de insulina defectuosa. También se encontró una disminución en la actividad del ciclo de Krebs, y un defecto en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Wang *et al.*, 2000b).

También, el papel de HNF4 α en el desarrollo del páncreas se ha podido analizar mediante el estudio de la expresión génica del tejido pancreático de ratones HNF1 α *-/-*. Estos ratones, a diferencia de los ratones HNF4 α *-/-*, sí sobreviven al desarrollo. HNF4 α es expresado en la en fase tardía del desarrollo de las células β pancreáticas (día 13.5 de gestación) junto a HNF1 α y HNF3 γ . Estos forman una red transcripcional requerida para iniciar y mantener el patrón de expresión en la diferenciación final de las células β pancreáticas. En la diferenciación final, los islotes desarrollan la capacidad de sensor la glucosa y de responder a los estímulos de glucosa con una apropiada secreción de insulina, para lo cual se requiere de la expresión de los genes que codifican para el transportador de glucosa 2, la glucocinasa, la piruvato cinasa hepática y la insulina (Shih y Stoffel, 2001).

3.4 Eventos moleculares en la función biológica de HNF4 α

3.4.1 Localización celular

La localización de HNF4 α en la célula es el núcleo. Se ha demostrado que la proteína CBP puede acetilar a HNF4 α en sus residuos de lisina dentro de la secuencia de localización nuclear. Esta acetilación es crítica para la retención nuclear de HNF4 α (Soutoglou *et al.*, 2000). También, se sabe que HNF4 α se concentra en diversos compartimentos nucleares. Para esta localización subnuclear, cuya especificidad parece ser importante en la actividad de HNF4 α , es necesaria la fosforilación de sus residuos de tirosina (Ktistaki *et al.*, 1995).

3.4.2 Homodimerización

HNF4 α existe como homodímero estable en solución. A pesar de tener una secuencia con una similitud elevada a la de RXR α , HNF4 α no heterodimeriza con ningún otro receptor nuclear (Jiang *et al.*, 1995). En el dominio E se identificaron un par de residuos cargados en las hélices 9 y 10 altamente conservados en los genes HNF4 α , que son críticos para la homodimerización en solución y tienen un papel en la prevención de heterodimerización con otros receptores (Jiang y Sladek, 1997; Bogan *et al.*, 2000). En un estudio cristalográfico reciente se muestra que la interfase de dimerización es dominada por la interacción "coiled coil" entre las hélices α 10 de cada molécula, mediante interacciones hidrofóbicas de aminoácidos entre ambas cadenas a lo largo de su longitud, y que su estabilidad requiere de los puentes de hidrógeno y puentes salinos intermoleculares (Dhe-Paganon *et al.*, 2002).

3.4.3. Unión al DNA

HNF4 α se une a los elementos de respuesta de la región promotora de sus genes blanco como homodímero (Sladek y Seidel, 2001).

Los sitios de unión para HNF4 α son repeticiones directas de la secuencia AGGTCA con uno o dos nucleótidos espaciadores (DR1 o DR2). La secuencia consenso para el reconocimiento de HNF4 α es: GGGTCA A AGGTCA (Sladek y Seidel, 2001).

Dos monómeros del dominio de unión al DNA de HNF4 α forman un ensamble polar cabeza-cola, en donde el extremo amino de uno contacta la región carboxilo del otro. La unión cooperativa y específica del homodímero de HNF4 α a estos repetidos directos depende del dominio de unión al DNA de cada monómero. El dominio de unión al DNA esencial o central, que está conformado

por los dos módulos de dedos zinc (Figura 3), es el elemento estructural de HNF4 α que hace el contacto directo con el elemento de respuesta. En cambio, la extensión carboxilo terminal (secuencias localizadas inmediatamente después del segundo dedo zinc, y que incluye a las cajas T y A) provee un contacto adicional y no específico con el DNA que estabiliza el complejo DNA-proteína, y también forma parte estructural de la interfase de dimerización entre los monómeros (Figura 3). Específicamente se ha encontrado que la región correspondiente a los residuos de aminoácidos 126-142 que incluyen la caja A del dominio D de HNF4 α es importante para la homodimerización cooperativa requerida para la unión específica al DNA. En estos mismos estudios, se demostró que la estabilidad del complejo DNA-proteína es dependiente de la presencia del dominio E, ya que se determinó que el dominio de unión al DNA por sí solo no es suficiente (Jiang y Sladek, 1997).

La actividad de unión al DNA de HNF4 α es regulada post-traduccionalmente a través de la fosforilación. Ktistaki y colaboradores (1995) demostraron que la fosforilación de los residuos de tirosina de HNF4 α era importante para su actividad de unión al DNA. En otro estudio, se identificó una secuencia consenso que es fosforilada por la proteína cinasa A (PKA) dentro de la caja A del dominio de unión al DNA (Figura 3). Se observó que la fosforilación de los residuos de serina en este sitio reducía la afinidad de unión al DNA de HNF4 α (Viollet *et al.*, 1997).

También, la acetilación vía CBP ha resultado amplificadora de la actividad de unión al DNA, y por lo tanto, requerida para la activación transcripcional de HNF4 α (Soutoglou *et al.*, 2000).

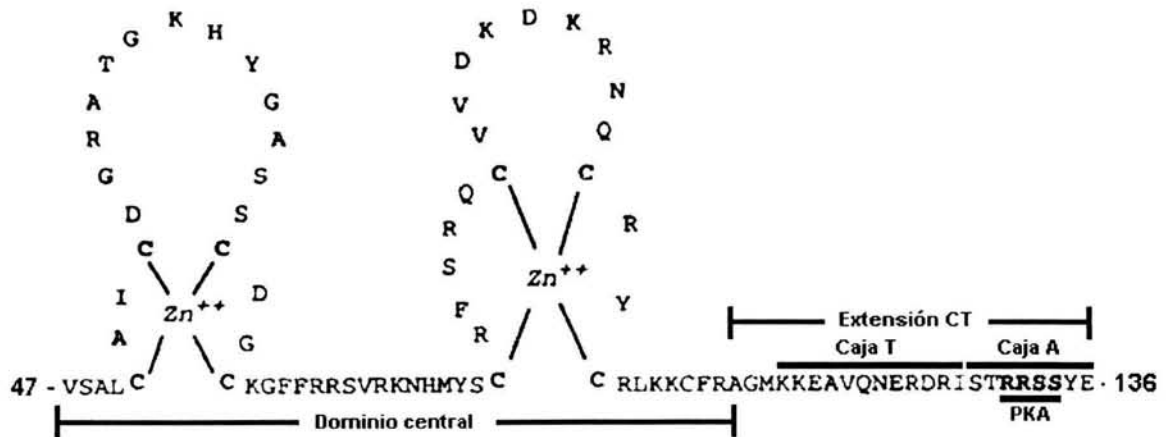


Figura 3. Dominio de unión al DNA de HNF4 α . La secuencia de aminoácidos corresponde a la de la proteína HNF4 α humana. Se muestra el dominio de unión al DNA central, constituido por los dos módulos de dedos de zinc, y la extensión carboxilo terminal (extensión CT) que contiene las cajas T y A. También, se indica el motivo que es reconocido y fosforilado por la proteína cinasa A (PKA).

3.4.4. Actividad transcripcional de HNF4 α

La actividad transcripcional de HNF4 α es mediada por dos módulos de *trans*-activación: AF-1 y AF-2 (Figura 1).

3.4.4.1 La activación transcripcional mediada por AF-2

Como en la mayoría de los miembros de la familia de receptores nucleares, la activación transcripcional de AF-2 de HNF4 α es dependiente de la unión de un ligando. En general, en los receptores nucleares se ha observado que en ausencia de un ligando agonista, la represión es efectuada en parte por la asociación del receptor con co-represores como SMRT. En cambio, la presencia de un ligando agonista resulta en cambios conformacionales en dominios específicos del receptor, que conducen al desplazamiento de los co-represores y al reclutamiento de co-activadores para la *trans*-activación. Algunos de estos co-activadores (por ejemplo, p300, CBP, PCAF y los miembros de la familia p160 como SRC-1, GRIP1) acetilan las histonas de los nucleosomas, lo cual conduce a que la

cromatina asuma una conformación más relajada, facilitando así, el ensamblaje de la maquinaria de transcripción basal. También, entre los co-activadores asociados, se encuentran proteínas co-integradoras que contactan y reclutan el aparato de la transcripción basal (factores de transcripción basal y la RNA polimerasa II) al promotor, activando la transcripción. Entre estos co-activadores se encuentran PC2, TRAP, y SMCC, que son componentes activadores de la holoenzima RNA polimerasa II (Malik *et al.*, 2002).

3.4.4.2. El dominio de *trans*-activación AF-2 de HNF4 α

El dominio AF-2 (128-366 aa) es el dominio de *trans*-activación principal de HNF4 α . Dentro de AF-2 se localizan varias regiones importantes para su actividad transcripcional como el dominio de unión a ligando y varios sitios de contacto con co-factores (Figura 1). En la región carboxilo terminal de AF-2 (360-366 aa) reside una región altamente conservada entre los receptores nucleares activos que consiste de los aminoácidos $\phi\phi X E \phi\phi$ (donde ϕ es un residuo hidrofóbico, y X un aminoácido no conservado) denominada AF-2AD (Figura 1). Esta región ha sido señalada como esencial para la actividad AF-2, ya que se ha demostrado su interacción directa con varios co-reguladores que conectan a HNF4 α con la maquinaria de transcripción basal (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997).

3.4.4.3. Unión a ligando

El dominio de unión a ligando de HNF4 α está localizado entre los residuos de aminoácidos 174-370 (Figura 1) (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997). Su estructura cristalográfica tridimensional mostró que contiene 10 hélices α y dos hebras β ("strands") que adoptan el motivo sandwich helical común a los dominios de unión a ligando de los receptores nucleares (Wisely *et al.*, 2002; Dhe-Paganon *et al.*, 2002). También se ha reportado que los residuos importantes en la

interacción con el ligando son: I175, V178, C179 y M182 de la hélice α 3; L219, L220 y A223 de la hélice α 5; L234 y L236 de la hebra β 1; V242 de la hebra β 2; L249 del "loop" 2/7; M252, V255, S256 y I259 de la hélice α 7; y M342, Q345, I346 y I349 de la hélice α 10 (Dhe-Paganon *et al.*, 2002).

Como se ha visto para otros receptores nucleares, es probable que la activación de HNF4 α por la unión de su ligando sea mediada por el plegamiento de la hélice α 12 sobre el bolsillo de unión en el que se encuentra unido un ácido graso, ya que esta maniobra, junta los elementos de AF-2 para generar una superficie de interacción que es reconocida por co-activadores.

Hasta hace poco tiempo, no se conocía un ligando definido para HNF4 α . Se había reportado que los ácidos grasos de cadena larga exógenos podían modular la actividad transcripcional de HNF4 α mediante la unión de sus acil-CoA tioésteres al dominio de unión a ligando: los ácidos grasos de 14 a 16 carbonos actúan como agonistas, mientras los ácidos grasos polinsaturados Omega-3 de cadena larga (C20:5, C22:6) tienen un efecto antagonista. Al parecer, el efecto de estos ligandos se da en la afinidad de HNF4 α a sus elementos de respuesta o en la capacidad de dimerización (Hertz *et al.*, 1998). Por otro lado, los datos obtenidos de los estudios tridimensionales del dominio de unión a ligando cristalizado de HNF4 α , revelaron que su bolsillo hidrofóbico de unión a ligando podía estar unido constitutivamente a una variedad de ácidos grasos libres saturados y monoinsaturados endógenos de 14 a 18 carbonos (Wisely *et al.*, 2002; Dhe-Paganon *et al.*, 2002). En un estudio reciente, se encontró que los acil-CoA servían como ligandos preferidos de HNF4 α , ya que la afinidad hacia estos era más alta al compararse con la de los ácidos grasos libres. Además, en este mismo estudio se pudo demostrar que los ligandos acil-CoA agonistas pueden modular la afinidad de HNF4 α para proteínas co-activadoras y co-represoras de la transcripción. Se requerirán de estudios futuros para determinar qué acil-CoA endógenos, co-activadores y co-represores se unen bajo condiciones celulares específicas, y también, para conocer la relevancia de HNF4 α como posible biosensor de ácidos grasos en las células de mamíferos (Hertz *et al.*, 2003).

3.4.4.4. Co-activadores que interactúan con el dominio AF-2

Se han identificado varios co-activadores que interactúan directamente con AF-2: 1) SRC1, SRC2 y SRC3, que son proteínas con una actividad intrínseca de acetilasa de histonas. Su unión a AF-2 facilita la interacción de HNF4 α con otros activadores incrementando su actividad transcripcional, por ejemplo: SRC1 sinergiza con p300 aumentando el potencial transcripcional de HNF4 α (Wang *et al.*, 1998b; Chen *et al.*, 1997). 2) CBP/p300 que interacciona en los extremos amino y carboxilo terminales de AF-2, y facilita la transcripción acetilando factores de transcripción TFIIE, TFIIIF e incluso HNF4 α (en sus residuos de lisina); se ha determinado que interactúa directamente con la maquinaria de transcripción basal (TBP, TFIIB, RNA helicasa), reclutándola hacia el promotor (Dell *et al.*, 1999; Soutoglou *et al.*, 2000; Ogryzko *et al.*, 1996). 3) COUP-TFI / COUP-TFII funciona como co-activador de HNF4 α para la regulación de ciertos genes (por ejemplo, HNF1 α), contactando regiones del dominio E (227-271 aa). Se cree que esta interacción orienta el dominio AF-2 a una configuración más eficiente para su actividad transcripcional (Ktistaki y Talianidis, 1997). 4) Mediador TRAP/SMCC, módulo regulador central del aparato de la transcripción. La subunidad TRAP220 de éste multicomplejo, interactúa físicamente con AF-2 de HNF4 α . Esta interacción permite el reclutamiento de varios factores de la maquinaria de la transcripción basal (Malik *et al.*, 2002).

3.4.4.5. Represión de la actividad transcripcional del dominio AF-2

a) Co-represores

Se ha reportado que regiones de AF-2, AF-1 y del dominio D de HNF4 α hacen contacto físico con un co-represor general de los receptores nucleares, SMRT. Esta interacción disminuye la capacidad transcripcional de HNF4 α (Ruse *et al.*, 2002).

También se han identificado co-represores específicos de HNF4 α que se asocian al dominio AF-2, como por ejemplo el receptor nuclear huérfano SHP (de las siglas en inglés: "Small Heterodimer Partner") y HNF1 α . SHP compite con co-activadores que se unen a AF-2, y una vez unido a AF-2, inhibe la actividad de HNF4 α mediante un dominio represor SHP (Lee *et al.*, 2000). HNF1 α reprime la actividad de HNF4 α vía la interacción directa de HNF-1 α con el AF-2 de HNF4 α (Ktistaki y Talianidis, 1997).

b) Represión de AF-2 por el dominio F de HNF4 α

El potencial de *trans*-activación total del dominio AF-2 de HNF4 α es inhibido por una región represora en las secuencias 428-441 dentro del dominio F (371-465 aa) (Figura 1) (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997; Iyemere *et al.*, 1998). Esta represión se da por el contacto físico directo entre el dominio F y el dominio de unión a ligando de HNF4 α . Al parecer, esta acción impide la interacción total con ciertos co-activadores (CBP, p300, SRC1, etc.) requeridos para la actividad transcripcional de AF-2 (Sladek *et al.*, 1999).

3.4.4.6. Dominio de *trans*-activación AF-1

AF-1 consiste de los 24 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal de HNF4 α (Figura 1). Este es un dominio de *trans*-activación autónomo constitutivo que pertenece a la clase de activadores ácidos. Su actividad de *trans*-activación corresponde al 40% de la actividad total de HNF4 α (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997). Aún se desconocen los mecanismos funcionales de éste activador *in vivo*. Se piensa que su actividad funcional podría ser similar a la de los activadores p53, NF- κ B-p65, y VP-16, ya que comparten motivos estructurales y blancos moleculares comunes. La actividad transcripcional de estos otros activadores depende de la interacción directa con co-activadores y factores de la maquinaria de transcripción basal como TFIIB. Consistente con este dato, se ha observado sinergia de AF-1 con TFIIB y otras proteínas que actúan durante la

transcripción (TBP, los factores asociados a TBP TAFII31 y TAFII80 y TFIID-p62), así como también con algunos co-activadores como CBP, ADA2, y PC4 (Green *et al.*, 1998).

3.4.4.7. Interacción de HNF4 α con el complejo de la maquinaria de transcripción basal

Malik y Karathanasis (1996) reportaron que HNF4 α activaba la transcripción por medio de dos vías, una independiente de AF-2 y otra dependiente de AF-2. Se indicó que en el primer caso, se daba el reclutamiento de TFIIB al complejo promotor mediante la interacción física de HNF4 α (probablemente mediante su extremo amino terminal) con TFIIB. Se observó que esta interacción facilitaba el ensamblaje del complejo de pre-iniciación intermediario que consiste de TBP, la proteína de unión a la caja TATA componente de TFIID y del mismo TFIIB. Posteriormente, Green y colaboradores (1998) demostraron la sinergia de AF-1 con TFIIB. Por lo tanto, es muy posible que esa vía de activación transcripcional sea mediada por AF-1. En el segundo caso, Malik y Karathanasis (1996) reportan que AF-2 facilita la entrada de la RNA polimerasa II (en asociación con TFIIF), TFIIE, y TFIID al complejo de pre-iniciación. Sin embargo, no hay interacción física directa con la maquinaria de transcripción basal (Malik y Karathanasis, 1996). Recientemente se ha demostrado la asociación del mediador TRAP/SMCC con AF-2 (Malik *et al.*, 2002). Es probable que la actividad de AF-2 dependa de complejos intermediarios como TRAP/SMCC para reclutar a la maquinaria de transcripción basal.

3.5 La diabetes tipo MODY1 causada por mutaciones en el gen *HNF4 α* humano

Las mutaciones en el gen *HNF4 α* humano están asociadas al desarrollo de una forma monogénica de la diabetes mellitus tipo 2 conocida como diabetes tipo MODY1 (Yamagata, et al, 1996a).

3.5.1 La diabetes mellitus

La diabetes mellitus corresponde a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia debido a defectos en la secreción y / o en la acción de la insulina (En la figura 4 se presenta un esquema con información general de la acción de la insulina). Mundialmente, es uno de los principales problemas de salud pública, y se ha estimado que más de 135 millones de personas en todo el mundo se encuentran afectadas por esta enfermedad (The Expert Committee on Diagnosis and Classification on Diabetes Mellitus, 2001).

La diabetes mellitus ha sido clasificada en dos tipos principales:

1) Diabetes mellitus tipo 1, que corresponde del 5 al 10% de los casos totales de la diabetes mellitus. Se debe a alteraciones predominantemente inmunológicas que implican la destrucción de las células β pancreáticas, ocasionando deficiencia absoluta de insulina. Su origen es multifactorial, sin embargo, se ha podido establecer que su principal contribuyente genético son los genes del antígeno de leucocitos humano o *HLA* (The Expert Committee on Diagnosis and Classification on Diabetes Mellitus, 2001).

2) Diabetes mellitus tipo 2, la forma más frecuente de diabetes mellitus (más del 90% de los casos totales), caracterizada por una hiperglicemia progresiva debida a la combinación de resistencia a la insulina con defectos en la secreción de esta hormona y un diagnóstico entre los 50 y 60 años de edad. Se ha

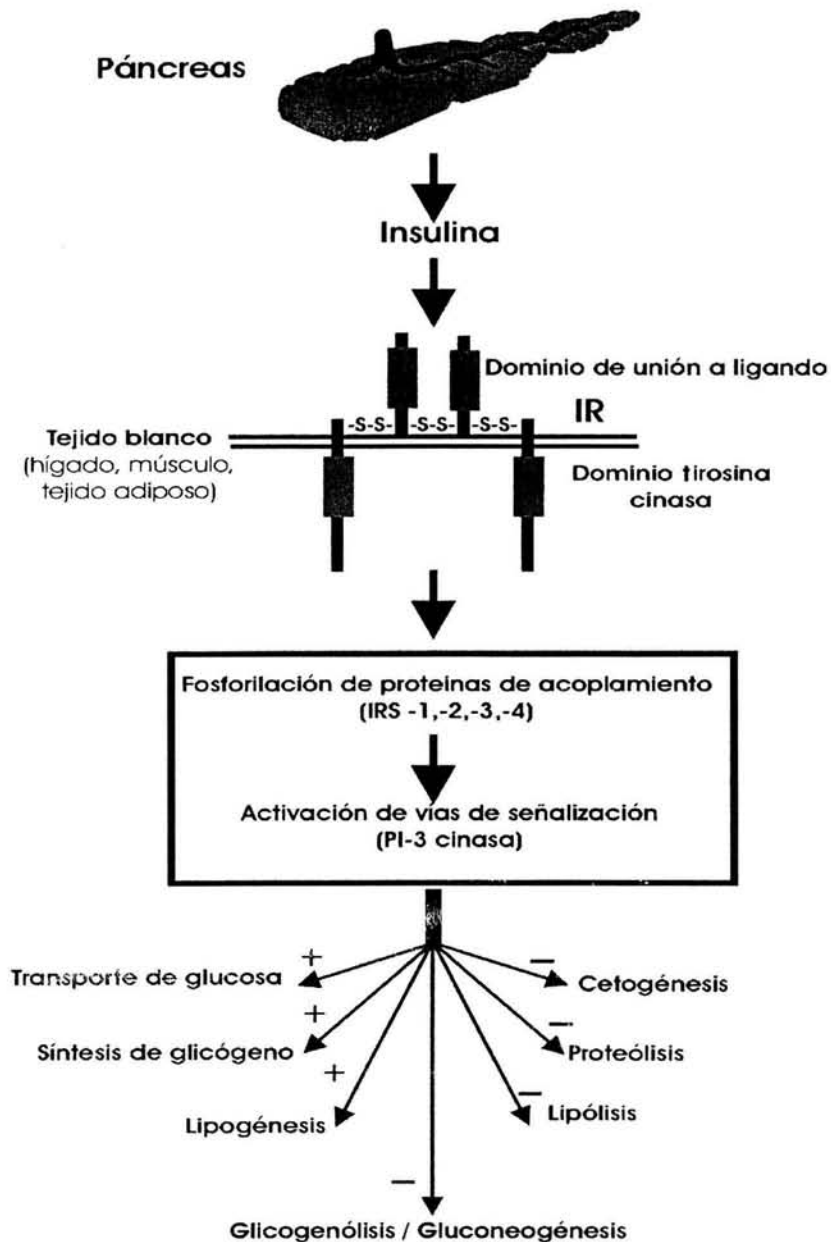


Figura 4. Acción de la insulina. La insulina, hormona secretada por las células β pancreáticas, es el principal controlador de la homeostasis de la glucosa mediante la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La insulina es secretada como respuesta a un aumento en la concentración de glucosa en la sangre (por ejemplo, después de ingerir un alimento). El receptor de insulina (IR), que es un receptor membranar con actividad de tirosina cinasa, está ampliamente distribuido en el cuerpo, sin embargo, los tres principales tejidos blanco son el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo. El IR activado fosforila proteínas acoplantes intracelulares como los sustratos de IR (IRS). Los IRS reclutan varias proteínas efectoras intracelulares activando vías de señalización como el de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3 cinasa), dando lugar así, a una variedad de efectos pleiotrópicos en los tejidos blanco de la insulina: la insulina activa el transporte de glucosa al músculo y al tejido adiposo, y promueve la síntesis de glucógeno y triglicéridos. La insulina inhibe la lipólisis en tejido adiposo, la cetogénesis en el hígado, y la proteólisis en músculo. También inhibe la producción hepática de glucosa inhibiendo la glicogenólisis y la gluconeogénesis.

sugerido que en la mayor parte de los pacientes diabéticos tipo 2, el mecanismo que inicia con el proceso fisiopatológico de la enfermedad es la resistencia a la insulina. En la resistencia a la insulina, los tejidos blanco de esta hormona tienen una disminución en la habilidad a responderle a su acción. Para compensar esta resistencia, el páncreas secreta más insulina, provocando una elevación en los niveles plasmáticos de insulina (hiperinsulinemia). Eventualmente las células β pancreáticas son incapaces de compensar la resistencia a través de la hipersecreción de insulina. Los niveles de glucosa aumentan, y se diagnostica la diabetes. En los pacientes con diabetes tipo 2 es muy común observar complicaciones macrovasculares (insuficiencia coronaria) y microvasculares (nefropatía, retinopatía y neuropatía) debidas a la hiperglicemia crónica. En este tipo de diabetes, coexiste la combinación de varios genes con factores no genéticos (estilo de vida y factores ambientales) contribuyendo a su desarrollo (The Expert Committee on Diagnosis and Classification on Diabetes Mellitus, 2001).

3.5.2 Factores genéticos en la diabetes mellitus tipo 2

Los estudios en gemelos idénticos y la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 en ciertas poblaciones (es más frecuente en asiáticos y en indios americanos) sugieren que existen factores genéticos en el desarrollo de esta enfermedad. Distinto a la diabetes mellitus tipo 1, cuyo componente genético ha podido relacionarse principalmente a los genes *HLA*, en el caso de la diabetes tipo 2, no existe una clara relación con estos genes. Entre el 5-10% de casos de diabetes tipo 2 son causadas por defectos en un solo gen, tales son los casos de la diabetes tipo MODY debido a mutaciones en uno de varios genes implicados en la regulación de la función de las células β pancreáticas, y la diabetes de herencia materna originada por defecto en un gen mitocondrial. El componente genético de la forma más común de diabetes tipo 2 es más compleja debido a que existe la interacción de múltiples genes. Mediante el análisis de genes candidatos se han identificado varios genes que regulan la secreción y la señalización de la insulina, sin embargo su contribución a la diabetes es mínima: por ejemplo, la frecuencia de

mutaciones en cada gen que codifica para la insulina, el receptor de la insulina, el sustrato del receptor de la insulina, los transportadores de glucosa 2 y 4, la fosfatidilinositol-3 cinasa, etc., corresponde a <1% en la población con diabetes tipo 2. Con los estudios de mapeo genómico, se ha podido identificar *loci* de susceptibilidad asociados a la diabetes mellitus tipo 2 en algunas poblaciones, por ejemplo *NIDDM1* y *NIDDM2* habían sido encontrados como los principales *loci* de susceptibilidad en poblaciones mexicano-americana y finlandesa respectivamente. Hace un par de años, analizando una región del *locus NIDDM1*, se encontró un polimorfismo en el intrón 3 del gen de la calpaína (una proteasa de cisteína no lisosomal) asociado a la diabetes tipo 2 en mexicano-americanos. Aun se desconocen los efectos funcionales de este polimorfismo en el desarrollo de la diabetes, sin embargo, su frecuencia es elevada entre los pacientes diabéticos. El mapeo genómico es un tipo de estrategia que ha comenzado a implementarse para la identificación de *loci* de susceptibilidad en diferentes poblaciones, lo cual permitirá la identificación de nuevos genes y nuevas vías que podrían describir los mecanismos de la patogénesis de esta enfermedad compleja (So *et al.*, 2000).

3.5.3 La diabetes juvenil tipo adulto o tipo MODY

La identificación de formas monogénicas de la diabetes mellitus ha permitido estudiar la genética de algunos de los mecanismos fisiopatológicos de la diabetes.

Existe una variante monogénica de la diabetes mellitus, la diabetes juvenil tipo adulto, mejor conocida como diabetes tipo MODY (de las iniciales en inglés de Maturity Onset Diabetes of the Young). La diabetes tipo MODY es responsable del 2 al 5 % de los casos de diabetes mellitus tipo 2, y se caracteriza por un patrón de herencia autosómico dominante, diagnóstico a una edad temprana (generalmente a <25 años de edad), y un defecto primario en la función de las células β pancreáticas (resultando en alteraciones en la síntesis y en la secreción de insulina). La diabetes tipo MODY puede ser resultado de mutaciones en seis distintos genes. Uno de estos genes codifica la enzima glicolítica glucocinasa (Yamagata *et al.*, 1996a), mientras que los demás genes codifican factores de transcripción: el factor nuclear de hepatocitos HNF4 α (Froguel *et al.*, 1993), el factor nuclear de hepatocitos HNF1 α (Yamagata *et al.*, 1996b), el factor promotor de insulina IPF-1 (Stoffers *et al.*, 1997), el factor nuclear de hepatocitos HNF1 β (Horikawa *et al.*, 1997) y NeuroD1 (Malecki *et al.*, 1999a). Todas son proteínas con un papel fundamental en el desarrollo y / o en el funcionamiento normal del páncreas. Algunas características de los subtipos de la diabetes tipo MODY se describen en la tabla 2.

| Subtipo MODY | MODY1 | MODY2 | MODY3 | MODY4 | MODY5 | MODY6 |
|--|---|--------------------|--|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Gen | <i>HNF4α</i> | <i>GCK</i> | <i>HNF1α</i> | <i>IPF1</i> | <i>HNF1β</i> | <i>NeuroD1/Beta</i> |
| Cromosoma, locus | 20q 12.9-13.1 | 7q 15-13 | 12q 24.1 | 13q 12.1 | 17cen-q21.3 | 2q 32 |
| Función del producto del gen | Factor de transcripción HNF4 α | Enzima Glucocinasa | Factor de transcripción HNF1 α | Factor de transcripción IPF1 | Factor de transcripción HNF1 β | Factor de transcripción NeuroD1/BETA |
| Expresión (tejidos) | Páncreas, hígado, riñones, estómago e intestino | Páncreas e hígado | Páncreas, hígado, riñones, estómago e intestino | Páncreas | Páncreas, hígado, riñones, estómago e intestino | Páncreas, cerebro, pulmón y ojos |
| Mutaciones identificadas | 13 | >130 | >120 | 1 | 2 | 2 |
| Frecuencia | 2-5% | 15-60% | 30-75% | <1% | 1% | 1% |
| Edad de diagnóstico | <30 años | <20 años | <25 años | <35 años | <25 años | <31 años <40 años |
| Defecto primario | Páncreas e hígado | Páncreas e hígado | Páncreas y riñones | Páncreas | Páncreas y riñones | Páncreas |
| Hiperglicemia | Progresiva, severa | Moderada | Progresiva, severa | Moderada | Progresiva, severa | Moderada |
| Sensibilidad a la glucosa | Si | No | Si | Si | Si | ? |
| Complicaciones diabéticas | Frecuente | Rara | Frecuente | Rara | Nefropatía diabética | Rara |
| Otras características fenotípicas | Niveles séricos de triglicéridos bajos | Poco peso al nacer | Umbral renal bajo para la glucosa, aminoaciduria | Agénesis pancreática en homocigotos | Quistes, falla renal, malformaciones genitales | Ninguna |
| Tratamiento | Hipoglucemiantes orales e insulina | Dieta e insulina | Hipoglucemiantes orales e insulina | Hipoglucemiantes orales e insulina | Insulina | Hipoglucemiantes orales e insulina |

Tabla 2. Características de los subtipos de la diabetes tipo MODY.

3.5.4 La diabetes tipo MODY1

3.5.4.1 Mutaciones en el gen *HNF4 α*

Los casos de diabetes tipo MODY debidos a mutaciones en *HNF4 α* son menos frecuentes comparado con los casos asociados a mutaciones en *HNF1 α* y glucocinasa (Velho y Froguel, 1998). Solo se han identificado ocho mutaciones distintas en el gen *HNF4 α* en familias con diabetes tipo MODY de varias poblaciones (Tabla 3). Interesantemente, se han encontrado otras cinco mutaciones en el gen *HNF4 α* de pacientes con diabetes tipo 2 o con nefropatía diabética (Tabla 3). Este último dato implica la posible participación de algunas variaciones en el gen *HNF4 α* en la susceptibilidad para la diabetes tipo 2. Este dato concuerda con los resultados de varios estudios genéticos en donde se ha encontrado asociación de la región que contiene al gen *HNF4 α* humano con la diabetes tipo 2 (Zhu *et al.*, 2003).

3.5.4.2. Fenotipo de los pacientes MODY1

Los pacientes con mutaciones en el gen *HNF4 α* presentan una diabetes de moderada a severa. La hiperglicemia en estos pacientes tiende a incrementarse con el tiempo debido a una disminución progresiva de la secreción de insulina, por lo que generalmente requieren de tratamientos con medicamentos hipoglucemiantes orales o insulina. También, es muy frecuente observar que estos pacientes presenten el espectro completo de complicaciones diabéticas (complicaciones microvasculares: retinopatía, nefropatía y neuropatía) como resultado de la hiperglicemia crónica. Se ha observado que los portadores de mutaciones *HNF4 α* pre-diabéticos tienen también defectos en la secreción de insulina, pero no presentan el defecto de la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, el defecto primario en los pacientes MODY1 se encuentra en la función de las células β pancreáticas más que en la actividad de la insulina. Adicionalmente, se

| Tipo de mutación | Mutación | Localización | Efecto funcional | | | | | Población (País) | Diabetes |
|--------------------|------------|-----------------|------------------|--------------|--------------|-----------------------------|---------------------|---|------------------------------|
| | | | Trans-activación | Unión al DNA | Localización | Interacción con co-factores | Dominancia negativa | | |
| Sin sentido | R154X | E LBD H1 | Reducida | Reducida | No alterada | p300, afectada | No | Caucásica (Alemania) | MODY |
| | Q268X | E LBD H7 | Perdida | Perdida | Alterada | --- | No | Caucásica (EU) | MODY |
| Sentido equivocado | G115S | D DBD | --- | --- | --- | --- | --- | Caucásica (EU) | MODY |
| | R127W | D DBD | Reducida | Reducida | No afectada | p300 y CBP, no afectada | No | Caucásica (RU) Asiática (Japón) | MODY |
| | T130I | D DBD | Reducida | Reducida | No afectada | --- | --- | Caucásica (Dinamarca) Asiática (Japón) | Tipo 2 |
| | V225M | E LBD H7 | Reducida | No afectada | No afectada | --- | No | Caucásica (Dinamarca) | Tipo 2 |
| | E276Q | E LBD H8 | Reducida | No afectada | No afectada | p300 y COUPTF-II, afectada | No | Caucásica (RU) | MODY |
| | R324H | E LBD H10-11 | No afectada | --- | --- | --- | --- | Caucásica (EU) | Nefropatía diabética |
| | V391I | F C-terminal | Reducida | --- | --- | --- | --- | Caucásica (Francia) | Tipo 2 |
| | I454V | F C-terminal | --- | --- | --- | --- | --- | Caucásica (EU) | Tipo 2 |
| | Inserción | V328-329ins | E LBD H10-11 | --- | --- | --- | --- | --- | Caucásica (Finlandia/Suecia) |
| Delección | K99fsdelAA | C DBD | --- | --- | --- | --- | --- | Caucásica (Suecia) | MODY |
| | F75fsdelT | C DBD | --- | --- | --- | --- | --- | Caucásica (Dinamarca) | MODY |

Tabla 3. Mutaciones identificadas en el gen *HNF4 α* humano: F75fsdelT (Moller *et al.*, 1999), K99fsdelAA (Letho *et al.*, 1999a, b), G115S (Malecki *et al.*, 1999b), R127W (Furuta *et al.*, 1997; Navas *et al.*, 1999; Bulman *et al.*, 2000; Lausen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000), T130I (Yamagata *et al.*, 1996a; Malecki *et al.*, 1999b; Rissanen *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003), R154X (Lindner *et al.*, 1997; Laine *et al.*, 2000; Lausen *et al.*, 2000), V255M (Moller *et al.*, 1997), Q268X (Yamagata *et al.*, 1996a; Herman *et al.*, 1997; Stoffel y Duncan, 1997; Sladek *et al.*, 1998; Ilag *et al.*, 2000; Lausen *et al.*, 2000; Shih *et al.*, 2000), E276Q (Bulman *et al.*, 1997; Navas *et al.*, 1999; Suaud *et al.*, 1999; Lausen *et al.*, 2000), R324H (Price *et al.*, 2000), V328ins (Letho *et al.*, 1999b), V391I (Hani *et al.*, 1998), I454V (Malecki *et al.*, 1999b). Los tres guiones (---) indican que aún no se ha estudiado. C, D, E y F corresponden a los dominios estructurales de *HNF4 α* ; DBD corresponde a dominio de unión al DNA; LBD indica dominio de unión al ligando; H indica hélice α del LBD; y C-terminal corresponde a región carboxilo terminal. En la columna de población, EU corresponde a Estados Unidos y RU a Reino Unido.

han reportado defectos en la secreción de glucagon y en la secreción del polipéptido pancreático en los pacientes con diabetes tipo MODY1. Estos últimos datos sugieren que la deficiencia de HNF4 α puede afectar la función no solo de las células β pancreáticas sino también de las células α y de las células secretoras del polipéptido pancreático (Fajans *et al.*, 2001).

Adicional a los efectos en las células β pancreáticas, la deficiencia de HNF4 α afecta la función hepática: los pacientes con diabetes tipo MODY1 tienen un defecto en la biosíntesis de triglicéridos y apolipoproteínas asociado con una reducción de las concentraciones séricas de Apo AI y Apo CIII y de la lipoproteína Lp(a) (Letho *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2000).

3.5.4.3. Estudios funcionales de las mutantes naturales identificadas en el gen HNF4 α

El uso de ratones como modelo animal de la diabetes debidas a mutaciones en el gen HNF4 α no ha sido posible debido a que en contraste al humano, los ratones heterocigotos para el gen HNF4 α (HNF4 α +/-) no muestran señales de diabetes y tienen una tolerancia a la glucosa normal (Sladek *et al.*, 1998).

Es por esta razón que los modelos experimentales se han enfocado en el uso de líneas celulares. En estos experimentos, las proteínas mutantes son transfectadas en líneas celulares para poder ensayar sus efectos en alguna de las actividades funcionales de HNF4 α .

Las mutaciones sin sentido R154X y Q268X, que se localizan al final de las hélices 1 y 7 respectivamente, carecen de gran parte del dominio de unión a ligando. Los estudios funcionales de estas mutantes indican que codifican para proteínas truncadas cuya actividad funcional esta reducida. En el caso de la mutante R154X se ha observado que tiene una actividad de unión al DNA reducida y muestra un potencial de *trans*-activación residual en los experimentos

de transfección dependiendo del tipo celular utilizado (Lausen *et al.*, 2000; Peiler *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que R127W presenta un defecto en el reclutamiento del co-activador p300 (Eeckhoute *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha determinado que la mutante Q268X tiene una localización subcelular alterada; esto afecta su capacidad de unión al DNA y su potencial de *trans*-activación (Laine *et al.*, 2000; Lausen *et al.*, 2000).

Aun no se han caracterizado funcionalmente las mutaciones de cambio del marco de lectura (inserciones y deleciones). Para la mutación V328ins329, que es una inserción localizada en la hélice 10 del dominio de unión a ligando, se ha propuesto que altera este elemento estructural altamente conservado entre los receptores nucleares (Letho *et al.*, 1999b). Por su parte, F75fsdelT y K99fsdelAA son deleciones que generan proteínas truncadas que no tienen parte del dominio con estructura de dedos de zinc necesario para la unión al DNA, por lo que se propone que tengan efectos funcionales similares a las mutaciones sin sentido (Letho *et al.*, 1999b; Moller *et al.*, 1999).

Las ocho mutaciones que cambian un aminoácido por otro están localizadas en posiciones altamente conservadas de las proteínas HNF4 α de los invertebrados, lo cual predice una relevancia funcional. Se ha analizado el potencial transcripcional de la mayor parte de estas mutantes. En general, esta actividad funcional se encuentra afectada (Tabla 3). Las mutantes mejor caracterizadas funcionalmente han sido R127W y E276Q. El análisis funcional de la mutante R127W, localizada en el dominio D, mostró que tiene una pérdida substancial de su actividad transcripcional y de su unión al DNA (Lausen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Suaud *et al.*, 1999); también se determinó que su localización celular y su interacción con algunos co-activadores no está afectada (Yang *et al.*, 2000). La mutante E276Q, localizada al final de la hélice 8 del dominio de unión a ligando, no tiene alteraciones en su localización celular y en su unión al DNA, pero si tiene afectada su actividad transcripcional, y su interacción y sinergia con los co-activadores de HNF4 α COUPTFII y p300 (Suaud *et al.*, 1999; Eeckhoute *et al.*, 2001).

3.5.4.4.Efecto mutación-fenotipo

A pesar de la variedad del tipo de mutaciones HNF4 α humanas identificadas, y su distinta localización en las estructuras funcionales de HNF4 α , ninguna ha podido asociarse a diferencias clínicas en los pacientes. El hecho de que cualquiera de estas mutaciones resulten en el fenotipo MODY1 indica que existe un defecto común en las mutantes. Los datos funcionales de las mutantes de HNF4 α han mostrado que tienen un efecto variado en la actividad de ésta proteína (disminución en la actividad de unión a sus elementos de respuesta y / o defectos en su potencial de *trans*-activación), y que la única característica común observada es una pérdida de función. Aún se desconoce el mecanismo por el cual la pérdida de función debida a la mutación en un alelo en la presencia de un alelo silvestre origine el fenotipo MODY1. Se ha descartado un efecto dominante negativo sobre la actividad de la proteína tipo silvestre, ya que no se ha encontrado tal actividad en las mutantes analizadas; además, se piensa que las mutaciones dominantes negativas no son compatibles con la vida. Se ha propuesto que las mutaciones de HNF4 α originen una dosis génica reducida o haploinsuficiencia (pérdida de una copia funcional del gen *HNF4 α*). Teniendo en cuenta que la expresión de *HNF4 α* en cantidades relativamente bajas parece ser un factor limitante en la eficiente transcripción de genes blanco de HNF4 α , una reducción en la cantidad de la proteína HNF4 α funcional debida a haploinsuficiencia puede tener efectos importantes en la expresión de los genes pancreáticos y hepáticos controlados por este factor de transcripción (Lausen *et al.*, 2000). En concordancia a estos datos, los resultados de un estudio realizado por Shih y colaboradores (2000) sugieren que la disminución en los niveles séricos de ApoA1, ApoCIII y Lp(a) observada en los pacientes portadores de mutaciones HNF4 α , está asociada a un defecto en la activación de estos genes como resultado de haploinsuficiencia de HNF4 α en el hígado. También se sugiere que los niveles bajos de triglicéridos, reportados en los pacientes MODY1, pueden ser resultado de un aumento en la actividad de la proteína lipasa (LPL) debido a que ApoCIII es un inhibidor de la actividad de LPL *in vitro*. De igual manera, en el

páncreas, la disminución de la expresión de los genes regulados por HNF4 α involucrados en el metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina debidos a una reducción en la actividad de HNF4 α por haploinsuficiencia, han sido asociados a los defectos en las células β pancreáticas de los pacientes MODY1 (Wang *et al.*, 2000b).

3.5.5 Relación entre los factores de transcripción HNF4 α y HNF1 α

Las mutaciones en el gen que codifica para HNF1 α están asociadas a la forma más frecuente de la diabetes tipo MODY, MODY3. Se han identificado más de 120 mutaciones en este gen (Ellard, 2000). HNF1 α es un factor de transcripción de la familia de homeodominio (Cereghini, 1996). Se expresa en los mismos tejidos que HNF4 α , en donde regula la expresión de más de un centenar de genes. La mayoría de estos genes son expresados específicamente en el hígado, como por ejemplo los genes que codifican para los fibrinógenos α y β , la albúmina y la α -1antitripsina (Blumenfeld *et al.*, 1991). HNF1 α se une al DNA como homodímero, o heterodimerizando con HNF1 β (responsable del fenotipo MODY5) (Rey-Campos *et al.*, 1991). En la figura 5.A se muestra un esquema de la estructura de la proteína HNF1 α .

En términos generales, el fenotipo clínico diabético de los pacientes con los tipos de diabetes MODY1 y MODY3 es muy similar: el defecto pancreático es progresivo y severo. Respecto al fenotipo hepático, a pesar de que se ha demostrado que HNF1 α , al igual que HNF4 α , también participa en la regulación transcripcional de varios genes de apolipoproteínas como los que codifican para ApoA1, ApoB y ApoCIII, no hay información referente a defectos hepáticos o en el perfil de lípidos en los pacientes con diabetes tipo MODY3 (Fajans y Brown, 1993; Herman *et al.*, 1994; Byrne *et al.*, 1995; 1996; Letho *et al.*, 1997).

A.



B.

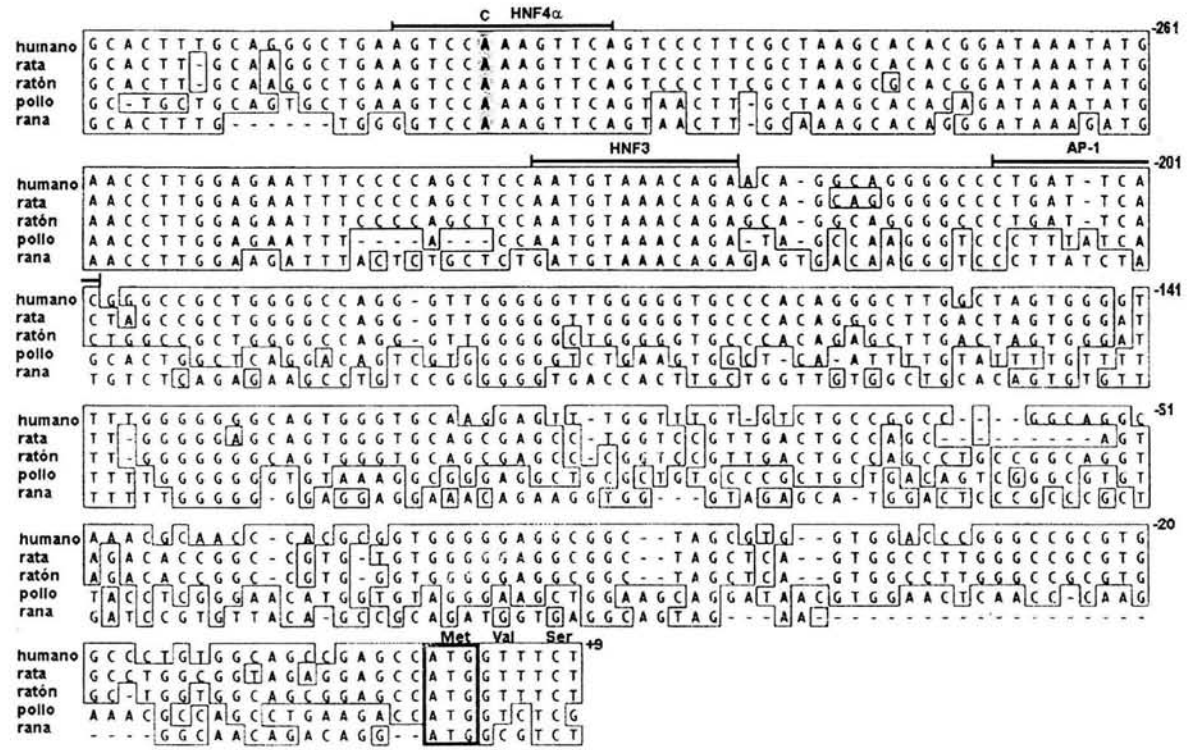


Figura 5. A. Estructura de la proteína HNF1 α . Se muestran el dominio de dimerización y los dos dominios involucrados en la unión al DNA (POU A y homeobox). B. Región promotora del gen HNF1 α . Se muestra una comparación de las secuencias de las regiones promotoras de los genes HNF1 α del humano, de la rata, del ratón, del pollo, y de la rana. Los residuos idénticos a la secuencia humana se encuentran encuadrados (nótese la alta conservación de ésta región entre las especies). Los nucleótidos son numerados según el nucleótido A (+1) del triplete ATG (encuadrado) de la metionina de iniciación. Se indican las secuencias reconocidas por los factores de transcripción HNF4 α , HNF3 y AP-1. En el sitio de unión de HNF4 α se señala la mutación (sustitución de A por C) identificada en una familia con el fenotipo MODY. Figura modificada de Gragnoli *et al.* (1997).

Dentro de la región promotora de *HNF1 α* se identificaron elementos de respuesta para HNF4 α , HNF3 y AP-1 (Figura 5.B) (Tian y Schibler, 1991; Kuo *et al.*, 1992). En hepatocitos se ha demostrado que HNF4 α es el principal activador de la transcripción del gen *HNF1 α* , ya que: 1) las mutaciones en el elemento de respuesta para HNF4 α originan una reducción del 95% del nivel de expresión de *HNF1 α* ; y 2) en líneas celulares de hepatocitos des-diferenciadas y en células hepáticas embrionarias con fenotipo hepático perdido por la eliminación de HNF4 α y HNF1 α (pierden la producción de proteínas específicas del hígado), la transfección de HNF4 α restauró la expresión de *HNF1 α* y otros genes hepáticos (Spath y Weiss, 1997; 1998).

Por otro lado, se ha observado que la expresión de una forma dominante negativa de HNF1 α en las células β INS-1 resulta en la expresión reducida de un conjunto de genes similares a los regulados por HNF4 α en un estudio semejante: insulina, transportador de glucosa 2, piruvato cinasa hepática, aldolasa B y 2 oxoglutarato deshidrogenasa. Estos resultados, junto al fenotipo clínico similar entre los pacientes con mutaciones en los genes *HNF4 α* y *HNF1 α* , eran indicio de que ambos factores controlaban un programa genético común y necesario para el funcionamiento apropiado de las células β (Wang *et al.*, 1998a; 2000a, b). La identificación de una familia en donde segregaba una mutación en el sitio de unión de HNF4 α dentro del promotor de HNF1 α con el fenotipo MODY (Figura 5.B), era evidencia de que la jerarquía funcional de HNF4 α -HNF1 α observada en hepatocitos era también importante en las células β pancreáticas (Gagnoli *et al.*, 1997). Sin embargo, datos recientes han demostrado que la interacción entre estos factores es más compleja en las células β . En el páncreas, HNF4 α y HNF1 α se autorregulan el uno al otro, ya que se encontró que HNF1 α era un activador principal de HNF4 α (Ferrer, 2001; Boj *et al.*, 2001; Shih y Stoffel, 2001; Thomas *et al.*, 2001). Se ha postulado que la interrupción de esta interdependencia, por ejemplo, por haploinsuficiencia debida a la pérdida funcional de un alelo de HNF1 α o HNF4 α , podría explicar el patrón de secreción de insulina común en los pacientes MODY1 y MODY3 (Figura 6) (Wang *et al.*, 2002).

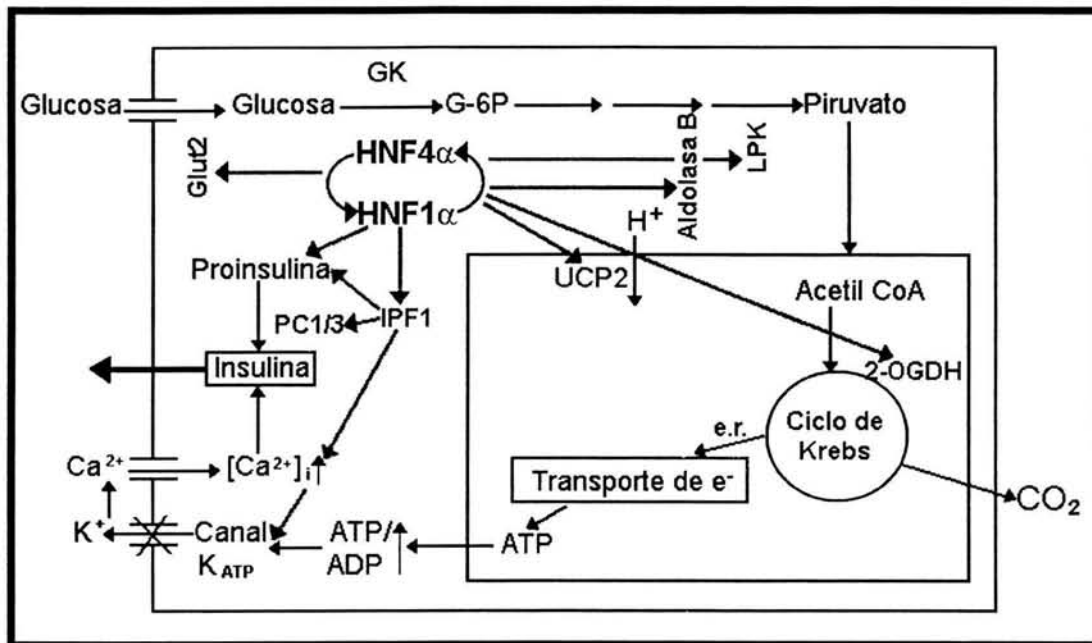


Figura 6. Participación del circuito transcripcional HNF4 α -HNF1 α en el proceso de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en las células β pancreáticas. La glucosa, cuya concentración se equilibra rápidamente a través de la membrana plasmática de las células β pancreáticas vía el transportador de glucosa 2 (Glut2), es fosforilada por la enzima glucocinasa (GK) para generar glucosa 6-fosfato. Esta reacción enzimática da inicio al proceso que convierte a la glucosa en piruvato: la glicólisis. El piruvato entra a la mitocondria, y provee sustrato (como acetil CoA) al ciclo de Krebs, resultando en la transferencia de equivalentes reductores a la cadena de transporte de electrones y a la síntesis de ATP. Al aumentar la síntesis de ATP, y por lo tanto la proporción de ADP/ATP, los canales de K⁺ se cierran provocando la despolarización de la membrana plasmática. Posteriormente, se abren los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje, ocasionando un aumento del Ca²⁺ intracelular, lo cual desencadena el proceso de exocitosis de la insulina. HNF4 α y HNF1 α que actúan en un circuito transcripcional, regulan la expresión del gen de la insulina, y de genes implicados en la glicólisis y en el metabolismo mitocondrial: 1) Aldolasa B, enzima glicolítica que cataliza la conversión reversible de la fructosa 1, 6 bifosfato al gliceraldehído 3 fosfato y dihidroxiacetona fosfato. 2) Piruvato cinasa hepática (L-PK), enzima glicolítica que transfiere el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato al ADP generando piruvato y ATP. 3) Proteína desacoplante 2 (UCP2), proteína mitocondrial que permite la disipación del gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo cual desacopla la fosforilación oxidativa, produciéndose calor en lugar de ATP; regula negativamente la secreción de insulina. 4) 2 oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH), complejo enzimático que cataliza la conversión del 2 oxoglutarato en succinil CoA en el ciclo de Krebs. 5) Transportador de glucosa 2 (Glut2), transportador de la glucosa en las células β pancreáticas. 6) Factor promotor de insulina (IPF1), factor de transcripción requerido en el desarrollo pancreático y en el mantenimiento del fenotipo de las células β pancreáticas; regula la transcripción del gen de la insulina, y de otros genes cuyos productos están asociados al procesamiento y a la secreción de la insulina, por ejemplo, las convertasas de pro-hormonas PC1/3 y 2 (involucradas en la conversión de proinsulina a insulina) y las subunidades Sur1 Y Kir6.2 de los canales de K⁺ sensibles a ATP. IPF1 y GK también son producto de genes asociados a la diabetes tipo MODY. Figura tomada de Wang *et al.* (2002).

4. ANTECEDENTES

En México, la diabetes mellitus tipo 2 representa uno de los principales problemas de salud pública. Su incidencia es del 8.2% en la población mexicana, y representa la tercera causa de enfermedad y muerte en nuestro país (Secretaría de Salud, 2000). Además, se ha estimado que dos de cada diez pacientes mexicanos desarrollan la enfermedad antes de los 40 años (diabetes de aparición temprana) (Rull *et al.*, 1995). Un estudio ha analizado la posible participación de los genes relacionados con la diabetes tipo MODY, e indica que estos genes podrían explicar solamente el 10% de los casos de diabetes de aparición temprana en la población mexicana (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001). En este estudio se identificaron dos pacientes portadores de mutaciones que resultan en el cambio de un aminoácido por otro en el exón 4 del gen *HNF4 α* . Un paciente era portador del cambio R154Q, el otro, presentaba cambios de secuencia en ambos alelos: D126Y y D126H. Estos cambios no se encontraron en 110 individuos sanos, lo cual sugirió que no se trataban de polimorfismos raros. Ambos pacientes presentaron defectos severos en la secreción de insulina y desarrollaron complicaciones diabéticas. Adicionalmente, se observaron niveles bajos de triglicéridos y de Lp(a). No fue posible el análisis de segregación de las mutaciones en las familias de los pacientes, pero los familiogramas indicaban un aparente patrón de herencia autosómico dominante. Este dato, en el caso del paciente con las mutaciones D126H y D126Y, sugería que una de las sustituciones de aminoácidos podría no tener un efecto funcional (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001). Posteriormente se tuvo acceso a la muestra de DNA de la madre (no diabética), ella resultó portadora heterocigota del alelo D126H (datos no publicados). Los tres cambios de aminoácidos encontrados son sustituciones no conservativas que alteran la carga o la longitud de la cadena lateral del aminoácido, y probablemente la función de la proteína. El aminoácido 126 está situado en la región D, dentro de la caja T del dominio de unión al DNA (Figura 7.A). Por ello era posible postular que estas mutantes podrían tener alteración en su unión al DNA, y como consecuencia de ello un efecto también sobre su capacidad de *trans*-activación. El cambio en la posición de 154 se sitúa al inicio

del la región E, que contiene el dominio de *trans*-activación AF-2 y el dominio de unión al ligando, y que ha sido reportada como importante para la interacción con una variedad de co-factores de HNF4 α (Figura 7.A) (Yoshida *et al.*,1997; Dell *et al.*, 1999; Soutoglou *et al.*, 2000; Laine *et al.*, 2001). El aspartato 126 se encuentra conservado en las proteínas de la rata, del ratón, de *Xenopus* y de *Drosophila*. La arginina 154 solo se encuentra conservada en *Drosophila*, mientras que el aminoácido resultado de la mutación, la glutamina, está presente en la rata, el ratón y en *Xenopus* (Figura 7.B). Considerando únicamente la información de la conservación de estos residuos entre distintas especies, los cambios en la posición 126 resultan los más interesantes.

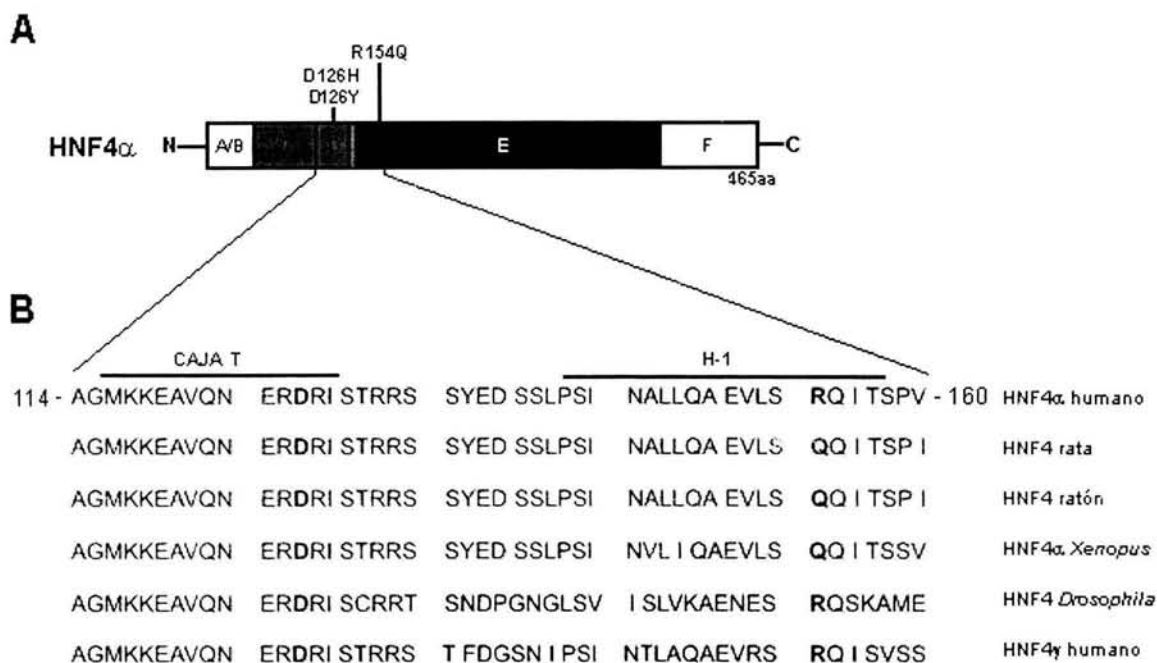


Figura 7. A. Localización de los residuos D126 y R154 en los dominios estructurales de HNF4 α . B. Conservación de los residuos D126 y R154 entre las especies. Se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio D y parte del dominio E del HNF4 α humano, y abajo las secuencias de aminoácidos correspondientes en los HNF4 α de otras especies y en HNF4 γ (producto de un gen humano ortólogo de HNF4 α). Las letras en negritas indican los residuos D126 y R154 y los aminoácidos correspondientes en los diferentes HNF4. Se indican los aminoácidos que componen la caja T del dominio de unión al DNA, y los correspondientes a la hélice α 1 (H-1) del dominio de unión a ligando.

Con el fin de tener evidencia del efecto de estas mutaciones en la función de HNF4 α , se requirió su análisis mediante un sistema de expresión *in vitro*.

Los primeros ensayos *in vitro* de las mutantes D126H, D126Y y R154Q consistieron en transfecciones transitorias de estas proteínas mutantes en células HeLa. En ese estudio se analizaron las actividades de *trans*-activación y de unión al DNA de estas mutantes HNF4 α , y se compararon con las actividades de la proteína HNF4 α tipo silvestre. Los resultados mostraron que solo la mutante D126Y presentaba una disminución importante en la capacidad de *trans*-activación de los promotores estudiados (los promotores de los genes *HNF1 α* y *L-PK*). También se ensayaron las actividades de la combinación de las mutantes D126H y D126Y, la cual tuvo una disminución con respecto a la actividad de HNF4 α tipo silvestre en la *trans*-activación del promotor del gen *HNF1 α* . Los ensayos de retardo no mostraron alteración alguna en la unión al DNA de las mutantes analizadas (Domínguez-López, 2003).

5. JUSTIFICACIÓN

La identificación de una mutación en una secuencia de DNA no siempre es indicativo de causalidad. Es preciso confirmar que esa mutación es la responsable de la enfermedad. Para este fin, puede estudiarse la distribución de la mutación entre distintos miembros de una familia o valorando su frecuencia en poblaciones diabética y sana; también existe la posibilidad de realizar diversos estudios *in vitro* demostrando una función anómala de una mutante.

El experimento más empleado para definir el estado de activación de las mutantes HNF4 α ha sido el de determinar sus actividades transcripcionales en ensayos de transfección. Esto se debe a que defectos en la unión al DNA, dimerización o interacción con co-factores de una determinada mutante puede reflejarse en ésta actividad.

Los estudios de *trans*-activación de las mutantes HNF4 α humanas han sido ensayados en una variedad de líneas celulares: HeLa, COS-7, COS-1, HepG2, INS-1, etc. Entre los promotores más empleados para la construcción de los plásmidos reporteros se encuentran los promotores de los genes que codifican para HNF1 α , L-PK, ApoAI, y ApoCIII.

Se ha observado que el efecto de algunas mutantes en la actividad transcripcional de HNF4 α puede variar según el promotor utilizado. Por ejemplo, en un estudio la mutante HNF4 α R127W presentó una actividad transcripcional igual a la de HNF4 α tipo silvestre en los promotores de los genes *ApoAI* y *ApoCIII* (Navas *et al.*, 1999), mientras que en otros dos estudios, esta mutante mostró un defecto para *trans*-activar el promotor del gen *HNF1 α* (Yang *et al.*, 2000; Lausen *et al.*, 2000). También, existe evidencia de inconsistencias en los resultados de los estudios de *trans*-activación de algunas mutaciones MODY1 en un mismo promotor, dependiendo el tipo celular utilizado. Tal es el caso de la mutante R154X que *trans*-activa el promotor del gen *HNF1 α* de manera tejido específica: este promotor es activado por R154X en las células COS-1 y HEK293T pero no en

la línea celular β pancreática HIT-T15 (Laine *et al.*, 2000). Algo semejante es observado con la mutante T130I, la cual presenta un defecto para *trans*-activar los promotores de los genes *HNF1 α* y *L-PK* en la línea celular HepG2 pero no en las células HeLa y MIN6 (Zhu *et al.*, 2003). Se ha sugerido que estas diferencias observadas son reflejo de la sinergia de distintos factores tejido específicos con HNF4 α (Laine *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003).

Las células HeLa, que se utilizaron en los estudios de las mutantes D126H, D126Y y R154Q, son células que no expresan endógenamente HNF4 α ni otros factores de transcripción tejido específicos asociados funcionalmente a éste (por ejemplo, HNF1 α) (Thomas *et al.*, 2002). Esta característica es compartida por las células COS (Naiki *et al.*, 2002). Es interesante hacer notar que las mutantes de HNF4 α R154X y T130I no presentan defectos en su actividad transcripcional en las células HeLa y COS-1, pero sí en las células β pancreáticas y hepáticas que sí expresan endógenamente HNF4 α . Estos datos podrían indicar la existencia de ciertas interacciones moleculares específicas en el páncreas y / o en el hígado que son requeridas para la actividad de HNF4 α .

Estos datos motivaron a elaborar el presente estudio, que consistió en explorar la importancia de las mutantes D126H, D126Y y R154Q de HNF4 α en el promotor del gen *HNF1 α* en las células β pancreáticas y en las células hepáticas, que como sabemos son células en donde se expresa constitutivamente este factor de transcripción, y además, representan los tejidos potencialmente afectados en los pacientes con diabetes MODY por mutaciones en HNF4 α .

Para este estudio lo ideal era trabajar en líneas celulares humanas de origen pancreático y hepático. Sin embargo, únicamente se dispuso de la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2, que ha sido ampliamente utilizada para simular el ambiente celular hepático. En el caso de las células β pancreáticas se optó por usar la línea celular de insulinooma de rata (*Rattus norvegicus*) RINm5F debido a que las líneas celulares de insulinooma humano son poco utilizadas por las dificultades en su obtención y en su cultivo por períodos largos. Además, la

línea celular RINm5F conserva una regulación normal de la secreción de insulina, y junto a otras líneas celulares animales como HIT, β TC, MIN6 y INS-1 ha sido usada para el estudio de los mecanismos fisiológicos y patofisiológicos involucrados en el metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas (Poitout *et al.*, 1996). También, se utilizó la línea celular de blastocito renal de mono COS-7 como un modelo celular que no expresa HNF4 α ni otros factores asociados a éste. Estas células, que son fáciles de crecer y muestran una alta eficiencia de transfección, han sido utilizadas en otros estudios para la caracterización funcional de mutantes de HNF4 α (Sladek *et al.*, 1998).

El vector reportero utilizado contiene el promotor del gen *HNF1 α* , humano, que se ha convertido en un reportero esencial para ensayar la función de las mutantes en los experimentos de transfección. Esto se debe especialmente a la evidencia de la cooperación de HNF4 α y HNF1 α en el metabolismo de las células hepáticas y células β pancreáticas, y su relación con la diabetes tipo MODY (Shih y Stoffel, 2001).

Durante la realización de este trabajo, el grupo de Oxombre y colaboradores (2002), publicó el análisis funcional de las mutantes D126Y y D126H de HNF4 α en las línea celular HepG2, en las células renales embrionarias HEK293, y en las células β pancreáticas β TC3. Sus resultados indican que éstas mutantes presentan defectos tanto en su actividad transcripcional como en su actividad de unión al DNA en las tres líneas celulares estudiadas.

6. HIPÓTESIS

Debido a que el páncreas y el hígado son tejidos en donde HNF4 α se expresa constitutivamente, y además, son los tejidos potencialmente afectados en los pacientes con diabetes tipo MODY1, se espera que el estudio funcional de las mutantes de HNF4 α en células de origen pancreático y hepático constituyan un modelo aproximado de sus posibles efectos *in vivo*.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Determinar el efecto funcional en la actividad transcripcional de tres mutantes de HNF4 α identificadas en dos pacientes mexicanos con diabetes de aparición temprana en células de origen pancreático y hepático.

7.2 Objetivos específicos

- a) Determinar la actividad transcripcional de HNF4 α tipo silvestre, de las mutantes D126H, D126Y, R154Q y la combinación de D126H/D126Y en el promotor del gen *HNF1 α* humano en las líneas celulares RINm5F, HepG2 y COS-7.
- b) Comparar la actividad transcripcional en el promotor del gen *HNF1 α* de las mutantes estudiadas (D126H, D126Y, R154Q y D126H/D126Y) con la de la proteína HNF4 α tipo silvestre en cada línea celular .
- c) Determinar el nivel de expresión de proteína para la tipo silvestre y las mutantes en extractos de proteínas nucleares de células RINm5F, HepG2 y COS-7 transfectadas.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Introducción

Hoy en día se dispone de una gran variedad de herramientas y técnicas que facilitan estudiar la regulación génica, la expresión y la función de muchas proteínas en células de mamíferos en cultivo. Una técnica importante en la manipulación de estas células ha sido la habilidad de introducirles DNA exógeno con el fin de expresar proteínas funcionales. En el presente trabajo se tomó ventaja de la facilidad y la eficacia que ofrece la técnica de transfección transitoria de células por medio de lípidos catiónicos para insertar temporalmente DNA (en forma de plásmido de expresión) y expresar transitoriamente las proteínas a estudiarse en tres diferentes líneas celulares de mamíferos. El “vehículo” de transfección correspondió al reactivo comercial LipofectAMINE™2000, que es un lípido catiónico sintético que forma complejos con el DNA (cargado negativamente) permitiendo que este atraviese la membrana celular. Para detectar y visualizar la expresión de estas proteínas, se utilizó el método denominado “western blot”. Este método combina la separación de una mezcla de proteínas (en este caso, proteínas extraídas de los núcleos) según su tamaño y carga mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y su transferencia a una membrana sólida (membrana de PVDF), con la inmunodetección indirecta de la proteína de interés: se emplea un anticuerpo primario para localizar la proteína, y un segundo anticuerpo contra la especie en la que se ha producido el primero, que además debe estar marcado por una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano) con el fin de producir una señal donde se formaron los complejos antígeno-anticuerpo. Debido a que la proteína estudiada es un factor de transcripción y a que se trabajó con versiones mutantes de ésta proteína que podrían tener defectos en su función, era importante determinar una de sus principales actividad funcionales, su actividad transcripcional. Para este fin, se empleó un sistema reportero genético de la luciferasa: un plásmido conteniendo un gen reportero (luciferasa) bajo el control de un promotor blanco natural del factor de transcripción estudiado se transfecta junto al plásmido de expresión; después, se adiciona un

sustrato para determinar la actividad enzimática de la luciferasa que resulta en la emisión de luz. La cantidad de luz medida en un intervalo de tiempo es proporcional a la cantidad de la actividad del gen reportero, la cual, a la vez, representa la actividad transcripcional de la proteína estudiada.

8.2 Cultivo celular

La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 y la línea celular de blastocito renal de mono COS-7 fueron obtenidas de la American Type Cell Culture (ATCC). Se cultivaron en medio DMEM suplementado con SBF al 10 % (Invitrogen). La línea celular de insulinoma de rata RINm5F, un obsequio de la Universidad de Tufts en Boston, Estados Unidos, se mantuvo en medio RPMI 1640 con SBF al 10 % (Invitrogen). Todas estas líneas crecen en monocapa, y se mantienen en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂, y a una temperatura de 37°C.

8.3 Ensayos de *trans*-activación

8.3.1 Plásmidos:

a) Plásmidos de expresión

Se utilizaron plásmidos de expresión contruidos en el laboratorio con anterioridad (Domínguez-López, 2003). El constructo tipo silvestre (pcDNA-WTHNF4 α) contiene el cDNA del gen HNF4 α 2 humano insertado en el vector pcDNA3. Las mutantes de HNF4 α D126H, D126Y y R154Q se generaron por mutación sitio dirigida (Kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChangeTM; Stratagene) en el constructo pcDNA-WTHNF4 α (Apéndice 1). La autenticidad de los fragmentos de DNA amplificados por PCR fueron verificados por secuenciación.

b) Plásmido reportero

El plásmido que contiene el gen de luciferasa de luciérnaga (pGL3; PROMEGA) controlado por el promotor del gen *HNF1 α* humano (-341/+183) fue un obsequio del Dr. Graeme Bell de la Universidad de Chicago, Estados Unidos.

8.3.2 Transfección transitoria

Las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células en cajas con 24 pozos, y se transfectaron con 25 ng de vectores de expresión HNF4 α (12.5 ng de los vectores de expresión de cada mutante en el caso del ensayo de la combinación de D126H y D126Y) y 500 ng de vector reportero junto con 10 ng del vector pRL-TK (Promega) usando 2 ml por mg de DNA del reactivo de LipofectAMINE™2000 (Invitrogen). Cuatro horas después de la transfección, se adicionó medio fresco a cada pozo. Las condiciones de los ensayos de transfección fueron semejantes para las tres líneas celulares utilizadas. Para cada línea celular, se prepararon dos ensayos por sextuplicado.

8.3.3 Ensayo de luciferasa

Después de 24 horas de la adición de medio fresco, se realizó el ensayo para determinar las actividades de luciferasas utilizando el reactivo de Dual Luciferase Assay System de Promega (Apéndice 2). Se utilizó el luminómetro automático LumiCount™ (Packard) para determinar la intensidad de señal de las muestras en un intervalo de 0.5 segundos por pozo.

8.3.4 Análisis estadístico

Las actividades de luciferasa leídas por el luminómetro en unidades de luz relativas (RLU o "Relative light units") se normalizaron para la eficiencia de

transfección. A los resultados normalizados obtenidos con el plásmido de expresión vacío se les dio un valor arbitrario de 1. Las actividades de los vectores de expresión HNF4 α tipo silvestre o mutantes son expresadas como x -veces de inducción sobre el valor de la actividad del vector vacío. Los datos se analizaron con la prueba estadística de t de Student para datos no apareados usando el programa Prism. La significancia se consideró a ***p<0.001, **p<0.01, y *p<0.05.

8.4 “Western blot”

8.4.1 Preparación de extractos protéicos nucleares

Las células COS-7, HepG2 o RINm5F, fueron sembradas a una densidad de 3×10^6 en cajas de cultivo de 100 mm. Después de 24 horas, las células fueron transfectadas con 10 μ g de los vectores de expresión, y después de 48 horas, se prepararon los extractos protéicos nucleares. Para este procedimiento, las células se lavaron con PBS pH 7.4 (Apéndice 3). Después, a cada caja de cultivo se le aplicó 1 ml de PBS pH 7.4 frío y se raspó su superficie para colectar las células y pasarlas a un tubo eppendorf. Se centrifugó a 1,500 rpm por 10 minutos a 4 °C, y se desechó el sobrenadante. A la pastilla se le adicionó 100 μ l de un amortiguador hipotónico “A” (Apéndice 4), y rápidamente se congeló colocando el tubo eppendorf en una mezcla de etanol y hielo seco. Las células se resuspendieron por pipeteo y se incubaron a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos a 4 °C. El pellet nuclear se resuspendió por pipeteo en 30 μ l de amortiguador hipertónico “C” (Apéndice 5) y se mezcló suavemente por 30 minutos a 4 °C para la extracción de las proteínas nucleares. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos a 4 °C, y finalmente el sobrenadante, que contiene los extractos nucleares, se diluyó con 30 μ l de amortiguador “D” (Apéndice 6). Se almacenaron a -80 °C. La concentración de proteínas totales fue determinada por el método Bradford.

8.4.2 Ensayo “western blot”

En un gel de poliacrilamida con SDS al 10 % se separaron 30 μg de proteínas nucleares (Apéndice 7). Posteriormente, las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando una celda de transferencia TRANS-BLOT (Bio-Rad) (Apéndice 8). La membrana fue “bloqueada” con la solución Blotto 5 % (Apéndice 9) por 16 horas a 4 °C. Después, se incubó la membrana con una dilución 1:250 del anticuerpo policlonal de conejo para la proteína HNF4 humana de Geneka Biotechnologies (Apéndice 10) por dos horas a 37 °C. Luego de lavar la membrana con la solución Blotto 5%, se incubó con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology). Para determinar la unión del anticuerpo se aplicó a la membrana un sustrato quimioluminiscente (Pierce Super Signal West Pico [®]), y se expuso a películas fotosensibles (KODAK). Se reveló manualmente utilizando reactivos de KODAK. Para cuantificar la intensidad de las bandas se realizaron análisis densitométricos utilizando el programa EDAS 290 (KODAK).

9. RESULTADOS

Con el fin de identificar posibles efectos funcionales de las mutantes D126H, D126Y y R154Q en la actividad de HNF4 α en tres diferentes líneas celulares, se determinó la actividad transcripcional de cada proteína mutante sobre el promotor del gen *HNF1 α* .

Las células COS-7 se incluyeron como un modelo celular en donde no se expresan HNF4 α ni otros factores asociados a éste (expresados en las células hepáticas y pancreáticas). Los resultados en éstas células muestran que todas las mutantes presentan una actividad transcripcional del promotor del gen *HNF1 α* muy similar a la mostrada por la proteína HNF4 α tipo silvestre (Figura 8.A). Únicamente la mutante D126H presentó una disminución significativa del 13% en su actividad de *trans*-activación con respecto a la proteína silvestre (Figura 8.A). En estos experimentos también se analizó el efecto de la combinación de las mutantes D126H y D126Y, debido a que ambas mutaciones fueron identificadas en el mismo paciente. El resultado mostró que la combinación de ambas mutantes no tiene un efecto aditivo sobre la disminución en la actividad de *trans*-activación comparándola con la silvestre (Figura 8.A).

Debido a la importancia de los factores HNF4 α y HNF1 α en el funcionamiento normal del páncreas, y la asociación de mutaciones en los genes que codifican para estos factores de transcripción con diabetes tipo MODY, era importante evaluar la actividad de estas mutantes en células β pancreáticas. En el presente estudio se empleó la línea celular RINm5F como modelo celular para los ensayos de *trans*-activación del promotor del gen *HNF1 α* en células β pancreáticas. En estas células, la actividad transcripcional no se vio afectada para la mutante R154Q, pero estuvo disminuida significativamente para las mutantes D126H y D126Y: D126H presentó una disminución de la *trans*-activación de 32% y D126Y de 13.5% con respecto a la actividad de HNF4 α tipo silvestre (Figura 8.B). Por el contrario, la combinación de las mutantes D126H y D126Y no tuvo un

defecto importante en la *trans*-activación como ocurre con cada una de las mutantes por separado (Figura 8.B).

Otro tejido en donde la actividad de HNF4 α y HNF1 α es importante es el hígado. Se ha observado que los pacientes MODY1 tienden a presentar defectos extra-pancreáticos comunes, especialmente en el hígado, como por ejemplo, defectos en la biosíntesis de triglicéridos y apolipoproteínas. Por esta razón se decidió incluir un estudio de la activación del promotor del gen *HNF1 α* por las tres mutantes en hepatocitos utilizando células HepG2. En esta línea celular la función *trans*-activadora de las mutantes fue afectada de manera drástica. La actividad de las mutantes D126H y D126Y, y su combinación disminuye a un 57% respecto a la actividad de la proteína silvestre, mientras que la mutante R154Q tuvo una reducción del 41% (Figura 8.C).

Los resultados de la técnica de "western blot" en las tres líneas celulares, en donde se observan bandas de aproximadamente 50 kDa correspondientes a HNF4 α (tipo silvestre y mutantes), mostraron que no hay defectos en la expresión de las proteínas estudiadas (Figuras 8.D, 8.E y 8.F).

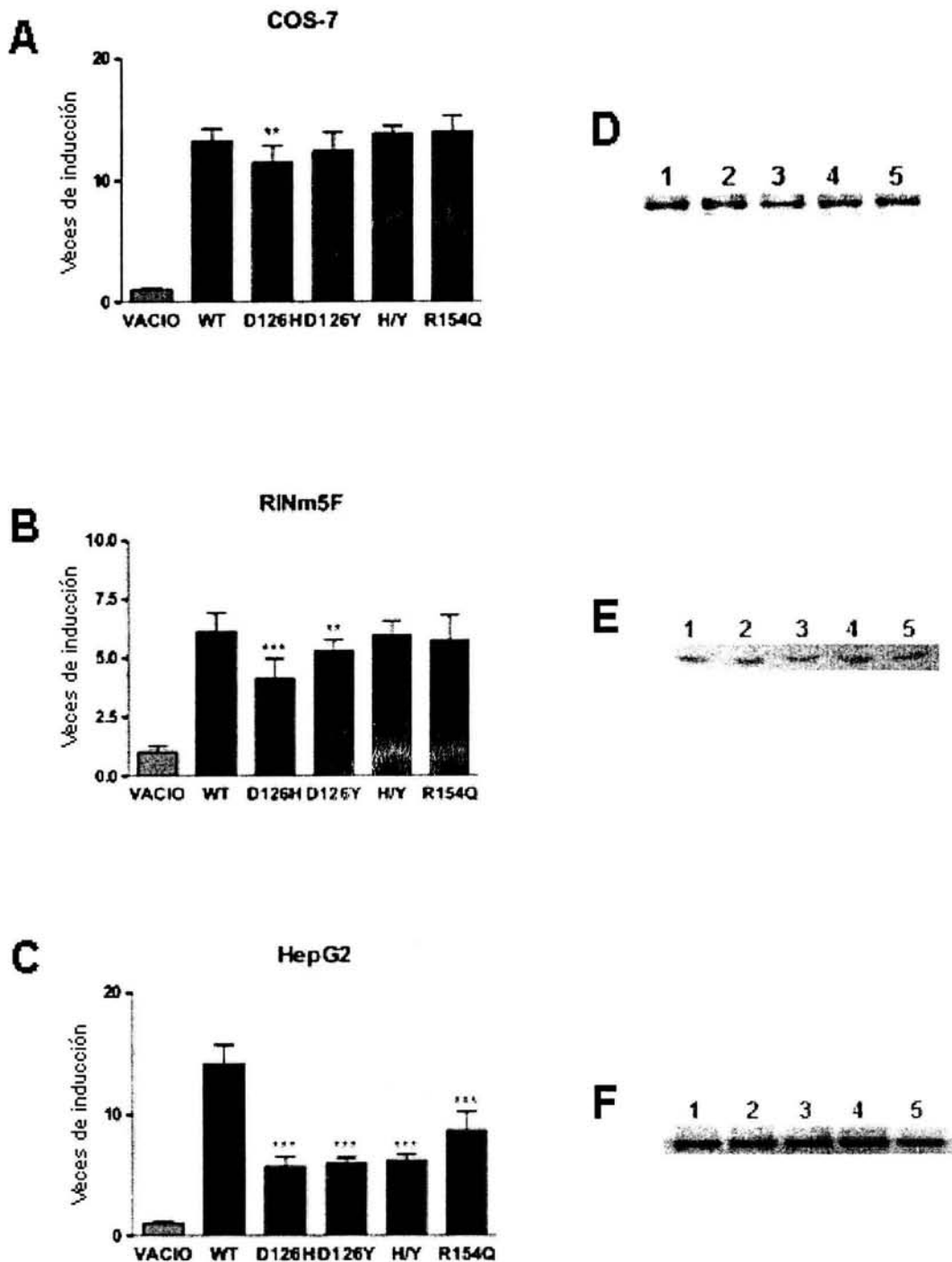


Figura 8. A, B y C. Actividades transcripcionales de HNF4 α tipo silvestre y mutantes sobre el promotor del gen *HNF1 α* obtenidas en las líneas celulares A) COS-7, B) RINm5F, y C) HepG2. Las células fueron transfectadas con 500ng del vector reportero y 25ng de los vectores de expresión tipo silvestre (WT) o mutantes (H/Y corresponde a la combinación de las mutaciones D126H y D126Y). Para la combinación de las mutantes D126H y D126Y se transfectaron 12.5ng de cada mutante. Veces de inducción corresponde a las actividad obtenida de la transfección del vector de expresión vacío, al cual se le dio un valor arbitrario de 1. Las barras de error representan las desviaciones estándar de dos experimentos independientes realizados por sextuplicado. La diferencia de los valores de las mutantes de HNF4 α con respecto a los de HNF4 α tipo silvestre se consideró a *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, y * $p < 0.05$. D, E y F. "Western blot" de 1) HNF4 tipo silvestre y mutantes (2, D126H; 3 D126Y; 4, D126H/Y, 5, R154Q) expresado en COS-7, RINm5F, y HepG2, respectivamente.

10. DISCUSIÓN

Las mutaciones de HNF4 α D126H, D126Y y R154Q se localizan en residuos de aminoácidos conservados en otras especies. Por lo tanto es posible que tengan un papel importante en la función de la proteína. Las mutantes en el residuo 126 se localizan en el dominio D, el cual forma parte del dominio de unión al DNA. La mutante R154Q se localiza en el dominio E, y está dentro de la secuencia 128-369, que corresponde al dominio de *trans*-activación AF-2 de HNF4 α . En el presente estudio se analizó el efecto funcional de estas mutaciones a través de valorar su actividad de *trans*-activación del promotor del gen de HNF1 α en tres líneas celulares distintas (COS-7, RINm5F y HepG2).

10.1 Efecto de las mutaciones D126H y D126Y

10.1.1 En células β pancreáticas

En las células β pancreáticas, en donde los defectos en la actividad transcripcional de las mutantes HNF4 α en el promotor del gen HNF1 α pueden asociarse al defecto en la secreción de insulina reportada en los pacientes MODY (Wang *et al.*, 2000a, b), se observó que la actividad transcripcional de las mutantes D126H y D126Y en el promotor del gen HNF1 α se encontraba afectada. Estos resultados fueron significativos, pero no tan dramáticos como los obtenidos para estas mutantes en las células β TC3 (Oxombre *et al.*, 2002). En ese estudio, las actividades transcripcionales del promotor del gen HNF1 α de ambas mutantes se pierden completamente. Asimismo, la combinación de las mutantes en ese estudio no presentó actividad de *trans*-activación, mientras que en las células RINm5F no se observó disminución significativa al compararse con la proteína tipo silvestre como sucede con las mutantes por separado.

Es interesante observar que en ninguno de los dos estudios los resultados de *trans*-activación pueden ser asociados al fenotipo clínico de los pacientes portadores de estas mutaciones. Por ejemplo, Oxombre y colaboradores (2002), reportan una actividad de *trans*-activación nula para la combinación de las mutaciones. Sin embargo, de acuerdo a los hallazgos reportados en pacientes MODY con mutaciones en HNF4 α , una mutación heterocigota es suficiente para manifestar diabetes, y a la fecha no se han reportado pacientes con mutaciones que ocasionen pérdida de la función total en ambos alelos. De hecho, se propone que mutaciones homocigotas que provoquen una reducción importante en la función de la proteína son incompatibles con la vida, debido al papel primario de HNF4 α en el desarrollo y diferenciación del páncreas y del hígado (Lausen *et al.*, 2000). Por otra parte, los resultados obtenidos en nuestro estudio utilizando la línea celular RINm5F no mostró diferencias en la actividad de *trans*-activación utilizando la combinación de ambas mutantes, lo cual tampoco concuerda con lo esperado, ya que el paciente portador de ambos alelos manifiesta diabetes. Las diferencias entre los resultados de *trans*-activación en células RINm5F y β TC3 puede sugerir que el residuo D126 puede ser parte de alguna región que interactúa con algún elemento tejido específico. El resultado de la combinación observado en este estudio podría deberse a que ésta interacción sea favorecida por el arreglo de la combinación de las mutantes en las células RINm5F.

10.1.2 En células hepáticas

Se ha observado que los pacientes MODY1 presentan en común, además de los defectos pancreáticos, alteraciones hepáticas significativas, especialmente en el metabolismo de los triglicéridos, probablemente como resultado de alteraciones en la expresión hepática de las apolipoproteínas AII, B, y CIII, cuyos genes son directamente regulados por HNF4 α (Lehto *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2000; Hayhurst *et al.*, 2001).

En este estudio, el defecto en la actividad transcripcional de las mutantes en el residuo D126 fue muy evidente en las células hepáticas HepG2: la función transcripcional de estas mutantes y su combinación sobre el promotor del gen *HNF1 α* en las células HepG2 mostró que tenían una disminución en su actividad transcripcional significativa con respecto a lo observado para la proteína tipo silvestre. Los resultados de las mutantes por separado concuerdan con los obtenidos por Oxombre y colaboradores (2000) en un experimento similar. Oxombre y colaboradores (2000) también reportaron un defecto de las mutantes D126H y D126Y para *trans*-activar el promotor del gen *ApoCIII* en células HepG2. En conjunto, todos estos hallazgos *in vitro* pueden asociarse al defecto hepático en el paciente portador de las mutantes D126H y D126Y. Este paciente exhibió niveles bajos de triglicéridos: 101 mg/dl, que corresponde al trigésimo percentil para la población mexicana. Además, entre la población de pacientes estudiados, este paciente exhibió los niveles más bajos de Lp(a): <2 mg/dl. Estos datos concuerdan también con el patrón bioquímico reportado para otros pacientes con mutaciones en el gen *HNF4 α* (Letho *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2000).

10.1.3. Los efectos funcionales de las mutantes D126H y D126Y son tejido específicos

Los resultados de las mutantes D126H y D126Y, y su combinación en las células COS-7 presentados en este trabajo, y los obtenidos en un estudio similar de estas mutantes en células HeLa, muestran defectos moderados: en las células COS-7 únicamente D126H presentó una disminución en la actividad transcripcional del 13%, mientras que en las células HeLa únicamente la actividad de D126Y se vio afectada. Comparando estos resultados con los de las células β pancreáticas o las hepáticas, se deduce que la actividad transcripcional de las mutantes en el residuo D126 varía dependiendo del tipo celular utilizado.

10.1.4 Las mutantes D126H Y D126Y tienen defectos en la unión al DNA

El defecto para activar la transcripción observado en las mutantes D126H y D126Y podrían atribuirse a alteraciones en la unión al DNA, en la dimerización dependiente de DNA o en ambos casos.

Oxombre y colaboradores (2002) reportan que las mutantes en el residuo D126 presentan un defecto en la de unión al DNA en las células β pancreáticas β TC3, en células Hek293, en HepG2, y en lisados de reticulocitos. En los estudios preliminares de unión al DNA presentados en este trabajo, también se encontró un defecto en la unión al DNA de estas mutantes en las células RINm5F (Apéndice 11). Estos datos resaltan la importancia del aspartato 126 en la actividad de unión al DNA de HNF4 α . En su trabajo, Oxombre y colaboradores (2002), también demostraron que la pérdida de unión al DNA ocurría sin defectos en la dimerización, lo cual descarta la posible implicación del residuo D126 en la interfase de dimerización. Esto indica que la pérdida de unión al DNA de las proteínas mutantes podría ser estructural, y que los cambios de aminoácidos en el residuo 126 pueden ser impedimentos estéricos que afectan la afinidad al elemento de respuesta (Oxombre *et al.*, 2002). Sin embargo, esta afinidad al DNA parece ser afectada de manera diferente según el tipo celular estudiado ya que contrario a lo observado en líneas celulares pancreáticas y hepáticas, en las células HeLa no se detectaron alteraciones en la unión al DNA de estas tres mutantes (Domínguez-López, 2003). Las células HeLa y COS-7 son líneas celulares que no expresan endógenamente HNF4 α y otros factores de transcripción específicos de páncreas o hígado (Naiki *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2001), y de acuerdo a nuestros datos y a otros reportes funcionales de otras mutantes (T130I y D127W), la presencia de mutaciones en la región D de HNF4 α correlaciona con diferencias en la actividad de la proteína en distintas líneas celulares. Por lo tanto, esta región puede tener un papel importante en el contacto directo o indirecto de HNF4 α con algún elemento tejido específico: ligando, co-activadores, co-represores, etc. Por ejemplo, esta interacción podría originar una modificación post-traducciona que afecta HNF4 α , y que sólo ocurre en

determinadas células. Teniendo en cuenta que dentro de esta región se han localizado posibles motivos reconocidos y fosforilados por las proteínas cinasas A y B (Viollet *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2003), la fosforilación, y por lo tanto su unión al DNA tejido específica de HNF4 α podría ser afectada en estas mutantes. Otra explicación podría ser la existencia de proteínas tejido específicas que inhiben la unión al DNA, por ejemplo, se ha reportado que la región D de HNF4 α hace contacto con el represor SMRT (Ruse *et al.*, 2002), y con un inhibidor de HNF4 α identificado en *Xenopus* (Peiler *et al.*, 2000). Por otro lado, como se ha demostrado que las concentraciones de co-factores pueden variar de un tipo celular a otro (Misiti *et al.*, 1998; Soderstrom *et al.*, 1997), suponiendo que las mutantes tuvieran mayor o menor afinidad a algún co-factor, por ejemplo a el co-activador CBP/p300 que contacta la región D (Yoshida *et al.*, 1997), la actividad de HNF4 α sería afectada de manera importante solo en ciertas líneas celulares. Será importante analizar a futuro el papel de algunos de estos factores tejido específicos en la actividad de las mutantes de HNF4 α D126H y D126Y.

Otra cuestión importante a definir será el efecto en la unión al DNA de la combinación de D126H y D126Y, especialmente en las células RINm5F. Con estos datos se podría determinar si el aparente efecto tejido específico en el potencial transcripcional de la combinación observado en estas células se debe a efectos en la unión al DNA.

10.2 Efecto funcional de la mutante de HNF4 α R154Q

En los ensayos de *trans*-activación del promotor del gen *HNF1 α* realizados en células RINm5F y en las células COS-7, se observó que la mutante R154Q no tenía defectos funcionales en esta actividad. Por otro lado, según los datos preliminares de la actividad de unión al DNA de esta mutante en células RINm5F (Apéndice 11), no parece tener defectos en esta otra actividad funcional. Fue interesante encontrar que la actividad transcripcional de la mutante R154Q estaba alterada en las células HepG2. El defecto de la mutante R154Q resultó menor

comparado al de las mutantes en el residuo D126. Contrario a las mutantes D126, donde el defecto en la *trans*-activación puede ser atribuido a la unión al DNA alterada, en el caso de la mutante R154Q, debido a su localización estructural, la alteración podrían observarse en la unión a ligando, en la dimerización, y / o en el contacto con co-factores de HNF4 α (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997; Bogan *et al.*, 2000). El motivo por el que el defecto en la activación transcripcional del promotor del gen *HNF1 α* haya sido únicamente observado en las células HepG2, sugiere nuevamente la presencia de factores tejido específicos moduladores de la actividad de HNF4 α . Por lo tanto, es muy probable que la mutante R154Q pueda influenciar en la interacción defectuosa con alguno de estos factores. El defecto funcional hepático de R154Q podría explicar el fenotipo del paciente portador de esta mutación. Los niveles séricos de triglicéridos de este paciente fueron bajos: 83 mg/dl, que corresponde al décimo percentil de la población mexicana.

Existe un reporte de una mutante de HNF4 α en donde, como en el presente trabajo, los defectos funcionales son únicamente observados en las células hepáticas. Es el caso la mutante T130I, asociada a diabetes tipo 2. En ese estudio, en donde se midió la actividad transcripcional de esta mutante en el promotor del gen *HNF1 α* en células β pancreáticas de ratón MIN6, en células HepG2 y HeLa, se observó únicamente defecto en las células HepG2. En ese trabajo se concluye que la diabetes observada en los pacientes portadores de la mutación T130I podría deberse más a defectos funcionales hepáticos (por ejemplo, defectos en el metabolismo hepático de la glucosa y de los lípidos) que pancreáticos (Zhu *et al.*, 2003).

10.3 Las células de origen hepático y pancreático en el estudio de las mutantes HNF4 α

Varios trabajos de mutantes de HNF4 α , incluyendo el presente, han demostrado la importancia del ambiente tejido específico en la actividad de esta proteína. Consistente con el hecho de que el páncreas y el hígado sean tejidos en

donde HNF4 α se expresa constitutivamente, y además, sean los tejidos potencialmente afectados en los pacientes con diabetes tipo MODY1, los efectos funcionales de las mutantes de HNF4 α en células de origen pancreático y hepático han sido especialmente relevantes. Se ha encontrado que los efectos de las mutantes HNF4 α en la línea celular de hepatoma humano HepG2 son importantes para considerarse en la asociación con el fenotipo hepáticos MODY1. Sin embargo, los estudios de las mutantes HNF4 α en células β pancreáticas, que se han centrado en el uso de varios modelos celulares murinos debido a que no se dispone de líneas celulares β pancreáticas humanas, han demostrado que los efectos pueden variar importantemente entre las líneas celulares β pancreáticas. Por esta razón, será muy importante acordar un modelo celular β pancreático para estudiar la función de las mutantes HNF4 α .

11. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió el efecto funcional de tres mutantes de HNF4 α identificadas en pacientes con diabetes tipo MODY de la población mexicana (D126Y, D126H y R154Q). Se analizó el efecto sobre la capacidad de *trans*-activación de cada una de ellas así como de la combinación de las mutantes D126Y y D126H de manera conjunta en tres líneas celulares (COS-7, HepG2 y RINm5F). En este trabajo se ensayo únicamente su actividad sobre el promotor del gen *HNF1 α* por ser un gen blanco importante que participa en el desarrollo, diferenciación y función del páncreas endocrino y el tejido hepático. Nuestros resultados nos permiten establecer las siguientes conclusiones: 1) El efecto sobre la actividad de *trans*-activación de las mutantes estudiadas es distinto en las distintas líneas celulares utilizadas, lo cual podría ser explicado por la modulación de la actividad de estas proteínas por cofactores tejido específicos; 2) las diferencias en la actividad de *trans*-activación observadas en las mutantes no se deben a diferencias en los niveles de expresión de la proteína; 3) los resultados de *trans*-activación obtenidos en las líneas celulares β pancreáticas de origen murino no pueden ser correlacionadas con los hallazgos fenotípicos de los pacientes que las portan; 4) por el contrario, los estudios funcionales de las mutantes en la línea celular HepG2 (de origen humano) pueden correlacionarse con las alteraciones hepáticas observadas en los pacientes; y 5) de acuerdo a los resultados preliminares obtenidos en el presente estudio y los presentados en el trabajo de Oxombre y colaboradores (2002) podemos concluir que las mutantes D126Y y D126H presentan también alteraciones en su capacidad de unión al DNA.

12. PERSPECTIVAS

La actividad transcripcional de un factor de transcripción es la medición más relevante para evaluar su estado de activación. En el presente trabajo se ha demostrado un defecto tejido específico de la actividad transcripcional de las mutantes D126H, D126Y y R154Q del factor de transcripción HNF4 α en un promotor potencial, el promotor del gen HNF1 α . Dado que la actividad transcripcional de HNF4 α depende de otros procesos como la unión al DNA, la unión de un ligando determinado, la interacción con co-factores y el reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal, es importante analizar algunos de estos procesos en el promotor utilizado. Por ejemplo, la unión al DNA de las mutantes pueden analizarse mediante ensayos de retardo en gel y "supershift", utilizando el elemento respuesta de HNF4 α (Apéndice 11). Este dato es importante para corroborar los defectos en la unión al DNA de las mutantes D126, y determinar si el defecto en la actividad de *trans*-activación de R154Q y la combinación de las mutantes D126H y D126Y en las células hepáticas HepG2 se debe también a defectos en esta actividad. Como los resultados del presente trabajo plantean un defecto debido a la interacción con algún factor tejido específico, deberá considerarse el análisis del efecto de la interacción de algunos co-factores de HNF4 α en la actividad de las mutantes estudiadas: se podría estudiar la interacción y la cooperación funcional de estas mutantes con algunas proteínas como el factor de transcripción C/EBP- β o los co-activadores CBP y p300; en estos estudios se co-expresarían ambas proteínas y se determinarían sus efectos sobre la actividad en un promotor determinado.

También será interesante analizar la actividad transcripcional de estas mutantes en los promotores de otros genes blanco de HNF4 α , como *L-PK* o *ApoCIII*, en las células hepáticas. En especial, será trascendente el análisis de la actividad transcripcional de la mutante R154Q en el promotor que codifica para ApoCIII en células hepáticas, ya que a diferencia de las mutantes en el residuo D126, aún no ha sido analizado, y este dato es importante para hacer una

asociación más directa con el fenotipo hepático observado en el paciente portador de la mutación.

Respecto a las células β pancreáticas, por el momento, tal vez sería conveniente realizar los estudios funcionales en otras líneas celulares β pancreáticas murinas empleadas en los estudios funcionales de las mutantes de HNF4 α (por ejemplo, se podría utilizar la líneas celulares MIN6 o INS-1, otra opción sería intentar el uso de cultivos celulares primarios de células β pancreáticas murinas) y ensayar la actividad transcripcional en otros promotores potenciales de HNF4 α .

13. REFERENCIAS.

- Aguilar-Salinas, C.A., Reyes-Rodríguez, E., Ordóñez-Sánchez, M.L., Torres, M.A., Ramírez-Jiménez, S., Domínguez-López, A., Martínez-Francois, J.R., Velasco-Pérez, M.L., Alpizar, M., García-García, E., Gómez-Pérez, F., Rull, J., y Tusié-Luna, M.T. 2001. Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in mexican population. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:220-226.
- Blumenfeld, M., Maury, M., Chourad, T., Yaniv, M., y Condamine, H. 1991. Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products from its known target genes in the developing mouse. *Development.* 113:589-599.
- Bogan, A.A., Dallas-Yang, Q., Ruse, M.D. Jr., Maeda, Y., Jiang, G., Nepomuceno, L., Scanlan, T.S., Cohen, F.E., y Sladek, F.M. 2000. Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4 alpha. *J Mol Biol.* 302:831-851.
- Boj, S.F., Párrizas, M., Maestro, M.A., y Ferrer, J. 2001. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 98:14481-14486.
- Bulman, MP, Dronsfield, M.J., Frayling, T, Appleton, M, Bain, S.C., Ellard, S., y Hattersley, A.T. 1997. A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in a UK pedigree with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia.* 40:859-862.
- Bulman, MP, Ellard, S., y Hattersley, A.T. 2000. R127W in HNF4 alpha is a loss-of-function mutation causing maturity-onset diabetes of the young (MODY) in a UK Caucasian family. *Diabetologia.* 43:1203.
- Byrne, M.M., Sturis, J., Fajans, S.S., Ortiz, F.J., Stoltz, A., Stoffel, M., Smith, M.J., Bell, G.I., Halter, J.B., y Polonsky, K.S. 1995. Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. *Diabetes.* 44:699-704.
- Byrne, M.M., Sturis, J., Menzel, S., Yamagata, K., Fajans, S.S., Dronsfield, M.J., Bain, S.C., Hattersley, A.T., Velho, G., Froguel, P., Bell, G.I., y Polonsky, K.S. 1996. Altered insulin secretory response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes.* 45:1503-1510.

- Cereghini, S. 1996. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10:267-282.
- Chartier, F.L., Bossu, J.P., Laudet, V., Fruchart, J.C., y Laine, B. 1994. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene.* 147:269-272.
- Chen, H.W., Lin, R.J., Schlitz, D., Chakravarti, A., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., y Evans, R.M. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* 90:569-580
- Dell, H., y Hadzopoulou-Cladaras, M. 1999. CREB binding protein is a transcriptional coactivator for hepatocyte nuclear factor-4 and enhances apolipoprotein gene expression. *J Biol Chem.* 274:9013-9020.
- Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y., y Shoelson, S.E. 2002. Crystal structure of the HNF4 α ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J Biol Chem.* 277:37973-37976.
- Domínguez-López, A. "Estudios funcionales para las mutaciones R154Q, D126Y y D126H del gen HNF4A encontradas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de aparición temprana". México, UNAM. 2003.
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., y Ryffel, G.U. 1996. Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol.* 16:925-931.
- Duncan, S.A., Nagy, A., y Chan, W. 1997. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expresión in the visceral endoderm: tetraploid rescue of HNF4 $-/-$ embryos. *Development.* 124:279-287.
- Eckhoute, J., Formstecher, P., y Laine, B. 2001. Maturity-onset diabetes of the young type 1 (MODY1)-associated mutations R154X and E276Q in hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) gene impair recruitment of p300, a key transcriptional coactivator. *Mol Endocrinol.* 15:1200-1210.
- Ellard, S. 2000. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1) mutations in maturity-onset diabetes of the young. *Human Mutation* 16:377-385.

- Fajans S.S., y Brown, M.B. 1993. Administration of sulfonylureas can increase glucose-induced insulin secretion for decades in patients with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care*. 16:1254-1261.
- Fajans, S.S., Bell, G., y Polonsky, K.S. 2001. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*. 345:971-980.
- Ferrer, J. A genetic switch in pancreatic β -cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes*. 51:2355-2362.
- Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., Permutt, M.A., Beckmann, J.S., Bell, G.I., y Cohen D. 1993. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase: definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 328:697-702.
- Furuta, H. Iwasaki, N., Oda, N., Hinokio, Y., Horikawa, Y. Yamagata, K., Yano, N., Sugahiro, J. Ogata, M., Ohgawara, H, Omori, Y., Iwamoto, Y., y Bell, G.I. 1997. Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor 4 α / MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family MODY. *Diabetes*. 46:1652-1657.
- Gragnoli, C., Linder, T., Cockburn, B.N., Kaisaki, P.J., Gragnoli, F., Marozzi, G, y Bell, G.I. 1997. Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene. *Diabetes*. 46:1648-1651.
- Green, V.J., Kokkotou, E., y Ladas, J.A. 1998. Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*. 273:29950-29957.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova E., Evagelopoulou, C., ZenG, S.Y., Cladaras, C., y Ladas, J.A.A. 1997. Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*. 272:539-550.
- Hani, E.H., Suaud, L., Boutin, P., Chevre, J.C., Durand, E., Philippi, A., Demenais, F., Vionnet, N., Furuta, H., Valho, G., Bell, G.I., Laine, B., y Froguel, P. 1998. A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4 alpha, resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 101:521-526.

- Hata, S., Inoue, T., Kosuga, K., Nakashima, T., Tsukamoto, T., y Osumi, T. 1995. Identification of two splice isoforms of mRNA for mouse hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochim Biophys Acta*. 1260:55-61.
- Hata, S., Tsukamoto, T., y Osumi, T. 1992. A novel isoform of rat hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochim Biophys Acta*. 1131:211-213.
- Hatzis, P., y Talianidis, I. 2001. Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4 α gene expression. *Mol Cell Biol*. 21:7320-7331.
- Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., y Gonzalez, F.J. 2001. Hepatocyte nuclear factor 4 α (NR2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol*. 21:1393-1403.
- Herman, W.H., Fajans, S.S., Ortiz, F.J., Smith, M.J., Sturis, J., Bell, G.I., Polonsky, K.S., y Halter, J.B. 1994. Abnormal insulin secretion, not insulin resistance, is the genetic or primary defect of MODY in the RW pedigree. *Diabetes*. 43:40-46.
- Herman, W.H., Fajans, S.S., Smith, M.J., Polonsky, K.S., Bell, G.I., y Halter, J.B. 1997. Diminished insulin and glucagon secretory responses to arginine in nondiabetic subjects with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene. *Diabetes*. 46:1749-1754.
- Hertz, R., Májenme, J., Berman, I., y Bar, T.J.1998. Fatty acyl-CcoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 alpha. *Nature*. 392:512-516.
- Hertz, R., Ben-Haiim, N., Petrescu, A.D., Kalderon, B., Berman, I., Eldad, N., Schroeder, F., y Bar-Tana, J. 2003. Resue of MODY-1 by agonist ligands of Hepatocyte Nuclear Factor 4(alpha). *J Biol Chem*. 278:22578-22585.
- Holewa, B., Pogge, E., Strandmann, V., Zapp, D., Lorenz, P., y Ryffel, G.U. 1996. Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1). *Mech Dev*. 54:45-57.
- Holewa, B., Zapp, D., Drewes, T., Senkel, S., y Ryffel, G.U. 1997. HNF4 β , a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*. 17:687-694.

- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B.N., Linder, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., Kuroki, H., Kasahara, T., Iwamoto, Y., y Bell, G.I. 1997. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1 β gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet.* 17:384-385.
- Ilag, L.L., Tabaei, B.P., Herman, W.H., Zawacki, C.M., D'Souza, E., Bell, G.I., y Fajans, S.S. 2000. Reduced pancreatic polypeptide response to hypoglycemia and amylin response to arginine in subjects with a mutation in the HNF-4 alpha/MODY1 gene. *Diabetes.* 49:961-968.
- Iyemere, V.P., Davies, N.H., y Brownlee, G.G. 1998. The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain. *Nucleic Acids Res.* 26:2098-2104.
- Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K., y Sladek, F.M. 1995. Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol.* 15:5131-5143.
- Jiang, G., y Sladek, F.M. 1997. The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative. Specific binding to DNA and heterodimerization with retinoid X receptors. *J Biol Chem.* 272:1218-1225.
- Kritis, A.A., Argyrokastritis, A., Moschonas, N.K., Power, S. Kratakili, N., Zannis, V.I., Cereghini, S., y Talinaidis, I. 1996. Isolation and characterization of a novel isoform for the human hepatocyte nuclear factor 4. *Gene.* 173:275-280.
- Ktistaki, E., y Talianidis, I. 1997. Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science.* 277:109-112.
- Kuo, C.J., Conley, P.B., Chen, L., Sladek, F.M. Darnel, J.E.Jr., y Crabtree, G.R. 1992. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature.* 355:457-461.
- Laine, B. Eeckhoute, J., Suaud, L., Briche, I., Furuta, H., Bell, G.I., y Formstecher, P. 2000. Functional properties of the R154X HNF-4 alpha protein generated by a mutation associated with maturity-onset diabetes of the young type 1. *FEBS Lett.* 479:41-45.

- Lausen, J., Thomas, H., Lemm, I., Bulman, M., Borgschulze, M., Lingott, A., Hattersley, A.T., y Ryffel, G.U. 2000. Naturally occurring mutations in the human HNF4 alpha gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Res.* 28:430-437.
- Lee, Y. K., Dell, H., Dowhan, D.H., Hadzopoulou-Cladaras, M., y Moore, D.D. 2000. The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 α and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol Cell Biol.* 20:187-195.
- Letho, M., Bitzen, P.O., Isomma, B, Wipemo, C., Wessman, Y., Forsblom, C., Tuomi,T., Taskinen, M.R., y Groop, L. 1999a. Mutations in the gene HNF-4 α gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes.* 48:423-425.
- Letho, M., Tuomi, T., Mahtani, M.M., Widén, E., Forsblom, C., Sarelin, L., Gullström, M., Isomaa, B., Lehtovirta, M., Hyrkkö, A., Kanninen, T., Orho, M., Manley, S., Turner, R.C., Brettin, T., Kirby, A., Thomas, J., Duyk, G., Lander, E., Taskinen, M., y Groop, L. 1997. Characterization of the MODY3 phenotype: early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *J Clin Invest.* 99:582-591.
- Letho, M., Wipemo, C., Ivarsson, S. Lindgren, C., Lipsanen-Nyman, M., Weng, J. Wibell, L., Widen, E., Tuomi, T., Y Groop, L. 1999b. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia.* 42:1131-1137.
- Li, J., Ning, G. y Duncan, S.A. 2000. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Dev.* 14:464-474.
- Lindner, T., Gragnoli, C., Furuta, H., Cockburn, B.N., Petsold, C., Rietzch, H., Weiss, U., Schulze, J., y Bell, G.I. 1997. Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene. *J Clin Invest.* 100:1400-1405.
- Malecki, M.T., Jhala, U.S., Antonellis, A., Fields, L., Doria, A., Orban, T., Saad, M., Warram, J.H., Montminy, M., y Krolewsky, A.S. 1999a. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 23:323-328.

- Malecki, M.T., Yang, Y., Antonellis, A., Curtis, S., Warram, J.H., y Krolewski, A.S. 1999b. Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene among families with early onset type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*. 16:193-200.
- Malik, S., Wallberg, A.E., Kang, Y.K., y Roeder, R.G. 2002. TRAP/SMCC/Mediator-Dependent transcription activation from DNA and chromatin templates by orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol*. 22:5626-5637.
- Malik, S., y Karathanasis, S.K. 1996. TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol*. 16:1824-1831.
- Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P.M., y Chin, W.W. 1998. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology*. 139:2493-2500.
- Moller, A.M., Dalgaard, L.T., Ambye, L., Hansen, T., Clausen, J.O., Lithell, H., y Pedersen, O. 1999. A novel Phe75 fsdelT mutation in a Danish pedigree with maturity-onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab*. 84:367-369.
- Moller, A.M., Urhammer, S.A., Dalgaard, L.T., Reneland, R., Berglund, L., Hansen, T., Clausen, J.O., Lithell, H., y Pedersen, O. 1997. Studies in the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha in caucasian with maturity-onset NIDDM. *Diabetologia*. 40:980-983.
- Naiki, T., Nagaki, M., Shidoji, Y., Kojima, H., Imose, M., Kato, T., Ohishi, N., Yagi, N., y Moriwaki, H. 2002. Analysis of gene expression profile Induced by hepatocyte nuclear factor 4 α in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray. *J Biol Chem*. 277:14011-14019.
- Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I., y Ryffel, G.U. 1998. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 alpha predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Res*. 26:497-504.
- Navas, M.A., Munoz-Elias, E.J., Kim, J., Shih, D., y Stoffel, M. 1999. Functional characterization of the MODY1 gene mutations HNF4(R127W), HNF4(V255M), and HNF4(E276Q). *Diabetes*. 48:1459-1465.

- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., y Nakatani, Y. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 87:953-959.
- Oxombre, B., Moerman, E., Eeckhoutte, J., Formstecher, P., y Laine, B. 2002. Mutations in hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) gene associated with diabetes results in greater loss of HNF4 α function in non pancreatic β -cells and in reduced activation of apolipoprotein CIII promoter in hepatic cells. *J Mol Med*. 80: 423-430.
- Peiler, G., Böckmann, B., Nakhei, H. y Riffel, G.U. 2000. Inhibitor of the tissue-specific transcription factor HNF-4, a potential regulator in early *Xenopus* development. *Mol Cell Biol*. 20:8676-8683.
- Poitou, V., Olson, L.K., y Robertson, R.P. 1996. Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications. *Diabetes and Metabolism*. 22:7-14.
- Price, J.A., Fossey, S.C., Sale, M.M., Brewer, C.S., Freedman, B.I., Wuerth, J.P., y Bowden D.W. 2000. Analysis of the HNF-4 alpha gene in Caucasian type II diabetic nephropathic patients. *Diabetologia*. 43:364-372.
- Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M, y Cereghini, S. 1991. vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J*. 20:1445-1457.
- Rissanen, J., Wang, H., Miettinen, R., Karkkainen, P., Kekalainen, P., Mykkanen, L., Kuusisto, J., Karhapaa, P., Niskanen, L., Uusitupa, M., y Laakso, M. 2000. Variants in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha and -4 alpha genes in Finnish and Chinese subjects with late-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 23:1533-1538.
- Rull, J.A., Rios, J.M., y Gómez-Pérez, F.J. 1995. *The impact of diabetes mellitus on public health in México*. En Schwartz, C.J. y Born, G. (ed), *New horizons in diabetes mellitus and cardiovascular disease*. Current Science, USA.
- Ruse, M.D.Jr., Privalsky, M.L., y Sladek, F.M. 2002. Competitive cofactor recruitment by orphan receptor HNF4 α 1: modulation by F domain. *Mol Cell Biol*. 22:1626-1638.

- Secretaría de Salud. 2000. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Dirección General de Epidemiología SSA, México.
- Shih, D.A. y Stoffel, M. 2001. Dissecting the transcriptional network of pancreatic islet during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 98:14189-14191.
- Shih, D.Q., Danskt, H.M., Fleisher, M., Assman, G., Fajans, S.S., y Stoffel, M. 2000. Genotype/phenotype relationship in HNF4 α -MODY1: haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein (a), and triglyceride levels. *Diabetes*. 49: 832-837.
- Sladek, F.M. y Seidel, S.D. 2001. *Hepatocyte nuclear factor 4 α* . En Burris, T.P., y McCabe, E.R.B. (ed), Nuclear Receptors in Genetic Disease. Academic Press, London.
- Sladek, F.M., Dallas-Yang, Q., y Nepomuceno, L. 1998. MODY1 mutation Q268X in hepatocyte nuclear factor 4 alpha allows for dimerization in solution but causes abnormal subcellular localization. *Diabetes*. 47:985-990.
- Sladek, F.M., Ruse, M.D., Nepomuceno, L., Huang, S.M., y Stallcup, M.R. 1999. Modulation of transcription activation and coactivator interaction by splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1. *Mol Cell Biol*. 19:6509-6522.
- Sladek, F.M., Zhong, W., Lai, E., y Darnell, Jr. J.E. 1990. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev*. 4:2353-2365.
- So, W.Y., Ng, M.C.Y., Lee, S.C., Sanke, T., Lee, H.K., y Chan, J.C.N. 2000. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *HKMJ*. 6:69-76.
- Soderstrom, M., Vo, A., Heinzl, T., Lavinsky, R.M., Yang, W.M., Seto, E., Peterson, D.A., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. 1997. Differential effects of nuclear receptor corepressor (N-CoR) expression levels on retinoic acid receptor-mediated repression support the existence of dynamically regulated corepressor complexes. *Mol Endocrinol*. 11:682-692.
- Soutoglou, E. Kratakili, N., y Talianidis, I. 2000. Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell*. 5:745-751.

- Spath, G.F., y Weiss, M.C. 1997. Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol.* 17:1913-1922.
- Spath, G.F., y Weiss, M.C. 1998. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol.* 140:935-946.
- Stoffers, D.A., Ferrer, J., Clarke, W.L., y Habener, J.F. 1997. Early-onset type II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet.* 17:138-139.
- Suaud, L., Hemimou, Y., Formstecher, P., y Laine, B. 1999. Functional study of the E276Q mutant hepatocyte nuclear factor 4-alpha found in type 1 maturity-onset diabetes of the young: impaired synergy with chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II on the hepatocyte nuclear factor-1 promoter. *Diabetes.* 48:1162-1167.
- The Expert Committee on Diagnosis and Classification on Diabetes Mellitus, 2001. Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 24.
- Thomas, H. Jaschowitz, K., Bulmas, M., Frayling, T.M., Mitchell, S.M.S., Roosen, S., Lingott-Frieg, A., Tack, C.J., Ellard, S., Ryffel, G.U., y Hattersley, A.T. 2001. A distant upstream promoter of the HNF4A gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet.* 10:2089-2097.
- Tian, J.M., y Schibler, U. 1991. Tissue-specific expresión of the gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 may involve hepatocyte nuclear factor-4. *Genes Dev.* 5:2225-2234.
- Velho, G., y Froguel, P. 1998. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur J Endocrinol.* 138:233-239.
- Viollet, B., Kahn, A., y Raymondjean, M. 1997. Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol.* 17:4208-4219.
- Wang, H., Antozzi, P.A., Hagen, K.A., Maecheler, P., y Wollheim, C.B. 2000a. Molecular targets of a human HNF1 α mutation responsible for pancreatic β cell dysfunction. *EMBO J* 19:4257-4264.

- Wang, H., Hagenfeldt-Johansson, K., Otten, L.A., Gauthier, B.R., Herrera P.L., y Wollheim, C.B. 2002. Experimental models of transcription factor-associated maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes*. 51:S333-S342.
- Wang, H., Maechler, P., Antinozzi, P.A., Hagenfeld, R.A., y Wolheim, C.B. 2000b. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha regulates the expression of pancreatic β -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 275:35953-35959.
- Wang, H.Y., Maechler, P., Hagenfeldt, K.A., y Wollheim, C.B. 1998a. Dominant-negative suppression of HNF-1 α function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism secretion coupling in a pancreatic β -cell line. *EMBO J*. 17:6701-6713.
- Wang, J. C., Stafford, J.M., y Granner, D.K.. 1998b. SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*. 273:30847-30850.
- Wisely, G.B., Miller, A.B., Davis, R.G., Thornquest, Jr., A.D., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J.T., Miller, A.B., Willson, T.M., y Williams, S.P. 2002. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure*. 10:1225-1234.
- Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Cox, N.J., Fajans, S.S., Signorini, S. Stoffel, M., y Bell G.I. 1996a. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 a gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*. 384:458-460.
- Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R.D., Lathrop, G.M., Boriraj, V.V., Chen, X., Cox, N.J., Oda, Y., Yano, H., Le, B.M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S.S., Hattersley, A.T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K.S., y Bell, G.I. 1996b. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*. 384:455-458.
- Yang, Q., Yamagata, K., Yamamoto, K., Miyagawa, J., Fukumizu, A., Hanafusa, T., y Matsuzawa, Y. 2000. R127W-HNF-4alpha is a loss of function mutation but not a rare polymorphism and causes type II diabetes in Japanese family with MODY1. *Diabetologia*. 43:520-524.

- Yoshida, E., Aratani, S., Itou, H., Miyaguishi, M., Takiguchi, M., Osumu, T., Murakami, K., y Fukamizu, A. 1997. Functional association between CBP and HNF4 in trans-activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 241:664-669.
- Zhong, W., Mirkovitch, J., y Darnell, J.E. 1994. Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol Cell Biol.* 14:7276-7284.
- Zhong, W., Sladek, F.M. y Darnell, J.E. 1993. The expression pattern of a *Drosophila* homologous to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J.* 12:537-544.
- Zhu, Q., Yamagata, K., Miura, A., Shihara, N., Horikawa, Y., Takeda, J., Miyagawa, J., y Matsuzawa, Y. 2003. T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia.* 46:567-573.

14. APÉNDICES

APÉNDICE 1

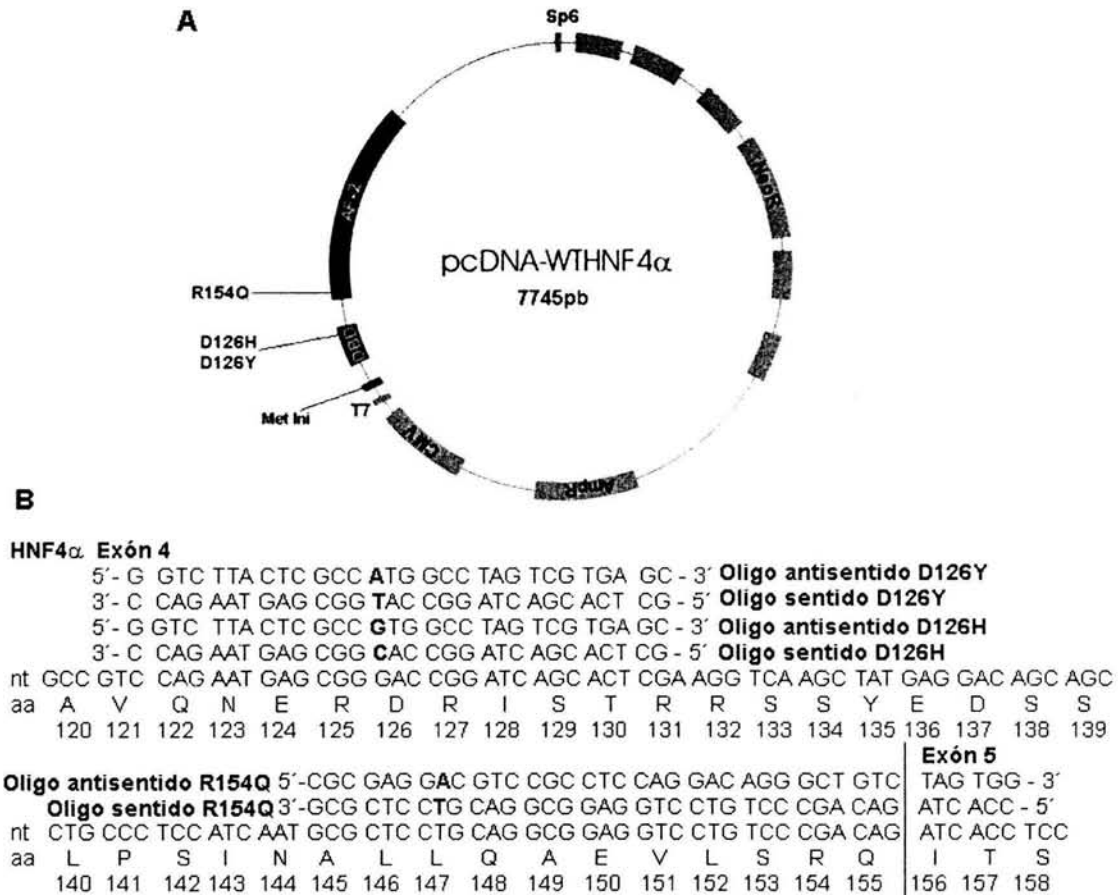


Figura A. Mapa del vector de expresión pcDNA-WTHNF4 α , a partir del cual se generaron los vectores de expresión de las mutantes D126H, D126Y y R154Q de HNF4 α . **Figura B.** Secuencia de nucleótidos y residuos de aminoácidos del exón 4 y parte del exón 5 de HNF4 α . Se muestran la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las mutantes D126H, D126Y y R154Q mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida. En letras negritas se muestran los nucleótidos que fueron modificados para originar los cambios de aminoácidos requeridos. Figura modificada de Domínguez-López (2003).

APÉNDICE 2

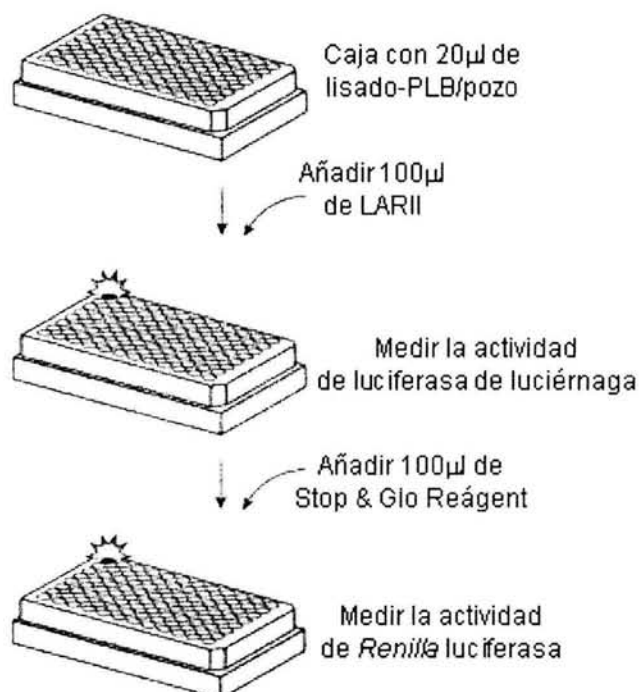
Dual-Luciferase ® Reporter Assay, PROMEGA (Cat.# E1910).

PROTOCOLO:

1. LISIS CELULAR:

- Se retira el medio de cultivo del cultivo celular.
- Se lavan las células 2 veces con PBS. Se retira el PBS.
- Se añade 100µl de solución PLB (Passive Lysis Buffer) 1X por pozo. Cantidad recomendada para una caja de cultivo de 24 pozos.
- Lisis pasiva: se agita la caja de cultivo por 15 minutos.

2. ENSAYO DE LUCIFERASA en una caja de 96 pozos:



LARII: Luciferase Assay Substrate resuspendido en Luciferase Assay Buffer II (Cat.#E1910).

Stop & Glo® Reagent: StopStop & Glo® Substrate disuelto en Stop & Glo® Substrate Solvent. Diluir a 1X en Stop & Glo® Buffer (Cat.#E1910).

APÉNDICE 3

PBS, pH 7.4:

8g NaCl
0.2g KCl
1.4g Na₂HPO₄
0.24g KH₂PO₄

Disolver en 800ml de agua desionizada, ajustar el pH con HCl, y aforar a 1L con agua.

APÉNDICE 4

Amortiguador hipotónico "A":

| Concentración final | Stock | Para 10ml |
|-------------------------|-------|-----------|
| Hepes 10mM pH 7.9 | 1M | 100µl |
| KCl 10mM | 3M | 33.32µl |
| MgCl ₂ 1.5mM | 200mM | 75µl |
| DTT 1mM * | 1M | 10µl |
| H ₂ O | | 9.8ml |

* Adicionar antes de usarse.

APÉNDICE 5

Amortiguador hipertónico "C":

| Concentración final | Stock | Para 10ml |
|-------------------------|-------|-----------|
| Hepes 20 mM pH 7.9 | 1M | 200µl |
| NaCl 0.4M | 1M | 4ml |
| MgCl ₂ 1.5mM | 200mM | 75µl |
| Glicerol 25% | 100% | 2.5ml |
| EDTA 0.2mM | 250mM | 8µl |
| DTT 1mM * | 1M | 10µl |
| PMSF 0.5mM * | 100mM | 50µl |
| H ₂ O | | 3.16ml |

* Adicionar antes de usarse.

APÉNDICE 6

Amortiguador "D":

| Concentración final | Stock | Para 10ml |
|---------------------|-------|-----------|
| Hepes 20 mM pH 7.9 | 1M | 200µl |
| KCl 50mM | 3M | 165µl |
| Glicerol 25% | 100% | 2ml |
| EDTA 0.2mM | 250mM | 8µl |
| DTT 1mM * | 1M | 10µl |
| PMSF 0.5mM * | 100mM | 50µl |
| H ₂ O | | 7.57ml |

* Adicionar antes de usarse.

APÉNDICE 7

PROTOCOLO PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRLAMIDA CON SDS AL 10%.

PREPARACIÓN DE AMORTIGUADORES Y REACTIVOS:

1. Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)

| | | |
|-------|------------------------------|---------------|
| 87.6g | acrilamida | (29.2g/100ml) |
| 2.4g | N´N´-bis-metileno-acrilamida | (0.8g/100ml) |

Llevar a 300ml con agua desionizada. Filtrar y almacenar a 4°C en la oscuridad (máximo 30 días).

2. Tris-HCl 1.5M pH 8.8

| | | |
|--------|------------------|----------------|
| 27.23g | Tris base | (18.15g/100ml) |
| 80ml | agua desionizada | |

Ajustar el pH 8.8 con HCl 6N. Llevar a un volumen total de 150ml con agua desionizada y almacenar a 4°C.

3. Tris-HCl 0.5M pH 6.8

| | |
|------|------------------|
| 6g | Tris base |
| 60ml | agua desionizada |

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 6N. Llevar a un volumen total de 100ml con agua desionizada y almacenar a 4°C.

4. SDS 10% (p/v)

Disolver 10g de SDS en 90ml de agua desionizada, llevar a 100ml.

5. Amortiguador de carga

| | |
|--------|-------------------------------|
| 3.55ml | agua desionizada |
| 1.25ml | Tris-HCl 0.5M pH6.8 |
| 2.5ml | glycerol |
| 2.0ml | SDS10% (p/v) |
| 0.2ml | azul de bromofenol 0.5% (p/v) |
| 9.5ml | Volumen total |

Almacenar a temperatura ambiente.

USO: añadir 50µl de β-Mercaptoetanol a 950µl del amortiguador de carga antes de usar.

6. Amortiguador de corrida 10X, pH 8.3

30.3g Tris base
144.0g glicina
10.0g SDS

Disolver y llevar a un volumen total de 1L con agua desionizada. No debe ajustarse el pH con ácido o base. Se almacena a 4°C.

USO: se debe preparar a 1X.

7. Persulfato de amonio 10%

Disolver 100mg persulfato de amonio en 1ml de agua desionizada. Debe prepararse justo antes de usarse.

PREPARACIÓN DEL GEL:

| GEL ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA 10% | | GEL CONCENTRADOR | |
|----------------------------------|--------|--------------------------|--------|
| • Acrilamida-bis 30:0.8% | 5ml | • Acrilamida-bis 30:0.8% | 1.67ml |
| • Tris-HCl 1.5M pH 8.8 | 3.75ml | • Tris-HCl 0.5M pH 6.8 | 2.5ml |
| • H ₂ O | 6.1ml | • H ₂ O | 5.7ml |
| • SDS 10% | 150µl | • SDS 10% | 100µl |
| • TEMED | 10µl | • TEMED | 10µl |
| • Persulfato de amonio | 50µl | • Persulfato de amonio | 100µl |

Una vez montados los vidrios, se aplica primeramente el gel al 10%. Se gelifica de 30 a 45 min. Luego, se añade el gel concentrador y se coloca el peine. Gelificar por 30min. Montar los geles en la cámara de electroforesis.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Se colocan en un tubo de 0.5ml:

- 30µg de proteínas nucleares (extracto nuclear)
- Volumen equivalente del amortiguador de carga

Las muestras son calentadas a 95°C por 5min. Luego se colocan en hielo mientras se cargan.

ELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS:

CONDICIONES: Aproximadamente 2½ horas a 80V.

APÉNDICE 8

TRANSFERENCIA:

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA (Tris base 25M, glicina 192M, metanol 20%)

3.03g Tris base
14.4g glicina
200ml metanol

Ajustar a 1L con agua desionizada. No es necesario ajustar el pH, debe estar por arriba del pH 8.0 (generalmente está a pH 8.2). Si está por debajo de este valor, debe desecharse. Almacenar a 4°C.

CONDICIONES: La transferencia se realiza a 100V durante 1hr a 4°C.

APÉNDICE 9

SOLUCION BLOTTO 5% (PBS, TWEEN 1% y leche en polvo al 5%)

Para 100ml:
100ml PBS pH 7.4
100µl TWEEN
5g de la leche en polvo descremada

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE 10

Anticuerpo contra el factor nuclear de hepatocitos 4 o HNF4 humano (Geneka Biotechnology).

El anticuerpo policlonal de conejo HNF4, purificado por afinidad, fue generado contra el péptido DYINDRQYDSRGRE inmunizado. Este péptido se deriva de los residuos de aminoácido 312-325 de la secuencia de la proteína humana de HNF4 (Geneka Biotechnology). Como se sugiere en el protocolo de manufactura, para el “western blot” se utilizó como control positivo extractos nucleares de hígado de rata. Este control se detecta como una banda de 50-54kDa (Figura 1). Las proteínas HNF4 α 2 expresadas *in vitro* en las diferentes líneas celulares utilizadas en el presente estudio, se detectaron como bandas con un peso molecular aproximado a 50kDa. Siempre se corrió en el gel un marcador de peso molecular (BENCHMARK™ Prestained Protein Ladder, GIBCO BRL).

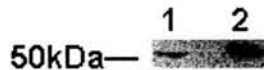


Figura 1. Ejemplo de un “western blot” utilizando un control positivo. 1) Banda detectada con células RINm5F transfectadas con HNF4 α tipo silvestre (30 μ g). 2) Banda (HNF4 α) detectada con el control positivo (20 μ g de extractos nucleares hepáticos de rata).

APÉNDICE 11

Resultados de la actividad de unión de las mutantes de HNF4 α D126H, D126Y y R154Q en células RINm5F (resultados preliminares*).

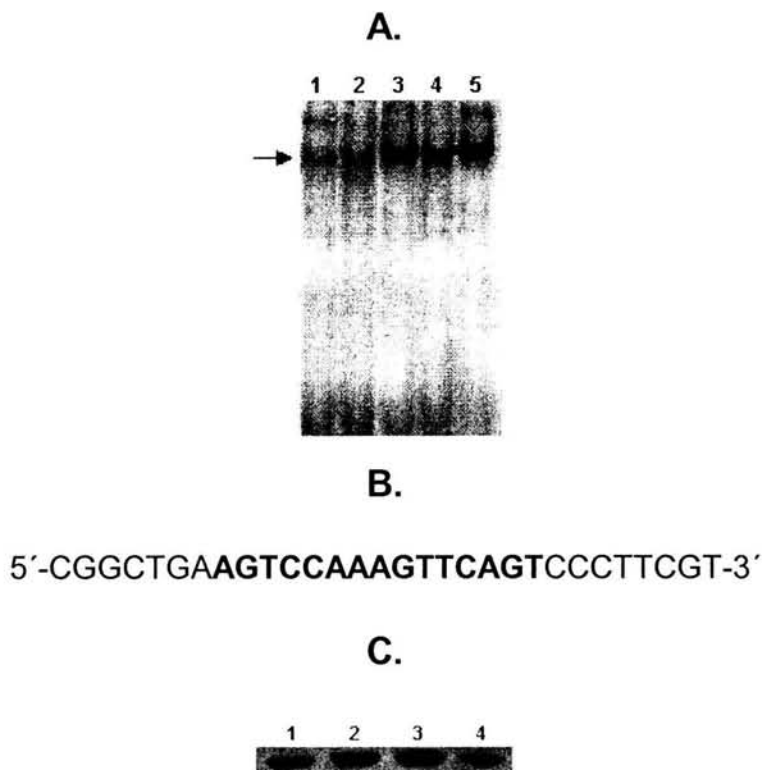


Figura A. Actividad de unión al DNA de las mutantes D126H, D126Y y R154Q de HNF4 α . Se realizó un ensayo de retardo en gel sobre el elemento de respuesta para HNF4 α del promotor de HNF1 α humano utilizando extractos nucleares de células β -pancreáticas RINm5F transfectadas con las proteínas D126H (2), R154Q (3), D126Y (4), y tipo silvestre (5). En 1 se emplearon extractos nucleares de células RINm5F sin transfectar. La flecha indica el complejo DNA-HNF4 α . **Figura B.** Secuencia del oligonucleótido utilizado como sonda. Se indican en letras negras las bases que corresponden al sitio de unión de HNF4 α . **Figura C.** Control de las cantidades de HNF4 α por "western blot": D126H (1), R154Q (2), D126Y(3) y R154Q (4).

***NOTA:** La actividad de unión al DNA de las mutantes en las células β pancreáticas RINm5F se estudió con un ensayo de retardo en gel, en el cual, el elemento de respuesta de HNF4 α en el promotor HNF1 α (Figura B) fue marcado radiactivamente e incubado con los extractos nucleares de las células trabajadas. En este ensayo, si HNF4 α está presente, la migración del oligonucleótido marcado en el gel se reduce y aparece una banda retardada (complejo HNF4 α -DNA). Si observamos la figura A, podemos corroborar que HNF4 α es expresado en las células RINm5F (A1) y que es sobrepresado en A2-A5. Las diferencias

observadas en la densidad de las bandas en A2 (HNF4 α D126H) y en A4 (HNF4 α D126Y) con respecto a la banda en A5 (HNF4 α tipo silvestre transfectada) no se deben a diferencias en la cantidad de proteínas expresadas (Figura C), y pueden deberse a defectos en la unión al DNA de las mutantes en el residuo D126. Estos experimentos son presentados como preliminares porque se requiere confirmar la especificidad de la unión de HNF4 α , por ejemplo, realizando ensayos "supershift". Para esto se requiere incubar el extracto nuclear con un anticuerpo específico para HNF4 α , esto debe ocasionar un mayor retardo de la banda del complejo HNF4 α -DNA debido a que se incrementa el peso molecular del complejo.