



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y
BIOPROCESOS

**“Desarrollo de un ensayo diagnóstico
para malaria (*Plasmodium falciparum* y/o
Plasmodium vivax), que involucra el uso de
sondas que incorporan un switch molecular
acoplado a un sistema generador de
señalamiento exponencial, por medio de la
replicasa del fago Q β ”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

Maria Isabel Tussié Luna

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Paul M. Lizardi



CUERNAVACA, MORELOS

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, HERMANOS Y SOBRINOS

ESPECIALMENTE A TI “MAC” QUE HAS COMPARTIDO TANTO CONMIGO

TAMBIEN A TI “GABY”

A TODOS Y CADA UNO DE MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO Y AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Paul M. Lizardi por su dirección, sus consejos, sus críticas y su apoyo durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Fred R. Kramer por sus brillantes contribuciones y por permitirnos colaborar con él.

Agradezco especialmente al Dr. Alejandro Alagón Cano por su invaluable ayuda para la obtención de mi grado de doctor.

A los miembros del jurado por todo lo que eso implica: Dr. Alejandro Alagón Cano, Dra. Carmen Gómez Eichelmann, Dr. Mario E. Zurita Ortega, Dra. Hilda M. Lomelí Buyoli y Dr. Juan Miranda Rios.

En especial a la Dra. Laurence Colin, a la Q.F.B. Georgina Estrada, al Dr. Sanjay Tyagi y al Dr. David Zhang, por su invaluable ayuda.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Paul M. Lizardi.

Durante la realización de este trabajo la sustentante fué becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Candidato a Investigador por el Sistema Nacional de Investigadores.

INDICE

PRIMERA PARTE

“Desarrollo de un ensayo diagnóstico para malaria (*Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax*), que involucra el uso de sondas que incorporan un switch molecular acoplado a un sistema generador de señalamiento exponencial, por medio de la replicasa del fago Q β ”

RESUMEN

INTRODUCCION	p. 1
JUSTIFICACION	p. 9
OBJETIVO GENERAL	p. 13
OBJETIVOS PARTICULARES	p. 13
MATERIALES Y METODOS	p. 14
a) Enzimas	p. 14
b) Moléculas blanco y sondas sintéticas:	
Oligonucleótidos de DNA utilizados como blancos artificiales	p. 14
RNAs ribosomales utilizados como blancos artificiales	p. 14
Oligonucleótidos de DNA utilizados como sondas artificiales	p. 16
c) Switches moleculares	p. 16
d) Templados de cadena sencilla (3' -> 5'): promotor para la T7 RNA polimerasa seguido por el cDNA para el templado replicable, MDV-1-poly4 o MNV-11:	
M13cadena sencilla-T7-MDV-poly4 (clona16).	p. 17
Templado obtenido por ligación sobre una secuencia guía (MNV-11).	p. 18
Templado de cadena sencilla que contiene un grupo amino en el extremo 3' (MNV-11mut).	p. 19
e) Sondas de captura	p. 19
f) Partículas magnéticas:	
Partículas magnéticas con oligo (dT) ₂₅ , Gene-Trak Systems (GTS).	p. 20

Partículas magnéticas con oligo (dT) ₂₅ , Dynal (Dynabeads).	p. 20
Partículas magnéticas con oligo (dT) ₂₀ , Advanced Magnetics.	p. 20
Partículas magnéticas con estreptavidina, Promega.	p. 20
Partículas magnéticas con estreptavidina, Dynal (M-280).	p. 21
Poliadenilación o biotilación de las sondas de captura.	p. 21
Transcripción <i>in vitro</i> .	p. 21
Replicación.	p. 22
Geles de retardamiento en presencia de Mg ⁺⁺ .	p. 22
Mfold 2.0: Predicción de estructuras secundarias subóptimas de RNA por minimización de energía.	p. 23
Mfold 3.2: Predicción de estructuras secundarias de RNA por minimización de energía.	p. 23
Protocolo del ensayo (Ver Esquema General, Fig. 9).	p. 23
RESULTADOS	p. 25
I. Montando <i>in vitro</i> el funcionamiento de un switch molecular que generará señal únicamente, como función de la presencia de DNA o RNA blanco.	
1) Diseño de switches moleculares que contienen una sonda de detección para <i>P. falciparum</i> o <i>P. vivax</i> , sondas de captura y templado de cadena sencilla que contiene el cDNA para el templado replicable, MNV-11.	p. 25
2) Construcción de los plásmidos que contienen el cDNA para el RNA 18S de la fase asexual de <i>Plasmodium falciparum</i> o de <i>Plasmodium vivax</i> y la obtención de blancos artificiales por transcripción <i>in vitro</i> .	p. 29
3) Monitoreo del estado abierto o cerrado de los switches moleculares para <i>P. falciparum</i> por hibridación al blanco y al templado de cadena sencilla (MDV-1-poly4) en experimentos de extensión con Klenow.	p. 30
4) Transcripción y replicación simultánea del templado de cadena sencilla, MDV-1-poly4.	p. 31
5) Evaluación de la interacción entre las distintas sondas, en geles de retardamiento.	p. 31

II. Implementación de un ensayo modelo de hibridación para la detección de blancos artificiales de <i>Plasmodium falciparum</i> y/o <i>Plasmodium vivax</i> en combinación con el sistema de amplificación de señal por medio de la Q β replicasa.	
1) Eficiencia de captura y elución de oligos de captura sólo o poliadenilados en condiciones de hibridación con GuSCN en función de la cantidad de partículas magnéticas y su capacidad de unión.	p. 32
2) Cinética de captura y eficiencia de captura-elución del RNA blanco a partículas magnéticas por medio de oligos de captura poliadenilados en condiciones de hibridación con GuSCN.	p. 33
3) Cinética de captura y eficiencia de captura-elución de los switches a partículas magnéticas por medio de su hibridación al RNA blanco y éste a su vez, a los oligos de captura poliadenilados en condiciones de hibridación con GuSCN.	p. 35
4) Ensayo de hibridación en soluciones de isotiocianato de guanidinio del switch molecular en presencia o ausencia del RNA blanco artificial, captura a partículas magnéticas, lavados y elución específica del templado de cadena sencilla, así como su transcripción y replicación.	p. 36
5) Implementaciones al mismo formato y límite de sensibilidad del ensayo.	p. 37
 DISCUSION	 p. 38
 REFERENCIAS	 p. 44

SEGUNDA PARTE

“Bioquímica y biología de los factores de transcripción, TFII-I y BEN, implicados en el Síndrome de Williams-Beuren”

INTRODUCCION p. 53

REFERENCIAS p. 65

ARTICULOS PRESENTADOS:

1. **Tussie-Luna MI**, Bayarsaihan D, Ruddle FH and Roy, AL (2001). Repression of TFII-I -dependent transcription by nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7789-7794.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=1438732>
2. **Tussie-Luna MI**, Bayarsaihan D, Seto E, Ruddle FH and Roy AL. (2002). Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family of proteins and PIAS α / β . *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12807-12812.
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/277/45/43185>
3. **Tussie-Luna MI**, Michel, B, Hakre S and Roy AL. (2002). The SUMO ubiquitin-protein isopeptidase ligase family member Miz1/PIAS α / β /Siz2 is a transcriptional cofactor for TFII-I. *J Biol Chem* 277, 43185-43193.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=12239342>

RESUMEN

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad de los ensayos de hibridación de DNA acoplados al sistema generador de señal exponencial con la replicasa de Q-beta diseñamos un esquema que utiliza “switches moleculares”. Un switch molecular en su estado cerrado forma un tallo y asa consigo mismo. El tallo contiene la secuencia promotora para la T7 RNA polimerasa y el asa, la secuencia que sirve como sonda. Cuando el switch se une al blanco, éste se abre y expone la secuencia que contiene la cadena superior del promotor de T7. En la misma solución se encuentra un DNA de cadena sencilla que contiene la cadena inferior del promotor de T7 localizado frente al cDNA del RNA replicable. Este DNA de cadena sencilla se une específicamente a la secuencia expuesta del switch abierto. Una incubación simultánea con la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q-beta, genera el RNA replicable. Los switches que no se unen al blanco permanecen cerrados y no generan señal.

En este trabajo, se diseñaron 7 switches moleculares que contienen sondas detectoras complementarias a secuencias conservadas del RNA ribosomal 18S de la etapa sanguínea de *Plasmodium*, 4 para *P. falciparum* y 3 para *P. vivax*. Se evaluó su funcionamiento en experimentos de extensión con Klenow y en geles de retardamiento. Tres de ellos, PfAsw4, PvAsw1 y PvAsw3, mostraron una buena eficiencia de apertura específica en presencia del oligonucleótido blanco e hibridaron al templado de cadena sencilla. Se utilizó el switch PfAsw4, en ensayos de hibridación en soluciones de isotiocianato de guanidinio que contenían como blanco, el RNA ribosomal 18S de PfA, dos sondas de captura y el templado de cadena sencilla y se encontró una señal:ruido de aproximadamente 10:1. Inesperadamente, el templado de DNA de cadena sencilla que se quedaba pegado de manera inespecífica y luego, se eluía, servía como templado tanto para la T7 RNA polimerasa como para la Q-beta replicasa, disminuyendo grandemente la sensibilidad del ensayo.

RESUMEN

Existe un gran interés en la implementación de mejores técnicas para la detección de patógenos de tipo parasitario, bacteriano y viral ya que mejorarán las perspectivas de un monitoreo epidemiológico eficiente y una intervención médica más efectiva.

En colaboración con el Dr. Fred R. Kramer del Instituto de Salud Pública de Nueva York, nuestro laboratorio desarrolló nuevas metodologías en el área de ensayos de hibridación de DNA acoplados a sistemas generadores de señal exponencial altamente sensibles, que podían detectar unos cuantos blancos en muestras biológicas. El sistema que utilizamos tomó ventaja de una reacción de amplificación de RNA que ocurre a 37°C, la reacción de replicación de la replicasa de Q-beta. El uso de la replicación de un templado de RNA como la base de un sistema generador de señal exponencial ofrece un gran número de ventajas: a) la replicasa de Q-beta es altamente específica para sus propios templados de RNA (RNA del fago Q-beta, RNA MDV-1, RNA MNV-11, RNA NV, etc); b) cantidades tan pequeñas como una molécula de templado, puede iniciar un ciclo de amplificación; c) la cantidad de RNA sintetizado en una reacción corta (típicamente, 200 ng en 15 min en 25 ul) es tan grande que puede ser medido con la ayuda de técnicas colorimétricas o fluorométricas sencillas.

Entre los primeros esquemas que se diseñaron, estaba la unión covalente de una sonda detectora oligonucleotídica de cadena sencilla a un RNA replicable que después de hibridar, pudiera ser amplificado exponencialmente. Si una sola molécula de RNA produce una cantidad detectable de RNA producto en una reacción de amplificación de 15 minutos, en principio, se podrían detectar un número extremadamente pequeño de secuencias sonda y por lo tanto, de moléculas blanco. En una segunda generación del mismo esquema, la secuencia sonda se introdujo dentro de la secuencia del RNA replicable, pero hubo que determinar cuál de los RNAs recombinantes eran bifuncionales en el sentido que, hibridaran específicamente a sus secuencias blanco y retuvieran la capacidad de ser amplificados exponencialmente por incubación con la replicasa de Q-beta (en promedio, 1 de cada 4). Así, se utilizaron sondas de RNA recombinante replicable específicas para HIV-1, en un ensayo modelo diseñado para la detección del RNA mensajero del gene *pol*. En ese esquema, las sondas de RNA recombinante que hibridaron al blanco se separaron de las sondas que no hibridaron, por la técnica de

lavados conocida como, ciclado reversible del blanco. Esa técnica involucra el uso de una segunda sonda (sonda de captura) cuya función es la de inmovilizar al híbrido a un soporte sólido. En ese ensayo, se realizaron tres ciclos de pegado a partículas magnéticas, lavados, elución e incubación con la replicasa de Q-beta. Los resultados indicaron que el límite de detección fué de aproximadamente 10,000 moléculas de blanco y que este número estuvo determinado por la señal generada por las sondas pegadas de manera inespecífica que no fueron eliminadas eficientemente durante los lavados.

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad de los ensayos de amplificación con la replicasa de Q-beta, prescindir del requisito de obtener RNAs recombinantes bifuncionales y disminuir el ruido de fondo causado por la persistencia de las sondas pegadas de forma inespecífica, se diseñaron esquemas en los que se introdujo un paso extra en la serie de pasos que lleva a la amplificación del RNA, con la condición de que este paso ocurriera sólo y únicamente, si la sonda se hubiese unido específicamente a su blanco. Este modelo es el que utiliza “switches moleculares” y es el que constituye el cuerpo de trabajo de esta tesis. Un switch molecular en su estado cerrado forma un tallo y asa consigo mismo. El tallo esta formado por dos secuencias complementarias, localizadas cada una en los extremos de la molécula y el asa contiene la secuencia que servirá como sonda. Cuando la sonda del switch hibrida con el blanco, el switch adquiere una posición abierta. La unión de la sonda al blanco produce un cambio conformacional del switch molecular (la apertura del tallo de cadena doble) tal que, únicamente las sondas unidas al blanco pueden generar señal. Las sondas que no se unen específicamente al blanco permanecen cerradas y de esta forma, no generan señal. En este ensayo, la generación de la señal ocurre de la siguiente forma: al unirse el switch al blanco, éste se abre y expone una secuencia de aproximadamente 20 nt de cadena sencilla que contiene 15 nucleótidos de la cadena superior del promotor para la T7 RNA polimerasa. En la misma solución se encuentra una molécula de DNA de cadena sencilla que contiene la cadena inferior del promotor de T7, localizado frente al cDNA del RNA replicable. Este DNA de cadena sencilla se une específicamente a la secuencia de 20 nucleótidos del switch abierto. Una incubación simultánea en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q β , resulta en la generación del RNA replicable, por transcripción y subsecuente replicación. La detección del RNA producido, puede

realizarse por métodos fluorogénicos simples. Un aspecto importante es la utilización del esquema de hibridación en “sandwich”, el cual involucra el uso de una sonda de captura cuya función es la de inmovilizar al híbrido a un soporte sólido para permitir el lavado de las sondas no hibridadas.

En este trabajo, se diseñaron 7 switches moleculares que contenían sondas detectoras complementarias a secuencias conservadas del RNA ribosomal 18S de la etapa sanguínea de *Plasmodium*, 4 para *P. falciparum* y 3 para *P. vivax*. Se evaluó el funcionamiento de estos switches moleculares en experimentos de extensión con Klenow y en geles de retardamiento en lo referente a que se abrieran específicamente en presencia del blanco e hibridaran con el templado de cadena sencilla que contenía el promotor para la T7 RNA polimerasa y el cDNA para el templado replicable. Tres de ellos, PfAsw4, PvAsw1 y PvAsw3, mostraron una buena eficiencia de apertura específica en presencia del oligonucleótido blanco complementario e hibridaron al templado de cadena sencilla. Se utilizó el switch PfAsw4, en ensayos de hibridación en soluciones de isotiocianato de guanidinio que contenían como blanco, el RNA ribosomal 18S de PfA, dos sondas de captura y el templado de cadena sencilla y se encontró una señal:ruido de aproximadamente 10:1. En teoría, aún cuando se quedaran pegadas de manera inespecífica las moléculas de templado de cadena sencilla a las partículas magnéticas y se eluyeran, no deberían de funcionar como sustratos para la T7 RNA polimerasa y mucho menos para la replicasa de Q-beta. Sin embargo, encontramos que los templados de DNA de cadena sencilla que contenían la secuencia inferior del promotor para la T7 RNA polimerasa, eran buenos sustratos para la T7 RNA polimerasa (datos no mostrados) y por otro lado que, la replicasa de Q-beta también podía utilizar DNAs (de cadena doble o de cadena sencilla) que codifican para RNAs replicables, como templados para producir RNA bajo condiciones estándar de replicación (datos no mostrados). Así, el templado de cadena sencilla que se quedaba pegado de manera inespecífica y luego, se eluía, generaba una fuente importantísima de “background”, lo cual disminuyó considerablemente la sensibilidad de nuestro ensayo e hizo imposible el funcionamiento de este ensayo diagnóstico en particular.

INTRODUCCION

Existe un gran interés en la implementación de mejores técnicas para la detección de patógenos de tipo parasitario, bacteriano y viral ya que constituyen un gran problema de salud pública, especialmente en los países en vías de desarrollo. En México, enfermedades tales como la malaria, la amibiasis, la tuberculosis, la fiebre tifoidea o el SIDA (HIV-1) constituyen una de las mayores preocupaciones en el área de salud pública. Actualmente, no hay estrategias de vacunación efectivas que prevengan el contagio de estas enfermedades. La disponibilidad de mejores herramientas diagnósticas, mejorará las perspectivas de un monitoreo epidemiológico eficiente y una intervención médica más efectiva.

Mientras las pruebas serológicas son herramientas epidemiológicas útiles, no indican necesariamente la presencia del agente infeccioso en pacientes que han estado en contacto con *Plasmodium vivax*, *Entamoeba histolytica*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Salmonella typhi*. En el caso del SIDA, una prueba serológica puede dar un resultado negativo en pacientes que no han estado expuestos el tiempo suficiente como para desarrollar anticuerpos anti-HIV-1. La detección de cualquiera de estos agentes infecciosos en sangre, heces o saliva, según sea el caso, es relativamente difícil, especialmente en el caso de la fiebre tifoidea o el SIDA. Durante una fiebre tifoidea activa, pueden encontrarse tan sólo 2 bacterias por ml de sangre mientras que únicamente, una célula mononuclear en un millón podría estar infectada con el HIV-1 en sangre periférica (Tabla 1). De esta forma, los ensayos de detección deben ser lo suficientemente sensibles para detectar una sola célula infectada por muestra.

Es bien conocida la utilización de ácidos nucleicos como sondas de hibridación en distintos tipos de bioensayos. En términos generales, un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos involucra, la separación de las cadenas nucleotídicas de la muestra (por fusión), la fijación de las cadenas de DNA a una membrana de nitrocelulosa o a un soporte sólido, la introducción de una secuencia probadora o sonda que es complementaria a una secuencia única en la muestra (blanco), un periodo de incubación que permita la hibridación de la sonda con el blanco, el lavado de las sondas no hibridadas y la detección de la sonda unida al blanco mediante el uso de diferentes técnicas de

Tabla 1. Sensibilidad requerida para la detección de agentes infecciosos en muestras de sangre de 25 μ l

Patógeno	Número de agentes patógenos	Número de moléculas de DNA	Número de moléculas de RNA
<i>Plasmodium falciparum</i> (Gene MDR) (Gene DHFR-TS)	1000*	2 x 10 ⁶ 4 x 10 ³ 2 x 10 ³	8 x 10 ⁷ * 2 x 10 ⁴ 1 x 10 ⁴
<i>Plasmodium vivax</i>	50**	1 x 10 ⁴	4 x 10 ⁶ *
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0.01?***	1 x 10 ³	1 x 10 ³
Virus HIV-1	1000	1 x 10 ³	2 x 10 ⁴
<i>Salmonella typhi</i>	0.5****	1?	5 x 10 ³

* Un parásito contiene al menos 80,000 moléculas de RNA ribosomal 18S.

** La sensibilidad del método de frotis de sangre (gota gruesa) permite la detección de 10 a 20 parásitos por μ l, entre 250 y 500 parásitos en 25 μ l.

*** Asumiendo al menos 1 parásito en 2.5 ml y solubilizando la muestra para analizar una alícuota de 25 μ l.

**** Asumiendo 20 bacterias por ml y solubilizando ésto para analizar una alícuota de 25 μ l.

generación de señal, las cuales influyen de una manera importante en la sensibilidad del ensayo (Gillespie y Spiegelman, 1965).

Se han utilizado varios esquemas para la detección de las sondas. En unos esquemas, la sonda se pega covalentemente a grupos reporteros fácilmente detectables, como serían a grupos fosfato marcados con [³²P] o ciertas moléculas orgánicas fluorescentes. Estos métodos de detección tienen un límite de sensibilidad de aproximadamente un millón de blancos por muestra. En otros, la sonda es acoplada a un sistema generador de señal, como serían reacciones enzimáticas con enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina, que cuando se incuban con sus substratos, producen un producto colorimétrico fácilmente detectable o a DNAs ramificados acoplados a reacciones enzimáticas (Urdea y col., 1987). Tal amplificación reduce el número de blancos que pueden ser detectados, aunque en la práctica, la unión inespecífica de la sonda ha limitado la sensibilidad de este método a entre 100,000 y 60,000 moléculas de blanco, respectivamente (sólo un orden de magnitud mejor comparado al uso de indicadores radioactivos). Otro acercamiento, ha sido la detección de blancos que se encuentran varias veces repetidos (detección de secuencias específicas dentro de elementos de DNA repetido) (González y col., 1984) o que naturalmente se encuentran en multicopia en el microorganismo a detectar (como son los genes multicopia y sus transcritos o los RNAs ribosomales) (Tabla 1).

Avances recientes en la biología molecular también han hecho posible la amplificación exponencial de secuencias blanco *in vitro* [reacción en cadena de polimerasa, PCR (Mullis y Fallona, 1987; Saiki y col., 1988); reacción en cadena de ligasa, LCR (Wu y Wallace, 1989); amplificación por desplazamiento de cadena, SDA (Walter y col., 1992); amplificación por “rolling circle”, RCA (Fire y Xu, 1995; Liu y col., 1996; Lizardi y col., 1998; Schweitzer y col., 2000)], abriendo nuevas perspectivas para las tecnologías de ensayos diagnósticos. Se han utilizado con éxito técnicas de amplificación exponencial para la detección de agentes infecciosos en tejidos humanos o en secreciones. Con la técnica de PCR, se pueden generar aproximadamente 3 millones de copias de la secuencia específica de DNA o RNA para el patógeno de interés. De esta forma, se puede detectar al patógeno inequívocamente, aún cuando el número de ácidos nucleicos específicos para el patógeno esté presente en el rango de 10 a 100 moléculas.

A pesar de su extraordinaria sensibilidad y especificidad, los ensayos de PCR son relativamente complejos y presentan algunos problemas: a) requieren de un paso de amplificación de aproximadamente 2-3 hr y usan un instrumento de ciclado de temperaturas; b) normalmente requieren de un paso extra de hibridación para detectar los ácidos nucleicos amplificados o la incubación con un intercalador de ácidos nucleicos fluorescente y más recientemente, si la detección ha de ser en tiempo real, requiere de la hibridación de una sonda extra que contenga una molécula fluorescente en un extremo y una molécula quencheadora en el otro y que genere señal únicamente como función de la amplificación del blanco (“Taqman probes”, Applied Biosystems) ; c) requieren del uso de un estándar interno, si el ensayo ha de cuantificar el número de blancos en la muestra; d) requieren la implementación de medidas de aislamiento y de anti-contaminación para prevenir la dispersión y/o acumulación de los productos de amplificación en el laboratorio, que si no se monitorean constantemente, pueden dar lugar a resultados falsos-positivos.

En colaboración con el Dr. Fred R. Kramer del Instituto de Salud Pública de Nueva York, nuestro laboratorio desarrolló nuevas metodologías en el área de ensayos de hibridación acoplados a sistemas generadores de señal exponencial altamente sensibles, que podían detectar unos cuantos blancos en muestras biológicas. El nuevo sistema generador de señalamiento exponencial que seleccionamos tomó ventaja de una reacción de amplificación de RNA bien caracterizada que ocurre a 37°C, la reacción de replicación de la Q β replicasa, una RNA-polimerasa RNA-dirigida del bacteriofago Q β . La replicasa de Q β es una enzima de 215 KDa, formada por 4 subunidades, una codificada por el RNA viral y las otras tres, son proteínas de *E. coli* que corresponden a los factores de elongación Tu y Ts y a la proteína ribosomal S1 (Blumenthal y col., 1972; Wahba y col., 1974). El uso de la replicación de un templado de RNA como la base de un sistema generador de señal exponencial ofrece un gran número de ventajas: a) la replicasa de Q β es altamente específica para sus propios templados de RNA (RNA del fago Q β , RNA MDV-1, RNA MNV-11, RNA NV, etc) (Haruna y Spiegelman, 1965a); b) cantidades tan pequeñas como una molécula de templado, puede iniciar un ciclo de amplificación (Levisohn y Spiegelman, 1968); c) la cantidad de RNA sintetizado en una reacción corta

(típicamente, 200 ng en 15 min en 25 ul) es tan grande que puede ser medido con la ayuda de técnicas colorimétricas o fluorométricas sencillas (Haruna y col., 1965b).

La replicasa de Q β copia sus propios templados de RNA y produce cadenas complementarias producto en apenas 12 segundos (Dobkin et al., 1979; Miele et al., 1983; Nishihara et al., 1983). Como las cadenas hijas son también templados para la replicasa de Q β , la producción de RNA procede exponencialmente mientras hay un exceso de enzima. Pero una vez que, el número de cadenas de RNA iguala el número de moléculas de replicasa activa, la síntesis de RNA procede linealmente. Si una sola molécula de RNA puede producir una cantidad detectable de RNA producto en una reacción de amplificación de 15 mins en principio, se podrían detectar un número extremadamente pequeño de secuencias sonda y por lo tanto, de moléculas blanco.

Entre los primeros esquemas que se diseñaron para la detección de agentes infecciosos que se encuentran en muy poca cantidad por muestra, estaba la unión de una sonda oligonucleotídica de cadena sencilla a un RNA replicable que, después de hibridar pudiera ser amplificado exponencialmente. Si después que la sonda se une al blanco, se requiriera separar a la sonda de la señal replicable para proceder a la amplificación, se contemplaron varios mecanismos que dependían de la forma en que la sonda y el RNA replicable estuvieran unidos. Una posibilidad es que fueran moléculas independientes que se unieran por enlaces disulfuro y que luego, fueran separadas por reducción con dithiothreitol (Fig. 1) (Chu y col., 1986).

En una segunda generación del mismo esquema, la secuencia sonda se introdujo dentro de la secuencia del RNA replicable (Fig. 2) (Lizardi y col., 1988). El sitio que se escogió para insertar la secuencia sonda dentro del RNA replicable MDV-1, se sabía que localizaba en el exterior de la molécula, donde la presencia de la secuencia insertada era menos probable que interfiriera con la replicación y donde, era menos probable que el resto de la molécula interfiriera con la hibridación de la secuencia sonda a su blanco. Hubo que demostrar que los RNAs recombinantes resultantes fueran bifuncionales en el sentido que, hibridaran específicamente a sus secuencias blanco complementarias y también, retuvieran la capacidad de ser amplificados exponencialmente por incubación con la replicasa de Q β (Lizardi y col., 1988 y Tussié-Luna, M.I., Tesis de Maestría, 1992).

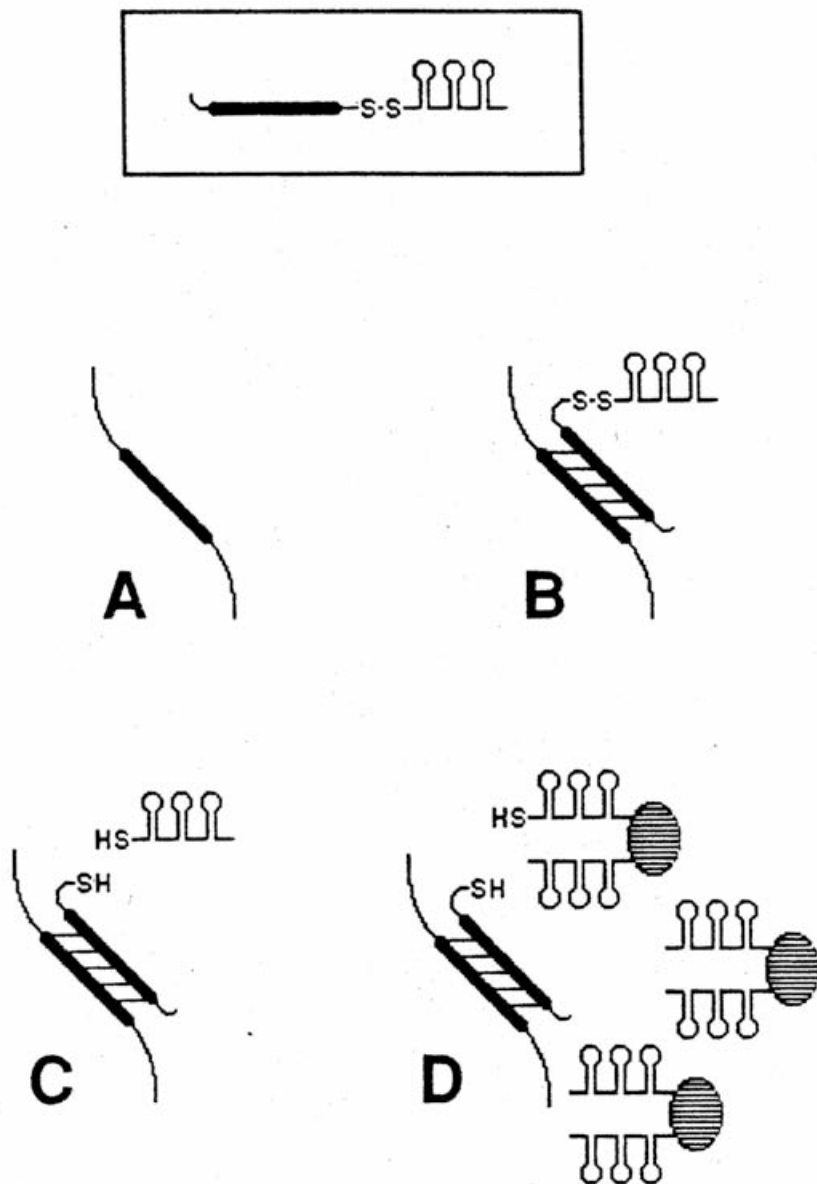


FIGURA 1. Uso de aductos sonda-templado unidos covalentemente. El símbolo del aducto sonda-templado consiste de un DNA de cadena sencilla que contiene una secuencia sonda (mostrado como una línea que contiene un segmento engrosado) unido covalentemente, vía un enlace disulfuro (-S-S-), al RNA MDV-1 (representado por una línea doblada en tres tallos y asas). Se prepara el DNA de cadena sencilla que contiene la secuencia blanco (panel A). Luego se hibrida a este DNA el aducto sonda-templado (panel B). Después de lavar los aductos sonda-templado no unidos, se rompe la unión disulfuro por incubación con ditionthreitol (panel C). Los templados de RNA liberados son amplificados exponencialmente por incubación con la replicasa de Q β (panel D).

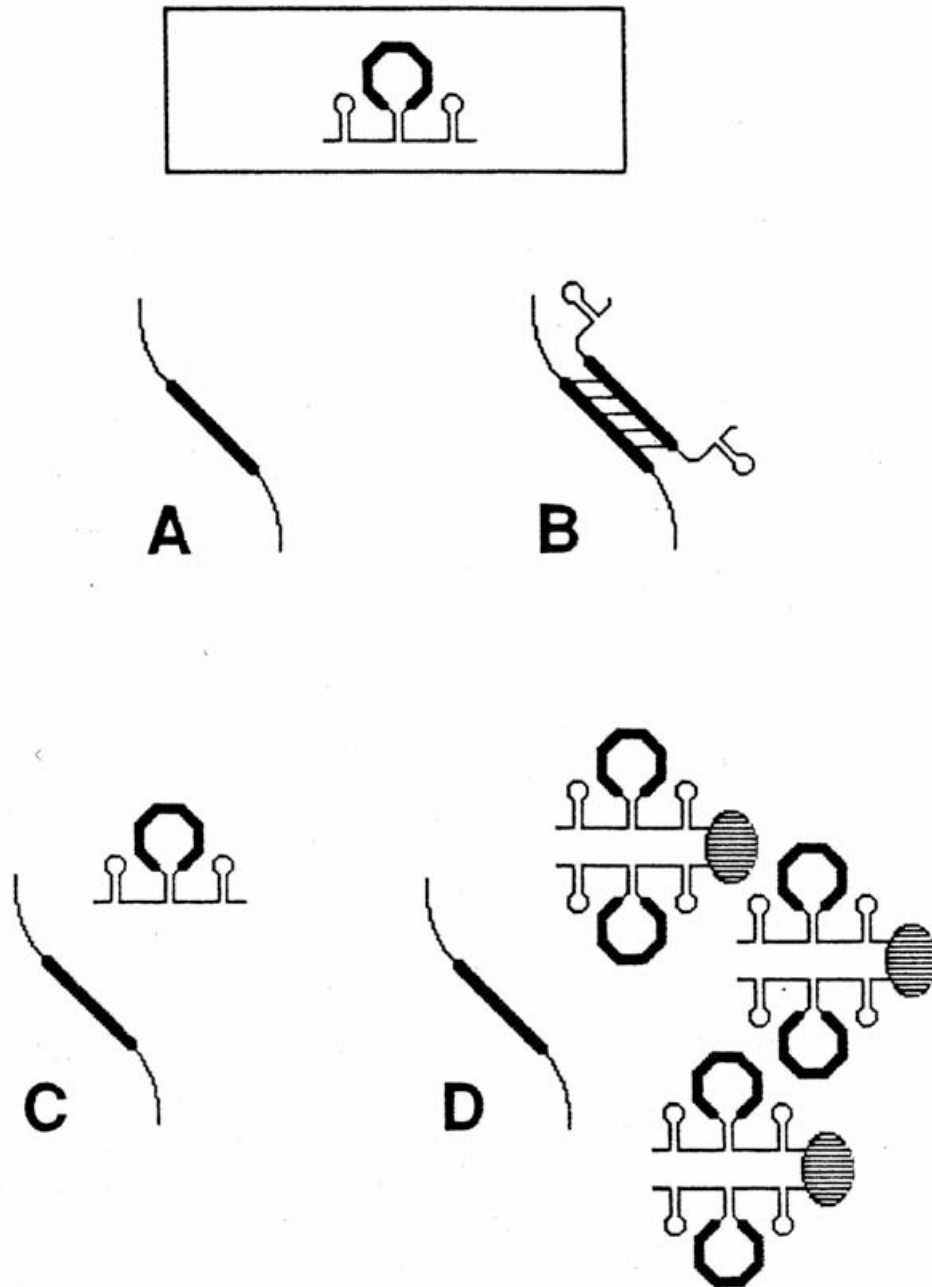


FIGURA 2. Uso de sondas de RNA recombinante. El símbolo de la sonda de RNA recombinante esta formado por una molécula de RNA MDV-1 (representada por una línea doblada en tres tallos y asas), a la cual se le ha insertado una secuencia detectora (que se muestra como un semicírculo engrosado). Se prepara la secuencia blanco de cadena sencilla (panel A). Se hibrida la sonda de RNA recombinante al blanco, el cual puede ser RNA o DNA (panel B). Después de lavar las sondas de RNA no unidas, se liberan las sondas hibridadas específicamente al blanco con calor (panel C). Luego, las sondas de RNA recombinantes liberadas son amplificadas exponencialmente por incubación con la replicasa de Q β (panel D).

Fue así como, se utilizaron sondas de RNA recombinante replicable específicas para HIV-1, en un ensayo modelo diseñado para la detección de diferentes concentraciones del RNA mensajero del gene *pol* (Lomelí y col., 1989). En este esquema, las sondas de RNA recombinante que hibridaron al blanco se separaron de las sondas que no hibridaron, por la técnica de lavados conocida como, ciclado reversible del blanco (“reversible target cycling”) (Morrisey y col., 1989; Hunsaker y col., 1989; Thompson y col., 1989). Esta técnica involucra el uso de una segunda sonda (sonda de captura) cuya función es la de inmovilizar al híbrido a un soporte sólido (Fig. 3). La sonda de captura contiene una secuencia complementaria al blanco en una región adyacente a la zona donde hibrida la sonda detectora y una cola de poli-dA en el extremo 3'. La cola de poli-dA permite que la sonda de captura se pegue con alta eficiencia a las partículas magnéticas que contengan oligo-dT (dT25). El híbrido formado entre la cola de poli-dA y el oligo-dT es relativamente débil, comparado a el híbrido formado entre la sonda de captura y el blanco o, a el híbrido formado entre la sonda del RNA replicable y el blanco. De esta forma, se puede romper a el híbrido poli-dA:oligo-dT a concentraciones bajas de isotiocianato de guanidinio mientras que, los otros híbridos, sonda de captura:blanco o sonda replicable:blanco, permanecen intactos. Esto permite liberar (eluir) el híbrido sonda:blanco de una primera ronda de partículas magnéticas que pudieran retener sondas pegadas inespecíficamente. En este ensayo de detección del RNA mensajero del gene *pol* de HIV-1, se realizaron tres ciclos de pegado a partículas magnéticas con oligo dT25, lavados y elución. De esta manera, sólo las sondas que hibridaron específicamente al blanco, son las que resultaron amplificadas exponencialmente por incubación con la replicasa de Q β . En principio, la replicación del RNA podría haber transcurrido aún cuando el RNA hubiese estado unido al blanco, sin embargo, en este ensayo se utilizó un paso de elución térmica para disociar a la sonda replicable del blanco. Los resultados indicaron que el límite de detección fué de aproximadamente 10,000 moléculas de blanco y que este número estuvo determinado por la señal generada por las sondas pegadas de manera inespecífica que no fueron eliminadas eficientemente durante los lavados. También, los resultados obtenidos confirmaron una relación semilogarítmica precisa entre el número de blancos y la señal generada por el RNA amplificado en un amplio rango de concentraciones de blanco, que

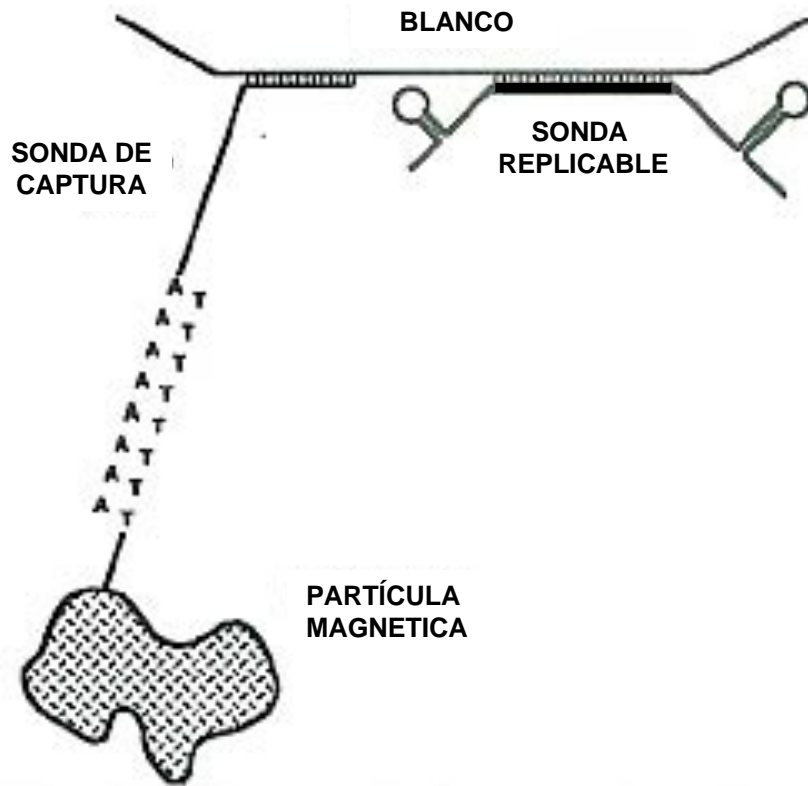


FIGURA 3. Representación esquemática del complejo formado cuando una sonda de captura une un híbrido sonda-blanco a un oligo-dT en la superficie de una partícula magnética. La sonda replicable es un RNA de cadena sencilla que contiene embebida una sonda (línea engrosada) dentro de la secuencia del RNA replicable (indicado por las estructuras de tallo y asa). La sonda replicable hibrida a la secuencia blanco complementaria dentro de la molécula blanco. La molécula blanco puede ser DNA o RNA. La sonda de captura es un DNA de cadena sencilla que contiene una secuencia 5'-sonda que hibrida a una secuencia blanco complementaria diferente dentro de la molécula blanco y una cola de poli-dA en el extremo 3', que hibrida a un oligo-dT unido a la superficie de una partícula magnética. El híbrido formado por la cola de poli-dA con el oligo-dT es relativamente débil comparado a el híbrido formado entre la sonda de captura y el blanco o a el híbrido formado entre la sonda replicable y el blanco, que es el más estable. Esto permite romper el híbrido poli-dA con el oligo-dT a bajas concentraciones de isotiocianato de guanidinio y liberar el híbrido sonda-blanco de las partículas magnéticas.

normalmente excede los seis órdenes de magnitud. La cantidad de RNA recombinante replicable presente en un ensayo de hibridación es directamente proporcional al número de blancos presentes inicialmente en la muestra (Fig. 4). Si se iniciaran un número de reacciones con diferentes cantidades de RNA templado y se incubaran a un tiempo tal que, todas hubieran entrado a la fase lineal de la síntesis, entonces habría una relación lineal entre la cantidad de RNA presente en cada reacción y el logaritmo de la cantidad inicial de templado. Dicho de otra forma, incrementos exponenciales en la cantidad de RNA templado son vistos como incrementos lineales en la cantidad de RNA producto (Kramer et al., 1974). En la práctica, esto significa que la detección de la señal ocurre en el rango de cientos de nanogramos aún para reacciones iniciadas con muy poco templado. Además, el tiempo al cual se mide el RNA producto puede ser disminuido si hay una gran cantidad de RNA templado inicial, o aumentado, si se requieren ensayos muy sensibles.

La replicación de una sonda de RNA, en contraposición a la amplificación de un blanco por PCR, se hace en un solo paso. En ese paso, se pueden sintetizar hasta 10^9 copias del RNA recombinante replicable en una incubación de 30 min que, teóricamente podría llevar a la detección de una sola molécula de blanco. Además, como la cantidad de RNA producto sintetizado está generalmente en el rango de ng, se puede cuantificar fácilmente por el intercalamiento de compuestos fluorescentes tales como el bromuro de etidio, el yoduro de propidio o más recientemente, algunos derivados de cyanina (TOTO, YOPRO, SYBER GREEN) (Molecular Probes). Y ya que una sola molécula de RNA replicable puede iniciar una reacción de amplificación exponencial, esta estrategia ofrece la oportunidad de desarrollar ensayos extremadamente sensibles.

Un gran problema en la implementación de ensayos que emplean tecnologías de hibridación acoplados a sistemas de amplificación de señal es el ruido de fondo producido por las sondas que se quedan pegadas inespecíficamente. Estas señales de fondo introducen un límite artificial en la sensibilidad del ensayo. En ensayos convencionales, este problema es aliviado por la utilización de elaborados esquemas de lavados que están diseñados para remover las sondas pegadas inespecíficamente. Pero, estos esquemas de lavado se añaden a la complejidad y al costo del ensayo.

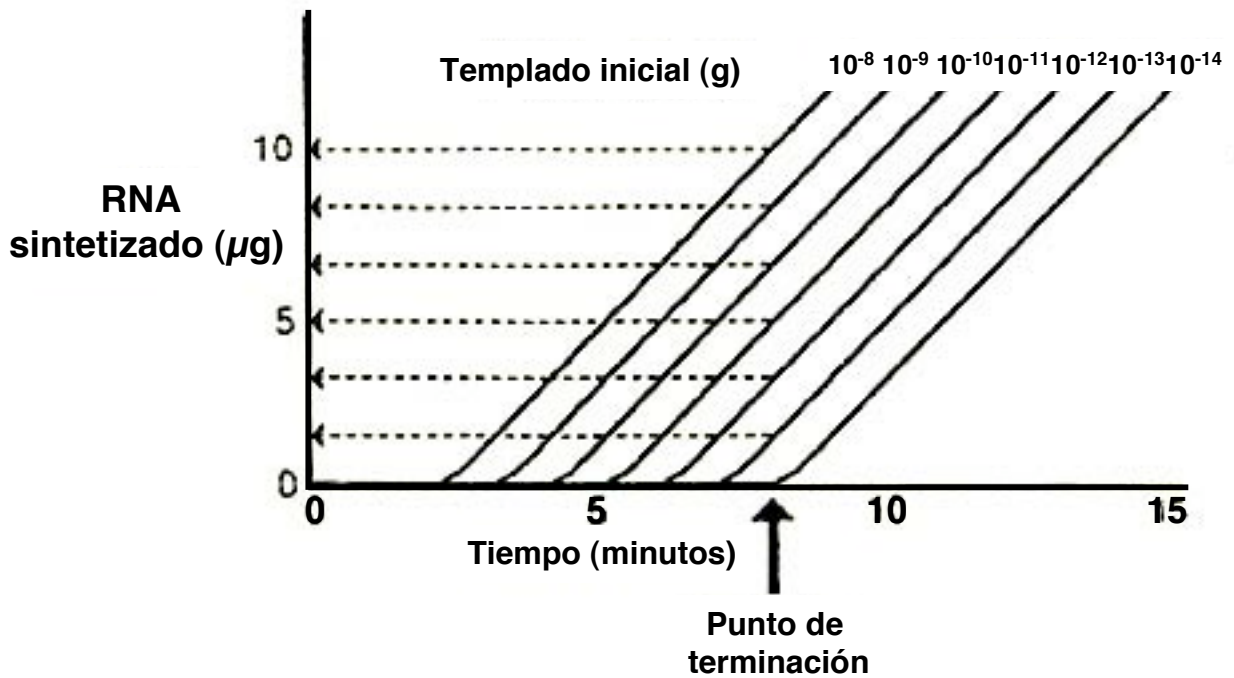


FIGURA 4. Relación entre la cantidad de RNA sintetizado en la fase lineal de una reacción con la replicasa de Q β y la cantidad inicial de RNA templado. Cada incremento geométrico en la cantidad inicial de RNA templado produce un incremento lineal en la cantidad de RNA producto presente cuando las reacciones se detienen a un tiempo x (Kramer et al., 1974).

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad de los ensayos de amplificación con la replicasa de Q β y disminuir el ruido de fondo causado por la persistencia de las sondas pegadas de forma inespecífica, se diseñaron esquemas en los que se introduce un paso extra en la serie de pasos que lleva a la amplificación del RNA, con la condición de que este paso ocurra sólo y únicamente, si la sonda se ha unido específicamente a su blanco.

Un modelo de detección que prescinde del requisito de obtener RNAs recombinantes replicables y que pretende abatir el ruido de fondo es el que utiliza “switches moleculares” (Fig. 5) y es el que constituye el cuerpo de trabajo de esta tesis. Un switch molecular en su estado cerrado forma un tallo y asa consigo mismo. El tallo está formado por dos secuencias complementarias, localizadas cada una en los extremos de la molécula y el asa contiene la secuencia que servirá como sonda. Cuando la sonda del switch molecular hibrida con el blanco, el switch adquiere una posición abierta. La apertura del tallo de cadena doble de la molécula switch, se debe a la rigidez adoptada por la doble hélice de DNA:DNA o DNA:RNA que se forma entre la sonda del switch (el asa) y el blanco (Shore y col., 1981; Ulanovsky y col., 1986 y Bhattacharyya y col., 1989 y 1990). En este esquema, la unión de la sonda al blanco produce un cambio conformacional del switch molecular (la apertura del tallo de cadena doble) tal que, únicamente las sondas unidas al blanco pueden generar señal. Las sondas que no se unen específicamente al blanco permanecen cerradas y de esta forma, no generan señal.

En este ensayo, la generación de la señal ocurre como se muestra en la Fig. 6. Al unirse al blanco, el switch se abre y expone una secuencia de aproximadamente 20 nt de cadena sencilla que contiene 15 nucleótidos de la cadena superior del promotor para la T7 RNA polimerasa. En la misma solución se encuentra una molécula de DNA de cadena sencilla que contiene la cadena inferior del promotor de T7, localizado frente al cDNA del RNA replicable. Este DNA de cadena sencilla se une específicamente a la secuencia de 20 nucleótidos del switch abierto. Una incubación simultánea en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q β , resultará en la generación de un RNA replicable por transcripción y su concomitante replicación. La detección del RNA así producido puede realizarse por métodos fluorogénicos simples tales como, por tinción con derivados de cyanina (TOTO o YOPRO).

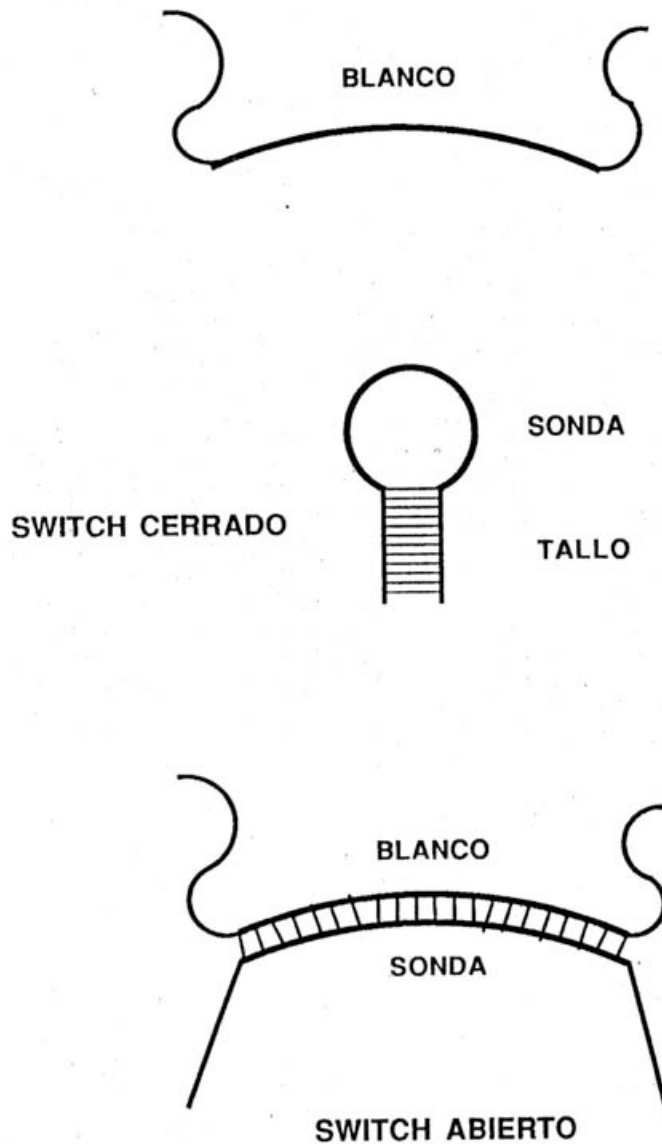


FIGURA 5. Esquema básico de un switch molecular que se abre al hibridar la sonda con el blanco. En la parte superior se muestra la molécula blanco, la cual puede ser DNA o RNA. En la porción media se esquematiza la sonda o “switch” en su estado cerrado (en ausencia del blanco) formando un tallo y asa consigo misma (el cual, también puede ser DNA o RNA). El tallo esta formado por dos secuencias complementarias, localizadas cada una en los extremos de la molécula y el asa contiene la secuencia que servirá como sonda. En la porción inferior se muestra el switch hibridando con el blanco, ahora en posición abierta.

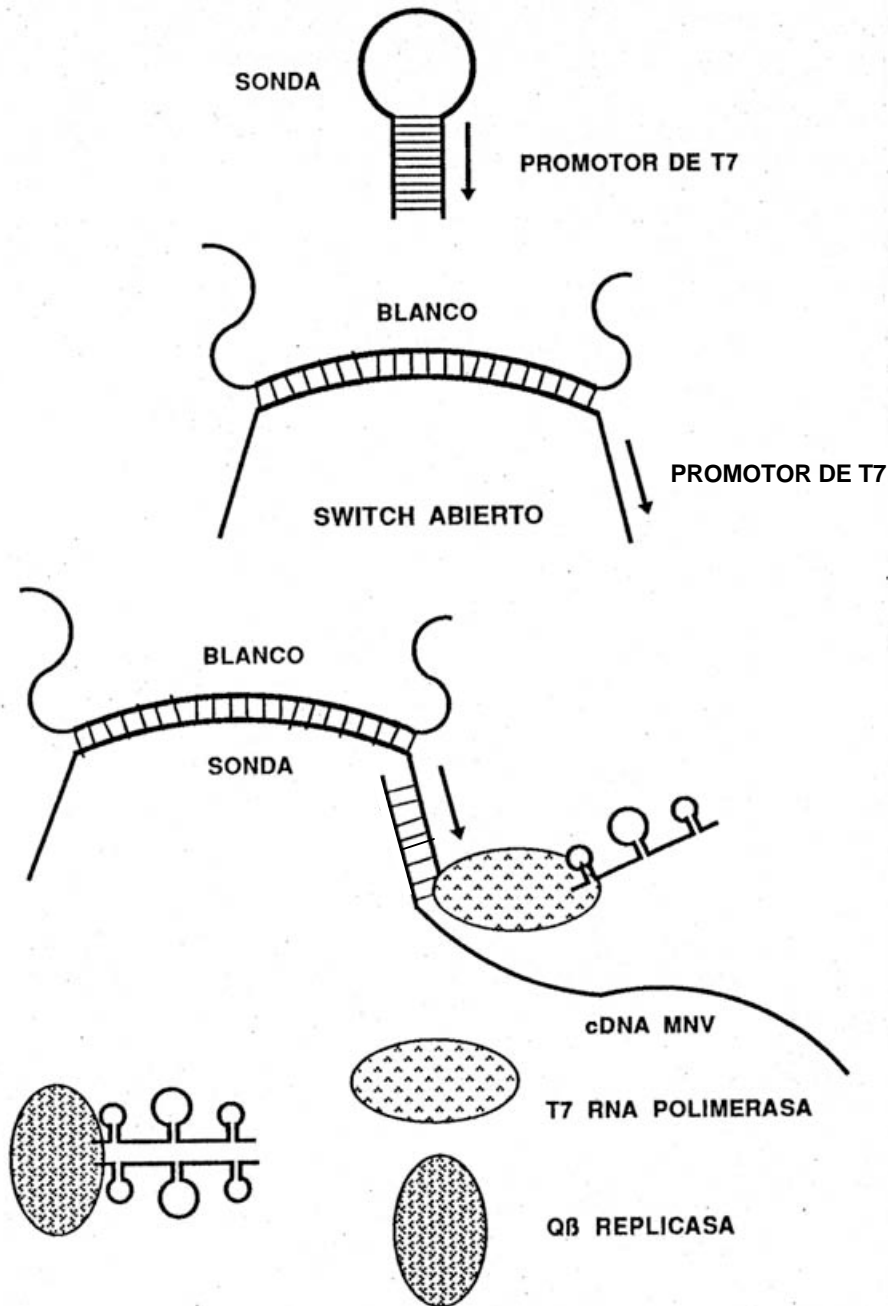


FIGURA 6. Uso de un “switch molecular” acoplado a un sistema generador de señalamiento exponencial. Cuando la sonda hibrida al blanco, el “switch molecular” se abre y expone una secuencia de 20 nucleótidos de cadena sencilla de los cuales, 7 son complementarios al promotor de la T7 RNA polimerasa. En la misma solución se encuentra presente una molécula de DNA de cadena sencilla que contiene la cadena inferior del promotor de T7 adyacente al cDNA que codifica para el RNA replicable. Este DNA de cadena sencilla hibrida específicamente con el tallo del switch abierto. Después de la incubación con la T7 RNA polimerasa, se genera un RNA replicable por transcripción que luego es amplificado por la Qβ replicasa.

Un aspecto importante de esta estrategia es la utilización de un esquema de hibridación en “sandwich”, el cual involucra el uso de una segunda sonda (sonda de captura) cuya función es la de inmovilizar al híbrido a un soporte sólido para permitir el lavado de las sondas no hibridadas (Fig. 7).

El funcionamiento de este tipo de switches moleculares ya había sido demostrado en ensayos *in vitro* que medían la presencia de una estructura de RNA y la desaparición de un sitio para RNAsa III en la molécula switch, como función de la presencia e hibridación al blanco (Guerra y col., resultados no publicados) (Fig. 8).

El ensayo diagnóstico propuesto en esta tesis involucra tres pasos: 1) Hibridación en solución del RNA o DNA blanco, el switch molecular, los oligos de captura y el DNA de cadena sencilla que contiene el cDNA del templado replicable en un buffer de GuSCN 2.25 M for 4.5 hrs at 37°C. 2). Captura de los híbridos a partículas magnéticas que tienen oligo (dT)₂₅ pegado covalentemente a la superficie de la partícula en una solución de GuSCN 1.25M por 10 min a 37°C seguido por tres lavados con un buffer de GuSCN 1.25M más tres lavados con un buffer de KCl 100 mM y elución en 50 μ l de buffer TE_{0.1mM} for 10 min a 37°C. 3) Incubación simultánea de una alícuota del eluido, con la T7 RNA polimerasa y la Q β replicasa, por 30 min a 37°C (Fig. 9). La utilización de soluciones de isotiocianato de guanidinio, un agente caotrópico, en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos en soportes sólidos, ha sido estudiado ampliamente y ofrece la ventaja de lisar la célula así como, desnaturalizar e inactivar a todas las proteínas en un solo paso.

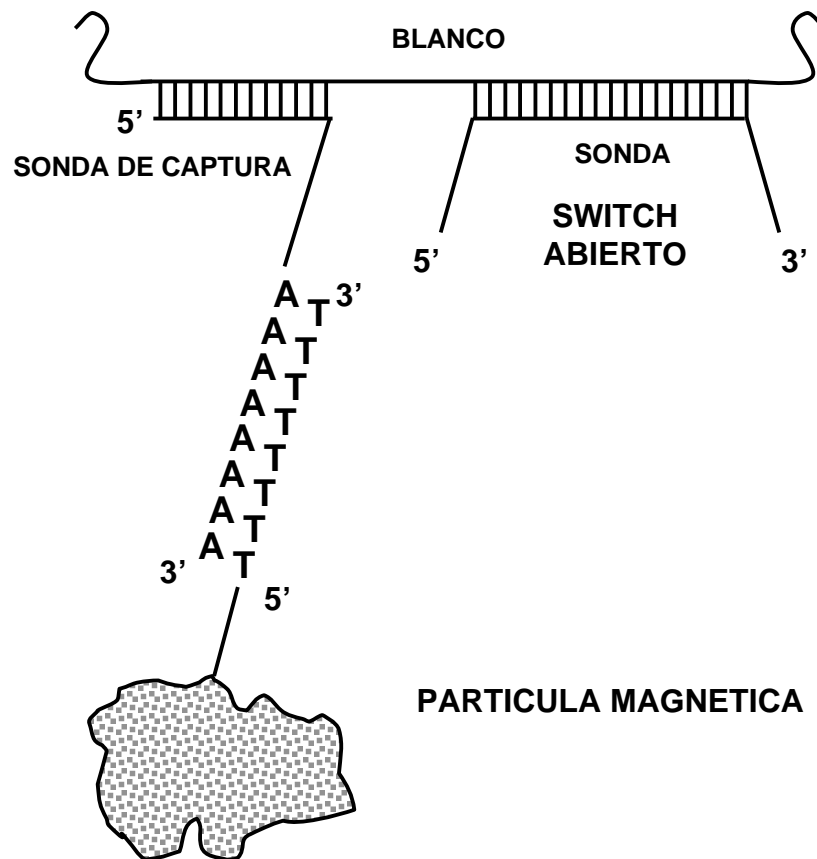


FIGURA 7. Representación esquemática del complejo formado cuando una sonda de captura une a un híbrido sonda-blanco con un oligo-dT en la superficie de una partícula magnética. El switch molecular es un DNA de cadena sencilla que contiene una secuencia sonda en medio de dos secuencias complementarias. El switch molecular se abre por hibridación de su secuencia complementaria al blanco (sonda) con la molécula blanco. La molécula blanco puede ser DNA o RNA. La sonda de captura es un DNA de cadena sencilla que contiene una secuencia 5'-sonda que hibrida a una secuencia blanco complementaria diferente dentro de la molécula blanco y una cola de poli-dA en el extremo 3', que hibrida a un oligo-dT unido a la superficie de una partícula magnética. El híbrido formado por la cola de poli-dA con el oligo-dT es relativamente débil comparado a los otros híbridos, el formado entre la sonda de captura y el blanco y el formado entre la sonda del switch abierto y el blanco (que es el más estable de todos).

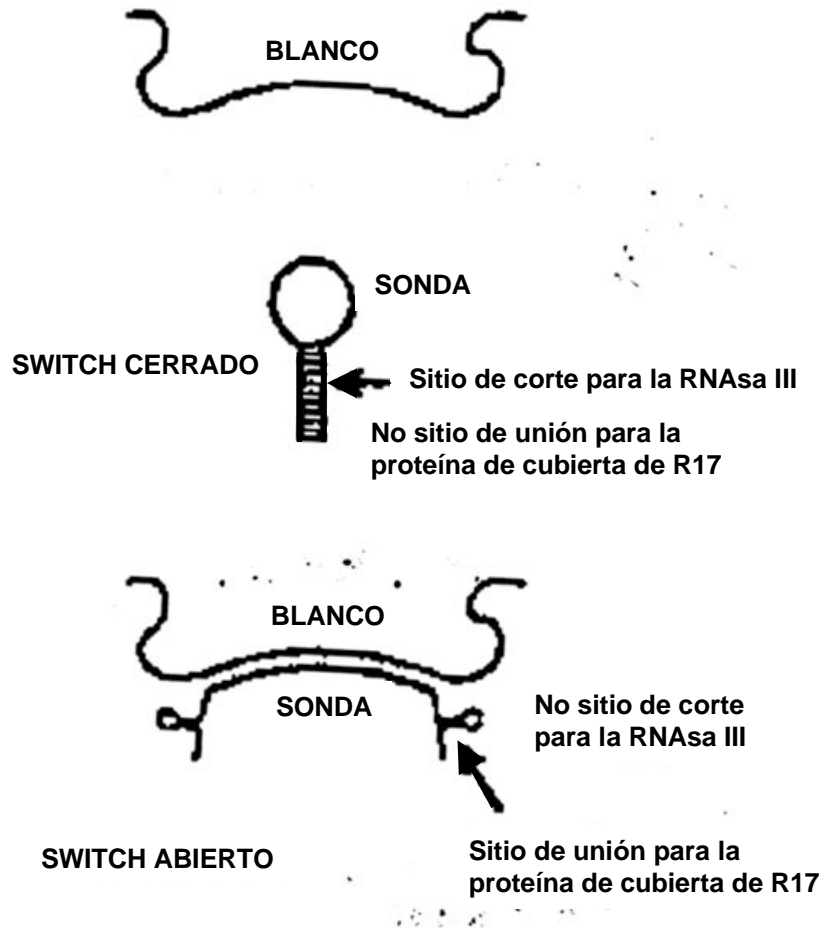


FIGURA 8. Monitoreo del estado de un “switch molecular”. Se mide la presencia de un sitio de corte para la RNAsa III en la conformación cerrada y la presencia de un sitio de unión para la proteína de cubierta del bacteriofago de R17, en la conformación abierta.

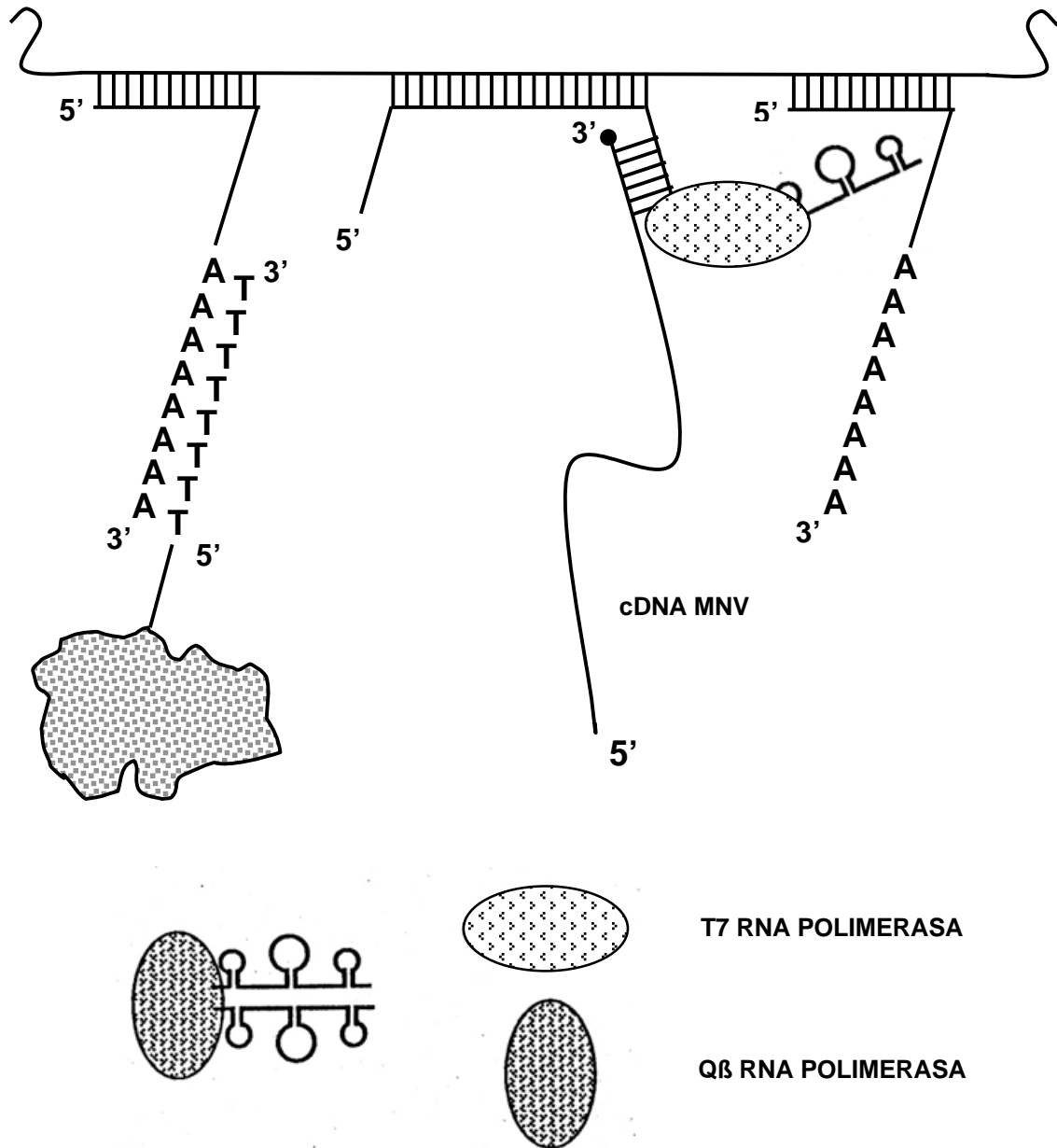


FIGURA 9. Esquema General. El ensayo diagnóstico propuesto en esta tesis involucra tres pasos: 1) Hibridación en solución del RNA blanco, el switch molecular, los oligos de captura y el DNA de cadena sencilla que contiene el promotor para la T7 RNA polimerasa frente al cDNA del templado replicable en 2.25 M de GuSCN for 4.5 hrs a 37°C. 2) Captura de los híbridos a partículas magnéticas (GTS dT25) en 1.25M de GuSCN por 10 min a 37°C seguido por tres lavados con un buffer de 1.25M mM de GuSCN, tres lavados con 100 mM de KCl y elución en 50 μ l de buffer TE_{0.1mM} for 10 min a 37°C. 3) Incubación simultánea de una alícuota del eluido, con la T7 RNA polimerasa y la Qβ replicasa, por 30 min a 37°C.

JUSTIFICACION

La malaria es uno de los principales problemas de salud pública en América Latina con más de un millón de casos anuales de los cuales el 10% corresponden a México, en donde se registran más de 100 000 casos al año. Si bien la epidemia de malaria ha logrado contenerse en los últimos años como resultado de la reactivación de las actividades del programa de control, el efecto obtenido aún es insuficiente.

Uno de los problemas principales que afectan las actividades de control son la falta de información epidemiológica con respecto a la extensión y la distribución real de la epidemia y las dificultades que enfrentan los servicios estatales de salud para proveer diagnóstico oportuno a la población. El diagnóstico temprano del paludismo es necesario no solamente para administrar tratamiento, sino también para detectar oportunamente la aparición de nuevos brotes epidémicos. El sistema actual de diagnóstico de la malaria, basado en el exámen microscópico de sangre teñido con Giemsa (gota gruesa), es un método barato, rápido y relativamente sensible, pero que requiere de técnicos altamente entrenados. La sensibilidad de este método es de 10 a 20 parásitos/ μ l y el rendimiento óptimo por microscopista es 20 a 40 exámenes por día, aproximadamente.

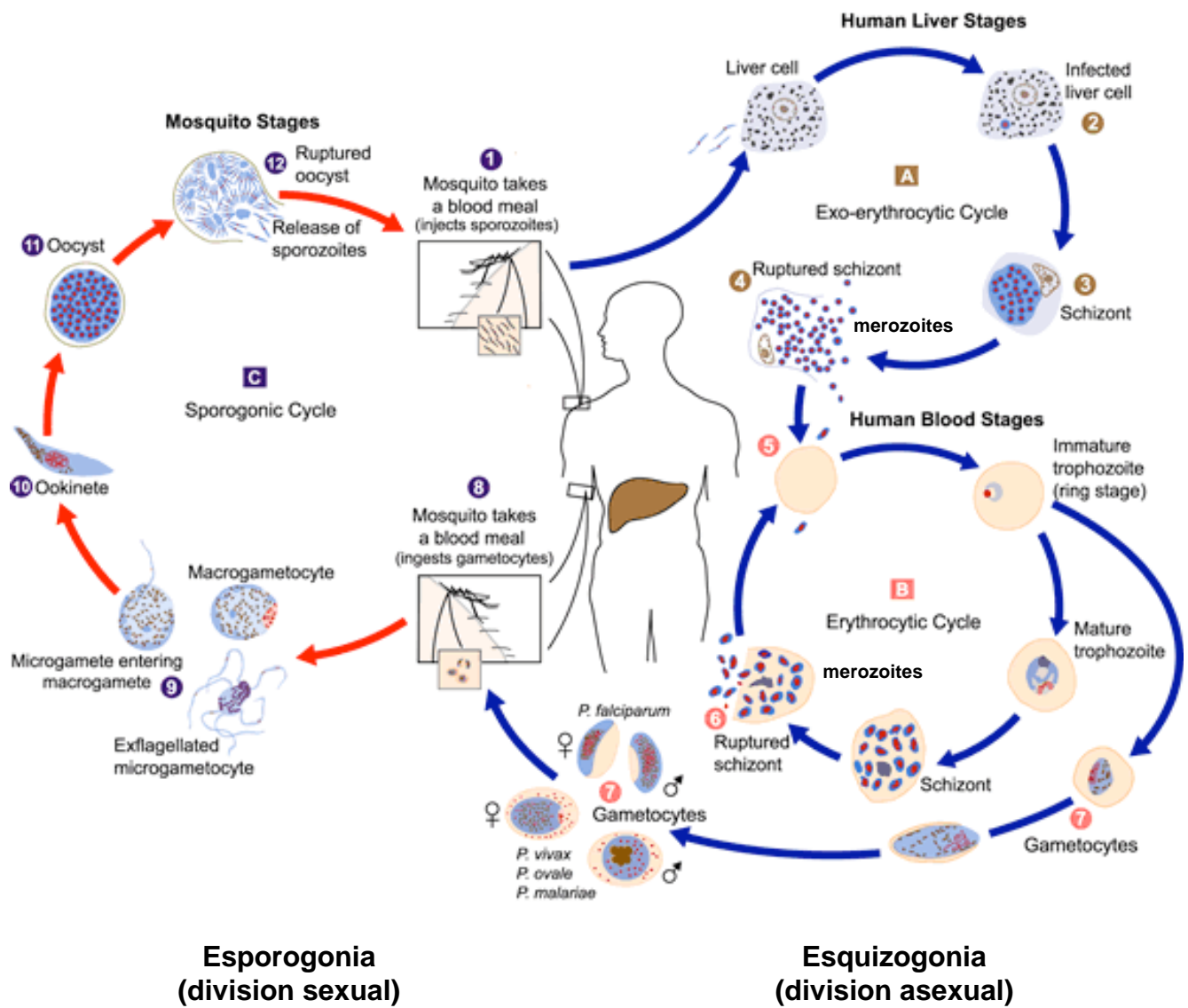
Los ensayos inmunológicos de tipo ELISA tienen un límite de detección de alrededor de 10^8 moléculas de blanco. Por lo tanto, estos métodos no tienen el potencial de ser lo suficientemente sensibles como para permitir la detección de un número muy pequeño de parásitos, tal como ocurre en la sangre de pacientes infectados con *Plasmodium vivax* con bajos niveles de parasitemia.

También se han desarrollado sondas de DNA para la detección del DNA repetitivo (5000 copias por genoma) de *Plasmodium falciparum* en muestras de pacientes y se ha encontrado una correlación razonable entre los resultados de pruebas de hibridación con la sonda radioactiva y los resultados de microscopía (Franzen y col., 1984; McLaughlin y col., 1985; Barker y col., 1986). Sin embargo, una comparación formal entre las dos técnicas mostró que las sondas de hibridación detectan al parásito en solamente entre 5-28% de las muestras que son positivas por microscopía o por cultivo (Lanar y col., 1989). En 1988 el grupo de McCutchan y col., demostró la factibilidad de diseñar sondas específicas para la detección del RNA ribosomal de varias especies de

Plasmodium de la etapa sanguínea, incluyendo *P. falciparum* y *P. vivax* (Fig. 13 y 14) (McCutchan y col., 1988; Waters y McCutchan, 1989). Y ya que cada parásito contiene alrededor de 150,000 moléculas de RNA ribosomal, estas sondas tienen el potencial de mejorar considerablemente la sensibilidad de los ensayos. Fue así que, escogimos la detección del RNA ribosomal 18S de *P. falciparum* y/o *P. vivax* de la etapa sanguínea para la implementación de nuestro esquema diagnóstico que usa switches moleculares.

Por otro lado, desarrollos recientes en la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos hacen posible explorar el diseño de nuevos métodos de diagnóstico con la sensibilidad y operabilidad propuestas. El desarrollo de este tipo de pruebas para el diagnóstico de paludismo permitirá el aprovechamiento de la misma tecnología para el diseño de ensayos diagnósticos similares para otras enfermedades infecciosas como el dengue, la fiebre tifoidea, la amibiasis o el SIDA.

Son cuatro, las especies de *Plasmodium* que causan la malaria en el humano: *P. falciparum* (causal del 80% de las infecciones y 90% de las muertes), *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Aunque recientemente, también se han identificado casos de infección por *P. knowlesi*, considerado previamente como infectivo únicamente de monos macacos (Singh y col., 2004). El ciclo de vida del *Plasmodium*, ocurre en dos huéspedes, el mosquito y el humano (Fig 10). Durante una toma de sangre, el mosquito hembra (Anopheles) infectado con *Plasmodium* inocula al humano, esporozoitos (1). Los esporozoitos infectan a las células del hígado (2) y maduran a esquizontes (3), rompen el hepatocito y liberan merozoitos (4). (Es preciso, indicar que en *P. vivax* y *P. ovale*, existe una forma latente, los hipnozoitos, que pueden persistir en el hígado por semanas o incluso años y causar recaídas más tarde, al invadir el torrente sanguíneo). Después de la replicación inicial en el hígado (esquizogonia exo-eritrocítica [A]), los parásitos llevan a cabo una multiplicación asexual en los eritrocitos (esquizogonia eritrocítica [B]). Los merozoitos infectan a los eritrocitos (5). Los trofozoitos (en forma de anillo) maduran en esquizontes, los cuales rompen al eritrocito y salen como merozoitos (6). Algunos parásitos diferencian a gametocitos (7) (etapa sexual eritrocítica). Hay que recalcar que, los parásitos de la etapa sanguínea son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y son los blancos a detectar por las pruebas diagnósticas, en sangre. Los gametocitos, macho (microgametocitos) y hembra (macrogametocitos), son ingeridos por



Center for Disease Control, Atlanta

FIGURA 10. Ciclo de vida de *Plasmodium*.

el mosquito *Anopheles* durante una toma de sangre (8). A la multiplicación de los parásitos en el mosquito se le conoce como, ciclo esporogónico [C]. Estando en el estómago del mosquito, los microgametos penetran a los macrogametos y generan zigotos (9). Los zigotos se vuelven alargados y adquieren motilidad (ookinetos) (10) y así, invaden la pared del intestino donde se diferencian en ooquistes (11). Los ooquistes crecen, rompen la células epiteliales del intestino y salen como esporozoitos (12), los cuales migran hasta las glándulas salivales del mosquito. La inoculación de los esporozoitos en un nuevo huésped humano perpetúa así, el ciclo de vida de este parásito (1).

Por otro lado, se sabe que la estructura y función de los RNAs ribosomales se encuentran altamente conservadas en todos los organismos de la escala filogenética y que las familias génicas que codifican para estas moléculas muestran también grandes similitudes, en cuanto a su organización estructural y su control transcripcional (Fig. 11). En contraste, dentro del género de *Plasmodium*, cada especie mantiene un número de RNAs ribosomales estructuralmente distintos, codificados en el núcleo y cuya transcripción es regulada durante el desarrollo. El arreglo de la unidad de DNA ribosomal en *Plasmodium* es convencional, con el gene que codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU rRNA or 18S) seguido por un espaciador interno transcrito (ITS1), el gene para el RNA ribosomal 5.8S, otro espaciador interno transcrito (ITS2) y, el gene para la subunidad grande del RNA ribosomal (LSU rRNA or 26S) en dirección 5' -> 3'. Las diferentes especies de *Plasmodium*, cuentan con únicamente de 4 a 8 copias de la unidad de DNA ribosomal. Éstas, se encuentran distribuidas por todos los cromosomas y solamente, una o dos se transcriben a la vez. En contraste, la mayor parte de los organismos eucariotes cuentan con miles de copias de los genes de DNA ribosomal (50,000-100,000), éstos se encuentran en arreglos de cabeza con cola y distribuidos en tandem a lo largo de una o muy pocas regiones del genoma (T.F. McCutchan y col., 1995). Del análisis de 4 especies de *Plasmodium*, se demostró que cada especie tiene al menos tres tipos distintos de genes de RNA ribosomal: el gene A, expresado fundamentalmente en la fase de esquizogonia eritrocítica y gametogénesis en el mamífero huésped y, durante la exflagelación y fertilización, en el estómago del mosquito; el gene O, expresado durante la fase de ookinete/ooquiste en el intestino del mosquito; y el





Organism	Transcriptional unit	Copy no.	Sequence	Arrangement
<i>E. Coli</i>		7	Identical	Dispersed
<i>Plasmodium</i>		4-8	Distinct	Dispersed
<i>Yeast</i>		100-200	Identical	Dispersed
<i>Mammalian</i>		50-10000	Identical	Dispersed

FIGURA 11. Organización de la unidad de DNA ribosomal en diferentes organismos de la escala filogenética. La flecha indica la dirección de la transcripción de los genes de RNA ribosomal.

gene S (previamente llamado gene C), expresado principalmente durante la fase de esporozoito maduro en la glándula salival del mosquito a esquizogonia exoeritrocítica en los hepatocitos del hígado del huésped mamífero (ver Fig.12) (Li y col., 1997).

Si bien la epidemia de malaria ha logrado contenerse en los últimos años como resultado de la reactivación de las actividades del programa de control, el efecto obtenido aún es insuficiente. Uno de los problemas principales que afectan las actividades de control son la falta de información epidemiológica con respecto a la extensión y la distribución real de la epidemia y las dificultades que enfrentan los servicios estatales de salud para proveer diagnóstico oportuno a la población. Es necesario un diagnóstico temprano del paludismo para administrar tratamiento y detectar oportunamente la aparición de nuevos brotes epidémicos.

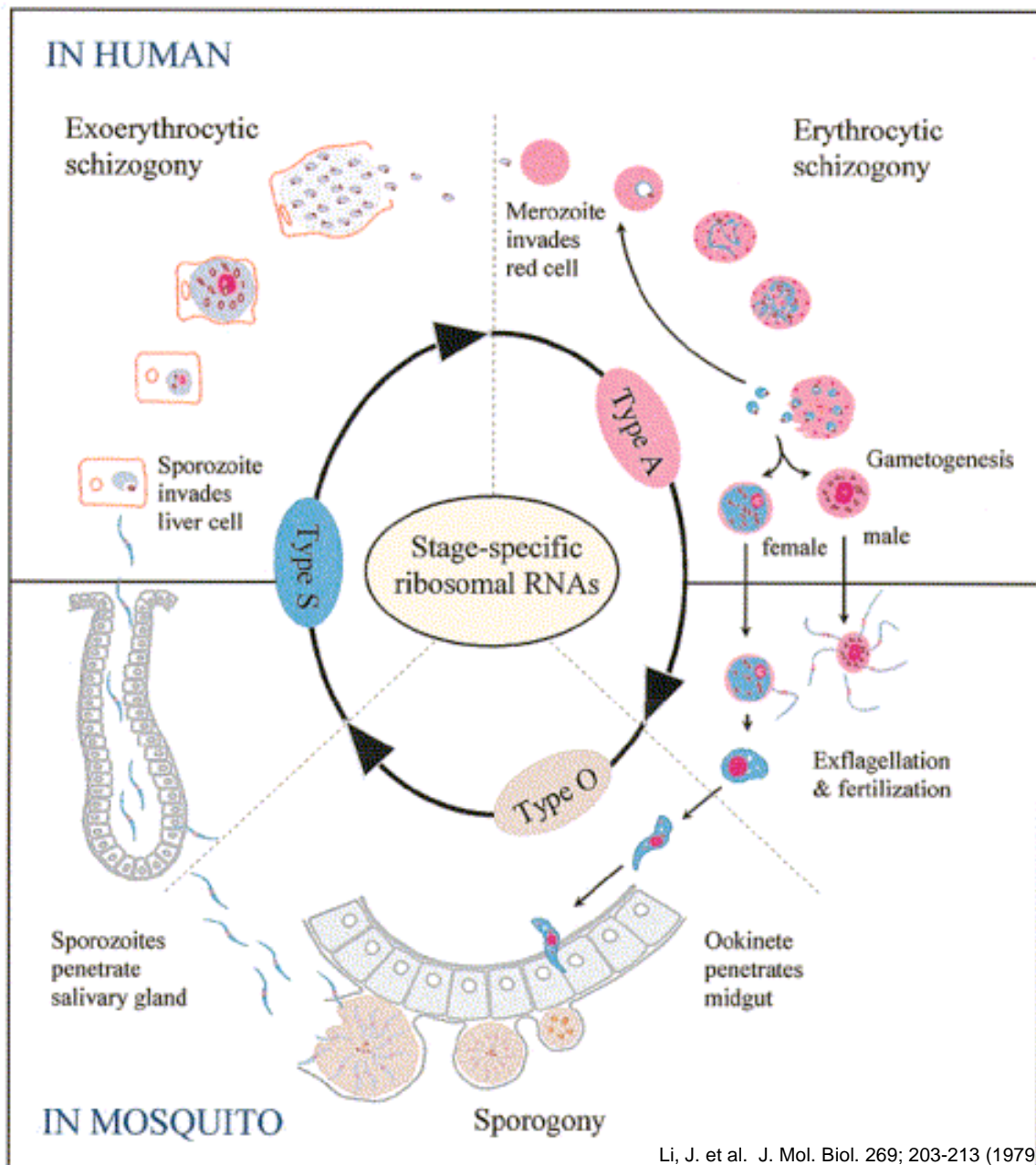


FIGURA 12. Tres tipos de RNA ribosomal durante el ciclo de vida de *Plasmodium*.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un nuevo ensayo de hibridación de ácidos nucleicos para la detección de *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax*, basado en el uso de sondas que incorporan un switch molecular acoplado a un sistema generador de señalamiento exponencial por medio de la replicasa de Q β .

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Montar *in vitro* el funcionamiento de un switch molecular que genere señal únicamente, como función de la presencia de DNA o RNA blanco.
- 2) Implementar un ensayo modelo de hibridación para la detección de blancos artificiales de *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax* en combinación con el sistema de amplificación de señal por medio de la Q β replicasa.
- 3) Evaluar la sensibilidad, la especificidad y la confiabilidad del ensayo para la detección de parásitos de *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax* (provenientes de cultivo, mezclados *in vitro* con sangre humana) en pruebas de laboratorio.
- 4) Validar el uso del ensayo con muestras de sangre de pacientes infectados en comparación al método de gota gruesa.

MATERIALES Y METODOS

a) Enzimas. Las enzimas de restricción se compraron a New England Biolabs. La T4 DNA ligasa, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* y la DNAsa de páncreas bovino fueron compradas a Boheringer Mannheim. La T7 RNA polimerasa se compró a U.S. Biochemicals. La replicasa nativa de Q β se aisló de *E. coli* Q13 infectada con el bacteriofago Q β por el método de Eoyang y August (1971), sin el paso de hidroxilapatita. La replicasa recombinante de Q β fué un regalo de GeneTrak, Inc. u obtenida de Vysis, Inc.

b) Moléculas blanco y sondas sintéticas.

Oligonucleótidos de DNA utilizados como blancos artificiales:

PfA MC (58mero)

5' ATTGTA ACTATTCTAGGGGA ACTATTTTAGCTTTTGGCTTTAATACGCTTCC
TCTATT 3'

(secuencia idéntica al RNA)

PfA VT (40mer) 5' TTTTAAAATCCCCACTTTTGCTTTTGCTTTTTTGGGGATT 3'

(secuencia idéntica al RNA)

PvAsw1c (38mero) 5' ATCCACATAACTGATACTTCGTATCGACTTTGTGCGCA 3'

(secuencia idéntica al RNA)

PvAsw2c (38mero) 5' ATTCTTTTTAAGGACTTTCTTTGCTTCGGCTTGGAAGT 3'

(secuencia idéntica al RNA)

PvAsw3c (38mero) 5' TGGGACTGAATTCGGTTGATTTGCTTACTTTGAAGAAA 3'

(secuencia idéntica al RNA)

RNAs ribosomales utilizados como blancos artificiales:

Las clonas que contenían el DNA ribosomal 18S de las etapas sanguíneas (gene A) de *P. falciparum* y *P. vivax* en los vectores pUC13, fueron un regalo del Dr. Thomas McCutchan del Instituto Nacional de Salud, EUA. La clona pUC13-PfA contenía el gene completo 18S ribosomal de *P. falciparum* (gene A) (un fragmento de Sma I de 2 Kb) y la

clona pUC13-PvA contenía únicamente el extremo 5' del gene 18S ribosomal de *P. vivax* (gene A) (un fragmento de Hind III con los primeros 1500 nt).

Con la ayuda de Georgina Estrada se subclonó el fragmento EcoR I-Pst I de la clona pUC13-PfA al vector pGEM-1 (Promega) que contiene los promotores para la T7 y la SP6 RNA polimerasa. El RNA ribosomal 18S de PfA era así, un transcrito de ~2.1 Kb obtenido a partir de una clona en pGEM-1 linerizada con PstI por transcripción con la T7 RNA polimerasa.

Los oligonucleótidos utilizados para la obtención de un producto de PCR de 759 nt que contenía un fragmento del DNA ribosomal 18S de PvA (que incluía únicamente la región de Cap1, Cap2, Cap3 y Cap4), a partir de DNA total del parásito obtenido de la sangre de pacientes infectados (Centro de Investigación de Paludismo, Tapachula, Chiapas) fueron:

BamH1.UP (26mero) 5' AGCGACACGTAATG/GATCCGTCCATT 3'

HindIII.LP (35mero) 5' TTTTAGGCAAA/AGCTTTCGCAGTTGTTTGTCTCCA 3'

Luego, este producto de PCR sería clonado en el vector pGEM-1, lo cual nos permitiría generar un fragmento de ~759nt del RNA ribosomal 18S de PvA por transcripción *in vitro* con la T7 RNA polimerasa.

Los oligonucleótidos utilizados para la obtención de un producto de PCR de 1626 nt que contenía un fragmento de 1.5 Kb del DNA ribosomal 18S de PvA (que incluye del nt 6 al 1489) (hasta parte de la secuencia sonda para PvAsw3), frente al promotor para la T7 RNA polimerasa (5' TAATACGACTCACTATAG 3') fueron:

Kpn1.T7.UP (44mero) (nt. 6)

5' CGATGGTAC/CTAATACGACTCACTATAGGGTTGATCTTGCCAGT 3'

Pst1.LP (19mero) (alrededor del nt 1489)

5' CAACCGAACTGCA/GTCCCA 3'

Pst1.LP (21mero) (al extremo 3' del gene, nt 1602)

5' AATCAAGCAACTGCA/GTCTTA 3'

Se obtenía así, un transcrito de ~1.5 Kb del RNA ribosomal 18S de PvA, por transcripción *in vitro* del producto de PCR de 1626 nt, amplificado a partir de la clona pUC13-PvA.

Posteriormente, obteníamos el mismo transcrito de 1.5 Kb a partir de una clona en el vector pCR3000 (Invitrogen) construida con un producto de PCR de 1626 nt, amplificado a partir de DNA total de *P. vivax* obtenido de la sangre de al menos 5 pacientes infectados en el área de Chiapas (Centro de Investigación de Paludismo, Tapachula, Chiapas).

Oligonucleótidos de DNA utilizados como sondas artificiales:

PvA MC1 (30mero) 5' CGAAGTATCAGTTATGTGGATTAAGCTAGA 3'

(secuencia complementaria al RNA)

PvA VT (30mero) 5' GGACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCT 3'

(secuencia complementaria al RNA)

PvA MC2 (24.1mero) 5' AAATCAACCGAATTCAGTCCCACG 3'

(secuencia complementaria al RNA)

PvA MC3 (24.3mero) 5' AAAGAAACAGTATGAAAAGCGAAC 3'

(secuencia complementaria al RNA)

c) **Switches moleculares.** Se sintetizaron 4 switches moleculares que contenían sondas complementarias al RNA 18S de *Plasmodium falciparum* (fase asexual) (PfA) y 3 switches moleculares con sondas complementarias al RNA 18S de *Plasmodium vivax* (fase asexual) (PvA) (Operon o Midland, Co). Sus tamaños fluctúan entre 76 y 86 nucleótidos. Las secuencias de los switches son:

PfAsw1(VT)

5' CTATAGTGAGTCGTATTAAATCCCCAAAAAAGCAAAAGCAAAAG

TGGGGATTTTAAAATAATACGACTCACTATAG 3'

PfAsw2 (MC1)

5' CTATAGTGAGTCGTATTAAAAGCCAAAAGCTAAAATAGTTCCC

TAGAATAGTTACAATAATACGACTCACTATAG 3'

PfAsw3 (MC1)

5' CGTATTAGTCGACAAGCTTGGCGAAAGCCAAAAGCTAAAATAG

TTCCCCTAGAATAGTTACAACGCCAAGCTTGTCGACTAATACG 3'

PfAsw4 (MC1)

5' TCTTCGTATTAGTCGACAAGCTTGGAAAGCCAAAAGCTAAAATA
GTTCCCCTAGAATAGTTACAAGCTTGTCGACTAATACG 3'

PvAsw1 (MC1)

5' TTCGTATTAGTCGACAAGCATGCGCACAAAGTCGATACGAAG
TATCAGTTATGTGGATTACATGCTTGTCGACTAATACG 3'

PvAsw2 (VT)

5' TTCGTATTAGTCGACAAGCATGACTTCCAAGCCGAAGCAAAG
AAAGTCCTTAAAAAGAATCATGCTTGTCGACTAATACG 3'

PvAsw3 (MC2)

5' TTCGTATTAGTCGACAAGCATGATTTTCTTCAIAAGTAAGCAA
ATCAACCGAATTCAGTCCCAITGCTTGTCGACTAATACG 3'

d) Templados de cadena sencilla (3'→5'): promotor para la T7 RNA polimerasa seguido por el cDNA para el templado replicable, MDV-1-poly4 o MNV-11.

M13cadena sencilla-T7-MDV-poly4 (clona16, obtenida de Sajay Tyagi). El templado de cadena sencilla se obtuvo por digestión de la clona 16 con Sal I o Hae III (justo antes del promotor para la T7 RNA polimerasa) y Sma I (al final del cDNA de MDV-1-poly4) con la ayuda de oligonucleótidos guía complementarios a estos sitios. El templado de cadena sencilla se purificó de geles de poliacrilamida-urea al 8%, por elución en buffer TE a 37°C toda la noche y luego por extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, seguido por precipitación con etanol.

Sal I (19mero) 5' TGCCAAGCTTGTCGA/CTAA 3'

Hae III (15mero) 5' AAACGACGG/CCAGTG 3'

Sma I (15mero) 5' GTTCCC/GGGAATTCG 3'

La secuencia de esta clona alrededor del promotor para la T7 RNA polimerasa es:

5'<..CGAACTCCCGTACGAGGTGCCCGCACCTCGTCCCCCCTTCCGGGGGGGT
CCC>CTATAGTGAGT[CGTATTAG/TCGACAAGC]TTGGCACTGG/CCGTTCG...

SalI

HaeIII

Entre < > se muestra el extremo 5' del RNA MDVpoly4.

*En letras oscuras se indica la secuencia inferior del promotor para la T7 RNA polimerasa, que es la secuencia que hibrida con el tallo de los switches, PfAsw1 y PfAsw2.

**Entre paréntesis [] se indica la región complementaria al tallo de los switches, PfAsw3 y PfAsw4, que también es complementaria al los switches, PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3.

Templado obtenido por ligación sobre una secuencia guía (MNV-11). Se sintetizaron dos oligonucleótidos que entre ambos contenían la secuencia de ~112 nt que comprendía el promotor de T7 frente al cDNA de MNV-11 (3' -> 5'). Estos dos oligonucleótidos se ligaron sobre una secuencia guía (30mero) y luego, el producto se purificó por extracción de geles de poliacrilamida-urea al 8% (igual que como se mencionó arriba).

Mitad 5' (70mero)

5' <GGGGCACCCCCCTTCGGGGGGTCAACCTCGCGTAGCTAGCTACGCGAGGA
AAAAGGTCCTTTAAAGCCGAA 3'

Mitad 3' (42mero)

5' TAGGCTATGAACCC>TATAGTGAGT{[CGTATTAGTCGACAAGC]A} 3'

Secuencia guía (30mero)

5' GGGTTCATAGCCTATTCGGCTTTAAAGGAC 3'

Entre < > se indica la secuencia del RNA MNV-11mut.

*En letras oscuras se indica la secuencia inferior del promotor para la T7 RNA polimerasa, que es la secuencia que hibrida con el tallo de los switches, PfAsw1 y PfAsw2.

**Entre paréntesis [] se indica la región complementaria al tallo de los switches, PfAsw3 y PfAsw4, que también es complementaria al los switches, PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3.

***Entre paréntesis {} se indica la región complementaria al tallo de los switches PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3.

Templado de cadena sencilla que contiene un grupo amino en el extremo 3' (MNV-11mut). Este oligonucleótido de 112 nt se ordenó a Midland, Co. y contiene la siguiente secuencia:

5'<GGGGCACCCCCCTTCGGGGGGTCACCTCGCGTAGCTAGCTACGCGAGGAA
AAAGGTCCTTTAAAGCCGAATAGGCTATGAACCC>TATAGTGAGT{[CGTAT
TAGTCGACAAGC]A} 3' grupo amino.

Entre < > se indica la secuencia del RNA MNV-11mut.

*En letras oscuras se indica la secuencia inferior del promotor para la T7 RNA polimerasa, que es la secuencia que hibrida con el tallo de los switches, PfAsw1 y PfAsw2.

**Entre paréntesis [] se indica la región complementaria al tallo de los switches, PfAsw3 y PfAsw4, que también es complementaria al los switches, PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3.

***Entre paréntesis {} se indica la región complementaria al tallo de los switches PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3.

e) Sondas de captura. Estos oligonucleótidos de cadena sencilla son complementarios al blanco y se obtuvieron de Midland, Co. Los oligonucleótidos de captura 1 y 2 son comunes para PfA y PvA, los oligonucleótidos de captura 3 y 4 son específicos para PfA mientras que, los oligonucleótidos de captura 5, 6 y 7 son específicos para PvA. Las secuencias para los oligonucleótidos de captura son:

Cap1 (37mero)

5' TAAAATATCGATTCTTTGAAATTCAACTACGAGCGTT 3'

Cap2 (45mero)

5' AAGCTACTCCTATTAATCGTAACTAAGCCAAAATAAGAAAAAAGA 3'

Cap3 (35mero)

5' TTGTTACTCTGGGAAGGTTTTAAATTCCCACCATT 3'

Cap4 (45mero)

5' GTTATTCCATGCTATAGTATTCAAACACAGTAAATGCTTTAACTG 3'

Cap5 (45mero)

5' TAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCTTATTTTAAAATCTTTCA 3'

Cap6 (45mero)

5' GCGAACTAAGTAGAAAAGGGAAAGGGAAACTGTTACGTTTCCCAA 3'

Cap7 (45mero)

5' TACAATCAAGCAAATACATTCTTACGCGAAAAAGAAACAGTATGA 3'

f) Partículas magnéticas.

Partículas magnéticas con oligo (dT)₂₅, Gene-Trak Systems (GTS). Esta suspensión de partículas magnéticas contiene 0.25% de sólidos y 186 pmolas de oligo (dT)₂₅/mg de sólidos.

Partículas magnéticas con oligo (dT)₂₅, Dynal (Dynabeads). Partículas de poliestireno superparamagnéticas de 2.8 μm de diámetro que tienen oligo (dT)₂₅ pegado covalentemente a la superficie de la partícula vía un grupo separador en el extremo 5'. Estas partículas magnéticas unen aproximadamente 2 μg de RNA poly(A)+ por mg de partículas. La suspensión contiene 5 mg de partículas/ml (0.5% de sólidos) disueltas en PBS pH 7.4 y NaN₃ 0.02%. Calculamos que hay alrededor de 5.8 pmolas de oligo (dT)₂₅/mg de partículas.

Partículas magnéticas con oligo (dT)₂₀, Advanced Magnetics. Estas partículas magnéticas contienen oligo (dT)₂₀ unido covalentemente a la superficie por el extremo 5' dejando el extremo 3' libre.

Partículas magnéticas con estreptavidina, Promega. Partículas paramagnéticas irregulares de 1.0 μm de diámetro que tienen estreptavidina pegada covalentemente a la superficie. Un mg de partículas une aproximadamente, 1 nmol de oligo biotinilado o 100 μg de IgG biotinilada. Las partículas son estables en un rango de pH de 5.0 a 9.0 y en un rango de temperatura de 4-65°C. Temperaturas fuera de este rango causa que las partículas formen conglomerados y se destruyan. Las partículas vienen a una concentración de 1 mg/ml en PBS, 1 mg/ml de BSA y 0.02% de azida de sodio.

Partículas magnéticas con estreptavidina, Dynal (M-280). Partículas de poliestireno superparamagnéticas de 2.8 μm de diámetro que tienen estreptavidina pegada covalentemente a la superficie. La suspensión contiene $6-7 \times 10^8$ partículas/ml (10 mg/ml), disueltas en PBS pH 7.4, BSA 0.1% y 0.02% de azida de sodio.

Poliadenilación o biotilación de las sondas de captura.

Las sondas de captura fueron poliadeniladas durante una incubación de toda la noche a 37°C en 0.1 M cacodylato de potasio (pH 7.0), 1 mM CoCl_2 , 0.2 mM dithiothreitol, 0.1 mg/ml seroalbúmina acetilada (Biolabs), 0.03-0.866 μM de oligonucleótido, 0.3 mM dATP y 420 u/ml de TdT (terminal deoxinucleotidil transferasa) (Pharmacia) en un volumen final de 100 μl . Este protocolo introduce colas de entre 30 y 500 nucleótidos de longitud en el extremo 3' del oligonucleótido. Se estimó la longitud de la cola de poliA, por comparación a marcadores de DNA de cadena sencilla corridos en paralelo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 8% en TBE 1x. Las sondas poliadeniladas fueron purificadas en Biogel P30 y desnaturalizadas 10 min a 65°C antes de usarse.

Las sondas de captura biotiladas se hicieron siguiendo el mismo protocolo, pero utilizando 0.3 mM de dUTP-biotina, 210 u/ml de TdT e incubando por sólo 4 hrs a 37°C.

Transcripción *in vitro*.

El plásmido pGEM-1-PfA se linearizó por digestión con Pst I. Se incubaron 2-2.5 μg del DNA linearizado o el producto de PCR para PvA, con 100 unidades de la T7 RNA polimerasa por 3 hrs a 37°C en 100 μl de 400 μM ATP, 400 μM CTP, 400 μM GTP, 400 μM UTP, 40-50 mM Tris-HCl (pH 7.5-8.1), 6-12 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 6-10 mM DTT (preparado fresco), 2-4 mM espermidina y 100 unidades de inhibidor de ribonucleasa, RNAsin (Gibco, BRL). Los transcritos se incubaron con ~ 2 u/ μl de DNAsa libre de RNAsas en 15 mM CaCl_2 y 100 mM NaCl para destruir el templado de DNA y luego, se purificaron por extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, seguido por precipitación con etanol. Los RNAs se resuspendieron en EDTA 1 mM pH 7.7. Si se utilizó [α - ^{32}P]CTP durante la transcripción, la concentración del RNA se determinó de acuerdo a su actividad específica. El tamaño y la homogeneidad del RNA se determinó

por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea al 6% en buffer TBE 1x (89 mM Tris-boratos pH 8.0, 2 mM EDTA). Las bandas de RNA se visualizaron por tinción con plata. Los RNAs no marcados con radioactividad se cuantificaron por absorbancia a 260 nm ($1OD_{260nm} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$) y por comparación con estándares de RNA de concentración conocida.

Replicación.

Entre 0.001 y 1 pg de transcrito (dependiendo de la reacción) fueron incubados con 1.2 μg (37 u/ml) de la Q β replicasa a 37°C en 25 μl de 400 μM ATP, 400 μM [α - ^{32}P]CTP, 400 μM GTP, 400 μM UTP, 5 mM MgCl_2 y 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). El tamaño y la homogeneidad del RNA fué determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Las bandas del [^{32}P]RNA fueron detectadas por autoradiografía.

Geles de retardamiento en presencia de Mg^{++} .

La formación de híbridos entre los switches y los RNAs u oligonucleótidos blanco, los oligonucleótidos de captura y el templado de cadena sencilla se analizó en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 10% en buffer Tris-boratos que contenían 1 mM de MgCl_2 . Se mezclaron en 8 μl finales de reacción y en buffer KGB 1x (100 mM glutamato de potasio, 25 mM Tris-acetato (pH 7.6), 10 mM acetato de magnesio, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ seroalbumina bovina, 0.5 mM 2-mercaptoetanol), 1×10^{10} moléculas de cada uno de los switches marcados con P^{32} por kinación con la T4 kinasa, 1×10^{11} moléculas de cada uno de los oligos de captura y, 1×10^{11} moléculas de RNA 18S de PfA o PvA obtenidos por transcripción *in vitro* o 1×10^{11} moléculas de oligonucleótido blanco. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- 1) Se hirvió la mezcla por 1 min en un baño de agua y luego se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente (por 1 hr, aproximadamente).
- 2) Se añadieron 1×10^{11} moléculas del templado de cadena sencilla (bloqueado en el extremo 3' por un grupo amino) y,
- 3) Se incubó la mezcla 30 min a 37°C.

- 4) Al término de esta incubación se agregaron 4 μ l de buffer de carga (15% de Ficoll, 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xileno de cyanol, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA pH 8.0).

Los geles se corrieron a 250 volts en el cuarto frío en buffer de Tris-boratos 1x con 1mM MgCl₂ y los resultados se visualizaron y cuantificaron en el PhosphorImager (Molecular Dynamics, Inc.).

Mfold 2.0: Predicción de estructuras secundarias subóptimas de RNA por minimización de energía.

Este programa se corría en computadoras McIntosh que tuvieran un procesador o simulador matemático integrado. (Zuker, 1989; Jaeger, 1989).

Mfold 3.2: Predicción de estructuras secundarias de RNA por minimización de energía.

Este programa se corrió en el Instituto Politécnico de Rensselaer, mfold server: 1995-2008, Michael Zuker: <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi> (Mathews y col., 1999; Zuker, M., 2003).

Protocolo del ensayo (Ver Esquema General, Fig. 9).

Hibridación en soluciones de isotiocianato de guanidinio y captura a partículas electromagnéticas.

Lavados.

Elución.

Transcripción *in vitro*.

Replicación.

Stop buffer Q β :

120 mM NaCl

20 mM EDTA

RESULTADOS

I. Montando *in vitro* el funcionamiento de un switch molecular que generara señal únicamente, como función de la presencia de DNA o RNA blanco.

- 1) Diseño de switches moleculares que contienen una sonda de detección para *P. falciparum* o *P. vivax*, sondas de captura y templado de cadena sencilla que contiene el cDNA para el templado replicable, MNV-11.

El diseño de nuestras sondas se deriva en parte, de las sondas usadas exitosamente por el grupo del Dr. McCutchan. Su grupo, demostró la factibilidad de diseñar sondas específicas para la detección del RNA ribosomal de la forma sanguínea de varias especies de *Plasmodium*, incluyendo *P. falciparum* y *P. vivax* (Fig. 13 y 14) (McCutchan et al., 1988; Waters y McCutchan, 1989). Y ya que cada parásito contiene alrededor de 150,000 moléculas de RNA ribosomal, estas sondas tienen el potencial de mejorar considerablemente la sensibilidad de los ensayos diagnósticos.

Los switches moleculares que se utilizan en el esquema que proponemos son DNAs de cadena sencilla que contienen una secuencia sonda en medio de dos secuencias complementarias. Los switches moleculares se abren por hibridación de la sonda (una secuencia complementaria al blanco) a la molécula blanco y la molécula blanco puede ser DNA o RNA. La apertura del tallo de cadena doble de la molécula switch, se debe a la rigidez adoptada por la doble hélice de DNA:DNA o DNA:RNA que se forma entre la sonda del switch molecular (el asa) y el blanco (Shore y col., 1981; Ulanovsky y col., 1986 y Bhattacharyya y col., 1989 y 1990). En este esquema, la unión de la sonda al blanco produce un cambio conformacional de la sonda (la apertura del tallo de cadena doble) tal que, únicamente las sondas unidas al blanco podrán generar señal. Las sondas que no se unen al blanco permanecerán cerradas y de esta forma, no generarán señal.

Para el diseño de la secuencia sonda de los switches moleculares, primero se identificaron las regiones hipervariables dentro de la secuencia del RNA 18S de los genes de la fase sanguínea (A) de modo que, las secuencias que se escogieran como sonda, fueran especie-específica (ver Tabla 2). Identificamos dos regiones con significativa

```

PFa 1   CTGCTAATTASCGGCGAGTA CACTATATTCTTATTGAAA TT-GAACATAGGTAACTATA
PM 1    T A A TTAAGTGAAA TTAGAATATAGATAAATTGT
PO 1    C A GT TTATGCCAAA TT-GAATATAGATGAATT-T
PV 1    C A GT TTACGTGGGA CT-GAATTCGGTTG-ATT-T

PFa 59  CATTTATTCAGTAAT-AAAT TAGGATATTTTTAT----- -TAAAATATCCTTTTCCCCT
PM 60  GCTAATTTTGATTAAAATAT TAGAATGTTTTTTTTAATAA AAAACGTTCTTTTCCCTT
PO 58  GCTTATTTTGAAGAATACAC TAGGATAC-----AATTA AT---GTGTCCTTTCCCTA
PV 57  GCTTACTTTGAAGAAAATAT TGGGA-----AACGT AACG-GTTTCCCTTTCCCTT

PFa 112 TCTA-CTAATA-AATTGTTT TTTAC--TCTATTTCTCTCT TCTTTAAGAATGTA CTGCTTGC
PM 120 TTTTCTTAATTATGCATAT TTATTCTTTTCTTTTCTTTT CGCA- T
PO 108 TT---CTTCTT-AATTGCGA ATTCAT-GCTGTTTCTCTTT TGCATA G CGT
PV 106 TT---CTACTT-AGTTCGCT TTTTAC-ACTGTTTCTTTT CGCG-

```

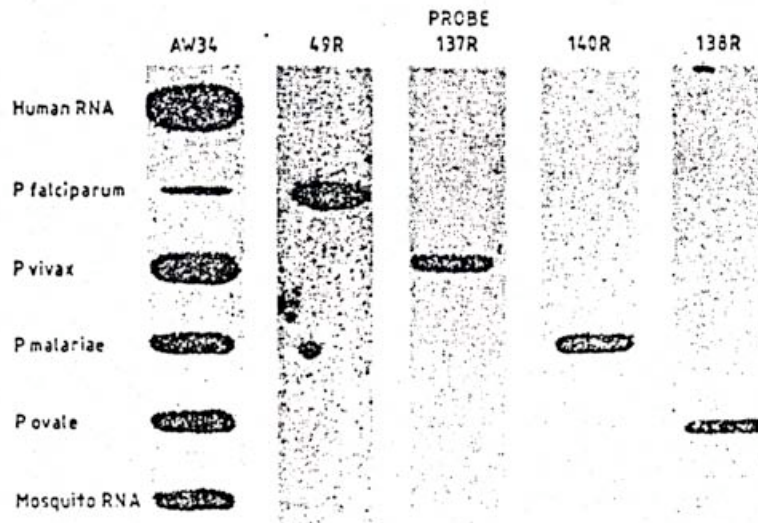


FIGURA 13. (Arriba) Secuencia de una región única del SSURNA (RNA18S) de cuatro especies de *Plasmodium* infectivas al hombre. Las secuencias están alineadas respecto a la secuencia de *P. falciparum* (Pfa); los gaps indican homología y los guiones indican que no existe el nucleótido correspondiente. PM = *P. malariae*; PO = *P. ovale*; PV = *P. vivax*. (Abajo) Detección especie-específica a alta astringencia de cuatro especies de *Plasmodium* infectivas al hombre (Waters y McCutchan, 1989).

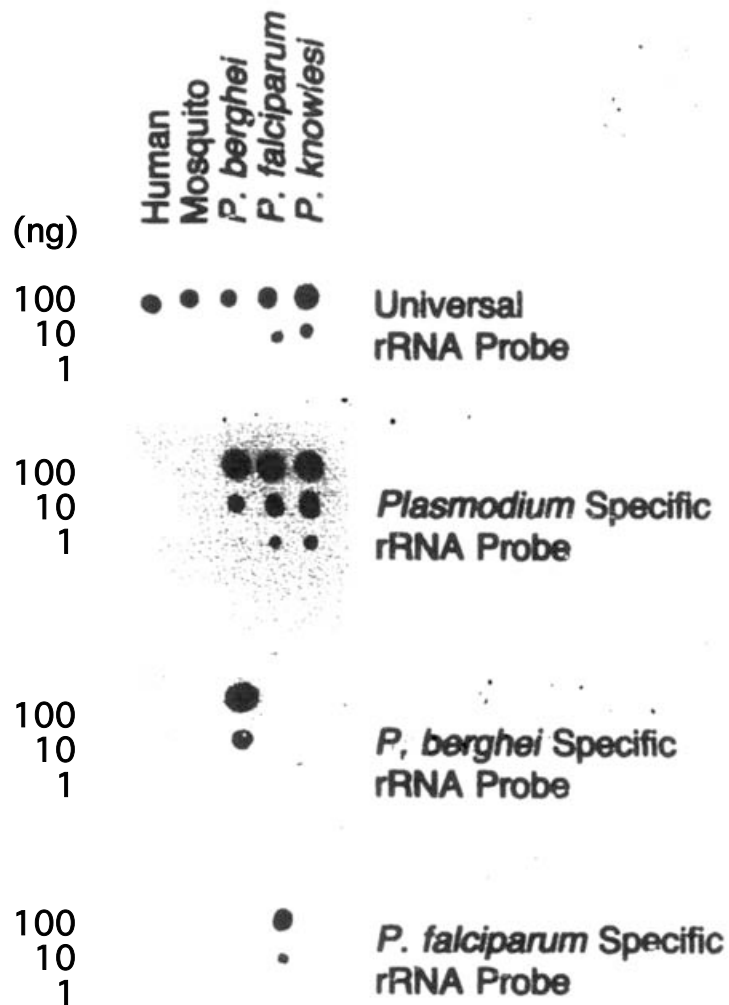


FIGURA 14. Comparación de la hibridación de sondas género- y especie-específicas para el RNA de tres diferentes especies de *Plasmodium*. Sondas: VD3, sonda universal para rRNA (5' TTACCGCGGACTGGCTGGC 3'); TM10, sonda específica para *Plasmodium* (5' ACTCGATTGATACACACT 3'); TM4, sonda específica para *P. berguei* (5' CATGAAGATATCGAGGCGGAG 3') y TM40, sonda específica para *P. falciparum* (5' TAGTCCCCTAGAATAGTTACAAT 3'). Se aplicaron a nitrocelulosa, 100, 10 y 1 ng de RNA total de cada uno de los tres parásitos así como, de humano y de mosquito (McCutchan et al., 1988).

Tabla 2. Similitud nucleotídica en diferentes regiones entre los RNAs ribosomales 18S de las especies de *Plasmodium* que infectan al humano.

Bloque No.	Posición nucleotídica ^a	Similitud ^b	(%)
1	1-175	Alta	(90)
2	176-302	Moderada	(61)
3	303-493	Alta	(98)
4	494-553	Moderada	(63)
5	554-656	Alta	(95)
6 (MC)	657-804	Baja	(26)
7	805-927	Moderada	(74)
8	928-1112	Alta	(92)
9	1113-1194	Baja	(49)
10	1195-1468	Alta	(97)
11 (VT)	1467-1687	Baja	(34)
12	1688-1793	Alta	(94)
13	1794-1889	Baja	(54)
14	1890-2146	Alta	(91)

^a Los bloques y el número de nt corresponde al RNA 18S de *P. vivax* C.

^b Alta similitud, > or = 90% de identidad; similitud moderada, 60-90% de identidad; y baja similitud, < 60% de identidad.

variación de secuencia entre el gene de humano y los genes de *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malarie*: la región 6, donde localizaba la sonda TM40, específica para *P. falciparum* (MC) y la región 11, donde localizaba la sonda 137, específica para *P. vivax* (VT) (McCutchan et al., 1988; Lal y col., 1989; Qari y col., 1994). En la Fig. 15, se muestra el alineamiento de las secuencias del RNA ribosomal 18S de los genes de la etapa de esporozoito (C) y de la etapa sanguínea (A) de *P. vivax* (*Pv*), *P. falciparum* (*Pf*) y *P. malarie* (*Pm*) así como, las secuencias escogidas para las sondas detectoras y las sondas de captura.

El tamaño del tallo y asa de los switches moleculares se escogieron de acuerdo al funcionamiento de otras estructuras de tipo tallo-asa, como el estudiado por Cesar Guerra en nuestro laboratorio (HIVswCG) (datos no publicados), donde se monitoreaba el estado cerrado o abierto del “switch molecular” por hibridación a su secuencia blanco, midiendo la presencia de un sitio de corte para la RNAsa III y la ausencia de un sitio de unión para la proteína de cubierta del bacteriofago de R17 en la conformación cerrada, y ausencia de un sitio de corte para la RNAsa III y la presencia de un sitio de unión para la proteína de cubierta del bacteriofago de R17 en la conformación abierta (Fig. 8). De esta forma se escogieron tallos de 18-20 nt y asas de alrededor de 40 nt.

La secuencias de las sondas detectoras se escogieron bajo los siguientes criterios: 1) que sus complementos estuvieran presentes en una región especie-específica para el RNA ribosomal 18S de la fase sanguínea (A) y no estuviera presente en el RNA ribosomal 18S de humano; 2) que de preferencia localizara una región poco estructurada, ya que esto podría interferir con su eficiencia de hibridación con el switch (aún en altas concentraciones de isotiocianato de guanidinio) y, 3) que por sí misma no presentara posibilidad de una fuerte estructura secundaria.

Inicialmente, para los switches PfAsw1 y PfAsw2 (Fig 16), la secuencia del tallo fué escogida de forma que 1) la porción 5' contuviera la secuencia complementaria al promotor para la T7 RNA polimerasa (cadena superior, 18 nt) y por lo tanto, 2) la porción 3' del tallo tuviera la secuencia complementaria y antiparalela. Posteriormente y de acuerdo al funcionamiento de estos switches (ver Fig. 20, más adelante), la secuencia del tallo, para PfAsw3, PfAsw4 y los switches de PvA, tuvo que ser modificada de forma que, 1) la porción 5' contuviera entre 13 y 16 nt de la secuencia hacia arriba del promotor

FIGURA 15. Alineamiento de las secuencias de los DNAs ribosomales 18S (SSUrDNA) de la etapa de esporozoito (C) y la etapa sanguínea (A) de *P. vivax* (*Pv*), *P. falciparum* (*Pf*) y *P. malarie* (*Pm*). Los puntos representan similitudes con la secuencia de *P. vivax* (*C*) y los guiones, representan gaps introducidos para alinear las secuencias. Las secuencias alineadas están divididas en 14 bloques arbitrarios basados en grado de similitud (ver Tabla 2). Se muestra la localización de 8 regiones del RNA 18S, que se sabe que divergen rápidamente y se refieren como regiones variables (V1-V9) o segmentos de expansión (Neefs y col., 1990). La región V6 no existe en los RNAs ribosomales 18S eucariotas. También se muestra en rojo la localización de todas las sondas; en verde, los oligos de captura utilizados para nuestros ensayos y en azul, algunas de las sondas utilizadas por el grupo de McCutchan (1989). El alineamiento se hizo utilizando el programa MACAW (Schuler y col., 1991) y fué tomado de Qari y col., 1994.

PfAsw1 (VT) 76 nt

5' CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT CCC CAA AAA AGC AAA AGC AAA AGT GGG
GAT TTT AAA ATA ATA CGA CTC ACT ATA G 3'

PfAsw2 (MC) 76 nt

5' CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAA GCC AAA AGC TAA AAT AGT TCC CCT AGA
ATA GTT ACA ATA ATA CGA CTC ACT ATA G 3'

PfAsw3 (MC) 86 nt

5' CGT ATT AGT CGA CAA GCT TGG CGA AAG CCA AAA GCT AAA ATA GTT CCC
CTA GAA TAG TTA CAA CGC CAA GCT TGT CGA CTA ATA CG 3'

PfAsw4 (MC) 82 nt

5' TCT TCG TAT TAG TCG ACA AGC TTG GAA AGC CAA AAG CTA AAA TAG TTC
CCC TAG AAT AGT TAC AAG CTT GTC GAC TAA TAC G 3'

PvAsw1 (MC) 80 nt

5' TTC GTA TTA GTC GAC AAG CAT GCG CAC AAA GTC GAT ACG AAG TAT CAG
TTA TGT GGA TTA CAT GCT TGT CGA CTA ATA CG 3'

PvAsw2 (VT) 80 nt

5' TTC GTA TTA GTC GAC AAG CAT GAC TTC CAA GCC GAA GCA AAG AAA GTC
CTT AAA AAG AAT CAT GCT TGT CGA CTA ATA CG 3'

PvAsw3 (MC) 80 nt

5' TTC GTA TTA GTC GAC AAG CAT GAT TTT CTT CAA AGT AAG CAA ATC AAC
CGA ATT CAG TCC CAT GCT TGT CGA CTA ATA CG 3'



Tallo



Asa (sonda)



**Promotor de la T7 RNA polimerasa
(cadena inferior)**

FIGURA 16. Secuencia de cada uno de los switches moleculares diseñados para *P. falciparum* (*PfA*) y *P. vivax* (*PvA*). Se especifican las secuencias del tallo, el asa y la secuencia complementaria al promotor de la T7 RNA polimerasa.

de T7 en la clona de M13 que contiene MDV-1 poly4 y únicamente, los primeros 7 nt del promotor para la T7 RNA polimerasa y por lo tanto, 2) la porción 3' del tallo tuviera esta misma secuencia, pero complementaria y antiparalela. En el ensayo propuesto, la generación de la señal ocurriría como se muestra en la Fig. 6. Al unirse al blanco, el switch molecular se abriría y expondría una secuencia de aproximadamente 20 nt de cadena sencilla que contiene 15-18 nucleótidos de la cadena superior del promotor para la T7 RNA polimerasa (para PfAsw1 y PfAsw2 o sólo los primeros 7 nt para PfAsw3, PfAsw4 y los switches de PvA). En la misma solución se encontraría una molécula de DNA de cadena sencilla que contiene la cadena inferior del promotor de T7, localizado frente al cDNA del RNA replicable. Este DNA de cadena sencilla se uniría específicamente a la secuencia de 20 nucleótidos del switch abierto. Una incubación simultánea en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q β , resultaría en la generación del RNA replicable por transcripción y su concomitante replicación. En el caso de usar los switches que contenían únicamente los primeros 7 nt del promotor de T7, se contempló la utilización de un paso extra de extensión con Klenow, para así reestablecer la secuencia promotora de T7 antes de la incubación con la T7 RNA polimerasa y la Q β replicasa (pero ésto trajo otro problema, ver más adelante). Así, para el diseño de los switches moleculares se requerían tallos cortos (18-20 nt) con una temperatura de fusión (TM) de alrededor de 50°C y energías libres (ΔG_0) de alrededor de -30 Kcal/mol.

Se utilizó el programa de predicción de estructuras secundarias óptimas y subóptimas, Mfold, desarrollado por el Dr. Michael Zuker (versión 2.0 y más recientemente, la versión 3.2) (Zuker, 1989; Jaeger, 1989) (Mathews y col., 1999; Zuker, 2003), para la obtención de las estructuras secundarias de los switches moleculares así como sus energías libres. Para la obtención de la energía libre de las secuencias sonda se corrió el programa de Mfold introduciendo las secuencias sonda solas. Mientras que, para la obtención de la energía libre de los tallos se corrió el programa de Mfold utilizando, la secuencia del tallo 5' seguida por 40 Ns más la secuencia complementaria a ese tallo. Las temperaturas de fusión (Tm) se calcularon utilizando un programa para McIntosh, llamado Tmcalc.av.0691, escrito por el Dr. Lizardi con las fórmulas de Itakura y Schilkdraut.

En la Fig. 16 se muestra la secuencia de los 4 switches moleculares diseñados para *P. falciparum* (PfAsw1-PfAsw4) y los 3 diseñados para *P. vivax* (PvAsw1-PvAsw3) indicando las secuencias del tallo, el asa y las secuencias complementaria al RNA blanco y al promotor de la T7 RNA polimerasa. En la Tabla 3 se indican las Tms y las energías libre (ΔG_0) para el tallo y el asa de los diferentes switches moleculares. Por último, en las Figs. 17, 18 y 19, se muestran las estructuras secundarias óptimas predichas por el programa Mfold (versión 3.2) para cada uno de los switches diseñados.

Las sondas de captura fueron escogidas, 1) en secuencias adyacentes a las secuencias sondas en regiones *Plasmodio* específicas y 2), de entre 35 y 45 nt de longitud con Tms por arriba de los 80°C. En la Figura 20 se muestra la secuencia de las sondas de captura seleccionadas y en la Tabla 4 se muestran las Tms y las energías libres de las sondas de captura así como, su especificidad.

Los templados de cadena sencilla que hibridan específicamente con el tallo 3' del switch abierto, debían incluir en su extremo 3', la secuencia inferior del promotor para la T7 RNA polimerasa seguida en su extremo 5', por el cDNA para una molécula replicable (MDV-poly4 o MNV-11). Este DNA de cadena sencilla se une específicamente a la secuencia de 20 nucleótidos del switch abierto. Una incubación simultánea en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q β , resultaría en la generación del RNA replicable por transcripción y su concomitante replicación.

La T7 RNA polimerasa es una RNA-polimerasa DNA-dependiente que cataliza la formación de RNA en dirección 5'->3'. La polimerasa del bacteriofago T7 es altamente específica para su promotor y sólo transcribe DNA del bacteriofago T7 o DNA clonado adelante del promotor de T7. La RNA polimerasa de T7 requiere del ion Mg²⁺ como cofactor para la síntesis de RNA. La enzima es fuertemente estimulada por BSA o espermidina. En contraste a las RNA polimerasas bacterianas, la T7 RNA polimerasa no es inhibida por rifampicina y tiene una frecuencia de error muy baja (Sastry and Ross, 1997).

Se decidió utilizar como molécula replicable al RNA MDV-poly4, una molécula recombinante de 243 nt, por la facilidad de obtener este templado de cadena sencilla por subclonación del cDNA de MDV-poly4 frente al promotor de T7 en un vector del tipo M13, del cual se podía preparar templado de cadena sencilla de ambas cadenas. Con la

Tabla 3. Comparación de la Tm y la energía libre del tallo y el asa de los diferentes switches moleculares.

Switch molecular	ΔG_0 estructura óptima* (kcal/mol)	Tm tallo (°C)	ΔG_0 tallo (kcal/mol)	Tm sonda (°C)	ΔG_0 sonda (kcal/mol)
PfAsw1 (18:40:18)	-32.9 (-38.70)	47.17	-21.8	92.38	-57.2
PfAsw2 (18:40:18)	-23.6 (-26.47)	47.17	-21.8	88.31	-57.7
PfAsw3 (23:40:23)	-38.3 (-41.87)	67.17	-36.3	88.31	-57.7
PfAsw4 (24:40:20)	-30.6 (-33.90)	59.78	-28.5	90.30	-60.1
PvAsw1 (22:40:20)	-33.8 (-39.70)	60.21	-28.1	95.39	-63.0
PvAsw2 (23:40:21)	-29.8 (-33.46)	62.75	-28.1	94.46	-63.0
PvAsw3 (22:40:20)	-27.0 (-29.60)	60.21	-28.1	93.31	-59.5
HPDsw1	-55.5	76.6	-43.3	75.2	-12.1
HPDsw2	-35.1	66.9	-20.7	92.3	-59.6
HPDsw3	-29.7	56.2	-27.1	92.3	-61.3
HIVswCG (20:32:20)	-33.9	50.7	-30.6	46.28	-45.5

- Las energías libres de las estructuras secundarias óptimas fueron calculadas por el programa Mufold (versión 2.0, 1990) y luego, más recientemente (entre paréntesis) por la nueva versión 3.2 del mismo programa (2003).

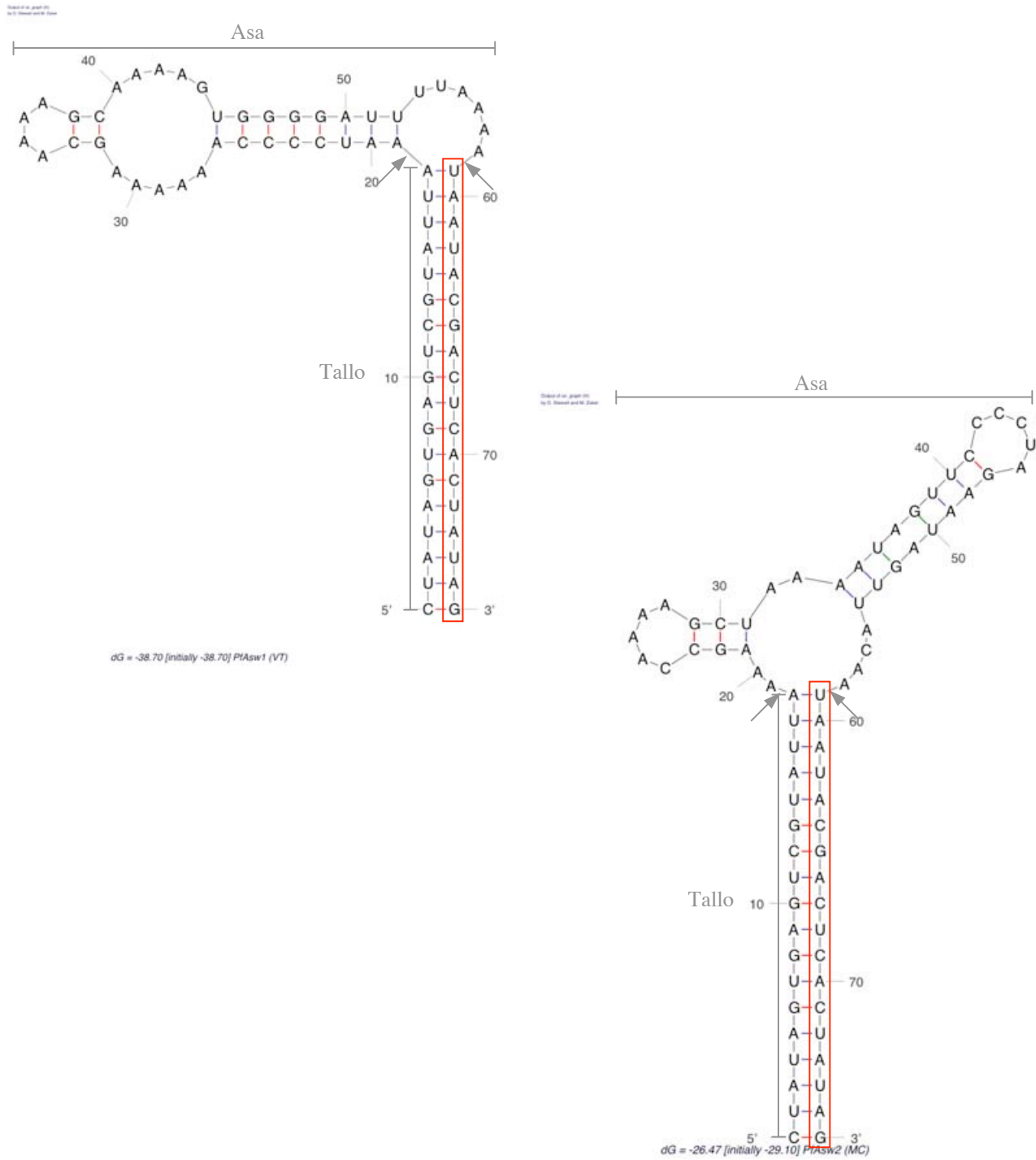


FIGURA 17. Estructuras secundarias óptimas predichas para los switches moleculares, PfAsw1 (VT) y PfAsw2 (MC). La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zucker (Mfold 3.2) (Zucker, 2003). La secuencia del tallo y el asa prediseñado se indica en cada estructura. La secuencia complementaria al RNA ribosomal 18S de *PfA* (sonda) esta flanqueada por flechas. La secuencia del promotor para la T7 RNA polimerasa se muestra dentro de un rectángulo rojo.

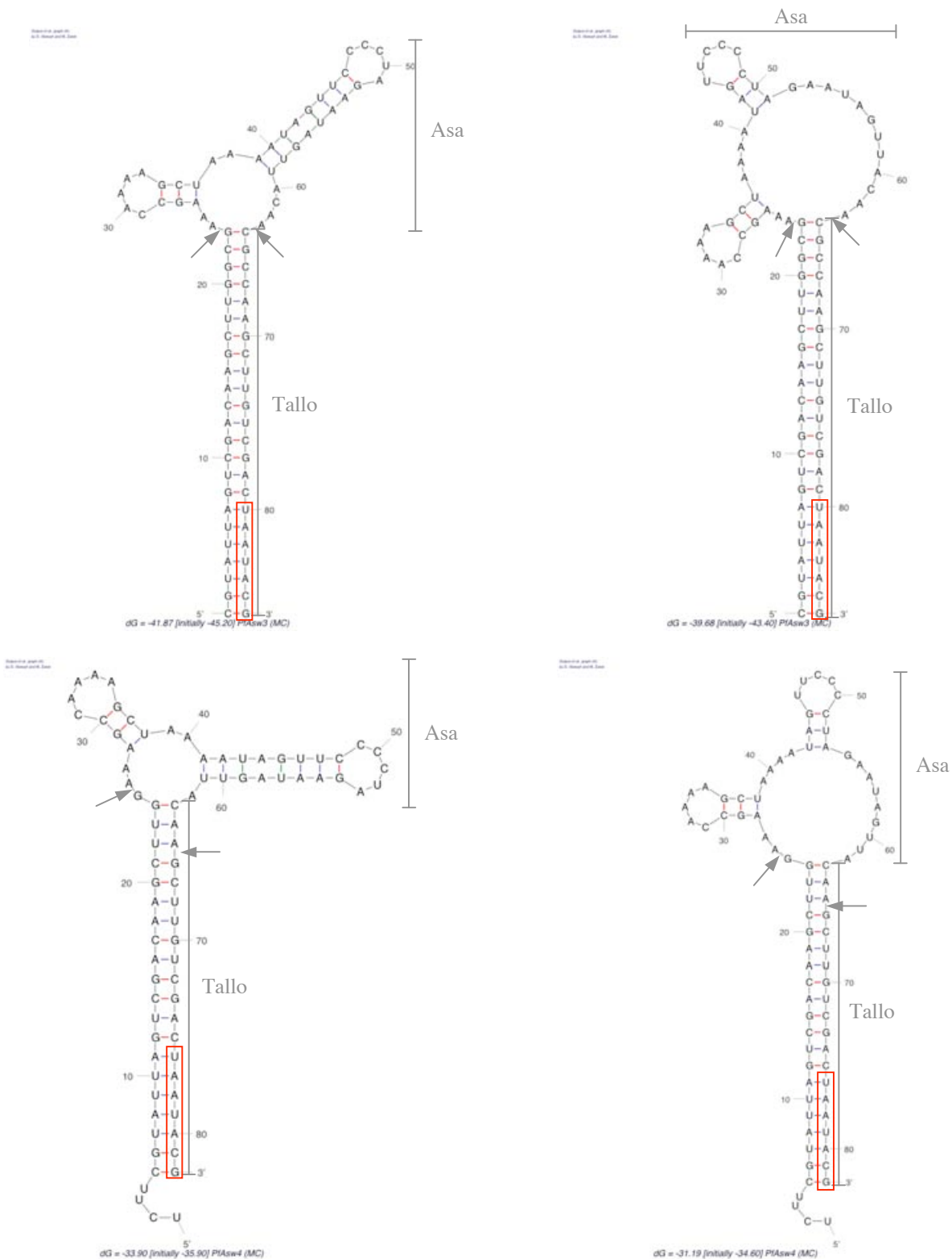


FIGURA 18. Primeras dos estructuras secundarias óptimas predichas para los switches moleculares, PfAsw3 (MC) y PfAsw4 (MC). La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zucker (Mfold 3.2) (Zucker, 2003). La secuencia del tallo y el asa prediseñado se indica en cada estructura. La secuencia complementaria al RNA ribosomal 18S de *PfA* (sonda) esta flanqueada por flechas. La secuencia del promotor para la T7 RNA polimerasa se muestra dentro de un rectángulo rojo.

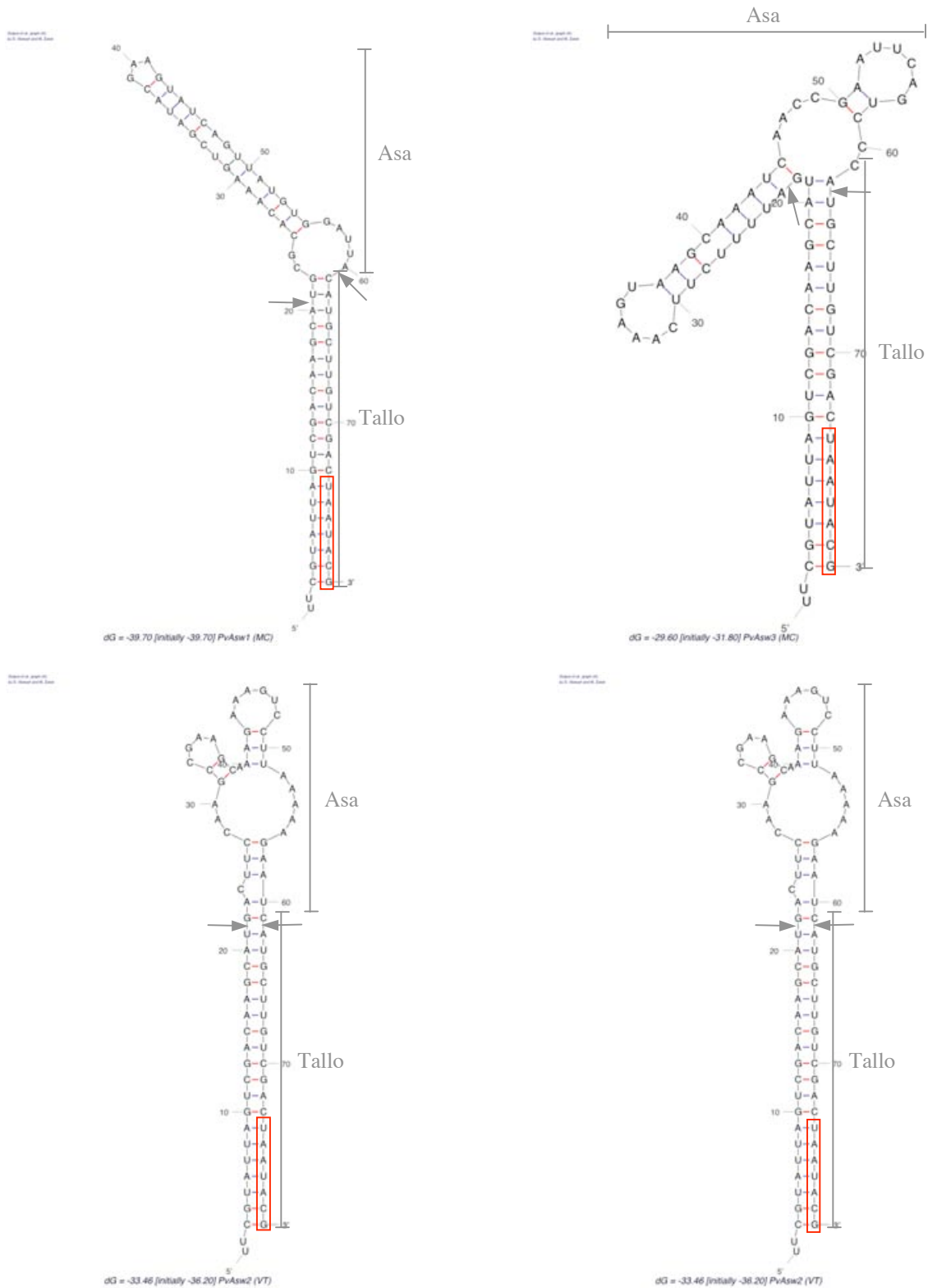


FIGURA 19. Estructuras secundarias óptimas predichas para los switches moleculares, PvAsw1 (MC) y PvAsw3 (MC) y las primeras dos estructuras secundarias óptimas para el switch PvAsw2 (VT). La predicción se hizo utilizando el programa de cálculo de estructuras subóptimas de Zucker (Mfold 3.2) (Zucker, 2003). La secuencia del tallo y el asa prediseñado se indican en cada estructura. La secuencia complementaria al RNA ribosomal 18S de *PvA* (sonda) esta flanqueada por flechas. La secuencia del promotor para la T7 RNA polimerasa se muestra dentro de un rectángulo rojo.

Cap1 (37mero)
5' TAAAATATCGATTCTTTGAAATTCAACTACGAGCGTT 3'

Cap2 (45mero)
5' AAGCTACTCCTATTAATCGTAACTAAGCCAAAATAAGAAAAAGA 3'

Cap3 (35mero)
5' TTGTTACTCTGGGAAGGTTTTAAATTCCCACCATT 3'

Cap4 (45mero)
5' GTTATTCCATGCTATAGTATTCAAACACAGTAAATGCTTTAACTG 3'

Cap5 (45mero)
5' TAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCTTATTTTAAAATCTTTCA 3'

Cap6 (45mero)
5' GCGAACTAAGTAGAAAAGGGAAAGGGAAACTGTTACGTTTCCCAA 3'

Cap7 (45mero)
5' TACAATCAAGCAAATACATTCTTACGCGAAAAAGAAACAGTATGA 3'

FIGURA 20. Secuencia de los oligonucleótidos de captura diseñados para *P. falciparum* (PfA) y *P. vivax* (PvA). Se especifican los tamaños para cada uno de ellos.

Tabla 4. Comparación de las Tms y las energías libres de los oligonucleótidos de captura para *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.

Oligo	Tamaño (nt)	Especificidad	%G/C	Tm (°C)	ΔG_0 (kcal/mol)
Cap 1	37	PfA y PvA	29.73	85.74	-43.0
Cap 2	45	PfA y PvA	28.89	93.44	-50.1
Cap 3	35	PfA	37.14	85.07	-52.7
Cap 4	45	PfA	31.11	94.05	-63.3
Cap 5	45	PvA	22.22	90.94	-56.5
Cap 6	45	PvA	42.22	102.61	-72.6
Cap 7	45	PvA	31.11	97.85	-64.1

ayuda de oligonucleótidos complementarios a los sitios de corte, que flanquean a el promotor de T7 frente al cDNA de MDV-poly4, se cortaba y purificaba un fragmento de 270 nt que servía en ensayos iniciales, como templado de cadena sencilla.

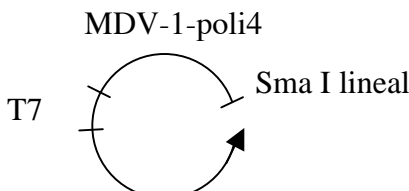
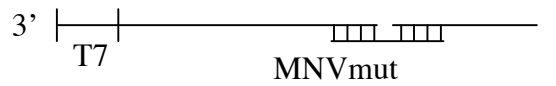
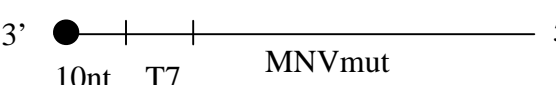
El RNA MDV-poly4 se deriva del RNA MDV-1 de 221nt, un sustrato natural para la replicasa de Q β (Lizardi y col., 1988). El RNA MDV-1-poly4 es una molécula recombinante que tiene embebida una secuencia polylinker en un tallo-asa que localiza en el exterior de la molécula del RNA MDV-1. Se sabe que esta secuencia no altera significativamente las propiedades de replicación de la molécula recombinante (Hilda M. Lomelí-Buyoli, Tesis de Doctorado, 1990).

Posteriormente, decidimos utilizar como molécula replicable al RNA MNV-11, por ser un sustrato natural para la replicasa de Q β y ser de menor tamaño, 86 nt. Esto, facilitaba su obtención por ligación de dos oligonucleótidos sintéticos sobre un tercero que funcionaba como secuencia guía. Y conforme la síntesis de oligonucleótidos fué más eficiente, fué posible incluso, comprar el oligonucleótido sintético de 112 nt que contenía el cDNA de MNV-11 frente al promotor para la T7 RNA polimerasa. Posteriormente, con la idea de disminuir la transcripción del templado de cadena sencilla y suponiendo que la T7 RNA polimerasa pudiera estar accedando el templado de cadena sencilla por el extremo 3', mandamos a sintetizar un templado de cadena sencilla de 112 nt que tenía un grupo amino en el extremo 3', como grupo bloqueador. En la Tabla 5 se muestran los diferentes templados de cadena sencilla utilizados, el tamaño y la T_m de los híbridos formados con los switches moleculares abiertos, antes y después del paso de extensión con Klenow.

2) Construcción de los plásmidos que contienen el cDNA para el RNA 18S de la fase asexual de *Plasmodium falciparum* o de *Plasmodium vivax* y la obtención de blancos artificiales por transcripción *in vitro*.

Con el objetivo de optimizar todos los parámetros del ensayo propuesto, era deseable poder generar los RNAs ribosomales que serían utilizados como blancos artificiales, por transcripción *in vitro* a partir de plásmidos que así lo permitieran.

Tabla 5. Tm del tallo que se forma entre los switches abiertos y los diferentes templados de cadena sencilla.

Templado de cs	Esquema	Tallo	Tm (°C)
ssM13-T7-MDV-1-poli4 270 nt	 <p>MDV-1-poli4</p> <p>T7</p> <p>Sma I lineal</p>	18 nt	47.17 ^{&}
		17 nt	53.79 [*]
		(27 nt)	(71.1) ^{**}
		18 nt	56.52 ⁺
		(28 nt)	(73.14) ⁺⁺
ssT7-MNV11mut 112 nt	 <p>3' ----- 5'</p> <p>T7 MNVmut</p>	18 nt	47.17 ^{&}
		17 nt	53.79 [*]
		(27 nt)	(71.1) ^{**}
		18 nt	56.52 ⁺
		(28 nt)	(73.14) ⁺⁺
ssT7-MNV11mut 3'NH3 112 nt	 <p>3' ●----- ----- 5'</p> <p>10nt T7 MNVmut</p>	18 nt	47.17 ^{&}
		17 nt	53.79 [*]
		(27 nt)	(71.1) ^{**}
		18 nt	56.52 ⁺
		(28 nt)	(73.14) ⁺⁺

[&] Tm del híbrido de 18 nt que se forma entre el templado de cs y los switches, PfAsw1 y PfAsw2.

^{*} Tm del híbrido de 17 nt que se forma entre el templado de cs y los switches abiertos, PfAsw3 y PfAsw4.

^{**} Tm del híbrido de 27 nt que se forma entre el templado de cs y los switches abiertos extendidos con Klenow, PfAsw3 y PfAsw4.

⁺ Tm del híbrido de 18 nt que se forma entre el templado de cs y los switches abiertos, PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3.

⁺⁺ Tm del híbrido de 28 nt que se forma entre el templado de cs y los switches abiertos extendidos con Klenow, PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3.

Así, con la ayuda de Georgina Estrada, se subclonó el fragmento Eco RI-Pst I de la clona pUC13-PfA (regalo del Dr. Thomas McCutchan, NIH) que contiene el gene 18S ribosomal de *P. falciparum* de la etapa sanguínea, al vector pGEM-1 (Promega) que contiene los promotores para la T7 y la SP6 RNA polimerasa, orientados en direcciones opuestas. La identidad y la orientación de las clonas obtenidas fueron analizadas por secuenciación con un oligonucleótido complementario al promotor de la T7 RNA polimerasa (datos no mostrados). El RNA ribosomal 18S de PfA (un transcrito de ~2.1 Kb) se obtenía así, por transcripción *in vitro* con la T7 RNA polimerasa a partir de la clona #5 (pGEM-1-PfA), linerizada con Pst I.

Para la producción del RNA ribosomal 18S de PvA, se utilizó la clona pUC13-PvA que contiene los primeros 1500 nt del extremo 5' del gene 18S ribosomal de PvA (regalo del Dr. Thomas McCutchan, NIH), para lo obtención de un producto de PCR 1626 nt que contuviera el promotor de la T7 RNA polimerasa en el extremo 5' y de ahí se generaba, por transcripción *in vitro*, un transcrito de 1.5 kb.

3) Monitoreo del estado abierto o cerrado de los swithces moleculares para *P. falciparum* por hibridación al blanco y al templado de cadena sencilla (MDV-1-poly4) en experimentos de extensión con Klenow.

Los switches marcados radioactivamente en el extremo 5' con la kinasa de T4, se hibridaron primero al RNA 18S de *P. falciparum* (PfA), luego se añadió el templado de cadena sencilla (fragmento Sal I-Sma I), se incubó a 37°C por 30 min y por último, se añadió el fragmento Klenow de la DNA polimerasa + dNTPs y se incubó por 20 mins a 37°C. Las muestras se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 8% en buffer TBE 1x. En los carriles 1, se cargaron los switches marcados; en los carriles 2, se cargaron los switches marcados hibridados al RNA blanco (en estado abierto); en los carriles 3, se cargaron los switches marcados abiertos (hibridados al RNA blanco) en presencia del templado de cadena sencilla y en los carriles 4, se cargaron los switches marcados en presencia únicamente del templado de cadena sencilla (Fig. 21). Como puede observarse, en estas condiciones de sal y temperatura los switches, PfAsw1 y PfAsw2 se abren tanto en ausencia (carril 4) como en presencia del RNA blanco (carril 3)

RNA blanco:sw:templado de cs
10 : 1 : 10

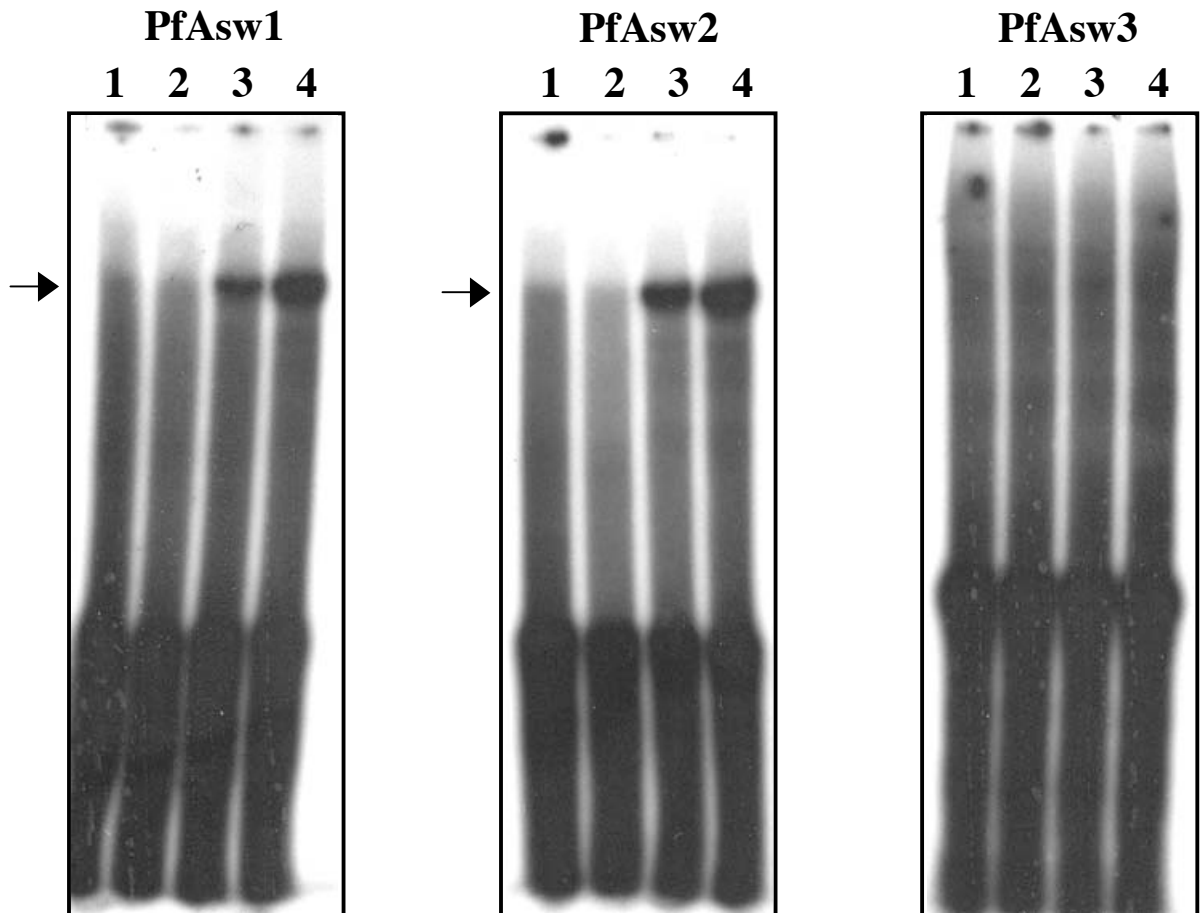
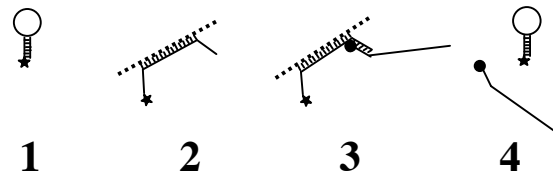


FIGURA 21. Extensión con Klenow de los switches abiertos por hibridación con el RNA de PfA sobre el templado de cadena sencilla (MDV-1-poly4). Primero, los switches marcados radioactivamente se hibridaron con el RNA 18S de PfA en buffer KGB 1x, luego, se añadió el templado de cadena sencilla (fragmento Sal I-Sma I) y se incubó a 37°C por 30 min y por último, se añadió el fragmento Klenow de la DNA polimerasa + dNTPs y se incubó 20 mins a 37°C. Se corrieron geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 8% en TBE 1x. En los carriles 1, se cargaron los switches marcados; en los carriles 2, se cargaron los switches hibridados al RNA blanco (en estado abierto); en los carriles 3, se cargaron los switches abiertos (hibridados al RNA blanco) en presencia del templado de cadena sencilla y en los carriles 4, se cargaron los switches en presencia únicamente del templado de cadena sencilla.

mientras que, el switch PfAsw3 no se abre ni en ausencia ni en presencia del RNA blanco (carril 3 y 4). Este comportamiento, correlaciona bien con las características de T_m y ΔG_o para estos switches (ver Tabla 2). A raíz de esto, se diseñó PfAsw4 y en experimentos similares, se determinó que este switch se abría específicamente en presencia del blanco (datos no mostrados).

4) Transcripción y replicación simultánea del templado de cadena sencilla, MDV-1-poli4.

Si se incuban diluciones seriadas del DNA de cadena sencilla que contiene el cDNA de MDV-poli4, con un oligonucleótido complementario al promotor de T7, en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q β con (1) 10^7 , (2) 10^6 , (3), 10^5 , (4) 10^4 (5) 10^3 , (6) 10^2 , (7) 10^1 , (8) 0 moléculas y las reacciones se incuban por 30 min a 37°C, se puede observar que el RNA MDV-1-poly4 producido por transcripción y subsecuente replicación de forma exponencial, es perfectamente detectable en la muestra 7 (aproximadamente 10 moléculas de “input”) (Fig. 22).

5) Evaluación de la interacción entre las distintas sondas, en geles de retardamiento.

La formación de híbridos entre los switches y los RNAs u oligonucleótidos blanco, los oligonucleótidos de captura y el templado de cadena sencilla se analizó en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 10% en buffer Tris-boratos que contenían 1 mM de $MgCl_2$, que estabiliza los híbridos DNA:DNA y DNA:RNA. Básicamente, se incubaron 1×10^{10} moléculas de cada uno de los switches marcados con P^{32} por kinación con la T4 kinasa, 1×10^{11} moléculas de cada uno de los oligos de captura, 1×10^{11} moléculas de RNA 18S de PfA o PvA obtenidos por transcripción *in vitro* o 1×10^{11} moléculas de oligonucleótido blanco y 1×10^{11} moléculas del templado de cadena sencilla (bloqueado en el extremo 3' por un grupo amino) en buffer KGB 1x (100 mM glutamato de potasio, 25 mM Tris-acetato (pH 7.6), 10 mM acetato de magnesio, 50 $\mu g/ml$ seroalbumina bovina, 0.5 mM 2-mercaptoetanol) por 30 min a 37°C. Como puede observarse en la Fig. 23, PfAsw1 no hibrida ni con el RNA de PfA ni con su oligonucleótido complementario por lo que no hay retardamiento del switch marcado en todos los carriles, mientras que los

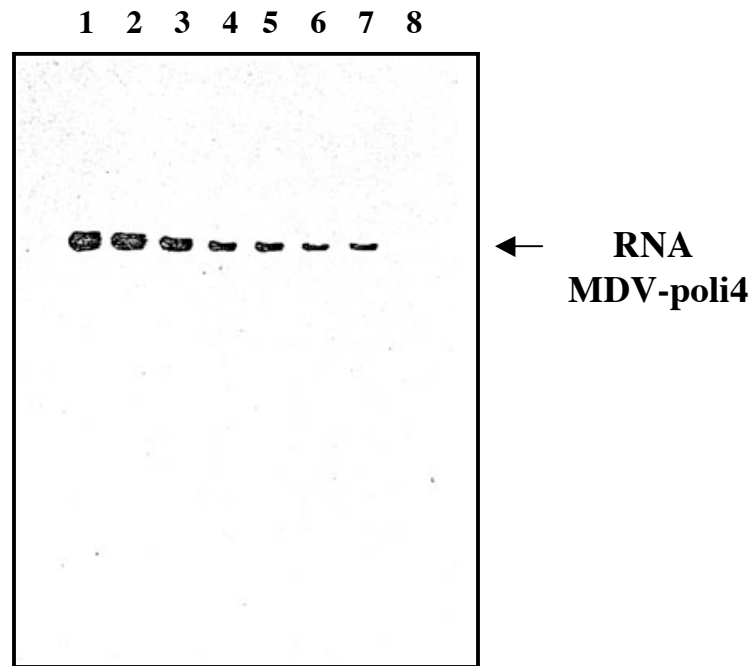
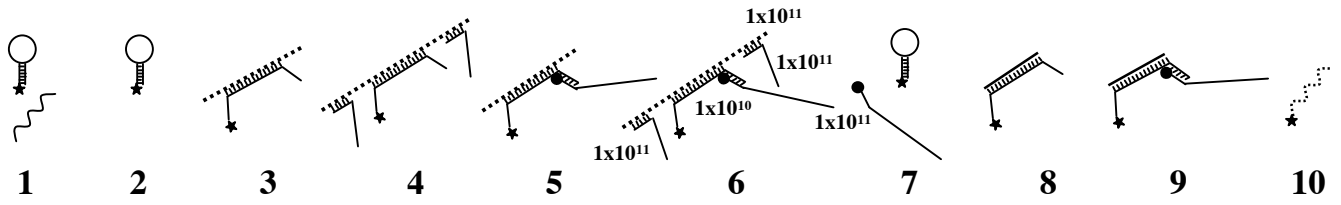
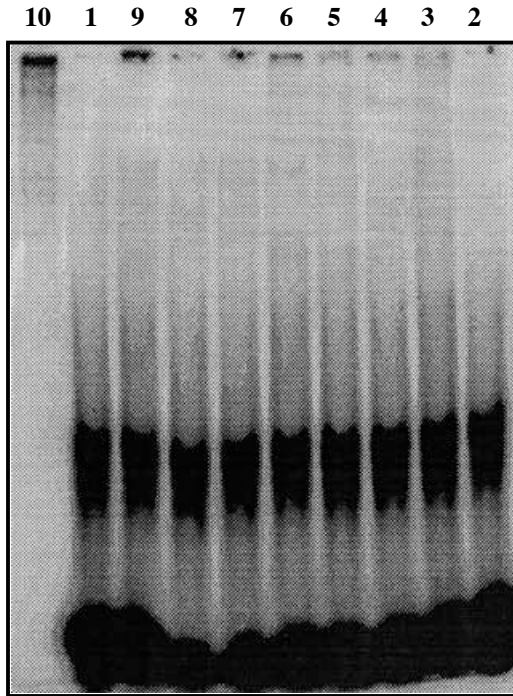


FIGURA 22. Análisis electroforético del RNA MDV-poli4 producido simultáneamente, en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q β . El RNA MDV-poli4 marcado radioactivamente proviene de la incubación del DNA de cadena sencilla que contiene el cDNA de MDV-poli4, con un oligonucleótido complementario al promotor de T7, en presencia de la T7 RNA polimerasa y la replicasa de Q β . Las diluciones seriadas añadidas a la reacción contienen (1) 10^7 , (2) 10^6 , (3), 10^5 , (4) 10^4 (5) 10^3 , (6) 10^2 , (7) 10^1 y (8) 0 moléculas del DNA de cadena sencilla. Las reacciones fueron incubadas por 30 min a 37°C. Como se puede observar, el material producido por transcripción y subsecuente replicación de forma exponencial es perfectamente detectable en la muestra 7 (aprox. 10 moléculas de “input”).

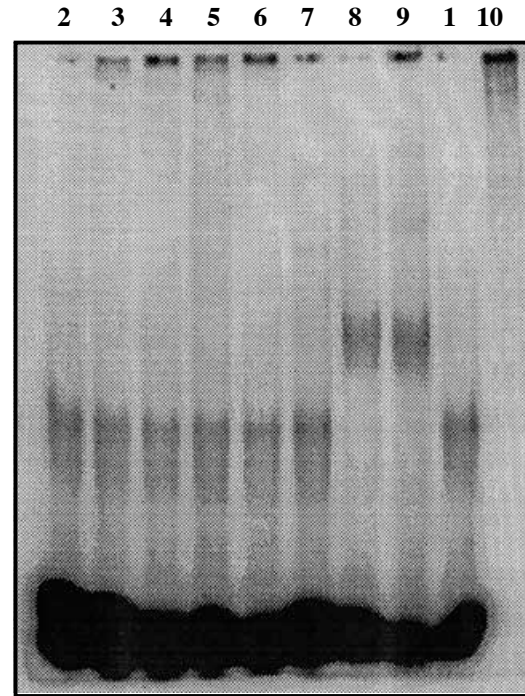
FIGURA 23



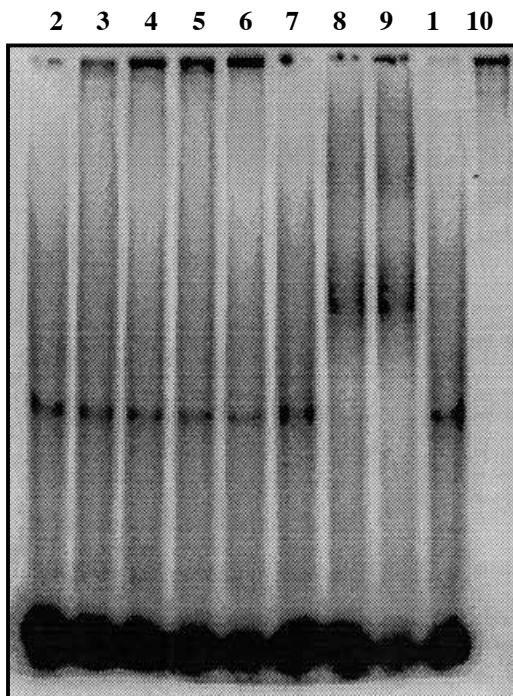
PfAsw1



PfAsw2



PfAsw3



PfAsw4

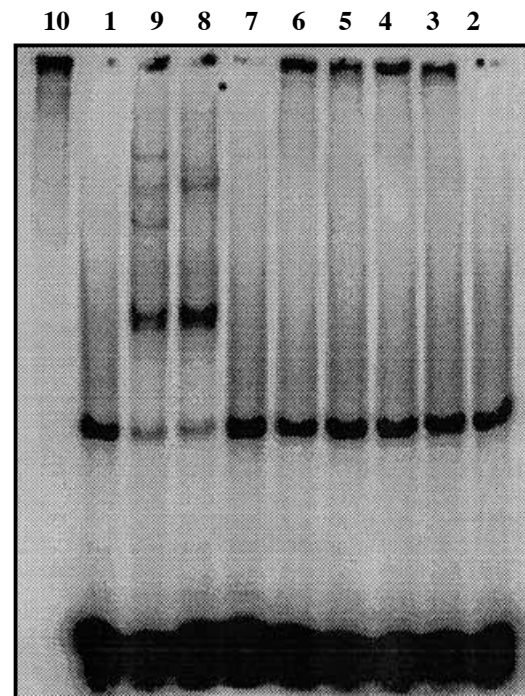


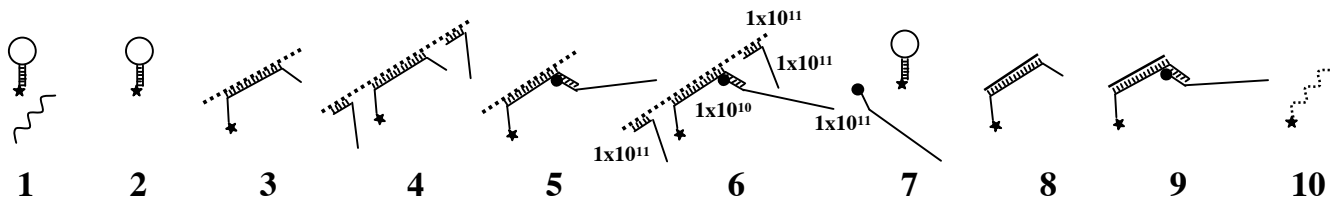
FIGURA 23. Evaluación de la interacción entre los switches para PfA y el RNA u oligonucleótido blanco, los oligos de captura y el templado de cadena sencilla, en geles de retardamiento. Primero, se mezclaron 1×10^{10} moléculas de cada uno de los switches marcados con [^{32}P] por kinación con la T4 kinasa con 1×10^{11} moléculas de RNA 18S de PfA obtenido por transcripción *in vitro* o 1×10^{11} moléculas de oligonucleótido blanco y 1×10^{11} moléculas de cada uno de los oligos de captura. La mezcla se hirvió por 1 min y luego se dejó llegar a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hr, en buffer KGB 1x. Luego se añadieron 1×10^{11} moléculas del templado de cadena sencilla (bloqueado en el extremo 3' por un grupo amino) y se incubó por otros 30 min a 37°C. Las muestras se corrieron y analizaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 10% en buffer Tris-boratos que contenían 1 mM de MgCl_2 .

otros switches para *P. falciparum*, PfAsw2, PfAsw3 y PfAsw4, hibridan tanto al RNA de PfA (carriles 3, 4, 5 y 6) como a sus respectivos oligonucleótidos complementarios (carriles 8 y 9). Sin embargo, PfAsw2 y PfAsw3 no parecen hibridar con el templado de cadena sencilla ya que no muestran un complejo extra de menor movilidad (comparar carril 8 y 9). El único switch que parece adquirir una conformación abierta al hibridar con su oligo complementario, es el sw4 (PfAsw4), ya que al comparar el carril 8 con el 9, podemos observar un complejo extra de menor movilidad que hibrida con el templado de cadena sencilla, aunque no hibrida eficientemente. En la Fig. 24 se muestran los geles de retardamiento para los switches de *P. vivax* (Pvasw1, Pvasw2 y PvAsw3). Los tres switches hibridan a sus oligonucleótidos complementarios (carril 8 y 9) pero solamente, el PvAsw1 y PvAsw3, hibridan eficientemente con el templado de cadena sencilla. El único switch que parece hibridar al RNA de PvA y éste a su vez, a los oligonucleótidos de captura, es el switch PvAsw3 (ver carriles 4 y 6), aunque su secuencia sonda en el RNA de PvA que obteníamos de la clona de pUC13-PvA, está truncada. En la Fig. 25 puede apreciarse que el complejo de menor movilidad que se observa entre el switch marcado (PvAsw3) y su oligo complementario (carriles 8 de la Fig. 24) se debe a la formación de dímeros, switch:blanco.

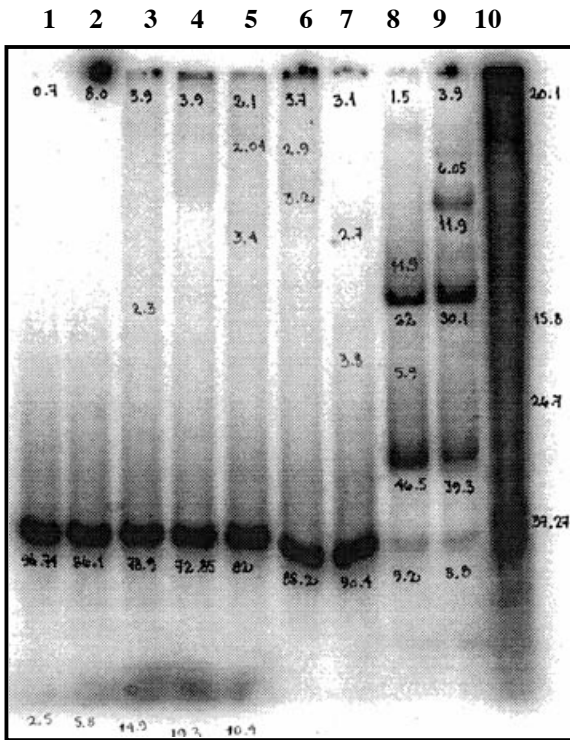
II. Implementación de un ensayo modelo de hibridación para la detección de blancos artificiales de *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax* en combinación con el sistema de amplificación de señal por medio de la Q β replicasa.

- 1) Eficiencia de captura y elución de oligos de captura sólo o poliadenilados en condiciones de hibridación con GuSCN en función de la cantidad de partículas magnéticas y su capacidad de unión.

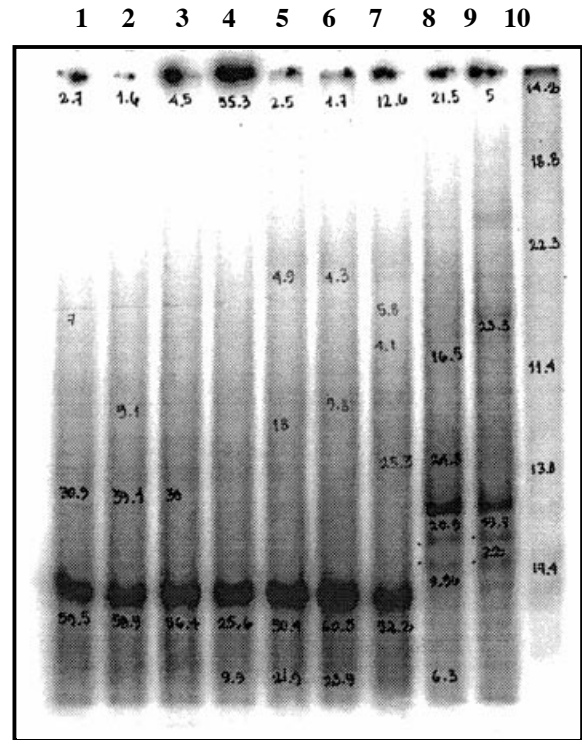
En el ensayo mostrado en la Fig. 26, se utilizaron 10^{10} moléculas del oligo de captura, Cap1, sólo o con cola de poliA y con dos diferentes cantidades de partículas magnéticas (Genetrak Systems) con una capacidad de unión de 2×10^{12} y 5×10^{12} moléculas de oligo dT (una relación de 1:200 o 1:500 oligo de captura:oligo dT). La primera elución ocurre a 37°C por 5 min y la segunda, a 65°C por 5 min. Como puede



PvAsw1



PvAsw2



PvAsw3

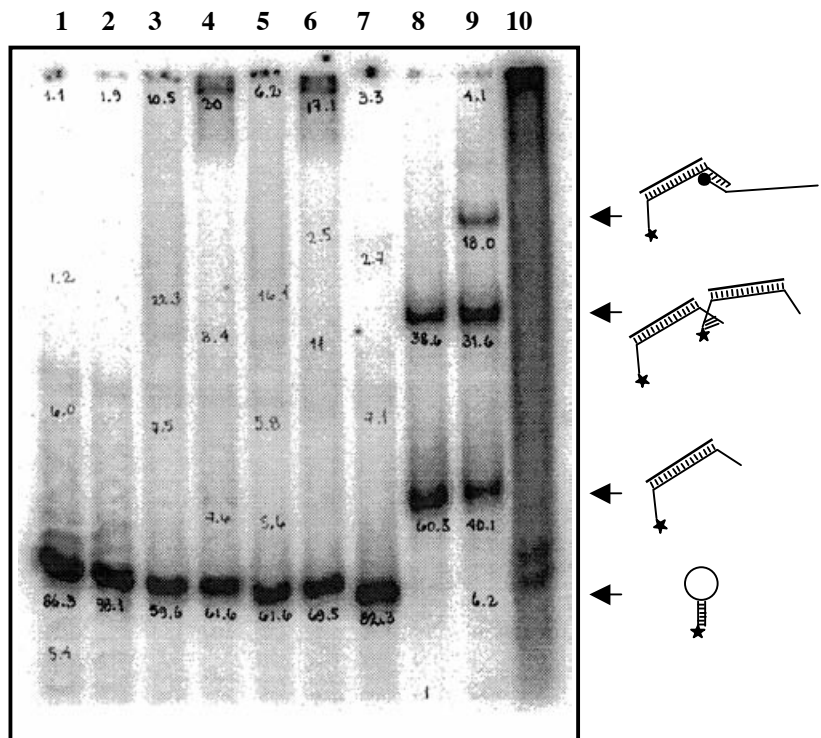


FIGURA 24. Evaluación de la interacción entre los switches para PvA y el RNA u oligonucleótido blanco, los oligos de captura y el templado de cadena sencilla, en geles de retardamiento. Igual que en la figura anterior pero utilizando el RNA 18S de PvA.

PvAsw3 + blanco PvAsw3c (dils 1:4)

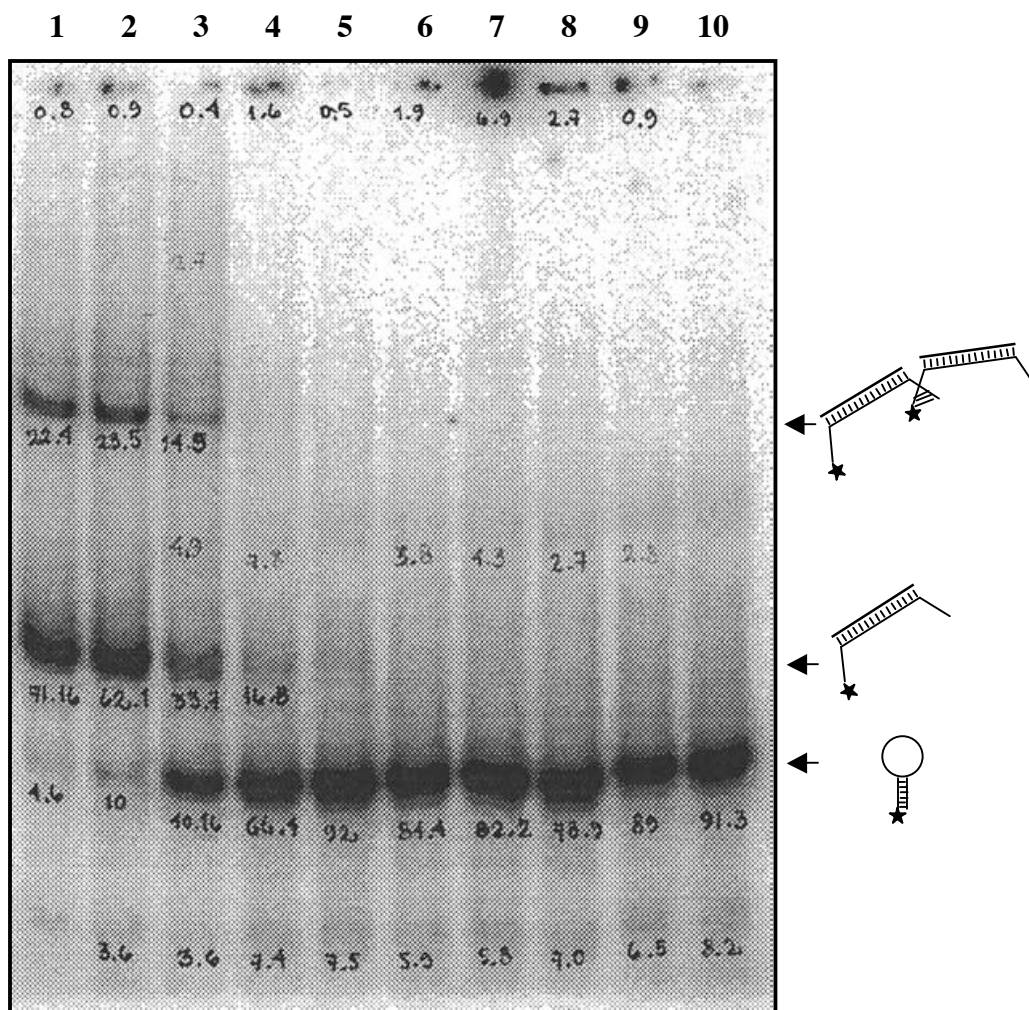
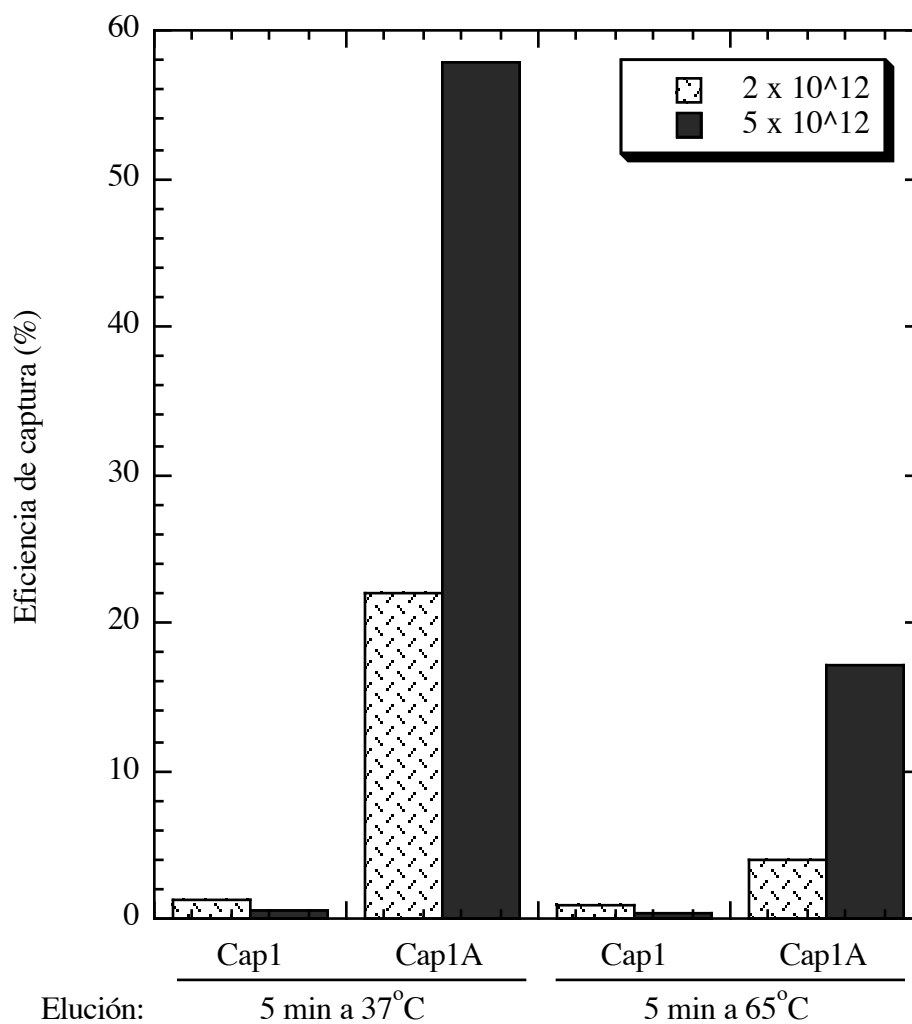


FIGURA 25. Evaluación de la formación de complejos entre el switch para PvA, PvAsw3 y su oligonucleótido blanco, en geles de retardamiento. La hibridación se hizo igual que en las figuras anteriores utilizando 1×10^{10} moléculas del switch y diluciones 1:4 del oligonucleótido blanco empezando con 1×10^{11} moléculas.



Sondas de captura*: 10¹⁰ c/u
 PM GTS dT25: 2x10¹² y 5x10¹²
 Captura: GuSCN 1.46 M, 15 min at RT
 Lavados: 2x en GuSCN 1.5 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 5min a 37oC
 seguido por 5 min a 65oC

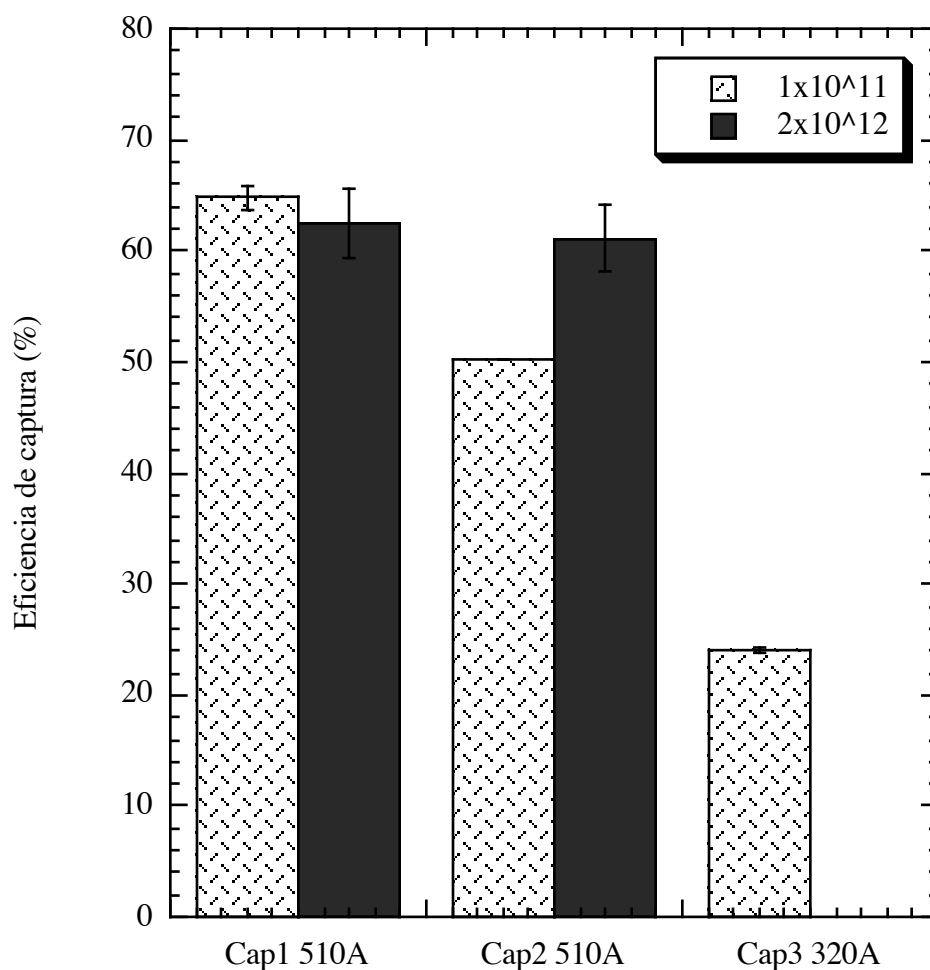
FIGURA 26. Eficiencia de captura y elución del oligo de captura Cap1 solo o derivatizado con cola de poliA en condiciones de hibridación con GuSCN y con dos diferentes cantidades de partículas magnéticas. El ensayo utilizó 10¹⁰ moléculas de la sonda de captura y partículas magnéticas de Genetrak Systems (cantidades con una capacidad de unión de 2 x 10¹² y 5 x 10¹² moléculas de oligo dT). Primera elución: 5 min a 37°C; segunda elución: 5 min a 65°C.

observarse, aproximadamente 60% del oligo poliadenilado (Cap1A) fué eluido durante la primera elución y 17% durante la segunda elución, cuando se utilizó una relación, 1:500 oligo de captura:oligo dT. Mientras que, sólo se pudo eluir 22% del Cap1A durante la primera elución y un 4% durante la segunda elución, cuando se utilizó una relación 1:200, oligo de captura:oligo dT. Esto sugería que era necesario un gran exceso de oligo dT en la superficie de las partículas para la eficiente captura de los oligos poliadenilados en solución. Por otro lado, se observó que el oligo de captura no poliadenilado se pega inespecíficamente a las partículas magnéticas y 1-1.5% de la cantidad de oligo inicial, se eluye bajo estas condiciones (pero esto no es relevante para nuestro esquema diagnóstico).

Ahora, si se utiliza una cantidad de partículas magnéticas con una capacidad de unión de 1×10^{13} y sondas de captura con tamaños equivalentes de cola de poliA (Cap1 510A, Cap2 510A y Cap3 320A) en cantidades de 0.1×10^{12} y 2×10^{12} (1:100 vs 1:5 oligo de captura:oligo dT), se observa que (Fig. 27), se puede eluir 60-62% del oligo Cap1 510A, 50-60% del oligo Cap2 510A y 24% del oligo Cap3 320A, en una incubación de 2 min a 65°C. La eficiencia de captura y elución de los oligos de captura a las partículas magnéticas, parece depender del oligo de captura y quizás del tamaño de cola de poliA, no tanto del exceso de oligo dT en la superficie de las partículas magnéticas.

2) Cinética de captura y eficiencia de captura-elución del RNA blanco a partículas magnéticas por medio de oligos de captura poliadenilados en condiciones de hibridación con GuSCN.

Se hicieron cinéticas de captura de dos fragmentos del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* marcados con P³² (uno de 2.1 Kb, que corresponde a la secuencia completa y otro de 1.4 Kb que incluye toda la región MC), utilizando dos sondas de captura (Cap1 290A y Cap2 410A), partículas magnéticas de Genetrak Systems (GTS) y condiciones de hibridación en GuSCN (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4.5, 6 y 8 hr). El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura (Cap1 290A y Cap2 410A), 1×10^{10} moléculas de cada uno de los blancos y partículas magnéticas de Genetrak Systems con una capacidad de unión de 1×10^{13} moléculas de oligo dT (una relación de 1:20:100,



Sondas de captura*: 10¹¹ and 2x10¹²c/u
 PM: GTS dT25 1x10¹³
 Captura: GuSCN 1.5 M, 10 min a 37oC
 Lavados: 2x en GuSCN 1.5 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 2 min a 65oC

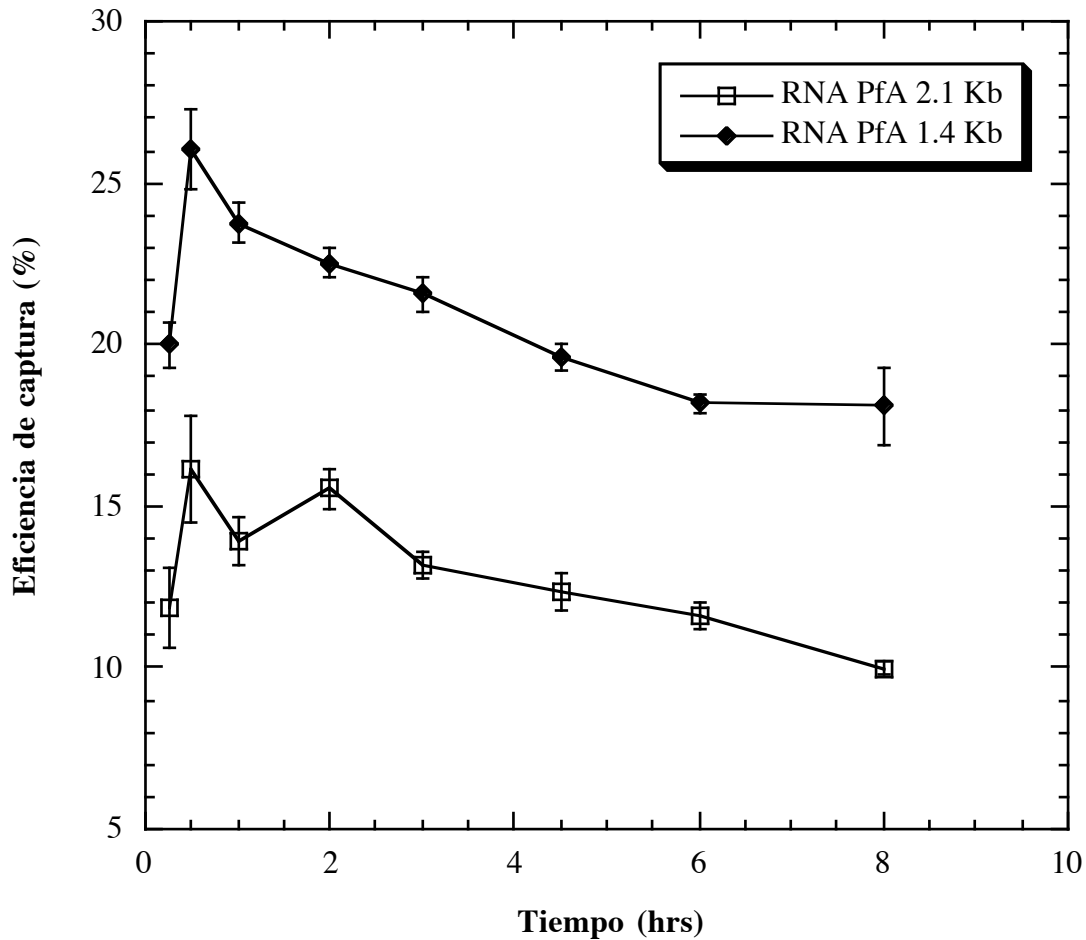
FIGURA 27. Eficiencia de captura de tres sondas de captura con diferentes tamaños de cola de poliA, en diferentes cantidades y en condiciones de hibridación con GuSCN. El ensayo utilizó 1 x 10¹¹ o 2 x 10¹² moléculas de cada una de las sondas de captura y una cantidad de partículas magnéticas de Genetrak Systems con una capacidad de unión de 1 x 10¹³ moléculas de oligo dT.

blanco:oligos de captura:oligo dT en el soporte sólido). Se observó que la máxima eficiencia de captura y elución del blanco ocurre a los 30 min de hibridación en 2.25 M de GuSCN y que es mejor para el RNA de 1.4 Kb (26%) que para el RNA de 2.1 Kb (16%) (Fig. 28).

Un experimento idéntico, de cinética de captura del RNA 18S de PvA marcado con P³² (fragmento de 752 nt) mostró que la máxima eficiencia de captura y elución del blanco ocurre a los 60 min de hibridación en 2.25 M de GuSCN (Fig. 29).

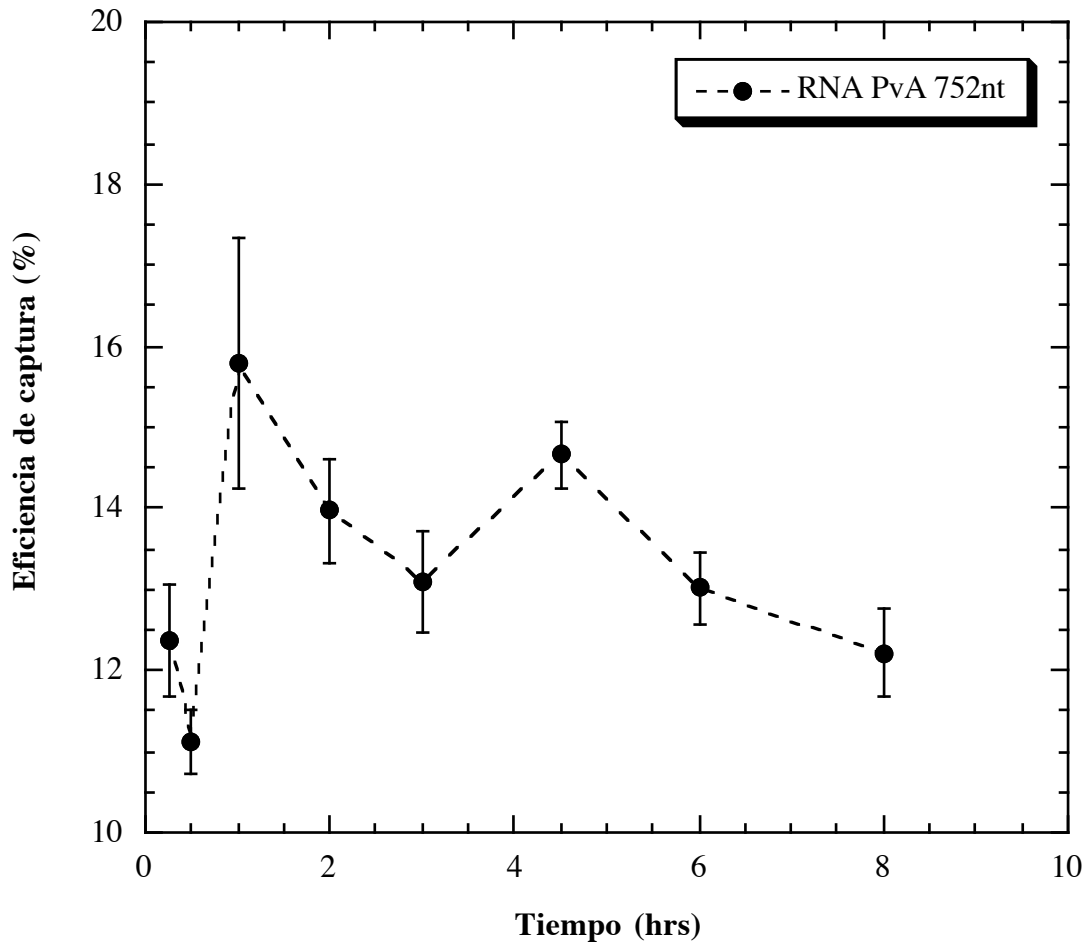
Por otro lado, quisimos comparar la eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium vivax* marcado con P³² (752 nt), utilizando diferentes combinaciones de sondas de captura en partículas magnéticas de dos diferentes compañías (GTS vs Dynal) y en condiciones de hibridación con GuSCN, ya que a esta altura de nuestro trabajo la compañía GTS dejó de vender este producto y había que sustituir éstas por otras partículas magnéticas que se pudieran adquirir comercialmente. Los resultados mostraron similares eficiencias de captura y elución para el RNA de PvA con Cap1A o Cap2A sólo en cualquiera de las partículas magnéticas utilizadas (Fig 30), pero cuando se utilizaron ambos oligos, Cap1A y Cap2A simultáneamente, la eficiencia de captura y elución del RNA fué mejor cuando se usaron las partículas de GTS dT25 en comparación a las de Dynal dT25. El pegado inespecífico del RNA a las partículas magnéticas de Dynal, es aproximadamente 10x más alto, lo cual podría disminuir la eficiencia de captura de los híbridos específicos en muestras biológicas y así, afectar el límite de sensibilidad del ensayo. Este ensayo utilizó 10¹¹ moléculas de cada una de las sondas de captura, 2 x 10⁸ moléculas de blanco y partículas magnéticas cubiertas con oligo dT25 con una capacidad de unión de 1 x 10¹³ moléculas de oligo dT (GenetrakSystems, GTS) o con una capacidad de unión de entre 6 x 10¹¹ y 1.5 x 10¹³ (Dynal).

Luego, decidimos probar la eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* marcado con P³² (2.1 Kb), utilizando una sonda de captura (Cap1 350A o Cap2 220A) y condiciones de hibridación en diferentes concentraciones de GuSCN. El ensayo utilizó 10¹¹ moléculas de cada una de las sondas de captura, 3 x 10¹⁰ moléculas de blanco y las partículas magnéticas de Dynal con una capacidad de unión de entre 1.2 x 10¹¹ y 2.8 x 10¹³. Los resultados muestran que la máxima eficiencia de captura del RNA blanco ocurre en soluciones de hibridación que contienen 1.75M de



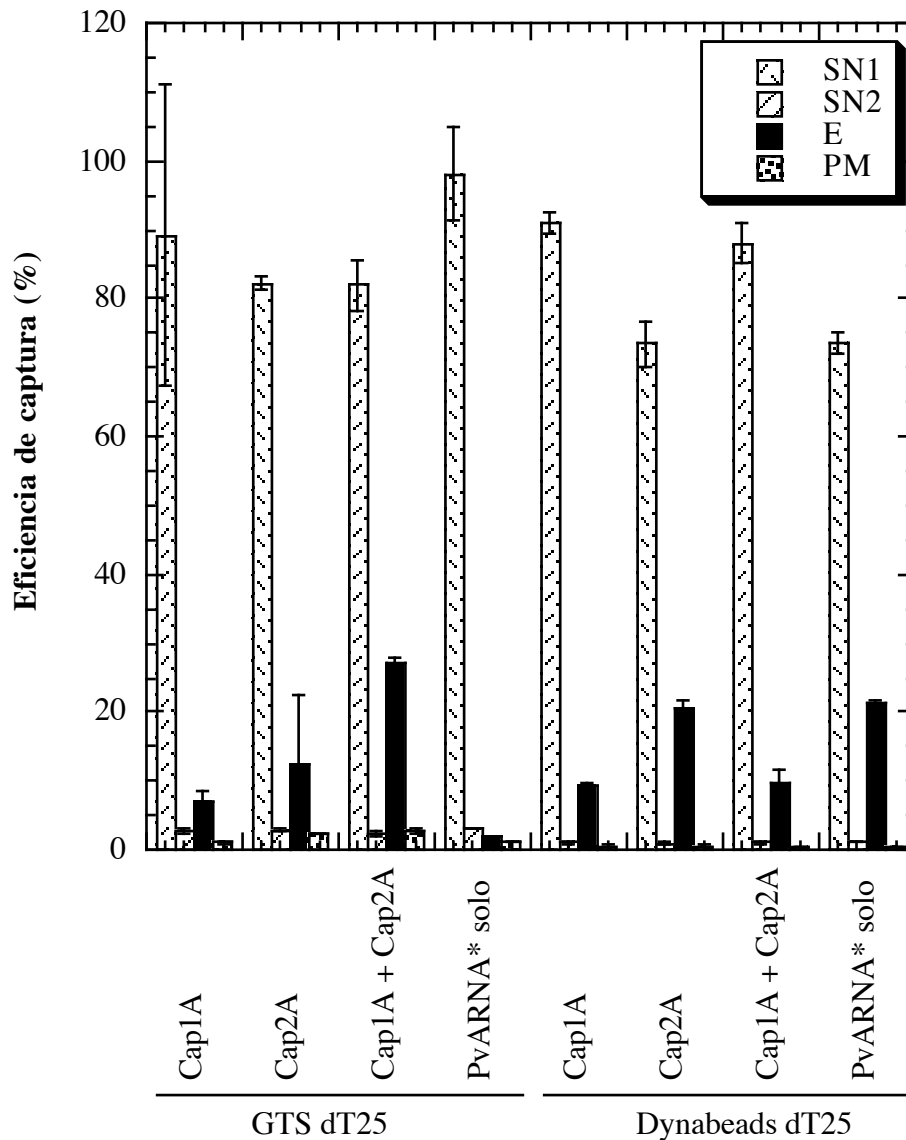
PfARNA*'s: 10^{10} c/u
 Cap1 290A y Cap2 410A: 10^{11} c/u
 PM GTS dT25: 10^{13}
 Hibridación: GuSCN 2.25 M, difs. tiempos a 37oC
 Captura: GuSCN 1.25 M, 15 min a 37oC
 Lavados: 1x en GuSCN 1.25 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 2 min a 65oC

FIGURA 28. Cinética de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* (2.1 Kb vs 1.4 Kb) utilizando dos sondas de captura, partículas magnéticas de Genetrak Systems (GTS) y condiciones de hibridación en GuSCN. El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura (Cap1 290A y Cap2 410A), 1×10^{10} moléculas de cada uno de los blancos y partículas magnéticas de Genetrak Systems con una capacidad de unión de 1×10^{13} moléculas de oligo dT.



PvARNA*: 10^{10}
 Cap1 290A y Cap2 410A: 10^{11} c/u
 PM GTS dT25: 10^{13}
 Hibridación: GuSCN 2.25 M, difs. tiempos a 37oC
 Captura: GuSCN 1.25 M, 15 min a 37oC
 Lavados: 1x en GuSCN 1.25 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 2 min a 65oC

FIGURA 29. Cinética de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium vivax* (752 nt) utilizando dos sondas de captura, partículas magnéticas de Genetrak Systems (GTS) y condiciones de hibridación en GuSCN. El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura (Cap1 290A y Cap2 410A), 1×10^{10} moléculas de blanco y partículas magnéticas de Genetrak Systems con una capacidad de unión de 1×10^{13} moléculas de oligo dT.



PvARNA* 752nt: 2×10^8
 Sondas de captura: 10^{11} c/u
 PM dT25: GTS 1×10^{13} or Dynabeads 6×10^{11} a 1.5×10^{13}
 Hibridación: GuSCN 2.5 M, 4:30 hr a 37oC
 Captura: GuSCN 1.5 M, 15 min a 37oC
 Lavados: 1x en GuSCN 1.5 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 2 min a 65oC

FIGURA 30. Comparación de la eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium vivax* (752 nt), utilizando diferentes combinaciones de sondas de captura y partículas magnéticas de dos diferentes compañías, en condiciones de hibridación con GuSCN. El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura, 2×10^8 moléculas de blanco y partículas magnéticas cubiertas con oligo dT25 con una capacidad de unión de 1×10^{13} moléculas de oligo dT (GenetrakSystems, GTS) o con una capacidad de unión de entre 6×10^{11} y 1.5×10^{13} (Dynabeads).

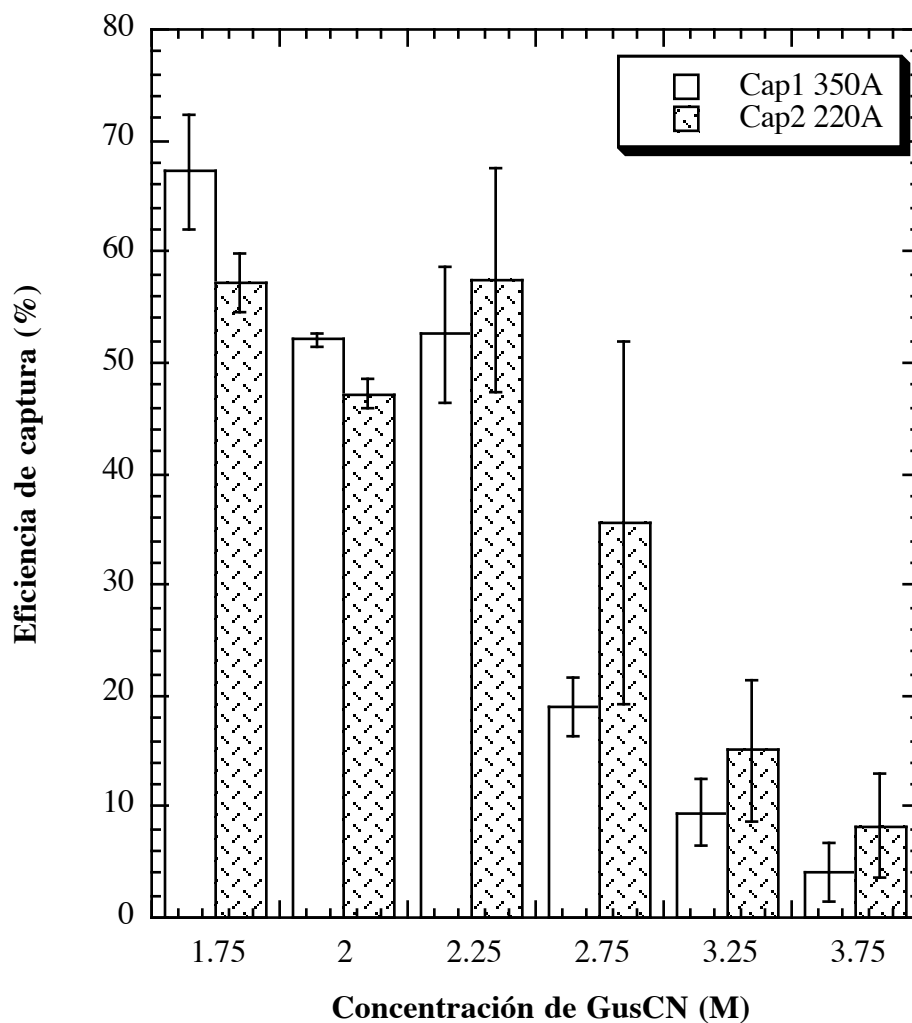
GuSCN (67% cuando se usa Cap1 350A y 57% cuando se usa Cap2 220A) seguida de 2.25M de GuSCN (53% cuando se usa Cap1 350A y 58% cuando se usa Cap2 220A) for 1hr at 37°C (Fig. 31). Esto confirmó que el uso de 2.25 M de GuSCN para la hibridación de las sondas era una buena opción.

También quisimos averiguar si el tamaño de la cola de poliA en los oligos de captura tenía algún efecto en la eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de PfA (2.1 Kb). Así, utilizamos de forma independiente, tres diferentes sondas de captura con diferentes tamaños de cola de poliA en condiciones de hibridación con GuSCN. El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de las sondas de captura, 3×10^{10} moléculas de blanco y partículas magnéticas de Dynal con una capacidad de unión de entre 1.2×10^{11} y 2.8×10^{13} . Confirmamos que el tamaño de cola de poliA no afecta la eficiencia de captura del RNA blanco y que definitivamente, Cap2 y Cap4 son buenos oligos de captura para el RNA de PfA mientras que, Cap3 no lo es (Fig 32). Quizas, la secuencia a la que hibrida el oligo Cap3 no sea una secuencia accesible en la estructura del RNA de PfA, aún en concentraciones de 2.25 M del agente caotrópico (GuSCN).

En experimentos que medían la eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* marcado con P^{32} (2.1 Kb) utilizando diferentes combinaciones de sondas de captura en condiciones de hibridación con GuSCN (el ensayo utilizó 10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura y 3×10^{10} moléculas de blanco), se mostró que a mayor número de oligos de captura utilizados en secuencia aledañas a la sonda, mayor es la eficiencia de captura del RNA blanco (85% para el RNA PfA, utilizando una combinación de Cap1A, Cap2A, Cap3A y Cap4A) (Fig. 33).

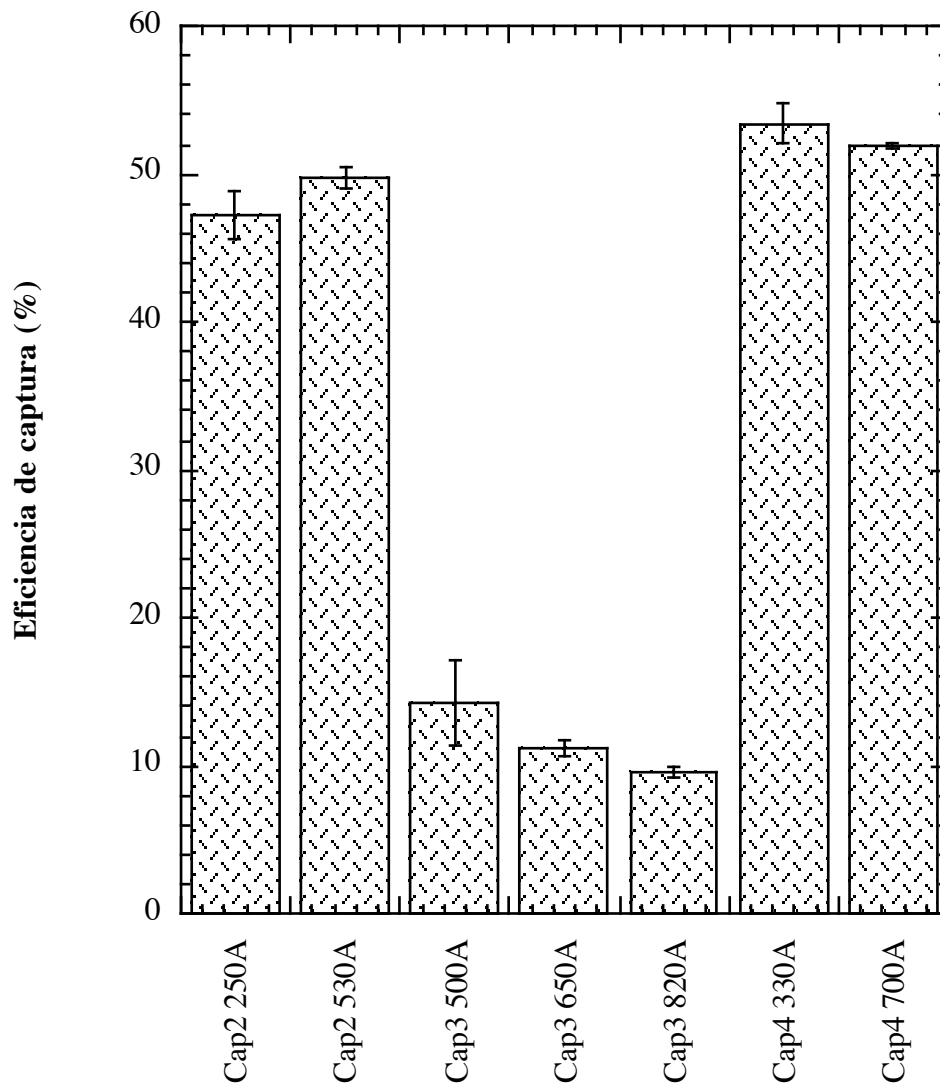
3) Cinética de captura y eficiencia de captura-elución de los switches a partículas magnéticas por medio de su hibridación al RNA blanco y éste a su vez, a los oligos de captura poliadenilados en condiciones de hibridación con GuSCN.

En experimentos de cinética de captura del switch molecular PfAsw4 marcado con P^{32} (por kinación con la T4 polinucleótido cinasa), utilizando el RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* (2.1 Kb), tres diferentes sondas de captura, partículas magnéticas de Dynal (dT25) y condiciones de hibridación en GuSCN, demostramos que



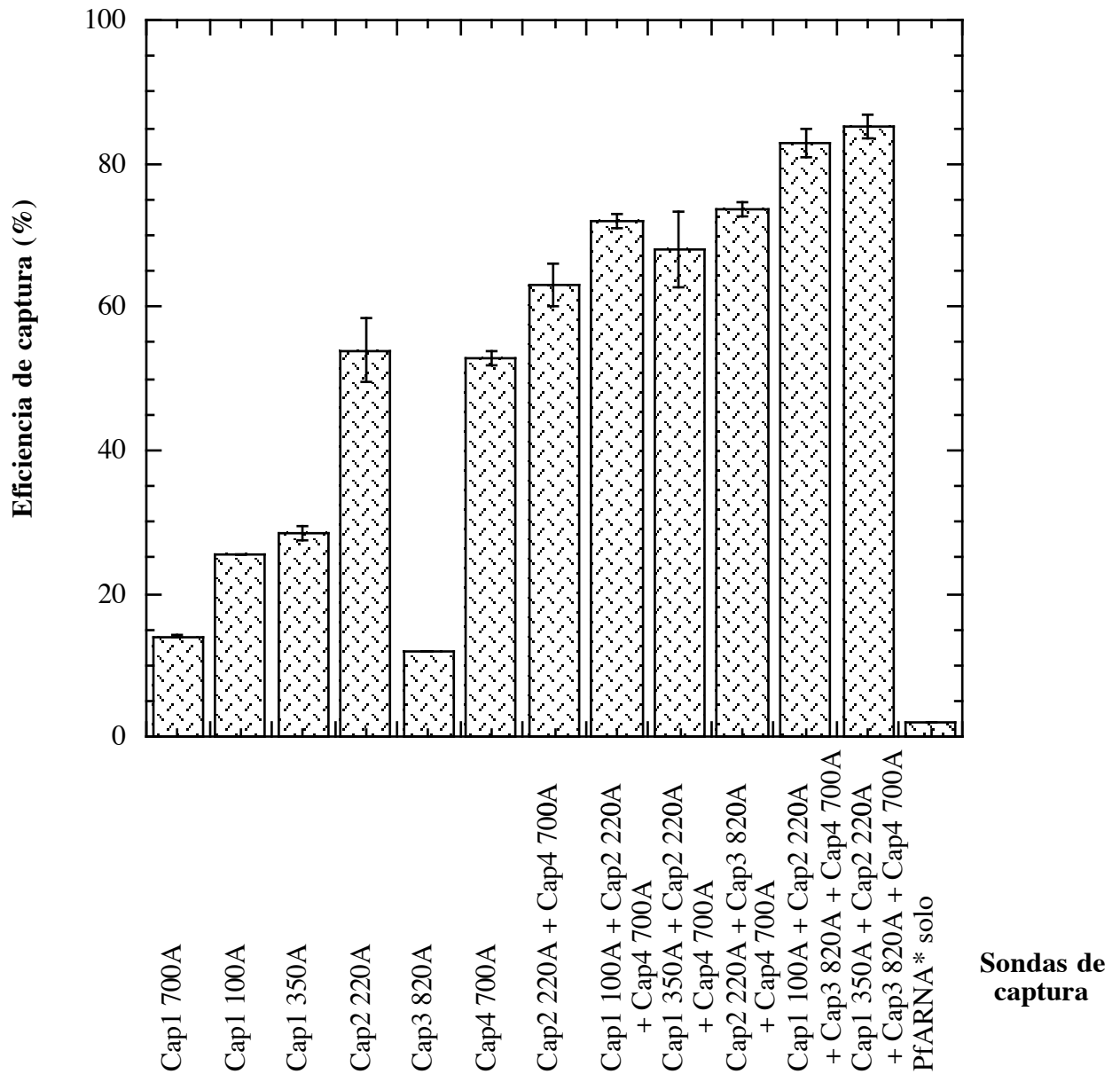
PfARNA 2.1Kb*: 3×10^{10}
 Sondas de captura: 10^{11}
 PM: Dynabeads dT25 1.2×10^{11} a 2.8×10^{13}
 Hibridación: GuSCN dif. conc., 1hr a 37oC
 Captura: GuSCN 1.25M, 15 min a 37oC
 Lavados: 1x en GuSCN 1.25M
 Elución: GusCN 3.25M, 2min a 65oC

FIGURA 31. Eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* (2.1 Kb) utilizando dos sondas de captura y condiciones de hibridación en diferentes concentraciones de GuSCN. El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura (Cap1 350A y Cap2 220A), 3×10^{10} moléculas de blanco y partículas magnéticas de Dynal con una capacidad de unión de entre 1.2×10^{11} y 2.8×10^{13} .



PfARNA 2.1Kb*: 3×10^{10}
 Sondas de captura: 10^{11} c/u
 PM: Dynabeads dT25 1.2×10^{11} a 2.8×10^{13}
 Hibridación: GuSCN 2.25 M, 1 hr a 37oC
 Captura: GuSCN 1.25 M, 15 min a 37oC
 Lavados: 1x en GuSCN 1.25 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 2 min a 65oC

FIGURA 32. Eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* (2.1 Kb) utilizando tres diferentes sondas de captura con diferentes tamaños de cola de poliA en condiciones de hibridación con GuSCN. El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de las sondas de captura, 3×10^{10} moléculas de blanco y partículas magnéticas de Dynal con una capacidad de unión de entre 1.2×10^{11} y 2.8×10^{13} .



PfARNA 2.1Kb*: 3×10^{10}
 Sondas de captura: 10^{11} c/u
 PM: Dynabeads dT25 1.2×10^{11} a 2.8×10^{13}
 Hibridación: GuSCN 2.25 M, 1 hr a 37°C
 Captura: GuSCN 1.25 M, 15 min a 37°C
 Lavados: 1x en GuSCN 1.25 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 2 min a 65°C

FIGURA 33. Eficiencia de captura del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* (2.1 Kb) utilizando diferentes combinaciones de sondas de captura en condiciones de hibridación con GuSCN. El ensayo utilizó 10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura y 3×10^{10} moléculas de blanco.

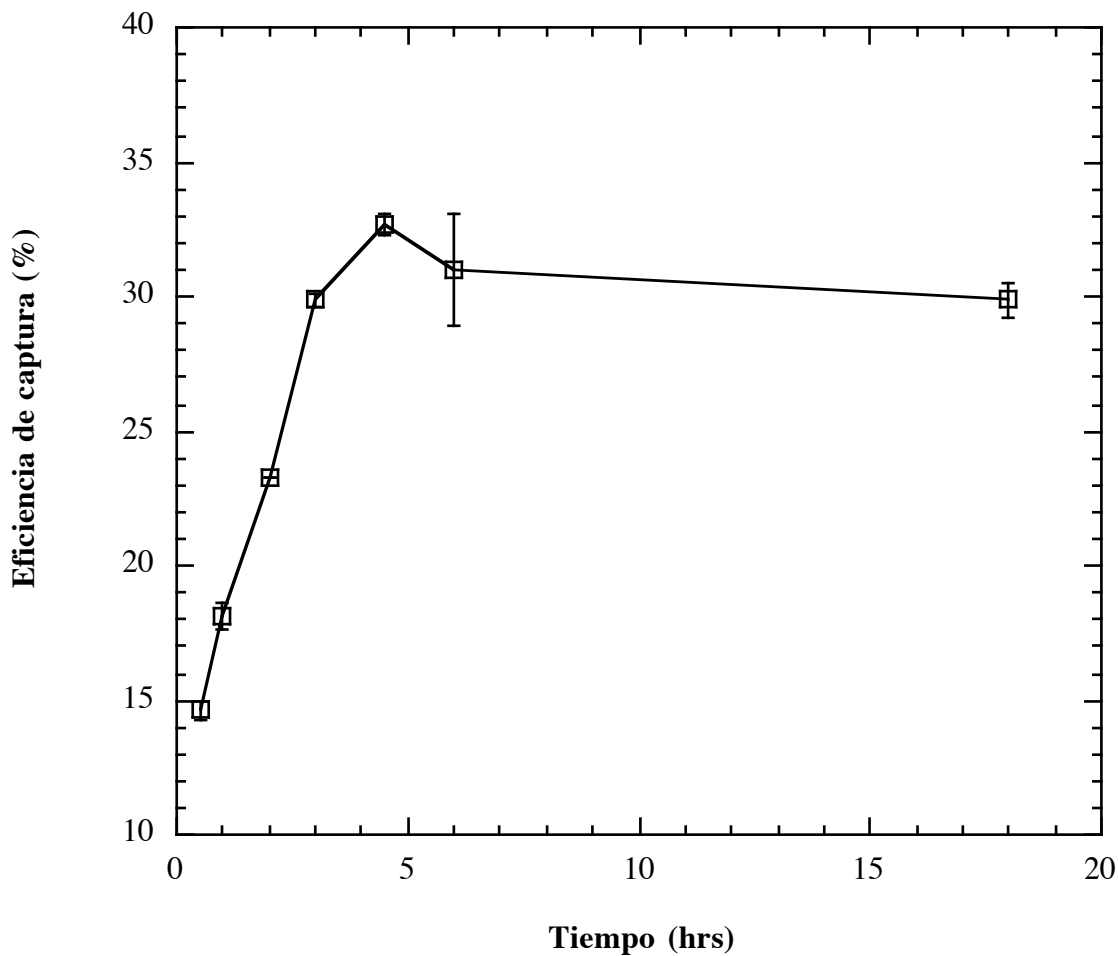
la máxima eficiencia de captura ocurre a las 4.5 hr de hibridación en 2.25 M de GuSCN (Fig. 34). El ensayo utilizó 5×10^{10} moléculas de switch, 1×10^{10} moléculas de blanco, 1×10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura y partículas magnéticas de Dynal con una capacidad de unión de entre 1.2×10^{11} y 2.8×10^{13} moléculas de oligo dT.

Decidimos utilizar el PfAsw4 para este experimento, ya que éste se abría específicamente por hibridación al RNA blanco e hibridaba con el templado de cadena sencilla (ver Fig. 22). En ensayos subsecuentes, utilizamos 4.5 hrs de hibridación entre las sondas, RNA blanco, oligos de captura y switch, en 2.25 M de GuSCN.

- 4) Ensayo de hibridación en soluciones de isotiocianato de guanidinio del switch molecular en presencia o ausencia del RNA blanco artificial, captura a partículas magnéticas, lavados y elución específica del templado de cadena sencilla, así como su transcripción y replicación.

Primero, quisimos averiguar la eficiencia de transcripción del templado de cadena sencilla proveniente de un ensayo en presencia o ausencia del RNA blanco. De esta forma, se realizó un ensayo de hibridación en GuSCN en presencia o ausencia del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum*, utilizando dos sondas de captura (Cap1A y Cap2A), el switch PfAsw4, el DNA de cadena sencilla que codifica para el RNA MNV-11 que contiene un grupo amino en el extremo 3' y las partículas magnéticas de GTS. Una alícuota del eluido (en $50 \mu\text{l}$ de buffer $\text{TE}_{0.1\text{mM}}$ for 10 min a 37°C), se utilizó en una reacción de transcripción en presencia de nucleótidos marcados con P^{32} y parte de la muestra se corrió en un gel desnaturizante de urea al 8%. La Fig. 35 muestra una buena señal en presencia del RNA blanco y nada en ausencia del RNA blanco. El marcador de peso molecular es el mismo DNA de cadena sencilla marcado radioactivamente en el extremo 5'.

Después, quisimos ver cuál sería la señal: ruido que obtendríamos si incubáramos una alícuota de la reacción de transcripción de un ensayo similar al anterior, que utiliza un templado de cadena sencilla no marcado y nucleótidos fríos y donde una alícuota, es incubada con la replicasa de Q β en presencia de ribonucleótidos marcados con P^{32} . En la Fig. 36, se puede apreciar que se obtuvo una señal:ruido de aproximadamente 10:1.



PfAsw4*: 5×10^{10}
 PfARNA 2.1Kb: 10^{10}
 Cap1 100A, Cap2 250A, Cap4 330A: 10^{11} c/u
 PM Dynabeads dT25: 1.2×10^{11} a 2.8×10^{13}
 Hibridación: GuSCN 2.25 M, difs. tiempos a 37oC
 Captura: GuSCN 1.25 M, 15 min a 37oC
 Lavados: 1x en GuSCN 1.25 M
 Elución: GusCN 3.25 M, 2 min a 65oC

FIGURA 34. Cinética de captura del switch molecular PfAsw4 utilizando el RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum* (2.1 Kb), tres diferentes sondas de captura, partículas magnéticas de Dynal (dT25) y condiciones de hibridación en GuSCN. El ensayo utilizó 5×10^{10} moléculas de switch, 1×10^{10} moléculas de blanco, 1×10^{11} moléculas de cada una de las sondas de captura y partículas magnéticas de Dynal con una capacidad de unión de entre 1.2×10^{11} y 2.8×10^{13} moléculas de oligo dT.

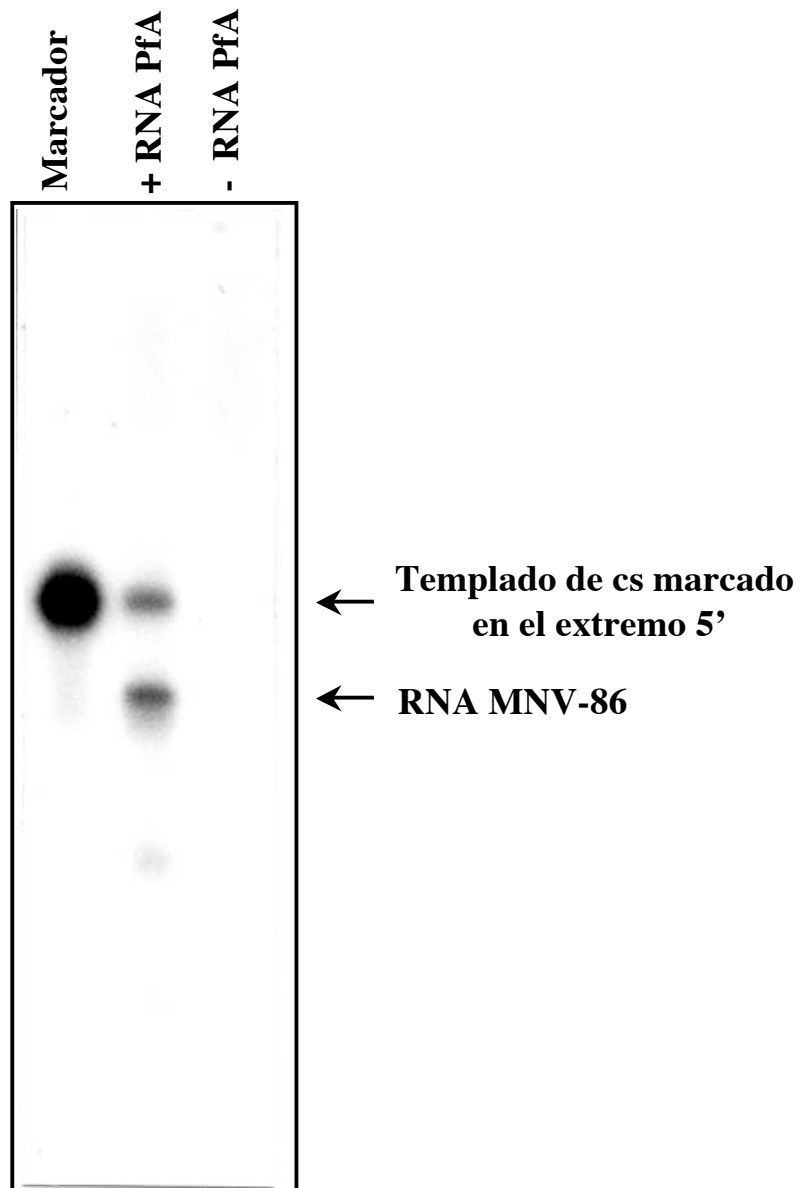


FIGURA 35. Transcripción del cDNA de MNV-86 en respuesta a la incubación con el blanco, el RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum*. Se realizó un ensayo de hibridación en GuSCN que utilizó dos sondas de captura, partículas magnéticas de GTS, el switch PfAsw4 y el DNA de cadena sencilla que codifica para el RNA MNV-86 y que contiene un grupo amino en el extremo 3'. El marcador de peso molecular es el mismo DNA de cadena sencilla marcado radioactivamente en el extremo 5'.

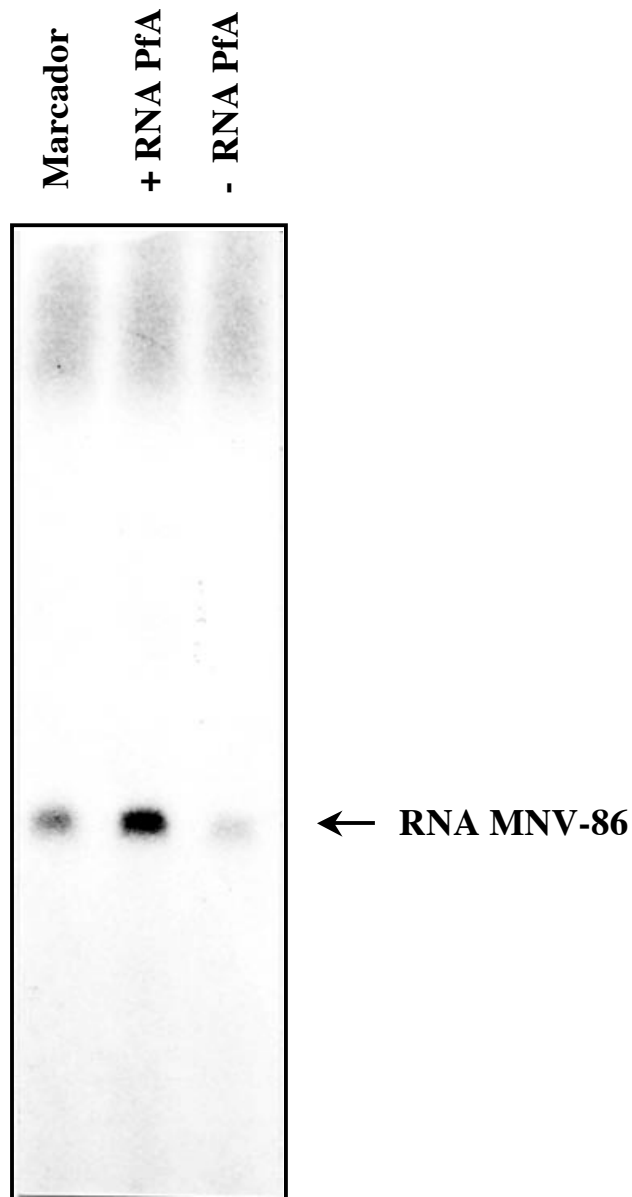


FIGURA 36. Replicación del RNA MNV-86 en respuesta a la presencia del RNA ribosomal 18S de *Plasmodium falciparum*. Se realizó un ensayo de hibridación en GuSCN utilizando dos sondas de captura, partículas magnéticas de GTS, el switch PfAsw4 y el templado de cadena sencilla que codifica para el RNA MDV-86 y que contiene un grupo amino en el extremo 3'. La figura muestra el RNA MNV-86 sintetizado como la señal a detectar en este ensayo. El marcador de peso molecular es el RNA MNV-86 marcado radioactivamente; + RNA PfA, ensayo conteniendo todos los componentes, incluyendo el RNA blanco; - RNA PfA, ensayo conteniendo todos los componentes, excepto el RNA blanco.

5) Implementaciones al mismo formato y límite de sensibilidad del ensayo.

Hibridación en soluciones de isotiocianato de guanidinio y captura a partículas electromagnéticas (se probaron las partículas magnéticas con oligo dT25 de Dynal y las partículas magnéticas con oligo dT20 de Advanced Magnetics). (También se probaron las partículas magnéticas con estreptavidina de Promega y Dynal, usando oligos de captura biotinilados).

Lavados.

Extensión del tallo del switch sobre el templado de cadena sencilla por incubación con el fragmento Klenow, en presencia de dATP, dTTP y dCTP, únicamente (para completar la secuencia del promotor de cadena doble para la T7 RNA polimerasa en los switches PfAsw3, PfAsw4, PvAsw1, PvAsw2 y PvAsw3). Este paso de extensión con Klenow, también extiende la cola de oligodT sobre la cola de poliA de los oligos de captura y hace que el paso de elución en buffer $TE_{0.1mM}$ por 10 min a 37°C, ya no funcione. Entonces, se implementó para el paso de elución, la incubación con la RNAsa H.

Elución con RNAsa H. Ésta es una endoribonucleasa que rompe los enlaces fosfodiéster del RNA en los híbridos de DNA:RNA formados entre las sondas de captura y el RNA blanco así como, entre la sonda detectora en el switch molecular y el RNA blanco.

Transcripción *in vitro*.

Replicación.

Stop buffer Q β :

120 mM NaCl

20 mM EDTA

DISCUSION

Cabe señalar que, un ensayo diagnóstico que utiliza señales de RNA replicables del tipo desarrollado para HIV-1, requiere de la síntesis de varios oligonucleótidos (para las sondas de captura y para la sonda detectora) y la construcción de varias sondas recombinantes así como, su caracterización para la selección de una sonda competente para replicación exponencial. En cambio, un modelo como el del “switch molecular”, donde la sonda detectora y la que sirve como templado de la molécula replicable, están localizadas en moléculas separadas, resulta más genérico en el sentido que, involucra únicamente la síntesis de algunos oligonucleótidos (las sondas de captura y la sonda detectora) para cada nuevo ensayo que se quiera implementar.

Aunque se han iniciado reacciones con la replicasa de Q β con tan poco como una molécula de RNA templado (Levinsohn y Spiegelman, 1968), hay tres fuentes de “background” que determinan el límite de sensibilidad a alcanzar en un ensayo que utiliza este sistema de amplificación exponencial: 1) el número de moléculas de cadena sencilla que se quedan pegadas inespecíficamente a la muestra, 2) la presencia de un número pequeño de moléculas de RNA MDV-1 en las preparaciones de replicasa (purificada de bacterias infectadas con el fago Q β) y, 3) la contaminación cruzada con productos replicables de reacciones anteriores.

En teoría, los templados de cadena sencilla, aún cuando se quedasen pegados de manera inespecífica a las partículas magnéticas y se eluyeran durante el paso de elución, no deberían de funcionar como sustratos para la T7 RNA polimerasa y mucho menos para la replicasa de Q β . Sin embargo, encontramos que los templados de DNA de cadena sencilla que contienen la secuencia inferior del promotor para la T7 RNA polimerasa en su extremo 5' o cerca del extremo 5', y sin necesidad de la cadena superior del promotor, son buenos sustratos para la T7 RNA polimerasa (datos no mostrados) y por otro lado que la replicasa de Q β , también puede utilizar DNAs (de cadena doble o de cadena sencilla) que codifican para RNAs replicables, como templado para producir RNA bajo condiciones estándar de replicación. Esto nos dejó doblemente sorprendidos, ya que la RNA polimerasa del bacteriofago T7, había sido descrita como una RNA polimerasa DNA-dependiente altamente específica para su secuencia promotora de DNA de cadena

doble (Milligan, 1987) y la replicasa de Q β , había sido descrita como una RNA polimerasa RNA-dependiente altamente específica para sus propios templados de RNA (Haruna, 1965a). El templado de cadena sencilla que se quedaba pegado de manera inespecífica y luego, se eluía, generaba una fuente importantísima de “background”, lo cual disminuyó considerablemente la sensibilidad de nuestro ensayo e hizo imposible el funcionamiento de este ensayo diagnóstico en particular.

Bajo ciertas condiciones, las RNA polimerasas DNA-dependientes también pueden usar RNA como templado para la polimerización de nucleótidos, aunque con muy baja eficiencia (Biebricher, 1973; Chamberlin, 1974). Sin embargo, Konarska y Sharp (1989, 1990) demostraron que la RNA polimerasa DNA-dependiente del bacteriofago de T7, podía utilizar un RNA específico de 64 nt como templado y replicarlo eficientemente y con precisión. Pero, no había evidencia de que las RNA polimerasas RNA-dependientes pudieran utilizar DNAs naturales como templados para la síntesis de RNA, aún cuando es cierto que existe un cierto grado de homología entre las secuencias de aminoácidos de las RNA polimerasas DNA-dependientes y las RNA polimerasas RNA-dependientes (Hartmann, 1988). Durante el transcurso de estudiar la replicación de algunos RNA recombinantes, nosotros y David Zhang, del grupo del Dr. Fred R. Kramer, encontramos que la replicasa de Q β también podía utilizar DNAs (de cadena doble o de cadena sencilla) que codifican para RNAs replicables, como templados para producir RNA bajo condiciones estándar de replicación y que el RNA producto de esa reacción puede ser amplificado exponencialmente por la replicasa de Q β de forma usual. Esta observación, contradecía lo que sabíamos de la Q β replicasa, que era una RNA polimerasa RNA-dependiente altamente específica para sus propios templados de RNA (Haruna, 1965a). Pero después de estudios extensivos, concluimos que la Q β replicasa posee ambas actividades, la de RNA polimerasa RNA-dependiente y la de RNA polimerasa DNA-dependiente (David Zhang, Tesis de Doctorado, 1992). Comparando las cinéticas de replicación obtenidas de templados de DNA con las obtenidas de templados de RNA, se observó que los templados de DNA son aproximadamente, 25,000 veces menos eficientes que los templados de RNA. La baja eficiencia del templado de DNA puede deberse a la pobre unión de la Q β replicasa, localización ineficiente del sitio de iniciación o menor velocidad de elongación. Sin embargo, cuando se comparó el

menor número de moléculas que pudo ser detectado, se observó una diferencia de sólo 250 veces. Esta observación implica que múltiples copias de RNA deben de producirse de un sólo templado de DNA (David Zhang, Tesis de Doctorado, 1992). Las observaciones hechas por nosotros, Zhang (1992), Konarska y Sharp (1989, 1990) sugieren que las RNA polimerasas, sean celulares o virales, y sean DNA-dependientes o RNA-dependientes, pueden poseer una habilidad intrínseca para utilizar ambos, RNA y DNA como templados. Esto puede reflejar un origen evolutivo común para estas polimerasas (Cavalier-Smith, 1987; Lazcano, 1988; Inokuchi, 1990), sumado a la conservación a nivel de secuencia de aminoácidos, entre estas polimerasas (Kamer, 1984; Hartmann, 1988).

El número de templados contaminando la replicasa de Q β , que proviene de bacterias infectadas con el fago, en una reacción típica es del orden de 40-100 moléculas (Kramer y col., 1974) aún cuando, existen métodos para remover los RNAs templados contaminantes (Eoyang y col., 1971; Hill y Blumenthal, 1983). Sin embargo ahora que, se ha clonado la subunidad viral de la Q β replicasa es posible, en teoría, obtener una replicasa libre de “background”. Aunque las moléculas replicables que flotan en el aire también pueden contaminar la preparación de la enzima o la reacción y dar lugar a una fuente de “background” por contaminación cruzada. Así, estos ensayos también requieren la implementación de medidas de aislamiento y de anti-contaminación para prevenir la dispersión y/o acumulación de los productos de replicación en el laboratorio, que si no se monitorean constantemente, pueden dar lugar a resultados falsos-positivos.

Por otro lado, en eucariotes, los transcritos de RNA ribosomal son bastante homogéneos dentro de un mismo organismo y cuando se comparan transcritos entre diferentes miembros de una especie, se observa poca diferencia de secuencia. En contraste, dentro de un sólo genotipo de *Plasmodium falciparum*, y comparando la secuencia del primer espaciador transcrito interno (ITS1), se observaron diferencias de entre el 9 y 20% entre las unidades ribosomales tipo A y 25% entre las unidades ribosomales tipo S con sólo 42 a 57% de identidad entre los tipos A y S. Así, las diferencias observadas dentro un sólo genoma son más grandes que las observadas normalmente cuando se comparan las unidades de DNA ribosomal de organismos distantemente relacionados. Ahora, cuando se comparó la región codificadora madura

para el RNA ribosomal 18S, no se observó variación de secuencia dentro de los genes tipos A y S de un solo genotipo. Sin embargo, comparación de la región codificadora para el RNA ribosomal 18S de 17 cepas-aislados geográficamente distintos, reveló hasta un 10% de variación de secuencia dentro de una región de 400 nt (Rogers y col., 1995). Estas variaciones de secuencia, fué exactamente lo que nosotros observamos para aislados de *P. vivax* de la región de Tapachula, Chiapas, cuya secuencia para el RNA ribosomal 18S del gene A no era exactamente la misma que la publicada anteriormente para un aislado Sal1 (Qari y col., 1994) (datos no mostrados). En este sentido, tendríamos que validar la utilidad de cada una de nuestras sondas detectoras y sondas de captura entre aislados de diferentes regiones geográficas.

Una explicación de porqué las miles de copias de los genes para el DNA ribosomal en eucariotes son tan homogéneas pudiera estar relacionada con su distribución a lo largo de una o muy pocas regiones del genoma. Se cree que los arreglos en tandem promueven homogeneidad entre las copias génicas individuales a través de mecanismos que involucran, conversión génica. En cambio, las diferentes especies de *Plasmodium*, que cuentan con únicamente de 4 a 8 copias de la unidad de DNA ribosomal distribuidas por todos los cromosomas y solamente, una o dos se transcriben a la vez, sea resultado de esta dispersión, que la homogeneidad de secuencia no ha sido mantenida y cada gene de RNA ribosomal dentro del parásito pareciera acumular variación de secuencia independientemente y retener una estructura única. En *Plasmodium*, ciertas poblaciones de RNA mensajero pudieran ser traducidas preferencialmente por los ribosomas A, O, S o por los ribosomas híbridos A-O, O-S o S-A. O alternativamente, el cambio de transcripción de una unidad ribosomal a otra, pudiera ser parte de una respuesta al ciclo de vida parasitario, dónde se activa sólo un área del genoma en cada fase del desarrollo.

El sistema actual de diagnóstico de la malaria, basado en el examen microscópico de sangre teñido con Giemsa (gota gruesa), es un método barato, rápido y relativamente sensible, pero que requiere de técnicos altamente entrenados. La sensibilidad de este método es de 10 a 20 parásitos/ μ l y el rendimiento óptimo por microscopista es 20 a 40 exámenes por día. Otros métodos alternativos o complementarios de diagnóstico tales como, el sistema cuantitativo de centrifugación de sangre (“quantitative buffy coat”, QBC, Becton Dickinson), métodos fluorescentes basados en tinciones con naranja de

acridina o benzotiocarboxipurinas, ELISAs para la detección de antígeno de *P. falciparum* o la técnica de PCR, han dado más o menos buenos resultados (límites de sensibilidad de entre 10^8 y 10^2 moléculas de blanco), pero todos requieren de un laboratorio y de considerable experiencia técnica.

Existen otros métodos disponibles comercialmente, que no utilizan microscopía. Las pruebas Parasight F (Becton Dickinson) e ICT Malaria Pf (ICT Diagnostics), utilizan un ensayo de captura de antígeno en tiras inmunocromatográficas para la detección de la proteína rica en histidinas 2 (HRP2), un antígeno soluble en agua específico de *P. falciparum*. La base de otra prueba para *P. falciparum* es la detección de la lactato deshidrogenada (LDH) del parásito. También se ha utilizado esta enzima en un ensayo de captura de antígeno (OptiMAL, Flor Inc) para *P. falciparum* y *P. vivax*. Se encontró que Parasight F tiene una sensibilidad del 92% y una especificidad del 98% en la detección inicial de *P. falciparum* cuando se compara con microscopía. ICT Malaria Pf tiene una sensibilidad reportada del 100% y una especificidad del 84.5% comparada con microscopía en un estudio en la India. Sin embargo, cuando se compararon las pruebas de Parasight F, gota gruesa y frotis teñidos con Giemsa y QBC en un estudio de campo en Sudáfrica contra el estándar de oro, que es la observación al microscopio de 800 campos de un frotis teñido con Giemsa, las sensibilidades para la detección de *P. falciparum* fueron; 96.6% para Parasight F, 93.1% y 82.8% para gota gruesa y frotis teñido con naranja de acridina, 91.4% para gota gruesa teñida con giemsa y 89.7% para QBC (Chiodini, P., 1998). Otros factores que determinan el uso de estas pruebas en el campo, en caso de epidemia y/o emergencia, son:

- 1) El costo de la prueba y los materiales
- 2) El requerimiento o no de un laboratorio y,
- 3) La experiencia técnica requerida

Y ya que estos métodos no establecen el grado de parasitemia, complementan, más que reemplazan, al frotis de sangre.

En este contexto, el esquema diagnóstico que tratábamos de implementar, aún cuando hubiera cubierto los requisitos de especificidad y sensibilidad, y fuera un esquema genérico sencillo, que requeriría la síntesis de sólo unos cuantos oligos para cada nuevo agente a detectar, isotérmico y más o menos rápido, tenía sus mayores

desventajas, en el requerimiento absoluto de medidas de aislamiento y técnicas de anti-contaminación, el alto costo de los materiales, el requerimiento de un laboratorio y por supuesto, el requerimiento de un técnico altamente experimentado.

REFERENCIAS

- Barker, R.H., Suebsaeng, L., Rooney, W., Alecrim, G.C., Dourado, H., Wirth, D.F. (1986) Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* **231**: 1434-1436.
- Beltz, G. A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H. Cherbas, P. T. and Kafatos F. C. (1983). R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds]. Academic Press, New Cork. *Methods of Enzymology* **100**:266-285.
- Bhattacharyya, A. and Lilley, DMJ. (1989). The contrasting structures of mismatched DNA sequence containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucleic Acids Res.* **17**, 6821.
- Bhattacharyya, A., Murchie, A.I.H. and Lilley, D.M.J. (1990). RNA bulges and the helical periodicity of double stranded RNA. *Nature* **343**, 484.
- Biebricher, C.K. and Orgel, L.E. (1973). An RNA that multiplies indefinitely with DNA-dependent RNA polymerase: selection from a random copolymer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 934-938.
- Blumenthal, T., Landers., T.A. and Weber, K. (1972). Bacteriophage Q β replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1313.
- Cavalier-Smith T. (1987). The origin of cells: a symbiosis between genes, catalysts, and membranes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **52**, 805-24.
- Chamberlin, M.J. (1974). Bacterial DNA-dependent RNA polymerase. The Enzymes. New York Academic Press.

- Chiodini, P.L. (1998). Non-microscopic methods for diagnosis of malaria. *The Lancet* **351**, 80-81.
- Chu, B.C.F., Kramer, F.R. and Orgel, L.E. (1986). Synthesis of an amplifiable reporter RNA for bioassays. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5591.
- Dobkin, C., Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S. (1979). RNA replication: Required intermediates and the dissociation of template, product and Q β replicase. *Biochemistry* **18**, 2038.
- Eoyang, L. and August, J.T. (1971). Q-beta RNA polymerase from phage Q-beta-infected *E. coli*. In: *Procedures in Nucleic Acid Research*. Volume 2 (Cantoni, G.L. and Davis, D.R., eds.). Harper and Row, New York. pp. 829-839.
- Fire, A. and Xu, S-Q. (1995). Rolling replication of short DNA circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4641-4645.
- Franzen, L., Westin, G., Shabo, R., Aslund, L., Perlmann, H., Persson, T., Wigzell, H. and Petersson, U. (1984). Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Lancet* **I**, 525-528.
- Gillespie, D. and Spiegelman, S. (1965). A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* **12**, 829-842.
- González, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N. And Lizardi, P.M. (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitive parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3356.
- Hartman, G.R., Biebricher, C.K., Glaser, S.J., Grisse, F., Katzameyer, M.J., Lindner, J., Mosing, H., Nasheuer, H.P., Rothman-Denes, L.B., Schaffner, A.R., Schneider, G.J.,

Stetter, K.O. and Tomm M. (1988). Initiation of transcription – a general tool for affinity labeling of RNA polymerase by autocatalysis. *Biol. Chem. (Hoppe-Seyler)* **369**, 775-788.

Haruna, I. and Spiegelman, S. (1965a). Recognition of size and sequence by an RNA replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1189.

Haruna, I. and Spiegelman, S. (1965b). Autocatalytic synthesis of a viral RNA *in vitro*. *Science* **150**, 884.

Hill, D. and Blumenthal, T. (1983). Does Q β replicase synthesize RNA in the absence of template?. *Nature* **301**, 350.

Hunsaker, W.R., Badri, H., Lombardo, M. and Collins ML. (1989). Nucleic acid hybridization assays employing dA-tailed capture probes. II. Advanced multiple capture methods. *Anal Biochem.* **181**, 360-370.

Inokuchi Y, Hirashima A. (1990). Interference with viral infection by RNA replicase deleted at the carboxy-terminal region. *J Biochem.* **108**, 53-58.

Kamer, G. And Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerase from plant, animal and bacterial viruses. *Nuc. Acids Res.* **12**, 7269-7282.

Konarska, M.M. and Sharp, P.A. (1989). Replication of RNA by the DNA-dependent RNA polymerase of phage T7. *Cell* **57**, 423-431.

Konarska, M.M. and Sharp, P.A. (1990). Structure of RNAs replicated by the DNA-dependent T7 RNA polymerase. *Cell* **63**, 609-618.

Kramer, F.R., Mills, D.R., Cole, P.E., Nishihara, T. And Spiegelman, S. (1974) Evolution *in vitro*: sequence and phenotype of a mutant RNA resistant to ethidium bromide. *J. Mol. Biol.* **89**, 719-736.

Lal, A.A., Changkasiri, S., Hollingdale, M.R. and McCutchan, T.F. (1989). Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol. Biochem. Parasitol*, **36**: 67-72.

Lanar, D.E., McLaughlin, G., Wirth, D.F., Barke, R.J., Zolg, W. and Chulay, J.D. (1989) Comparison of thick films, *in vitro* culture and hybridization probes for detecting *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**, 3-6.

Lazcano, A., Fastag, J., Garoglio, P., Ramírez, C. And Oro, J. (1988). On the early evolution of RNA polymerase. *J. Mol. Evol.* **27**: 365-376.

Levisohn, R. and Spiegelman, S. (1968). The cloning of a self replicating RNA molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 866.

Li, J., Gutell, R., Damberger, S.H., Wirtz, R.A., Kissinger, J.C., Rogers, M.J., Sattabongkot, J. and McCutchan, T.F. (1997). Regulation and trafficking of three distinct 18S ribosomal RNAs during development of the malaria parasite. *J. Mol. Biol.* **269**, 203-213.

Liu, D., Daubendiek, S.L., Zillman, M.A., Ryan, K. and Koo, E.T. (1996). Rolling circle DNA synthesis: small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *J. A. Chem. Soc.* **118**, 1587-1594.

Lizardi, P. M., Guerra, C.E., Lomelí, H., Tussié-Luna, I. and Kramer, F.R. (1988). Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes. *BioTechnology* **6**, 1197-1202.

Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C. y. Ward, D.C. (1998). Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genetics* **19**, 225-232.

Lomelí Buyoli, H.M. (1990). Desarrollo de sondas de RNA recombinante amplificables y su uso en ensayos modelo de hibridación. Tesis de Doctortado en Investigación Biomédica Basica. UACPyP del CCH/UNAM.

Lomelí, H., Tyagy, S., Pritchard, C.G., Lizardi, P.M. and Kramer, F.R. (1989). Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin. Chem* **35**, 1826-1831.

Mathews, D.H. Sabina, J. Zuker, M. and Turner D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **288**, 911-940.

McCutchan, T.F., de la Cruz, V.F., Lal, A.A., Gunderson, J.H., Elwood, H.J. and Sogin, M.L. (1988). Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **28**: 63-68.

McCutchan, T.F., Li. J., McConkey, G.A., Rogers, M.J. and Waters, A.P. (1995). The cytoplasmic ribosomal RNAs of *Plasmodium* spp. *Parasitology Today* **11**, 134-138.

McLaughlin, G.L., Edlin, T.L., Campbell, G.H., Eller, R.F. and Ihler, G.M. (1985). Detection of *Plasmodium falciparum* using a synthetic DNA probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 837-840.

Miele, E.A., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1983). Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J. Mol. Biol.* **171**, 281.

Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783-8798.

Morrisey, D.V., Lombardo, M., Eldredge J.K., Kearney, K.R., Groody, E.P. and Collins, M.L. (1989). Nucleic acid hybridization assays employing dA-tailed capture probes. *Anal. Biochem.* **181**, 345-359.

Mullis, K.B. and Fallona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enz.* **155**, 335-350.

Nishihara, T., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1983). Localization of Q β replicase recognition site in MDV-1 RNA. *J. Biochem.* **93**, 669.

Qari, S.H., Goldman, I.F., Pieniazek, N.J., Collins, W.E. and La1, A.A. (1994). Blood and sporozoite stage-specific small subunit ribosomal RNA-encoding genes of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene* **150**, 43-49.

Rogers, M.J., McConkey, G.A., Li, J. and McCutchan, T.F. (1995). The ribosomal DNA loci in *Plasmodium falciparum* accumulate mutations independently. *J. Mol. Biol.* **254**, 881-891.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Saiki, R.K., Scharf, S., Falona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

Sastry SS and Ross BM. (1977). Nuclease activity of T7 RNA polymerase and the heterogeneity of transcription elongation complexes. *J Biol Chem* **272**, 8644-8652.

Schweitzer, B., Steven Wiltshire, S., Lambert, J., O'Malley, S., Kukanskis, K., Zhu, Z., Kingmore, S.F., Lizardi, P.M. and Ward, D.C. (2000). Immunoassays with rolling circle

DNA amplification: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**, 10113-10119.

Shore, D., Langowski, J., Baldwin, R.L. (1981). DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4833-4837.

Singh, B., Sung, L.K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S.G., Cox-Singh, J., Thomas, A. and Conway, D.J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* **363**, 1017.

Thompson, J.D., Decker, S., Haines, D., Collins, R.S., Field, M. and Gillespie, D. (1989). Enzymatic amplification of RNA purified from crude cell lysate by reversible target capture. *Clin Chem.* **35**, 1878-1881.

Tussié-Luna, M.I. (1992). Construcción y análisis de tipo estructura-función de dos moléculas recombinantes substratos para la replicasa del fago Q β , que contienen una sonda para *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Basica. UACPyP del CCH/UNAM.

Ulanovsky, L., Bodner, M., Trifonov, E.N. and Choder, M. (1986). Curved DNA: design, synthesis and circularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 862-866.

Urdea, M.S., Running, T.H., Clyne, J.C., Ku, L. And Warner, B.D. (1987). A novel method for the rapid detection of specific nucleotide sequences in crude biological samples without blotting or radioactivity; application to the análisis of hepatitis B virus in human serum. *Gene* **61**, 253-264.

Wahba, A.J., Miller, M.J., Nivelau, A., Landers, T.A., Carmichael, K., Weber, K., Hawley, D.A. and Slobin, L.I. (1974). Subunit I of Q β replicase and 30S ribosomal protein S1 of *Escherichia coli*. Evidence for the identity of the two proteins. *J. Biol. Chem.* **249**, 3314.

Walter, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.G. and Sank, D.D. (1992). Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 392-396.

Waters, A.P. and McCutchan, T.F. (1989). Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *The Lancet* 8651, 1343-1344.

Wu, D.Y. and Wallace, R.B. (1989). The ligation amplification reaction (LAR) – amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* **4**, 560-569.

Zhang, D. (1992). New activities of Q β RNA replicase. PhD Thesis in Biochemistry. New York University, School of Medicine.

Zuker, M., Mathews, D.H. and Turner, D.H. (1999). Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology. *J. Barciszewski and B.F.C. Clark, eds.*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers,

Zuker, M (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31** (13), 3406-3415.

SEGUNDA PARTE

“Bioquímica y biología de los factores de transcripción, TFII-I y BEN, implicados en el Síndrome de Williams-Beuren”

Artículos presentados:

1. Tussie-Luna MI, Bayarsaihan D, Ruddle FH and Roy, AL (2001). Repression of TFII-I -dependent transcription by nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7789-7794.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=1438732>
2. Tussie-Luna MI, Bayarsaihan D, Seto E, Ruddle FH and Roy AL. (2002). Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family of proteins and PIAS α / β . *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12807-12812.
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/277/45/43185>
3. Tussie-Luna MI, Michel, B, Hakre S and Roy AL. (2002). The SUMO ubiquitin-protein isopeptidase ligase family member Miz1/PIAS α / β /Siz2 is a transcriptional cofactor for TFII-I. *J Biol Chem* 277, 43185-43193.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=12239342>

INTRODUCCION

Las señales generadas fuera de la célula son transducidas al núcleo a través de una serie de complicados pasos bioquímicos que finalmente dan lugar a la activación temporal y/o espacial de un grupo de genes específicos (Pawson y Nash, 2000). De esta forma, existen receptores membranales en la superficie de la célula que sensan las señales extracelulares y transducen la señal a proteínas específicas intracelulares que, a su vez transducen la señal a genes específicos y así, proveen un puente entre el señalamiento extracelular y el crecimiento, la proliferación o la diferenciación celular en una célula determinada. Los factores de transcripción juegan un papel primordial en estos procesos en general y a menudo, sirven de puente entre la transducción de la señal y la activación génica en tipos celulares específicos. TFII-I es uno de tales factores de transcripción multifuncionales, que se expresa de forma ubícua, es activado en respuesta a una gran variedad de señales extracelulares y une así, eventos de transducción de señal con transcripción (Roy, 2001).

TFII-I fué descubierto originalmente como un factor de la maquinaria de transcripción basal que se une y funciona *in vitro*, a través de un elemento promotor “core” iniciador (Inr) (Roy y col., 1991). La unión de TFII-I a los elementos Inr, promueve la activación de la transcripción de los promotores que carecen de la caja TATA (TATA^{Inr+}) (Roy y col., 1991). Más tarde se encontró que, TFII-I también se une a elementos “Inr-like” y a elementos “Inr no consenso” (Wu y Patterson, 1999; Morikawa y col., 2000; Mobley y Sealy, 2000) así como a elementos reguladores que se encuentran hacia arriba del promotor, como la caja E (E-box) y los elementos inducibles en cis (SIE) (Grueneberg y col., 1997; Kim y col, 1998; Parker y col., 2001; Roy y col.,

1997). Generalmente, las cajas E son reconocidas por miembros de la familia de las proteínas “helix-loop-helix” como USF y se sabe que, TFII-I sinergiza con USF en la unión de las cajas E y los elementos Inr (Roy y col., 1991) y que la cooperación negativa de *c-myc* con TFII-I (*c-myc* inhibe la transcripción de genes que dependen de TFII-I), involucra la unión de TFII-I a los elementos Inr (Roy y col., 1993). Por otro lado, la activación de *c-fos* mediada por TFII-I, depende de la unión de TFII-I a los elementos SIE y SRE (elemento que responde a suero) (Casteel y col., 2002; Kim y col., 1998; Roy y col., 1997), de la interacción con SRF/Elk, Phox1 (una proteína con dominios homeóticos), STAT1, STAT3 (Grueneberg y col., 1997; Kim y col., 1998) así como, de una vía de señalamiento *Ras* intacta (Kim y col., 1998).

Recientemente, se ha demostrado que TFII-I también se une a elementos que responden a estrés por retículo endoplásmico (ERSEs) en las regiones promotoras de los genes regulados por glucosa (GRP), los cuales codifican para chaperonas (Parker y col., 2001). Además, TFII-I interacciona física y funcionalmente con ATF6, un activador transcripcional inducido por señalamiento, que se requiere para la inducción óptima de *grp78* (Parker y col., 2001). De esta forma, TFII-I es capaz de inducir la transcripción de *grp78* en respuesta a la depleción de las pozas de calcio del retículo endoplásmico por tratamiento con thapsigargin. Estas observaciones sugieren que, TFII-I puede funcionar simultáneamente como factor de transcripción basal y como activador, facilitando así, la comunicación entre la maquinaria basal ensamblada en el elemento promotor “core” y los complejos activadores ensamblados en las regiones regulatorias hacia arriba (Roy y col., 1991) (Fig. 1). También, sugieren que dependiendo de la señal y/o el promotor, TFII-I

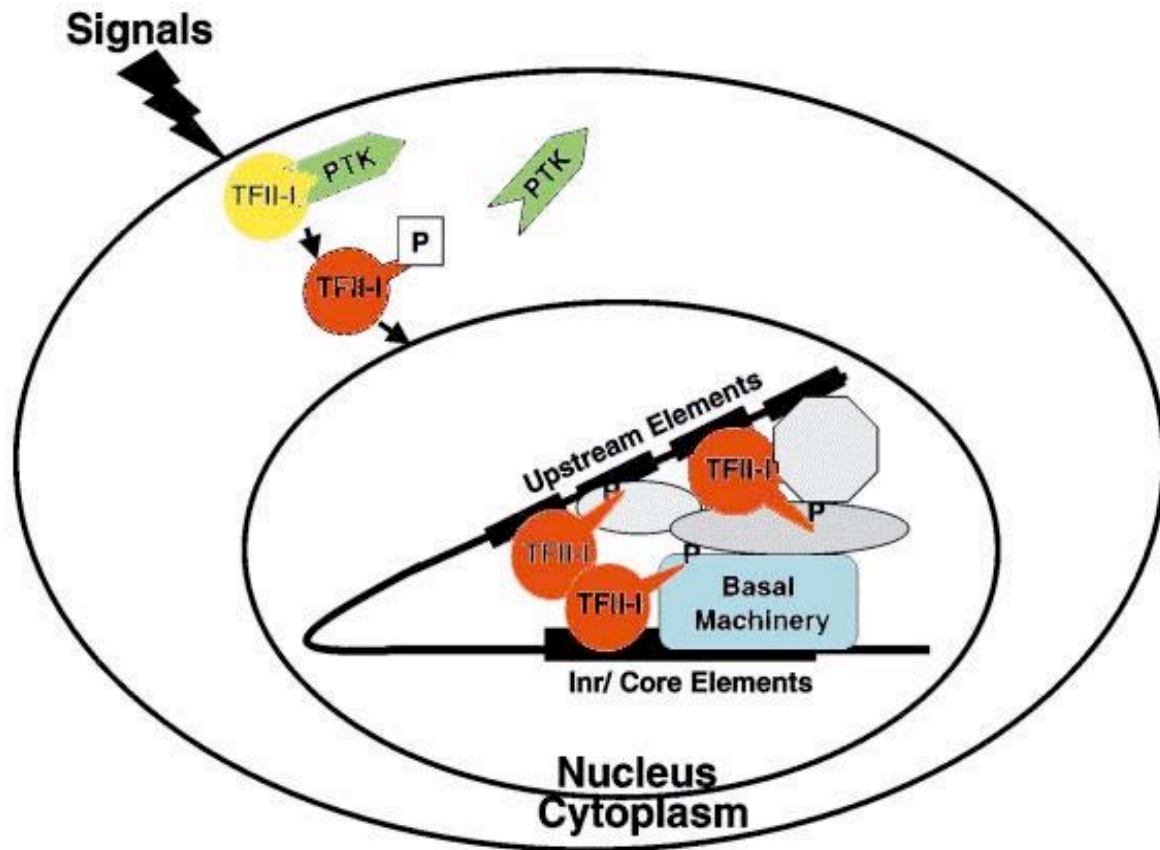


Fig 1. TFII-I es un factor de transcripción multifuncional que se une a a dos elementos promotores -al elemento “Inr” del promotor “core” y a varios elementos hacia arriba-, facilitando así, la comunicación entre la maquinaria basal de transcripción y los activadores hacia arriba. Ambas funciones transcripcionales de TFII-I dependen de su estado de fosforilación. En células primarias en reposo, TFII-I permanece secuestrado en el citoplasma por tirosina proteína cinasas del tipo no-receptor (como son, Btk o Src) o por la proteína activadora de la Rho-GTPasa, p190-Rho-GAP. TFII-I es fosforilado y liberado de sus secuestradores, en respuesta a señales extracelulares. Una vez que, TFII-I es fosforilado en tirosinas, transloca al núcleo y activa genes específicos.

tiene la capacidad de interactuar con diversos complejos activadores (Cheriyath y Roy, 2000).

Se ha demostrado que, TFII-I es fosforilado en residuos de serinas y tirosinas y que ésta fosforilación se requiere para su función transcripcional (Novina y col. 1998). Una gran variedad de señales extracelulares mediadas a través de receptores en la superficie de la célula, incluyendo los receptores a factores de crecimiento, como el EGF (factor de crecimiento epidérmico) o el PDGF (factor de crecimiento de plaquetas), el receptor de linfocitos B (BCR) o el receptor a el factor de crecimiento tumoral, TGF β , inducen una mayor fosforilación de TFII-I en tirosinas o serinas e inducen así, su actividad transcripcional (Yang y Desiderio, 1997; Novina y col., 1998, 1999; Kim y col., 1998; Kim y Cochran, 2001; Casteel y col., 2002; Sacristán y col., 2004; Stasyk y col., 2005). En linfocitos B, una fracción significativa de TFII-I esta asociada constitutivamente a la proteína cinasa de Bruton (Btk) (Novina y col., 1999; Yang y Desiderio, 1997) y mutaciones en Btk que disocian esta interacción, producen en humanos un síndrome de inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, conocido como agammaglobulinemia (linfocitos B arrestados en la etapa de diferenciación de pre-B y niveles bajos de inmunoglobulinas en suero) y en ratón, un síndrome más leve conocido como “xid” (reducción del 50% de linfocitos B maduros) (Rawlings y col., 1993; Thomas y col., 1993; Tsukada y col., 1993; Vetrie y col., 1993; Yang y Desiderio, 1997; Pérez Jurado y col., 1998; Novina y col., 1999). Por entrecruzamiento con inmunoglobulinas del receptor de células B, Btk es activada por fosforilación y ésta, a su vez fosforila a TFII-I en tirosinas, lo cual induce la transcripción de genes específicos involucrados en progresión del ciclo celular, proliferación, diferenciación y quizás, inhibición de

apoptosis (Yang y Desiderio, 1997; Novina y col., 1999, Sacristan y col., 2004 y observaciones no publicadas) (Fig. 2). Estas observaciones sugieren que, TFII-I media eventos de señalamiento y une los complejos activadores que responden a señalamiento con la maquinaria de transcripción basal. Cabe mencionar que, TFII-I también interacciona con componentes de la familia de NFκB, particularmente con p50, facilitando la unión a DNA de los homodímeros p50/p50, disminuyendo la translocación nuclear de *c-Rel* y por lo tanto, promoviendo la formación de heterodímeros *c-Rel/p50*, con ello, disminuyendo los niveles de *c-myc* y aumentando los niveles de p21 y p27 controlando así, negativamente la proliferación de linfocitos B (Montano y col., 1996; Ashworth y Roy, 2006).

Datos bioquímicos y genéticos recientes sugieren que TFII-I pertenece a una familia de proteínas que contienen el repetido “I” (un dominio ‘helix-loop-helix’ atípico que pudiera tener actividad de unión a DNA pero que se le ha implicado más bien en interacciones proteína-proteína), identificado primero en TFII-I (Perez Juardo y col., 1998; O’Mahoney y col., 1998; Franke y col., 1999; Osborne y col., 1999; Roy y col., 1997), luego en BEN (Bayarsaihan y Ruddle, 2000; Tassabehji y col., 1999; Yan et al., 2000) y más recientemente, en GTF2IRD2 (Makeyev y col., 2004; Tipney y col., 2004) (Fig. 3). Todos los genes de esta familia han sido localizados en la deleción hemizigota asociada a el Síndrome de Williams-Beuren (WBS) en la región del cromosoma 7q11.23 (revisado en Francke, 1999). Esta deleción hemizigota de alrededor de 1.5 Mb produce la haploinsuficiencia de alrededor de 25-30 genes. Por análisis de deleciones mínimas en pacientes con WBS se ha podido establecer una correlación entre genotipo y fenotipo,

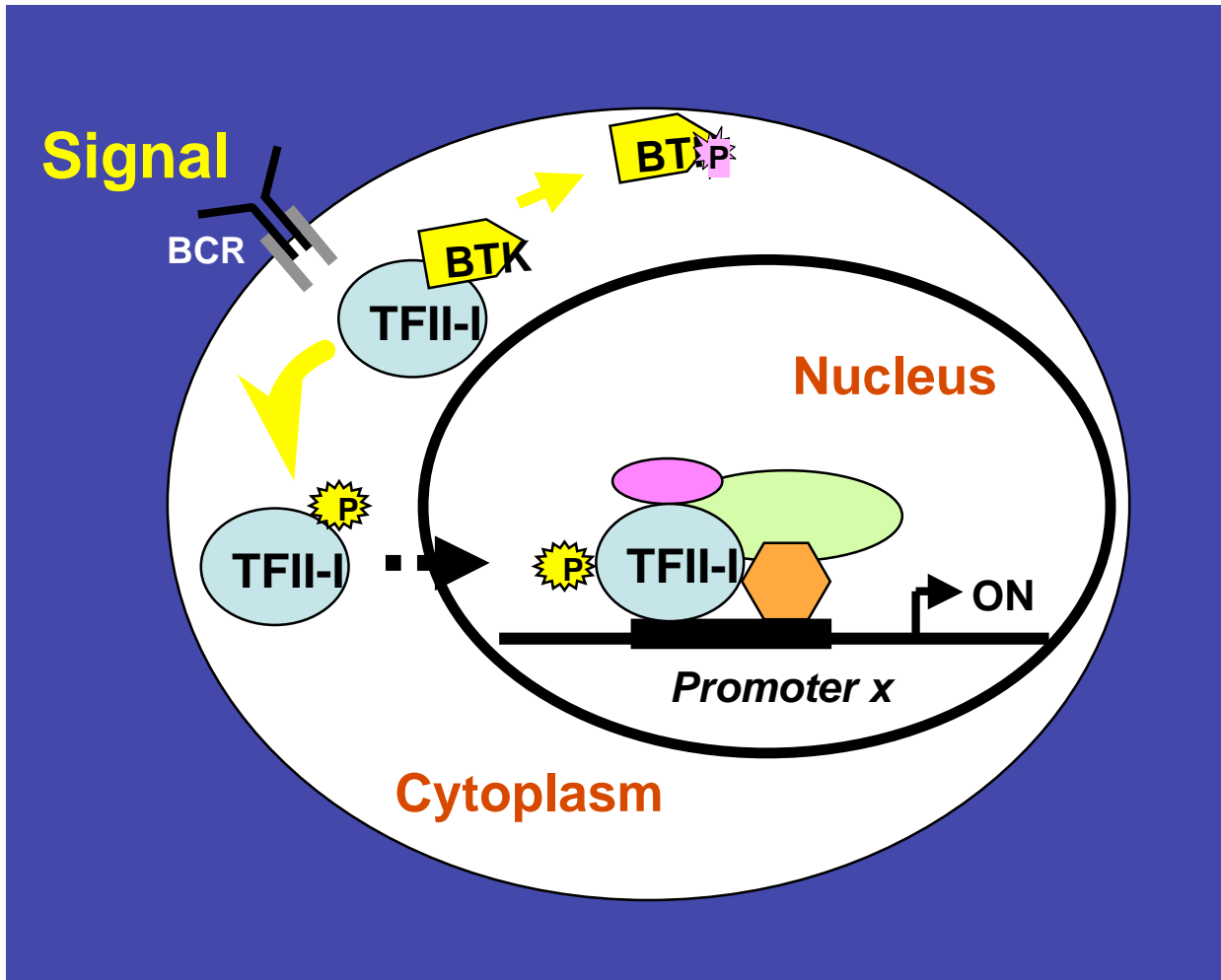


Fig 2. Regulación de TFII-I mediada por Btk. En células primarias en reposo, TFII-I permanece secuestrado en el citoplasma por tirosina proteína cinasas del tipo no-receptor (como Btk o Src) o por la proteína activadora de la Rho-GTPasa, p190-Rho-GAP. TFII-I es fosforilado y liberado de sus secuestradores, en respuesta a señales extracelulares. En células B en reposo, TFII-I no fosforilado se encuentra asociado con Btk en el citoplasma. Btk es activada (se autofosforila) en respuesta al entrecruzamiento del receptor de células B (BCR) y subsecuentemente, Btk activada fosforila a TFII-I en tirosinas, lo cual induce la disociación del complejo, TFII-I:Btk. Mientras, Btk activada localiza en la membrana citoplasmática vía su dominio de homología a“pleckstrin” (PH), TFII-I fosforilado en tirosinas, transloca al núcleo y activa genes involucrados en la progresión del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y quizás, la inhibición de la apoptosis (observaciones no publicadas).

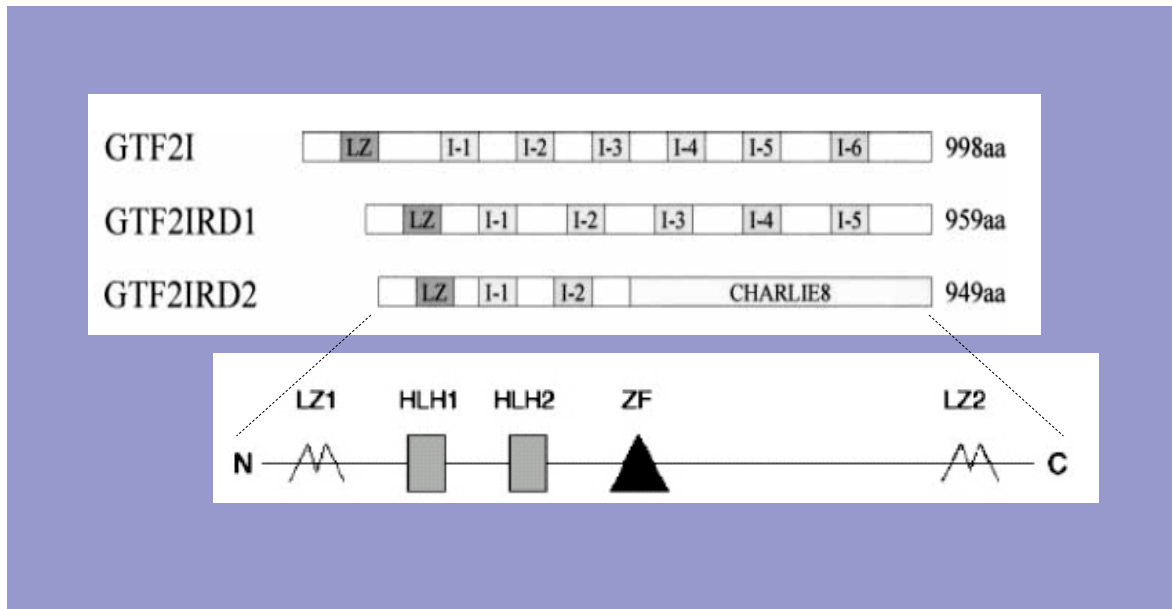


Fig 3. Representación esquemática de la familia de proteínas que contienen el repetido I y los motivos estructurales del producto protéico de GTF2IRD2. GTF2I, gene que codifica para TFII-I; GTF2IRD1, gene que codifica para BEN; GTF2IRD2, gene que codifica para el tercer miembro de esta familia. LZ (leucine zipper), cierre de leucinas, involucrado en interacciones proteína-proteína; I-1 a I-6, repetidos I (dominios hélice-asa-hélice o “HLH domains”, involucrados en la unión a DNA o interacciones proteína-proteína); ZF (zinc finger), dedo de Zn, involucrado en interacciones proteína-proteína y CHARLIE8, retrotransposon del tipo “Charlie8”.

implicando a TFII-I y BEN en el retraso mental y los defectos craneo-faciales, observados en estos pacientes (Fig 4).

Mientras TFII-I ha sido descrito mayoritariamente como un regulador ‘positivo’ de la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular y la proliferación (*c-fos*, *cyclin D1*) (Grueneberg y col., 1997; Kim y col., 1998; Kim y Cochran, 2000, 2001; Desgranges y col., 2005), la diferenciación (*goosoid* en *Xenopus*) (Ring y col., 2002; Ku y col., 2005) o el desarrollo (substancia inhibidora Mülleriana) (Morikawa y col., 2000); BEN ha sido descrito principalmente como un regulador ‘negativo’ de la transcripción, ya que antagoniza alguna de las funciones de TFII-I, como la activación de *c-fos* (Tussie-Luna y col., 2001) y *Gsc* (Ku y col., 2005), y reprime otros genes tales como, el de *Hoxc8* (comunicación personal), el de la Troponina I de fibras lentas por interacción con MEF2 (Calvo y col., 2001; Vullhorst y Buonano, 2003; Polly y col., 2003) o el del VEGFR-2 (receptor 2 del factor de crecimiento de endotelio vascular) (Jackson y col., 2005). Sin embargo, tanto TFII-I como BEN, pueden comportarse como activadores y/o represores de la transcripción, según el gene regulado, la vía de señalamiento recibida y la etapa de diferenciación del tipo celular específico (O’Mahoney y col., 1998; Novina y col., 1998; 1999; Yan y col., 2000; Cheriyaath y col., 2000; 2002; Kim y col., 2000, 2001; Tussie-Luna y col., 2001; 2002; Polly y col., 2003; Hakimi y col., 2003; Wen y col., 2003; Tantin y col., 2004; Ku y col., 2005; Jackson y col., 2005; Hakre y col., 2006).

BEN (“binding factor for early enhancer”) fué aislado primero como una proteína nuclear asociada a la proteína de retinoblastoma (pRb) (Yan y col., 2000); luego como un factor de transcripción que se une al “early enhancer” de *Hoxc8*, un gene homeótico

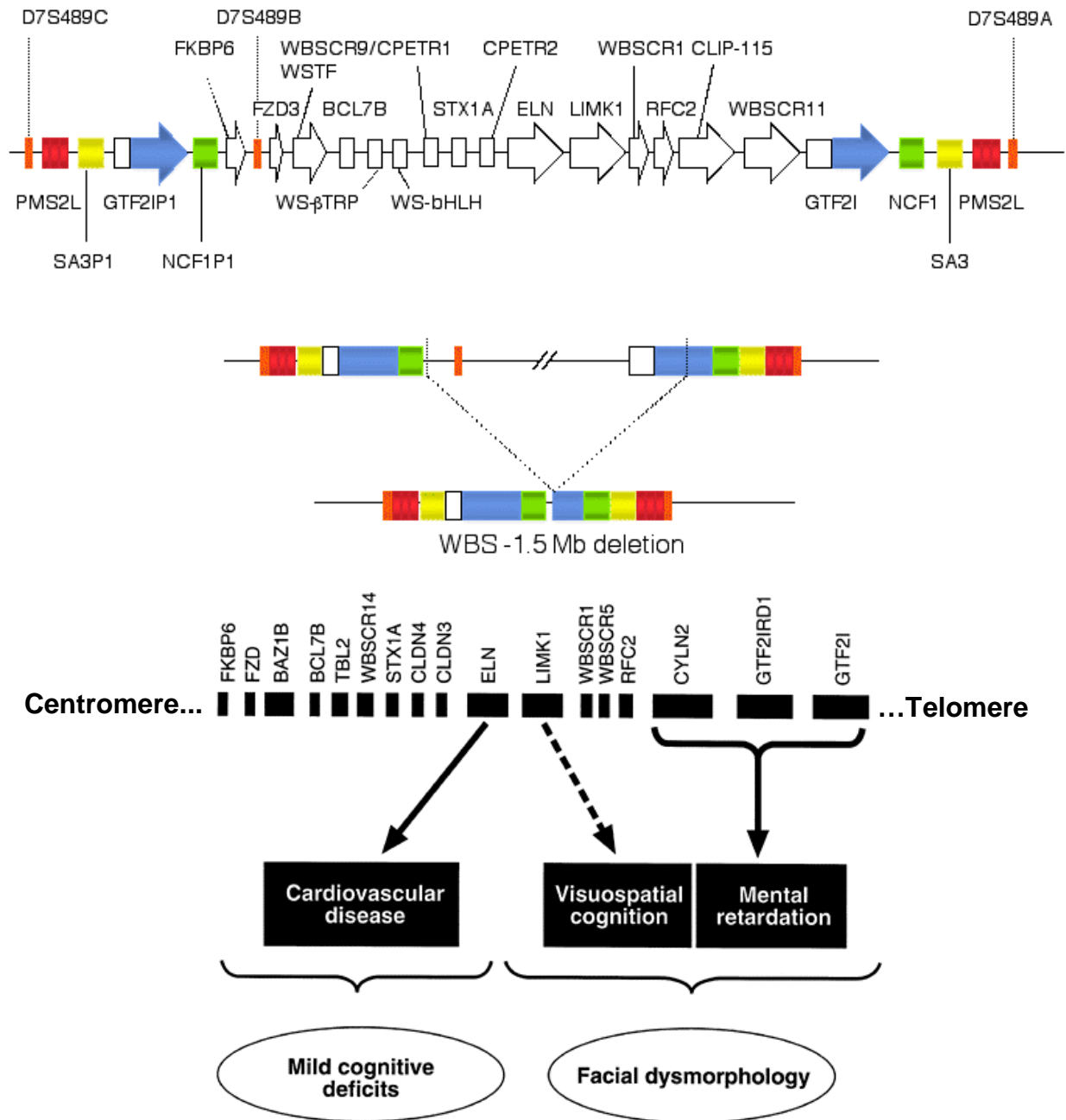


Fig 4. (A) El Síndrome de Williams Beuren (WBS) se produce como resultado de la delección hemizigota de ~ 1.5 Mb en la región del cromosoma 7, 7q11.23. Su incidencia es de entre 1 en 7500 a 1 en 20,000. **(B) Correlación genotipo-fenotipo del WBS.** Pacientes con este síndrome muestran retraso mental, defectos cognocitivos (CI 40-96) en construcción visuoespacial, problemas de aprendizaje, personalidades extremadamente sociables, adelgazamiento de la aorta y las arterias pulmonares (estenosis supra valvular aórtica, SVAS), defectos craneofaciales, retraso en el crecimiento, poco tono muscular e hipercalcemia durante la infancia. Por medio del análisis de pacientes con delecciones mínimas, se ha podido correlacionar la haploinsuficiencia de los genes para CYLN2, GTF2IRD1 y GTF2I, como los responsables del retraso mental así como, los genes responsables de los defectos craneofaciales observados.

involucrado en la determinación del eje anterior-posterior del embrión en vertebrados (Bayarsaihan y Ruddle, 2000); más tarde como una proteína que se une al “enhancer” del gene de la troponina I y reprime la activación de MEF2 (O’Mahoney y col., 1998; Calvo y col., 2001; Vullhorst y Buonano, 2003; Polly y col., 2003) o luego, como una proteína que se une al elemento distal (DE) del promotor de *Gsc* en *Xenopus laevis*, un gene que regula la formación del patrón del embrión (durante organogénesis) en vertebrados y que funciona como un “organizador”, y como una proteína que interacciona tanto con Smad2/3 como con FoxH1, un factor de transcripción de la familia “winged helix”, ambos bajo el señalamiento de activina e involucrados en la regulación de *Gsc* (Ring y col., 2002; Ku y col., 2005); y finalmente, como un factor que se une al elemento DICE en el promotor de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) (Tantin y col., 2004).

Aún cuando TFII-I y BEN, expresadas individual y ectópicamente son proteínas nucleares, cuando se les co-expresa ectópicamente en la misma célula, BEN permanece en el núcleo y TFII-I es excluido del núcleo. Importantemente, tal exclusión nuclear y concomitante represión transcripcional es específica para TFII-I pues no afecta a otros activadores transcripcionales. La delección del trecho de serinas del extremo carboxilo de BEN, resulta otra vez, en la colocalización nuclear de ambas proteínas (Tussié-Luna y col., 2001) (ver artículo #1 de esta Tesis). Bajo condiciones fisiológicas, la expresión de BEN es mucho más baja que la de TFII-I y esto podría explicar cómo es que TFII-I puede sobrellevar tales mecanismos de represión.

Cada una de estas proteínas, TFII-I, BEN y GTF2IRD2, presenta múltiples isoformas (Perez Jurado, 1998; Cheriya y Roy, 2000; Hardemann al expresarlas y col., 2003; Tussié-Luna y col., 2001). A la fecha, se han descrito 4 isoformas para TFII-I

murino y de humano (α , β , γ y Δ) (Fig. 5) (Perez Jurado, 1998; Cheriya y Roy, 2000), 11 isoformas para BEN murino (Tussié-Luna y col., 2001; Vullhorst y Buonano, 2003; Hardemann y col., 2003) (Fig. 6) y 3 para GTF2IRD2 humano (datos no publicados). La distribución en tejidos y entre especies así como, la distribución subcelular de las diferentes isoformas sugiere que pudieran tener funciones no redundantes. Evidencia reciente sugiere que la función de las diferentes isoformas, pudiera estar regulada por sus interacciones homoméricas (consigo mismas) y/o heteroméricas (entre las diferentes isoformas de la misma proteína o entre las isoformas de las diferentes proteínas), aún cuando se encuentren presentes simultáneamente (Cheriya y Roy, 2000; Tantin y col., 2004; Vullhorst and Buonanno, 2003) además de que, las diferentes isoformas pudieran tener diferentes funciones transcripcionales en los diferentes promotores (Cheriya y Roy, 2000) (Fig. 7).

Análisis cuidadoso de la distribución subcelular endógena de las diferentes isoformas de TFII-I en fibroblastos de ratón, mostró que mientras TFII-I Δ se encuentra principalmente en el citoplasma, TFII-I β se encuentra principalmente en el núcleo, bajo condiciones de ausencia de suero (Cheriya y Roy, 2001; Cheriya y col., 2002; Jiang y col., 2005; Hakre y col., 2006). Ahora, por estimulación con factores de crecimiento, TFII-I Δ es fosforilado en tirosinas y rápidamente transloca al núcleo, mientras que, TFII-I β es exportado al citoplasma (Hakre y col. 2006). Se demostró que, TFII-I β permanece reclutado al promotor de *c-fos* en ausencia de señalamiento y que, su reclutamiento es indetectable en presencia de señalamiento. De igual forma, se demostró que el knockdown específico de la isoforma β lleva a la activación transcripcional del gene de *c-fos* (Hakre y col. 2006). Dado que, ambas isoformas se unen al mismo sitio

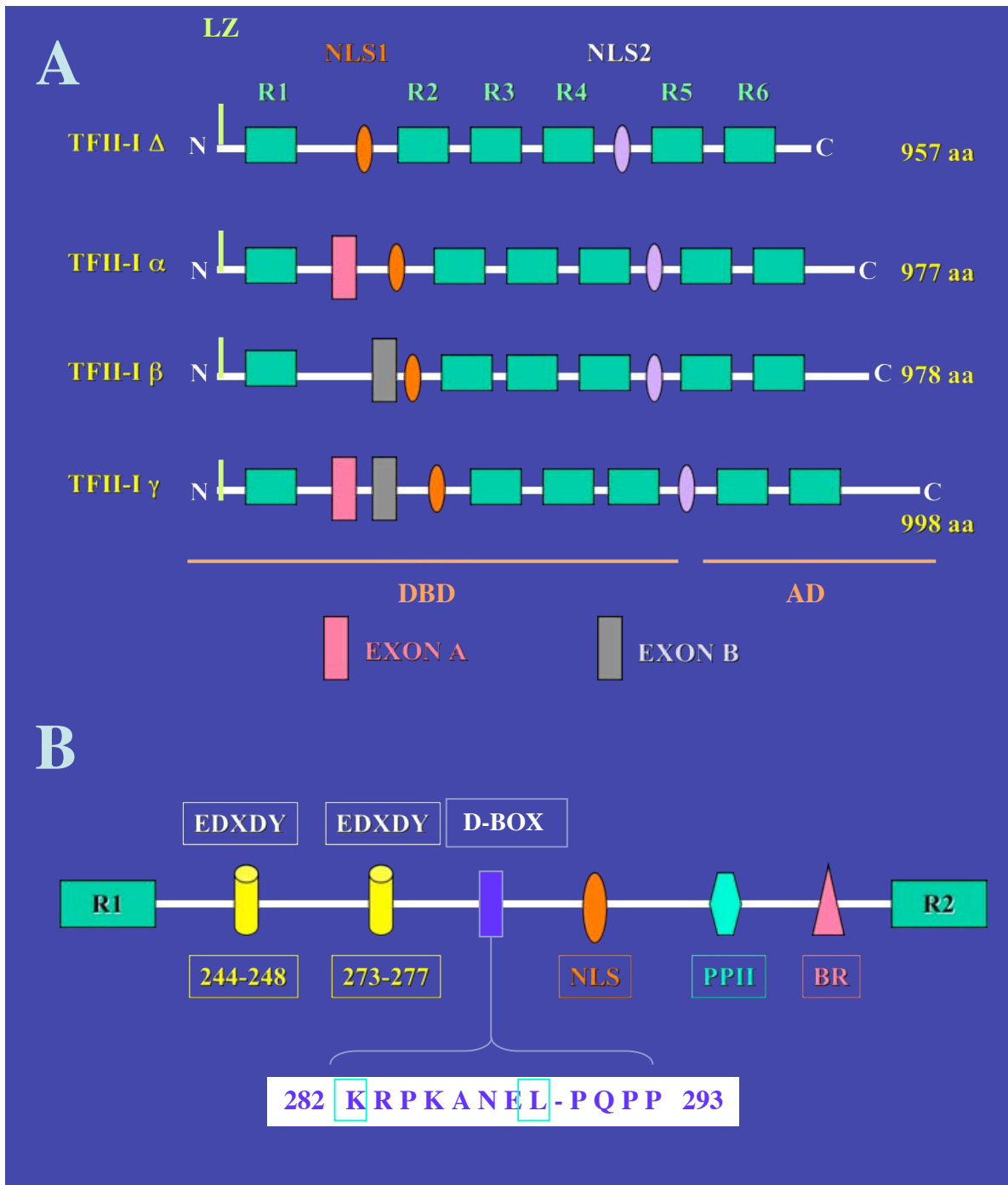


Fig 5. Estructura esquemática de las isoformas de TFII-I. (A) Esquema de las cuatro isoformas de TFII-I y sus respectivas longitudes en aminoácidos. LZ, cierre de leucinas; NLS, señal de localización nuclear; R1-R6, repetidos I/dominios HLH; DBD, dominio de unión a DNA; AD, dominio de activación. **(B) Se muestra la región comprendida entre R1 y R2 y sus dominios regulatorios.** Sitios de autofosforilación de Src: EDXDY en las posiciones 244-248 y 273-277; D-box, caja-D, sitio de interacción con la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (vía de señalamiento de RhoA) entre los aa 282-293; PPII, dominio de polyprolinas II, motivo de unión a dominios SH3; y BR, región básica/dominio de unión a DNA. La secuencia de la caja-D se muestra abajo con los residuos más conservados encerrados en un rectángulo.

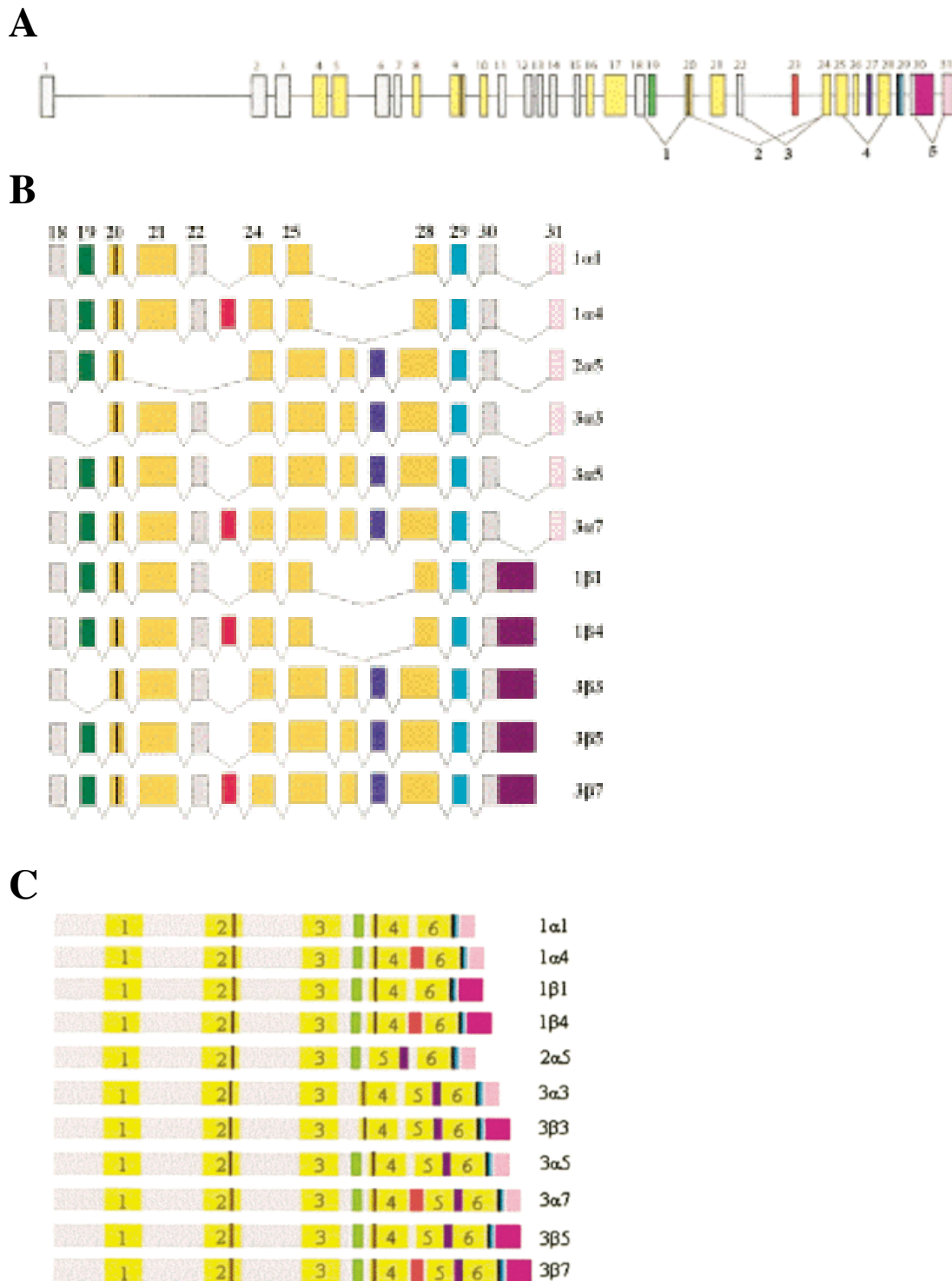


Fig 6. Representación esquemática de los eventos de ‘splicing’ en GTF2IRD1. y de las isoformas de BEN murino. (A) Representación esquemática de GTF2IRD1 mostrando las posiciones relativas de los intrones y de los cinco eventos de ‘splicing’ en la región 3’ que dan lugar a las 11 isoformas. **(B)** Eventos de ‘splicing’ alternativo en la región 3’ de GTF2IRD1 (exones 18-31). **(C)** Isoformas de BEN murino. Repetidos “I”, amarillo; exon 19, verde; exon 23, rojo; exon 27, azul oscuro; trecho de poliserinas, azul claro; NLSs, negro; exon 30, morado; exon 31, rosa.

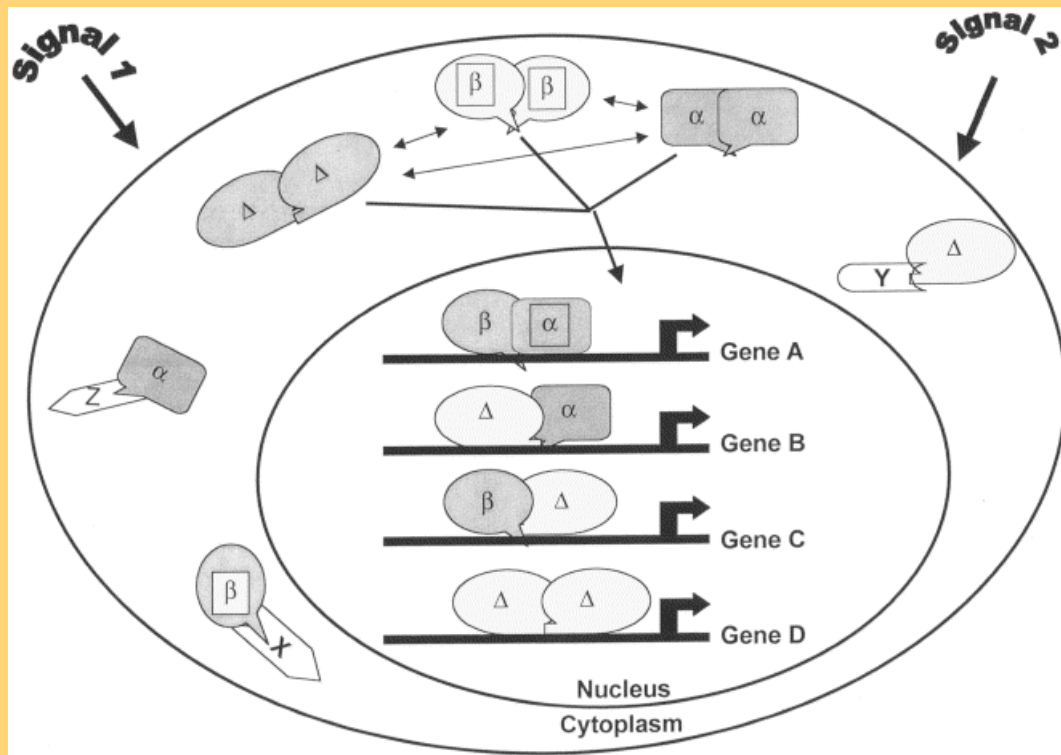


Fig 7. Modelo indicando las interacciones homoméricas y heteroméricas entre las diferentes isoformas deTFII-I. Las isoformas de TFII-I pueden existir como homómeros o heterómeros (en asociación con otras proteínas, X, Y o Z) en el citoplasma. Estas últimas interacciones pueden impedir la formación de complejos homoméricos o heteroméricos consigo mismas. TFII-I existe predominantemente en complejos heteroméricos en el núcleo y dependiendo del tipo celular o la especie, también se puede encontrar una subpoblación de homómeros. La importación al núcleo de TFII-I podría también estar regulada por la formación de complejo o subcomplejo entre las diferentes isoformas. El proceso entero podría depender de señalamiento de forma que, las diferentes señales extracelulares (1 vs 2) podrían inducir la formación de los distintos subcomplejos,y éstos, a su vez podrían translocar al núcleo para mediar una regulación génica diferencial a través de interacciones específicas, proteína-proteína y/o proteína-DNA. Así, el control temporal y/o espacial de la formación de subcomplejos se podría añadir a la red regulatoria de TFII-I.

dentro del promotor de *c-fos*, se sugiere que la isoforma β es la que se encarga de mantener los niveles bajos de *c-fos* y que, la isoforma Δ es la que se encarga de la activación mediada por mitógenos (Hakimi y col., 2003; Hakre y col., 2006). Por otro lado, también se ha demostrado que las diferentes isoformas de TFII-I tienen la capacidad de interactuar específicamente con algunos complejos represores *in vitro*, como con la histona deacetiltransferasa 3 (HDAC3) (Tussie-Luna y col., 2002; Wen y col., 2003) (ver artículo #2 de esta Tesis) y la demetilasa de histonas (H3K4), LSD1/BHC110 (observaciones no publicadas) (Fig. 8).

Muchas de las funciones de TFII-I están reguladas por fosforilación. Se ha demostrado que en condiciones basales, TFII-I se encuentra fosforilado en residuos de serina, treonina y tirosina, pero bajo condiciones de estimulación, se encuentra fosforilado predominantemente en residuos de serina aunque también se han identificado residuos fosforilados de treonina y tirosina (Novina y col. 1998; Yang y Desiderio, 1997). No se requiere la fosforilación de TFII-I para su unión a DNA (Inr), pero la fosforilación de TFII-I en tirosinas y serinas, es crítica para su actividad transcripcional (Novina y col., 1998; Novina y col., 1999; Egloff y Desiderio, 2001; Kim y Cochran, 2001; Casteel y col., 2001; Cheriya y col., 2002; Sacristán y col., 2004). La lista de los sitios de fosforilación identificados en TFII-I incluye: Tyr248, Tyr357, Ser371, Tyr462, Ser633, Ser627 and Ser743. Las cinasas Jak2, Src y Btk estimulan la fosforilación de la Tyr248, lo cual lleva a una mayor activación de *c-fos* (Grueneberg y col., 1997; Yang y Desiderio, 1997; Egloff y Desiderio, 2001; Kim y Cochran, 2001; Cheriya y col., 2002). La fosforilación de TFII-I en la Ser371 y la Ser627 por la proteína cinasa activada por mitógenos, ERK (Kim y Cochran, 2000), la fosforilación en la Ser633 por MAPK (Kim y

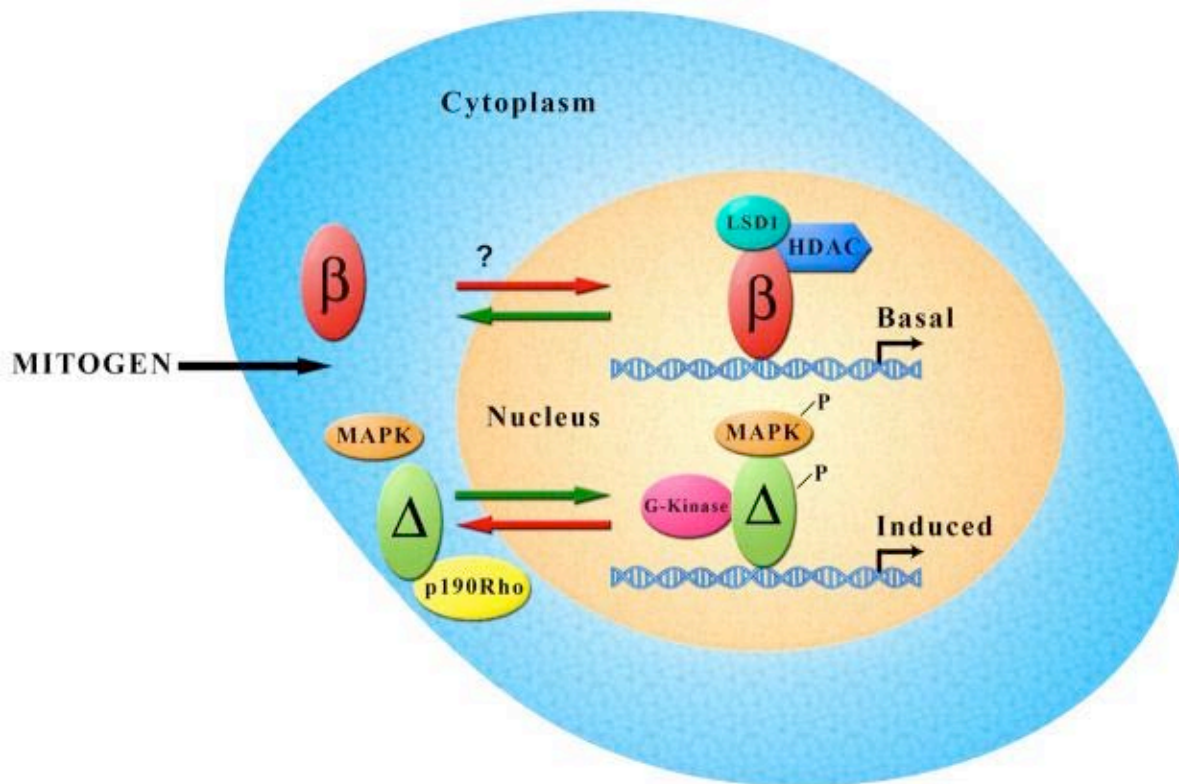


Fig 8. Regulación génica de las isoformas de TFII-I mediadas por factores de crecimiento. En ausencia de señalamiento, TFII-I β reside en el núcleo, unido al promotor de *c-fos*. Como parece reprimir la transcripción de *c-fos* e interactuar preferencialmente con la histona deacetyltransferasa3 (HDAC3) y/o la histona metiltransferasa, LSD1, pensamos que el TFII-I β unido al promotor debe estar asociado con estos co-represores. En contraste, en ausencia de señalamiento, TFII-I Δ reside en el citoplasma dónde interacciona con p190 Rho-GAP. Después de la estimulación con mitógenos, TFII-I Δ resulta fosforilada en tirosinas, interactúa con la cinasa MAPK/Erk activada y transloca al núcleo. Se ha demostrado que TFII-I Δ nuclear se une al mismo sitio que TFII-I β , en el promotor de *c-fos*. Y dado que TFII-I interacciona con la cinasa-G y transloca al núcleo junto con la cinasa MAPK, es probable que sea TFII-I Δ , la que unida al promotor en condiciones de estimulación, permanezca asociada con estas cinasas *in vivo*.

col., 1998; Kim y Cochran, 2000; Novina y col., 1998) y la fosforilación en la Ser371 y la Ser743, por la proteína cinasa dependiente de cGMP, PKG I β (Casteel y col., 2002) también aumentan la activación transcripcional de *c-fos*. Así, TFII-I representa un punto de convergencia para varios reguladores que activan la transcripción.

El factor de crecimiento tumoral TGF β 1, regula la expresión de los genes E2F2, ciclina D2 y ciclina D3, en una forma que depende de TFII-I y Smad3 (Stasyk y col., 2005), y esto está de acuerdo con la ausencia de la caja TATA y la presencia de los sitios de unión para TFII-I (Inr) y Smad3 (CAGA), en los promotores de estos genes (Brooks y col., 1996; Sears y col., 1997). TGF β 1 estimula la fosforilación de TFII-I en la Ser371 y la Ser743 al igual que la proteína cinasa dependiente de cGMP, PKG I β (Casteel y col., 2002). Inhibición de la fosforilación de TFII-I por reemplazo de estos residuos de serina por alanina (S371A y S743A), resulta en una mayor formación de complejo entre TFII-I y Smad3 y una mayor cooperación entre TFII-I y Smad3 en la regulación de la expresión de E2F2, ciclina D2 y ciclina D3. Por otro lado, TFII-I incrementa la unión de Smad3 a los elementos CAGA. De esta forma, la fosforilación de TFII-I inducida por TGF β 1, podría estar modulando-antagonizando el señalamiento de TGF β a nivel transcripcional (Stasyk y col., 2005). La disponibilidad y la actividad de las cinasas que fosforilan a TFII-I pudiera definir cuáles genes y en qué nivel serían regulados por TGF β . Se sabe que, las células tratadas con mitógenos responden menos a la acción inhibitoria de crecimiento del TGF β (Derynck y col., 2001; Souchelnytskyi y col., 2002a; Wakefield and Roberts, 2002). El efecto cooperativo de TFII-I en la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular, como la ciclina D2, la ciclina D3 y el factor de transcripción E2F2, pudiera estar contrarrestando el efecto inhibitorio de TGF β

sobre la proliferación celular. Así, la combinación de tales mecanismos pudieran estar contribuyendo a la activación fina y selectiva de genes, mediada por el TGF β .

Por otro lado, miembros de la familia de TGF β /activina/nodal regulan la expresión del gene ‘gooseoid’ (*Gsc*), un represor transcripcional que contiene dominios homeóticos, que regula la formación del patrón del embrión en vertebrados y que funciona como un “organizador” (Laurent y col., 1997; Watanabe y col., 1995; Ring y col., 2002). TGF β /activina/nodal regulan positivamente la expresión de *Gsc* vía TFII-I:Smad2 y negativamente, vía BEN:Smad2 a través de la unión excluyente de TFII-I o BEN, al elemento distal (DE) del promotor de *Gsc* (Ku y col., 2005) (Fig. 9). *Gsc* se expresa estrictamente en el labio dorsal del embrión en *Xenopus* (Blumberg y col., 1991; Cho y col., 1991) y es considerado como un “organizador”, por su capacidad, no sólo de diferenciar autónomamente a notocorda sino también de cambiar el destino de las células mesodérmicas vecinas a células con características dorsales e inducir un eje neural en el ectodermo que se sobrepone. La expresión ectópica de *Gsc* puede duplicar el eje y mimetizar el fenómeno organizador en *Xenopus* (Cho y col., 1991). Así, *Gsc* ha sido implicado en procesos tales como, migración celular y dorsalización del mesodermo, procesos que dependen de un “organizador”. En ratón, *Gsc* se expresa en la región del saco primitivo, y las células que expresan *Gsc* están comprometidas-predestinadas a formar la cabeza, así, luego dan lugar a la notocorda anterior y el endodermo y a el mesodermo de la cabeza (Blum y col, 1992; Gaunt y col., 1993). Dos regiones en el promotor de *Gsc* son críticas para su patrón de expresión apropiado en embriones de *Xenopus*, el elemento distal (DE) y el elemento proximal (PE). El elemento DE es activado por miembros de la familia de TGF β /activina/nodal y el elemento PE es

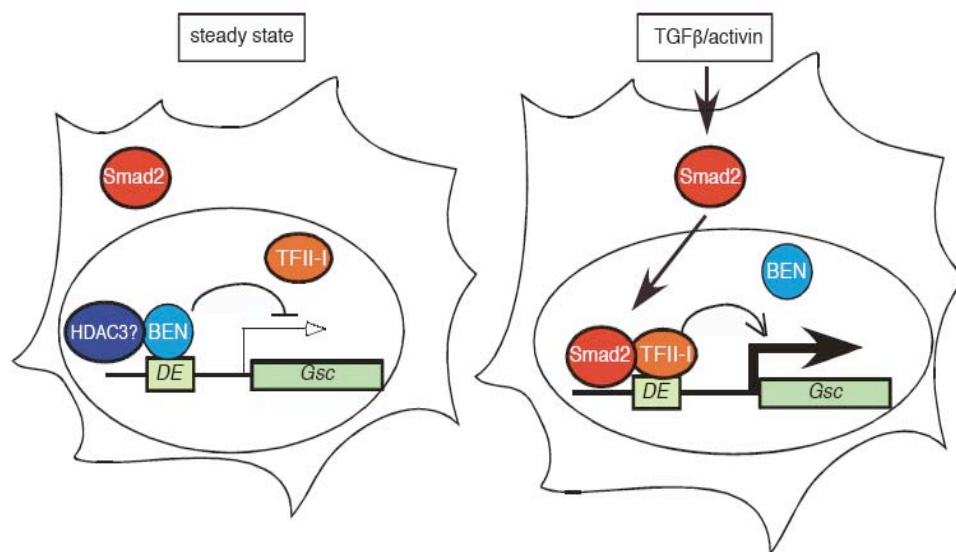
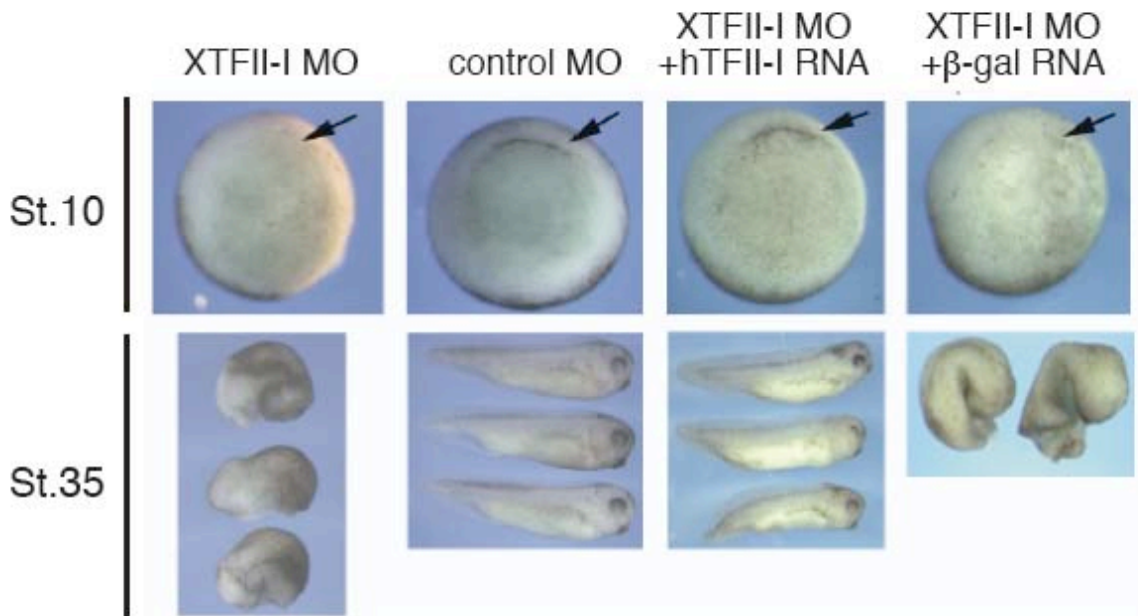


Fig 9. (A) Inhibición de TFII-I produce defectos durante el desarrollo en *Xenopus*. (B) Modelo de la regulación génica de TFII-I y BEN en la vía de TGFβ/BMP.

activado por miembros del señalamiento de Wnt. TGF β /activina/nodal regulan positivamente la expresión de *Gsc* vía TFII-I:Smad2 y negativamente, vía BEN:Smad2 a través de la unión excluyente de TFII-I o BEN, al elemento distal (DE) del promotor de *Gsc* (Ku y col., 2005) (Fig. 9).

Recientemente, se demostró que TFII-I es un activador transcripcional de la ciclina D1 *in vivo*, y que éste promueve a una entrada y salida acelerada de la fase S del ciclo celular (Desgranges y col., 2005). La exposición a radiaciones ionizantes (IR) (un tipo de estrés genotóxico), induce arresto del ciclo celular con daño a DNA y activación de p53. El arresto del ciclo celular, inducido por exposición a radiaciones ionizantes (IR), induce la degradación de TFII (Desgranges y col., 2005). La ubiquitinación de TFII-I y su degradación por el proteasoma por exposición a IR, requiere de la presencia de p53 y ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) intactas. La fosforilación de TFII-I en la Tyr248 y la Tyr611, es importante, tanto para la regulación transcripcional de la ciclina D1 como el control del ciclo celular y su actividad transcripcional inducida por señales de crecimiento (Desgranges y col., 2005) (Fig. 10). Aunque la expresión ectópica de TFII-I incrementa los niveles de la ciclina D1 y la células no se arrestan por exposición a IR, no se sabe si progresan a través del ciclo celular, “a pesar del daño al DNA” o si es que lo reparan más rápido. TFII-I ha sido encontrado en asociación con varios complejos involucrados en la detección y propagación de la señal de daño a DNA (observaciones no publicadas). Y cómo TFII-I sufre varias modificaciones postranscripcionales (fosforilación, sumoylación, ubiquitinación), es probable que alguna de estas modificaciones ocurran selectivamente en una fase particular del ciclo celular y dicten su capacidad de interactuar con diversos complejos reguladores (Roy, 2007). En este

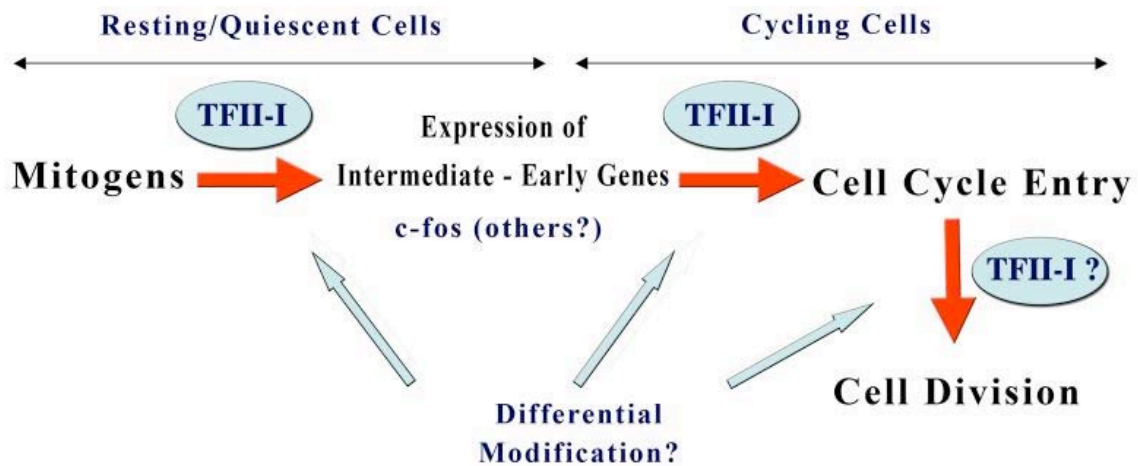


Fig 10. Funciones de TFII-I en las distintas fases del ciclo celular mediada por modificaciones diferenciales. TFII-I parece jugar distintos papeles durante las diferentes fases del ciclo celular. Suponemos que esto es posible debido a que, las diferentes modificaciones post-transcripcionales que sufre TFII-I, podrían dar lugar a sus diferentes interacciones con los diferentes factores. Las modificaciones post-transcripcionales descritas a la fecha para TFII-I incluyen, fosforilación en tirosinas y/o serinas/treoninas, sumoylación y ubiquitinación. La función de cada una de las isoformas de TFII-I en este proceso, se desconoce hasta el momento.

sentido, encontramos que tanto TFII-I como BEN, interaccionan con parte de la maquinaria de sumoylación (PIAS α β , UBC9), en un tamiz de dos híbridos (“two-hybrid screen”), validamos esas interacciones (Tussié-Luna y col., 2002) (ver artículo #3 de esta Tesis) y a la fecha hemos mapeado los residuos que son sumoylados *in vivo*, en TFII-I (datos no publicados).

Aunque entendemos mejor la función bioquímica de TFII-I y su mecanismo de activación inducido por señalamiento, la función de BEN, no está clara todavía. Necesitamos averiguar cuáles son sus funciones fisiológicas y cuáles son los genes que regulan? Cómo y cuándo estos reguladores son regulados? Las mismas vías de señalamiento regulan a ambas proteínas? Sus funciones opuestas, sugieren una regulación recíproca durante el desarrollo y/o diferenciación en un linaje dado?. En éste sentido, durante el análisis de un ratón transgénico para *c-myc*, la integración indujo una deleción que incluía parte del gene de GTF2IRD1 (BEN) (Durkin y col., 2001). En los ratones homózigos para la deleción inducida por éste transgene, se redujeron significativamente los niveles del transcrito para GTF2IRD1, lo cual llevó a la postulación de que GTF2IRD1, pudiera no ser esencial para viabilidad. Estos ratones mostraron también defectos en la quijada y la nariz, en concordancia con su posible participación en los defectos craneofaciales observados en los pacientes con WBS (Durkin y col., 2001). Sin embargo, no parece haberse hecho un análisis más detallado de otras anormalidades, como las asociadas al sistema nervioso. En nuestras manos, la pérdida homozigota de la función de GTF2I o GTF2IRD1, indujo letalidad embriónica entre los días 8.5 y 12.5 de gestación, hemorragia cerebral, defectos vasculares, craneofaciales y en el tubo neural (manuscrito en preparación).

REFERENCIAS

Bayarsaihan, D. and Ruddle, F.H. (2000). Isolation and characterization of BEN, a member of the TFII-I family of DNA-binding proteins containing distinct helix-loop-helix domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7342-7347.

Bayarsaihan, D., Bitchevaia, N., Enkhmandakh, B., Tussié-Luna, M.I., Leckman, J.F., Roy, A.L. and Ruddle, F.H. (2003). Expression of BEN, a member of TFII-I family of transcription factors, during mouse pre- and postimplantation development. *Gene Expr. Patterns* **3**, 579-589.

Brooks, A. R., Shiffman, D., Chan, C. S., Brooks, E. E. and Milner, P. G. (1996). Functional analysis of the human cyclin D2 and cyclin D3 promoters. *J. Biol. Chem.* **271**, 9090 –9099.

Calvo, S., Vullhorst, D., Venepally, P., Cheng, J., Karavanova, I. and Buonanno, A. (2001). Molecular dissection of DNA sequences and factors involved in slow muscle-specific transcription. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8490-503.

Casteel, D. E., Zhuang, S., Gudi, T., Tang, J., Vuica, M., Desiderio, S. and Pilz, R. B. (2002). cGMP-dependent protein kinase I physically and functionally interacts with the transcription regulator TFII-I. *J. Biol. Chem.* **277**, 32003–32014.

Cheriyath, V., Desgranges, Z.P. and Roy, A.L. (2002). *c-Src*-dependent transcriptional activation of TFII-I. *J. Biol. Chem.* **277**, 22798-22805.

Cheriyath, V. and Roy, A.L. (2000). Alternatively spliced isoforms of TFII-I: complex formation, nuclear translocation and differential gene regulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 26300-26308.

Cheriyath, V. and Roy, A.L. (2001). Structure-function analysis of TFII-I: roles of the N-terminal end, basic region, and I-repeats. *J. Biol. Chem.* **276**, 8377-8383.

Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2001). TGF- β signalling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* **29**, 117-129.

Desgranges, Z.P., Ahn, J., Lazebnik, M.B., Ashworth, T., Lee, C., Pestell, R.C., Rosenberg, N., Prives, C. and Roy, A.L. (2005). Inhibition of TFII-I-dependent cell cycle regulation by p53. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10940-52.

Durkin, M.E., Keck-Waggoner, C.L., Popescu, N.C. and Thorgeirsson, S.S. (2001). Integration of a *c-myc* transgene results in disruption of the mouse *Gtf2ird1* gene, the homologue of the human *GTF2IRD1* gene hemizygotously deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics* **73**, 20-27.

- Francke, U. 1999. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1947-1954.
- Franke, Y., Peoples, R.J. and Francke, U. (1999). Identification of GTF2IRD1, a putative transcription factor within the Williams-Beuren syndrome deletion at 7q11.23. *Cytogenet. Cell. Genet.* **86**, 296-304.
- Grueneberg, D.A., Henry, R.W., Brauer, A., Novina, C.D., Cheriyaath, V., Roy, A.L. and Gilman, M. (1997). A multifunctional DNA binding protein that promotes the formation of serum response factor/homeodomain complexes: identity of TFII-I. *Genes Dev.* **11**, 2482-2493.
- Hakimi, M.A., Dong, Y., Lane, W.S., Speicher, D.W. and Shiekhattar, R. (2003). A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 7234-7239.
- Hakre, S., Tussie-Luna, M.I., Ashworth, T., Novina, C.D., Settleman, J., Sharp, P.A. and Roy, A.L. (2006). Opposing functions of TFII-I spliced isoforms in growth factor induced gene expression. *Mol. Cell* **24**, 301-308.
- Kim, D.W. and Cochran, B.H. (2000). Extracellular signal-regulated kinase binds to TFII-I and regulates its activation of *c-fos* promoter. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1140-1148.

Kim, D.W. and Cochran, B.H. (2001). JAK2 activates TFII-I and regulates its interaction with extracellular signal-regulated kinase. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3387-3397.

Kim, D.W., Cheriya, V., Roy, A.L. and Cochran, B.H. (1998). TFII-I enhances activation of the *c-fos* promoter through interactions with upstream elements. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3310-3320.

Ku, M., Sokol, S.Y., Wu, J., Tussie-Luna, M.I., Roy, A.L. and Hata, A. (2005). Positive and negative regulation of the TGF β /activin target gene *gooseoid* by the TFII-I family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 7144-7157.

Laurent, M.N., Blitz, I.L., Hashimoto, C., Rothbacher, U. and Cho, K.W. (1997). The *Xenopus* homeobox gene *twin* mediates *Wnt* induction of *gooseoid* in establishment of Spemann's organizer. *Development* **124**, 4905-4916.

Montano, M.A., Kripke, K., Novina, C.D., Achacoso, P., Herzenberg, L.A., Roy, A.L. and Nolan, G.P. (1996). NF κ B homodimer binding within the HIV-1 initiator region and interactions with TFII-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12376-12381.

Morikawa, N., Clarke, T.R., Novina, C.D., Watanabe, K., Haqq, C., Weiss, M., Roy, A.L. and Donahoe, P.K. (2000). Human Müllerian-inhibiting substance promoter contains a functional TFII-I-binding initiator. *Biol. Reprod.* **63**, 1075-83.

Novina, C.D. and Roy, A.L. (1996). Core promoter mediated transcription. *Trends Genet.* **12**, 351-355.

Novina, C.D., Cheriyaath, V. and Roy, A.L. (1998). Regulation of TFII-I activity by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **273**, 33443-33448.

Novina, C.D., Kumar, S., Bajpai, U., Cheriyaath, V., Zhang, K., Pillai, S., Wortis, H.H. and Roy, A.L. (1999). Regulation of nuclear localization and transcriptional activity of TFII-I by Bruton's tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5014-5024.

O'Mahoney, J.V., Guven, K.L., Lin, J., Joya, J.E. and Robinson, C.S., Wade, R.P. and Hardeman, E.C. (1998). Identification of a novel slow-muscle-fiber enhancer binding protein, MusTRD1. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6641-6652.

Osborne, L.R., Campbell, T., Daradich, A., Scherer, S.W. and Tsui, L.C. (1999). Identification of a putative transcription factor gene (WBSCR11) that is commonly deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics* **57**, 279-284.

Parker, R., Phan, T., Baumeister, P., Roy, B., Cheriyaath, V., Roy, A.L. and Lee, A.S. (2001). Identification of TFII-I as the endoplasmic reticulum stress response element binding factor ERSF: its autoregulation by stress and interaction with ATF6. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3220-3233.

Pawson, T. and Nash, P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* **14**, 1027-1047.

Perez Jurado, L.A., Wang, Y.K., Peoples, R., Coloma, A., Cruces, J. and Franke, U. (1998). A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of Btk. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 325-334.

Rawlings, D.J., Saffran, D.C., Tsukada, S., Largaespada, D.A., Grimaldi, J.C., Cohen, L., Mohr, R.N., Bazan, J.F., Howard, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Witte, O.N. (1993). Mutation of the unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* **261**, 358-361.

Ring, C., Ogata, S., Meek, L., Song, J., Ohta, T., Miyazono, K. and Cho, K.W. (2002). The role of a Williams-Beuren syndrome-associated helix-loop-helix domain-containing transcription factor in activin/nodal signaling. *Genes Dev.* **16**, 820-835.

Roy, A.L. (2001). Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene* **274**, 1-13.

Roy, A.L. (2007). Signal-induced functions of the transcription factor TFII-I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1769**, 613-21.

Roy, A.L., Meisterernst, M., Pognonec, P. and Roeder, R.G. (1991). Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiator factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* **354**, 245-248.

Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T. and Roeder, R.G. (1993). An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature* **365**, 355-359.

Roy, A.L., Du, H., Gregor, P.D., Novina, C.D., Martinez, E. and Roeder, R.G. (1997). Cloning of an Inr- and E-box binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1. *EMBO J.* **16**, 7091-7104.

Sacristán, C., Tussíé-Luna, M.I., Logan, S.M. and Roy, A.L. (2004). Mechanism of Bruton's tyrosine kinase-mediated recruitment and regulation of TFII-I. *J. Biol. Chem.* **279**, 7147-7158.

Sears, R., Ohtani, K., and Nevins, J. R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5227–5235.

Souchelnytskyi, S. (2002). Transforming growth factor- β signaling and its role in cancer. *Exp. Oncol.* **24**, 3–12

Stasyk, T., Dubrovska, A., Lomnytska, M., Yakymovych, I., Wernstedt, C., Heldin, C.H., Hellman, U. and Souchelnytskyi, S. (2005). Phosphoproteome profiling of transforming growth factor (TGF)- β signaling: abrogation of TGF β 1-dependent phosphorylation of transcription factor-II-I (TFII-I) enhances cooperation of TFII-I and Smad3 in transcription. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4765-4780.

Tantin, D., Tussié-Luna, M.I., Roy, A.L. and Sharp, P.A. (2004). Regulation of immunoglobulin promoter activity by TFII-I class transcription factors. *J. Biol. Chem.* **279**, 5460-5469.

Tassabehji, M., Carette, M., Wilmot, C., Donnai, D., Read, A.P. and Metcalf, K. (1999). A transcription factor involved in skeletal muscle gene expression is deleted in patients with Williams syndrome. *Eur. J. Genet.* **7**, 737-747.

Tay, E.S., Guven, K.L., Subramaniam, N., Polly, P., Issa, L.L., Gunning, P.W. and Hardeman, E.C. (2003). Regulation of alternative splicing of Gtf2ird1 and its impact on slow muscle promoter activity. *Biochem. J.* **374**, 359-67.

Thomas, J.D., Sideras, P., Smith, C.I.E., Vorechovsky, I., Chapman, V. and Paul, W.E. (1993). Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* **261**, 355-358.

Tsukada, S., Saffran, D.C., Rawlings, D.J., Parolini, O., Allen, R.C., Klisak, I., Sparkers, R.S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quan, S., Belmont, J.W., Cooper, M.D., Conley, M.E. and Witte, O.N. (1993). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* **72**, 279-290.

Tussie-Luna, M.I., Bayarsaihan, D., Ruddle, F.H. and Roy, A.L. (2001). Repression of TFII-I -dependent transcription by nuclear exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7789-7794.

Tussie-Luna, M.I., Bayarsaihan, D., Seto, E., Ruddle, F.H. and Roy, A.L. (2002). Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family of proteins and PIAS α β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12807-12812.

Tussie-Luna, M.I., Michel, B., Hakre, S. and Roy, A.L. (2002). The SUMO ubiquitin-protein isopeptidase ligase family member Miz1/PIAS α β /Siz2 is a transcriptional cofactor for TFII-I. *J Biol Chem* **277**, 43185-43193.

Vetrie, D., Vorechovsky, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarstrom, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow, M., Smith, C.I. and Bentley, D.R. (1993). The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the *src* family of protein tyrosine kinases. *Nature* **361**, 226-233.

Vullhorst, D., Buonanno, A. (2003). Characterization of general transcription factor 3, a transcription factor involved in slow muscle-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 8370-8379.

Vullhorst, D., Buonanno, A. (2005). Multiple GTF2I-like repeats of general transcription factor 3 exhibit DNA binding properties. Evidence for a common origin as a sequence-specific DNA interaction module. *J. Biol. Chem.* **280**, 31722-31731.

Watanabe, T., Kim, S., Candia, A., Rothbacher, U., Hashimoto, C., Inoue, K. and Cho, K.W. (1995). Molecular mechanisms of Spemann's organizer formation: conserved growth factor synergy between *Xenopus* and mouse. *Genes Dev.* **9**, 3038-3050.

Wakefield, L. and Roberts, A. (2002). TGF- β signaling: positive and negative effect on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 22-29.

Wen, Y.D., Cress, W.D., Roy, A.L. and Seto, E. (2003). Histone deacetylase 3 binds to and regulates the multifunctional transcription factor TFII-I. *J. Biol. Chem.* **278**, 1841-7.

Yan, X., Zhao, X., Qian, M., Guo, N., Gong, X. and Zhu, X. (2000). Characterization and gene structure of a novel retinoblastoma-protein-associated protein similar to the transcription regulator TFII-I. *Biochem. J.* **345**, 749-757.

Yang, W. and Desiderio S. (1997). BAP-135, a target for Bruton's tyrosine kinase in response to B cell receptor engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**, 604-609.

Repression of TFII-I-dependent transcription by nuclear exclusion

María Isabel Tussí-Luna*, Dashzeveg Bayarsaihan†, Frank H. Ruddle†, and Ananda L. Roy**§¶

*Department of Pathology, †Programs in Immunology and Genetics, and ‡Department of Biochemistry, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, MA 02111; and †Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, Yale University, 266 Whitney Avenue, New Haven, CT 06520

Contributed by Frank H. Ruddle, May 4, 2001

TFII-I is an unusual transcription factor possessing both basal and signal-induced transcriptional functions. Here we report the characterization of a TFII-I-related factor (MusTRD1/BEN) that regulates transcriptional functions of TFII-I by controlling its nuclear residency. MusTRD1/BEN has five or six direct repeats, each containing helix-loop-helix motifs, and, thus, belongs to the TFII-I family of transcription factors. TFII-I and MusTRD1/BEN, when expressed individually, show predominant nuclear localization. However, when the two proteins are coexpressed ectopically, MusTRD1/BEN locates almost exclusively to the nucleus, whereas TFII-I is largely excluded from the nucleus, resulting in a loss of TFII-I-dependent transcriptional activation of the *c-fos* promoter. Mutation of a consensus nuclear localization signal in MusTRD1/BEN results in a reversal of nuclear residency of the two proteins and a concomitant gain of *c-fos* promoter activity. These data suggest a means of transcriptional repression by competition at the level of nuclear occupancy.

transcription factor | nuclear translocation | transcriptional repression

In recent years it has become increasingly clear that the regulation of nuclear entry or exit of transcription factors provides an important control point for the expression of target genes, because these factors must be transported from the cytoplasm, where they are synthesized, to the nucleus, where they function. For example, sequestration of transcription factors in the cytoplasm in a latent but inducible form has been shown to be a significant point of control of gene expression in a variety of systems ranging from yeast to flies to mammals (1). Different mechanisms have been proposed to bring about such a regulation (1–5). One common theme among all of these mechanisms is that a reversible protein modification allows alteration of the nucleocytoplasmic shuttling pathway in response to an extracellular signal (6, 7). Here we show the regulation of the nuclear entry of a transcription factor, TFII-I, by a mechanism that appears to be independent of reversible protein modifications.

TFII-I is a ubiquitously expressed transcription factor that appears to have broad biological functions and may be involved in Williams–Beuren syndrome and X-linked agammaglobulinemia (8, 9). Based on its unique interactions at both the Inr element (10–12) and upstream regulatory sites (11, 13–15), TFII-I is postulated to be a transcriptional cofactor that integrates signals from the regulatory components to the basal machinery (11). In B cells, a significant fraction of cytoplasmic TFII-I is associated constitutively with Bruton's tyrosine kinase (16, 9). Upon Ig receptor crosslinking, TFII-I is released from Bruton's tyrosine kinase to enter the nucleus (9), suggesting that its transcriptional activity could be regulated through the alteration of its subcellular localization. Here we describe a repressor (MusTRD1/BEN) that appears to specifically regulate the nucleocytoplasmic shuttling of TFII-I. Nuclear exclusion of TFII-I results in a repression of its target reporter gene, and such repression can be alleviated when MusTRD1/BEN is retained in the cytoplasm through targeted mutation.

The existence of a TFII-I-related protein was reported by several groups as a gene located within a 1.4- to 1.6-Mb heterozygous deletion of chromosomal subband 7q11.23 that results in Williams–Beuren syndrome and was called WBSR11 (17), GTF2IRD1 (18), or GTF3 (19). BEN (binding factor for early enhancer) was isolated as a transcription factor that binds to early enhancer of the *Hoxc8* gene (20). The ORF of BEN encodes a protein of 1,072 aa and contains six helix-loop-helix (HLH) domains, a hydrophobic leucine zipper-like motif, and a serine stretch. The murine BEN gene is structurally similar to the human gene TFII-I and appears to be an alternative splice isoform of the human WBSR11/GTF2IRD1 (20). The gene product also has been reported as a retinoblastoma-associated nuclear protein (CREAM-1) with potential transcriptional activator functions (21). O'Mahoney and colleagues (22) reported it as a troponin I enhancer binding protein, muscle TFII-I repeat domain-containing protein 1 (MusTRD1). However, the predicted MusTRD1 protein was 458 aa long, whereas WBSR11, GTF2IRD1, GTF3, and CREAM-1 were either 944 or 959 aa long, and their corresponding protein products all were ubiquitously expressed. The difference in size is due to alternative splicing (18). Subsequent sequence analysis of MusTRD1 cDNA (22) and ectopic expression of its protein product by us suggested a 120-kDa protein with 944 aa containing five repeats. Thus, MusTRD1/GTF3 is the human ortholog of the corresponding mouse BEN/GTF2IRD1. Henceforth we call this protein MusTRD1/BEN.

Materials and Methods

Cell Culture. COS7 and HeLa cell lines were grown in DMEM (GIBCO/BRL) containing 10% FBS (GIBCO/BRL), 50 units/ml of penicillin, and 50 μ g/ml of streptomycin (GIBCO/BRL).

Constructs. To make pEBG-MusTRD1/BEN containing a C-terminal polyhis tag, a full-length MusTRD1 cDNA was PCR-amplified from pGEM-7Zf(+)-EH67 (kindly provided by Edna Hardeman, Children's Medical Research Institute, Wentworthville, Australia), with the use of oligonucleotides 1 and 2 shown in Table 1. The product was inserted into a pEBG vector as a *ClaI*–*NotI* fragment. For pEBB-GFP-MusTRD1/BEN, the full-length MusTRD1 cDNA was PCR-amplified with the use of oligonucleotides 1 and 3 and inserted as a *ClaI*–*NotI* fragment into a pEBB vector. The green fluorescent protein (GFP) was PCR-amplified from pEGFP-N1 (CLONTECH) with the use of the primers 4 and 5 (Table 1) and inserted in-frame into

Abbreviations: MusTRD1, muscle TFII-I repeat domain-containing protein 1; GFP, green fluorescent protein; HLH, helix-loop-helix; NLS, nuclear localization signal; GST, glutathione S-transferase.

¶To whom reprint requests should be sent at: § address. E-mail: ananda.roy@tufts.edu.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Table 1. Oligonucleotides used to generate plasmids

Expression vector	Restriction site	Nucleotide sequence
pEBG-MusTRD1	<i>ClaI</i>	(1) 5'-CCATCGATGGAATGGCCTTGCTGGGTAAG-3'
	<i>NotI</i>	(2) 5'-ATAGTTTAGCGGCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTAATTAAGAGGTCCCGGGAG-3'
pEBB-MusTRD1	<i>ClaI</i>	(1) 5'-CCATCGATGGAATGGCCTTGCTGGGTAAG-3'
	<i>NotI</i>	(3) 5'-ATAAGAATGCGGCCCTGTAATTAAGAGGTCCCGGGAG-3'
pEBB-GFP-MusTRD1	<i>SpeI</i>	(4) 5'-GGACTAGTCCATGGTGGAGCAAGGGCGAG-3'
	<i>ClaI</i>	(5) 5'-CCATCGATCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
pEBG-MusTRD1-ΔNLS3 and pEBB-GFP-MusTRD1-ΔNLS3	<i>BsiWI</i>	(6) 5'-CCAACACGTACGACATCCAC-3'
	ΔNLS3 UP	(7) 5'-TCCTTCCGAGACAATGCTGCTGTC-3'
	ΔNLS3 LP	(8) 5'-GACAGCAGCATTGTCTCGGAAGGA-3'
	<i>XmaI</i>	(9) 5'-AGAGGTCCCGGGAGCTGC-3'
pEBG-MusTRD1-Δss and pEBB-GFP-MusTRD1-Δss	<i>BsiWI</i>	(6) 5'-CCAACACGTACGACATCCAC-3'
	Δss UP	(10) 5'-CTGAATCTGGGTTGACGGAATTTCC-3'
	Δss LP	(11) 5'-GGAAATTCCTCAACCCAGATTCAGTG-3'
	<i>XmaI</i>	(9) 5'-AGAGGTCCCGGGAGCTGC-3'

pEBB-MusTRD1/BEN as a *SpeI*-*ClaI* fragment at the N terminus. In MusTRD1/BEN ΔNLS3, the region between amino acids 883 to 889 was deleted by double-round PCR mutagenesis with the use of primers 6–9 (Table 1). In MusTRD1/BEN Δss, the region between amino acids 897 and 908 was deleted with the use of primers 6 and 9–11 (Table 1). Both PCR products were inserted into pEBG-MusTRD1/BEN or pEBB-GFP-MusTRD1/BEN as *XbaI*-*BsiWI* fragments.

Transient Transfection and Luciferase Assays. Transfections were performed with Lipofectamine (GIBCO/BRL). Ten micrograms of pEBG-II-I and 12 μg of any of the pEBG-MusTRD1/BEN constructs were used per 100-mm-diameter plate. For the *c-fos* luciferase assays, pSVOAΔ5' containing a murine *c-fos* promoter (15) (600 ng) and pRL-TK (35 ng) were transfected either alone or with pEBG-MusTRD1/BEN or ΔNLS3 (1,000 ng) and pEBG-TFII-I (800–3,200 ng) (12). Before harvesting, cells were serum-starved for 12 h and stimulated with 25 ng/ml of recombinant human epidermal growth factor (Sigma) for 4 h. To test for GAL4 transcriptional activity, a GAL4 reporter, pFR-Luc (Stratagene) (200 ng), and pRL-TK (35 ng) were transfected alone or with the GAL4 expression vector pMA242 (200 ng) (24) and/or pEBG-MusTRD1/BEN (500 ng). To test for USF1 activity, a vector containing four tandem E-boxes from the secretin promoter pT81-[Ebox]₄-Luc (25) (400 ng) and pRL-TK (35 ng) were transfected either alone or with the USF1 expression vector pCX-USF1 (26) (400–800 ng) and/or pEBG-MusTRD1/BEN (1,000 ng). To assay for Sp1 activity, pGL3-promoter (Promega) (40 ng) and pRL-TK (35 ng) were transfected alone or with the Sp1 expression vector pPac-Sp1 (kind gift from Robert Tjian, Univ. of California, Berkeley) (400–800 ng) and pEBG-MusTRD1/BEN (1,000 ng). Total transfected DNA was kept constant by empty vectors pEBB or pEBG. Luciferase activity was assessed with a Dual Luciferase Kit (Promega). Experiments were done at least three times, with triplicate sets included each time.

Protein Analysis. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared as described (27). Identical amounts of protein from each sample were subjected to SDS/PAGE and immunoblotting. The mouse monoclonal anti-glutathione *S*-transferase (GST-2; Sigma) antibody was used at 1:4,000 dilution. Both rabbit anti-TFII-I and sheep anti-MusTRD1/BEN (a kind gift from Edna Hardeman)

antibodies were used at 1:2,500 dilution. Detection was done by enhanced chemiluminescence (NEN) with standard methods.

Immunostaining. COS7 cells were transfected with 200 ng of tagless TFII-I (V. Cheriya and A.L.R., unpublished observations) in the absence or in the presence of 200 ng of GFP-tagged MusTRD1/BEN constructs. Forty hours after transfection, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min, and blocked with 10% FBS in PBS for 1 h. Nontransfected HeLa cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 60 min. Cells were incubated with primary antibody [rabbit anti-TFII-I, 1:6,000; affinity-purified rabbit anti-BEN, 1:200; mouse monoclonal anti-GAL4-TA (C10; Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-USF1 (a kind gift from Robert Roeder, Rockefeller Univ., New York), 1:1,000; rabbit anti-Sp1 (sc-59; Santa Cruz Biotechnology), 1:10,000] for 2 h, washed three times with PBS-T (PBS/0.1% Triton X-100) followed by Alexa 594 goat anti-rabbit or goat anti-mouse IgG (H + L) (Molecular Probes) (1:20,000), washed three times with PBS-T, and mounted in 4',6-diamidino-2-phenylindole-mounting buffer (50% glycerol/5 μg 4',6-diamidino-2-phenylindole/ml in PBS). Preparations were visualized by fluorescence and confocal microscopy as described (9).

Results

Structural Features and Localization of MusTRD1/BEN. Fig. 1A shows the relationship of the six repeats of TFII-I to the repeats of MusTRD1/BEN and its family members. Note that each repeat in TFII-I (and, by inference, in MusTRD1/BEN) contains a putative HLH domain (11). The PROSITE search (28) revealed an additional Myc-type HLH motif between amino acids 458 and 466 and a stretch of 12 serines between positions 897 and 908 in MusTRD1/BEN. Finally, a PSORT search (29) predicted three conserved nuclear localization signals (NLS) (30) at positions 407–413 (NLS1), 715–721 (NLS2), and 883–889 (NLS3). The serine stretch adjacent to NLS3 is perhaps the most interesting feature in MusTRD1/BEN. Similar serine stretches are also present in transcriptional activators such as ICP4, IE180, IE62, Nopp140, PC4, Sox-4, and Sp4 (31–37); nuclear shuttling proteins such as Nopp 140 (38); and transcriptional repressors belonging to the polycomb group of proteins, such as Pc1 and cramped (39, 40). Ectopic expression and subsequent Western blot analysis of TFII-I and MusTRD1/BEN revealed that whereas TFII-I is distributed between cytoplasm (37%) and

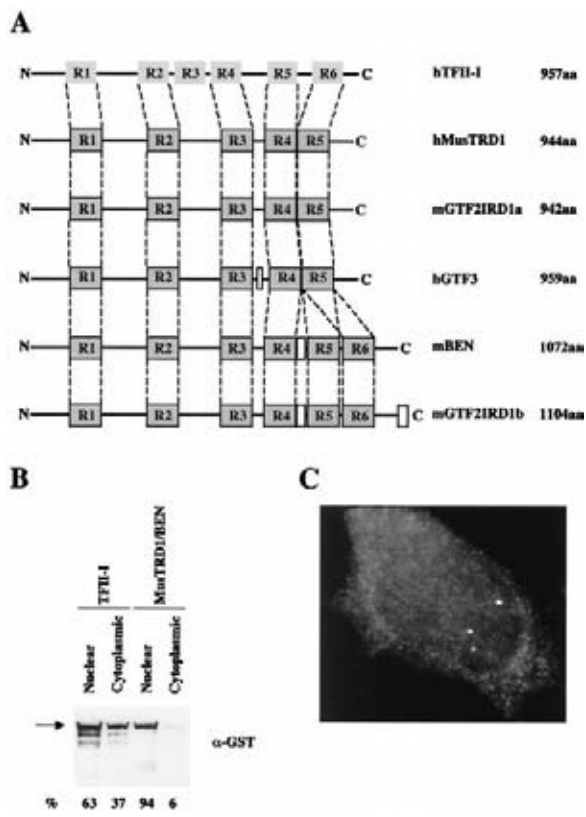


Fig. 1. Structural features of MusTRD1/BEN. (A) The relative localization of the six repeat domains in human TFII-I (hTFII-I, 957 aa) and the five or six repeat domains in MusTRD1/BEN (hMusTRD1, 944aa) and its isoforms (mGTF2IRD1a, 942 aa; hGTF3, 959 aa; mBEN, 1,072 aa; mGTF2IRD1b, 1,104 aa) is indicated. Although there is only 30–32% identity with TFII-I throughout the entire protein, the total homology among the repeats is 39%. (B) Ectopically expressed GST-TFII-I or GST-MusTRD1/BEN in COS7 cells was visualized by anti-GST antibody. The percentage subcellular distribution of each protein is indicated at the bottom. (C) Endogenous nuclear expression of MusTRD1/BEN in HeLa cells was visualized with the use of an affinity-purified rabbit polyclonal anti-BEN antibody.

nucleus (63%), MusTRD1/BEN is almost exclusively nuclear (94%) (Fig. 1B). Accordingly, fluorescent microscopy of endogenous MusTRD1/BEN in HeLa cells shows specific staining only in the nucleus (Fig. 1C).

Transcriptional Function of MUsTRD1/BEN: Changes in Subcellular Localization of TFII-I by MUsTRD1/BEN. We next tested the transcriptional function(s) of MusTRD1/BEN on the *c-fos* promoter, the activity of which is up-regulated by TFII-I both in the absence and in the presence of epidermal growth factor (15). In contrast to TFII-I, which stimulates the *c-fos* promoter both in the absence (Fig. 2A, compare lanes 1 and 3) and in the presence (Fig. 2A, compare lanes 2 and 4) of epidermal growth factor, MusTRD1/BEN represses the *c-fos* promoter both in the absence (Fig. 2A, compare lanes 1 and 5) and in the presence (Fig. 2A, compare lanes 2 and 6) of epidermal growth factor. Most notably, MusTRD1/BEN represses even in the presence of TFII-I (Fig. 2A, compare lanes 3 and 4 with 7 and 8). The ectopic expression of these proteins was tested by Western blot to confirm that the differences in activity were not due to significant differences in their expression patterns (Fig. 2B). Although there appears to be a slight drop in the expression of both proteins when coexpressed, this drop is not seen consistently (see Fig. 3B).

The lack of any significant physical association between the

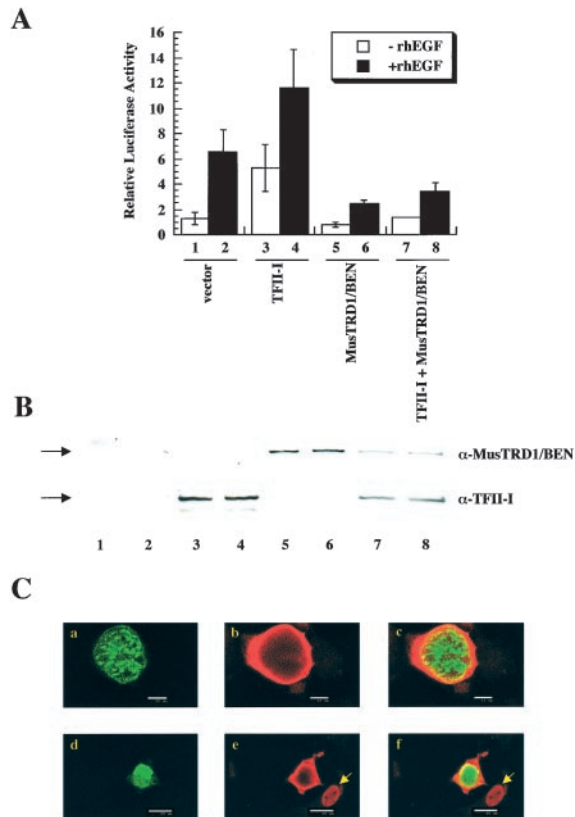


Fig. 2. MusTRD1/BEN represses TFII-I transcriptional activity and promotes TFII-I nuclear exclusion. (A) *c-fos*-luciferase activity of TFII-I and/or MusTRD1/BEN in the presence (filled columns) or in the absence (empty columns) of 25 ng/ml of recombinant human epidermal growth factor. Lanes 1 and 2, empty vector; 3 and 4, TFII-I; 5 and 6, MusTRD1/BEN; 7 and 8, TFII-I + MusTRD1/BEN. (B) Cell extracts from A were Western blotted with an anti-MusTRD1/BEN (α -MusTRD1/BEN) antibody and then stripped and reprobed with anti-TFII-I antibody (α -TFII-I). (C) Confocal microscopic analysis of cotransfected GFP-MusTRD1/BEN and GST-TFII-I COS7 cells. Cells were stained with anti-TFII-I antibody and a secondary antibody coupled to Alexa 594. Duplicate experiments (either *a–c* or *d–f*) are shown. *a* and *d* show GFP-MusTRD1/BEN (green); *b* and *e* show TFII-I (red); and *c* and *f* are the superimposition of *a* and *b* (*c*) or *d* and *e* (*f*), and colocalization is in yellow (*a–c*, scale bar = 10 μ m; *d–f*, scale bar = 25 μ m). Nuclear localization of an ectopic TFII-I (but not ectopic MusTRD1/BEN)-expressing cell is shown by an arrow.

two proteins by GST pull-down and its lack of specific DNA binding to TFII-I recognition elements (data not shown) led us to postulate that MusTRD1/BEN indirectly causes changes in subcellular distribution of TFII-I that might contribute to its repressive function. Immunohistochemical analysis of GFP-MusTRD1/BEN coexpressed with GST-TFII-I in COS7 cells and monitored by confocal microscopy revealed a dramatic redistribution of TFII-I (Fig. 2C, shown in red, *b* and *e*) in the presence of MusTRD1/BEN (Fig. 2C, green, *a* and *d*). Whereas MusTRD1/BEN exhibited a predominant nuclear staining, TFII-I was largely excluded from the nucleus in the presence of MusTRD1/BEN. A very small proportion of the two proteins showed colocalization (Fig. 2C, seen as yellow, *c* and *f*). TFII-I showed a predominant nuclear staining in the absence of MusTRD1/BEN (e.g., see Fig. 2C *e* and *f*, arrowhead). Upon careful analysis from several experiments, we found two major patterns of TFII-I redistribution in the presence of MusTRD1/BEN: a uniform nuclear pattern and a partial nuclear plus perinuclear ring-like pattern (Table 2). Interestingly, although there is a 50% reduction in nuclear TFII-I in the

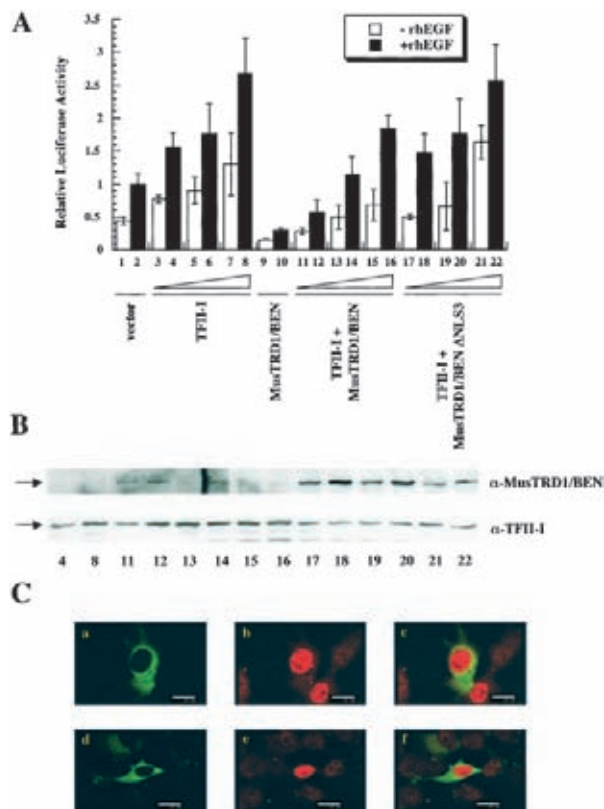


Fig. 3. MusTRD1/BEN Δ NLS3 remains at the cytoplasm and induces neither nuclear exclusion nor transcriptional repression of TFII-I. (A) *c-fos*-luciferase activity of wild type or Δ NLS3 MusTRD1/BEN in the presence or in the absence of TFII-I and either in the presence (filled columns) or in the absence (empty columns) of 25 ng/ml of recombinant human epidermal growth factor. Lanes 1 and 2, empty vector; 3–8, increasing concentrations of TFII-I; 9 and 10, MusTRD1/BEN, 1,000 ng; 11–16, MusTRD1/BEN, 1,000 ng + increasing concentrations of TFII-I; 17–22, MusTRD1/BEN Δ NLS3, 1,000 ng + increasing concentrations of TFII-I: (3, 4, 11, 12, 17, and 18, 800 ng; 5, 6, 13, 14, 19, and 20, 1,600 ng; 7, 8, 15, 16, 21, and 22, 3,200 ng). (B) Cell extracts from indicated lanes in A were Western blotted with an anti-MusTRD1/BEN (α -MusTRD1/BEN) antibody and then stripped and reprobed with anti-TFII-I antibody (α -TFII-I). (C) Confocal images of coexpressed GFP-MusTRD1/BEN Δ NLS3 and GST-TFII-I. Cells were stained as in Fig. 2B. Duplicate images (either a–c or d–f) are shown. a and d show the distribution of GFP-MusTRD1/BEN Δ NLS3 (green); b and e show TFII-I (red); c and f show a superimposition of images a and b (c) or d and e (f). (Scale bar = 25 μ m.)

presence of ectopic MusTRD1/BEN, the ring-like distribution of TFII-I is also seen in some cells, even in the absence of MusTRD1/BEN, albeit with much less frequency. Whether this distribution pattern is due to the endogenous expression of MusTRD1/BEN in COS cells remains to be determined.

Table 2. Subcellular distribution of TFII-I in cells expressing nuclear MusTRD1/BEN

Condition	Uniform nuclear		Nuclear + perinuclear ring	
	Average, %	SD, %	Average, %	SD, %
TFII-I (tagless)				
+ pEBB vector	62.8	5.9	37.1	5.9
TFII-I (tagless)				
+ GFP-MusTRD1/BEN	30.2	2.9	59.3	5.5
TFII-I (tagless)				
+ GFP-MusTRD1/BEN Δ ss	52.8	6	38.9	6.4

To test the hypothesis that the presence of MusTRD1/BEN in the nucleus is required for the impediment of nuclear residency of TFII-I, we mutated the NLS3 in MusTRD1/BEN. The transcriptional function was tested by coexpression of TFII-I with either this mutant or wild-type MusTRD1/BEN (Fig. 3A). Whereas TFII-I activated the *c-fos* promoter in a dose-dependent manner (Fig. 3A, lanes 3–8), the wild-type MusTRD1/BEN repressed even at the highest amount of TFII-I (Fig. 3A, lanes 11–16). Consistent with our hypothesis, MusTRD1/BEN Δ NLS3 did not significantly repress the *c-fos* activity at any concentrations of TFII-I (Fig. 3A, lanes 17–22) and is primarily localized in the cytoplasm (Fig. 3C, a and d). More importantly, cotransfected TFII-I (Fig. 2D, b and e) is primarily localized in the nucleus, and the levels are similar to the control levels (i.e., in the absence of MusTRD1/BEN; Fig. 3B).

Repression by MUSTRD1/BEN Is Specific for TFII-I. Next we tested the specificity of repression by MusTRD1/BEN by fluorescence microscopy. In transient transfection assays, MusTRD1/BEN failed to repress a GAL4-dependent promoter (compare lane 2 with lane 4, Fig. 4A Left) (12). Moreover, MusTRD1/BEN (green) does not inhibit nuclear localization of GAL4 (red), and, thus, the two proteins completely colocalize (yellow) in the nucleus (blue) (Fig. 4A Right). Likewise, neither the transcriptional activation (Fig. 4B Left) nor the subcellular distribution of Sp1 (Fig. 4B Right) was affected by MusTRD1/BEN. Given that both TFII-I and MusTRD1/BEN exhibit multiple HLH motifs, we tested another HLH activator, USF1 (26), to ensure that the repression is specific for TFII-I and not for HLH proteins in general. This reporter was slightly repressed (20–30%) (Fig. 4C Left), although in localization studies USF1 and MusTRD1/BEN showed complete nuclear colocalization (Fig. 4C Right). Because TFII-I can be a coactivator of USF1 and functions via an E-box *in vivo* (10, 11), the repression may be due partly to the nuclear exclusion of endogenous TFII-I by MusTRD1/BEN.

MUSTRD1/BEN: A Bimodal Repressor. To test whether the serine stretch in MusTRD1/BEN provides its preferential nuclear residency over TFII-I, we deleted the serine stretch (Δ ss), coexpressed it with TFII-I, and analyzed both transcriptional function, and colocalization potentials of the mutant protein. However, contrary to our expectations, we found that the Δ ss mutant still behaved as a repressor of TFII-I-dependent transcription (Fig. 5A). Although the Δ ss still behaved as a repressor, it could not prevent the nuclear localization of TFII-I (Fig. 5B, compare a and d with b and e), and the two proteins colocalized in the nucleus (Fig. 5B c and f). Taken together, these data suggest a bimodal repressive action of MusTRD1/BEN in which it prevents the proper nuclear residency of TFII-I and inhibits the transcriptional activation of nuclear TFII-I (Fig. 5).

To get a quantitative idea of the nuclear residency of TFII-I in the presence of MusTRD1/BEN and its mutants, we analyzed immunostained cotransfected COS7 cells by fluorescence microscopy (Table 2). Whereas in the absence of MusTRD1/BEN, uniform nuclear TFII-I distribution was observed in 62.8% of the cells, in the presence of MusTRD1/BEN it was observed in 30.2% (in each case a total of 100 cells were counted). Moreover, there was an increase from 37.1% to 59.3% in the number of cells that showed a distribution pattern of TFII-I with both nuclear and cytoplasmic staining. In contrast, 52.8% of TFII-I plus MusTRD1/BEN Δ ss cotransfected cells showed uniform nuclear staining that was comparable to 62.8% of control cells transfected with only TFII-I (see Table 2). Moreover, TFII-I and MusTRD1/BEN Δ ss cotransfected cells no longer showed increased nuclear plus perinuclear distribution of TFII-I (38.9%) when compared with the TFII-I only transfected cells (37.1%).

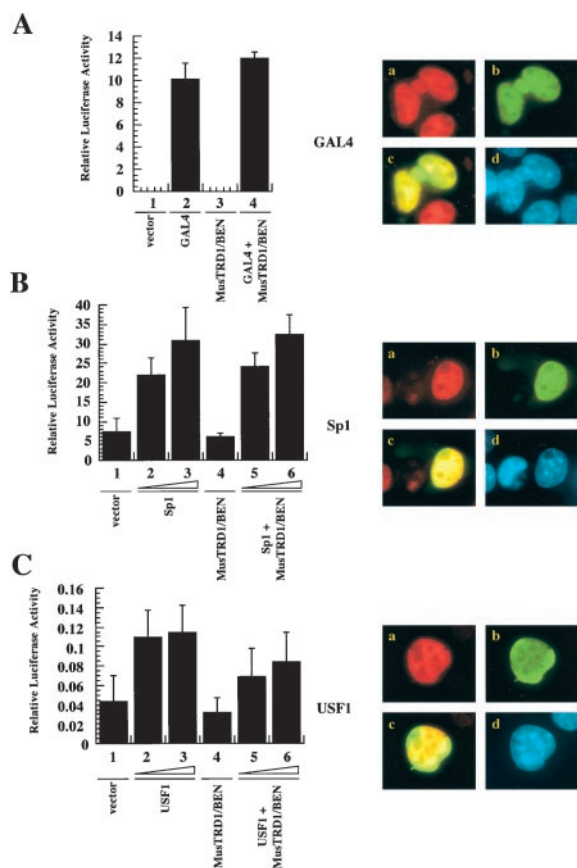


Fig. 4. MusTRD1/BEN repressive effects are specific for TFII-I. (A) Transcriptional activity of a GAL4-responsive reporter in the absence (lanes 1 and 3) or in the presence (lanes 2 and 4) of 200 ng of GAL4 and 500 ng of MusTRD1/BEN (lanes 3 and 4). (Right) Fluorescent microscope images of cotransfected GAL4 (red, a) and GFP-MusTRD1/BEN (green, b). Nuclear overlap of GAL4 and MusTRD1/BEN is seen in yellow (c), and the nucleus is seen by 4',6-diamidino-2-phenylindole staining in blue (d). (B) Transcriptional activity of the pGL3 promoter either in the absence (lanes 1 and 4) or in the presence of 400 ng (lanes 2 and 5) or 800 ng (lanes 3 and 6) of Sp1 and Sp1 + 1,000 ng of MusTRD1/BEN (lanes 5 and 6). (Right) Images of cotransfected Sp1 (red, a) and GFP-MusTRD1/BEN (green, b). Nuclear overlap of Sp1 and MusTRD1/BEN is seen in yellow (c), and the nucleus is in blue (d). (C) As in B, but with the pT81-[E-box]₄-luciferase reporter construct and USF1 as the transcriptional activator.

Discussion

The precise regulation of the differentiation and developmental program requires not only that genes be turned on, but also that they be turned off. In fact, the founding principles of transcriptional regulation by Jacob and Monod came from studies of repression in *Escherichia coli* (41). Given the complexity of the eukaryotic organism and its precise coordination of gene expression programs, it is not surprising that there are several general pathways of gene repression. The repressor can exert its effects via (i) competition with an activator for DNA binding; (ii) competition with an activator for a cofactor required for activation; (iii) direct interaction with an activator, thereby masking its activation domain; or (iv) remodeling of the chromatin such that the accessibility for the activator is blocked (reviewed in ref. 42). Apart from these competitive mechanisms occurring in the nucleus, a repressor can sequester an inducible activator in the cytoplasm, as exemplified by κ B (23). Here we report a potentially novel mechanism of gene repression in which the repressor selectively occupies the nucleus at the expense of the activator, resulting in a nuclear exclusion of the activator.

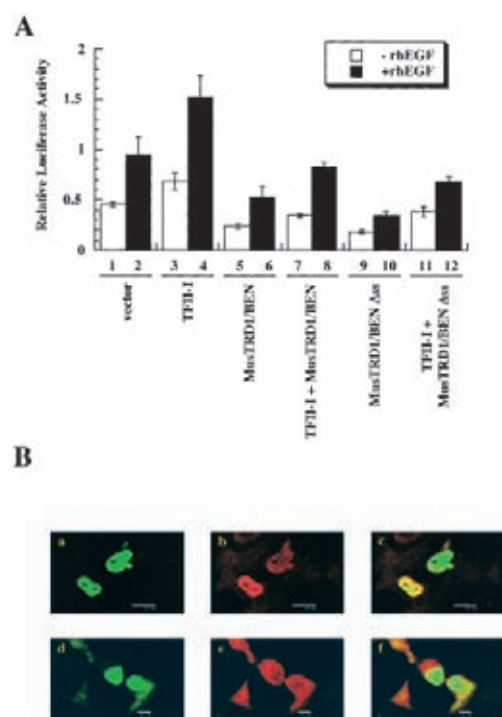


Fig. 5. Inhibition of TFII-I basal and epidermal growth factor-stimulated *c-fos* promoter activation by MusTRD1/BEN wild type and MusTRD1/BEN Δss. (A) *c-fos*-luciferase activity with either wild type or Δss MusTRD1/BEN (1,000 ng) in the absence (empty columns) or in the presence (filled columns) of 25 ng/ml recombinant human epidermal growth factor and TFII-I (800 ng). Lanes 1 and 2, empty vector; 3 and 4, TFII-I; 5 and 6, MusTRD1/BEN; 7 and 8, TFII-I + MusTRD1/BEN; 9 and 10, MusTRD1/BEN Δss; 11 and 12, TFII-I + MusTRD1/BEN Δss. (B) Cells were stained as in Fig. 2B and were visualized by confocal microscopy. Duplicate images are shown. (a and d) GFP-MusTRD1/BEN Δss (green). (b and e) TFII-I localization (red). (c and f) Superimposition of either a and b (c) or d and e (f). Colocalization is seen in yellow. (These images were taken with the same $\times 60$ objective, but the scale bar = 25 μ m in a-c and 10 μ m in d-f.)

Although the precise mechanism is not yet known, our data suggest a competition with a nuclear shuttling component (Fig. 6). We propose a dual mechanism for MusTRD1/BEN-mediated inhibition. First, MusTRD1/BEN outcompetes TFII-I for a “dedicated” nucleocytoplasmic shuttling component A, resulting in nuclear exclusion of TFII-I. However, given that the endogenous TFII-I is generally higher than MusTRD1/BEN, this step may not quantitatively exclude nuclear TFII-I. Thus, in a second step, nuclear MusTRD1/BEN competes with nuclear TFII-I for a necessary and specific transcriptional cofactor, B. The dual repression mechanism might ensure a complete inhibition of TFII-I-dependent gene activation. However, we cannot formally exclude the possibility that MusTRD1/BEN accelerates the nuclear export of TFII-I. Moreover, we emphasize that although, under our assay conditions, ectopic MusTRD1/BEN behaves as a repressor for TFII-I function, it might respond differently in the context of TFII-I unresponsive genes and could even behave as an activator in other promoters and/or cell types. Thus, it is likely that MusTRD1/BEN could specifically bind to a DNA sequence that is not recognized by TFII-I. TFII-I and MusTRD1/BEN also exhibit quite distinct phosphorylation patterns, raising the possibility that they are activated by different signaling pathways (data not shown). Given that MusTRD1/BEN represses TFII-I transcriptional activity, it is not surprising that MusTRD1/BEN naturally exists in low amounts inside the cell (Fig. 1C) (19). In preliminary experiments, it also appears that BEN behaves as a repressor for *Hoxc8*

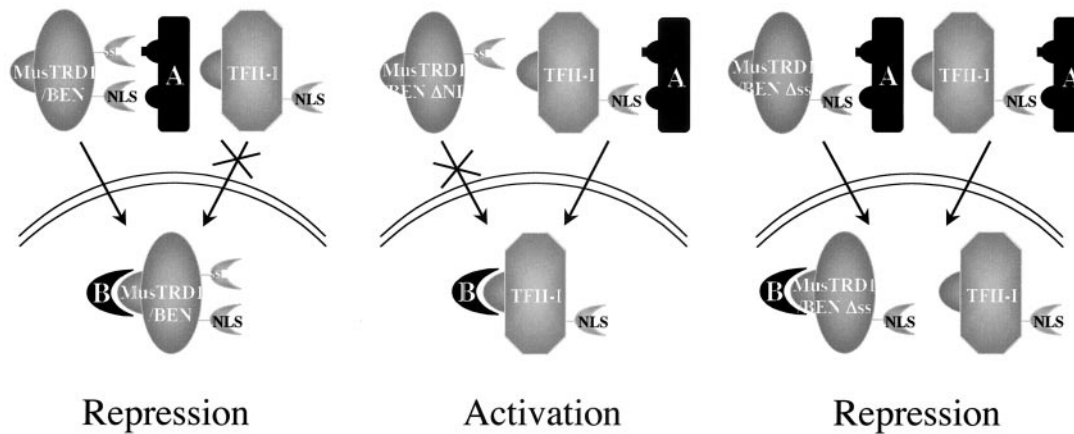


Fig. 6. Model for MusTRD1/BEN-mediated repression. The interactions of factor A with both MusTRD1/BEN and TFII-I are through NLS. Only MusTRD1/BEN has a weak secondary interaction through the serine stretch (ss), giving it an advantage over TFII-I (Left). In Δ NLS3 MusTRD1/BEN, component A can only bind to and facilitate TFII-I nuclear entry, allowing activation of target genes (Middle). When the serine stretch in MusTRD1/BEN is deleted, factor A can bind equally well to MusTRD1/BEN and TFII-I, resulting in nuclear colocalization of both proteins. Nuclear MusTRD1/BEN now competes with nuclear TFII-I for a transcriptional cofactor B, ensuring repression of TFII-I target genes (Right).

gene expression (D.B. and F.H.R., unpublished observations). Thus, we believe that there may be circumstances where MusTRD1/BEN would need to be up-regulated (even if only transiently) through a different signaling pathway or in a cell-specific fashion. Although we have not yet found any physiological signal that would cause an up-regulation of MusTRD1/BEN or a system where the constitutive levels of MusTRD1/BEN are naturally high, our ectopic expression system suggests that elevating the concentration of the repressor might be a potent means of regulating TFII-I transcriptional activity. Hence, the

levels of MusTRD1/BEN expression could set the threshold of TFII-I activity. These questions have yet to be addressed.

We thank Peter Brodeur, Edouard Vannier, Michelle Benson, and Claire Moore for critical reading of the manuscript and Dean Dawson for use of the fluorescent microscope. We are indebted to Robert Roeder, Robert Tjian, Andrew Leiter, and especially Edna Hardeman for generously sharing antibodies and plasmids. We are grateful to Venu Cheriya for his input. This work is supported in part by Grant AI45150 from the National Institutes of Health to A.L.R.

- Vandromme, M., Gauthier-Rouviere, C., Lamb, N. & Fernandez, A. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 59–64.
- Nigg, E. A. (1997) *Nature (London)* **386**, 779–787.
- Mattaj, J. W. & Englmeier, L. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265–306.
- Hood, J. K. & Silver, P. A. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 241–247.
- Kaffman, A. & O’Shea, E. K. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 291–339.
- Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H. & Nasmyth, K. (1991) *Cell* **66**, 743–758.
- Ducret, C., Maira, S. M., Deirich, A. & Wasylyk, B. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7076–7087.
- Pérez-Jurado, L. A., Wang, Y. K., Peoples, R., Coloma, A., Cruces, J. & Francke, U. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 325–334.
- Novina, C. D., Kumar, S., Bajpai, U., Cheriya, V., Zhang, K., Pillai, S., Wortis, H. H. & Roy, A. L. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5014–5024.
- Roy, A. L., Meisterernst, M., Pognonec, P. & Roeder, R. G. (1991) *Nature (London)* **354**, 245–248.
- Roy, A. L., Du, H., Gregor, P. D., Novina, C. D., Martinez, E. & Roeder, R. G. (1997) *EMBO J.* **16**, 7091–7104.
- Cheriya, V., Novina, C. D. & Roy, A. L. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4444–4454.
- Grueneberg, D. A., Henry, R. W., Brauer, A., Novina, C. D., Cheriya, V., Roy, A. L. & Gilman, M. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2482–2493.
- Kim, D. W., Cheriya, V., Roy, A. L. & Cochran, B. H. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3310–3320.
- Cheriya, V. & Roy, A. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 26300–26308.
- Yang, W. & S. Desiderio (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 604–609.
- Osborne, L. R., Campbell, T., Daradich, A., Scherer, S. W. & Tsui, L. C. (1999) *Genomics* **57**, 279–284.
- Franke, Y., Peoples, R. J. & Francke, U. (1999) *Cytogenet. Cell Genet.* **86**, 296–304.
- Tassabehji, M., Carette, M., Wilmot, C., Donnai, D., Read, A. P. & Metcalfe, K. (1999) *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 737–747.
- Bayarsaihan, D. & Ruddle, F. H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7342–7347.
- Yan, X., Zhao, X., Qian, M., Guo, N., Gong, X. & Zhu, X. (2000) *Biochem. J.* **345**, 749–757.
- O’Mahoney, J. V., Guven, K. L., Lin, J., Joya, J. E., Robinson, C. S., Wade, R. P. & Hardeman, E. C. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6641–6652, and erratum (2000) **20**, 5361.
- Baldwin, A. S. (1996) *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649–683.
- Ma, J. & Ptashne, M. (1987) *Cell* **48**, 847–853.
- Mutoh, H., Fung, B. P., Naya, F. J., Tsai, M., Nishitani, J. & Leiter, A. B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3560–3564.
- Du, H., Roy, A. L. & Roeder, R. G. (1993) *EMBO J.* **12**, 501–511.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475–1489.
- Ogiwara, A., Uchiyama, I., Takagi, T. & Kanehisa, M. (1996) *Protein Sci.* **5**, 1991–1999.
- Nakai, K. & Kanehisa, M. (1992) *Genomics* **14**, 897–911.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E. (1984) *Cell* **39**, 499–509.
- Cheung, A. K. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 4637–4646.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M. & Suske, G. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 5519–5525.
- Perera, L. P., Mosca, J. D., Ruyechan, W. T., Hayward, G. S., Straus, S. E. & Hay, J. (1993) *J. Virol.* **67**, 4474–4483.
- Wetering, V. D. M., Oosterwegel, M., Norren, V. K. & Clevers, H. (1993) *EMBO J.* **12**, 3847–3854.
- Kretzschmar, M., Kaiser, K., Lottspeich, F. & Meisterernst, M. (1994) *Cell* **78**, 525–534.
- Miau, L. H., Chang, C. J., Tsai, W. H. & Lee, S. C. (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 230–239.
- Bates, P. A. & DeLuca, N. A. (1998) *J. Virol.* **72**, 7115–7124.
- Meier, U. T. & Blobel, G. (1992) *Cell* **70**, 127–138.
- Yamamoto, Y., Girard, F., Bello, B., Affolter, M. & Gehring, W. J. (1997) *Development (Cambridge, U.K.)* **124**, 3385–3394.
- Stroboulis, J., Damjanovski, S., Vermaak, D., Meric, F. & Wolffe, A. P. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3958–3968.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961) *J. Mol. Biol.* **3**, 318–356.
- Maldonado, E., Hampsey, M. & Reinberg, D. (1999) *Cell* **99**, 455–458.

The SUMO Ubiquitin-Protein Isopeptide Ligase Family Member Miz1/PIASx β /Siz2 Is a Transcriptional Cofactor for TFII-I*

Received for publication, July 29, 2002, and in revised form, August 13, 2002
Published, JBC Papers in Press, August 21, 2002, DOI 10.1074/jbc.M207635200

María Isabel Tussíé-Luna \ddagger , Bertha Michel \ddagger , Shweta Hakre \S , and Ananda L. Roy \ddagger \S \parallel **

From the Departments of \ddagger Pathology and \parallel Biochemistry, \S Programs in Immunology and \parallel Genetics, Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts 02111

We have shown previously that a TFII-I-related protein, hMusTRD1/BEN, represses transcriptional activity of TFII-I. The repression by hMusTRD1/BEN was hypothesized to occur via a two-step competition mechanism involving a cytoplasmic shuttling factor and a nuclear cofactor required for transcriptional activation of TFII-I. Employing a two-hybrid approach with both yeast genomic and mouse cDNA libraries in parallel, we have identified the RING-like zinc finger containing Miz1/PIASx β /Siz2, which is a ubiquitin-protein isopeptide ligase in the SUMO pathway, as the potential nuclear cofactor that interacts with both TFII-I and hMusTRD1/BEN. Our conclusion is based on the following observations. First, the interactions are biochemically confirmed in mammalian cells where Miz1/mPIASx β interacts with both TFII-I and hMusTRD1/BEN when these proteins are ectopically co-expressed. Second, co-expression of a nuclear localization signal-deficient mutant of Miz1/mPIASx β with wild type TFII-I fails to alter the subcellular localization of the former. Finally, ectopically expressed Miz1/mPIASx β augments the transcriptional activity of TFII-I and relieves the repression exerted by a mutant hMusTRD1/BEN that co-localized with TFII-I in the nucleus.

TFII-I belongs to a family of proteins characterized by the presence of I-repeats first identified in the founding member TFII-I (1–8). Although TFII-I functions as a signal-induced transcriptional activator, the role of the related family member hMusTRD1/BEN is less clear. Both TFII-I and hMusTRD1/BEN are mapped to the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion (reviewed in Ref. 2). Furthermore, genetic and biochemical analyses show that each of these proteins have multiple isoforms both in mice and in humans (7, 9–11). The transcription functions of hMusTRD1/BEN have not yet been well characterized biochemically. It was first reported (3) as a muscle specific activator of the troponin I gene. It also seems to function as an activator in yeast one-hybrid assays (6). However, clear demonstration of its activator function is not yet obtained. Results from our laboratory suggest that hMusTRD1/BEN behaves as a specific repressor of TFII-I (10). Although each protein when individually expressed exhibits predominant nuclear localization in eukaryotic cells,

TFII-I is excluded from the nucleus when it is co-expressed with hMusTRD1/BEN. Nuclear exclusion of TFII-I results in the repression of the TFII-I-responsive *c-fos* gene. A key to this novel nuclear exclusion function appears to be the serine stretch (ss)¹ in hMusTRD1/BEN because deletion of this stretch results in co-occupancy of both proteins in the nucleus (10). However, although the Δ ss hMusTRD1/BEN failed to prevent nuclear localization of TFII-I, the transcriptional repression of TFII-I was still observed. The latter data led us to postulate that the repression by hMusTRD1/BEN involves the following two-step mechanism: a competition for a common cytoplasmic factor required for nuclear translocation and a competition for a nuclear cofactor required for transcriptional activation.

In an attempt to identify these putative factors that are shared by both the activator (TFII-I) and the repressor (hMusTRD1/BEN), we performed a two-hybrid screen using TFII-I and hMusTRD1/BEN as baits. We screened both yeast genomic and mouse cDNA libraries with the rationale that these screens would ideally yield homologous proteins. We further set the criteria such that (a) the interacting proteins should interact with both hMusTRD1/BEN and TFII-I and (b) the nuclear cofactor must interact with both the wild type and the Δ ss hMusTRD1/BEN, whereas the cytoplasmic factor should not interact with the latter. By employing such a double screen, we report that we have identified protein Siz2/Miz1/PIASx β that appears to be the nuclear cofactor that interacts with TFII-I as well as the wild type and the Δ ss hMusTRD1/BEN. The yeast library screen yielded NFI1 (neck filament interacting protein) also known as Siz2 (after SAP and Miz) (12–14, 19–21), whereas the mouse library screen yielded the corresponding homologue, Miz1/mPIASx β . NFI1/Siz2 and Miz1/mPIASx β interact more avidly with hMusTRD1/BEN than TFII-I both in yeast and in mammalian interaction assays. This RING-like zinc finger-containing factor is localized exclusively in the nucleus and failed to alter the nuclear residency of TFII-I or hMusTRD1/BEN in mammalian localization assays. Consistent with these properties, ectopic Miz1/mPIASx β augments transcriptional activation by TFII-I and alleviates Δ ss hMusTRD1/BEN-mediated transcriptional repression.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

COS7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 50 units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin (Invitrogen).

* This work was supported by National Institutes of Health Grant AI45150 (to A. L. R.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

** To whom correspondence should be addressed: Dept. of Pathology, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Ave., Boston, MA 02111. Tel.: 617-636-6715; Fax: 617-636-2990; E-mail: ananda.roy@tufts.edu.

¹ The abbreviations used are: ss, serine stretch; wt, wild type; GST, glutathione *S*-transferase; GFP, green fluorescent protein; NLS, nuclear localization signal; rhEGF, recombinant human epidermal growth factor; ADH1, alcohol dehydrogenase 1; 3-AT, 3-aminotriazole; PML, promyelocytic leukemia; X- α -gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside.

Yeast Strains and Media

The *Saccharomyces cerevisiae* pJA69-4A strain was used in this study (*Mata*, *trp1-901*, *leu1-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *GAL2-ADE2*, *LYS2::GAL1-HIS3*, *met2::GAL7-lacZ*) (15). Yeast was generally grown in rich media (YPD), and once they were transformed with 2- μ m expression plasmids, they were grown in synthetic media (SD) containing the appropriate amino acids and nitrogen base supplement.

Plasmid Constructs

pGBDU-TFII-I—A *Bam*HI-*Cla*I TFII-I fragment from pEBG-TFII-I (14) was subcloned into *Bam*HI-*Cla*I sites of the pGBDU-C1 vector (2 μ m, ADH1 promoter driving GAL4 DNA binding domain C1, C2, C3-MCS, URA3, and Amp^r) (15) to make the GAL4 DNA binding domain-TFII-I bait construct.

pGBDU-hMusTRD1/BEN wt—To make the pGBDU-hMusTRD1/BEN wt, the full-length hMusTRD1/BEN was PCR-amplified from the pGEM-7Zf(+)-EH67 clone (10) using the following oligonucleotides: 1) *Eco*RI 5'-GGAATTCATGGCCTTGCTGGGTAAG-3', and 2) *Cla*I 5'-CCATCGATGGCTAATTAAGAGGTCCCGGGAG-3'. The PCR product was digested with *Eco*RI and *Cla*I, gel-purified, and subcloned into the same sites of pGBDU-C2 vector (15) to get the GAL4 DNA binding domain-hMusTRD1/BEN wt bait construct.

pGBDU-hMusTRD1/BEN Δ ss—An *Smal*-*Bsi*WI fragment from pEBB-GFP-hMusTRD1/BEN Δ ss (10) was subcloned into the same sites of the pGBDU-hMusTRD1/BEN wt construct.

pEBG-Miz1/mPIASx β —A *Bam*HI-*Not*I fragment from the pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β vector (kindly provided by Robert Maxson, University of Southern California School of Medicine, Los Angeles, CA), corresponding to an N-terminal truncated form of mPIASx β (amino acids 125–614 of GenBankTM accession number BC005596), was subcloned into the *Bam*HI-*Not*I-digested pEBG vector. The assignment of amino acids numbers is based on the truncated form of the Miz1/mPIASx β .

pEBB-GFP-Miz1/mPIASx β —The same *Bam*HI-*Not*I fragment from pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β was subcloned into *Bam*HI-*Not*I sites of pEBB vector. The GFP was PCR-amplified from pEGFP-N1 (Clontech) by using the following primers: 5'-CGGGATCCATGGTGAGCAAGGG-CGAG-3' and 5'-CGGGATCCCTGTACAGCTCGTCCATGC-3'. The amplified product was digested with *Bam*HI, gel-isolated, and ligated in-frame to pEBB-Miz1/mPIASx β for expression as N-terminal fusion protein. The correct GFP orientation was assessed by restriction and sequence analysis.

Miz1/mPIASx β - Δ NLS1—The NLS1 localized between amino acids 295 and 301 in pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β was deleted by a double-round PCR mutagenesis using the following primers: 1) *Spe*I 5'-AAT-TGCTACAAC TAGTCTTTCGAGTGTCC-3'; 2) 5'-GGTTACTTTCATAG-CACACCAAGAACCATC-3'; 3) 5'-GCTATGAAAGTAACAGCCAGCC-3'; and 4) *Not*I 5'-TCTAGATCGCGGCCGCTCGAGGG-3'. The final PCR product was digested with *Spe*I and *Not*I, gel-isolated, and ligated to pEBG-Miz1/mPIASx β or pEBB-GFP-Miz1/mPIASx β .

Miz1/mPIASx β - Δ NLS2—The NLS2 localized between amino acids 353 and 361 in pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β was deleted by the same procedure using the *Spe*I and *Not*I primers plus the two following primers: 1) 5'-CTTTGTGTTTCTGACATGTCTTCTTTCATC-3' and 2) 5'-ATGTCAGAAACACAAAGCAGTCCAAC-3'. The final PCR product was digested with *Spe*I and *Not*I, gel-isolated, and ligated to pEBG-Miz1/mPIASx β or pEBB-GFP-Miz1/mPIASx β .

Miz1/mPIASx β - Δ ZF—From the RING-like zinc finger localized between amino acids 215 and 257 in pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β , only amino acids 231–236 were deleted by the same procedure using the *Spe*I and *Not*I primers plus the two following primers: 1) 5'-GAGGGC-GGCATCAAAAGTCACTGCACGGCAC-3', and 2) 5'-TTTGATGCCGC-CCTCTATCTTTCAG-3'. The final PCR product was digested with *Spe*I and *Not*I, gel-isolated, and ligated to pEBG-Miz1/mPIASx β or pEBB-GFP-Miz1/mPIASx β .

Miz1/mPIASx β - Δ C141—The last 141 amino acids from the C terminus of pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β were deleted by PCR using the *Spe*I upper primer and a *Not*I lower primer, 5'-ATAAGAATGCGGCCGCT-TATGTTTCTGACATAAAGATGC-3'. The final PCR product was digested with *Spe*I and *Not*I, gel-isolated, and ligated into the same sites of pEBG-Miz1/mPIASx β .

Miz1/mPIASx β - Δ C237—The last 237 amino acids from the C terminus of pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β were deleted by PCR using the *Spe*I upper primer and a *Not*I lower primer, 5'-GGATACCTCAGACTATG-ATCTAATTCGCCGGCGTAAGAATA-3'. The final PCR product was

digested with *Spe*I and *Not*I, gel-isolated, and ligated into the same sites of pEBG-Miz1/mPIASx β .

Miz1/mPIASx β - Δ C382—The last 382 amino acids from the C terminus of pGEX-4T-1-Miz1/mPIASx β were deleted by PCR using a *Bam*HI upper primer 5'-CGCGGATCCACAATGCAGCAGCCGCTCCG-3' and a *Not*I lower primer 5'-GATTTTTACCCTAACCTGTCTTCATTCCGCCGCGCTAAGAATA-3'. The final PCR product was digested with *Bam*HI and *Not*I, gel-isolated, and ligated into the same sites of pEBG-Miz1/mPIASx β .

Yeast Two-hybrid Assay

Yeast was transformed using the lithium acetate method (16). To screen the yeast genomic library and the mouse cDNA library, the *S. cerevisiae* pJA69-4A strain was sequentially transformed with a Gal4-BD bait fusion construct followed by transformation with the library plasmid. We used three yeast genomic DNA libraries (Y2HL-C1, Y2HL-C2, and Y2HL-C3) into pGAD-C(x) vectors (2 μ m, ADH1 promoter driving GAL4-AD-library fragment fusions, ADH1 terminator, LEU, Amp^r) (15) and various pools of WEHI-3 cDNA libraries (WEHI-3 is a mouse myelomonocytic leukemia cell line) (ATCC TIB 68) into pGADNOT vector (2 μ m, ADH1 promoter driving a NLS-GAL4-AD-cDNA library fragment fusions, ADH1 terminator, LEU, Amp^r) (17). The initial screen was done by selecting positives in SD -Ura, -Leu, -Ade or SD -Ura, -Leu, -His + 1 mM 3-aminotriazole (3-AT; Sigma) plates. From the colonies that grew under these conditions, a β -galactosidase colony-lift assay was performed. The ones with strong β -galactosidase activity were selected, and the library plasmid DNA was isolated and re-transformed with the bait construct in yeast. Final selection of true positive interacting proteins was done by growing co-transformed yeast in SD -Ura, -Leu, -Ade, -His + 50 mM 3-AT + X- α -gal (Clontech) selection plates.

Transient Transfection and Luciferase Assays

Transfections were performed with LipofectAMINE (Invitrogen) as described (10). Before harvesting, cells were serum-starved for 14–16 h and stimulated with 25 ng/ml of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF; Sigma) for 4 h. Total transfected DNA was kept constant by the empty vectors pEBB or pEBG. Luciferase activity was assessed using the Dual Luciferase kit (Promega). Experiments were done at least three times with triplicate sets included each time.

Cell Extracts, GST Pull-down, and Immunoblotting

At 42 h post-transfection COS7 cells were harvested, washed twice in phosphate-buffered saline buffer, and lysed in lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 μ M KCl, 100 mM glycerol, 5 mM NaF, 2 mM Na₂VO₄, 0.1% Triton X-100) containing 1 \times antiprotease mixture EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals) for 30 min at 4 $^{\circ}$ C. The lysate was clarified by centrifugation for 10 min at 14,000 rpm at 4 $^{\circ}$ C. Total protein concentration was measured by the Bradford method (Bio-Rad). 800 μ g of whole cell extracts were used for immunoprecipitation with anti-TFII-I antibody, and 300 μ g were used for GST pull down. Incubations with protein A-agarose or glutathione-agarose beads (50 μ l, 1:1 slurry; Invitrogen and Sigma, respectively) were done for 2 h, rocking at 4 $^{\circ}$ C. At the end of the incubation, the beads were washed 2 times with 1 ml of lysis buffer without detergents. After the final wash, 4 \times SDS sample buffer was added to the beads, boiled at 100 $^{\circ}$ C for 3 min, and loaded onto a 10% SDS-PAGE. Semi-dry transfer to nitrocellulose was done as described (18). The mouse monoclonal antibodies, anti-GST (GST-2, Sigma) and anti-GFP (JL-18, Clontech), were used at 1:3500 and 1:2000, respectively. Detection was done by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences) using standard methods.

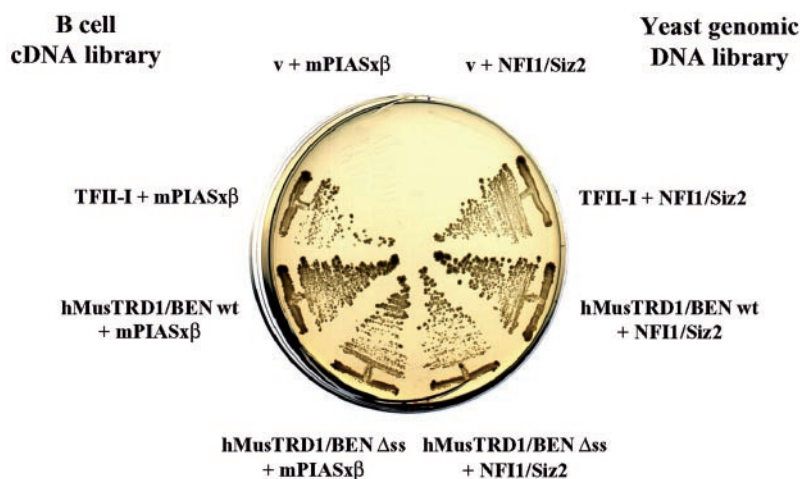
Immunofluorescence

COS7 cells were transfected with 200 ng of each construct, and 36 h post-transfection cells were fixed as described before (10). Cells were incubated with mouse monoclonal antibody anti-GST (GST-2, Sigma) (1:3500) followed by Alexa 594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) (1:20,000) and visualized on a fluorescence E400 Nikon microscope.

RESULTS

Identification of Siz2/Miz1/mPIASx β as a hMusTRD1/BEN and TFII-I Interacting Protein by Two-hybrid Screen—In an attempt to identify the putative factors that are shared by both TFII-I and hMusTRD1/BEN, we performed a two-hybrid screen using both of these proteins sequentially as baits. We screened

FIG. 1. NF11/SIZ2 and Miz1/mPIASxβ interact with TFII-I and hMusTRD1/BEN wt or Δss in yeast. GAL4-BD-TFII-I, GAL4-BD-hMusTRD1/BEN wt, and GAL4-BD-hMusTRD1/BEN Δss were used as baits in the two-hybrid screening of a yeast genomic DNA library and a mouse cDNA library, both containing GAL4-AD fusion proteins. Using wild type GAL4-BD-hMusTRD1/BEN as the bait yielded NF11/SIZ2 from the yeast library and the mammalian homologue Miz1/mPIASxβ from the mouse library (denoted as mPIASxβ in all figures). Both NF11/SIZ2 and Miz1/mPIASxβ also interact with TFII-I, wt hMusTRD1/BEN, or Δss hMusTRD1/BEN in yeast, as shown by growth in SD -Ura, -Leu, -Ade, -His + 50 mM 3-AT + X-α-gal (Clontech) selective plates.



both yeast genomic library and a mouse cDNA library with the rationale that these screens would ideally yield homologous proteins. Indeed, by using this approach, the yeast library screen yielded NF11/Siz2 (12–14), whereas the mouse library screen yielded the corresponding homologue, Miz1/mPIASxβ (19) (Fig. 1). Although in all our analyses we have used the cDNA corresponding to Miz1, sequence analysis revealed that Miz1 is actually a truncated form of mPIASxβ missing the N-terminal 124 amino acids. The PIAS proteins belong to a large family of proteins that share two highly conserved motifs (Fig. 2) as follows: a SAP domain (a putative DNA-binding motif) presumably involved in chromosomal organization (12, 20, 21) and a RING-like zinc finger motif implicated in protein-protein interactions (22–24). Importantly, both NF11/SIZ2 and Miz1/mPIASxβ interacted better with Δss hMusTRD1/BEN. Our final selection of true positive clones was determined under extremely stringent conditions (Fig. 1). Hence, the observation that TFII-I yeast co-transformants grow much slower than wt or Δss hMusTRD1/BEN yeast co-transformants reflects the strength of interaction. We conclude that Siz2/Miz1/mPIASxβ interaction with hMusTRD1/BEN in yeast is stronger than the interaction of Siz2/Miz1/mPIASxβ with TFII-I.

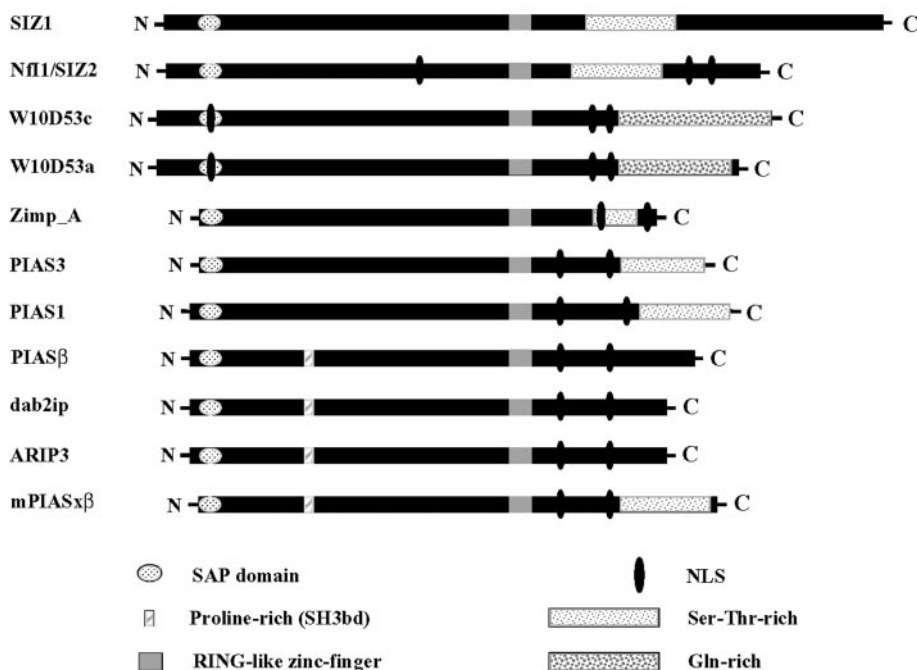
In Vivo Interactions of Miz1/mPIASxβ with TFII-I or hMusTRD1/BEN—After establishing interactions of Siz2/Miz1/mPIASxβ with both TFII-I and hMusTRD1/BEN in yeast, we wanted to corroborate these interactions in mammalian cells. Furthermore, to determine which regions of Miz1/mPIASxβ are important for potential physical and functional interactions with TFII-I and hMusTRD1/BEN, we also generated a series of C-terminal mutants (Fig. 3A). For interaction studies, we either expressed GST-tagged Miz1/mPIASxβ (wild type or mutants) alone or with GFP-tagged TFII-I (Fig. 3B) or with GFP-tagged hMusTRD1/BEN (Fig. 4) in COS7 cells. The potential interactions were analyzed either by immunoprecipitation (for TFII-I, Fig. 3B, upper panel) or by GST pull down (for hMusTRD1/BEN, Fig. 4, upper panels). These results revealed that wild type GST-Miz1/mPIASxβ was immunoprecipitated when co-expressed with GFP-TFII-I (Fig. 3B, compare lane 1 with lane 2). Deletion of the C-terminal 141 amino acids, containing the serine-threonine-rich regions, increased the interaction of this mutant with TFII-I (compare lane 2 with 3). Further deletion from the C-terminal end, including the putative nuclear localization signals and the RING finger (ΔC382), also somewhat enhanced the interaction of this mutant with TFII-I (compare lanes 2 and 4). Whereas deletion of a portion of the RING/zinc finger (amino acids 231–236, ΔZF) or deletion of a putative nuclear localization signal (ΔNLS1) did not alter the

interaction of Miz1/mPIASxβ with TFII-I (lanes 5 and 6), deletion of the putative second NLS (ΔNLS2) significantly diminished the interaction with TFII-I (lane 7). The amount of immunoprecipitated TFII-I in all lanes was comparable except in lane 5 (bottom panel). However, when normalized to the precipitated protein in lane 1, it appears that the interaction of TFII-I with ΔZF is even better than the wild type Miz1/mPIASxβ. These results suggested that interaction of Miz1/mPIASxβ with TFII-I is mediated largely through the N-terminal portion of Miz1/mPIASxβ that does not include the RING/zinc finger.

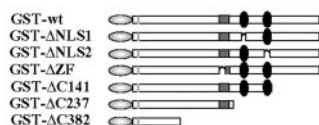
Identical results were obtained with hMusTRD1/BEN (Fig. 4, top and bottom panels). ΔZF Miz1/mPIASxβ interacted better than the wild type protein with hMusTRD1/BEN (compare lanes 3 and 8). Because hMusTRD1/BEN is expressed less than TFII-I in general, we observed fainter bands in GST pull-down assays with GST-Miz1/mPIASxβ. The GST pull-down assay was performed due to a lack of specific antibodies against either hMusTRD1/BEN or Miz1/mPIASxβ. Despite these differences in assay conditions, it is clear that both TFII-I and hMusTRD1/BEN interact with Miz1/mPIASxβ through the N-terminal end of Miz1/mPIASxβ. It is also worth mentioning that Δss hMusTRD1/BEN also interacted with Miz1/mPIASxβ in GST pull-down assays (data not shown).

Identification of a Functional Nuclear Localization Signal (NLS2) in Miz1/mPIASxβ—Although members of PIAS family of proteins have been shown to exhibit nuclear residency, no definitive localization for Miz1/mPIASxβ has been documented. To determine the functional nuclear localization signal in Miz1/mPIASxβ, either wild type or various mutants were expressed as GST fusion proteins in COS7 cells, and their localization was determined by indirect immunofluorescence (Fig. 5). Miz1/mPIASxβ (wt) was localized exclusively to the nucleus when expressed individually. Although deletion of NLS1 (ΔNLS1) did not have any significant effect, deletion of NLS2 (ΔNLS2) profoundly altered the nuclear residency of Miz1/mPIASxβ, suggesting that NLS2 is the functional sequence under our conditions and in this cell type. Neither deletion of the zinc/RING finger motifs (ΔZF) nor deletion of the C-terminal 141 amino acids (ΔC141) had significant effect on the nuclear localization of Miz1/mPIASxβ. Interestingly, ΔZF localizes in nuclear dots far more than the wild type protein. Also a slight cytoplasmic spreading out observed with overexpression of ΔC141 may be due to the fact that the deletion is too close to NLS2. As anticipated, further deletion from the C-terminal end (ΔC237 and ΔC382) had severe effect on the

FIG. 2. Schematics of PIAS family proteins. Members of this family are found in different eukaryotic species. The relative localization of the SAP domain, proline-rich domain (putative SH3 binding domain), serine/threonine/glutamine-rich domain, RING-like zinc finger, and the putative nuclear localization signals are indicated.



A



B

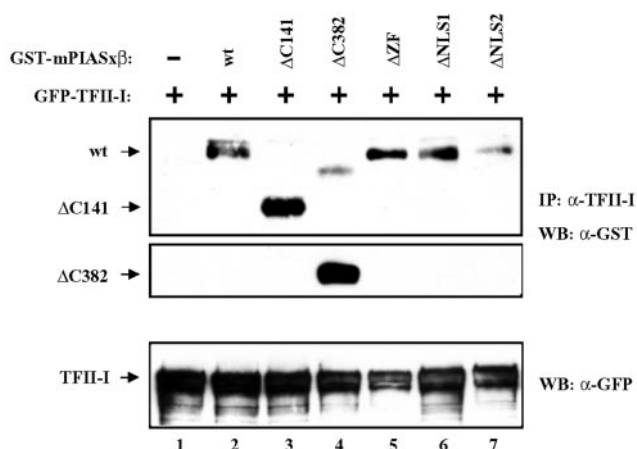


FIG. 3. Miz1/mPIASx β interacts physically with TFII-I in mammalian cells. A, schematics of GST-Miz1/mPIASx β constructs. B, COS7 cells were transfected with 10 μ g of GFP-TFII-I vector alone (lane 1) or co-transfected with 10 μ g of either GST-Miz1/mPIASx β wt (lane 2), Δ C141 (lane 3), Δ C382 (lane 4), Δ ZF (lane 5), Δ NLS1 (lane 6), or Δ NLS2 (lane 7). 44 h post-transfection, whole cell lysates were prepared, and 1000 μ g were immunoprecipitated (IP) with anti-TFII-I antibody. Blots were probed first with anti-GST antibody (α -GST) (upper panels), stripped, and reprobed with anti-GFP antibody (α -GFP) (lower panel). WB, Western blot.

nuclear localization of Miz1/mPIASx β because both of these mutations remove the functional NLS2 (Fig. 5).

Localization of Miz1/mPIASx β NLS Mutant Is Unaltered Upon Co-expression With TFII-I or hMusTRD1/BEN—We ra-

tionalized that if Miz1/mPIASx β is indeed a nuclear cofactor for TFII-I, then it should have a nuclear residency even in the presence of TFII-I. To test this idea, either wild type or various mutants of GST-Miz1/mPIASx β were co-expressed with GFP-TFII-I or GFP-hMusTRD1/BEN in COS7 cells, and their localization was determined by indirect immunofluorescence. As expected, there was no change in the nuclear localization of either Miz1/mPIASx β or TFII-I when these proteins were co-expressed and both co-localized in the nucleus (Fig. 6). Identical results were also obtained when Miz1/mPIASx β was co-expressed with hMusTRD1/BEN (Fig. 6). However, these results do not indicate whether the interactions between Miz1/mPIASx β and TFII-I or hMusTRD1/BEN occur in the nucleus. In order to test whether the interactions are occurring in the cytoplasm or nucleus, we employed the Δ NLS2 mutant of Miz1/mPIASx β . Our rationale was that if the two proteins interact stably in the cytoplasm, wild type TFII-I or wild type hMusTRD1/BEN should be able to “carry” the NLS mutant Miz1/mPIASx β to the nucleus. However, no significant change in cytoplasmic localization of Δ NLS2 Miz1/mPIASx β was observed when co-expressed with either TFII-I or with hMusTRD1/BEN. These data suggests that either interaction between these proteins is not strong enough or that it occurs inside the nucleus. Based on the fact that we observe a greatly diminished interaction of the Δ NLS2 Miz1/mPIASx β with TFII-I or hMusTRD1/BEN, we prefer the latter explanation. In converse experiments both a nuclear signal deficient-TFII-I or a nuclear-deficient hMusTRD1/BEN remains in the cytoplasm when co-expressed with wild type Miz1/mPIASx β further corroborating our idea (data not shown). We have also observed that the nuclear localization of TFII-I does not change substantially when it is ectopically expressed in a yeast strain that lacks the *SIZ2* gene and subsequently complemented with ectopic Miz1/mPIASx β .² Because we observed an enhanced interaction between the Δ C382 and TFII-I or hMusTRD1/BEN, we also wanted to test whether such interactions might lead to alteration in nuclear localization of the latter proteins. However, upon co-expression of TFII-I or hMusTRD1/BEN with Δ C382 Miz1/mPIASx β , we did not observe any significant

² M. I. Tussié-Luna and A. L. Roy, unpublished data.

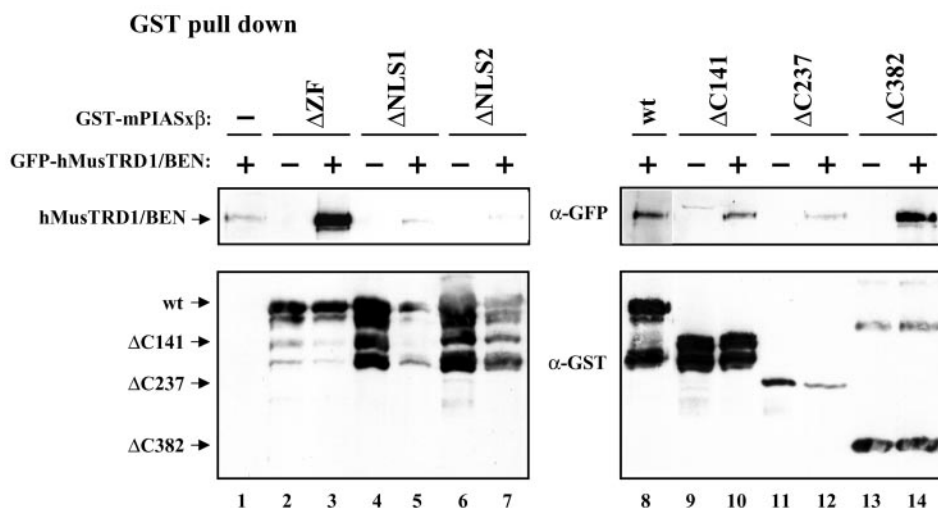


FIG. 4. **Miz1/mPIASxβ interacts with hMusTRD1/BEN in mammalian cells.** GST-Miz1/mPIASxβ proteins were used as baits for GST pull-down assays. COS7 cells were transfected with 10 μ g each of GST-Miz1/mPIASxβ wt (lanes 1 and 8), GST-Miz1/mPIASxβ Δ ZF (lanes 2 and 3), GST-Miz1/mPIASxβ Δ NLS1 (lanes 4 and 5), GST-Miz1/mPIASxβ Δ NLS2 (lanes 6 and 7), GST-Miz1/mPIASxβ Δ C141 (lanes 9 and 10), GST-Miz1/mPIASxβ Δ C237 (lanes 11 and 12), or GST-Miz1/mPIASxβ Δ C382 (lanes 13 and 14) alone or together with 10 μ g of plasmid encoding GFP-hMusTRD1/BEN (lanes 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, and 14). Blots were probed first with anti-GFP antibody (α -GFP) (upper panels), stripped, and reprobed with anti-GST antibody (α -GST) (lower panel).

change in nuclear localization of TFII-I or hMusTRD1/BEN. Although 77% of ectopically TFII-I remained in the nucleus when co-expressed with wild type Miz1/mPIASxβ, 70% of nuclear TFII-I was found when it is co-expressed with Δ C382 Miz1/mPIASxβ. Thus, the enhanced interaction of TFII-I or hMusTRD1/BEN with Δ C382 Miz1/mPIASxβ most likely occurred at a post-lysis stage.

Miz1/mPIASxβ Is a Co-activator of TFII-I Transcriptional Activity—Because TFII-I and Miz1/mPIASxβ co-localize in the nucleus, we were interested to test whether Miz1/mPIASxβ would augment or inhibit transcriptional activity of TFII-I. However, if Miz1/mPIASxβ is indeed the nuclear cofactor that we sought, then it should co-activate rather than repress. In transient co-transfection assays with *c-fos* as a reporter and in the presence of rhEGF, TFII-I activated the *c-fos* promoter in a dose-dependent fashion (Fig. 7, lanes 2 and 3) over the vector-only lanes (lane 1). Miz1/mPIASxβ alone also gave a 3-fold increase in promoter activity in the presence of rhEGF (lanes 4 and 5). Co-expression of low but constant levels of TFII-I with increasing levels of Miz1/mPIASxβ resulted in nearly an additive activation of the *c-fos* promoter (lanes 6 and 7). We conclude that Miz1/mPIASxβ augments transcriptional activity of TFII-I, although the co-activity is not very high. Nevertheless, the increase in transcriptional activity is not due to an increase in TFII-I expression as the levels of expression of ectopic TFII-I decreases when both proteins were co-expressed (compare lanes 2 and 3 with 6 and 7, bottom panels). The increase in transcriptional activity seen with Miz1/mPIASxβ alone most likely reflects activation of endogenous TFII-I, although this remains to be formally proven. In the same assay we also tested the co-activation potentials of two mutants of Miz1/mPIASxβ, Δ ZF and Δ C382. Δ ZF showed modest activation potential on its own (compare lanes 1 with 8 and 9) and retained modest co-activation potentials with TFII-I (compare lanes 2 with 10 and 11) despite the fact that the activities were lower than observed with wild type Miz1/mPIASxβ. However, Δ C382 showed neither activation (lanes 12 and 13) nor any significant co-activation (lanes 14 and 15) potentials. We conclude that the zinc finger may not be essential for co-activation function of Miz1/mPIASxβ and that nuclear residency of Miz1/mPIASxβ is required for its TFII-I-dependent transcription function.

Miz1/mPIASxβ Can Alleviate hMusTRD1/BEN Δ ss-mediated Repression of TFII-I Transcriptional Activity—We showed before (10) that both wild type and serine stretch mutant (Δ ss) hMusTRD1/BEN repress TFII-I-dependent transcriptional activity. We also proposed a two-step mechanism for such inhibitory effects. In the first step, hMusTRD1/BEN excluded TFII-I from the nucleus either by impeding nuclear import or by accelerating nuclear export. This was primarily attributed to a functional region with a stretch of 12 serines because the Δ ss mutant failed to impede nuclear occupancy of TFII-I. However, although Δ ss mutant co-localized to the nucleus with TFII-I, it still inhibited transcriptional activity of TFII-I (10). This led us to postulate that there must be an additional step involving a nuclear component responsible for such inhibition. This nuclear component could be a co-activator of TFII-I that is titrated by either wild type or Δ ss mutant hMusTRD1/BEN (10). Therefore, this putative nuclear cofactor must interact with TFII-I, wild type, and Δ ss mutant hMusTRD1/BEN in the nucleus. Given that Miz1/mPIASxβ interacted with all three proteins and appeared to be exclusively in the nucleus, we tested whether Miz1/mPIASxβ could be the potential nuclear cofactor. If it is, then upon overexpression Miz1/mPIASxβ would alleviate Δ ss-mediated repression of TFII-I transcriptional activity. For this experiment we chose suboptimal levels of TFII-I (Fig. 8, lane 2). As seen in the previous experiment (Fig. 7), although high levels of Miz1/mPIASxβ alone showed 3-fold activation over the vector-only lanes (compare lanes 1 and 3), Δ ZF and Δ C382 failed to do so (compare lanes 1 with 4 and 5). The Δ ss mutant hMusTRD1/BEN slightly repressed even the basal transcriptional activity (compare lanes 1 and 6). This repression was significantly relieved by wild type Miz1/mPIASxβ but not by Δ ZF or Δ C382 mutants (compare lanes 7–9). Moreover, as observed before, Δ ss also repressed TFII-I-dependent activation (compare lane 2 with 10). Most importantly however, ectopic co-expression of wild type Miz1/mPIASxβ with TFII-I and hMusTRD1/BEN Δ ss almost fully relieved Δ ss-mediated transcriptional repression in a dose-dependent fashion (lanes 11 and 12). In contrast, Δ ZF had a moderate effect on relief of repression (lanes 13 and 14) and Δ C382 totally lacked such ability (lanes 15 and 16). Western blot analyses show that the levels of expression of ectopic proteins were comparable between different lanes. Taken together, these data suggest that

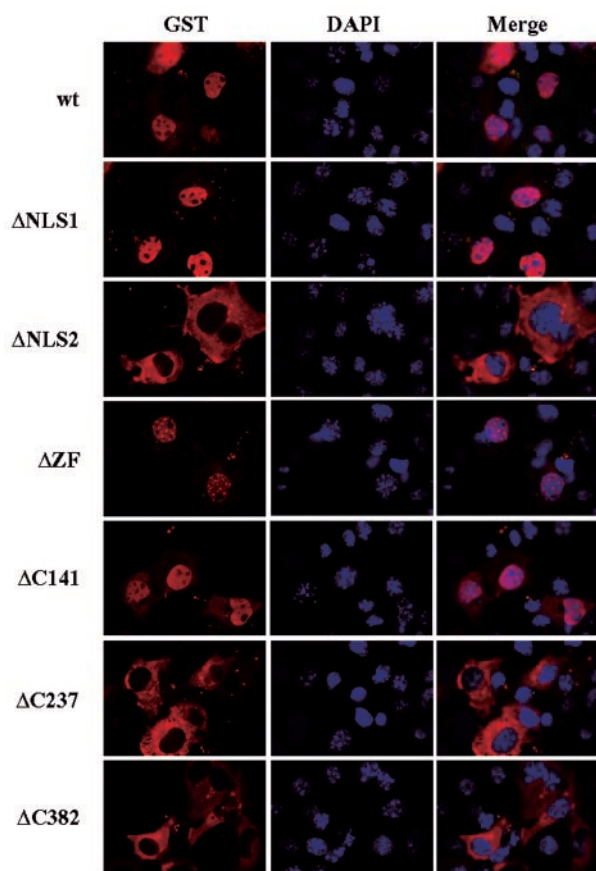


FIG. 5. Identification of a functional nuclear localization signal NLS2 in Miz1/mPIASx β . COS7 cells were transfected with 200 ng of expression plasmids coding for GST-Miz1/mPIASx β wt (top row), GST-Miz1/mPIASx β Δ NLS1 (2nd row), GST-Miz1/mPIASx β Δ NLS2 (3rd row), GST-Miz1/mPIASx β Δ ZF (4th row), GST-Miz1/mPIASx β Δ C141 (5th row), GST-Miz1/mPIASx β Δ C237 (6th row), or GST-Miz1/mPIASx β Δ C382 (last row). 30 h post-transfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and the ectopically expressed proteins were visualized by indirect immunofluorescence with monoclonal anti-GST antibody (α -GST) and Alexa 594 goat anti-mouse IgG secondary antibody. Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Superimposition of Alexa 594 and 4,6-diamidino-2-phenylindole images is shown at the far right panels. Images were obtained by using a Nikon E400 fluorescence microscope with a 100 \times objective.

Miz1/mPIASx β is indeed a nuclear cofactor for TFII-I that can be titrated out by hMusTRD1/BEN leading to transcriptional repression of TFII-I-dependent promoters. Moreover, such function of Miz1/mPIASx β is dependent upon its nuclear localization.

DISCUSSION

The TFII-I family of proteins currently has two members, each with multiple isoforms (25). One distinguishing feature about these proteins is that they are genetically linked in human chromosome 7 (7q11.23) and are deleted in Williams-Beuren syndrome (25). Perhaps a more interesting feature is the fact that although TFII-I is a transcriptional activator, under the same conditions its family member hMusTRD1/BEN behaves as a repressor (10). In an attempt to elucidate the molecular mechanisms governing this family of proteins, we undertook a two-hybrid screen with the notion that interacting partners may provide useful hints to the biochemical modes of action of these proteins. We performed a parallel screen with both yeast and mammalian libraries. Although this was not the most important criterion for screening, we rationalized that if homologous proteins are pulled out from these two screens, it

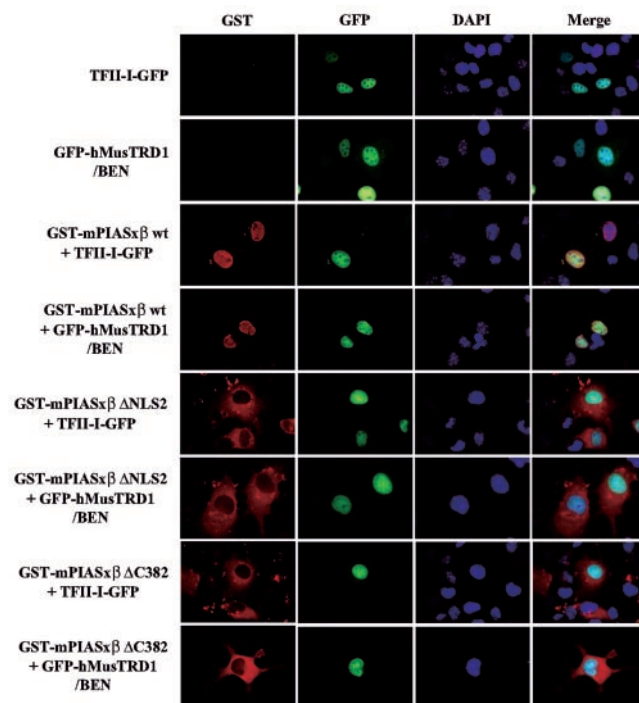


FIG. 6. Wild type Miz1/mPIASx β co-localizes with nuclear TFII-I or hMusTRD1/BEN, whereas Δ NLS2 and Δ C382 Miz1/mPIASx β do not alter TFII-I and hMusTRD1/BEN nuclear localization. COS7 cells were transfected with 200 ng of expression plasmids coding for TFII-I-GFP (top row) or GFP-hMusTRD1/BEN (2nd row) alone or co-transfected with 200 ng of GST-Miz1/mPIASx β wt plus 200 ng of either TFII-I-GFP or GFP-hMusTRD1/BEN (3rd and 4th rows), 200 ng of GST-Miz1/mPIASx β Δ NLS2 plus 200 ng of either TFII-I-GFP or GFP-hMusTRD1/BEN (5th and 6th rows), or 200 ng of GST-Miz1/mPIASx β Δ C382 plus 200 ng of either TFII-I-GFP or GFP-hMusTRD1/BEN (7th and last row). 30 h post-transfection, cells were processed as in Fig. 5.

will provide a compelling evidence for *bona fide* interactions. Out of the three clones that survived this criterion, only Siz2/Miz1/PIASx β appeared to be a potential nuclear factor with transcriptional properties (26–30). Although we used hMusTRD1/BEN as our primary bait for screening these libraries, we also tested both TFII-I and Δ ss hMusTRD1/BEN as interacting partners of the isolated putative clones. In yeast interaction studies, NF1/Siz2 and Miz1/mPIASx β interacted with TFII-I, hMusTRD1/BEN, as well as Δ ss mutant of hMusTRD1/BEN (Fig. 1). Hence, we proceeded to characterize the physical and functional interactions of Miz1/mPIASx β with TFII-I and hMusTRD1/BEN in mammalian cells and to test whether Miz1/mPIASx β is the nuclear cofactor of TFII-I that is competed by hMusTRD1/BEN leading to transcriptional repression.

The interactions observed in yeast were recapitulated in mammalian cells upon co-expression of Miz1/mPIASx β with either TFII-I or hMusTRD1/BEN (Figs. 3 and 4). Although it appears that a fraction of input TFII-I or hMusTRD1/BEN interacts with Miz1/mPIASx β under the assay conditions, whether this is also true under more physiologic conditions could not be determined because an antibody against endogenous Miz1/mPIASx β is not available, and thus co-immunoprecipitation experiments could not be performed. Moreover, whether under normal conditions these interactions take place in the nucleus also could not be determined. Although Miz1/mPIASx β belongs to a large family of proteins (Fig. 2), the majority of which have nuclear localization, precise subcellular localization of Miz1/mPIASx β has not been demonstrated. Hence, to follow further characterization of Miz1/mPIASx β and

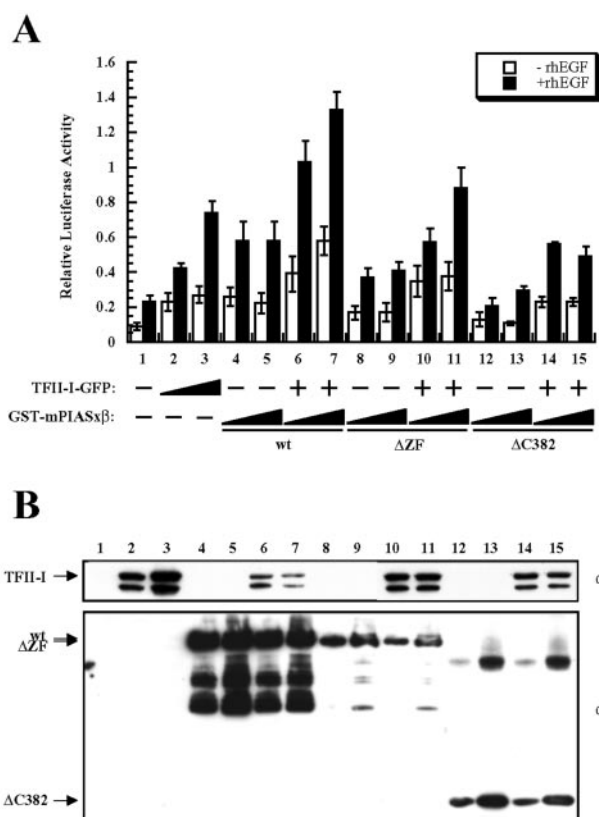


FIG. 7. Miz1/mPIASxβ is a cofactor for TFII-I. A, *c-fos* luciferase activity of TFII-I-GFP, GST-Miz1/mPIASxβ wt, ΔZF, or ΔC382 alone or TFII-I-GFP + GST-Miz1/mPIASxβ wt, ΔZF, or ΔC382 in the presence (filled columns) or in the absence (open columns) of 25 ng/ml rhEGF (top panel). Lanes 1, empty vector; lanes 2 and 3, TFII-I-GFP, 600 and 1800 ng; lanes 4 and 5, GST-Miz1/mPIASxβ wt, 600 and 1800 ng; lanes 6 and 7, TFII-I-GFP, 600 ng + GST-Miz1/mPIASxβ wt, 600 or 1800 ng; lanes 8 and 9, GST-Miz1/mPIASxβ ΔZF, 700 and 2100 ng; lanes 10 and 11, TFII-I-GFP, 600 ng + GST-Miz1/mPIASxβ ΔZF, 700 or 2100 ng; lanes 12 and 13, GST-Miz1/mPIASxβ ΔC382, 700 and 2100 ng; lanes 14 and 15, TFII-I-GFP, 600 ng + GST-Miz1/mPIASxβ ΔC382, 700 and 2100 ng (top panel). B, cell extracts from indicated lanes in A were analyzed by Western blot probed with anti-GFP antibody (α-GFP) (top panel) and then stripped and reprobed with anti-GST antibody (α-GST) (bottom panel).

its interactions with TFII-I family proteins, it was important for us to determine unequivocally the subcellular localization of Miz1/mPIASxβ at least when ectopically expressed. Under our assay conditions, Miz1/mPIASxβ localized exclusively to the nucleus. Interestingly, the staining revealed a speckled pattern with nuclear pod- or dot-like structures that are reminiscent of promyelocytic leukemia (PML) bodies. Our preliminary data suggest that the nuclear dots observed with Miz1/mPIASxβ indeed co-localize with PML bodies. However, the functional consequences of this co-localization are unclear at present. The localization of TFII-I and hMusTRD1/BEN in PML bodies is under study at present.

Data base scanning (PSORT) (31) revealed two consensus nuclear localization signals in Miz1/mPIASxβ, termed NLS1 and NLS2. Of these, NLS1 appears to be non-functional at least under our assay conditions because deletion of NLS1 did not alter the nuclear localization of Miz1/mPIASxβ. The NLS2 is functional because the deletion of NLS2 causes a major change in the subcellular localization of Miz1/mPIASxβ. It is also clear that co-expression of TFII-I or hMusTRD1/BEN does not increase the nuclear localization of NLS mutant Miz1/mPIASxβ. Conversely, wild type Miz1/mPIASxβ also failed to alter the localization of a nuclear localization deficient mutant of TFII-I

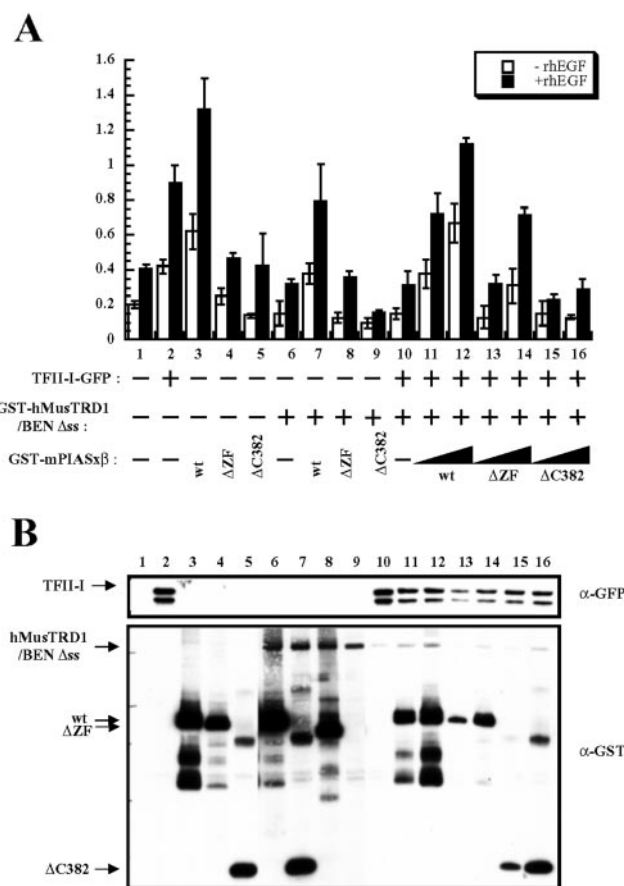


FIG. 8. Miz1/mPIASxβ alleviates Dss hMusTRD1/BEN mediated repression of TFII-I transcriptional activity. A, *c-fos* luciferase activity of TFII-I-GFP; GST-Miz1/mPIASxβ wt, ΔZF, or ΔC382; GST-hMusTRD1/BEN Δss + GST-Miz1/mPIASxβ, ΔZF, or ΔC382; TFII-I-GFP + GST-hMusTRD1/BEN Δss and TFII-I-GFP + GST-hMusTRD1/BEN Δss + GST-Miz1/mPIASxβ wt, ΔZF, or ΔC382 in the presence (filled columns) or in the absence (open columns) of 25 ng/ml rhEGF (top panel). Lane 1, empty vector; lane 2, TFII-I-GFP, 600 ng; lane 3, GST-mPIASxβ wt, 1500 ng; lane 4, GST-Miz1/mPIASxβ ΔZF, 2000 ng; lane 5, GST-Miz1/mPIASxβ ΔC382, 2000 ng; lanes 6–9, GST-hMusTRD1/BEN Δss, 600 ng; lane 7, + GST-Miz1/mPIASxβ wt, 1500 ng; lane 8, + GST-Miz1/mPIASxβ ΔZF, 2000 ng; lane 9, + GST-Miz1/mPIASxβ ΔC382, 2000 ng; lanes 10–16, TFII-I-GFP, 600 ng + GST-hMusTRD1/BEN Δss, 600 ng; lanes 11, 13, and 15, + GST-Miz1/mPIASxβ wt, ΔZF, or ΔC382, 650 ng, respectively; and lanes 12, 14, and 16, + GST-Miz1/mPIASxβ wt, ΔZF, or ΔC382, 2000 ng, respectively. B, cell extracts from indicated lanes in A were analyzed by Western blot probed with anti-GFP antibody (α-GFP) (top panel) and then stripped and reprobed with anti-GST antibody (α-GST) (bottom panel).

(9) or a nuclear localization deficient mutant of hMusTRD1/BEN when both proteins were co-expressed (data not shown). Despite the fact that the wild type proteins interact, the failure of a wild type protein to alter the localization of the partner mutant could be either due to the fact that these proteins interact weakly or transiently or that they interact exclusively in the nucleus. Although these scenarios are not yet clear, the fact that protein substrates must be targeted to the nucleus in order to undergo SUMO-1 conjugation (32), a process dependent on PIAS family proteins, favors the latter idea. TFII-I, on its own, is a weak transcriptional activator. Miz1/mPIASxβ also has a weak transcriptional activity in the absence of ectopically expressed TFII-I. Together they appear to have an additive effect. It is not clear at present whether Miz1/mPIASxβ binds to *c-fos* promoter directly in a sequence-specific fashion or whether it is a transcriptional cofactor for TFII-I. Although Miz1/mPIASxβ can bind sequence specifically to dou-

ble strand DNA in gel shift assays, the precise consensus sequence or the target genes are not well characterized yet (19). It is worthwhile to point out that various members belonging to the PIAS family (Fig. 2), *viz.* androgen receptor interacting protein (ARIP3) (26, 27), protein inhibitor of activated STATs (PIAS1, PIAS3, and PIASy) (28–30), and Miz1 (19), have all been shown to possess varying degrees of transcriptional activity. However, it is not clear at present whether Miz1/mPIASx β can indeed behave as a gene-specific transcriptional activator or it behaves more as a transcriptional co-regulator together with TFII-I. Although it is very likely that the full range of transcriptional activity by Miz1/PIASx β requires its interaction with TFII-I and its N-terminal regions, the activation of *c-fos* by Miz1/PIASx β in the absence of ectopic TFII-I makes it more difficult to pinpoint its mechanism of action. Accordingly, changes in transcriptional activity of the mutants of Miz1/PIASx β could be independent of TFII-I. This issue has to be addressed by determining whether Miz1/mPIASx β has a consensus binding site in the *c-fos* promoter and, if so, whether Miz1/mPIASx β binds to this site and activates it. Given the fact that STAT1 and STAT3 activate the *c-fos* promoter, we also tested the effect of PIAS1 and PIAS3 on TFII-I-dependent activation. However, in our hands, we failed to see any significant effects of either PIAS1 or PIAS3 on TFII-I-dependent activation of the *c-fos* promoter (data not shown). Most importantly, Miz1/mPIASx β relieved the Δ ss hMusTRD1/BEN-mediated transcriptional repression. Thus, under conditions in which TFII-I-dependent activation was completely abrogated by Δ ss hMusTRD1/BEN, co-expression of Miz1/mPIASx β rescued such repression. Miz1/mPIASx β alone, in the absence of TFII-I, also prevented Δ ss hMusTRD1/BEN-mediated transcriptional repression, although the relief of repression was less than achieved in the presence of TFII-I. This result suggests that Miz1/mPIASx β requires TFII-I for its full range of activity under our assay conditions, leading us to believe that Miz1/mPIASx β in this context might be acting more as a transcriptional co-regulator of TFII-I rather than as an independent transcriptional activator. Regardless, it is clear that Miz1/mPIASx β is a nuclear co-regulator or cofactor for TFII-I that is titrated away by hMusTRD1/BEN leading to transcriptional repression. The precise mechanism of this pathway remains to be elucidated.

The PIAS family of proteins is characterized by the presence of an N-terminal SAP domain believed to be involved in chromosome organization (12, 21, 22). However, because a truncated form of mPIASx β (Miz1, lacking the SAP domain) interacts with TFII-I, the SAP domain is probably dispensable for such interactions. This family is also characterized by the presence of a RING-like zinc finger motif, presumably involved in protein-protein interactions (22–24). Compelling evidence supports the involvement of a number of different and functionally distinct RING finger proteins in ubiquitin- and SUMO-dependent pathways (22, 23). Recent studies (13, 14, 33–37) have demonstrated that SIZ2, PIASx α , PIASx β , PIASy, PIAS1, and PIAS3 behave as ubiquitin-protein isopeptide-SUMO-ligases that sumoylates septins and several transcription factors (13, 14, 33–36). In this regard, it has been shown that the enzymatic activity of PIAS family proteins is dependent on its zinc/RING finger domains (33, 34). However, our data reveal that deletion of amino acids 231–236 coding for central CTHLQC zinc/RING finger of Miz1/mPIASx β (Δ ZF) does not significantly affect its interaction with TFII-I or hMusTRD1/BEN and that the functional effects of these mutations are rather moderate. However, lack of enzymatic activity of this mutant needs to be formally proven.

Despite the fact that Miz1/mPIASx β is not yet well characterized, many of its family members have been shown to have exciting properties that control multiple aspects of chromosome structure and function by establishing or maintaining chromosome organization in interphase nuclei (12, 13, 21, 33, 38). Taken together these data suggest that besides its role in transcriptional activation or repression, the PIAS family of proteins will have a definite role in other chromosomal functions as well. One of the other clones obtained from the two-hybrid screens that interacted with both TFII-I and hMusTRD1/BEN was Ubc9, a ubiquitin-conjugating enzyme involved in SUMO modification.² These data raise the possibility that TFII-I family of proteins may undergo SUMO modification and are also likely to be involved in SUMO-dependent pathways that control transcription. However, given that Δ ZF interacts with TFII-I and partially functions as a co-activator, it appears that the interactions of TFII-I family proteins with Miz1/mPIASx β may be independent of enzymatic activity of Miz1/mPIASx β . It has been observed in other cases that PIAS proteins can tether other sumoylated proteins in a noncovalent fashion (37). Whether TFII-I family proteins serve a regulatory role in this latter process remains to be determined.

Acknowledgments—We thank Sheila Logan for expert technical assistance and Dean Dawson for supplying various yeast strains and helpful suggestions. We thank Philip James for kindly providing the yeast genomic library and Carl Novina and Philip Sharp for the mouse B cell cDNA library. We also thank Robert Maxson for providing Miz1 cDNA. We are particularly grateful to Ke Shuai for generously providing PIAS1 and PIAS3 cDNA constructs.

REFERENCES

- Bayarsaihan, D., and Ruddle, F. H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7342–7347
- Franke, Y., Peoples, R. J., and Francke, U. (1999) *Cytogenet. Cell Genet.* **86**, 296–304
- O'Mahoney, J. V., Guven, K. L., Lin, J., Joya, J. E., Robinson, C. S., Wade, R. P., and Hardeman, E. C. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6641–6652 and Correction (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5361
- Osborne, L. R., Campbell, T., Daradich, A., Scherer, S. W., and Tsui, L. C. (1999) *Genomics* **57**, 279–284
- Tassabehji, M., Carette, M., Wilmot, C., Donnai, D., Read, A. P., and Metcalfe, K. (1999) *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 737–747
- Yan, X., Zhao, X., Qian, M., Guo, N., Gong, X., and Zhu, X. (2000) *Biochem. J.* **345**, 749–757
- Perez-Jurado, L. A., Wang, Y. K., Peoples, R., Coloma, A., Cruces, J., and Francke, U. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 325–334
- Roy, A. L., Du, H., Gregor, P. D., Novina, C. D., Martinez, E., and Roeder, R. G. (1997) *EMBO J.* **16**, 7091–7104
- Cheriyath, V., and Roy, A. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 26300–26308
- Tussie-Luna, M. I., Bayarsaihan, D., Ruddle, F. H., and Roy, A. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7789–7794
- Wang, Y. K., Perez-Jurado, L. A., and Francke, U. (1998) *Genomics* **48**, 163–170
- Strunnikov, A. V., Aravind, L., and Koonin, V. (2001) *Genetics* **158**, 95–107
- Johnson, E. S., and Gupta, A. A. (2001) *Cell* **106**, 735–744
- Takahashi, Y., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. (2001) *Gene (Amst.)* **275**, 223–231
- James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996) *Genetics* **144**, 1425–1436
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 163–168
- Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., and Goff, S. P. (1994) *Cell* **79**, 119–130
- Novina, C. D., Kumar, S., Bajpai, U., Cheriyath, V., Zhang, K., Pillai, S., Wortis, H. H., and Roy, A. L. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5014–5024
- Wu, L., Wu, H., Sangiorgi, F., Wu, N., Bell, J. R., Lyons, G. E., and Maxson, R. (1997) *Mech. Dev.* **65**, 3–17 and Correction (1997) *Mech. Dev.* **69**, 219
- Aravind, L., and Koonin, E. V. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 112–114
- Hari, K. L., Cook, K. R., and Karpen, G. H. (2001) *Genes Dev.* **15**, 1334–1348
- Freemont, P. S. (2000) *Curr. Biol.* **10**, R84–R87
- Hochstrasser, M. (2001) *Cell* **107**, 5–8
- Kentis, A., Gordon, R. E., and Borden, K. L. B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 667–672
- Roy, A. L. (2001) *Gene (Amst.)* **274**, 1–13
- Molainen, A., Karvonen, U., Poukka, H., Yan, W., Toppari, J., Jänne, O. A., and Palvimo, J. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3700–3704
- Kotaja, N., Aittomäki, S., Silvennoinen, O., Palvimo, J. J., and Jänne, O. A. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**, 1986–2000
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10626–10631
- Liu, B., Gross, M., tenHoeve, J., and Shuai, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3203–3207
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997)

Science **278**, 1803–1805

31. Nakai, K., and Kanehisa, M. (1992) *Genomics* **14**, 897–911
32. Rodriguez, M. S., Dargemont, C., and Hay, R. T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 12654–12659
33. Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001) *Genes Dev.* **15**, 3088–3103
34. Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh-e, A., Yasuda, H., and Kikuchi, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48973–48977
35. Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001) *Mol. Cell* **8**, 713–718
36. Schmidt, D., and Müller, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2872–2877
37. Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5222–5234
38. Li, S. J., and Hochstrasser, M. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2367–2377



Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASx β

María Isabel Tussí-Luna*, Dashzeveg Bayarsaihan[†], Edward Seto[‡], Frank H. Ruddle[†], and Ananda L. Roy*[§]

*Department of Pathology, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, MA 02111; [†]Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, Yale University, 266 Whitney Avenue, New Haven, CT 06520; and [‡]H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, University of South Florida, Tampa, FL 33612

Contributed by Frank H. Ruddle, August 2, 2002

TFII-I family proteins are characterized structurally by the presence of multiple reiterated I-repeats, each containing a putative helix-loop-helix domain. Functionally, they behave as multifunctional transcription factors that are activated by a variety of extracellular signals. In studying their subcellular localization, we noticed that these transcription factors frequently reside in subnuclear domains/dots. Because nuclear dots are believed often to harbor components of histone deacetylase enzymes (HDACs), we investigated whether TFII-I family proteins colocalize and interact with HDACs. Here, we show that TFII-I and its related member hMusTRD1/BEN physically and functionally interact with HDAC3. The TFII-I family proteins and HDAC3 also show nearly identical expression patterns in early mouse development. Consistent with our earlier observation that TFII-I family proteins also interact with PIASx β , a member of the E3 ligase family involved in the small ubiquitin-like modifier (SUMO) pathway, we show further that PIASx β physically and functionally interacts with HDAC3 and relieves the transcriptional repression exerted by HDAC3 upon TFII-I-mediated gene activation. These results suggest a complex interplay between two posttranslational pathways—histone modification and SUMOylation—brokered in part by TFII-I family proteins.

Extracellular signals often are transduced to the nucleus to bring about either up-regulation or down-regulation of specific genes. However, because the nuclear DNA is packaged with histones in nucleosomal arrays, to initiate transcriptional activation of any given gene, the promoter DNA must be accessible by the gene-specific activators as well as the basal machinery. Conversely, an actively transcribing genetic locus or a specific gene can be “switched off” by rendering the DNA inaccessible. Hence, the regulation of gene expression may begin at the level of chromatin alteration by concerted actions of histone-modifying enzymes. A histone acetyl transferase (HAT) acts by acetylating the tails of histones, lowering their positive charge and decreasing its stability of interactions with the DNA, upon which DNA becomes accessible. A histone deacetylase (HDAC) can reverse such an effect by deacetylating the histones, preserving their basic nature and, thereby, impeding DNA accessibility (1–3). Several other histone-tail modifications also have been described, such as methylation, ubiquitination, and phosphorylation (2, 3). It has been proposed that certain combinations of these modifications in one or more tails act sequentially or concomitantly to form a “histone code” recognized by specific regulatory proteins that lead to downstream events (4). It is generally believed that these enzymes are brought to the vicinity of the DNA and targeted to specific promoter regions through interactions with transcription factors, which can exert their effect only when the DNA is accessible. Therefore, to better understand how these enzymes regulate gene expression, considerable efforts have been spent to study their biochemical interactions with specific transcription factors. Here, we show that multifunctional factor TFII-I and its relative, hMusTRD1/BEN, interact physically and functionally with HDAC3.

TFII-I belongs to a family of proteins characterized by the presence of I-repeats (5–12, 40). TFII-I is a ubiquitously expressed

multifunctional transcription factor that is activated in response to various extracellular signals ranging from antigenic stimulation in B cells to growth factor signaling in fibroblasts. TFII-I undergoes induced tyrosine phosphorylation in response to these signals and translocates to the nucleus. The tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of TFII-I is required for *c-fos* transcriptional activation. Thus, TFII-I is postulated to link signal-transduction events to transcription. Although TFII-I functions as a signal-responsive transcriptional activator, the precise role of the related family member hMusTRD1/BEN remains to be elucidated. Both transcription factors are mapped to the breakpoint regions of the 7q11.23 deletion, which is correlated with Williams–Beuren syndrome (6). Both genetic mapping studies and biochemical analyses show that each of these proteins has multiple isoforms in mice and in humans (11, 13–16). The transcription functions of hMusTRD1/BEN have not yet been well characterized biochemically. hMusTRD1/BEN was reported first as a muscle-specific activator of the troponin I gene (7, 40). It also seems to function as an activator in yeast one-hybrid assays (10). However, clear demonstration of its activator function has not been obtained. In contrast, results from our laboratory suggest that hMusTRD1/BEN may behave as a specific repressor of TFII-I (15). The repression by hMusTRD1/BEN appears to involve a two-step mechanism: a competition for a common cytoplasmic factor required for nuclear translocation and a competition for a nuclear cofactor required for transcriptional activation. Taken together, these results would suggest that hMusTRD1/BEN might act both as a transcriptional activator as well as a repressor.

To elucidate the biochemical mechanisms of action of these factors, we undertook yeast two-hybrid assays with both TFII-I and hMusTRD1/BEN as baits. These assays yielded PIASx β as an interacting partner for both proteins (39). The PIAS family proteins are characterized by the presence of a RING-like zinc-finger motif presumably involved in protein–protein interactions (17–19). Several recent evidences support the involvement of a number of different and functionally distinct, RING-finger proteins in ubiquitin and small ubiquitin-like modifier (SUMO)-dependent pathways (17, 18). The PIAS family proteins behave as E3 ligases in SUMOylation of several transcription factors in mammalian cell-free systems (20–23). In addition to their enzymatic functions, this family of proteins also may have functions related to chromosome structure and/or function (24–26). Interestingly, the PIAS family proteins localize to the nuclear dots (22, 27–29), which also harbor members of the HDAC family (30, 31), raising the possibility that these two family proteins physically and/or functionally interact to control gene expression. Consistent with this expectation, it indeed has been shown that HDAC1 is SUMOylated (32). In this manuscript, we show that both TFII-I and hMusTRD1/BEN interact physically and functionally with HDAC3 and that PIASx β also interacts with HDAC3. The HDAC3-mediated repression of TFII-

Abbreviations: HAT, histone acetyl transferase; HDAC, histone deacetylase; rhEGF, recombinant human epidermal growth factor; SUMO, small ubiquitin-like modifier; PML, promyelocytic leukemia.

[§]To whom reprint requests should be addressed. E-mail: ananda.roy@tufts.edu.

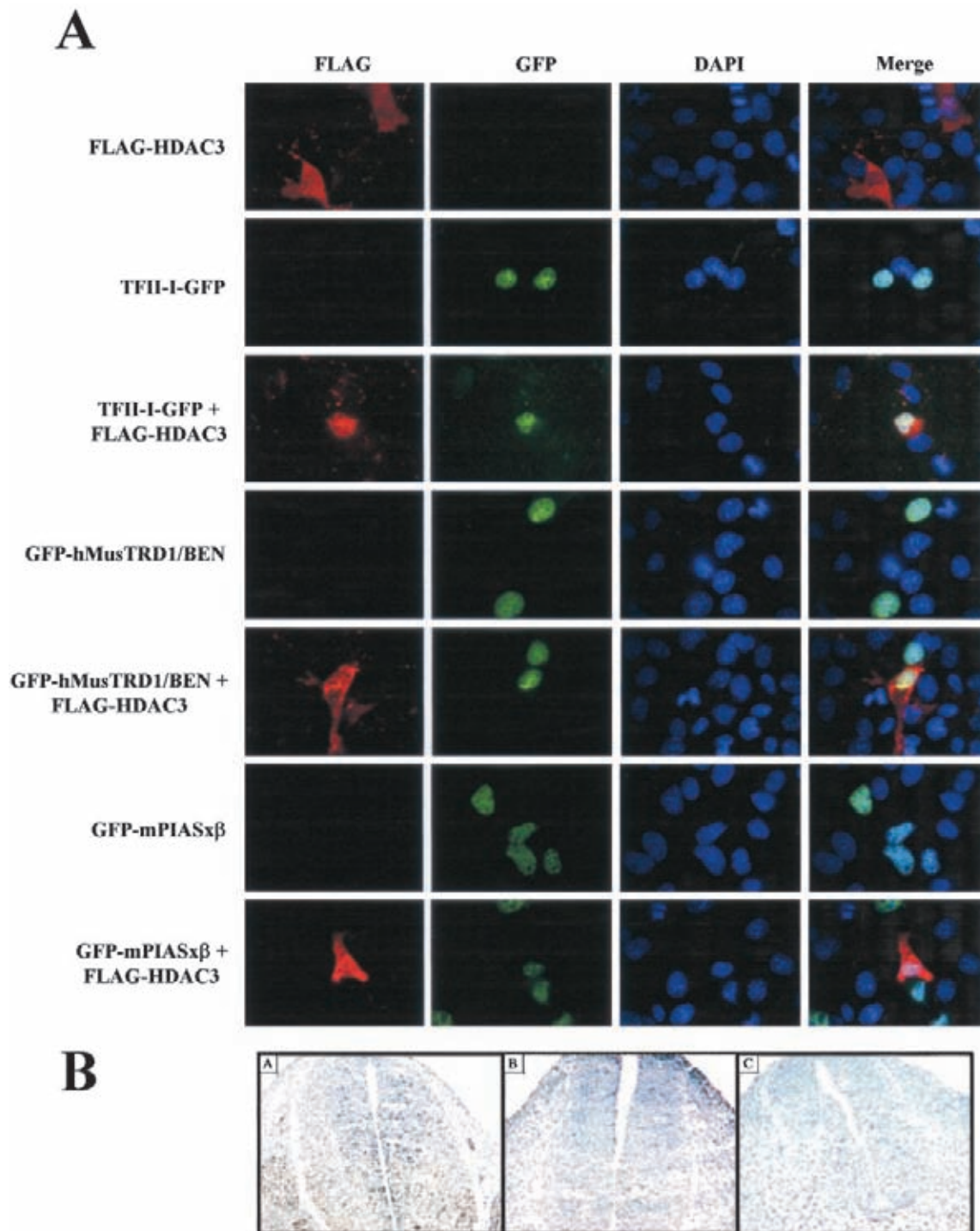


Fig. 1. HDAC3 partially colocalizes with TFII-I, hMusTRD1/BEN, and mPIASxβ in mammalian cells and during early embryogenesis. (A) COS7 cells were transfected with 500 ng of FLAG-HDAC3 expression plasmid (first row) and 200 ng each of TFII-I-GFP (second row), GFP-hMusTRD1/BEN (fourth row), or GFP-mPIASxβ (sixth row) or cotransfected with 500 ng of FLAG-HDAC3 and 200 ng of TFII-I-GFP, GFP-hMusTRD1/BEN, or GFP-mPIASxβ (third, fifth, and last row, respectively). The ectopically expressed proteins were visualized by indirect immunofluorescence by using a monoclonal anti-FLAG antibody and Alexa 594 goat anti-mouse IgG secondary antibody. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Merge of GFP, Alexa 594, and DAPI images are shown at the far right. (B) Frozen sections of mouse embryos at E10.5 were stained with the following antibodies: anti-BEN (A), anti-TFII-I (B), or anti-HDAC3 (C). All three proteins show nuclear expression and overlap in the neural tube and somites.

I-dependent transcription of the *c-fos* promoter is relieved by PIASxβ in a dose-dependent fashion, providing further biochemical evidence that there may be a general connection between the SUMO pathway and HDAC pathway via TFII-I family proteins.

Materials and Methods

Cell Culture, Antibodies, and Plasmids. COS7 cells were grown under standard conditions. The monoclonal anti-FLAG (M2) and monoclonal anti-GST (GST-2) antibodies were purchased

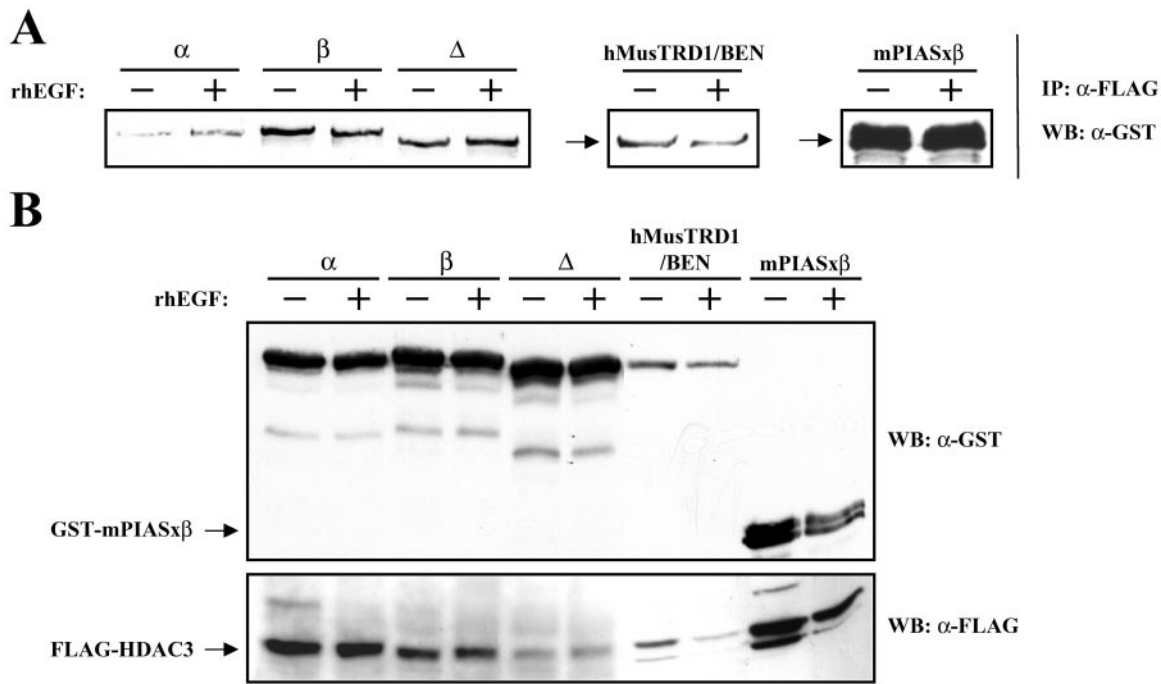


Fig. 2. HDAC3 interacts physically with TFII-I isoforms (α , β , and Δ), hMusTRD1/BEN, and mPIASx β . (A) COS7 cells were cotransfected with a FLAG-HDAC3 expression vector and plasmids for the indicated GST proteins in the absence or presence of rhEGF. Whole-cell extracts were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody, and interacting proteins were visualized with anti-GST antibody. (B) Cell extracts from A were Western-blotted with anti-FLAG antibody (Lower) and then stripped and reprobed with anti-GST antibody (Upper).

from Sigma. The monoclonal anti-GFP (JL-8) was obtained from CLONTECH. The pCEP4-FLAG-HDAC3 vector has been described (33).

Protein Analysis. Transfections were performed with Lipofectamine (GIBCO/BRL) as described (15). For 10-cm-diameter cell culture dishes, the amount of transfected plasmid was 8 μ g for FLAG-HDAC3, mPIASx β (an N-terminal truncated form; ref. 39), and TFII-I- α , β , or Δ isoforms and 10 μ g for hMusTRD1. Cells then were serum-starved for 16 h, stimulated for 20 min with recombinant human epidermal growth factor (rhEGF, 25 ng/ml; Sigma), and harvested 40 h posttransfection. For Western blot analysis, the primary anti-FLAG (1:2,000), anti-GST (1:3,500), and anti-GFP (1:2,000) antibodies and the secondary anti-mouse HRP-conjugated (Zymed) (1:10,000) antibodies were incubated in TBST buffer. Detection was done by enhanced chemiluminescence (NEN), using standard methods.

Immunostaining and Immunocytochemical Analysis. COS7 cells were grown on coverslips, transfected with FLAG-HDAC3, TFII-I-GFP, or hMusTRD1-GFP alone, or cotransfected with FLAG-HDAC3 and TFII-I-GFP, or hMusTRD1-GFP or GFP-mPIASx β . Nineteen hours after transfection, cells were serum-starved for 5 h and stimulated by 20 min with rhEGF (25 ng/ml; Sigma). Cells were washed twice with Dulbecco's PBS, fixed, and stained as described (15). Cells were incubated with mouse monoclonal anti-FLAG (1:1,500), followed by Alexa 594 goat anti-mouse IgG (H+L; Molecular Probes; 1:20,000), and visualized on a fluorescence E400 Nikon microscope.

For the immunocytochemical analysis, CD-1 mouse embryos were obtained from timed-pregnant mice and fixed overnight at 4°C in freshly prepared 4% paraformaldehyde/PBS. The fixed embryos were equilibrated overnight with 30% sucrose/PBS, followed by 30% sucrose/OCT (1:1) at 4°C. Embryos were transferred to embedding chambers, covered with OCT (Tissue-Tek Ost4583

compound, Miles), and stored at -70°C. Frozen sections were treated according to the standard protocols. Rabbit anti-BEN, anti-TFII-I, and anti-HDAC3 (Santa Cruz Biotechnology) polyclonal primary antibodies were incubated overnight at 4°C and then incubated with the biotin-SP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Staining with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) and counterstaining with Harris' hematoxylin were performed as recommended by the manufacturer. For negative controls, the same protocols were used without the addition of primary antibodies.

Immunoprecipitation Assays. For coimmunoprecipitation experiments, cells were lysed in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0/100 mM KCl/0.1% Triton X-100/0.05% Nonidet P-40/5 mM NaF/2 mM Na₃VO₄/1 mM Na₂P₄O₇/1× EDTA-free antiprotease mixture (Roche)/10% glycerol. Whole-cell extracts (500 ng) were immunoprecipitated with 12.25 μ g of anti-FLAG mAb and 35 μ l of protein G-Sepharose (slurry, 1:1). Western blot analysis was performed as described above.

Reporter Gene Assays. COS7 cells were transfected with 600 ng of *c-fos*-luciferase reporter plasmid and either pEBB empty vector, wild-type TFII-I, and mPIASx β in the absence or presence of HDAC1 or HDAC3 and 35 ng of Renilla-luciferase plasmid. Total transfected DNA was kept constant by using empty vector pEBB. Before harvesting, cells were serum-starved for 16 h and stimulated with rhEGF (25 ng/ml; Sigma) for 4 h. Luciferase activity was assessed by using the Dual Luciferase kit (Promega). Each experiment was done in triplicate and repeated at least twice.

Results

Colocalization of TFII-I Family Proteins and PIASx β with HDACs. To evaluate the subcellular localization of HDAC3 with TFII-I family proteins and their interacting partner, PIASx β , we expressed them ectopically in COS7 cells. HDAC3 was visualized by virtue of its

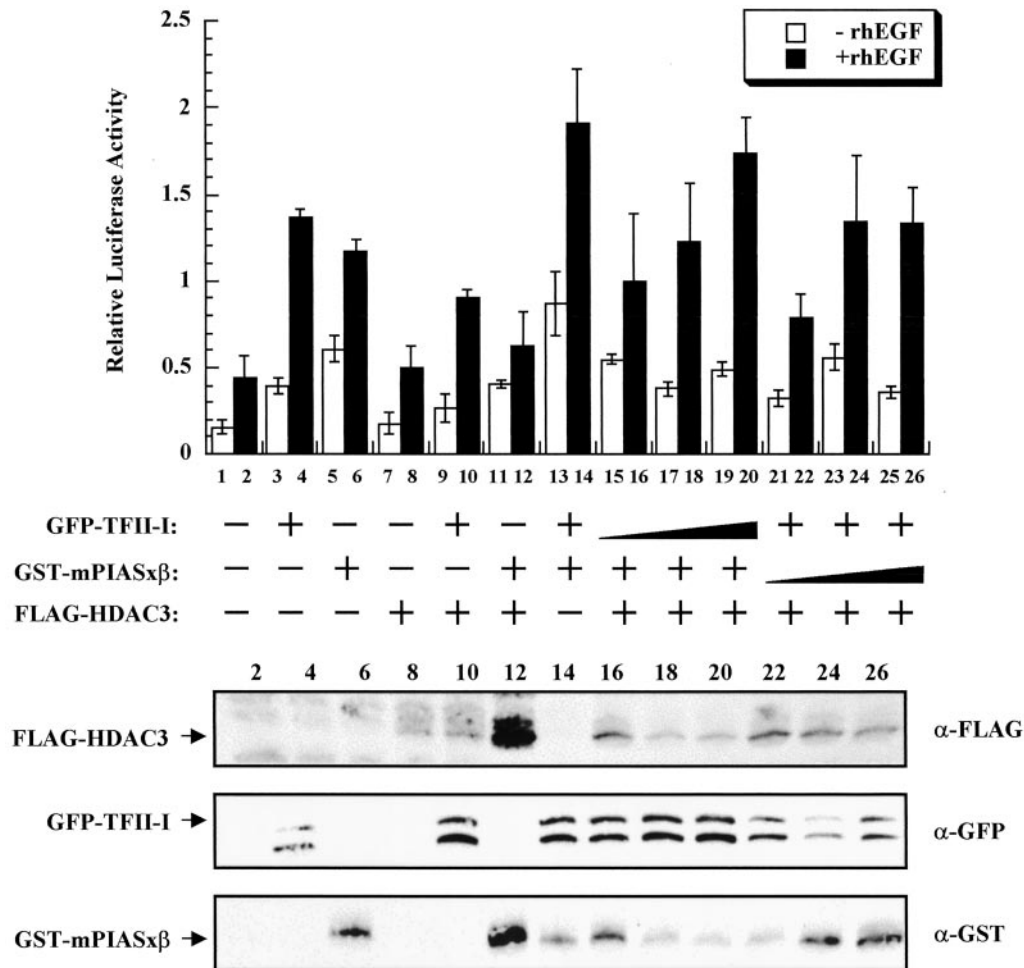


Fig. 3. HDAC3 represses TFII-I- and mPIASx β -dependent transcriptional activity. COS7 cells were cotransfected with a *c-fos* luciferase vector together with either 600 ng each of TFII-I or mPIASx β or 800 ng of HDAC3 expression vectors in indicated combinations. Relative luciferase activity was measured in the absence (open bars) or presence of 25 ng/ml rhEGF (solid bars). Lanes 1 and 2, empty vector; 3 and 4, 600 ng of TFII-I; 5 and 6, 600 ng of mPIASx β ; 7 and 8, 800 ng of HDAC3; 9 and 10, 600 ng of TFII-I + 800 ng of HDAC3; 11 and 12, 600 ng of mPIASx β + 800 ng of HDAC3; 13 and 14, 600 ng of TFII-I + 600 ng of mPIASx β ; 15–20, 600 ng of mPIASx β + 800 ng of HDAC3 + increasing concentrations of TFII-I; 21–26, 600 ng of TFII-I + 800 ng of HDAC3 + increasing concentrations of mPIASx β (15, 16, 21, and 22, 600 ng; 17, 18, 23, and 24, 1,200 ng; 19, 20, 25, and 26, 1,800 ng). The result is the average of a representative experiment done in triplicate. (Lower) Western blot analyses of representative lysates.

FLAG-tag, whereas TFII-I, hMusTRD1/BEN, and PIASx β were visualized by fluorescence by virtue of their GFP tags. Under our conditions, HDAC3 was expressed both in the cytoplasm and in the nucleus (Fig. 1A). Under the same conditions, TFII-I was expressed predominantly in the nucleus. Although distinct colocalization was observed when both were coexpressed, a significant amount of HDAC3 remained in the cytoplasm. It is unclear at the moment whether the proportion of nuclear HDAC3 is greater when coexpressed with TFII-I. Similar staining and colocalization patterns were observed with hMusTRD1/BEN and PIASx β either when expressed individually or when coexpressed with HDAC3. It is also apparent that ectopic expression of TFII-I (34) and, particularly, PIASx β gave rise to speckled nuclear dots resembling those of promyelocytic leukemia (PML) bodies (22, 27–29). HDAC3 colocalized with these proteins in the nucleus, further suggesting that these proteins may interact physically with each other in nuclear and/or subnuclear regions. Colocalization of these proteins with HDAC1 in the nucleus also is observed (data not shown). Because TFII-I is activated in response to growth factors, we tested the colocalization of TFII-I with HDAC3 in the absence or presence of EGF. However, no apparent differences were observed under our conditions (data not shown).

Our immunohistochemical analysis demonstrated a broad and extensive overlap expression of BEN and TFII-I during mouse postimplantation development (unpublished results), further suggesting that these proteins may have functional association during early embryogenesis. Consistent with this notion, we show that in mouse embryo (around E10.5), the expression patterns of TFII-I, BEN, and HDAC3 in the neural tube, somites, and dorsal root ganglia are very similar (Fig. 1B).

Physical Interactions of HDAC3 with TFII-I, hMusTRD1/BEN, and PIASx β . Given the colocalization of these proteins, we directly tested their physical interactions. Because TFII-I has multiple isoforms, we also tested the interaction potentials of some of these isoforms with HDAC3. For this purpose, either TFII-I α , TFII-I β , TFII-I Δ , hMusTRD1/BEN, or PIASx β (all GST-tagged) were transiently coexpressed with HDAC3 (FLAG-tagged) in COS7 cells. Interaction with HDAC3 was assessed by immunoprecipitation with an anti-FLAG antibody, and the interacting proteins were visualized by probing with an anti-GST antibody. Although all three isoforms of TFII-I interacted with HDAC3 (Fig. 24) either in the absence or presence of EGF, interaction of the α -isoform was noticeably less than either the Δ - or the β -isoform. Similarly, hMusTRD1/BEN

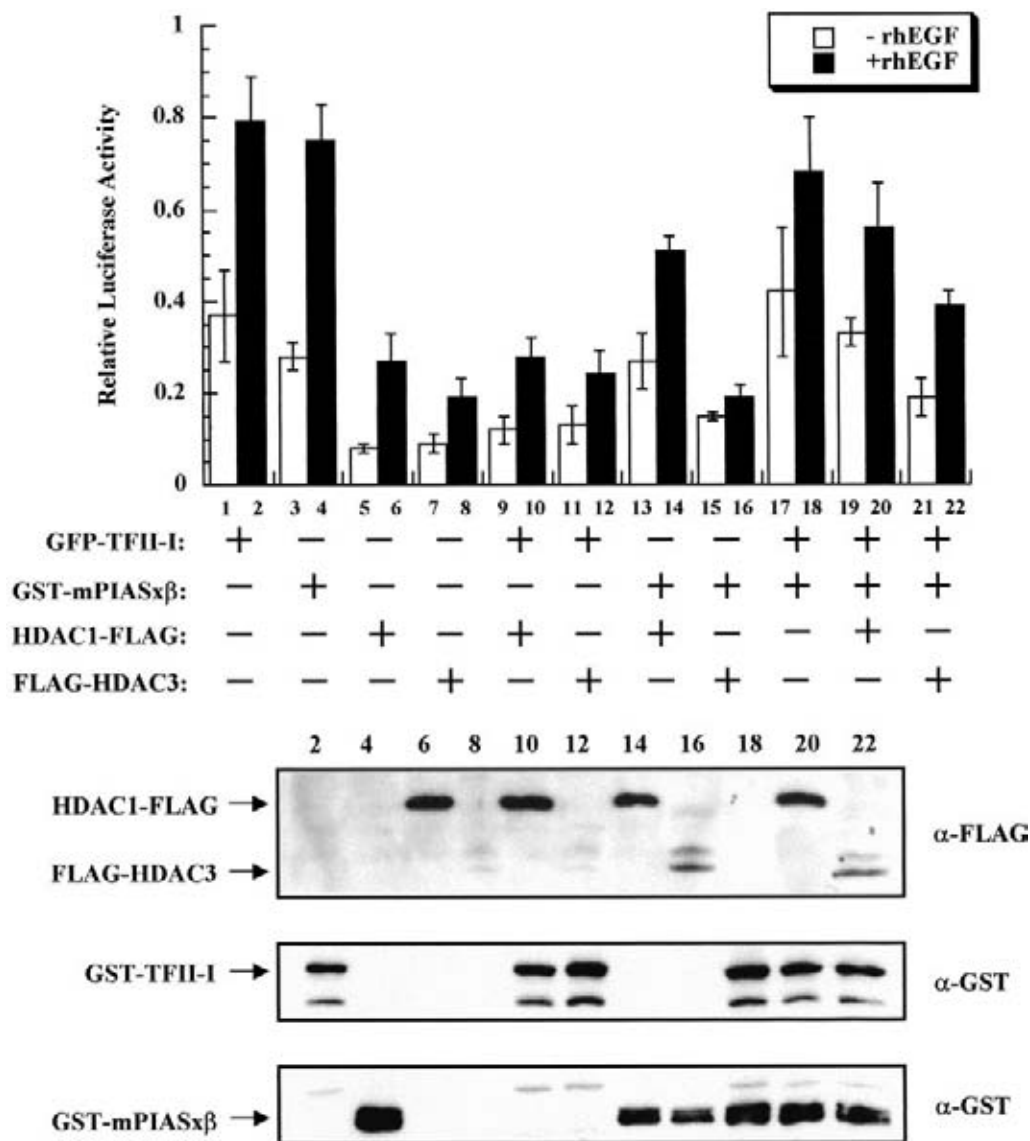


Fig. 4. HDAC3 is better than HDAC1 as a repressor of TFII-I and mPIASxβ transcriptional activity. Relative *c-fos* luciferase activity in the absence (open bars) or presence of 25 ng/ml rhEGF (solid bars) of indicated expression plasmids is shown (Upper). Lanes 1 and 2, 800 ng of TFII-I; 3 and 4, 800 ng of mPIASxβ; 5 and 6, 800 ng of HDAC1; 7 and 8, 800 ng of HDAC3; 9–12, 800 ng of TFII-I + 800 ng of HDAC1 (9 and 10) or 800 ng of HDAC3 (11 and 12); 13–16, 800 ng of mPIASxβ + 800 ng of HDAC1 (13 and 14) or 800 ng of HDAC3 (15 and 16); 17–22, 600 ng of TFII-I + 1,200 ng of mPIASxβ (17 and 18) + 800 ng of HDAC1 (19 and 20) or 800 ng of HDAC3 (21 and 22). The result is the average of a representative experiment done in triplicate. (Lower) Western blot analyses of representative lysates.

interacted with HDAC3 either in the absence or presence of EGF. Interaction of PIASxβ with HDAC3 was much greater than observed either with TFII-I isoforms or with hMusTRD1/BEN. Once again, however, no apparent differences were observed in the presence or absence of EGF. Western blot analysis was performed to ascertain the levels of expression of all of the proteins (Fig. 2B). The various isoforms of TFII-I all were expressed at a comparable level and similar to PIASxβ. But, hMusTRD1/BEN was expressed at a considerably lower level. Thus, when normalized to the expression levels, it appears that hMusTRD1/BEN and PIASxβ interact better than TFII-IΔ with HDAC3. However, because the expression of HDAC3 in cells coexpressing hMusTRD1/BEN is also lower than cells coexpressing either TFII-Iα and TFII-Iβ isoforms or PIASxβ proteins, the interactions between hMusTRD1/BEN with HDAC3 could be even greater. Interactions of these proteins with HDAC1 also was observed, although they were weaker than observed with HDAC3 (data not shown).

HDAC3 Represses TFII-I- and PIASxβ-Dependent Transcription. HDAC proteins are known to function as repressors/corepressors. Thus, we tested whether HDAC3 would repress TFII-I-dependent activation of the *c-fos* promoter in a transient, cotransfection assay. We have shown that PIASxβ stimulates the *c-fos* promoter in the presence of EGF, most likely reflecting a coactivator function with endogenous TFII-I (39). Whereas both TFII-I and PIASxβ activated the *c-fos* promoter in EGF-dependent fashion, HDAC3 repressed both TFII-I- and PIASxβ-dependent transcription (Fig. 3). However, HDAC3 appears to be expressed generally at low levels. We also have shown that PIASxβ functions as a coactivator with TFII-I to stimulate the *c-fos* promoter (39). Although, HDAC3 repressed the transcriptional coactivation by TFII-I and PIASxβ, the repression was almost fully relieved in the presence of increasing amounts of TFII-I. Relief of HDAC3-mediated transcriptional repression was observed in the presence of increasing amounts of PIASxβ, but a plateau was reached at the highest levels of PIASxβ.

The latter could be a result of the decreased expression of TFII-I, which often is observed at very high concentrations of PIASx β expression plasmid. Taken together, these results suggest that perhaps HDAC3 can be titrated away from the promoter by either TFII-I or PIASx β in a concentration-dependent manner.

Given that under our experimental conditions HDAC3 interacted better with both TFII-I and PIASx β than HDAC1, we tested whether there is a difference in the repressive potentials between HDAC1 and HDAC3. Employing similar transient transfection assays, we evaluated the repression by both HDAC3 and HDAC1 (Fig. 4). Although TFII-I- and PIASx β -dependent transcription was repressed significantly by HDAC1 and HDAC3, the latter was more efficient in the case of PIASx β compared with TFII-I. A substantial difference between HDAC1 and HDAC3 also was observed when both TFII-I and PIASx β were present together. These results may reflect the fact that HDAC3 interacts better with both proteins than HDAC1 and that HDAC3 interacts far better with PIASx β than with TFII-I.

Discussion

The packaging of eukaryotic DNA with histones into higher-order chromatin structure gives rise to an additional layer of regulation of gene expression at the level of promoter accessibility (1–3). Thus, the mechanism of action of chromatin-remodeling complexes and histone-modifying enzymes in the activation and repression of transcription has become a highly active area of study. Because binding of gene-specific transcription factors is a prerequisite for active transcription, it is generally believed that there must be an active communication between transcription factors and chromatin-modifying molecules. The chromatin-modifying molecules, depending on their particular activity and association with specific transcription factors, can be classified either as transcriptional coactivators or corepressors (1–3). Here, we show both physical and functional association of HDAC3 with TFII-I family proteins and PIASx β , a member of the E3 ligase family proteins involved in SUMOylation of several transcription factors (20–23).

Although association of HDAC3 was observed with three predominant isoforms of TFII-I, α -isoform interacts much less than the other two isoforms. The reason for this is not clear at present. Moreover, at present, we also do not know whether HDAC3-mediated repression of TFII-I-dependent transcription involves enzymatic modification of TFII-I. The interactions of hMusTRD1/BEN with HDAC3 are better than those of TFII-I with HDAC3. Given that hMusTRD1/BEN may behave as a transcriptional repressor, at least under some conditions, it is not totally surprising

that hMusTRD1/BEN could be better associated with HDAC3 *in vivo*. Together with the fact that these factors colocalize in nuclear dots, which potentially may represent PML bodies, our data raise the possibility that the functional activity of the TFII-I family of transcription factors may be modulated by association with HDAC proteins in PML bodies. Regardless of the potential association of HDAC proteins with the TFII-I family in PML bodies, it is clear that these proteins colocalize in cultured cells and exhibit overlapping expression patterns in developing tissues. It has been demonstrated in *Xenopus* oocytes that maternal HDAC with potential enzymatic activity is accumulated in nuclei (35). Here, we show that in the developing mouse embryo, the expression patterns of TFII-I, MusTRD1/BEN, and HDAC3 are very similar. These data raise the possibility that the transcriptional activity of the TFII-I family of transcription factors may be controlled by HDACs during early development.

One of the more exciting findings is the physical and functional association of PIASx β with HDAC3. The PIAS family proteins first were identified as inhibitors of signal transducers of activated transcription factors (STATs; refs. 36–38). Structurally, they are characterized by the presence of a RING-like zinc-finger motif that is thought to be involved in protein–protein interactions (17–19). A number of different and functionally distinct RING-finger proteins have been implicated in ubiquitin and SUMO-dependent pathways (17, 18). The PIAS family proteins behave as E3 ligases in SUMOylation of several transcription factors in both yeast and mammalian cell-free systems (20–23). Besides their enzymatic functions, this family of proteins also may have regulatory roles related to chromosome structure and/or function (24–26). An interesting connection between HDAC activity and the SUMO pathway recently was provided by DePinho and colleagues, which showed that the HDAC1 molecule is modified by SUMO-1 and that this modification can dramatically alter HDAC1 activity (32). Our data provide a direct demonstration that a key intermediate in the SUMO pathway, PIASx β , physically interacts with HDAC3. However, although PIASx β interacts with HDAC3, the latter does not appear to have a consensus SUMOylation site. Thus, we favor a model in which the PIASx β may provide a regulatory role to control the activity of HDAC3. Current efforts in our laboratory are directed toward understanding the complex role of PIASx β in simultaneously modulating HDAC and TFII-I activities.

We thank Peter Brodeur for critical reading of the manuscript, and Stuart Schreiber for his generous gift of the HDCA1 cDNA. This work was supported by National Institutes of Health Grant AI45150 (to A.L.R.).

- Cress, W. D. & Seto, E. (2000) *J. Cell. Physiol.* **184**, 1–16.
- Marmorstein, R. (2001) *Nat. Rev.* **2**, 422–432.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y. & Kingston, R. E. (2002) *Cell* **108**, 475–487.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000) *Nature (London)* **403**, 41–45.
- Bayarsaihan, D. & Ruddle, F. H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7342–7347.
- Frank, Y., Peoples, R. J. & Francke, U. (1999) *Cytogenet. Cell Genet.* **86**, 296–304.
- O'Mahoney, J. V., Guven, K. L., Lin, J., Joya, J. E., Robinson, C. S., Wade, R. P. & Hardeman, E. C. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6641–6652.
- Osborne, L. R., Campbell, T., Daradich, A., Scherer, S. W. & Tsui, L. C. (1999) *Genomics* **57**, 279–284.
- Tassabehji, M., Carette, M., Wilmut, C., Donnai, D., Read, A. P. & Metcalfe, K. (1999) *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 737–747.
- Yan, X., Zhao, X., Qian, M., Guo, N., Gong, X. & Zhu, X. (2000) *Biochem. J.* **345**, 749–757.
- Perez-Jurado, L. A., Wang, Y. K., Peoples, R., Coloma, A., Cruces, J. & Francke, U. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 325–334.
- Roy, A. L., Du, H., Gregor, P. D., Novina, C. D., Martínez, E. & Roeder, R. G. (1997) *EMBO J.* **16**, 7091–7104.
- Wang, Y. K., Perez-Jurado, L. A. & Francke, U. (1998) *Genomics* **48**, 163–170.
- Cheriyath, V. & Roy, A. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 26300–26308.
- Tussié-Luna, M. I., Bayarsaihan, D., Ruddle, F. H. & Roy, A. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7789–7794.
- Bayarsaihan, D., Dunai, J., Grealley, J. M., Kawasaki, K., Sumiyama, K., Enkhmandakh, B., Shimizu, N. & Ruddle, F. H. (2002) *Genomics* **79**, 137–143.
- Freemont, P. S. (2000) *Curr. Biol.* **10**, R84–R87.
- Hochstrasser, M. (2001) *Cell* **107**, 5–8.
- Kentsis, A., Gordon, R. E. & Borden, K. L. B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 667–672.
- Johnson, E. S. & Gupta, A. A. (2001) *Cell* **106**, 735–744.
- Kahyo, T., Nishida, T. & Yasuda, H. (2001) *Mol. Cell* **8**, 713–718.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. & Grosschedl, R. (2001) *Genes Dev.* **15**, 3088–3103.
- Schmidt, D. & Müller, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2872–2877.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 112–114.
- Hari, K. L., Cook, K. R. & Karpen, G. H. (2001) *Genes Dev.* **15**, 1334–1348.
- Strunnikov, A. V., Aravind, L. & Koonin, E. V. (2001) *Genetics* **158**, 95–107.
- Valdez, B. C., Henning, D., Perlaky, L., Busch, R. K. & Busch, H. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 335–340.
- Molainen, A., Karvonen, U., Poukka, H., Yan, W., Toppari, J., Jänne, O. A. & Palvimo, J. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3700–3704.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A. & Palvimo, J. J. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5222–5234.
- Matiullah, K., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P. P. & Ishii, S. (2001) *Mol. Cell* **7**, 1233–1243.
- Wu, W. S., Vallian, S., Seto, E., Yang, W. M., Edmonson, D., Roth, S. & Chang, K. S. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2259–2268.
- David, G., Neptune, M. A. & DePinho, R. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 23658–23663.
- Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R. & Seto, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28001–28007.
- Novina, C. D., Kumar, S., Bajpai, U., Cheriyath, V., Zhang, K., Pillai, S., Wortis, H. H. & Roy, A. L. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5014–5024.
- Ryan, J., Llinas, A. J., White, D. A., Turner, B. M. & Sommerville, J. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 2441–2452.
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. & Shuai, K. (1997) *Science* **278**, 1803–1805.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. & Shuai, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10626–10631.
- Liu, B., Gross, M. I., tenHoeve, J. & Shuai, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3203–3207.
- Tussié-Luna, M. I., Michel, B., Hakre, S. & Roy, A. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, in press.
- O'Mahoney, J. V., Guven, K. L., Lin, J., Joya, J. E., Robinson, C. S., Wade, R. P. & Hardeman, E. C. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5361.