

Departamento de Fisiología

Regulación de la transcripción de los genes *SND1 (Homo sapiens)* y *SNDp102 (Rattus norvegicus)*

Transcriptional regulation of *SND1 (Homo sapiens)* and *SNDp102 (Rattus norvegicus)* genes

Sandra Armengol López

Leioa, Diciembre 2011

Durante la realización del presente trabajo, he sido beneficiaria de una beca-contrato predoctoral para la Formación de Investigadores otorgada por la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibersitatea durante el período comprendido entre Mayo del 2007 y Mayo del 2011 y con la Ref. PIFA01/2006/001. Además, he disfrutado de una ayuda para la movilidad de estudiantes de doctorado (mención europea) durante el curso 2009-2010 del Ministerio de Educación y Ciencia, la cual ha contribuido a la realización de una estancia de 3 meses en el *Royal Veterinary College* de Londres (Reino Unido).

Este trabajo ha sido subvencionado por la UPV, el Gobierno Vasco y el Ministerio de Educación y Ciencia en varios proyectos de investigación.

*Seguirem somiant, escoltarem la llum,
mentre el món es mou dins dels teus ulls.*

*Seguirem lluitant, ensorrarem els mars,
anirem sempre més lluny.*

- Sopa de Cabra -



Cuántas sensaciones, sentimientos y recuerdos recorren mi mente. Ahora, que es el momento de mirar hacia atrás y hacer resumen de todo lo vivido, me siento muy bien de haber aprovechado la oportunidad para pasar aquí todo este tiempo.

El nudo en el estómago, que lleva aquí ya hace unos meses, aprieta con fuerza cada vez que pienso en este “librito” que, para mí, es como el lugar donde guardo esos billetes de la primera visita BCN-Bilbao, algunas tarjetas de cumpleaños, el boli de la licenciatura, identificaciones de congresos... momentos dulces, mezclados con algunos amargos.

No quisiera hacer distinciones, pero me es imposible, ya que es una necesidad agradecer a la gente que más te ha apoyado.

Gracias Lorena, por la transferencia de información en mis primeros pasos en el labo.

Mila esker Enara! Siempre con una sonrisa, palabras amables... Muchas gracias de todo corazón por los ratillos de risas, por las xafarderías, por las meriendas... pero sobretodo, por estar siempre a mi lado y ayudarme tantísimo. Y aunque intentaré que recibas lo mismo de mí, sé que allí donde acabe nunca tendré una euskocompi como tú!

Ainara, loca, siempre he sentido envidia de tu carácter entusiasta y emprendedor, me alegro mucho de haber pasado tantos momentos juntas y haber disfrutados de tu gran sentido del humor y tus mil y una historietas.

Agradecer muchísimo la paciencia y dedicación de mis dos directoras de tesis, M^a José y Yolanda. Gracias M^a José por transmitirme ese nervio con toques de curiosidad, seguido de baños de sinónimos. Y a ti Yolanda, por esa tranquilidad y eficacia con las “sopas” de comas. El mix es lo que os hace un dúo genial.

Una vez alguien me dijo que era el futuro, y aquí estoy haciendo del futuro algo nuestro. Gracias, aunque también lo siento, sobretodo por estos últimos meses; por el apoyo, por todas las esperas, por tu amor incondicional, por tus ojos que me encantan y por tu sonrisa que vale millones. T'estimo molt carinyo.

Tot això no hauria sigut possible sense l'ajuda que sempre m'ha donat la meva família. Mama, gràcies per les hores d'estudi compartides i ensenyar-me a ser constant. A tu, papa, per descobrir-me la “oruguita” i poder d'aquesta manera voler sempre pujar a lo més alt. Nati, gràcies per fer-me veure l'altra cara de les situacions i per tots els momentazos viscuts juntes, t'estimo. Avis y Aitites, gracias por vuestro empeño en estar siempre juntos para lo bueno y lo menos bueno.

Agradezco de todo corazón a todos l@s compañer@s del labo (que son un montón), tanto a los que están como a los que estuvieron, que ayudan a pasar con alegría las decepciones y más amenas las esperas. Así como a los demás profesores, gente de administración y técnico del labo, que no dudan en echarme una mano. Y por supuesto a “nuestras” chicas (Leire y Sarai), que son como aire fresco en cada uno de los experis y espero que os ganéis muchas chapitas de aquí en adelante. Eskerrik Asko.

Special thanks to Kathy Botham and Charlotte Lawson for giving me the opportunity to learn fascinating things in my time in London. Like all members of the department for their enthusiastic welcome.

ABREVIATURAS

A

AEG-1	Astrocite elevated gene-1
AGO	Argonaute
AP	Adaptor Primers
AT1R	Angiotensin II type 1 receptor
ATCC	American Type Culture Collection

B

bHLH-Z	básico Hélice-lazo-hélice-cremallera de leucina
BRE	TFIIB recognition element
BSA	Albúmina de suero bovino

C

CBP	CREB-binding protein
CDP	CCAAT Displacement Protein
CE	Colesterol esterificado
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CEH	Colesterol éster hidrolasa
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina/ Chromatin immunoprecipitation
Ct	ciclo umbral
CTF	CCAAT Transcription Factor
CYP7A1	Colesterol 7 α -hidroxilasa

D

DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
DPE	Downstream Promoter Element
DR	Repeticiones directas
DS/SD	Desviación estándar/Standard deviation

E

E-box	Enhancer Box sequence
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética/ Electrophoretic mobility shift assay

Abreviaturas

F

FAS Ácido graso sintasa

G

GSP Oligonucleótido específico del gen/ Gene Specific Primer

H

HMG-CoA 3-Hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A

I

Inr Secuencia iniciadora

IOD Densidad óptica integrada

IP Inmunoprecipitación

K

Kpb Kilopares de bases

KLF Kruppel-like factor

L

LB Luria Bertani

LDL Low density lipoprotein

LUC Luciferasa

LXR Liver X receptor

LXRE Liver X receptor element

M

miR MicroRNA

mRNA RNA mensajero

MTDH Metadherin

MTP Proteína microsomal transferidora de triglicéridos

N

n Número de experimentos

NCBI National Centre for Biotechnology Information

NF-1 Nuclear Factor 1

NF-Y Nuclear Factor Y

O

ONPG Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranososa

Oct Octamer-Binding Factor

P

pb Pares de bases/ Base pair

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pir	Pirimidina
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
R	
RE	Retículo endoplasmático
rh	Proteína recombinante humana
RISC	RNA-induced silencing complex
RT	Retrotranscripción
RXR	Retinoid X Receptor
S	
S1P	Site-1 protease
S2P	Site-2 protease
SCAP	SREBP Cleavage-Activating Protein
siRNA	Small interfering RNA
SND	Staphylococcal Nuclease domain
snRNA	Small nuclear RNA
snRNP	Small nuclear ribonucleoproteins
Sp1	Specificity Protein 1
SRE	Sterol Regulatory Element
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription protein
T	
TAF	TBP-associated factor
TBP	TATA Binding Protein
TF	Factor de transcripción/ Transcription factor
TFII	Factor de transcripción general II
TLF	TBP-like factor
T _m	Temperatura de fusión
TRF	TBP-related factor
U	
URL	Unidades relativas de luminiscencia
Y	
YY1	Ying Yang factor 1

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS.....	- 3 -
1.1.1 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN	- 3 -
1.1.1.1 Transcripción basal.....	- 4 -
1.1.1.2 Transcripción regulada	- 6 -
1.2 SND1 Y SNDp102.....	- 14 -
1.2.1 ANTECEDENTES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN	- 20 -
2 OBJETIVOS	- 23 -
3 MATERIALES.....	- 27 -
3.1 LINEAS CELULARES	- 29 -
3.1.1 HepG2 (HEPATOMA HUMANO)	- 29 -
3.1.2 McA-RH7777 (HEPATOMA DE RATA).....	- 29 -
3.2 CEPAS BACTERIANAS.....	- 29 -
3.3 VECTORES.....	- 30 -
3.3.1 pGL3-Basic.....	- 30 -
3.3.2 pRL-TK	- 30 -
3.3.3 pSV- β -Galactosidasa	- 31 -
3.3.4 pSV Sport SREBP-1c/ pSV Sport SREBP-1c dom neg	- 31 -
3.3.5 PPRE X3-TK-luc	- 32 -
3.3.6 FAS promoter luciferase	- 32 -
3.3.7 pSV Sport PPAR γ 1	- 32 -
3.3.8 pTrcHisA-PPAR α (aa101-468)	- 32 -
3.4 REACTIVOS QUÍMICOS	- 32 -
3.5 HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS	- 33 -
3.5.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR.....	- 33 -
3.5.2 MAPAS DE RESTRICCIÓN DE SECUENCIAS DE DNA.....	- 33 -
3.5.3 ALINEACIÓN DE SECUENCIAS.....	- 33 -
3.5.4 ANÁLISIS DE LUGARES RECONOCIDOS POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	- 34 -
3.5.5 BÚSQUEDA DE ISLAS CpG	- 35 -
3.5.6 ANALIZADORES DE SECUENCIAS DE DNA	- 35 -

3.5.7 NORMALIZACIÓN DE DATOS DE qPCRs.....	- 36 -
3.6 EQUIPAMIENTO	- 36 -
4 MÉTODOS.....	- 38 -
4.1 AISLAMIENTO Y ELONGACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1	
HUMANO	-38 -
4.1.1 AISLAMIENTO DE LA REGIÓN PROMOTORA	- 38 -
4.1.2 ELONGACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA.....	- 40 -
4.1.3 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.....	- 40 -
4.1.4 PURIFICACIÓN DE DNA.....	- 40 -
4.1.5 SECUENCIACIÓN DE DNA	- 41 -
4.2 CLONACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1 HUMANO.....	- 41 -
4.2.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DELECIÓN 5'	- 41 -
4.2.2 DIGESTIÓN DEL VECTOR INDICADOR pGL3-Basic Y DE LOS FRAGMENTOS DE	
DELECIÓN 5' DE LA REGIÓN PROMOTORA.....	- 42 -
4.2.3 LIGACIÓN DEL VECTOR pGL3-Basic CON LOS FRAGMENTOS DE DELECIÓN 5' DEL	
PROMOTOR DE SND1.....	- 43 -
4.2.4 TRANSFORMACIÓN DE E. coli TG1 o JM109 CON LOS FRAGMENTOS DEL	
PROMOTOR DE SND1 CLONADOS EN pGL3-Basic.....	- 44 -
4.2.5 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO	- 45 -
4.2.5.1 (MINIPREP) Purificación a pequeña escala de DNA plasmídico	- 45 -
4.2.5.2 (MIDIPREP) Purificación a mediana escala de DNA plasmídico	- 45 -
4.3 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	- 46 -
4.3.1 DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	- 46 -
4.3.2 PCR MUTAGÉNICA.....	- 46 -
4.3.3 DIGESTIÓN CON DpnI.....	- 47 -
4.3.4 TRANSFORMACIÓN DE E. coli Y SELECCIÓN DE RECOMBINANTES MUTADOS EN	
LOS LUGARES DE UNIÓN DE Sp1 Y NF-Y.....	- 48 -
4.4 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES DE HEPATOMAS HepG2 Y McA-RH7777	- 48 -
4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE GENES	
MARCADORES (<i>Reporter Gene Assay</i>).....	- 49 -
4.5.1 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.....	- 49 -
4.5.2 ENSAYO DE LOS GENES MARCADORES	- 49 -

4.6 UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN A LOS PROMOTORES DE LOS GENES SND1 HUMANO Y SNDp102 DE RATA MEDIANTE EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>).....	- 51 -
4.6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE HEPATOMA	- 51 -
4.6.2 MARCAJE DE SONDAS CON DIGOXIGENINA	- 52 -
4.6.3 FORMACIÓN DEL COMPLEJO DNA-PROTEÍNA.....	- 54 -
4.6.4 ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE.....	- 54 -
4.7 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)	- 55 -
4.7.1 FIJACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL DNA	- 55 -
4.7.2 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)	- 56 -
4.7.3 REVERSIÓN DE LA FIJACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA.....	- 57 -
4.7.4 CUANTIFICACIÓN DEL DNA INMUNOPRECIPITADO.....	- 57 -
4.7.4.1 PCR convencional	- 58 -
4.7.4.2 PCR a tiempo real.....	- 58 -
4.8 CUANTIFICACIÓN DE RNA	- 60 -
4.8.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS HepG2 Y McA-RH7777.....	- 60 -
4.8.2 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).....	- 61 -
4.8.3 CUANTIFICACIÓN DEL mRNA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL	- 62 -
4.9 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	- 63 -
4.10 CUANTIFICACIÓN DE SND1 Y SNDp102 MEDIANTE WESTERN BLOTTING	- 63 -
4.11 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	- 65 -
5 RESULTADOS.....	- 67 -
5.1 AISLAMIENTO Y ELONGACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1 HUMANO	-69 -
5.2 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS AL PROMOTOR DEL GEN SND1 HUMANO	- 73 -
5.3 CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN SND1 HUMANO	- 74 -
5.3.1 ELEMENTOS DEL PROMOTOR BASAL.....	- 75 -
5.3.2 ISLAS CPG	- 76 -
5.3.3 CAJAS GC Y CCAAT.....	- 76 -
5.3.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN REGULADORES.....	- 78 -

5.4 ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS FRAGMENTOS DE DELECIÓN 5' DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1 HUMANO.....	- 79 -
5.5 IMPLICACIÓN DE Sp1 Y NF-Y EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN SND1 HUMANO	- 81 -
5.5.1 ESTUDIO DE LA UNIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Sp1 Y NF-Y MEDIANTE EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	- 81 -
5.5.2 LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP) REVELA LA ASOCIACIÓN <i>in vivo</i> DE Sp1 Y NF-Y A LOS PROMOTORES DE SND1 Y DE SNDp102	- 85 -
5.5.3 LAS MUTACIONES DE LUGARES DE UNIÓN DE Sp1 Y NF-Y EN EL PROMOTOR DE SND1 REDUCEN SU ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL.....	- 88 -
5.6 IMPLICACIÓN DE SREBP EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES SND1 HUMANO Y SNDp102 DE RATA.....	- 91 -
5.6.1 ESTUDIO DE LA UNIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SREBP MEDIANTE EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>).....	- 91 -
5.6.2 LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP) REVELA LA ASOCIACIÓN <i>in vivo</i> DE SREBP-1 y SREBP-2 A LOS PROMOTORES DE SND1 Y DE SNDp102	- 94 -
5.6.3 REGULACIÓN POR SREBP DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES SND1 Y SNDp102.....	- 95 -
5.6.3.1 Efecto de la sobreexpresión de SREBP-1c sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102.....	- 95 -
5.6.3.2 Efecto de simvastatina y mevalonolactona sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102.....	- 97 -
5.6.4 NIVELES DE mRNA Y PROTEÍNA DE SND1 Y DE SNDp102	- 99 -
5.6.5 EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE SREBP-1c SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR SND1 CON LOS LUGARES DE UNIÓN DE Sp1 y NF-Y MUTADOS	- 100 -
5.7 IMPLICACIÓN DE PPAR EN LA REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES SND1 HUMANO Y SNDp102 DE RATA.....	- 102 -
5.7.1 REGULACIÓN POR PPARs DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES SND1 Y SNDp102.....	- 102 -
5.7.1.1 Efecto de la sobreexpresión de PPAR α y PPAR γ sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102.....	- 102 -
5.7.1.2 Efecto de los activadores de PPARs sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102.....	- 104 -

5.7.2 NIVELES DE mRNA Y PROTEÍNA DE SND1 Y DE SNDp102 - 107 -

6 DISCUSIÓN - 109 -

7 CONCLUSIONES - 119 -

8 BIBLIOGRAFÍA - 123 -

APPENDIX: ENGLISH SUMMARY - 141 -

I INTRODUCTION - 143 -

 I.1 SND1 - 143 -

II OBJECTIVES - 149 -

III RESULTS AND DISCUSSION - 151 -

 III.1 ISOLATION OF THE HUMAN SND1 GENE PROMOTER REGION - 151 -

 III.2 CHARACTERIZATION OF THE HUMAN SND1 GENE PROMOTER REGION - 153 -

 III.3 FUNCIONAL ANALYSIS OF THE SND1 GENE PROMOTER - 154 -

 III.4 INVOLVEMENT OF Sp1 AND NF-Y IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF
HUMAN SND1 AND RAT SNDP102 GENES - 155 -

 III.5 INVOLVEMENT OF SREBP IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN SND1
AND RAT SNDp102 GENES - 159 -

 III.6 INVOLVEMENT OF PPAR IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN SND1
AND RAT SNDp102 GENES - 164 -

IV CONCLUSIONS - 167 -

1. INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES

MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BILBIOGRAFIA

1 INTRODUCCIÓN

1.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS

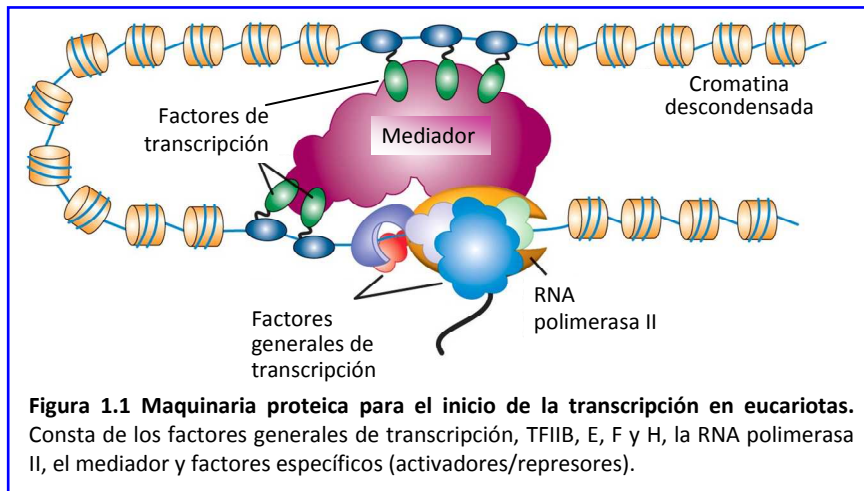
La célula eucariota se enfrenta al reto de regular adecuadamente cada uno de sus decenas de miles de genes. Considerando que cada gen contiene su propio programa de expresión, es evidente que el control de la actividad de los genes requiere una enorme cantidad de recursos, entre instrucciones para la regulación de cada gen y factores que median en la expresión génica.

El mantenimiento de la concentración celular de una proteína implica un equilibrio preciso entre muchos procesos. Como principales puntos de regulación destacan el inicio de la transcripción, el procesamiento postranscripcional del mRNA (RNA mensajero), la degradación del mRNA, la síntesis proteica, las modificaciones postrasduccionales, la degradación proteica, el transporte y la localización específica de la proteína en la célula.

1.1.1 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

El promotor es el lugar donde se encuentra mucha de la información específica del programa para la transcripción génica, que es uno de los pasos esenciales en el control de la expresión de un gen. Esta región de DNA contiene motivos en su secuencia a los que se unen de forma específica factores de transcripción (TFs), que funcionan como interruptores de la transcripción génica, activándola o inhibiéndola (Suzuki et al., 2001).

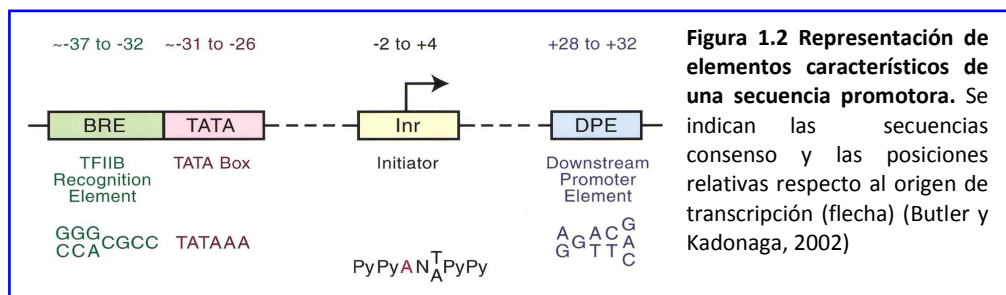
El ensamblaje de la maquinaria para la iniciación de la transcripción en humanos es un punto clave en el control de la síntesis de mRNA y depende de la RNA polimerasa II, de los factores de transcripción generales y del mediador (Kelleher et al., 1990; Kim et al., 1994). Los factores de transcripción generales, denominados TFIIB, D, E, F y H, junto con la RNA polimerasa II forman el complejo de preiniciación, el cual reconoce el lugar de inicio de la transcripción (+1) para comenzar la síntesis de mRNA (Bernecky et al., 2011; Seizl et al., 2011). El mediador es un complejo multiproteico que actúa como puente de información entre el complejo de preiniciación y los factores de transcripción reguladores que se unen generalmente hacia el extremo 5' del promotor (Szutorisz et al., 2005) (Figura 1.1).



El inicio de la transcripción también implica la remodelación de la cromatina del estado inactivo al activo, siendo el mecanismo más común para su conversión la adición de grupos acetilos o metilos a las histonas mediante las enzimas histona acetilasas o metilasas (Lewis and Reinberg, 2003; Bulger, 2005).

1.1.1.1 Transcripción basal

El promotor basal es la mínima estructura de DNA que contiene los elementos de unión necesarios y suficientes para un inicio correcto de la transcripción. Su función principal es la de dirigir el inicio de la transcripción mediante la maquinaria basal o complejo de preiniciación, que reconoce los elementos basales del promotor, como la caja TATA, el elemento BRE (*TFIIB recognition element*), la secuencia iniciadora (Inr), el elemento DPE (*Downstream promoter element*) y las islas CpG (Figura 1.2).



Caja TATA

La caja TATA fue el primer elemento basal eucariota identificado, presenta una secuencia consenso 5'-TATAAA-3' y se localiza entre los 25 y 30 nucleótidos anteriores al inicio de la transcripción. La caja TATA es reconocida por la proteína TBP (*TATA-binding protein*), que junto a

diversas proteínas TRFs (*TBP-Related factor*) y TLFs (*TBP-like factor*) forman el complejo TFIID responsable de identificar el punto exacto de inicio de la transcripción (Smale and Kadonaga, 2003).

Inicialmente, se pensó que la caja TATA era un componente esencial para iniciar la transcripción, pero al analizar un número más elevado de promotores se demostró una escasa prevalencia (Baumann et al., 2010). Suzuki et al. analizaron 1.031 promotores basales de humano, de los que sólo un 32% contenían caja TATA (Suzuki et al., 2001).

Elemento BRE

El elemento BRE se localiza entre 31 y 38 nucleótidos anteriores al inicio de la transcripción junto a la caja TATA, su secuencia consenso es 5'-G/CG/CG/ACGCC-3' (Lagrange et al., 1998) y es reconocida por el factor TFIIB. Recientemente, también se ha identificado el elemento BRE corriente abajo de la caja TATA (Deng and Roberts, 2005).

Secuencia Iniciadora o Inr

La secuencia Inr contiene el lugar de inicio de la transcripción. En mamíferos, la secuencia consenso es 5'-Pir-Pir(C)-A₊₁-N-T/A-Pir-Pir-3' (Javahery et al., 1994), la cual es reconocida por dos subunidades de TBP: TAF (*TBP-associated factor*) II250 (TAF1) y TAF II150 (TAF2) (Oelgeschlager et al., 1996; Chalkley and Verrijzer, 1999), además de TFII-I (Roy et al., 1997; Cheryath et al., 1998) y la proteína YY1 (*Ying Yang factor 1*) (Usheva and Shenk, 1996; Weis and Reinberg, 1997).

Elemento DPE

DPE se localiza en la región (+28,+32), más frecuentemente en promotores sin caja TATA. Su secuencia, 5'-A/GGA/TC/TG/A/C-3' (Kutach and Kadonaga, 2000), es reconocida por TFIID a través de las subunidades TAFII60 (TAF6) y TAFII40 (TAF9) (Kadonaga, 2002).

Islas CpG

Las islas CpG son regiones de DNA de entre 0,5 y 2 Kpb ricas en GC no metiladas (Bird, 1986; Gardiner-Garden and Frommer, 1987; Antequera and Bird, 1993; Adachi and Lieber, 2002), detectadas en un 70-80% de los promotores humanos (Baumann et al., 2010). Generalmente, las islas CpG están presentes en genes que carecen de caja TATA, Inr o elementos DPE (Javahery et al., 1994) y suelen contener múltiples sitios de inicio de la transcripción distribuidos en una región de unos 100 bp.

Estas islas CpG, en su mayoría no metiladas, se encuentran asociadas a genes transcripcionalmente activos. Se ha demostrado que la metilación del DNA juega un papel

importante en la regulación de la expresión génica. En las islas CpG el grado de metilación de las citosinas es inversamente proporcional a la actividad transcripcional, ya que los grupos metilo pueden interferir directamente con la unión de factores de transcripción (Suzuki and Bird, 2008).

En estas regiones destaca la alta presencia de cajas GC a las que se une el factor de transcripción Sp1, que, además de mantener el estado hipometilado de las islas, puede interaccionar con los factores de transcripción basales para activar el inicio de la transcripción (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994).

1.1.1.2 Transcripción regulada

En la transcripción regulada intervienen elementos de respuesta a los que se unen proteínas activadoras o represoras de la transcripción, sintetizadas en momentos concretos o en tipos celulares específicos.

Entre los factores de transcripción con actividad reguladora, son de interés para el presente estudio:

- ✚ Factores de transcripción de expresión ubicua: Sp1 y NF-Y
- ✚ Factores de transcripción reguladores del metabolismo lipídico: SREBP y PPAR

Sp1 (*Specificity protein 1*)

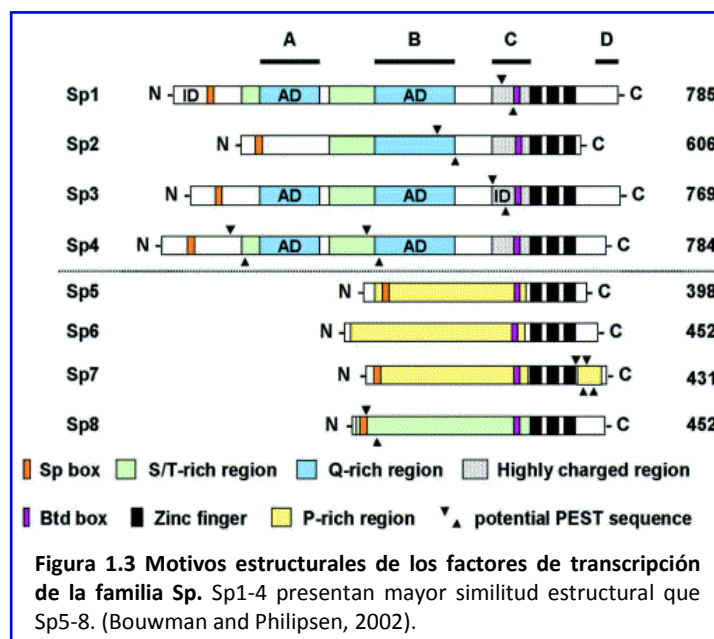
Sp1 fue el primer factor de transcripción purificado y caracterizado en mamíferos. En primer lugar se identificó como activador constitutivo, sin embargo, estudios recientes han demostrado que Sp1 se modifica por fosforilación en respuesta a estímulos extracelulares provocando cambios en su unión al DNA y en su actividad transcripcional.

Sp1 regula la actividad transcripcional de múltiples genes implicados en numerosos procesos biológicos, incluyendo el control del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis. Además, está implicado en el desarrollo de varias enfermedades humanas como el cáncer, la enfermedad de Huntington y la esteatosis hepática (Kim et al., 2011).

Sp1 es miembro de la familia de factores de transcripción Sp/KLF (*Specificity protein/Krüppel-like factor*). Dentro de esta familia, ocho miembros Sp (Sp1-8) se distinguen de los miembros KLF por su estructura. Los miembros del subgrupo Sp1-4, tienen una estructura conservada en más de un 65%. En células de mamífero, Sp1 y Sp3 están expresados ubicuamente, mientras que Sp2 y Sp4 tienen un patrón de expresión limitado. Sp2 se encuentra altamente expresado en células cancerígenas (Phan et al., 2004) y la expresión de Sp4 es elevada en el sistema nervioso central y en las neuronas retinales (Lerner et al., 2005). El otro subgrupo, Sp5-8,

contiene regiones completamente diferentes a Sp1-4, las cuales no han sido estudiadas con detalle.

Las proteínas Sp tienen muchos dominios con funciones relacionadas (Figura 1.3). La actividad de transactivación de Sp1 y Sp3 se encuentra en los dominios A y B. El dominio C contiene tres dedos de zinc, necesarios para la unión específica a los elementos de unión del DNA; y el dominio D, localizado en el extremo carboxilo, participa en la activación mediante la cooperación entre varios Sp1 (Pascal and Tjian, 1991).



La secuencia consenso de unión de Sp1 al DNA corresponde a la caja GC 5'-GGGGCGGGG-3'. Sin embargo, Sp1 y Sp3 pueden unirse con afinidad reducida a variantes de esta secuencia, como las cajas GT (5'-GGTGTGGGG-3') (Letovsky and Dynan, 1989). En promotores con múltiples lugares de unión para Sp, Sp1 coopera mediante interacciones directas proteína-proteína con otros Sp1 formando un polímero, mientras que Sp3 se une como monómero. Muchos estudios han demostrado que Sp3 reprime eficientemente la transcripción dependiente de Sp1 bloqueando la cooperación con otros Sp1 (Li and Davie, 2008).

Sp1 es capaz de estimular el inicio de la transcripción al unir su extremo N-terminal a la proteína TBP del complejo TFIID, favoreciendo la formación del complejo de preiniciación, lo que explica su habilidad para inducir la transcripción en genes sin caja TATA (Wierstra, 2008). Además, Sp1 puede modular la unión de otros factores de transcripción como SREBP (Naar et al., 1998), NF-Y (Kadonaga et al., 1987; Wright et al., 1995; Roder et al., 1999) o PPAR γ (Sugawara et al., 2002).

NF-Y (*Nuclear Factor-Y*)

El factor de transcripción NF-Y consta de tres subunidades evolutivamente conservadas y necesarias para la unión a DNA: NF-YA, NF-YB y NF-YC (Mantovani, 1999). Mientras NF-YB y NF-YC se expresan constitutivamente y sus niveles son relativamente constantes durante las diferentes fases del ciclo celular, los niveles de NF-YA fluctúan durante el ciclo (Bolognese et al., 1999).

NF-Y se une a secuencias denominadas cajas CCAAT, que pueden presentarse en orientación directa (5'-GGCCAATCT-3') o inversa (5'-AGATTGGCC-3') y se encuentran en promotores con o sin caja TATA (Maity and De Crombrughe, 1998; Mantovani, 1999).

En ausencia de caja TATA, NF-Y actúa reclutando la maquinaria transcripcional al asociarse con TBP, permitiendo a la RNA polimerasa II encontrar el punto de inicio de la transcripción (Bellorini et al., 1997). En la mayoría de estos promotores sin caja TATA, la orientación más frecuente de las cajas CCAAT es la inversa y generalmente se localizan en la región (-80,-40) (Mantovani, 1998).

Un análisis estadístico realizado en 500 secuencias promotoras, demuestra que la caja CCAAT está presente en el 30% de los promotores (Mantovani, 1999), aunque sólo en un 7-8% de los promotores humanos que la contienen es funcional (Cao et al., 2011). El factor de transcripción NF-Y requiere un alto grado de conservación de la secuencia CCAAT para su unión al DNA. Se han descrito otras proteínas de unión a DNA que reconocen secuencias que contienen cajas CCAAT dispuestas frecuentemente en palíndromos, aunque requieren un grado de conservación menor, como por ejemplo CTF/NF1 (*CCAAT Transcription Factor/Nuclear Factor 1*), C/EBP (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*) (Osada et al., 1996) y CDP (*CCAAT Displacement Protein*) (Aufiero et al., 1994).

Es de destacar que las cajas CCAAT de unión a NF-Y son elementos reguladores comúnmente localizados en las proximidades de cajas GC de unión a Sp1, o de E-box y SRE de unión a SREBPs (Ishimoto et al., 2010; Ito et al., 2011).

SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*)

Los SREBPs son miembros de la familia de factores de transcripción que contienen un motivo básico hélice-lazo-hélice-cremallera de leucina (bHLH-Z). Estos factores de transcripción responden a los niveles celulares de esteroides y participan en la regulación de la transcripción de genes relacionados con la síntesis lipídica, principalmente de colesterol y de ácidos grasos (Brown and Goldstein, 1997).

Los factores de transcripción SREBP tienen dos características que les diferencian de los demás miembros de la familia, la primera es que se sintetizan como precursores inactivos unidos

a la membrana del retículo endoplasmático (RE), quedando los extremos amino y carboxilo orientados hacia el citosol (Yokoyama et al., 1993; Hua et al., 1995; Sakai et al., 1996). Cada precursor de SREBP se organiza en tres dominios: el dominio amino terminal, portador de la actividad como factor de transcripción, el dominio central que posee dos regiones transmembrana y el extremo carboxilo terminal que media la regulación por esteroides. La segunda característica, de vital importancia para el papel de estos factores de transcripción en la regulación del metabolismo de lípidos, es la doble especificidad en la unión al DNA, proporcionada por una tirosina que aparece en lugar de una arginina conservada en la secuencia de los demás miembros de la familia. Esta sustitución les permite reconocer los elementos no palindrómicos SRE (*Sterol Regulatory Elements*) (5'-TCACNCCAC-3') (Kim et al., 1995), además de unirse a los motivos E-box (5'-CANNTG-3'), como todas las proteínas de la familia bHLH-Z.

El grupo de Brown y Goldstein demostró que la activación de SREBP está controlada por el contenido de esteroides de la célula (Brown and Goldstein, 1997). Como se observa en la Figura 1.4, en presencia de altas concentraciones de esteroides, el complejo SCAP (*SREBP Cleavage-Activating Protein*)-SREBP está retenido en el RE por la proteína Insig (Yang et al., 2002). Cuando disminuye el contenido de esteroides celulares, SCAP se activa y acompaña a SREBP desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, las proteasas S1P (*Site-1 protease*) y S2P (*Site-2 protease*) generan la forma activa de SREBP como factor de transcripción, que viaja al núcleo y se une a los elementos SRE o cajas E presentes en los promotores de los genes diana (Brown and Goldstein, 1997).

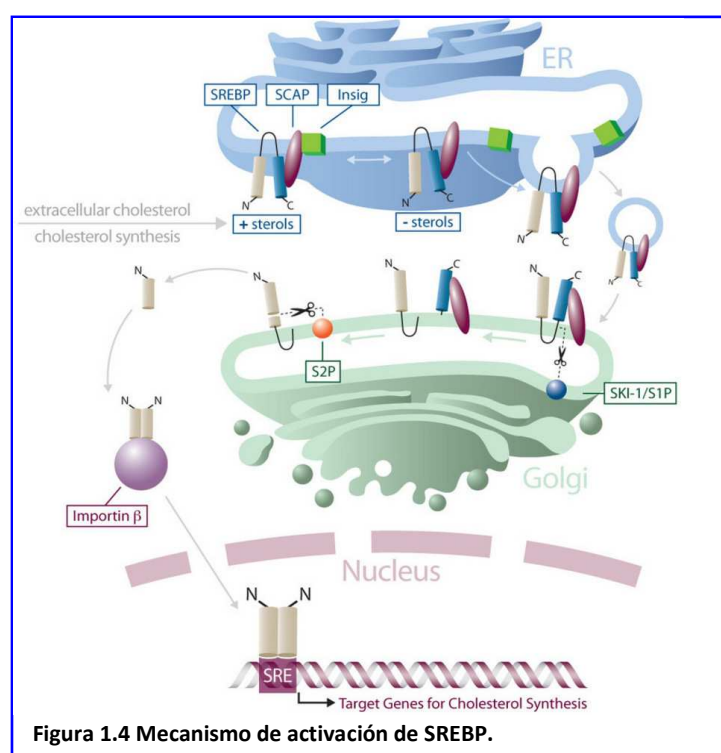


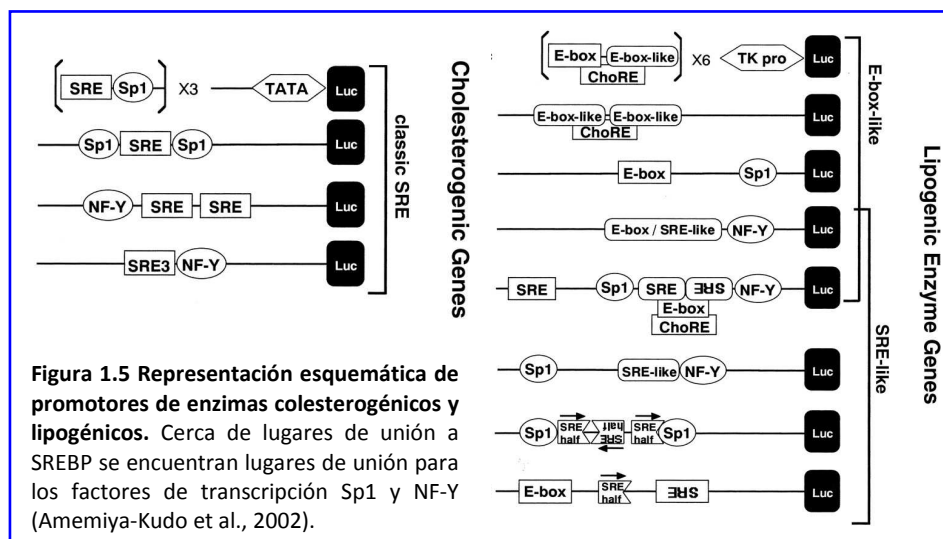
Figura 1.4 Mecanismo de activación de SREBP.

Se conocen 3 isoformas de SREBP: 1a, 1c y 2 (Brown and Goldstein, 1997). Las dos primeras están codificadas por el mismo gen pero tienen promotores diferentes, por lo que difieren en el primer exón (Hua et al., 1995). La tercera isoforma está codificada por un gen diferente y comparte un 50% de homología con 1a y 1c. Todas las isoformas de SREBP tienen la misma estructura y pueden formar heterodímeros, aunque no es necesario para su función (Hua et al., 1993).

Las isoformas de SREBP difieren en su grado de activación, en su selectividad para el gen diana y en su expresión específica en cada tejido (Osborne, 2000). SREBP-1a es un activador más potente que SREBP-1c debido a que su dominio de unión a DNA es más largo (Shimano et al., 1997). En estudios con ratones transgénicos, se ha demostrado que SREBP-1c es más activo en la regulación de la transcripción de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, que SREBP-2 está implicado principalmente en la transcripción de enzimas de la síntesis del colesterol (Horton et al., 1998) y que SREBP-1a participa en la regulación de ambos procesos (Shimano et al., 1996; Shimano et al., 1997). Más recientemente, se ha indicado que SREBP-1c también está relacionado con el metabolismo de la glucosa. Se ha observado que la insulina estimula la transcripción de SREBP-1c y, como resultado se obtiene una elevada transcripción de genes implicados en la lipogénesis y en el metabolismo de carbohidratos (Osborne, 2000).

Aunque la lista de los genes regulados por SREBP está en continua expansión, funcionalmente se dividen en dos grandes grupos. El primero incluye genes reguladores del metabolismo del colesterol, como 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) sintasa, HMG-CoA reductasa, farnesil difosfato sintasa, escualeno sintasa, receptor de LDL (*Low density lipoprotein*) y el mismo SREBP-2. Cada uno de ellos contiene en su promotor una secuencia SRE clásica o su forma modificada SRE3 (5'-CTCACACGAG-3') (Guan et al., 1995; Sanchez et al., 1995; Ericsson et al., 1996; Sato et al., 1996). El segundo grupo comprende genes de enzimas lipogénicos, como acetil-CoA carboxilasa, ácido graso sintasa (FAS), estearil-CoA desaturasa 1 y 2 y glicerol-3-fosfato aciltransferasa, entre otros. Estos promotores regulados por SREBP contienen lugares de unión similares a SRE, denominados *SRE-like* (Lopez et al., 1996; Ericsson et al., 1997; Tabor et al., 1998; Mater et al., 1999; Magana et al., 2000). Algunos de estos genes, como los de ácido graso sintasa, piruvato quinasa de hígado y glucoquinasa, contienen E-box o *E-box like*, lo que les confiere sensibilidad a carbohidratos, glucosa o insulina (Shih et al., 1995; Wang and Sul, 1997).

Generalmente, alrededor de los lugares de unión de SREBP en los promotores de genes diana se suelen encontrar lugares de unión para los factores de transcripción NF-Y y Sp1, que hacen la transcripción más eficiente (Bennett et al., 1995; Sanchez et al., 1995; Ericsson et al., 1996; Sato et al., 1996; Natarajan et al., 1998; Bennett and Osborne, 2000) (Figura 1.5).



SREBP actúa básicamente como activador, pero existen casos en los que juega un papel inhibidor, como en los promotores de las proteínas MTP (*Microsomal triglyceride transfer protein*) (Sato et al., 1999) y caveolina (Bist et al., 1997). Estas proteínas regulan el contenido de colesterol celular mediante el ensamblaje y secreción de lipoproteínas y la consiguiente la salida de colesterol libre y esterificado. Se ha sugerido que la represión mediada por SREBP puede ser debida a que este factor de transcripción desplaza a otro regulador positivo específico del promotor diana (Shimano, 2001).

PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)

Los PPARs pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares de tipo II activados por ligando, identificada en los años 90, a la que también pertenecen los receptores de vitamina D, de hormona tiroidea y RXR (*Retinoid X receptor*) (Mangelsdorf and Evans, 1995; Kota et al., 2005). Los PPARs regulan la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos incluyendo el transporte, la captura, la unión intracelular, así como el catabolismo (β y ω -oxidación) y el almacenamiento (Desvergne and Wahli, 1999). También están implicados en la diferenciación del adipocito (Schoonjans et al., 1996; Willson et al., 2000) y en procesos inflamatorios como la aterosclerosis (Willson et al., 2000).

Sus ligandos naturales son ácidos grasos libres o derivados de ácidos grasos como los eicosanoides, pero también pueden unir agonistas sintéticos como fibratos y tiazolidinedionas.

Los PPARs se unen a DNA como heterodímeros unidos a RXR formando el complejo PPAR:RXR. En ausencia de ligando, se forma un complejo dímero-correpressor que tiene actividad histona desacetilasa, provocando la condensación del DNA e impidiendo la transcripción (Chen and Evans, 1995; Heinzl et al., 1995; Horlein et al., 1995). En presencia de ligando, la unión

induce un cambio conformacional que provoca la disociación del correpresor y el reclutamiento de coactivadores con actividad histona acetilasa, facilitando la unión de los PPARs a elementos PPRE (*Peroxisome proliferator response element*) (Onate et al., 1995; Zhu et al., 1996; Zhu et al., 1997; Gelman et al., 1999; Heinlein et al., 1999). La secuencia consenso de PPRE (5'-AGGTCANAGGTCA-3') consta de 2 repeticiones directas del elemento hexamérico 5'-AGGTCA-3' separadas por 1 nucleótido (DR-1) (Wahli and Martinez, 1991; Kliewer et al., 1992; Juge-Aubry et al., 1997). PPAR se une en la parte 5' y RXR en la parte 3' de la secuencia consenso (DiRenzo et al., 1997; IJpenberg et al., 1997; Hsu et al., 1998) (Figura 1.6).

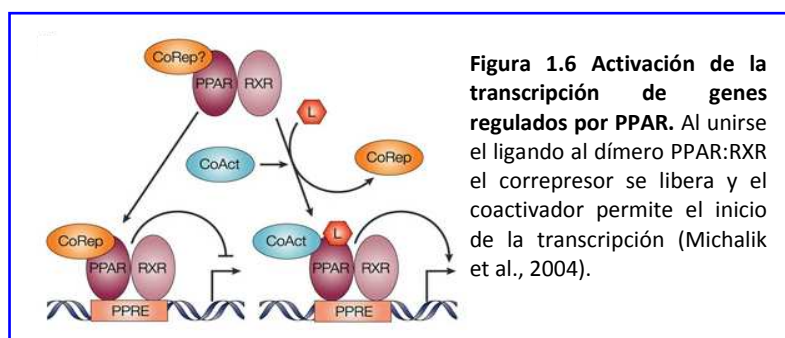


Figura 1.6 Activación de la transcripción de genes regulados por PPAR. Al unirse el ligando al dímero PPAR:RXR el correpresor se libera y el coactivador permite el inicio de la transcripción (Michalik et al., 2004).

Los PPARs tienen cuatro dominios funcionales: el dominio amino terminal responsable de su fosforilación, el dominio de unión a los elementos PPRE del DNA, el dominio para la unión de los cofactores y el dominio carboxilo terminal responsable de la unión del ligando y la dimerización (Kota et al., 2005).

Se conocen tres isoformas de PPAR codificadas por genes diferentes (Gearing et al., 1994; Zhu et al., 1995) y con distribución tisular distinta: α , β y γ . Todas las isoformas poseen una estructura conservada entre 60-80% en los dominios de unión a DNA y al ligando.

PPAR α predomina en tejidos con catabolismo de ácidos grasos muy activo, como hígado, corazón, riñón y músculo (Beck et al., 1992; Braissant et al., 1996). También se expresa en monocitos, macrófagos (Chinetti et al., 1998) y en células endoteliales y musculares de vasos sanguíneos (Inoue et al., 1998; Diep et al., 2000). Posee un papel predominante en el metabolismo hepático, implicado en la captura de lípidos y en la β -oxidación de los ácidos grasos (Schoonjans et al., 1996; Kersten et al., 1999). PPAR α es activado por eicosanoides, ácidos grasos libres y fibratos, que disminuyen el nivel de triglicérido del plasma, aumentan el colesterol de las HDL y la expresión de las apolipoproteínas A-I y A-II (Vu-Dac et al., 1994; Vu-Dac et al., 1995; Plutzky, 2000). Los agonistas de PPAR α se utilizan como tratamiento para reducir la progresión de la aterosclerosis.

PPAR β (también conocido como PPAR δ) presenta una expresión ubicua y su función, menos conocida, tiene relación con la regulación de la actividad del macrófago (Willson et al., 2000).

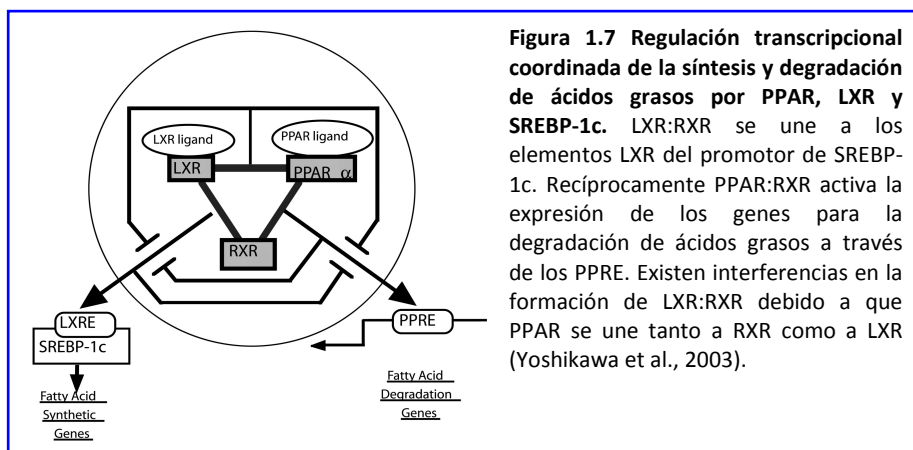
PPAR γ tiene tres isoformas γ 1, γ 2 y γ 3 y es el más estudiado. PPAR γ 1 es de expresión constitutiva, PPAR γ 2 se expresa en tejido adiposo y PPAR γ 3 se expresa en adipocitos y macrófagos (Braissant et al., 1996; Ricote et al., 1998). PPAR γ se activa por ácidos grasos, preferentemente poliinsaturados, y tiazolidinedionas, aumentando la transcripción de varios genes involucrados en adipogénesis, homeostasis de glucosa y metabolismo de lípidos, además tiene efectos anti-diabéticos y anti-aterioscleróticos (Lemberger et al., 1996; Kahn and McGraw, 2010).

Los PPARs, y también los factores de transcripción LXR (*Liver X receptor*), forman heterodímeros obligados con RXR. Estos dos receptores nucleares desempeñan un papel crucial en la regulación del metabolismo de ácidos grasos. Por un lado, PPAR:RXR promueve la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que LXR:RXR puede estimular directamente la transcripción de genes o unirse al promotor de SREBP-1c a través de los elementos LXRE (*Liver X receptor element*) y activar la función de SREBP-1c como regulador de genes lipogénicos.

Existen evidencias de la regulación coordinada entre PPAR y LXR. Chinetti et al. demostraron que en hepatocitos de rata y de humano los agonistas de PPAR α y PPAR γ aumentaban la expresión de LXR debido al PPRE que contiene en su región promotora (Tobin et al., 2000; Chinetti et al., 2006). Además, PPAR se activa por este factor de transcripción mediante el elemento de unión de LXR que contiene en su región promotora, como se ha demostrado con el agonista de LXR, T0901317, el cual aumenta la expresión de PPAR γ en adipocitos y hepatocitos de ratón (Seo et al., 2004).

Todo esto indica que a nivel transcripcional PPAR estimula LXR y a su vez LXR estimula PPAR; sin embargo, PPAR y LXR se pueden inhibir mutuamente por la competición de la pareja común RXR, necesaria para formar heterodímeros (Matsusue et al., 2006).

En estudios en los que se analizaron los efectos de los PPARs en el sistema LXR-SREBP-1c se demostró que, en hígado, la activación de PPAR reprime la vía de señalización de LXR a través de la reducción de la heterodimerización LXR:RXR, al quedar todo el RXR unido a PPAR (Ide et al., 2003; Yoshikawa et al., 2003). Esto resulta en una reducción de la actividad de promotores que contienen LXRE, como el promotor de SREBP-1c (Figura 1.7). El único caso conocido en el que debido a tal competición, LXR y PPAR α son capaces de formar un heterodímero atípico e inhibir la actividad transcripcional, es el del promotor de CYP7A1 (Colesterol 7 α -hidroxilasa) de ratón que contiene un PPRE y un elemento LXR superpuestos (Gbaguidi and Agellon, 2002).



Las cantidades de los tres factores de transcripción en el núcleo, la concentración de cada ligando y la posible participación de otros receptores nucleares y cofactores, determinan el efecto global.

1.2 SND1 Y SNDp102

SND1 (*Staphylococcal Nuclease Domain 1*), también denominada Tudor-SN, p100 o TSN, es la proteína codificada por el gen SND1 humano, que se localiza en el cromosoma 7q31.3 (Lienard et al., 2000). Debe este nombre a su estructura compuesta por cuatro dominios similares a *Staphylococcal aureus nuclease* (SN1-4). También contiene un dominio que aparece repetido en la proteína Tudor de *Drosophila melanogaster* (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997a) y un quinto dominio SN parcial (SN5) (Ponting, 1997b) (Figura 1.8).

La estructura de la proteína de SND1 está altamente conservada en más de 20 especies distintas del reino eucariota, como *Histoplasma capsulatum* (Porta et al., 1999), *Trypanosome brucei* (Alsford et al., 2010), *Plasmodium falciparum* (Hossain et al., 2010), *Caenorhabditis elegans* (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997a), *Arabidopsis thaliana* (Ponting, 1997a), *Drosophila melanogaster* (Caudy et al., 2003), pez zebra (Zhao et al., 2003), así como rata, ratón, vaca y humano, entre otros mamíferos (Tong et al., 1995; Callebaut and Mornon, 1997; Sakamoto et al., 1999; Keenan et al., 2000; Broadhurst and Wheeler, 2001; Broadhurst et al., 2005).

En la Figura 1.8 se representa un esquema de las proteínas de humano, rata, ratón, vaca y pez. Todas ellas conservan una elevada homología en su estructura, diferenciándose en el número de aminoácidos de la proteína.

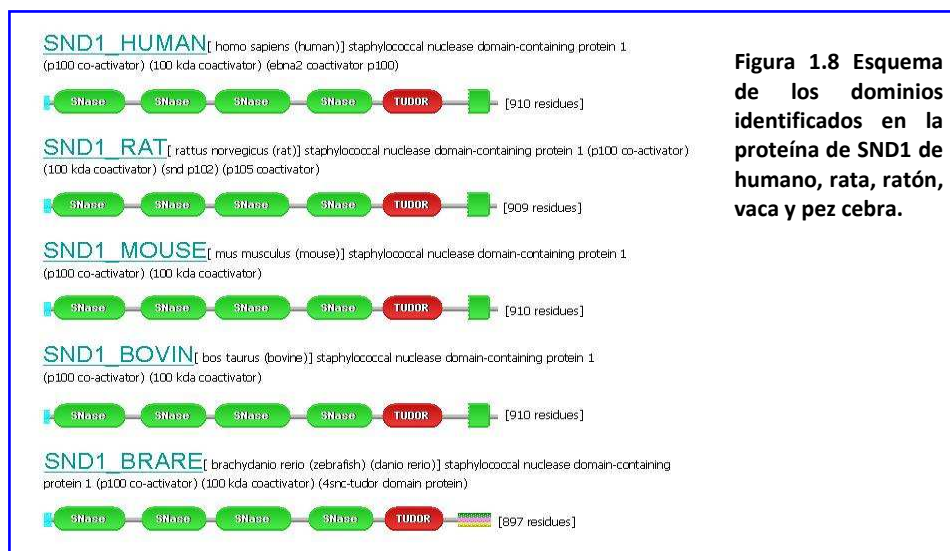


Figura 1.8 Esquema de los dominios identificados en la proteína de SND1 de humano, rata, ratón, vaca y pez cebra.

Numerosos estudios han demostrado la interacción de los dominios SN de la proteína SND1 con ácidos nucleicos y con proteínas (Tong et al., 1995; Callebaut and Moron, 1997; Ponting, 1997b; Pauku et al., 2003; Valineva et al., 2005; Shaw et al., 2007). Los dominios SN carecen de los residuos esenciales para la actividad nucleasa; aún así, se ha demostrado que SND1 funciona como RNasa, preferiblemente sobre RNA de doble cadena y microRNA (miR) editados conteniendo inosina (Caudy et al., 2003; Scadden, 2005; O'Connell and Keegan, 2006). Un estudio reciente muestra que la actividad RNasa se bloquea cuando el domino Tudor se separa proteolíticamente del dominio SN5 mediante caspasa-3 (Sundstrom et al., 2009). En el modelo tridimensional de la Figura 1.9, se observa que los dominios SN3 y SN4 son suficientes para el reconocimiento del RNA de doble cadena por la forma cóncava de su estructura y la carga positiva de su superficie; además, SN4 contiene una región con cargas negativas que puede mediar en la interacción iónica entre dominios SN y proteínas (Shaw et al., 2007; Li et al., 2008).

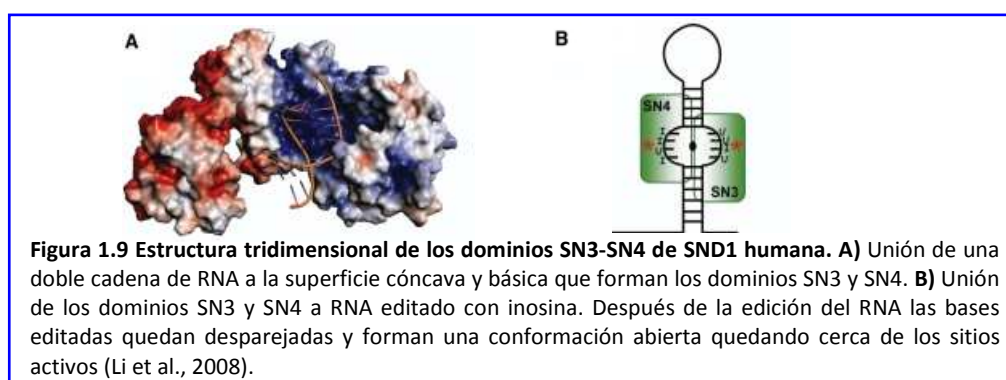
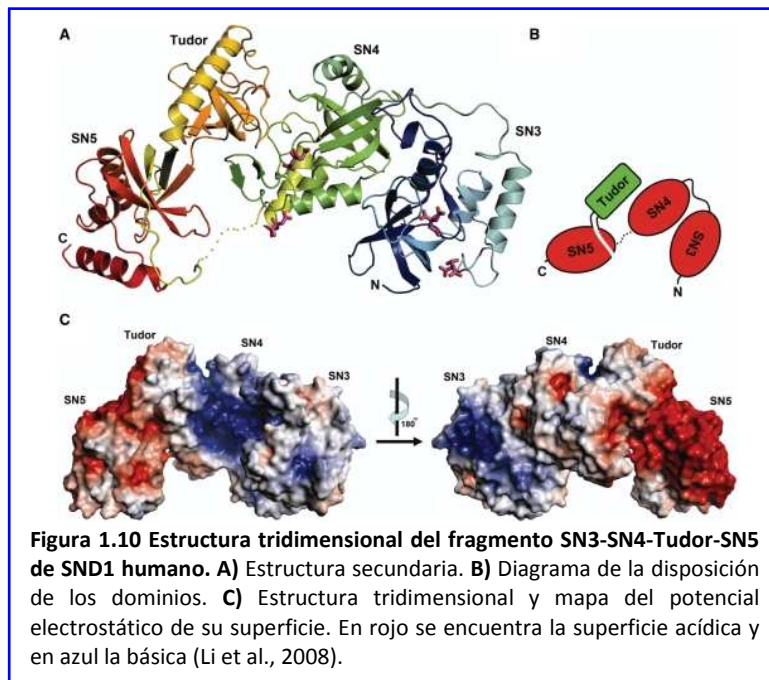
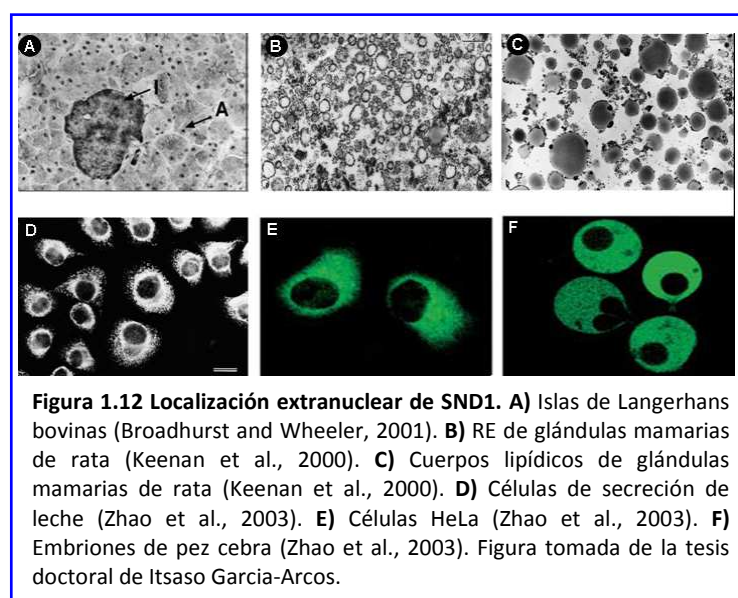
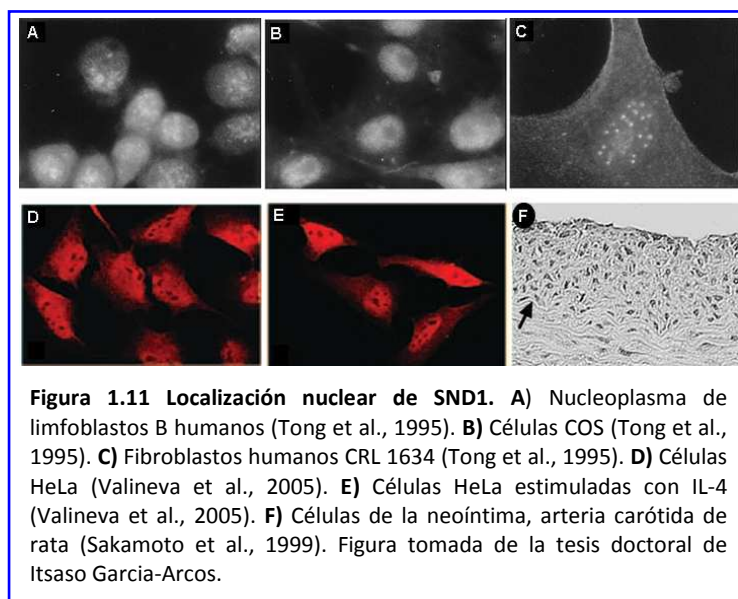


Figura 1.9 Estructura tridimensional de los dominios SN3-SN4 de SND1 humana. A) Unión de una doble cadena de RNA a la superficie cóncava y básica que forman los dominios SN3 y SN4. B) Unión de los dominios SN3 y SN4 a RNA editado con inosina. Después de la edición del RNA las bases editadas quedan desaparejadas y forman una conformación abierta quedando cerca de los sitios activos (Li et al., 2008).

Dada la superficie ácida del dominio Tudor-SN5, se ha descartado su unión a ácidos nucleicos (Li et al., 2008) (Figura 1.10). Su estructura muestra una caja de residuos aromáticos que le confiere, junto con su superficie negativa, la capacidad de unirse a grupos metilo, como por ejemplo a las guanosinas metiladas del casquete 5' de los snRNAs (*Small nuclear RNAs*) asociados a las snRNPs (*Small nuclear ribonucleoproteins*) o a las argininas dimetiladas de las proteínas Sm, así como a las lisinas metiladas de las histonas (Shaw et al., 2007; Yang et al., 2007).



Estudios en diversos tipos celulares, han demostrado que la proteína SND1 está presente tanto en el núcleo celular (Tong et al., 1995; Sakamoto et al., 1999; Broadhurst et al., 2005; Valineva et al., 2005) (Figura 1.11), así como en compartimentos extranucleares, entre ellos el retículo endoplasmático, el citosol o los cuerpos lipídicos (Keenan et al., 2000; Zhao et al., 2003; Broadhurst et al., 2005) (Figura 1.12).



Las funciones atribuidas a la proteína SND1 son numerosas y las más estudiadas están relacionadas con la regulación de expresión génica, incluyendo la transcripción y el splicing del pre-mRNA, así como la traducción y el metabolismo del RNA interferente.

Inicialmente, SND1 fue identificada como coactivador transcripcional del antígeno del virus *Epstein-Barr nuclear antigen-2* (EBNA-2) y del factor general de transcripción TFIIE (Tong et al., 1995). Posteriormente, se ha demostrado que interacciona directamente con STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription protein*) (Yang et al., 2002), STAT5 (Paukku et al., 2003) y con c-Myb (Dash et al., 1996), aumentando su afinidad por este último si se une a Pim-1, una proteína quinasa que fosforila a SND1 (Leverson et al., 1998). Además, funciona como puente entre el factor de transcripción STAT6 y la RNA polimerasa II (Yang et al., 2002), CBP (Valineva et al., 2005), RNA Helicasa A (Valineva et al., 2006) o Policistin-1 (Low et al., 2006).

Estudios sobre la implicación de SND1 en el splicing del mRNA, muestran que la interacción del dominio Tudor-SN con los residuos metilados de los snRNAs y/o de las proteínas Sm, asociados a los snRNPs (U1, U2, U4, U5 y U6), acelera el ensamblaje de los componentes para la formación del espliceosoma (Shaw et al., 2007; Yang et al., 2007).

Se ha demostrado que SND1 está implicada en procesos postranscripcionales mediante la maquinaria del RNA interferente, degradando el mRNA o reprimiendo su traducción.

SND1 fue identificada como componente del complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) en estudios realizados en *D. melanogaster*, *C. elegans* y líneas celulares humanas HeLa y HEK293 (Caudy et al., 2003); además, se encontró que los dominios SN se unen a la proteína Argonaute (AGO), que es miembro del complejo RISC (Paukku et al., 2008). El RNA interferente (siRNA o microRNA), derivado de la digestión enzimática de RNA de doble cadena, es

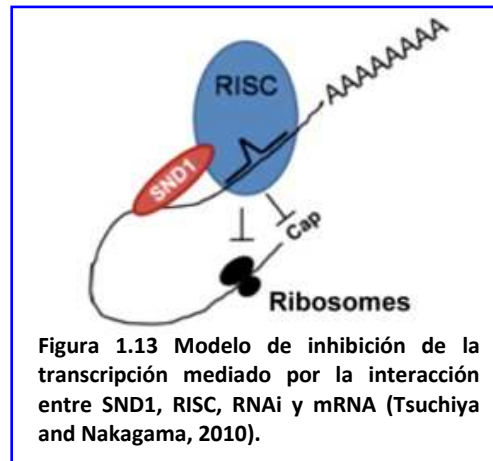


Figura 1.13 Modelo de inhibición de la transcripción mediado por la interacción entre SND1, RISC, RNAi y mRNA (Tsuchiya and Nakagama, 2010).

guiado por AGO a una zona complementaria del mRNA para reprimir la traducción. Tsuchiya y Nakagama han propuesto un modelo de unión según el cual el extremo carboxilo de la proteína SND1 interacciona con el RNA de interferencia y el complejo RISC, mientras que el extremo amino sirve como plataforma entre el mRNA y la proteína Argonaute de RISC (Tsuchiya and Nakagama, 2010) (Figura 1.13).

Por otro lado, la proteína SND1 forma parte de un nuevo mecanismo regulador de mRNA independiente de RISC, en el que interacciona con el extremo 3'UTR del mRNA diana y produce un aumento en su traducción y una inhibición de la degradación del mRNA. Se ha observado que esta regulación positiva por parte de SND1 tiene lugar mediante la interacción de los dominios SN con el extremo 3'UTR del gen AT1R (*Angiotensin II type 1 receptor*) (Paukku et al., 2008) (Figura 1.14).

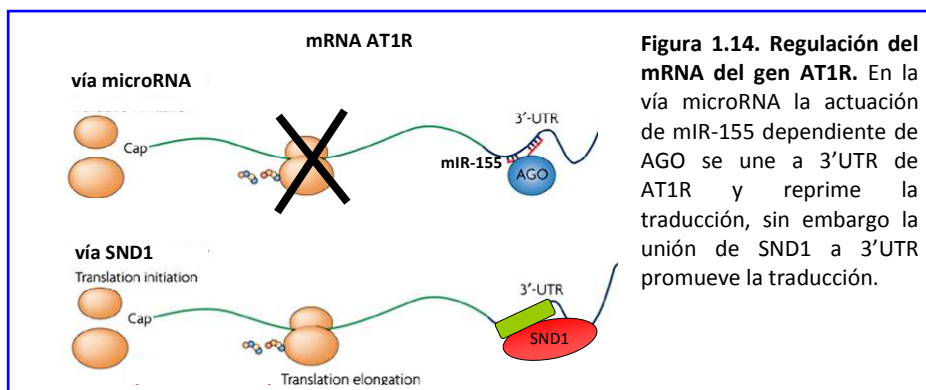


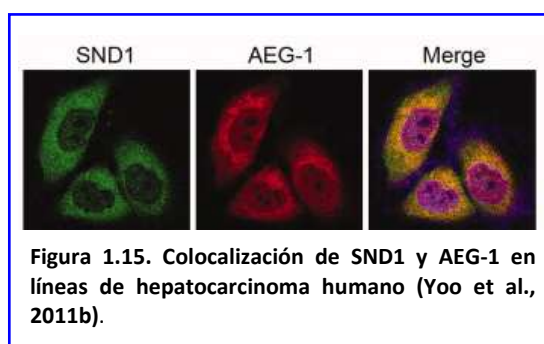
Figura 1.14. Regulación del mRNA del gen AT1R. En la vía microRNA la actuación de miR-155 dependiente de AGO se une a 3'UTR de AT1R y reprime la traducción, sin embargo la unión de SND1 a 3'UTR promueve la traducción.

Aunque la función de SND1 no se conoce con exactitud, existen numerosas evidencias de su relación fisiológica con el crecimiento y el desarrollo celular. Por un lado, la inhibición de la expresión de SND1 frena la proliferación celular, ocasionando incluso la muerte celular (Tong et al., 1995), y por otro lado, su sobreexpresión está implicada en el desarrollo de diversas patologías.

El aumento de expresión de SND1 provocado por el estrés oxidativo en células musculares de la aorta de ratón induce la proliferación y crecimiento celular, sugiriéndose su implicación en el depósito de lípidos en la pared arterial, lo que puede desembocar en aterosclerosis (Sakamoto et al., 1999). También se ha encontrado sobreexpresión de SND1 en células de riñón poliquístico que proliferan y se diferencian en un fenotipo secretor característico de la patología (Low et al., 2006).

Un aspecto que actualmente despierta un gran interés clínico es la implicación de SND1 en el desarrollo del cáncer. SND1 está sobreexpresada en diferentes tipos de cánceres como el de pulmón (Chiose et al., 2007), el de colon (Tsuchiya et al., 2007; Tsuchiya and Nakagama, 2010), el de riñón (Brito et al., 2008), el de mama (Ho et al., 2009; Blanco et al., 2011), el de próstata (Kuruma et al., 2009) y el de hígado (Yoo et al., 2011b). Además, SND1 se ha localizado en los gránulos de estrés que se desarrollan en el citosol de células tumorales, lo que sugiere que SND1 podría silenciar o estabilizar el mRNA en estas condiciones (Gao et al., 2010).

Recientemente, se ha encontrado que, en hepatocarcinoma y en cáncer de mama humanos, SND1 interacciona y se sobreexpresa con la proteína AEG1 (*Astrocyte elevated gene-1*), también conocida como MTDH (*Metadherin*), la cual está relacionada con la metástasis (Blanco et al., 2011; Yoo et al., 2011b) (Figura 1.15).



La sobreexpresión de SND1 y AEG1 en células tumorales y tejidos cancerígenos, provoca un aumento de la actividad del complejo RISC y también de los miRs, que puede conducir a la degradación masiva de los mRNA de los genes supresores de tumores, dianas de miRs, lo que provocaría un descontrol de la expresión génica que podría degenerar en una progresión del cáncer (Tsuchiya and Nakagama, 2010; Yoo et al., 2011b).

Se ha sugerido que SND1 sería una buena diana terapéutica en el tratamiento de patologías en las que se sobreexpresa SND1, ya que su bloqueo induciría apoptosis en las células tumorales (Yoo et al., 2011a; Yoo et al., 2011b).

1.2.1 ANTECEDENTES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Nuestro grupo se ha centrado durante años en la investigación sobre la proteína homóloga de rata, SNDp102 y su relación con el metabolismo de lípidos en tejido hepático, en especial, con el metabolismo de colesterol.

En el hígado, los ésteres de colesterol están sujetos a un ciclo dinámico de hidrólisis y re-esterificación que permite su utilización y almacenaje. La hidrólisis de los ésteres de colesterol está catalizada por tres enzimas colesterol éster hidrolasas (CEH) con diferentes propiedades enzimáticas y localización celular. La CEH lisosomal hidroliza colesterol esterificado (CE) y triglicéridos de lipoproteínas endocitadas, la CEH citosólica transforma CE de los cuerpos lipídicos en colesterol libre y la última actividad CEH se encontró en microsomas de hígado de rata siendo la menos conocida (Ghosh and Grogan, 1992; Martinez et al., 1994).

Nuestro grupo purificó la CEH de microsomas de hígado de rata y mediante inmunolocalización se encontró en el retículo endoplasmático (Cristobal et al., 1999; Fresnedo et al., 2001). Aunque su función no se conoce, su localización sugiere que podría tener algún papel en la homeostasis lipídica, ya que es en el RE donde se desarrollan procesos clave para el balance lipídico.

Se identificó el cDNA y la secuencia aminoacídica de la proteína CEH microsomal, y se analizó mediante programas bioinformáticos de predicción de características estructurales y propiedades fisicoquímicas en proteínas, que revelaron una homología del 97% con la proteína SND1 humana, por lo que pasó a denominarse SNDp102 (GenBank AY697864) (Palacios et al., 2006). El gen SNDp102 o *Snd1* de rata se localiza en la región cromosómica 4q23 (Lienard et al., 2000).

Existen evidencias de la posible implicación de SND1 y SNDp102 en el metabolismo de lípidos, como su relación con el depósito de lípidos en las paredes arteriales de rata (Sakamoto et al., 1999), la localización en los cuerpos lipídicos de células epiteliales mamarias de vaca y de rata durante la lactancia (Broadhurst and Wheeler, 2001; Broadhurst et al., 2005) o en los cuerpos lipídicos de adipocitos de ratón (Keenan et al., 2000). Nuestro grupo mostró que la sobreexpresión de SNDp102 en hepatocitos de rata aumenta la cantidad de fosfolípidos secretados en lipoproteínas (Palacios et al., 2006), y que en hepatocitos de rata y hepatomas de humano, en condiciones esteatóticas, SNDp102 y SND1 se translocan del RE a cuerpos lipídicos

formados en el citosol por la acumulación de grandes cantidades de lípido (García-Arcos et al., 2010). Todos estos resultados tienen en común una presencia importante de SND1 o de sus proteínas homólogas en tejidos con activo metabolismo de lípidos.

En este contexto, considerando la importancia de conocer la regulación de la expresión del gen SND1, nuestro grupo aisló y secuenció el promotor de SNDp102 (GenBank AY957585), que tiene el lugar de inicio de la transcripción 216 pb río arriba del codón ATG de traducción (Rodríguez et al., 2006) (Figura 1.16). Los análisis bioinformáticos mostraron la ausencia de caja TATA y de elementos DPE, BRE o Inr y la presencia de Islas CpG con elementos GC y CCAAT invertidos, los cuales son reconocidos por los factores de transcripción Sp1 y NF-Y (Rodríguez et al., 2007). Los ensayos con el gen indicador de la luciferasa demostraron que la actividad promotora basal se encontraba en la región de (-112,+208) y la máxima actividad en (-422,+208).



Nuestro mayor interés ha sido profundizar en el estudio del promotor de rata SNDp102 e iniciar los análisis del promotor humano de SND1. La caracterización de los promotores de rata y humano nos permitirá identificar factores de transcripción que participan en el mecanismo de la regulación transcripcional en diferentes condiciones celulares.

INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

MATERIALES

MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BILBIOGRAFIA

2 OBJETIVOS

Basándonos en los conocimientos actuales de las proteínas SND1 humana y SNDp102 de rata y en el análisis del promotor de SNDp102 realizado en nuestro laboratorio, abordamos el estudio de los mecanismos de regulación transcripcional de los genes de humano y de rata.

Los objetivos del presente trabajo titulado '**Regulación de la transcripción de los genes SND1 (*Homo sapiens*) y SND p102 (*Rattus norvegicus*)**' son los siguientes:

- 1- Aislamiento y clonación de la región promotora del gen SND1 humano.
- 2- Identificación de lugares de unión funcionales para los factores de transcripción basales Sp1 y NF-Y en los promotores de los genes SND1 humano y SNDp102 de rata.
- 3- Implicación de los factores de transcripción SREBP y PPAR en la regulación de la actividad promotora de los genes SND1 y SNDp102.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

3. MATERIALES

4. MÉTODOS

RESULTADOS

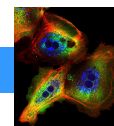
DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BILBIOGRAFIA

3 MATERIALES

3.1 LINEAS CELULARES



Para los diferentes estudios se ha requerido el uso y cultivo de las siguientes líneas celulares de humano y rata:

3.1.1 HepG2 (HEPATOMA HUMANO)

Línea celular hepática tumoral humana (*Homo sapiens*) establecida a partir de tejido cancerígeno de un paciente afectado con carcinoma hepatocelular. Presenta morfología epitelial y crece en monocapa formando pequeños agregados (Figura 3.1). Adquirida en ATCC (American Type Culture Collection) HB-8065.

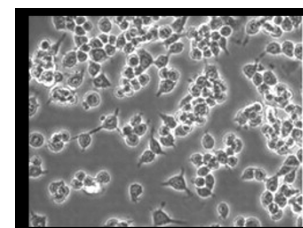


Figura 3.1 Monocapa de células HepG2

3.1.2 McA-RH7777 (HEPATOMA DE RATA)

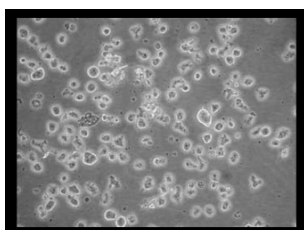


Figura 3.2 Monocapa de células McA-RH 7777

Línea celular hepática tumoral de rata (*Rattus norvegicus*) con morfología epitelial, derivada del hígado de una hembra con hepatoma de Morris (Figura 3.2). Adquirida en ATCC CRL-1601.

3.2 CEPAS BACTERIANAS

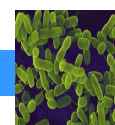


Tabla 3.I Cepas bacterianas *Escherichia coli* empleadas.

Cepa	Características	Proveedor
TOP10	Cepa comercial optimizada para la clonación de todo tipo de plásmidos. Se denomina supercompetente.	INVITROGEN
JM109	Cepa deficiente en recombinasas utilizada para el crecimiento y la clonación de plásmidos. Presenta una elevada eficiencia de transformación.	PROMEGA
TG1	Posee una tasa de transformación elevada, son utilizadas para la clonación y para visualizar la expresión de una proteína de un vector vírico.	Cedidas por la Dra. Ana Zubiaga del Dep. de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, Fac. de Ciencias y Tecnología (UPV-EHU)

Las cepas bacterianas *E. coli* JM109 y TG1 se mantienen a -80°C en medio LB (Luria-Bertani) (PRONADISA) con un 25% de glicerol (SIGMA) y 1 mg/ml de ampicilina (ROCHE APPLIED SCIENCE). Las cepas TOP10 se almacenan a -80°C tal y como son suministradas.

3.3 VECTORES

Los vectores indicadores del gen luciferasa, normalizadores y vectores de expresión de factores de transcripción utilizados se describen a continuación.

3.3.1 pGL3-Basic

Los vectores pGL3 están diseñados principalmente para el análisis de los factores que pueden regular la expresión génica en los mamíferos.

El vector pGL3-Basic (PROMEGA) carece de promotor eucariota y de secuencias potenciadoras, permitiendo la máxima flexibilidad en la clonación de hipotéticas secuencias reguladoras de la transcripción. Este vector presenta una secuencia modificada del cDNA del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*, designada *luc+*, la cual sirve para monitorizar la actividad transcripcional en células eucariotas transfectadas (Figura 3.3).

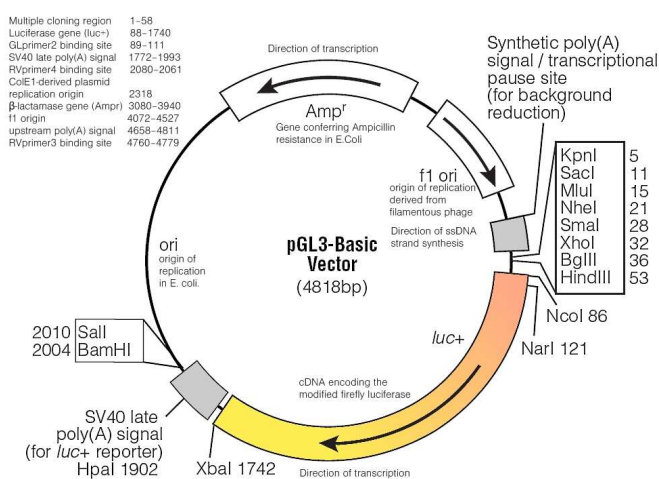


Figura 3.3 Mapa del vector de expresión pGL3-Basic.

3.3.2 pRL-TK

El vector pRL-TK (PROMEGA) está diseñado para utilizarse como control interno. El vector contiene un cDNA (*Rluc*) del organismo marino *Renilla reniformes* que codifica para la *Renilla* luciferasa y el promotor de la Timidina Kinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), que proporciona niveles bajos de expresión de luciferasa en cotransfección de células mamíferas (Figura 3.4).

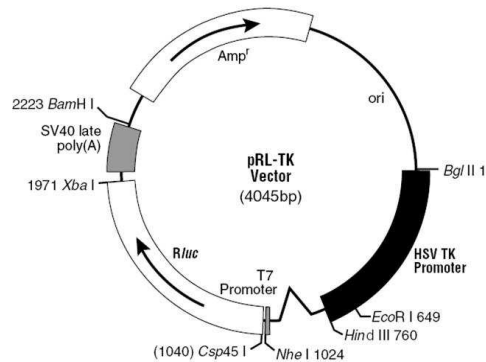


Figura 3.4 Mapa del vector pRL-TK.

3.3.3 pSV-β-Galactosidasa

El vector pSV-β-Galactosidasa se utiliza como control positivo para el seguimiento de la eficiencia de la transfección de células mamíferas. El promotor temprano SV40 potencia la transcripción del gen lacZ que codifica la enzima β-galactosidasa (Figura 3.5).

El vector fue cedido por el Prof. Dr. Michael Trauner del Laboratorio de Hepatología Experimental y Molecular Universidad Médica de Graz (Austria).

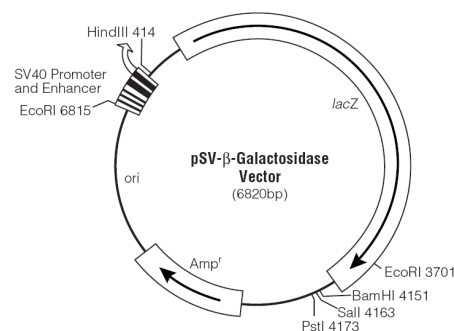
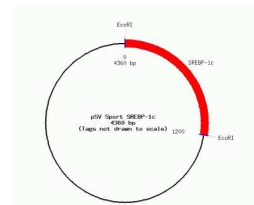


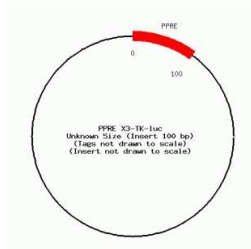
Figura 3.5 Mapa del vector pSV-β-Galactosidasa.

3.3.4 pSV Sport SREBP-1c/ pSV Sport SREBP-1c dom neg

El plásmido de expresión del factor de transcripción SREBP-1c y su control negativo se adquieren en ADDGENE (num. 8883 y 8885). El vector pSV Sport SREBP-1c de 3.160 pb contiene un inserto de 1.200 pb del gen de Srebf1, ADD-1 o Srebp1 de *Rattus norvegicus*, y el vector pSV Sport SREBP-1c dom neg contiene una mutación en la tirosina-320, sustituida por una alanina, funcionando como control negativo. Digiriendo con *EcoRI* el plásmido pSV Sport SREBP-1c se obtiene el plásmido pSV Sport.



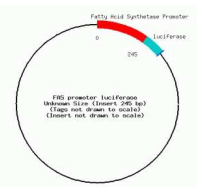
3.3.5 PPRE X3-TK-luc



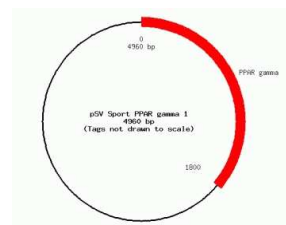
El plásmido PPRE X3-TK-luc (ADDGENE num. 1015) contiene un inserto de 100 pb del elemento de respuesta a PPAR de *Mus musculus* en el vector de expresión de luciferasa pTK-luc de 4.700 pb.

3.3.6 FAS promoter luciferase

El vector de expresión de la luciferasa contiene un fragmento de 245 pb del gen de la ácido graso sintasa. (ADDGENE num. 8890)



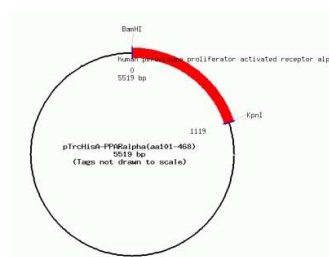
3.3.7 pSV Sport PPAR γ 1



En el plásmido pSV Sport se encuentra el inserto de 1.800 pb correspondiente a un fragmento del gen de PPAR γ 1 de *Mus musculus*. (ADDGENE num. 8886)

3.3.8 pTrcHisA-PPAR α (aa101-468)

El vector de expresión pTrcHisA-PPAR α contiene el dominio A/B del factor de transcripción humano PPAR α con una deleción de los aminoácidos 1 al 100 (aa101-468). (ADDGENE num. 13574) El plásmido pTrcHisA se obtiene digiriendo pTrcHisA-PPAR α con la enzima de restricción *Bam*HI.



3.4 REACTIVOS QUÍMICOS



Los productos químicos que se utilizan son de grado analítico, compatibles con la aplicación de técnicas bioquímicas y de biología molecular, de las casas comerciales MERCK, SIGMA, ROCHE y FLUKA, entre otros.

Los oligonucleótidos que se emplean se sintetizan por INVITROGEN by LIFE TECHNOLOGIES.



3.5 HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS

Se detallan a continuación los programas en red utilizados para la caracterización, análisis y diseño de las secuencias promotoras de los genes de rata *Snd1* o *SNDp102* y humano *SND1*, indicándose la dirección electrónica de acceso libre o previo registro.

3.5.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR

- ✚ Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

El programa Primer 3, creado por el *Whitehead Institute for Biomedical Research* (Cambridge, Massachusetts, EE UU), permite diseñar y contrastar los oligonucleótidos con varias librerías génicas y ajustar parámetros tales como T_m , porcentaje de GC, longitud, autocomplementariedad y complementariedad de los extremos 3'.

- ✚ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Nueva aplicación del NCBI para el diseño de oligonucleótidos. Al igual que el Primer 3 ofrece la posibilidad de seleccionar condiciones específicas.

3.5.2 MAPAS DE RESTRICCIÓN DE SECUENCIAS DE DNA

- ✚ WebCutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>)

Programa para la creación de mapas de restricción de secuencias nucleotídicas.

3.5.3 ALINEACIÓN DE SECUENCIAS

- ✚ NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) *Rat/Mouse/Human Genome* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>)

- ✚ Blast 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>)

Esta herramienta en red permite comparar secuencias con genomas de distintas especies como rata, ratón y humano o con alguna de las bases de datos pertenecientes a GenBank, EMBL, DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) y PDB (*Protein Data Bank*).

La sensibilidad de la comparación y alineación de secuencias puede ser alta, media o baja utilizando MegaBlast, MegaBlast discontinuo o Blastn respectivamente. Versión BLASTN 2.2.25.

- ✚ Ensembl (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>)

Ensembl es un proyecto conjunto que comprende EBI (*European Bioinformatics Institute*), EMBL (*European Molecular Biology Open Software Suite*) y WTSI (*Wellcome Trust Sanger Institute*). Versión Ensembl 61-Feb 2011.

BlastView proporciona una plataforma para la búsqueda de similitudes entre secuencias de la base de datos de Ensembl, ofreciendo acceso a los programas Blast que permiten buscar secuencias poco relacionadas y Blat, que se emplea para buscar alineamientos entre secuencias de DNA de forma rápida. Se pueden alinear secuencias con genomas de diferentes especies eucariotas.

✚ EMBOSS *Pairwise Alignment Algorithms* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>)

Esta herramienta se emplea para comparar dos secuencias.

✚ EMBOSS *ENA Sequence Search* (<http://www.ebi.ac.uk/ena/search/>)

ENA Sequence Search permite hacer una comparación de una secuencia dada con todas las secuencias nucleotídicas de la base ENA (*European Nucleotide Archive*).

✚ EMBOSS *Multiple Sequence Alignment*, ClustalW2, Kalign, Mafft, Muscle y T-Coffe. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html>)

Realiza alineamientos de múltiples secuencias que tienen relación evolutiva. Creado por EBI y EMBOSS.

✚ NCBI DCODE.org *Comparative Genomics Developments* (<http://www.dcode.org/>)

Establecida en 2003 como una colección de páginas web basadas en herramientas para el estudio de la regulación de los genomas de vertebrados. Provee a los usuarios de aplicaciones para la comparación de secuencias.

✚ ECR (*Evolutionary Conservation Region*) Browser (<http://ecrbrowser.dcode.org/>)

Identificación y análisis de secuencia de elementos reguladores. Se alinea la secuencia de nucleótidos a analizar con el genoma elegido.

✚ Mulan (<http://mulan.dcode.org/>) y zPicture (<http://zpicture.dcode.org/>)

Interpretan un alineamiento múltiple entre secuencias.

3.5.4 ANÁLISIS DE LUGARES RECONOCIDOS POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

✚ TESS (*Transcription Element Search System*) (<http://cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>)

Programa diseñado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Pensilvania (EEUU) para la predicción de potenciales sitios de unión de factores de transcripción en una secuencia de DNA. Puede identificar lugares de unión usando la secuencia consenso de las bases de datos de TRANSFAC v6.0, JASPAR 20060301, IMD v1.1 y CBIL/GibbsMatv1.1.

✚ MatInspector (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector/>)

Programa que utiliza una librería de matrices para localizar lugares de unión de factores de transcripción en secuencias de DNA. MatInspector fue creado por la empresa de bioinformática *Genomatix Software GmbH* (Munich, Alemania). Versión 8.0 (Abril 2009).

✚ Jasparr (http://jasparr.cgb.ki.se/cgi-bin/jasparr_db.pl)

Jaspar es una colección de matrices con diferentes preferencias de unión a factores de transcripción. Programa creado por el centro *Karolinska Institutet* (Estocolmo, Suecia) y el *Center for Molecular Medicine and Therapeutics* (Vancouver, Canadá) para la búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción.

🚧 Consite (http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite?rm=t_input_single)

Programa creado por el *Center for Genomics and Bioinformatics* (Suecia), detecta la huella filogenética de los lugares de regulación. Diseñado para comparar dos secuencias e informar sobre los lugares de unión conservados de factores de transcripción. Utiliza la base de datos de Jaspar.

🚧 SiteGa (*Site recognition by Genetic Algorithm*) <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/sitega/index.pl>

Creado por *Russian Foundation for Basic Research* (RFBR) para el reconocimiento en una secuencia nucleotídica de los lugares de unión a factores de transcripción. La base de datos es TRRD (*Transcription Regulatory Regions Database*).

3.5.5 BÚSQUEDA DE ISLAS CpG

🚧 CpG Island Searcher (<http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx>)

El CpG Island Searcher identifica las islas CpG que existen bajo los criterios seleccionados. Versión actual 29-10-2004.

🚧 EMBOSS CpGPlot/CpGReport (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>)

Detecta regiones ricas en GC de secuencias genómicas. CpGPlot realiza un gráfico con las áreas ricas en CpG y CpGreport presenta los datos numéricos.

3.5.6 ANALIZADORES DE SECUENCIAS DE DNA

🚧 Chromas Lite

Permite observar el gráfico de la secuenciación de fragmento de DNA, además de copiar dicha secuencia para analizarla. Versión 2.33.

🚧 BioEdit *Sequence Alignment Editor*

Creado por *Tom Hall, Ibis Therapeutics*, además de ver el gráfico, se puede realizar un alineamiento entre secuencias. Versión 7.0.

3.5.7 NORMALIZACIÓN DE DATOS DE qPCRs

geNorm

Es un programa para seleccionar el candidato adecuado a gen de referencia de una lista de genes utilizados. Calcula el factor de normalización para cada gen de referencia, teniendo en cuenta la medida de estabilidad de la expresión génica (M) y la media de la variación de emparejamiento (V) de este gen frente a todos los genes de referencia. La exclusión de los genes con mayor M permite seleccionar los genes a utilizar para la normalización. Versión 3.4.

3.6 EQUIPAMIENTO

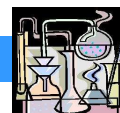


Tabla 3.II Principales equipos utilizados.

APARATO	MODELO	FABRICANTE
Autoclave	2000	SES
Sonicador	150	SONIPREP
Agitador magnético	REAX 2000	HEIDOLPH
pHímetro	GLP21	CRISON
Agitador rotatorio	Orbit	SELECTA
Agitador basculante	MR 3000	GIANT- BIO
Cabina de flujo laminar	AV100	TELSTAR
	MSC-ADVANTAGE	THERMO
Incubador de CO ₂	HERA CELL 150 /i	
Microscopio óptico	TMS	NIKON
	CH	OLYMPUS
Centrífuga refrigerada	BIOFUGE FRESCO	HERAEUS
Centrífuga de alta velocidad	RC 6 PLUS	SORVALL
	RT-7	
Cubetas para geles de agarosa	SUB-CELL GT	BIO-RAD
Cubetas para geles de poliacrilamida	MINI-PROTEAN TETRA CELL/III	
Fuente de alimentación	POWER PAC 300	
Sistema de transferencia de proteínas	TRANS-BLOT SD SEMI-DRY	
Horno de fijación de ácidos nucleicos	UV STRATALINKER 1800	STRATAGENE
Estufas	THEROVEN	SELECTA
Baños de agua termostatizados	UNITRONIC 320 OR	
Hornos de hibridación	HYBAID MAXI 14	THERMO
	SHAKE'N STACK	
Termobloque	TB1	BIOMETRA
Multi lector de placas	SYNERGY HT	BIOTEK
Espectrofotómetro	POWER WAVE XS2	

	ND 1000	NANO- DROP
Termociclador	T GRADIENT	BIOMETRA
Sistema de detección de secuencias	ABIPRISM 7000	APPLIED BIOSYSTEMS
Analizador de imagen con el Software Quantity One (versión 4.2.3.)	MOLECULAR IMAGER FX SYSTEM	BIO-RAD
Densitómetro	GS- 800	
Transiluminador	ULTRA-LUM	THRIFTLINE
Balanzas de precisión	TOLEDO AT261	MELTER
	PJ400	
Ultracongelador	-86°C Freezer	FORMA SCIENTIFIC
		SANYO

4 MÉTODOS

4.1 AISLAMIENTO Y ELONGACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1 HUMANO

4.1.1 AISLAMIENTO DE LA REGIÓN PROMOTORA

El aislamiento y amplificación de la región promotora del gen SND1 se realiza mediante una técnica denominada rastreo genómico basada en una doble PCR empleando un kit comercial (Figura 4.1).

Reactivos:
 •GenomeWalker™ Human Kit •TaKaRa LA Taq (TAKARA BIO INC.)
 (CLONTECH-TAKARA BIO COMPANY)

Las librerías genómicas humanas contenidas en el kit consisten en DNA genómico humano digerido separadamente por las enzimas de restricción *EcoRV*, *DraI*, *PvuII* y *SspI*, que forman extremos romos a los que se les han unido secuencias adaptadoras reconocidas por los oligonucleótidos sentido AP (*Adaptor Primers*) 1 y 2.

Los oligonucleótidos antisentido específicos (GSP, *Gene Specific Primer*) se diseñan con el programa Primer3 basándonos en la secuencia del cDNA del gen SND1 (GenBank NM_014390). Los oligonucleótidos diseñados (GSP1 y GSP2) (Tabla 4.1) se reconstituyen en agua milliQ a una concentración final de 10 µM.

Figura 4.1 Proceso de rastreo genómico utilizado en el aislamiento de la región promotora.

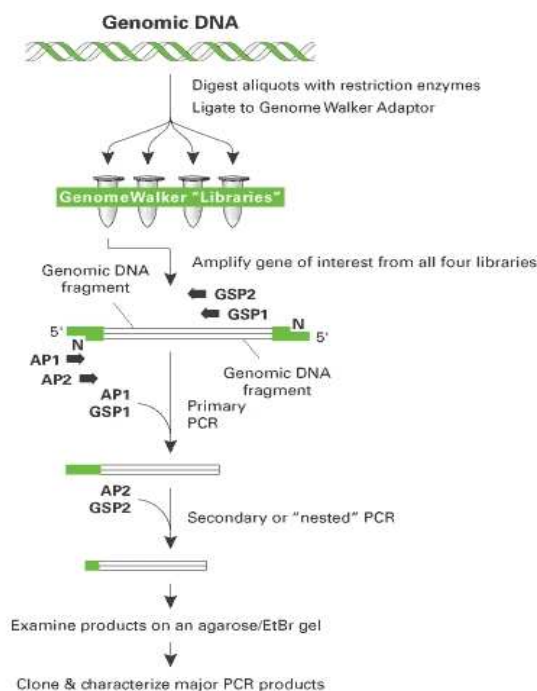


Tabla 4.I Oligonucleótidos utilizados para el aislamiento y elongación del promotor humano de SND1. La letra .s indica un oligonucleótido complementario a la secuencia 5'-3' (sentido) y las letras .as indican que es complementario a la secuencia 3'-5' del promotor (antisentido).

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
GSP1(+284,+318).as	CCCTGAGAGGACCATCTTGATGATGCCCCGCT	64°C
GSP2(+142,+172).as	GTGGGTGTCGGTGTGGTCAAAGGGAGTCT	62°C
Seq1(-2882,-2853).s	AGATCTATAACCAGATGTACTIONCTAACACC	52°C
Seq2(-2844,-2818).as	GAGGTTCACTACATGCAAAATCACATC	52°C
Seq3(-2105,-2079).as	TCAGTTTCCTTCTACATGGGTCTCTCC	55°C
Seq4(-1519,-1293).s	AATGACACGGTAGAAAATAGGGGTACGG	55°C
Seq5(-514,-487).as	CTTGAAAATCAGAGCTTTGTGGAACC	62°C
Seq6(-76,-49).s	GCGAGCAGGGTGCCTATTGGCCTGAGG	62°C
Seq4BIS(-1498,-1475).s	GTACGGTAGATAAAAAGCCACGAG	52°C
Seq7(-1410,-1487).s	TTGGAAAAGGGTGGCAAATTAGGG	51°C
Seq8(-816,-795).as	ACCGGATACCTTCCCTAGCCCC	55°C
Seq9(-1218,-1194).s	GGGCAAGATAGTCAAATCTCAGCTCT	53°C

En la primera PCR de aislamiento de la región promotora, se emplean como molde 2,5 ng de las librerías de DNA genómico humano, 0,17 μ M del oligonucleótido sentido AP2, 0,31 μ M del oligonucleótido antisentido GSP1 complementario a la región del gen SND1 (+284,+318), 2,5 mM de Mg⁺, 0,4 mM de dNTP, Tampón 10X y 1,25 U de enzima TaKaRa LA TaqTM en un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de la PCR son las siguientes:

94°C	30 s	10 ciclos
76°C	4 min	
94°C	30 s	25 ciclos
73°C	4 min	
94°C	30 s	6 ciclos
67°C	4 min	
67°C	10 min	

A continuación se realiza una PCR anidada o PCR2 en un volumen final de 20 μ L utilizando como molde 0,5 μ L del producto de la primera PCR, 0,19 μ M del oligonucleótido sentido AP2, 0,33 μ M del oligonucleótido antisentido GSP2 complementario a la región del gen (+142,+171), 2,5 mM de Mg⁺, 0,4 mM de dNTP, Tampón 10X y 1 U de enzima polimerasa TaKaRa LA Taq. Las condiciones de la PCR son las siguientes:

94°C	30 s	15 ciclos
75°C	4 min	
94°C	30 s	28 ciclos
70°C	4 min	
70°C	10 min	

El producto resultante de cada PCR2 se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se purifica y se lleva a secuenciar.

4.1.2 ELONGACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA

Se elongan las secuencias obtenidas de la amplificación de librerías de DNA genómico humano utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido Seq1-9 de la Tabla 4.I, los cuales se diseñan según los extremos secuenciados de las PCRs anteriores para amplificar la zona desconocida que queda entre ellos.

Para elongar los extremos de los fragmentos aislados por PCR se emplea como molde 2,5 ng del producto de la PCR2, 0,25 μ M del oligonucleótido sentido, 0,25 μ M del oligonucleótido antisentido GSP1, 2,5 mM Mg⁺, 0,4 mM dNTP, Tampón 10X y 1,25 U de enzima polimerasa TaKaRa LA Taq, en un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de la PCR son las siguientes:

94°C	30 s	15 ciclos
75°C	1 min	
94°C	30 s	28 ciclos
73°C	1 min	
70°C	10 min	

Los productos resultantes de las múltiples PCRs de elongación realizadas se separan por electroforesis en un gel de agarosa al 1-2%, se aíslan y se purifican para secuenciarlos.

4.1.3 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Reactivos:	
•Agarosa	•Tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8)
•Bromuro de etidio (SIGMA)	•Tampón de carga 6X (Sacarosa 40% p/v, azul de Bromofenol 0,25%, Xilencianol 0,25%)
•SyberSafe (INVITROGEN)	



La electroforesis de DNA se realiza en geles de agarosa 1-3% (según el tamaño de la muestra a separar) en tampón TAE con 0,6 μ g/mL de bromuro de etidio o 0,4 μ g/mL de SyberSafe. Las muestras en tampón de carga se aplican en el gel y se realiza la electroforesis a voltaje constante (50-70 V) durante 20-45 min. Se visualizan las bandas en el transiluminador de UV, se recortan y se extrae el DNA.

4.1.4 PURIFICACIÓN DE DNA

Reactivos:	
•High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE):	-Tampón de elución Tris-HCl 10 mM pH 8

El DNA procedente del gel de agarosa o producto de una PCR se purifica mediante el *High Pure PCR Product Purification* Kit. Los fragmentos de DNA de tamaño entre 0,1-10 kb se eluyen en tampón Tris-HCl obteniéndose el DNA purificado a una concentración final de 20-30 ng/ μ L.

4.1.5 SECUENCIACIÓN DE DNA

Las secuenciaciones se realizan en el Servicio General de Genómica, unidad de secuenciación y genotipado (SGIker, UPV-EHU). Se emplea la metodología basada en la reacción química de Sanger y la posterior migración en secuenciadores automáticos ABIPRISM.

El kit de secuenciación utilizado es el BigDye v3.1 (Applied Biosystems). Para secuencias con un alto porcentaje en GC, formación de estructuras secundarias o con poliGs, se emplea el kit específico dGTPBigDye (Applied Biosystems).

Las secuencias se analizan con la ayuda del editor de secuencias biológicas BioEdit que permite alinearlas, ver su factor de similitud y lograr una sola secuencia resultante. El resultado se comprueba con el NCBI-Blast en el cual se alinea la secuencia obtenida con la secuencia conocida de la base de datos del genoma humano o el de rata.

4.2 CLONACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1 HUMANO

Para la clonación de los fragmentos de delección 5' de la región promotora del gen SND1 se emplea el vector pGL3-Basic, que contiene el gen marcador de la luciferasa, *luc+*. La luciferasa se expresa en células transfectadas solamente cuando existe una secuencia promotora insertada en el plásmido, siendo la expresión de la enzima dependiente de la actividad promotora del fragmento insertado, que en nuestro caso es del promotor humano del gen SND1.

4.2.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DELECCIÓN 5'

A partir de la región promotora del gen SND1 se amplifican siete fragmentos de delección 5' que tienen en común el extremo 3'.

Se clonan los fragmentos de DNA utilizando como molde el producto de la PCR2 del DNA genómico humano de la librería *Dral*. Los oligonucleótidos sentido empleados incluyen una diana de restricción para la enzima *MluI* y los oligonucleótidos antisentido una diana de restricción para la enzima *BglII* (Tabla 4.II).

Tabla 4.II Oligonucleótidos empleados para la clonación de los fragmentos de delección 5' de la región promotora del gen humano SND1. Las letras minúsculas indican las dianas de restricción para *MluI* añadidas en los oligonucleótidos sentido y para *BglII* en el oligonucleótido antisentido.

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
PRMTER(+200,+233).as	ACGCCATGTGTagatcTGCAAAGGCAACGAGTGG	61°C
PRMTER(-15,+15).s	CGGTGGCGCTCTGGCacgcgtGCGCGGCGA	70°C
PRMTER(-125,-94).s	GCGCTTCCTGGAacgcgtCACCGTTTTGGGGA	64°C
PRMTER(-286,-260).s	CGCGGCTGGCTacgcgtCTGGGGCTCC	67°C

PRMTER(-430,-398).s	AGATTCCTCCAGGacgcgtCCTGCGTGGCTCCA	66°C
PRMTER(-635,-605).s	AACATTAATGGAacgcgtACAAGTGCTAGA	55°C
PRMTER(-945,-920).s	AAATGACATAacgcgtGCAAGGTCCT	53°C
PRMTER(-1295,-1269).s	ACTGTGGTTAacgcgtGTAATACCAG	53°C

Se obtienen de este modo los fragmentos p100/2 (+2,+221), p100/112 (-112,+221), p100/274 (-274,+221), p100/416 (-416,+221), p100/622 (-622,+221), p100/934 (-934,+221) y p100/1284 (-1284,+221). Se indica entre paréntesis la región del promotor del gen humano SND1 amplificada, considerando +1 el inicio de transcripción.

Para cada PCR se utiliza: 2,5 mM de Mg⁺, 0,4 mM de dNTP, Tampón 10X, 10 µM de oligonucleótido sentido, 10 µM del oligonucleótido antisentido, 2,5 U de enzima TaKaRa LA TaqTM y 2,5 ng de DNA molde, en un volumen final de 50 µL. Las condiciones de las PCRs para cada fragmento son las siguientes:

Fragmento p100/2			Fragmento p100/112			Fragmento p100/274			Fragmento p100/416		
94°C	30 s	19	94°C	30 s	15	94°C	30 s	15	94°C	30 s	15
72°C	1 min	ciclos	72°C	1 min	ciclos	72°C	1 min	ciclos	70°C	1 min	ciclos
94°C	30 s	32	94°C	30 s	30	94°C	30 s	28	94°C	30 s	28
73°C	1 min	ciclos	71°C	1 min	ciclos	69°C	1 min	ciclos	65°C	1 min	ciclos
73°C	10 min		71°C	10 min		69°C	10 min		65°C	10 min	

Fragmento p100/622			Fragmento p100/934			Fragmento p100/1284		
94°C	1 min	15 ciclos	94°C	1 min	30 ciclos	94°C	30 s	30 ciclos
71°C	30 s		94°C	30 s		94°C	1 min	
94°C	1 min	28 ciclos	56°C	1 min	30 ciclos	56°C	30 s	30 ciclos
61°C	3 min		72°C	3 min		72°C	1 min	
61°C	10 min		72°C	10 min		72°C	10 min	

4.2.2 DIGESTIÓN DEL VECTOR INDICADOR pGL3-Basic Y DE LOS FRAGMENTOS DE DELECCIÓN 5' DE LA REGIÓN PROMOTORA

Reactivos: • Acetato sódico 3 M pH 5 • Etanol 98% • TrisHCl 1 mM pH 8.5	• Enzimas de restricción <i>MluI</i> y <i>BglII</i> (ROCHE APPLIED SCIENCE) • Tampón H SuRE/Cut (10x)
---	---

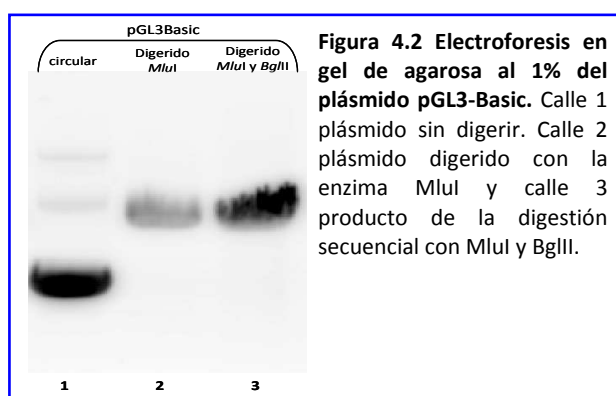
El plásmido pGL3-Basic (30 µg) se digiere con 30 U de la enzima de restricción *MluI* en tampón H, en un volumen final de 50 µL y a 37°C durante 3 h. Se precipita por adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5 y 2,5 volúmenes de etanol al 98%, se agita y se mantiene a -20°C durante 1 h. La muestra se centrifuga a 16.000 x g durante 10 min y el precipitado se lava dos veces con etanol al 70%. Por último, se deja secar la muestra y se resuspende en 33 µL de agua milliQ.

El producto de la digestión se digiere, en segundo lugar con 20 U de la enzima de restricción *BglII* en tampón H, en un volumen final de 50 µL y a 37°C durante 19 h. El plásmido

digerido se precipita como se ha descrito anteriormente y se resuspende en 70 μL de tampón TrisHCl 1 mM pH 8.5.

Los fragmentos de deleción 5' de la secuencia promotora (100-500 ng) se digieren simultáneamente con 5 U de *BglII* y 5 U de *MluI* en tampón H, en un volumen final de 50 μL y a 37°C durante 18-20 h.

El producto de las digestiones se carga en un gel de agarosa al 1% (Figura 4.2) y se purifica como en 4.1.4, obteniéndose entre 10 y 20 μL de muestra en tampón Tris-HCl 1 mM pH 8.5 con una concentración entre 25 y 40 ng/ μL , determinados por el espectrofotómetro NanoDrop.



4.2.3 LIGACIÓN DEL VECTOR pGL3-Basic CON LOS FRAGMENTOS DE DELECCIÓN 5' DEL PROMOTOR DE SND1

Los productos purificados de las digestiones del vector pGL3-Basic y de los fragmentos de deleción, se unen mediante el sistema *LigaFast Rapid DNA Ligation* diseñado para una ligación eficiente de un fragmento de DNA con extremos cohesivos en un vector plasmídico.

Reactivos:	-T4 DNA Ligase
•LigaFast Rapid DNA Ligation (PROMEGA):	-Tampón de ligación rápida 2X

Se incuban el plásmido pGL3-Basic y el inserto en una proporción molar 2:1 o 3:1 inserto:plásmido con 3 U de T4 DNA Ligasa en el tampón de ligación rápida 2X y a temperatura ambiente durante 5-10 min.

Se utilizan 120 ng de pGL3-Basic y la cantidad de inserto de deleción necesaria en una relación molar 3:1 se determina mediante la siguiente ecuación:

$$X \text{ (ng del fragmento de deleción)} = \frac{3 \times [(\text{tamaño en pb del inserto}) \times (120 \text{ ng de vector})]}{4800 \text{ bp del vector}}$$

4.2.4 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* TG1 o JM109 CON LOS FRAGMENTOS DEL PROMOTOR DE SND1 CLONADOS EN pGL3-Basic

Una vez introducidos los fragmentos de delección 5' del promotor del gen humano SND1, se amplifican los vectores pGL3-Basic clonados utilizando cepas de *Escherichia coli*.

Reactivos:

- *Luria Bertani* (LB) (PRONADISA)
- Medio TSS pH 6.5 (medio LB suplementado con un 10% (p/v) Polietilenglicol PEG 8000, 5% (v/v) DMSO y 50 mM MgSO₄·7H₂O)

Para inducir a la competencia las bacterias *Escherichia coli*, se toma una muestra mantenida a -80°C, se inocula en 25 ml de medio LB y se incuba a 37°C durante 16 h. Transcurrido ese tiempo se toma 1 ml del cultivo, se añade a 100 ml de medio LB y se incuba a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5-0,6 a 600 nm. Las bacterias se sedimentan por centrifugación a 2.400 x g a 4°C durante 10 min, se resuspenden en 10 ml de medio TSS y se almacenan a -80°C en alícuotas.

Reactivos:

- Bacterias *Escherichia coli* competentes TG1 o JM109
- Medio LB
- Asa Digiralsky (DELTALAB)
- Placa de 10 cm de LB agar (PRONADISA) con 1 µg/mL Ampicilina
- Agarosa (PRONADISA)
- Enzimas de restricción *Bgl*II y *Mlu*I

Se toman 70 µL de bacterias *Escherichia coli* competentes, se añaden 10 µL de producto de ligación y se incuban en hielo durante 20 min. A continuación se someten a choque térmico a 42°C durante 45 o 90 s (según la cepa TG1 o JM109), proceso por el cual las bacterias introducen el DNA externo. Se enfrían en hielo, se añade 1 mL de medio LB y se incuban con agitación a 37°C durante 1 h. Se sedimentan por centrifugación a 2.400 x g durante 1 min y tras retirar el sobrenadante se siembra el sedimento sobre una placa de LB agar con Ampicilina. El antibiótico selecciona las bacterias transformadas, ya que el vector pGL3-Basic contiene el gen de resistencia a ampicilina (*bla*) por lo que sólo las bacterias que han incorporado el plásmido crecerán en este medio de cultivo. Se deja secar el sedimento durante 15 min y las placas se incuban invertidas a 37°C durante 15-16 h.

Las colonias seleccionadas se inoculan en 3 mL de medio LB en presencia de ampicilina y se dejan crecer en agitación a 37°C. Pasadas 15-16 h, se purifica el DNA plasmídico por miniprep (4.2.5.1, *Métodos*). A continuación, se digiere con las endonucleasas *Bgl*II y *Mlu*I y mediante electroforesis en gel al 1% de agarosa se comprueba si se ha insertado el fragmento. Para comprobar que no existen mutaciones en la región clonada se secuencian los plásmidos que contienen el fragmento deseado.

4.2.5 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

4.2.5.1 (MINIPREP) Purificación a pequeña escala de DNA plasmídico

Los plásmidos se purifican a partir del cultivo bacteriano de *E. coli* mediante lisis alcalina y fenol:cloroformo.

Reactivos:	
• LB con 1 µg/mL Ampicilina	• Disolución III: acetato potásico 3 M y ácido acético 2 M
• Tampón de lisis I: tampón glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8	• Fenol:cloroformo 1:1
• Tampón de lisis II: disolución NaOH 0,2 N, SDS 1%	• Etanol absoluto
	• Etanol 70%
	• Ribonucleasa Pancreática 100 µg/mL

De los 3 mL del cultivo bacteriano transformado, se toman 1,5 mL y se centrifuga a 16.000 x g durante 1 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 100 µL de tampón de lisis I, se agita y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 200 µL del tampón de lisis II y se incuba a 4°C durante 5 min. Se añaden 150 µL de disolución III fría y se incuba de nuevo a 4°C durante 5 min. Se eliminan los restos celulares por centrifugación a 16.000 x g a 4°C durante 5 min. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo, se añaden 500 µL de fenol:cloroformo y se centrifuga a 16.000 x g a 4°C durante 3 min. Se transfiere la fase superior acuosa, que contiene el DNA, a un tubo nuevo, se mezcla con 1 ml de etanol absoluto frío, se mantiene a -80°C durante 15 min y se precipita el DNA mediante centrifugación a 16.000 x g a 4°C durante 15 min. La pastilla se lava con 1 ml de etanol frío al 70%, se centrifuga a 16.000 x g a 4°C durante 2 min y se elimina el etanol dejando secar la muestra a temperatura ambiente. Por último, se resuspende en 30 µL de agua con ribonucleasa pancreática y se incuba durante 15 min a 37°C. La concentración del DNA se determina en el NanoDrop. En el presente trabajo se obtuvieron concentraciones de entre 1-2 µg/µL.

4.2.5.2 (MIDIPREP) Purificación a mediana escala de DNA plasmídico

Cuando se requiere una cantidad mayor de DNA plasmídico para la transfección de líneas celulares de hepatoma, los plásmidos recombinantes se purifican a partir de volúmenes superiores de cultivo bacteriano de *E. coli*.

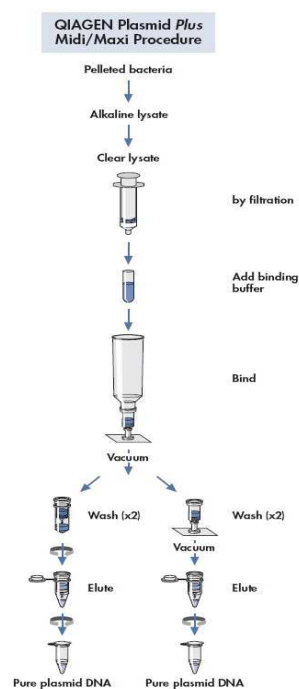


Figura 4.3 Proceso esquemático de la purificación de los plásmidos a mediana escala utilizando el kit Plus.

A lo largo de la tesis se utilizan dos kits comerciales:

- ✚ DNA Plasmid Midi Kit (QIAGEN)
- ✚ DNA Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN) acoplado a una bomba de vacío (QIAvac 24 Plus) (QIAGEN)

Reactivos:
 •DNA Plasmid (Plus) Midi Kit •LB-Ampicilina (1 µg/mL)

Las bacterias de interés se incuban con agitación, en 25 mL de LB y a 37°C durante 16 h, se sedimentan por centrifugación a 6.000 x g durante 15 min y se continúa el protocolo de purificación del kit de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Figura 4.3), obteniéndose entre 100-200 ng/µL del plásmido purificado.

4.3 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

4.3.1 DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Los oligonucleótidos sentido y antisentido empleados en la mutagénesis dirigida son complementarios a la región promotora del gen SND1 y contienen las secuencias de unión a los factores de transcripción en estudio, NF-Y y Sp1, con algunas bases sustituidas de acuerdo a su mayor probabilidad de formar parte del elemento de unión. Las secuencias y las características de los oligonucleótidos para la mutagénesis dirigida se detallan en la Tabla 4.III.

Tabla 4.III Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida a los lugares de unión de Sp1 y NF-Y del promotor humano de SND1. En negrita y cursiva se encuentran las bases de los lugares que han sido sustituidas para la mutagénesis dirigida. Únicamente se muestran los oligonucleótidos sentido.

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
SND1MutSp1(-99,-70).s	TGGGGACCAAGA <i>ATCGG</i> TACTCCGCGAGC	62°C
SND1MutSp1(-58,-29).s	GGCCTGAGGGCC <i>ATCGT</i> ACTCTGGGCGCTA	65°C
SND1MutSp1(-175,-151).s	CCGGAAGT <i>CTAGCCA</i> TATATTTAGC	51°C
SND1MutNFY(-71,-47).s	CAGGGTGCCT <i>CCTGT</i> CCTGAGGGCC	62°C
SND1MutNFY(-38,-13).s	CTGGGCGCT <i>ACCTGT</i> GCGGAGGGCG	64°C

4.3.2 PCR MUTAGÉNICA

Se obtienen 3 tipos de mutados en los fragmentos p100/112, p100/274 y p100/416:

- ✚ Clonados con una sola mutación correspondiente a Sp1 o NF-Y.
- ✚ Clonados con dos mutaciones para el mismo factor de transcripción, Sp1 o NF-Y.
- ✚ Clonados con dos mutaciones, una para cada factor de transcripción Sp1 con NF-Y.

Reactivos:	
• Pfu Turbo (STRATAGENE)	• KAPA HiFi (KAPA BIOSYSTEMS)
-10x tampón de reacción	-5x tampón KAPA HiFi
Pfu DNA polimerasa	Fidelity
-dNTP	-dNTP

Para la reacción de amplificación se utilizan las polimerasas Pfu Turbo y KAPA HiFi. La polimerasa KAPA HiFi tiene una tasa de error 3 veces menor que Pfu. Los componentes de la reacción para cada polimerasa se detallan a continuación:

Componente	PfuTurbo	KAPA HiFi
Agua destilada estéril (dH ₂ O)	Vf= 50 µL	Vf= 25 µL
10x tampón de Pfu DNA polimerasa	1x	
5x tampón de KAPA HiFi <i>Fidelity</i>		1x
dNTPs	0,4 mM	0,3 mM
Molde	2 ng	40 ng
Oligonucleótido sentido	1 mM	0,4 mM
Oligonucleótido antisentido	1 mM	0,4 mM
<i>PfuTurbo DNA polimerasa</i>	2,5 U	
<i>KAPA HiFi DNA polimerasa</i>		0,5 U

Las condiciones para la PCR son las siguientes:

Programa tipo para Pfu			Programa tipo para KAPA		
95°C	2 min		95°C	5 min	
95°C	30 s		98°C	20 s	
Tm- 5°C	30 s	30 ciclos	Tm	15 s	35 ciclos
72°C	1 min/ Kb		72°C	30 s/ Kb	
72°C	10 min		72°C	5 min	

4.3.3 DIGESTIÓN CON DpnI

Los plásmidos utilizados como moldes en las PCRs de las mutagénesis dirigidas han sido purificados de bacterias dam⁺, que metilan las adeninas de su DNA. El DNA plasmídico resultante de las PCRs no está metilado, por lo que no se degradará por el enzima DpnI, que reconoce y corta la secuencia 5'-GmATC-3'.

Reactivos:	
• Enzima DpnI (20 U/µL)	• Tampón de digestión NE4 (acetato potásico 50 mM, Tris-acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, dTT 1mM pH 7.9)

Para digerir el DNA molde se incubó el producto de la PCR mutagénica con 16 U de la enzima DpnI en tampón NE4 a 37°C durante 3 h. Después de obtener el plásmido recombinante mutado se transforman bacterias competentes TOP10.

4.3.4 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* Y SELECCIÓN DE RECOMBINANTES MUTADOS EN LOS LUGARES DE UNIÓN DE Sp1 Y NF-Y

Reactivos:
 •Placas de LB agar y Ampicilina •One Shot® TOP10 (INVITROGEN)
 -Medio SOC

Se transforman bacterias *Escherichia coli* químicamente competentes One Shot® TOP10 con 5 µL del vector clonado-mutado mediante un choque térmico de 42°C durante 30 s. Se añaden 250 µL de medio SOC, se incuban con agitación 1 h a 37°C y se siembran en placa de LB agar con ampicilina a 37°C durante 16 h. Al día siguiente, se seleccionan las colonias que son posibles portadoras de las mutaciones, se lleva a cabo una miniprep (4.2.5.1, *Métodos*) y se secuencian para comprobar si la mutagénesis ha funcionado.

4.4 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES DE HEPATOMAS HepG2 Y McA-RH777

Las líneas celulares de hepatoma humano y de rata se mantienen en un incubador a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ en frascos de cultivo de 75 cm² (CORNING LIFE SCIENCES/ BECTON DICKINSON).

Reactivos:
 •Tripsina (SIGMA) •Azul Trypan (FLUKA) •Medio EMEM (ATCC)
 •Suero fetal bovino (ATCC) •Suero de caballo (ATCC)
 •L-Glutamina (ATCC) •Penicilina /Estreptomicina (SIGMA)

Las células se cultivan en medio EMEM (Medio esencial mínimo de Eagle) suplementado como se detalla a continuación:

Componente	McA-RH777	HepG2
Suero fetal bovino	5% (v/v)	10% (v/v)
Suero de caballo	20% (v/v)	-
L-Glutamina	2 mM	2 mM
Penicilina / Estreptomicina	100 U/ml 0,1 mg/ml	100 U/ml 0,1 mg/ml

Cuando las células alcanzan una confluencia del 80-90% se hace un pase para seguir manteniendo el cultivo. Se incuban con Tripsina 1 mg/ml y EDTA 0,4 mg/ml a 37°C durante 10 min, para que las células dejen de estar adheridas. Se recogen y se les añade el medio EMEM suplementado y se determina la densidad celular mediante tinción con azul Trypan en una cámara de conteo Neubauer (ASSISTENT). Se resiembran en frascos o en placas para los experimentos correspondientes.

4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE GENES MARCADORES (*Reporter Gene Assay*)

4.5.1 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

Reactivos:

- FuGENE® 6 / FuGENE® HD (ROCHE, PROMEGA)
- EMEM (Medio Base)
- EMEM (suplementado)
- PBS 1x

La transfección consiste en la introducción de DNA plasmídico en células eucariotas. Para ello se siembran 95.000 células HepG2 o 40.000 células McA-RH7777 por pocillo, en placas de 12 pocillos, y cuando están entre 60-70% de confluencia se introducen los vectores empleando el complejo lipídico comercial FuGENE®6 para la transfección de la línea celular HepG2 humana y FuGENE®HD en el caso de McA-RH7777.

Por un lado se elabora la mezcla de los plásmidos que contiene 0,1 µg de los fragmentos del promotor, 0,1 µg del plásmido de expresión del factor de transcripción de interés y 0,1 µg del plásmido normalizador (pRL-TK o pSV-β-Galactosidasa). Por otro lado se prepara el FuGENE®, manteniendo la proporción 3 µL de FuGENE® por cada 1 µg de DNA a transfectar, diluyéndolo en medio EMEM suplementado. Se combinan ambas preparaciones en un mismo tubo que se incuba a temperatura ambiente durante 30 min y se añade a cada pocillo del cultivo celular un volumen de 20-40 µL. Transcurridos 24 h se determina la actividad transcripcional.

4.5.2 ENSAYO DE LOS GENES MARCADORES

La actividad transcripcional de los fragmentos de delección 5' de la región promotora de los genes SND1 y SNDp102 de rata, se mide como actividad luciferasa del gen marcador *Firefly luciferase*, presente en el vector pGL3-Basic y cuya expresión depende de la actividad promotora del fragmento clonado. Los valores de actividad transcripcional se normalizan respecto a la actividad *Renilla Luciferase* o β-Galactosidase, correspondientes a los vectores normalizadores pRL-TK o pSV-β-Galactosidasa.

Reactivos:

- Dual Luciferase Assay System DLR (PROMEGA)
- PBS 1X
- Actividad Luciferasa:
 - D-Luciferin 2,5 mM (SIGMA)
 - Glycyl-glycine 100 mM (SIGMA)
 - MgSO4 100 mM
 - ATP 20 mM (SIGMA)
- Actividad Galactosidasa:
 - ONPG (o-nitrophenyl-B-D-galactopyranoside) (SIGMA)
 - β-Mercaptoetanol (SIGMA)
 - Tampón Z (Na2HPO4 100 mM, KCl 10 mM, MgSO4 1 mM)

Los lisados celulares se preparan según el protocolo del kit comercial *Dual Luciferase Assay System*. Se aspira el medio de cada pocillo, se lava con PBS, se añaden 100 µL de medio de lisis por

pocillo y se incuba durante 15 min con agitación. Se recogen los lisados celulares y se añade el sustrato quimioluminiscente, que en presencia de ATP y otros cofactores produce luz, la cual se detecta en un luminómetro.

En los experimentos en los que se utiliza pRL-TK como normalizador, la actividad luciferasa-renilla se ensaya con el Kit comercial DLR que permite medir secuencialmente las actividades *Firefly* y *Renilla* luciferasas utilizando 20 μL de muestra. En primer lugar se mide la actividad de *Firefly* añadiendo 100 μL de *Luciferase Assay Reagent II* que genera una señal luminiscente durante al menos un minuto, después se añaden 100 μL de *Stop & Glo[®] Reagent*, sobre la misma muestra, para detener la reacción e iniciar la de la *Renilla*, que emite luminiscencia durante otro minuto más (Figura 4.4)

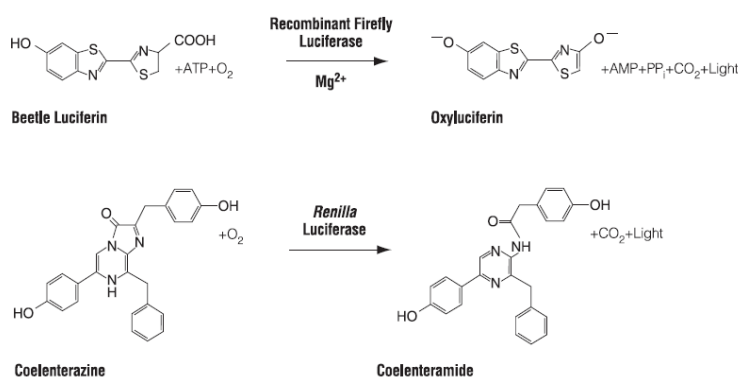


Figura 4.4 Reacción bioluminiscente catalizada por las luciferasas *Firefly* y *Renilla*. Tanto Oxiluciferina como Coelenteramida son productos luminiscentes detectados por el lector.

Cuando se cotransfecta el normalizador pSV- β -Galactosidasa, los ensayos de luciferasa y Galactosidasa se hacen por separado. Se mide la luminiscencia de la *Firefly* luciferasa utilizando 20 μL de lisado y D-Luciferina como sustrato. La actividad enzimática de la β -Galactosidasa se determina por colorimetría, incubando a 37°C durante 16 h 20 μL de lisado con 200 μL de la mezcla del sustrato ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranososa) que genera O-nitrofenol, de color amarillo y que absorbe a una longitud de onda de 405 nm (Figura 4.5).

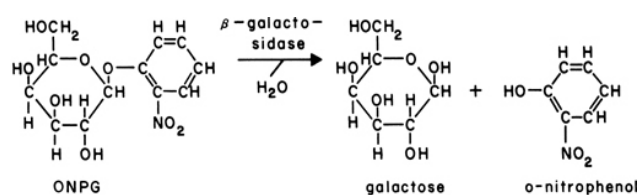


Figura 4.5 Reacción catalizada por β -Galactosidasa.

Las actividades transcripcionales de cada uno fragmento de delección 5' de los promotores humano SND1 y rata SNDp102 se expresan en unidades relativas de luminiscencia (URL), que se calculan como la relación entre las actividades de *Firefly* luciferasa y del normalizador.

4.6 UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN A LOS PROMOTORES DE LOS GENES SND1 HUMANO Y SNDp102 DE RATA MEDIANTE EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

El ensayo de retardo de la movilidad electroforética o EMSA, se basa en la distinta movilidad de los complejos DNA-proteína (*shift*) respecto al DNA de doble cadena, en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Este método permite determinar la unión específica de un factor de transcripción a un elemento de unión presente en la secuencia promotora del gen.

4.6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE HEPATOMA

Reactivos:	
•PBS frío	-Tampón B (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 0,4 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10%, 1,5 µL cóctel inhibidor de proteasas, DTT 1 mM)
•Nuclear Extraction Kit (PANOMICS):	-DTT 100 mM
-Tampón A (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, DTT 1 mM, 10 µL cóctel inhibidor de proteasas, IGEPAL 0,0004%)	-Inhibidor de proteasas
	-Inhibidor de fosfatasa I / II

Los extractos nucleares de las líneas celulares HepG2 y McA-RH7777 se aislaron mediante el *Nuclear Extraction Kit*. Se siembran 3×10^6 células en placas de 10 cm de diámetro y se cultivan 4-5 días hasta alcanzar una confluencia del 90%.

Se lavan las placas dos veces con PBS frío y se añade la disolución hipotónica (Tampón A), se agitan en hielo durante 10 min y se recogen las células con un rascador de goma. A continuación, se centrifugan a 4°C a 14.000 x g durante 3 min y se retira el sobrenadante. Se añaden 150 µL de la disolución hipertónica (Tampón B) a la pastilla y se incuba durante 60 min en hielo con agitación para romper la membrana nuclear. Seguidamente, se centrifuga a 4°C a 14.000 x g durante 5 min y se recoge el sobrenadante, que es el extracto nuclear.

La concentración proteica se determina según se detalla en el apartado 4.9, *Métodos* y el extracto se divide en alícuotas que se almacenan a -80°C.

4.6.2 MARCAJE DE SONDAS CON DIGOXIGENINA

Los oligonucleótidos (o sondas) sentido y antisentido que se diseñan para el EMSA constan de unos 30 nucleótidos y contienen uno o más posibles lugares de unión a los factores de transcripción de interés (Tabla 4.IV).

Tabla 4.IV Oligonucleótidos utilizados en el EMSA para identificar los lugares de unión de Sp1, NF-Y, SREBP y PPARs en el promotor de humano SND1 o de rata SNDp102. En negrita y cursiva se encuentran las bases de los lugares de unión para Sp1 que han sido sustituidas en los oligonucleótidos mutados. Los oligonucleótidos son de doble cadena aunque se muestran los sentido, indicados como .s. SND1 corresponde al promotor humano y Snd1 al de rata.

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
Sp1 consenso	ATTCGATCGGGGCGGGGCGAG	62°C
SND1Sp1(-412,-382).s	GCCTGCGTGGCTCCACCTCCCAGGCCGCA	69°C
SND1Sp1(-315,-286).s	GACGTCATGGGCGAGGTCAGGCGGGAGGGC	67°C
SND1Sp1(-294,-263).s	CGGGACGGCGCGGCTGGCTCCGCCCTGGGGC	75°C
SND1Sp1(-183,-151).s	CGGCTGCCCCGGAAGTCCC GCCCATATTTAGC	67°C
SND1Sp1(-100,-69).s	TTGGGGACCAAGAGGCGGGGCTCCGCGAGCAG	68°C
SND1Sp1(-62,-33).s	TATTGGCCTGAGGGCCGGCGGGCTCTGGGC	67°C
SND1Sp1(+12,+48).s	GCGAGTAGAACGTGTGGCGGCGGCGAGATCGCGTCT	69°C
SND1Sp1(+139,+156).s	GGTAGCCAGCCTGCCCTCGCTCGACTCCCTTTCACC	70°C
SND1Sp1(-262,-223).s	TCCCATGGCCCCCGCGCCCCGCGCCAGATGCTGACGTG	75°C
SND1Sp1(-41,-6).s	GCTCTGGGCGCTAATTGGGCGGAGGGCGGTGGCGCTC	72°C
SND1MutSp1(-412,-382).s	GCCTGCGTGGCTCCATCTCT <i>TAC</i> AGGCCGCA	69°C
SND1MutSp1(-315,-286) a.s	GACGTCATG <i>ATCGAT</i> ATCAGGCGGGAGGGC	62°C
SND1MutSp1(-315,-286) b.s	GACGTCATGGGCGAGGTCA <i>ATCGGT</i> AGGGC	63°C
SND1MutSp1(-294,-263)a.s	CGGGAG <i>ATCGCTACT</i> GGCTCCGCCCTGGGGC	70°C
SND1MutSp1(-294,-263)b.s	CGGGAGGGCG <i>CATCTGTAT</i> CCGCCCTGGGGC	70°C
SND1MutSp1(-294,-263)c.s	CGGGAGGGCGCGGCTGGCT <i>TAGCCATT</i> GGGGC	70°C
SND1MutSp1(-183,-151).s	CGGCTGCCCCGGAAGTCT <i>TAGCCAT</i> ATATTTAGC	67°C
SND1MutSp1(-100,-69).s	TGGGGACCAAGAA <i>ATCGGTACT</i> CCGCGAGC	62°C
SND1MutSp1(-62,-33)a.s	GGCCTGAGGGCC <i>ATCGTACT</i> CTGGGCGCTA	65°C
SND1MutSp1(-62,-33)b.s	TATTGGCCTGAGG <i>ATCGGTAGG</i> CTCTGGGC	62°C
SND1MutSp1(+139,+156).s	GGTAGCCAGCCTGC <i>TATCGATT</i> CGACTCCCTTTCACC	66°C
SND1MutSp1(-41,-6)a.s	GCTCTGGGCGCTAATTG <i>ATCGGTAGG</i> CGGTGGCGCTC	68°C
SND1MutSp1(-41,-6)b.s	GCTCTGGGCGCTAATTGGGCGGAG <i>ATCGGTAGG</i> CGCTC	68°C
SND1NF-Y (-55,-23).s	GTTTCTGGACGCTAATTGGCCAGAGGGAGGTGG	64°C
SND1NF-Y (-87,-55).s	AAACAGAGTGCCTATTGGCTTGAGTTCTAGC	58°C
LDLR-SRE.s	TTTGAAAATCACCCACTGCAAACCTCTCCCCTGCTA	62°C
B-HLH-ZIP-Ebox.s	GTCAGTCAGGCCACGTGAGATCGGTCAG	61°C
SND1SREBP (-71,-32).s	CAGGGTGCCTATTGGCCTGAGGGCCGGCGGG	69°C
SND1SREBP (-239,-211).s	GGCCAGATGCTGACGTGTCCTTTCCTCC	61°C
SND1SREBP(-785,-755).s	CGCTTCACACTGGGTGCGGTGAGAGCGTGAA	62°C
SND1SREBP (-945,-916).s	AAATGACATAACACATGCAAGGTCCTTGGT	54°C
SND1SREBP (-1104,-1076).s	GCCTGGGAGTGTAAGGCTGCAGTGAGCC	63°C
SND1SREBP (-1224,-1220).s	GGAGTATAGCTTGAGCCCAGGAGACCAGCC	62°C
Snd1SREBP (-169,-141).s	AATTTGCCCGTCACCGCAAATCAGCTGTTT	57°C
Snd1SREBP (-235,-206).s	TCCTTTCTTTCCACTACACCTCCCGACAC	59°C
Snd1SREBP (-256,-227).s	CCACGGCCAGATGCTGACGTGTCCTTTCTT	61°C
Snd1SREBP (-272,-243).s	CATGGCTCCCCGCGCCCCACGGCCAGATGC	69°C
Snd1SREBP (-482,-453).s	TCTGTTCTGCTGAAGTGAAACGTCGGAAC	57°C
Snd1SREBP (-598,-570).s	ATTAGTGGAACTCACAAAGACCTGTGATACT	54°C
Snd1SREBP (-968,-939).s	AACTTGACCCTGATTTGAGACATGGGTGAC	57°C

PPAR consenso	CAAACTAGGTCAAAGGTCA	48°C
SND1PPAR α (-315,-286).s	GACGTCATGGGCGAGGTCAGGCGGGAGGGC	67°C
SND1PPAR γ (-239,-211).s	GGCCAGATGCTGACGTGTCCTTTCCTTCC	61°C
SND1PPAR α (-548,-517).s	GCCGCGTGGCAGGTCAAAGCCCACATCGGTAG	66°C
SND1PPAR γ (-708,-677).s	AGAACGAGGGTCACTCTCCCCTGTATACGTGG	75°C
SND1PPAR α (-834,-803).s	TTCCCCGACCTTTTACTGGGGCTAGGGAAGG	62°C
SND1PPAR α (-1382,-1350).s	AAGAAGGTGACCTCAAACTTAACCCTGGGATA	57°C
SND1PPAR α (-1667,-1636).s	GTCCTAAATTGGTGCAGAGGTCAAGTTTACT	55°C
Snd1PPAR α (-482,-453).s	TCTGTTCTGCTGAAGTGAAACGTCGGAAC	57°C
Snd1PPAR α (-598,-570).s	ATTAGTGGAACACACAAGACCTGTGATACT	54°C
Snd1PPAR α (-852,-826).s	TCTAAAAAGGGGCACTCCAAGGACATAA	53°C
Snd1PPAR α (-1153,-1119).s	TGGTTAAATTGTTGCAAAGGTCAAATTCATTAAG	52°C
Snd1PPAR γ (-1243,-1214).s	GGCTGAGTAGGGGAAAAGGACAGTAATTAT	55°C
Snd1PPAR α (-1423,-1394).s	AGATTGTATGAACCTTTGTAGACTTGTCTCTG	52°C

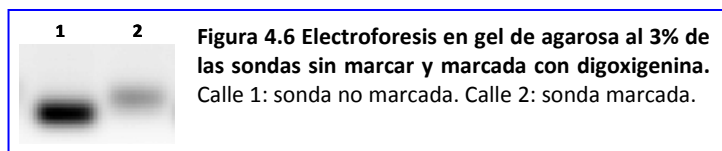
Reactivos:	
<ul style="list-style-type: none"> •Tampón TEN (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M, pH 8) •DIG gel shift kit, 2nd generation (ROCHE): <ul style="list-style-type: none"> -Tampón de marcaje (cacodilato potásico 0,2 M, Tris-HCl 25 mM, 0,25 mg/ml albúmina de suero bovino, pH 6.6) -CoCl₂ 5 mM -ddUTP-11-digoxigenina (DIG) 50 μM -400 U de Terminal Transferasa -Poli[d(I-C)] 50 ng/μL -Poli L-lysine 0,1 μg/μL -Factor de transcripción Oct2A -Tampón de carga con azul de bromofenol •Tampón de unión (HEPES 20 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, DTT 1 mM, Tween 20 0,2% (p/v), KCl 30 mM) •Tampón de electroforesis TBE 0,5x (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) •EDTA 0,2 M pH 8 •Membrana HyBond N+ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) •SSC 2x (NaCl 30 mM, citrato sódico 30 mM, pH 7) •Tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7.5, 0,3% (v/v) Tween 20) •Disolución de bloqueo (1% de reactivo de bloqueo en tampón maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7.5) 	<ul style="list-style-type: none"> •Tampón de detección (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M pH 9.5) •CSPD (3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro) tríciclo[3.3.2.1^{3,7}] decan-4-il) (ROCHE) •Revelador (AGFA) •Fijador (AGFA) •Películas de Rayos-X Amersham Hyperfilm™ ECL (GE HEALTHCARE) •Anticuerpo de conejo anti-Sp1 (región interna) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) •Anticuerpo de conejo anti-SREBP-1 (41-200 aa) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) •Anticuerpo de conejo anti-SREBP-1 (región interna) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) •Anticuerpo de conejo anti-NF-YA (C-terminal) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) •Anticuerpo de cabra anti-SREBP-2 (N-terminal) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) •Anticuerpos de conejos anti-PPARα y PPARγ (BIOWORLD TECHNOLOGY, INC.) •Oligonucleótidos de INVITROGEN o SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Para obtener la sonda de DNA bicatenario, los oligonucleótidos sentido y antisentido se reconstituyen con agua MilliQ a una concentración final de 100 μ M, se mezclan en cantidades equimolares (10 μ L) y se procesan en el Termociclador con el siguiente programa:

95°C	10 min
95 – 80°C	enfriando 2.5°C/min
80 – 40°C	enfriando 2.5°C/min
40 – 20°C	enfriando 2.5°C/min

El producto se diluye 1/10 con tampón TEN para obtener una concentración final de 5 pmol/ μ L y las sondas se marcan con ddUTP-11-digoxigenina (DIG). De acuerdo al protocolo del kit, las sondas bicatenarias se diluyen 1/4 con agua MilliQ y se añaden 10 μ L de una mezcla de tampón de marcaje, CoCl₂, DIG-ddUTP y transferasa terminal. Se incubó 15 min a 37°C y se para la reacción con 2 μ L de EDTA 0,2 M. La sonda marcada se diluye a una concentración final de 0,4 pmol/ μ L.

Se comprueba el marcaje de la sonda mediante una electroforesis en gel de agarosa, donde se observa el retraso en la migración que experimenta la sonda marcada con digoxigenina respecto a la no marcada (Figura 4.6).



4.6.3 FORMACIÓN DEL COMPLEJO DNA-PROTEÍNA

Los extractos nucleares (1-3 µg), o las proteínas recombinantes del factor de transcripción en estudio (1 µg), se incuban con 0,16 pmoles de sonda bicatenaria marcada con digoxigenina, 4 µL de tampón de unión, 1 µL de Poli[d(I-C)] y 1 µL de poli L-lysine durante 15 min a temperatura ambiente. Cuando se añade a la mezcla el anticuerpo (2 µg) para el factor de transcripción en estudio se prolonga la reacción otros 15 min.

Si existe unión entre la sonda y la proteína se observa una o más bandas denominadas 'shift'. Se realizan ensayos de competición en los que se emplean oligonucleótidos sin marcar a una concentración 100 veces mayor que la sonda marcada (competición específica); o sondas, 100 veces concentradas, que contienen una secuencia de unión mutada o para un factor de transcripción diferente (*octamer-binding factor- Oct2A*) (competición inespecífica). Cuando se añade el anticuerpo específico para el factor de transcripción, se observa un retraso aún mayor del complejo denominado 'supershift'.

4.6.4 ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

Finalizado el tiempo de reacción para la unión DNA-proteína, se añaden a cada muestra 5 µL de tampón de carga de electroforesis con azul de bromofenol y se aplican en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 6% en tampón TBE, sometido previamente a una pre-electroforesis a 100 V durante 10 min. La electroforesis se realiza a 100 V durante 1 h y 30 min a 4°C.

Una vez finalizada la electroforesis se transfieren los complejos DNA-proteína del gel a una membrana de nylon mediante electrotransferencia por adsorción a 300 mA durante 30 min (Figura 4.7). Al terminar la

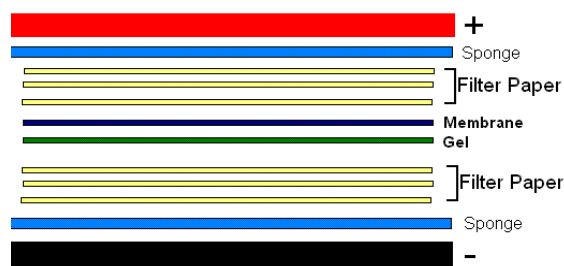


Figura 4.7 Esquema del montaje denominado *sandwich*.

transferencia, la membrana se coloca sobre un papel de cromatografía equilibrado con SSC 2x y se fija el DNA transferido mediante radiación ultravioleta a 120 mJ en el Stratalinker.

Tras lavar y bloquear la membrana, se incuba 30 min con el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:10.000 en disolución de bloqueo) y se hacen dos lavados de 15 min con tampón de lavado. Se equilibra la membrana en tampón de detección y se añade el sustrato CSPD 0,1 mg/ml en dilución 1:100. La membrana se incuba en oscuridad durante 5 min a temperatura ambiente, 10 min a 37°C y se expone a una película de rayos X durante 15-30 min. Se analizan las bandas que corresponden a las uniones entre la proteína (factor de transcripción) y el DNA (región del promotor de SND1 o SNDp102).

4.7 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina se utiliza para averiguar si los elementos de unión de los factores de transcripción son funcionales en la célula.

Reactivos:	
•37% Formaldehído (SIGMA)	•Human RNA Polymerase II Antibody Kit (SABIOSCIENCES)
•Puntas de boca ancha (VWR)	•ChIP-IT™ Control Kit-Rat (ACTIVE MOTIF)
•Champion o EpiTeq ChIP™ One-Day kit (SABIOSCIENCES)	

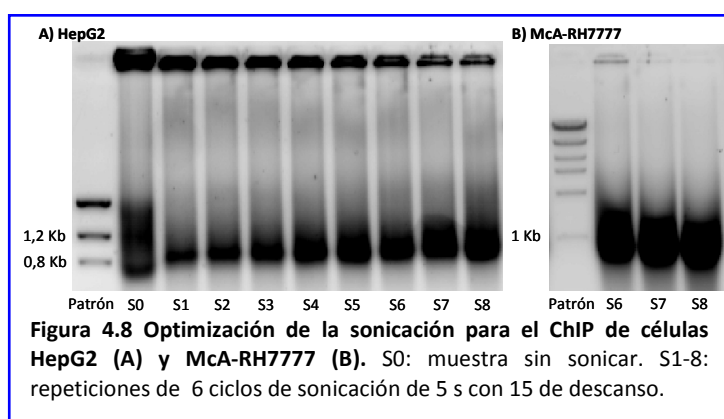
Se fija el complejo DNA-proteína formado *in vivo* y se generan fragmentos pequeños del DNA mediante sonicación. El complejo DNA-proteína se inmunoprecipita con un anticuerpo específico contra el factor de transcripción de interés. Se purifica el DNA después de revertir la unión a la proteína y se analizan las secuencias de unión mediante PCR convencional o PCR a tiempo real.

4.7.1 FIJACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL DNA

Se siembran 5 millones de células HepG2 o 3,5 millones de McA-RH7777 en placas de 100 mm de diámetro. Cuando las células alcanzan una confluencia del 75-80%, se fijan con formaldehído al 1% durante 10 min a 37°C, se añaden 1,1 mL de *Stop Buffer* del Kit y se incuban a temperatura ambiente durante 5 min. Las células se lavan con PBS y se añade *Cell harvesting Buffer*, se centrifugan a 800 x g durante 10 min a 4°C y la pastilla se resuspende en 420 µL de *IP Lysis Buffer* con inhibidores de proteasas. A continuación se fragmenta el DNA mediante sonicación y se centrifuga a 14.000 x g durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares.

El tamaño adecuado de los fragmentos de DNA es de entre 800-1.000 pb. Se optimizan las condiciones de sonicación para cada tipo celular según el protocolo recomendado por el proveedor.

Se realizan 6 ciclos de sonicación de 5 s descansando 15 s, se toma una alícuota para analizar y se repite el proceso varias veces. Las muestras sonicadas se cargan en un gel de agarosa al 1% (Figura 4.8). Se establecen como condiciones óptimas 36 ciclos de 5 s y 15 s de descanso (A:S6) para muestras de humano y 42 ciclos (B:S7) de 5 s con descansos de 15 s para las de rata.



4.7.2 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)

El sobrenadante de las muestras sonicadas se incuba con 2,7 mL de *IP Buffer A*, 15 μ L de inhibidor de proteasas y 150 μ L de *Protein A Beads* en un agitador rotatorio durante 50 min a 4°C. Se precipitan las *Protein A Beads* por centrifugación a 4.000 x g 1 min. Se retiran 10 μ L de cromatina del sobrenadante que se mantiene a 4°C hasta el siguiente paso. Esta fracción se denomina INPUT. El resto del sobrenadante de la cromatina se transfiere en fracciones de 1 mL a 3 tubos a los que se añade:

- ✚ 2 μ g de IgGs de suero no inmune de ratón (Control Negativo), o
- ✚ 4 μ g de anticuerpo anti-RNA Polimerasa II humana en el caso de HepG2 y anti-RNA pol II de ratón para McA-RH7777 (Control Positivo), o
- ✚ 4 μ g del anticuerpo de interés (Anti-Sp1, Anti-NF-Y, Anti-SREBP-1 o Anti-SREBP-2)

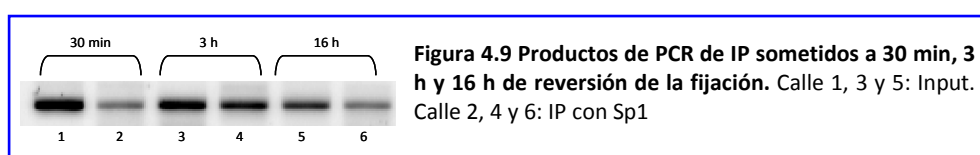
Tras incubar durante toda la noche a 4°C se añaden a cada tubo 60 μ L de *Protein A Beads*, se incuba 1 h a 4°C y se centrifuga a 4.000 x g durante 1 min, descartando el sobrenadante. Se añade 1 mL de *Wash Buffer I*, se incuba 4 min en el agitador rotatorio, se centrifuga 4.000 x g durante 1 min y se descarta el sobrenadante. Este paso se repite con cuatro tipos de *Wash Buffer* diferentes.

4.7.3 REVERSIÓN DE LA FIJACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA

Previamente a la purificación del DNA es necesario romper la unión del complejo DNA-proteína. Para ello, se añaden 20 μL de *Elution Buffer* y 2 μL de Proteinasa K a cada una de las fracciones y al Input y se incuba a 45°C durante 30 min. Se añaden 100 μL de *DNA Extraction Beads*, se incuban a 95°C durante 10 min y se centrifugan a 14.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Se recoge el sobrenadante, la pastilla se lava con 110 μL de *Elution Buffer*, se centrifuga en las mismas condiciones y el sobrenadante se une al anterior.

Se añaden a cada fracción 400 μL de *Column Binding Buffer*, se aplica cada muestra en una *DNA Spin Column* y se centrifuga a 11.000 x g durante 1 min. Se lavan las columnas con 600 μL de *Column Wash Buffer* y se centrifugan de nuevo a 11.000 x g durante 1 min. Se añaden 100 μL de *Elution Buffer* y se centrifugan a 11.000 x g durante 1 min. Se repite este paso y se une el eluato al anterior, obteniendo 200 μL de volumen final en cada una de las inmunoprecipitaciones (IP).

Una vez obtenidas las IP se almacenan a -20°C para su posterior análisis por PCR convencional o a tiempo real (qPCR).



Se optimizan las condiciones de reversión de la fijación se empleando muestras de HepG2 inmunoprecipitadas con anti-Sp1 y de Input sometidas a diferentes tiempos de reversión: 30 minutos (recomendados en el kit), 3 horas y 16 h a 45°C. Se amplifica un fragmento del promotor de SND1 (Figura 4.9) y no se observan diferencias importantes entre 30 min, 3 h y 16h, por lo que se siguen las recomendaciones del kit.

4.7.4 CUANTIFICACIÓN DEL DNA INMUNOPRECIPITADO

Para determinar el enriquecimiento de las inmunoprecipitaciones se amplifican regiones correspondientes a los promotores SND1 y SNDp102 mediante PCR convencional y/o qPCR. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en Tabla 4.V.

Tabla 4.V Oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos del promotor humano (SND1) y rata (Snd1).

	Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
Humano	SND1CHIP(-176,-155).s	CCCGGAAGTCCCGCCCATATT	55°C
	SND1CHIP(+4,+23).as	CGTTCTACTCGCCGCGCAAG	53°C
	SND1CHIP(-112,-91).s	CACGGAGCGAAAGAGACGCGA	53°C

	SND1CHIP(+41,+61).as	CTCACCACCGTTTTGGGGACCA	53°C
	SND1CHIP(-176,-155).s	CCCGGAAGTCCCGCCCATATT	55°C
	SND1CHIP(+41,+61).as	CTCACCACCGTTTTGGGGACCA	53°C
	SND1CHIP(-112,-91).s	CACGGAGCGAAAGAGACGCGA	53°C
	SND1CHIP(+4,+23).as	CGTTCTACTCGCCGCAAG	53°C
	SND1CHIP(-345,-166).s	CAAGTGTGCGCCCTGAGGC	55°C
	SND1CHIP(-345,-166).as	GACTTCCGGGGCAGCCGGAG	57°C
	SND1CHIP(-268,-73).s	CTGGGGCTCCCATGGCCCC	57°C
	SND1CHIP(-268,-73).as	CGCGGAGCCCCGCCTCTT	54°C
Rata	Snd1CHIP(-151-132).s	ATCAGCTCTTCAGCGCTTC	47°C
	Snd1CHIP(+31+50).as	TGGAAGCAAAGAGGAGACG	47°C
	Snd1CHIP(-196-177).s	TGTTGTCCAGTCCGGTGTA	47°C
	Snd1CHIP(-242-223).as	GGGAAAGAAAGGACACGTCA	47°C
	Snd1CHIP(-249-230).s	CAGATGCTGACGTGTCCTTT	47°C
	Snd1CHIP(-115-104).as	GCCCCTTGGTCCCAAAC	47°C

4.7.4.1 PCR convencional

Reactivos: •KAPA Taq (KAPA BIOSYSTEMS)

La mezcla de reacción de PCR para muestras de humano contiene: Tampón B de KAPA Taq 10X, 200 µM de dNTPs, 2 U de enzima polimerasa KAPA Taq, 0,4 µM de oligonucleótidos sentido y antisentido y 2 µL de IP o Input, en un volumen final de 20 µL.

La mezcla de reacción en la PCR para muestras de rata contiene: Tampón PCR 10X, tampón de tinción 10X, 5 mM de dNTPs, 1 U de enzima polimerasa La Taq, 0,2 µM de oligonucleótidos sentido y antisentido y 5 µL IP o Input, en un volumen final de 25 µL.

Las condiciones de las PCRs para humano y para rata son similares. Los productos resultantes se separan por electroforesis en un gel de agarosa al 3% a 100 V durante 25 min y se digitaliza la imagen empleando el analizador *Personal Molecular Imager FX*.

94°C	3min	
94°C	20 s	35ciclos (HepG2)
59°C	30 s	
72°C	30 s	30ciclos (McA-RH7777)
72°C	2 min	

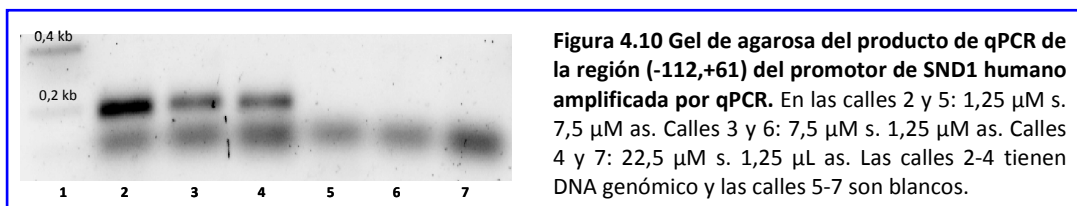
4.7.4.2 PCR a tiempo real

Reactivos: •SYBER® Green PCR Master Mix

La amplificación del DNA mediante qPCR se realiza utilizando SYBER® *Green*, el cual se une a los ácidos nucleicos de doble hebra emitiendo fluorescencia a 528 nm, de manera que según avanza la reacción de PCR y aumenta el número de cadenas de DNA de doble hebra, aumenta la intensidad de fluorescencia, lo que permite registrar el avance de la reacción a tiempo real.

Las condiciones de qPCR establecidas para el fluoróforo en el termociclador Abiprism 7000 son las siguientes:

- 1- Activación de la AmpliTaq Gold® DNA Polymerase: 95°C 10 min
- 2- Desnaturalización: 95°C 15 s
- 3- Hibridación de los oligonucleótidos al molde y Elongación: 60°C 1 min (repetición pasos 2 y 3, 40 veces)



Para cuantificar las secuencias amplificadas por qPCR de las IPs se emplea el método delta Ct (ciclo umbral). Una vez obtenidas las Ct de cada una de las secuencias amplificadas por qPCR se calcula el % del Input y el enriquecimiento relativo de la IP con el anticuerpo para el factor de transcripción en estudio según se detalla:

1. Normalización de los valores Ct de cada fracción del ChIP con el valor Ct de la fracción Input:

$$\Delta Ct[\text{ChIP normalizado}] = (Ct[\text{ChIP}] - (Ct[\text{Input}] - \log_2(\text{Factor de dilución del Input})))$$

$$\text{Factor de dilución del Input} = (\text{fracción de cromatina recogida (Input)} / 100)^{-1}$$

2. Cálculo del % Input para cada una de las fracciones del ChIP:

$$\% \text{Input} = 2^{(-\Delta Ct[\text{ChIP normalizado}])} * 100$$

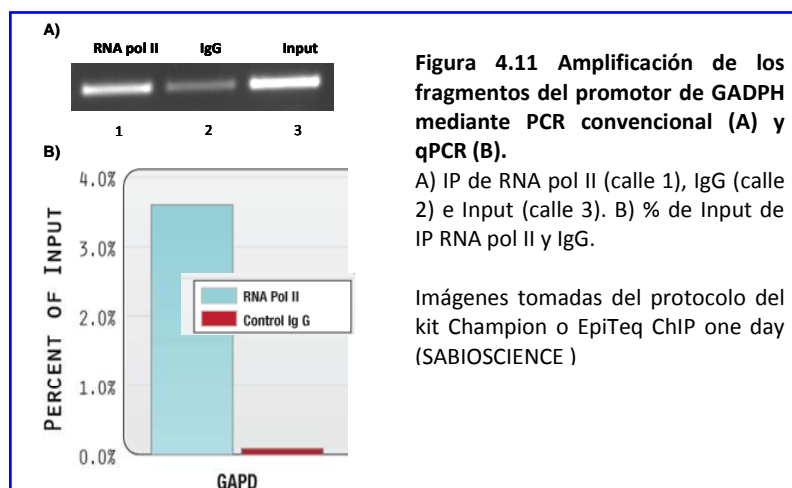
3. Ajuste de las fracciones del ChIP normalizadas con la fracción normalizada de IgG :

$$\Delta \Delta Ct[\text{ChIP/IgG}] = \Delta Ct[\text{ChIP normalizado}] - \Delta Ct[\text{IgG normalizada}]$$

4. Cálculo del **enriquecimiento relativo** de uniones de la cromatina inmunoprecipitada con el factor de transcripción en estudio:

$$\text{Enriquecimiento relativo} = 2^{(-\Delta \Delta Ct[\text{ChIP/IgG}])}$$

Las amplificaciones de las IPs de la RNA polimerasa II (control positivo), IgG (control negativo) e Input con los oligonucleótidos de GADPH o β -actina nos aseguran el correcto funcionamiento del ChIP. El enriquecimiento de la muestra de la IP con anti-RNA pol II debe ser similar al total del Input (control positivo). En las IPs con IgGs lo ideal es no tener amplificación (control negativo) (Figura 4.11).



4.8 CUANTIFICACIÓN DE RNA

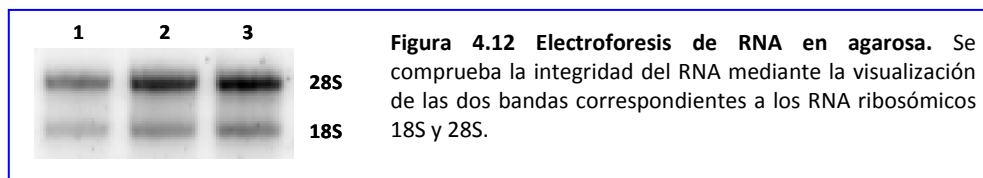
4.8.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS HepG2 Y McA-RH7777

La extracción de RNA a partir de células se realiza siguiendo el método del isotiocianato de guanidinio/fenol:cloroformo (Chomczynski and Sacchi, 2006), con el reactivo TRIzol. Este reactivo mantiene la integridad del RNA mientras rompe las células y disuelve sus componentes. Las cantidades están ajustadas para procesar entre 3 y 5 millones de células de HepG2 y McA-RH7777.

Reactivos:	
•PBS frío	•Cloroformo (SCHARLAU)
•TRIzol (SIGMA)	•Isopropanol (SCHARLAU)
	•Etanol al 70% en agua DEPC (SIGMA)

Las células se siembran en placas de 24 pocillos y se tratan con los efectores o se transfectan con los vectores de expresión durante 24 h. Se lavan dos veces con PBS frío y se añaden 166 μ L de TRIzol por pocillo. A continuación se incuban 5 min a temperatura ambiente y se recogen las células de 6 pocillos en un tubo. A cada una de las muestras se añaden 0,2 mL de cloroformo, se agita y se incuba 3 min a temperatura ambiente. Se recoge la fase superior, se centrifuga 15 min a 12.000 x g a 4°C y se precipita el RNA con 500 μ L de isopropanol, dejándolo 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifuga a 12.000 x g 5 min a 4°C, se lava la

pastilla dos veces con 1 mL de etanol al 70% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato), se centrifuga de nuevo a 7.500 x g 5 min a 4°C y se resuspende la pastilla en 50 µL de agua-DEPC. Por último, se desestabilizan posibles estructuras secundarias calentando la muestra a 60°C durante 10 min.



Se comprueba la integridad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.12). La concentración de RNA de las muestras se mide por espectrofotometría con el NanoDrop, la relación de absorbancia 260/280 nm indica la pureza de la muestra, que está siempre entre 1,7-2,0.

4.8.2 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La RT consiste en la síntesis de DNA monocatenario y complementario (cDNA) utilizando como molde el RNA. El cDNA se utiliza para analizar por PCR a tiempo real la expresión de SND1 y SNDp102 en respuesta a los efectores y plásmidos de expresión de factores de transcripción.

Reactivos:	
•DNase I Amplification Grade (INVITROGEN)	•SuperScript III First-Standard Synthesis System for RT-PCR (INVITROGEN)

Una vez obtenemos el RNA total de hepatomas humano y de rata, se trata con desoxirribonucleasa I para eliminar una posible contaminación con DNA genómico.

Para ello, se mezclan en un volumen final de 10 µL, 1,5 µg de RNA en el tampón de digestión y 1 U de la enzima DNasa I, se incuba 15 min a 25°C, se añade 1 µL de EDTA 25 mM y se vuelve a incubar 15 min a 65°C. El producto está listo para la retrotranscripción.

La retrotranscripción del RNA se realiza con el kit *SuperScript III First-Standard Synthesis System for RT-PCR* y el material empleado debe estar libre de RNasas.

Se mezclan 8 µL del producto del tratamiento con DNasa, 1 µL de *Random hexamers* y 10 mM de dNTPs, se incuba 5 min a 65°C y se mantiene 1 min en hielo. A continuación, se añade tampón de RT 10X, 25 mM de MgCl₂, 0,1M de DTT, 1 µL de inhibidor de RNasa y 50 U de la enzima SuperScript III RT. Se mantiene 10 min a 25°C, 50 min a 50°C, 5 min a 85°C y 1 min en hielo.

Se degrada el RNA molde añadiendo 1 µL de RNasa H a la muestra e incubando 20 min a 37°C. A partir de este momento la muestra está lista para ser analizada mediante la técnica de PCR a tiempo real.

4.8.3 CUANTIFICACIÓN DEL mRNA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Los oligonucleótidos específicos para amplificar los transcritos de SND1 de humano y SNDp102 de rata y los de los genes normalizadores de humanos y/o de rata 18S, Actina, GADPH, TBP y ARBP, se diseñan con la ayuda de los programas en red Primer3 o Primer-BLAST. La longitud óptima del producto a amplificar es de 80-150 pb. Todos los oligonucleótidos usados están clasificados en la Tabla 4.VI.

Tabla 4.VI Oligonucleótidos empleados en las PCR a tiempo real del gen de rata *Snd1*, de humano *SND1* y genes normalizadores. El amplicón es la secuencia resultante de la amplificación y su longitud viene dada en pares de bases. Se muestra el número de acceso a GenBank para cada mRNA utilizado en el diseño de los oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplicon(pb)	Referencia
Genes analizados			
SND1.s	GTGATCAGATACCGGCAGGATG	82	NM_014390
SND1.as	TCTTAATAGCTCTGGCCTCTGCAG		
SND p102.s	CAGAGTATGCCTTCGCCTTC	101	NM_022694
SND p102.as	CAGGCACTGAGTGTTTTGGA		
Genes normalizadores			
18S rata.s	AAGTCCCTGCCCTTTGTACACA	68	X01117
18S rata.as	TCCGAGGGCCTCACTAAACC		
18S humano.s	TTCGAACGTCTGCCCTATCAAC	82	K03432.1
18S humano.as	GAACCCTGATCCCCGTAC		
Actina humano.s	GAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCC	84	NM_001101.3
Actina humano.as	CGAGCGCGGATATCATCATCC		
Actina rata.s	ATCGCTGACAGGATGCAGAAG	77	NM_031144
Actina rata.as	TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA		
GADPH humano.s	GGTGAAGCAGGCGTCGGAGG	127	NM_002046.3
GADPH humano.as	GAGGGCAATGCCAGCCCCAG		
GADPH rata.s	GTGCCAGCCTCGTCTGATAGAC	87	NM_017008
GADPH rata.as	AAGGCAGCCCTGGTAACCAG		
TBP humano.s	TTGCAGTGACCCAGCAGCATCAC	136	NM_003194.3
TBP humano.as	AACCCTTGCGCTGGAACCTCGTC		
ARBP rata.s	CGACCTGGAAGTCCAACCTAC	109	NM_022402
ARBP rata.as	ATCTGCTGCATCTGCTTG		

Todas las muestras se preparan por triplicado en un volumen final de 25 μ L con 2 μ L de una dilución 1/30 del producto de la retrotranscripción, 12,5 μ L de SYBER® *Green PCR Master Mix* y 0,1 μ M de cada oligonucleótido sentido y antisentido. Las condiciones son las establecidas por el Abiprism 7000 (4.7.4.2, *Métodos*).

La cuantificación de RNA se realiza de forma relativa utilizando una recta de calibrado que se prepara haciendo diluciones seriadas de una muestra de cDNA. La cantidad de molde representada en la recta de calibrado es un valor arbitrario asignado a cada una de las diluciones de la serie. Se representa el valor de Ct o ciclo umbral obtenido en la qPCR respecto al \log_{10} de la cantidad inicial de molde o cDNA. Interpolando en la recta de calibrado los valores de Ct

obtenidos para las muestras problema, se estima la cantidad inicial de cDNA que hay en cada muestra en unidades arbitrarias.

Los datos obtenidos para el gen SNDp102 se normalizan respecto a los obtenidos para los genes 18S, Actina, GADPH y ARBP; en el caso del gen SND1 se normalizan respecto a los genes 18S, Actina, GADPH y TBP. Para la normalización de los datos se utilizó el programa geNorm (3.5.7, *Materiales*).

4.9 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Durante esta tesis doctoral se han empleado dos métodos colorimétricos de cuantificación de proteínas, el método de Bradford y el ensayo de Ácido Bicinconínico.

Reactivos:	
•Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD)	•Albúmina de suero bovino (BSA) (ROCHE)
	•BCA Protein Assay Kit (THERMO SCIENTIFIC)

El método de Bradford se basa en el cambio de color del colorante azul de Coomassie al unirse a los residuos aromáticos de las proteínas, formando un complejo que se cuantifica a 595 nm (Bradford, 1976).

El ensayo del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985) se basa en la reacción de Biuret. Los iones Cu^+ producidos en presencia de proteínas, se unen a dos moléculas de ácido bicinconínico y se obtiene un complejo de un intenso color púrpura que se puede medir a 562 nm.

En los dos métodos la concentración de proteína se calcula respecto a una recta de calibrado de concentración conocida de BSA de 0 a 10 μg . A 10 μL de la muestra se añaden 200 μL del reactivo Coomassie o Bicinconínico, se incuba a temperatura ambiente 5 min en caso del Coomassie y a 37°C durante 30 min en caso del ácido bicinconínico, y se lee la absorbancia en el lector de placas a la longitud de onda correspondiente.

4.10 CUANTIFICACIÓN DE SND1 Y SNDp102 MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Las muestras para el Western Blotting corresponden a lisados de 5×10^6 células de hepatoma humano o de rata transfectados con vectores de expresión de factores de transcripción o tratadas con diversos efectores de factores de transcripción en estudio.

Entre 8-12 μg de proteína de las muestras se desnaturalizan en tampón de desnaturalización (5X) a 95°C durante 5 min.

Reactivos:	
<ul style="list-style-type: none">• Tampón de desnaturalización (5X): 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% Glicerol, 2% SDS, 14,4 mM β-Mercaptoetanol o DTT y 0,1% Azul de Bromofenol• Acrilamida:Bisacrilamida (37.5:1) (BIO-RAD)• SDS (Dodecilsulfato Sódico)• Tampón de electroforesis: Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1%, pH 8.3• Tampón TBS: Tris 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.5• Tampón TBST: TBS + 15% Tween20• Albúmina de suero bovino (BSA)• Gel code Blue Stain (THERMO SCIENTIFIC)• PageRuler (Plus) Prestained Protein Ladder (FERMENTAS LIFE SCIENCES)• Immobilon®-P Transfer Membranas (MILLIPORE)• Papel cromatográfico (WHATMAN)• ECL Western Blotting detection reagents (AMERSHAM)	<ul style="list-style-type: none">• Anticuerpo de conejo anti-SNDp102 (BIOSOURCE INTERNATIONAL)• Anticuerpo de ratón anti-β-Tubulina (SIGMA)• Anticuerpo de conejo anti-SREBP-1 (41-200 aa) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.)• Anticuerpo de conejo anti-SREBP-1 (región interna) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.)• Anticuerpo de cabra anti-SREBP-2 (N-terminal) de humano (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.)• Anticuerpo de caballo anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC.)• Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa (SIGMA)• Anticuerpo de conejo Anti-IgG de cabra (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.)• Películas de Rayos-X Amersham Hyperfilm™ ECL (GE HEALTHCARE)

Se analizan las proteínas SND1, SNDp102 y SREBP a partir de lisados celulares de las líneas de hepatoma de humano y de rata. Tras separar las proteínas mediante electroforesis desnaturalizante, se transfieren a una membrana de PVDF (Polivinilideno fluoruro) y se detectan utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas de interés. El complejo antígeno-anticuerpo se detecta con anticuerpo secundario unido al enzima peroxidasa que genera un producto quimioluminiscente.

Se cargan las muestras y 6 μ L de los marcadores de pesos moleculares PageRuler (Plus) *Prestained Protein Ladder* en un gel de poliacrilamida del 9% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. La electroforesis se desarrolla en baño de hielo durante 30 min a 120 V y 1 h a 170 V.

Previamente a la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana de PVDF, ésta se activa en metanol durante 15 s y se equilibra, junto con papeles Whatman, en tampón de electroforesis y metanol. Se prepara un *sandwich* con 3 papeles Whatman y la membrana, sobre la que se coloca el gel de poliacrilamida y otros 3 papeles también equilibrados en tampón de electroforesis. Se monta el *sandwich* en la cámara de transferencia semi-húmeda y se transfieren las proteínas del gel a la membrana a 20 V durante 1h y 15 min. Finalizada la transferencia, el gel se tiñe con azul de Comassie para comprobar la eficacia de la transferencia.

La membrana de PVDF se bloquea en TBST con 10% de leche en polvo durante 2 h y se lava 3 veces en TBST con 1-5% de BSA durante 10 min. A continuación, se incuba durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (Anti-SNDp102 (1,6 mg/ml), diluido 1:5.000 en TBST suplementado con BSA al 1% y que reconoce tanto la proteína de rata como la de humano, anti-SREBP-1 o anti-SREBP-2 de humano (2 μ g/ μ L) diluidos 1:1.000 en TBST con 5% de BSA). La membrana se lava 3 veces en TBST con 1% de BSA y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa diluido 1:2.000 en TBST con 1% de BSA para los anticuerpos de SNDp102 y SREBP-1, o se incuba con el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado también con peroxidasa diluido 1:5.000 en

TBST con 5% de BSA para SREBP-2. Después de otros 3 lavados con TBST se procede al revelado de la membrana.

Como normalizador se utiliza la proteína constitutiva β -Tubulina la cual forma parte del citoesqueleto de células eucariotas. Se utiliza el anticuerpo de ratón anti- β -Tubulina diluido 1:5.000 en TBST suplementado con BSA al 5% y el secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:2.000 en TBST con BSA al 5%.

Para revelar la membrana, ésta se cubre con la mezcla de los reactivos de detección quimioluminiscente ECL *Western Blotting Detection Regents* durante 1 min y se expone a una película fotográfica durante 5 min en el caso de la proteína SNDp102 o SND1, 2 min para la β -Tubulina y 3 min para SREBP-1 y 2. Las bandas correspondientes aparecen cuando se sumerge la película en revelador fotográfico seguido de fijador y agua.

Se digitaliza la imagen de la película utilizando el densitómetro GS-800 de Bio-Rad en modo transmitancia. A continuación, se selecciona la banda de interés con el programa *Quantity One* y se analiza la densidad óptica integrada (IOD). Los resultados se expresan como IOD relativas de las bandas de las proteínas respecto a las de β -Tubulina.

4.11 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los cálculos de los parámetros estudiados se realizan mediante hojas de cálculo creadas a tal efecto. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (DS) de un número n de experimentos ≥ 3 determinados por triplicado. El análisis de la significación estadística se realiza con la ayuda del programa informático GraphPad Prism mediante el test de la t de Student para datos no pareados, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$ y se representa por medio de asteriscos: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES

MÉTODOS

5. RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BILBIOGRAFIA

5 RESULTADOS

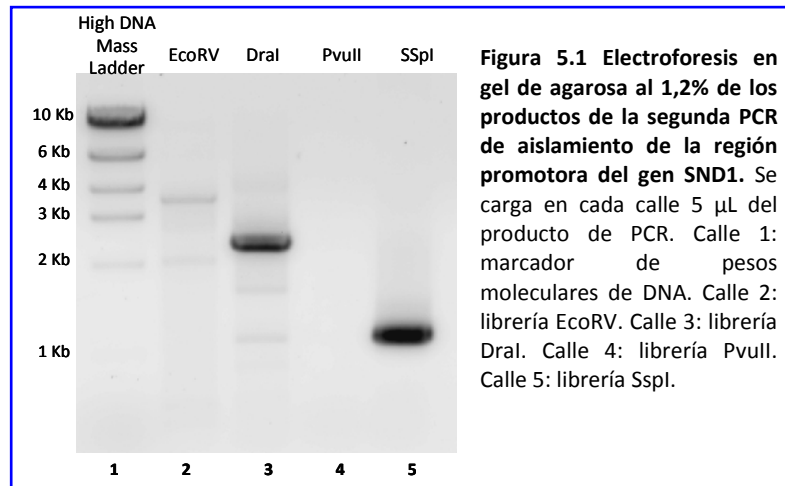
En estudios previos, nuestro grupo ha aislado el promotor del gen SNDp102 de rata y ha analizado la actividad basal y la participación de Sp1 (*Specificity protein 1*) y NF-Y (*Nuclear factor Y*) en su regulación transcripcional. El presente trabajo es una continuación de esta línea de investigación e inicia el estudio del promotor del gen SND1 humano. En este apartado se presentan los resultados de su aislamiento y caracterización y el estudio comparativo de la regulación de la expresión de ambos genes por los factores de transcripción de expresión ubicua Sp1 y NF-Y, así como por los factores de transcripción cuyos genes diana controlan el metabolismo lipídico SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) y PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*).

5.1 AISLAMIENTO Y ELONGACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1 HUMANO

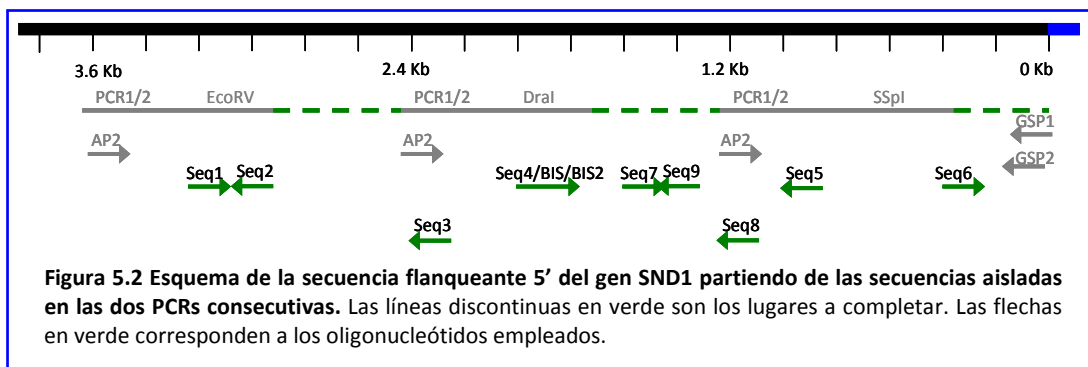
Para aislar la región promotora del gen SND1 humano, se toma como referencia la secuencia de 3.522 bases del cDNA de SND1 humano. Esta parte del gen está registrada en la base de datos del NCBI con el número NM_014390 y define la posición del inicio de transcripción (+1), el codón AUG (+227) y la proteína SND1 resultante (NP_055205).

La región promotora del gen SND1 se aísla y se amplifica mediante un rastreo genómico basado en dos PCRs consecutivas. En la primera PCR se utilizan como molde librerías de DNA genómico humano ligado a una secuencia adaptadora y el producto obtenido sirve como molde de la segunda reacción de amplificación. En las dos PCRs se emplean los oligonucleótidos AP2, complementarios a la secuencia adaptadora de los fragmentos de las librerías y los oligonucleótidos específicos GSP1, complementario a la región (+284,+318) o GSP2 complementario a la región (+142,+171) del cDNA de SND1.

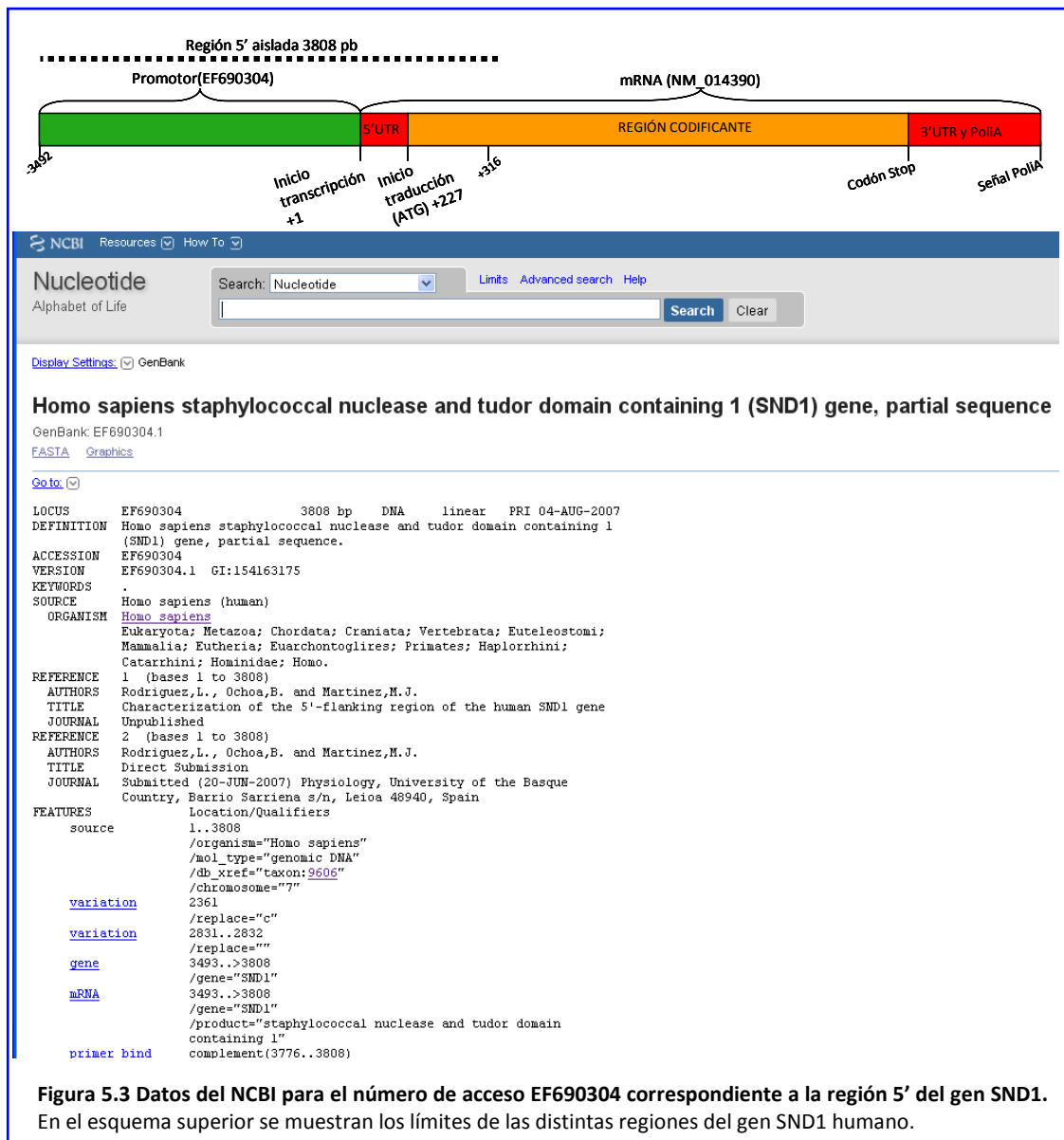
La Figura 5.1 muestra los productos de la amplificación obtenidos a partir del DNA genómico de las librerías *EcoRV* (calle 2), *DraI* (calle 3) y *SspI* (calle 5). Sin embargo, no se consigue amplificar nada partiendo de la librería *PvuII* (calle 4). Cada producto tiene un tamaño distinto, en la librería *DraI* se obtiene una banda mayoritaria de 2,38 Kb, en la librería *SspI* una banda de 1,21 Kb y en la librería *EcoRV* se observan 5 bandas de diferentes tamaños, siendo la de 3,67 Kb la mejor definida.



Los fragmentos de la región promotora obtenidos de las librerías *EcoRV*, *Dral* y *SspI* se extraen del gel de agarosa para su purificación y secuenciación. No todas las secuencias obtenidas se solapan, por lo que se realizan nuevas PCRs para elongar los extremos de los productos del aislamiento de las tres librerías genómicas y conseguir una secuencia única completa de la región flanqueante 5' del gen *SND1* humano (Figura 5.2).



Finalmente, se consigue una secuencia de 3.808 pb de las cuales 3.492 pb son anteriores al extremo 5' del mRNA y las otras 316 pb se solapan con la secuencia del mRNA. La secuencia correspondiente a la región promotora del gen *SND1* se encuentra depositada en la base de datos de GenBank, con el número de acceso EF690304 (Figura 5.3 y Figura 5.4).



5.2 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS AL PROMOTOR DEL GEN SND1 HUMANO

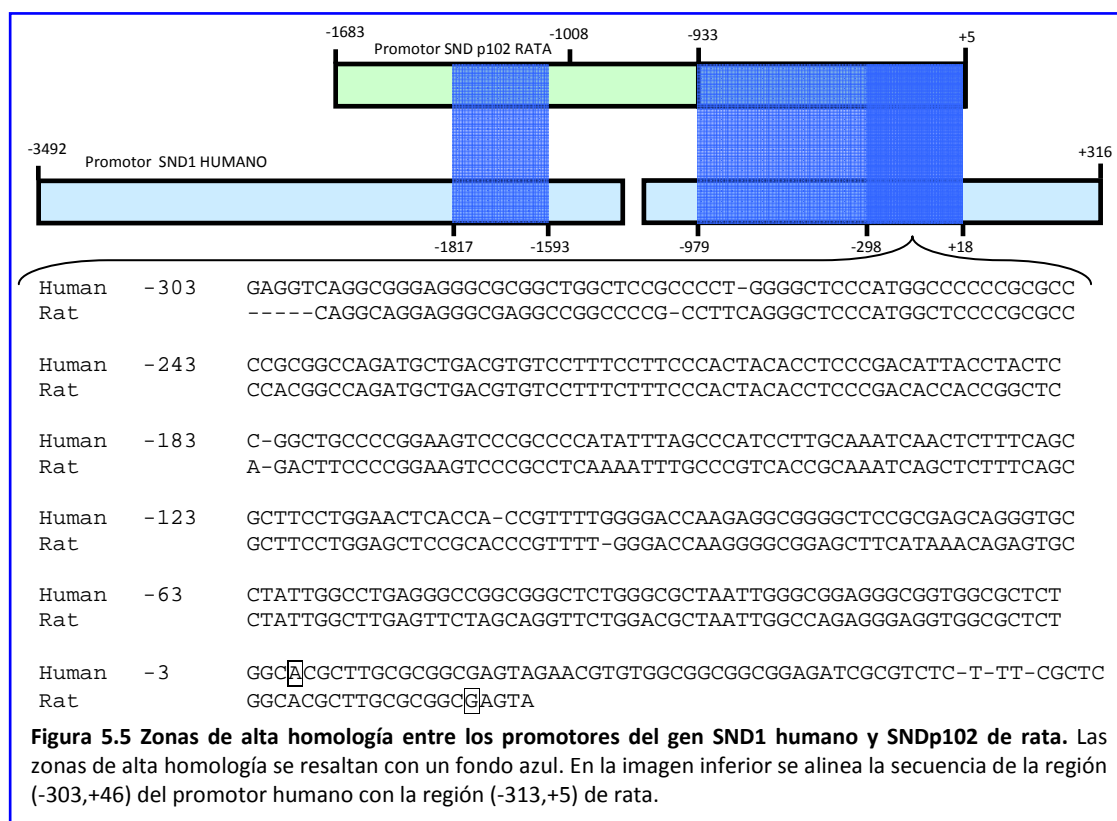
A partir de la secuencia promotora humana del gen SND1 se realiza una búsqueda de secuencias homólogas de humano, rata y ratón existentes en las bases de datos génicas de NCBI-BLAST, Ensembl, EMBOSS-ENA y NCBI-DCODE (Tabla 5.I).

Tabla 5.I Regiones homólogas a la secuencia promotora del gen SND1 humano en las secuencias genómicas de humano (*Homo sapiens*), rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*) almacenadas en las bases de datos NCBI, Ensembl, EMBOSS-ENA y NCBI-DCODE.

Especie	Base de datos	Región promotora	Homología (%)	Num. acceso/Nombre				
<i>Homo sapiens</i>	NCBI	(-3492,+316) (blastn)	99%	NW_923640.1/chr 7 genomic contig, alternate assembly Hs_Celera				
				NT_079596.2/chr 7 genomic contig, alternate assembly CRA_TcAgchr7v2				
				NT_007933.15/chr 7 genomic contig, GRch37.p2 reference primary assembly				
				NW_001839071.2/chr 7 genomic contig, alternate assembly HuRef				
	Ensembl	(-3492,-3465) (-3437,-3401) (-1786,-1665) (-881,-663) (-556,-257) (-235,+316)	100%	AC073934.1/chr 7: 127,288,802-127,288,877				
				EMBOSS-ENA	(-3492, +316)	99%	AADB02010791/chr 7 CRA_219000002700944	
							AADC01071236/chr 7 CSA:71235 contig scaffold	
							AACC02000001/chr 7 contig1	
							BL000001/chr 7	
	NCBI-DCODE	(-3492,+306)	100%	chr 7 (127075943-127079773)				
<i>Rattus norvegicus</i>	NCBI	(-398,+316) (blastn)	83%	NW_047689.2/strain BN/SsNHsdMCW chr 4 genomic scaffold				
				NW_001084827.1/chr 4 genomic scaffold, alternate assembly Rn_Celera				
	Ensembl	(-235,-194) (-142,-83) (-39,+49) (+152,+316)	98% 89% 94% 88%	AC128239.4/chr 4: 55,328,617-55,516,223				
				NCBI-DCODE	(-1830,-1705) (-747,-593)	68,5% 81%	Chr 4 (55341564- 55351052)	
							<i>Mus musculus</i>	NCBI
				NW_001030802.1/chr 6 genomic contig, alternate assembly				
	NT_039340.7/chr 6 genomic contig, stain C57BL/6J							
Ensembl	(-235,-194) (-142,-90) (-67,+49) (+161,+316)	100% 89% 92% 92%	AC068608.5.1.191358/chr 6: 28,326,021-28,505,956					
			EMBOSS-ENA	(-393,+316)	78%	AC068608/chr 6 clone RP23-434014 stain C57BL6/J		
						AEKR01049067/stain C57BL6/J contl 49066		
AEKQ01041716/stain C57BL6/J contl 41715								
CAA01004281/Whole genome shotgun assembly contig 26260								
NCBI-DCODE	(-747,-593) (-324,+306)	71,9% 81%	AAHU01052290/Stain 129C1/Svj ch 6 CRA_211000021960877					
			chr 6 (28420450-28430674)					

La secuencia promotora aislada para el gen SND1 humano presenta un alto grado de homología con las secuencias que se localizan en el cromosoma 7 del genoma humano (*Homo sapiens*) anteriores al gen de SND1. También posee una alta homología (70-100%) con secuencias génicas localizadas en el cromosoma 4 de rata (*Rattus norvegicus*) y en el cromosoma 6 de ratón (*Mus musculus*) en posiciones anteriores al gen homólogo de SND1. Las secuencias de las regiones (-747,-593) y (-398,+316) del promotor de SND1 humano parecen estar altamente conservadas (72-83%) entre las tres especies.

Si se compara la secuencia promotora de SND1 humano, recién aislada, con la secuencia promotora de su homólogo en rata, clonada y caracterizada en nuestro laboratorio (NCBI GenBank con el número de acceso AY957585), podemos observar que las zonas de mayor homología se concentran en las regiones más cercanas al extremo 3' de ambos promotores, siendo del 85% en la región (-298,+18) y del 65% en las regiones (-979,+18) y (-1817,-1593) del promotor de SND1 humano (Figura 5.5).



5.3 CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN SND1 HUMANO

La búsqueda de elementos de respuesta característicos del promotor se realiza con los programas en red TESS, MatInspector, Jaspar, CpG Island Searcher y EMBOSS CpGPlot/CpGReport, que analizan la secuencia de bases y, de acuerdo a las secuencias consenso recogidas en sus bases

de datos, muestran los lugares de unión a factores de transcripción (TFs) con mayor probabilidad de funcionalidad (La, semejanza núcleo y probabilidad) y la orientación del lugar de unión, indicada como (+) 5'-3' o (-) 3'-5'.

5.3.1 ELEMENTOS DEL PROMOTOR BASAL

Considerando la posición +1 como el inicio de la transcripción del gen SND1 humano, se presta especial atención a los elementos próximos a ésta. Se estudia la presencia de elementos característicos del promotor basal como la caja TATA, el elemento BRE (*TFIIB recognition element*), la secuencia iniciadora (Inr) y el elemento DPE (*Downstream promoter element*), mediante la búsqueda de secuencias a los que se unen proteínas que los reconocen. Para la localización de la caja TATA se buscan secuencias de unión de TBP (*TATA binding protein*), para BRE se buscan secuencias de unión de TFIIB (*General transcription factor II-B*), para Inr se buscan lugares de unión de TFII-I e YY1 y para la búsqueda de DPE se localizan elementos de unión de TFIID (Tabla 5.II).

Tabla 5.II Posibles sitios de unión de TBP, TFIIB, TFIID, TFII-I y YY1 en la secuencia promotora de SND1.

Posición	Secuencia	Orientación	La	Semejanza núcleo	Probabilidad	
(-3362,-3346)	atcTATAactggcagcg	-		1,000	8,331	
(-3266,-3250)	agctgTAAAaaccggag	+		1,000	8,848	
(-2989,-2973)	gtccaTAAAagataaat	+	13,92	1,000	6,491	
(-2980,-2966)	AGATAAATGACCTTA	+	12		5,830	
(-2815,-2799)	gcttaTATataggagg	-		0,892	8,615	
(-2810,-2794)	ctataTATAagcaatgg	+		0,892	9,620	
(-2808,-2792)	ataTATAagcaatgggc	+	11,82	1,000	10,819	TBP
(-1925,-1909)	tcttaTAAAgctgcagt	-		1,000		(caja TATA)
(-1918,-1904)	CTTTATAAGAGAAGA	+/-	12			
(-1490,-1476)	AGATAAAAAGCCACG	+	12		9,715	
(-873,-857)	aatattTAAGtgactg	-		1,000	6,701	
(-352,-334)	gggtataCAAGgtgctg	+		0,750	6,627	
(-287,-281)	ccgCGCC	-		1,0	1,0	
(-249,-243)	ccgCGCC	+		1,0	1,0	TFIIB (BRE)
-3279	GATAAA	+	11,02	0,952		(DPE) TFIID
-2650	AGAGAG	-	10,91			
-2372	AGAGAG	-	10,91			
-1755	AGAGAG	-	10,91			
-1472	AGAGAG	-	10,91			TFII-I (Inr)
-1314	AGAGAG	-	10,91			
-574	CTCTCT	+	10,91			
(-3138,-3118)	agaagCCATgtttcctca	+	12	0,832	7,219	
(-161,-156)	CCCATA	+/-	18	0,964	5,236	
(+226,+231)	GCCATG	-	12		7,219	YY1 (Inr)
(+293,+298)	ATCATC	+/-		0,973	5,123	

Los resultados obtenidos indican que el promotor del gen SND1, al igual que el de SNDp102, carece de caja TATA, así como de elementos BRE, Inr y DPE, dado que los posibles

lugares de unión de estos elementos basales encontrados por los programas se localizan a gran distancia de la posición +1, inicio de transcripción.

5.3.2 ISLAS CpG

Se analiza la presencia de islas CpG en la secuencia promotora del gen SND1 humano mediante los programas en red CpG Island Searcher y EMBOSS CpGPlot/CpGReport, empleando en cada caso los criterios recomendados:

	%CG	Longitud	Espacio entre islas
EMBOSS	50%	200 pb	100 pb
CpG Island	55%	500 pb	100 pb

Los análisis realizados en la secuencia promotora de SND1 muestran que la región (-881,+316) presenta un 62,5% de GC y la zona (-627,+260), incluida en la anterior, un 65% de GC (Figura 5.6).

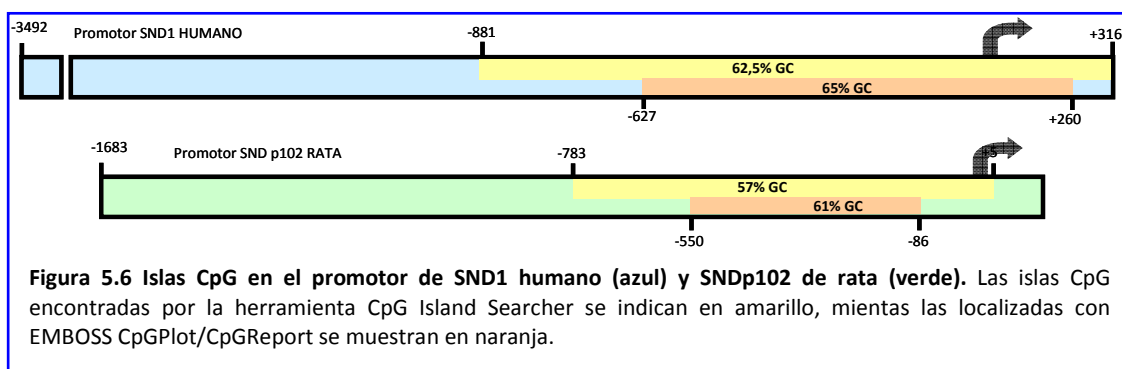


Figura 5.6 Islas CpG en el promotor de SND1 humano (azul) y SNDp102 de rata (verde). Las islas CpG encontradas por la herramienta CpG Island Searcher se indican en amarillo, mientras que las localizadas con EMBOSS CpGPlot/CpGReport se muestran en naranja.

Comparando las islas CpG halladas en el promotor del gen SND1 humano con su homólogo de rata, que presentan un 61% de GC en la región (-550,-86) y un 57% si se amplía a (-783,+5), se observa que en ambos casos las islas CpG se encuentran en la región más cercana al inicio de transcripción, que además es la región que presenta mayor homología entre las dos especies (Figura 5.6).

5.3.3 CAJAS GC Y CCAAT

En promotores sin caja TATA se han descrito las cajas GC y CCAAT como elementos importantes en el inicio de la transcripción (Wierstra, 2008). La búsqueda de las secuencias se realiza mediante los factores de transcripción que se unen a ellas. Las cajas GC se localizan como

los lugares de unión de los factores de transcripción Sp1, Sp3, Sp4, BTEB1 o KLF9 y BTEB2 o KLF5, y para la localizar las cajas CCAAT se buscan sitios de unión de los factores de transcripción CTF/NF1, C/EBP, CDP y NF-Y.

En las Tablas 5.III y 5.IV se muestran los múltiples lugares de unión obtenidos para estos factores de transcripción limitando los datos a la región (-1600, +316), cuya actividad transcripcional analizaremos posteriormente.

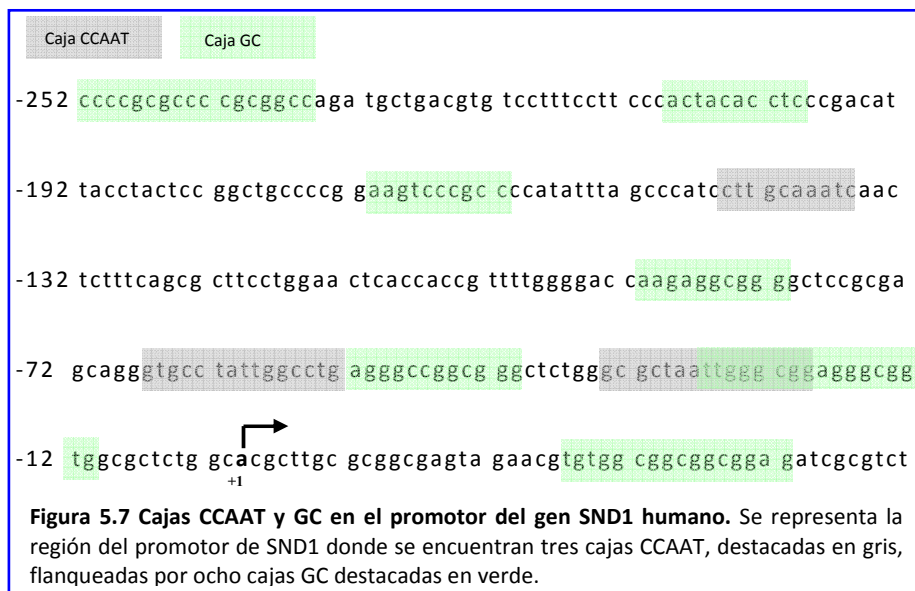
Tabla 5.III Posibles cajas GC en la secuencia promotora de SND1.

FT	Posición	Secuencia	Orientación	La	Semejanza núcleo	Probabilidad
KLF, SP1	(-1481,-1465)	ttagctgGGCGtggttag	+/-		0,955	6,705
KLF	(-614,-598)	cgctcatgGGCGgaggtca	+		0,942	3,742
KLF	(-596,-580)	gccccgagGGCGcggtctg	+	17	0,921	
KLF	(-581,-565)	ccccagGGCGgagcca	-/+		0,876	9,862
Sp1, KLF	(-402,-392)	tgggagGGTGgagccac	-/+		0,886	11,441 /7,601
KLF	(-380,-364)	tccgagcaGGGTgcc	+		0,908	4,876
SP1, KLF	(-295,-281)	CCCTCCCGCC	-/+	14 /18		8,408 /10,584
Sp1, KLF, TBP, TFIID, BTEB1 ETF, CP1	(-278,-269)	cccagGGCGgagccag	++	18 /20	0,969 /9,501	10,773
KLF, SP1	(-256,-236)	GGCGGGGGG	-/+	18		6,791 /10,183
KLF	(-208,-199)	GAGGTGTAGT	-	8,33		3,886
KLF, SP1, ETF, CP1, ER-alpha TBP, TFIID, BTEB1	(-169,-161)	GGGCGGGAC	-	9,807		
Sp1, KLF, TBP, TFIID, BTEB1, octamer-binding factor, ER-alpha	(-91,-82)	ccaagaGGCGgggtctcc	+/-	20 /18	0,921	10,597
Sp1, ER-alpha	(-52,-41)	AGGGCgGGCGG	+	20		
Sp1, KLF, ETF, CP1	(-29,-13)	taattGGCGgagggcg	+/-	12 /12	8,274 /8,190	0,917
Sp1, KLF, ETF, CP1	(-27,-10)	gcggaGGCGggtggcg	+	12 /12	7,023 /7,956	0,922
SP1	(+24,+39)	CGCCCGCC	-/+	20		8,466

Tabla 5.IV Posibles cajas CCAAT en la secuencia promotora de SND1.

FT	Posición	Secuencia	Orientación	La	Semejanza núcleo	Probabilidad
CTF, NF-1, CCAAT-binding factor, alpha-CP1, NF1, NF-Y	(-1565,-1551)	ATTGGCT	-/+	8,41 /14	0,964	9,728
CEBP	(-515,-501)	agctttgtGGAacct	-		0,961	9,728
CEBP	(-497,-489)	TTGGAAAAT	-/+	8,68		5,795 /6,784
CEBP, NF1	(-145,-137)	ATTGCAAG	-	9,99		6,654
CTF, NF-1, CCAAT-binding factor, alpha-CP1, NF1, NF-Y, TGGCA-binding protein T	(-67,-53)	caggCCAAtaggcac	-	8,41 /16	0,939	10,519
NF-Y	(-34,-19)	ccgcCCAAtaggcg	-		0,942	9,519

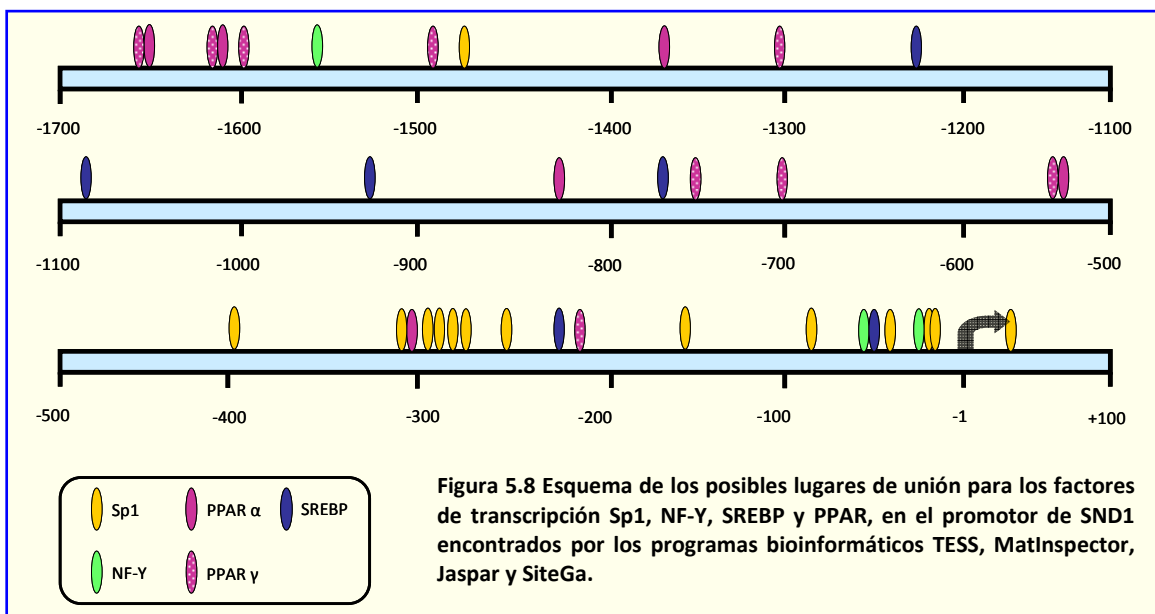
Si nos fijamos en las posiciones de los elementos del promotor localizados (Figura 5.7), las cajas CCAAT descritas quedan flanqueadas por las múltiples cajas GC encontradas en la región (-252,+48), de manera similar a lo que sucedía en el promotor del gen de rata.



5.3.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN REGULADORES

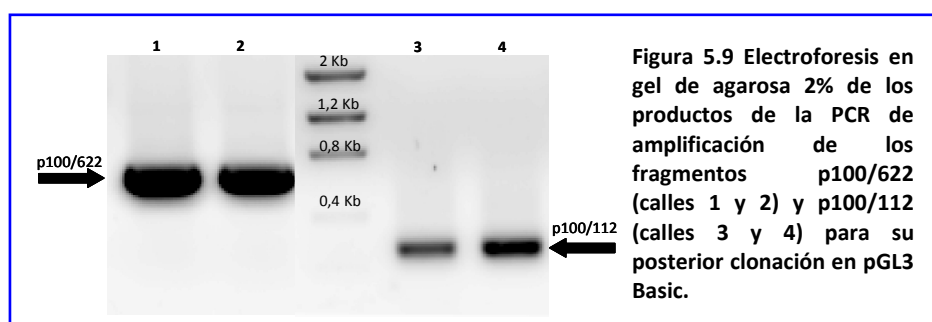
Estudios publicados sobre homólogos de SND1 y trabajos realizados en nuestro laboratorio relacionan a la proteína SNDp102 de rata con el metabolismo lipídico, la secreción de las VLDL en hepatocitos primarios (Palacios et al., 2006), la formación de cuerpos lipídicos (García-Arcos et al., 2010), el proceso aterogénico (Sakamoto et al., 1999) y la producción y secreción de lípidos en la leche (Keenan et al., 2000). Por tanto, se realiza la búsqueda, en el promotor de SND1 humano, de lugares de unión de dos factores de transcripción relevantes en la regulación del metabolismo de lípidos como son SREBP y PPAR, sensibles a los niveles intracelulares de colesterol y de ácidos grasos. En la Figura 5.8 se muestra un esquema del promotor de SND1 con los posibles elementos de unión para estos factores de transcripción junto a los de otros dos factores de transcripción, Sp1 y NF- κ B. Se observa cómo los factores de transcripción basales, Sp1 y NF- κ B, se encuentran en mayor número hacia el extremo 3' del promotor, mientras que los factores de transcripción reguladores, SREBP y PPAR, se encuentran mayoritariamente más alejados, hacia el extremo 5'.

Los elementos de unión para SREBP tienen una variabilidad muy alta en cuanto a las bases que forman su secuencia consenso. Se han descrito diferentes elementos de unión, entre ellos SRE (*Sterol regulatory element*), SRE-like (secuencias similares a SRE), E-box (*Enhanced box sequences*) y E-box-like (secuencias similares a E-box).



5.4 ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS FRAGMENTOS DE DELECIÓN 5' DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN SND1 HUMANO

Con el fin de determinar los elementos responsables de la actividad transcripcional de la región promotora del gen SND1, la secuencia aislada se divide en seis fragmentos de delección 5', que se diferencian entre sí por la longitud del extremo 5' y mantienen en común el extremo 3'. Los fragmentos de delección se amplifican a partir de DNA genómico humano (Figura 5.9) y se clonan en el vector de expresión eucariota pGL3-Basic como promotor del gen indicador *Firefly luciferase* (Figura 5.10), de modo que la actividad luciferasa refleja la actividad transcripcional de cada fragmento.



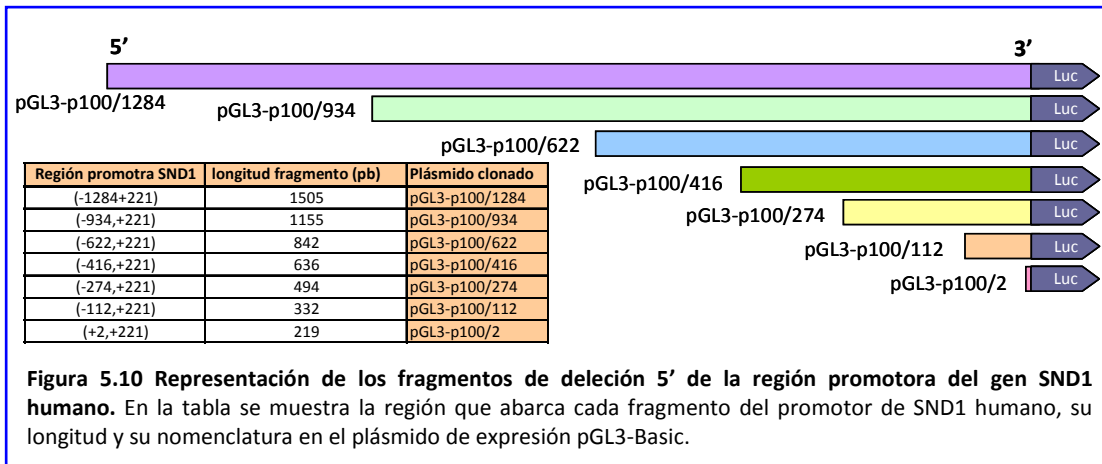


Figura 5.10 Representación de los fragmentos de delección 5' de la región promotora del gen SND1 humano. En la tabla se muestra la región que abarca cada fragmento del promotor de SND1 humano, su longitud y su nomenclatura en el plásmido de expresión pGL3-Basic.

La actividad transcripcional de cada fragmento del promotor de SND1 humano se determina en células HepG2 transfectadas de manera transitoria y se expresa en unidades relativas de luminiscencia (URL) como el cociente entre los valores de las actividades *Firefly* luciferasa y *Renilla* luciferasa respecto al clonado pGL3-p100/112, al cual se le asigna el valor de 1.

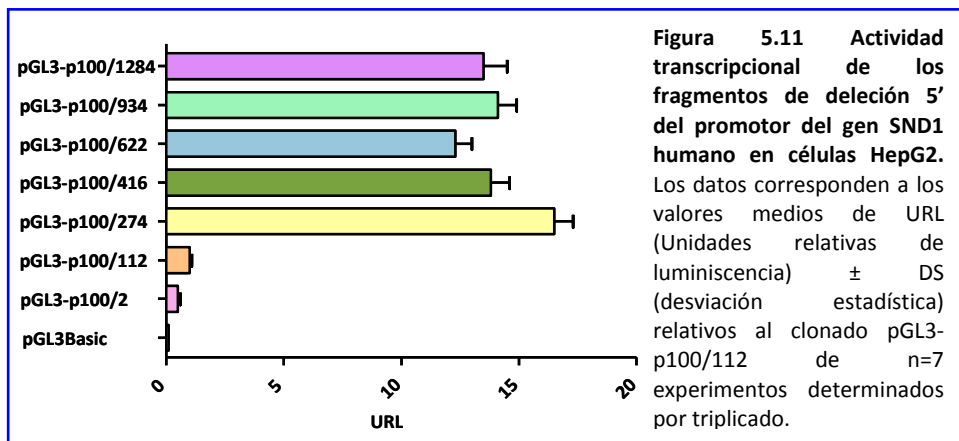


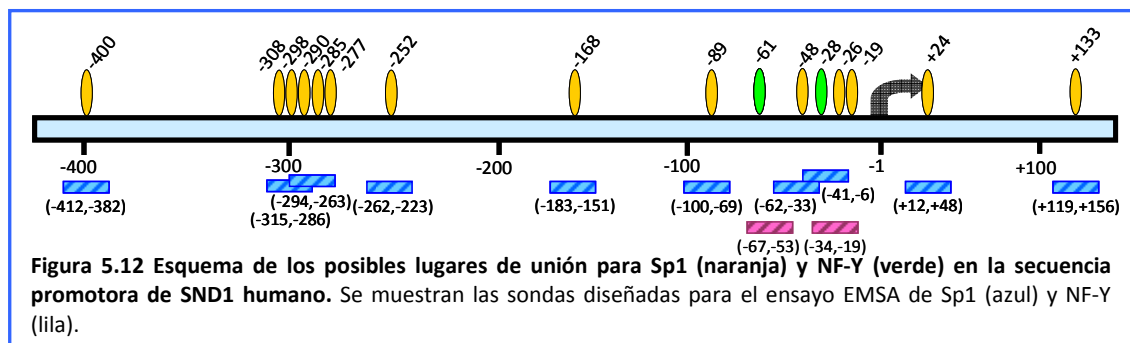
Figura 5.11 Actividad transcripcional de los fragmentos de delección 5' del promotor del gen SND1 humano en células HepG2. Los datos corresponden a los valores medios de URL (Unidades relativas de luminiscencia) \pm DS (desviación estadística) relativos al clonado pGL3-p100/112 de n=7 experimentos determinados por triplicado.

Los resultados de la Figura 5.11 muestran que la actividad transcripcional en los fragmentos más pequeños p100/2 y p100/112, es mínima, seguido de un marcado aumento de 15 veces en el fragmento p100/274. Los datos sugieren que los elementos potencialmente responsables de la máxima actividad promotora del gen SND1 se encuentran localizados en la región (-274,-112), ya que a partir de este fragmento la actividad luciferasa se mantiene en el resto de los fragmentos en valores de 12-16 URLs. El análisis de esta región (-274,-112) revela la presencia de dos cajas GC y cajas CCAAT que podrían ser esenciales para la actividad del promotor en las células humanas, así como un lugar de unión para SREBP y otro para PPAR.

Considerando estos resultados, abordamos el estudio de la unión de Sp1 y NF-Y a las cajas GC y CCAAT y su participación en la regulación de la actividad promotora del gen SND1.

5.5 IMPLICACIÓN DE Sp1 Y NF-Y EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN SND1 HUMANO

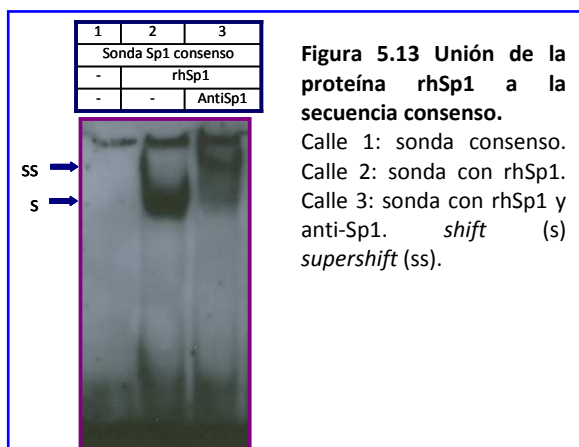
Los elementos de unión para Sp1 y NF-Y de mayor probabilidad se localizan principalmente en la región de 300 pb corriente arriba del inicio de transcripción, en la que se obtiene la máxima actividad transcripcional Figura 5.12.



En primer lugar, se examina mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA) la capacidad de los factores de transcripción Sp1 y NF-Y para interactuar con los lugares de unión identificados en la región (-400,+141). Posteriormente, se confirma la unión *in vivo* y la funcionalidad del factor de transcripción en el control del promotor por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y mediante la mutación de los elementos de unión.

5.5.1 ESTUDIO DE LA UNIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Sp1 Y NF-Y MEDIANTE EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

En el ensayo EMSA se emplea como control positivo la sonda bicatenaria que contiene la secuencia consenso del lugar de unión de Sp1 (5'-GGGCGGGG-3'). La sonda consenso se incubaba con la proteína recombinante humana Sp1 (rhSp1) y, como se muestra en la Figura 5.13, se forma una banda o *shift*, que es la representación de la unión entre la proteína (rhSp1) y el DNA (sonda consenso) (calle 2, s). Al añadir el anticuerpo anti-Sp1 la banda experimenta un desplazamiento o *supershift* (calle 3, ss).



Para el estudio de las cajas GC localizadas a lo largo de la región (-400,+141) mediante ensayos EMSA, se diseñan sondas que contienen los lugares de unión para Sp1 -400, -308, -298, -290, -285, -277, -252, -168, -89, -48, -26, -19, +24 y +133, como indica la Figura 5.12. Algunas de las sondas contienen más de un lugar de unión de Sp1.

La Figura 5.14 muestra el complejo sonda-rhSp1 que se forma al incubar las sondas con la proteína recombinante rhSp1 (calle 2, A-I), excepto en el lugar de unión +24 (J). La especificidad de los complejos se determina con el competidor específico (sonda no marcada) e inespecífico (Oct2A). En la calle 3 los complejos desaparecen completamente con una cantidad del competidor específico 100 veces superior a la sonda marcada, al contrario de lo que ocurre con el competidor inespecífico (calle 4). Al añadir el anticuerpo anti-Sp1 se observa un retraso en la movilidad del complejo sonda-rhSp1-anticuerpo (calle 5), confirmando que Sp1 reconoce *in vitro* los elementos presentes en las sondas A-I, aunque con las sondas G e I no se observa *supershift* sino que la banda desaparece al añadir anti-Sp1.

En las calles 6-10 de la Figura 5.14 se representan los resultados obtenidos con las sondas que contienen los lugares de unión de Sp1 mutados. Cuando se utilizan sondas mutadas, se observa la ausencia de complejo DNA-Sp1 en los lugares de unión de Sp1 -400, -308, -298, -252, -168, -89 y -48 del promotor de SND1. En cambio, en las sondas C y H, que contienen dos o más lugares de unión posibles a Sp1, la mutación de cada uno de ellos no impide en su totalidad la unión de rhSp1, ya que Sp1 puede unirse a otros lugares no mutados. De esta manera, al añadir anti-Sp1 se continúa observando un desplazamiento de la banda. En las calles 6 y 7 de las imágenes C y H, podemos observar que la mutación del lugar de unión -290 en C y en de -26 en H, muestran una señal similar a la de la sonda no mutada, lo que sugiere que estos lugares no parecen ser determinantes respecto a los otros lugares de unión para Sp1 que contienen las sondas.

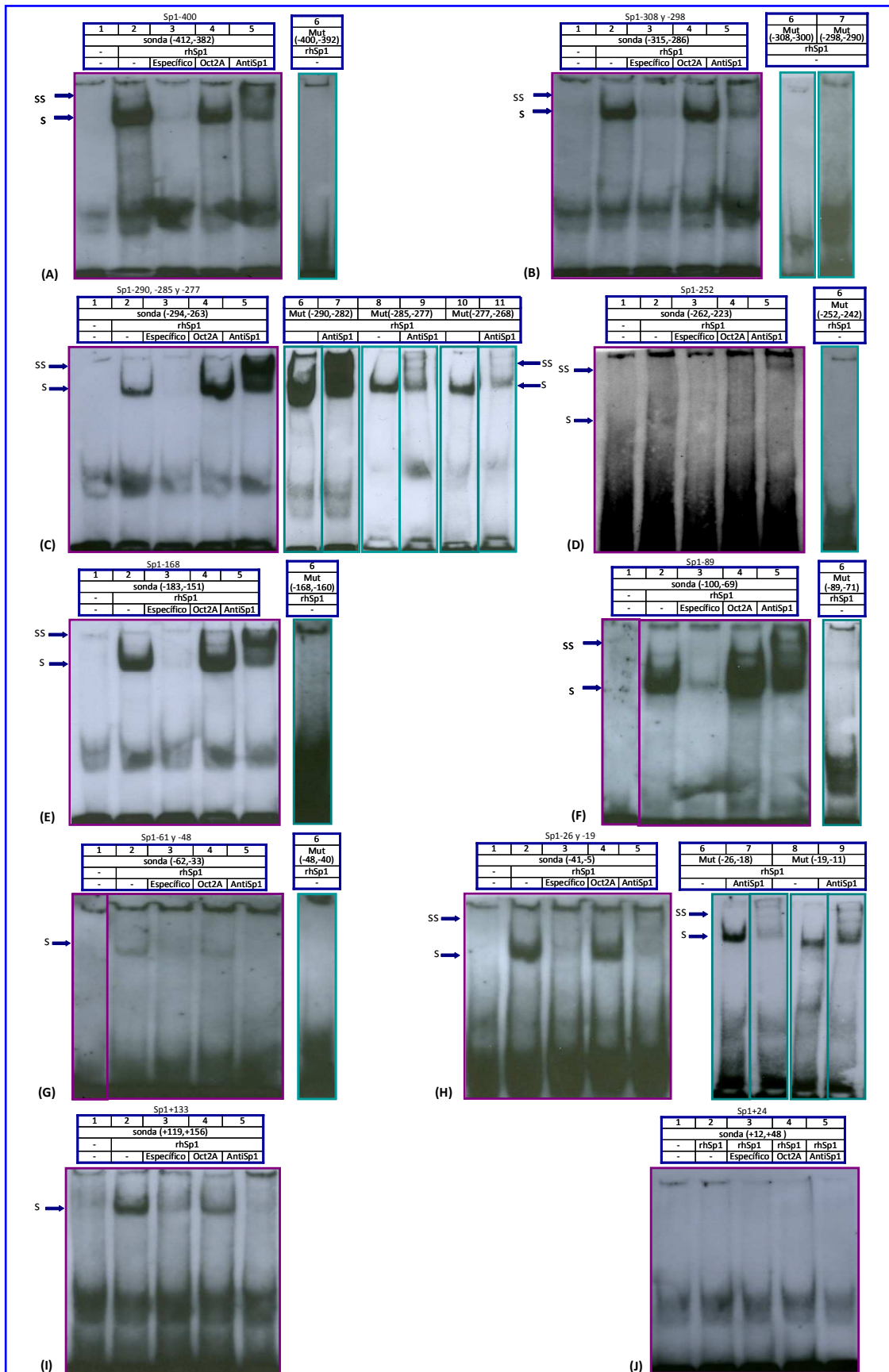
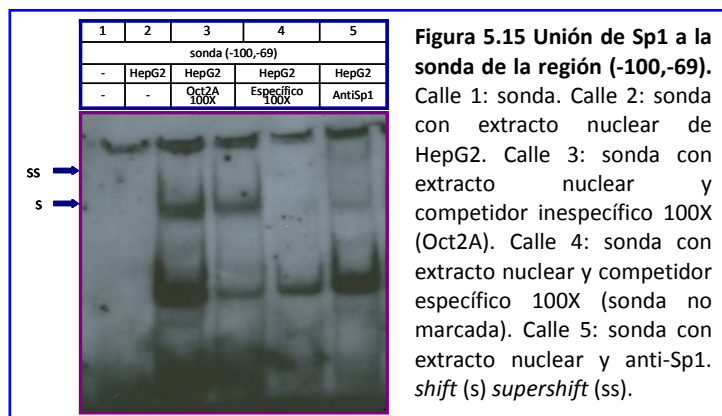


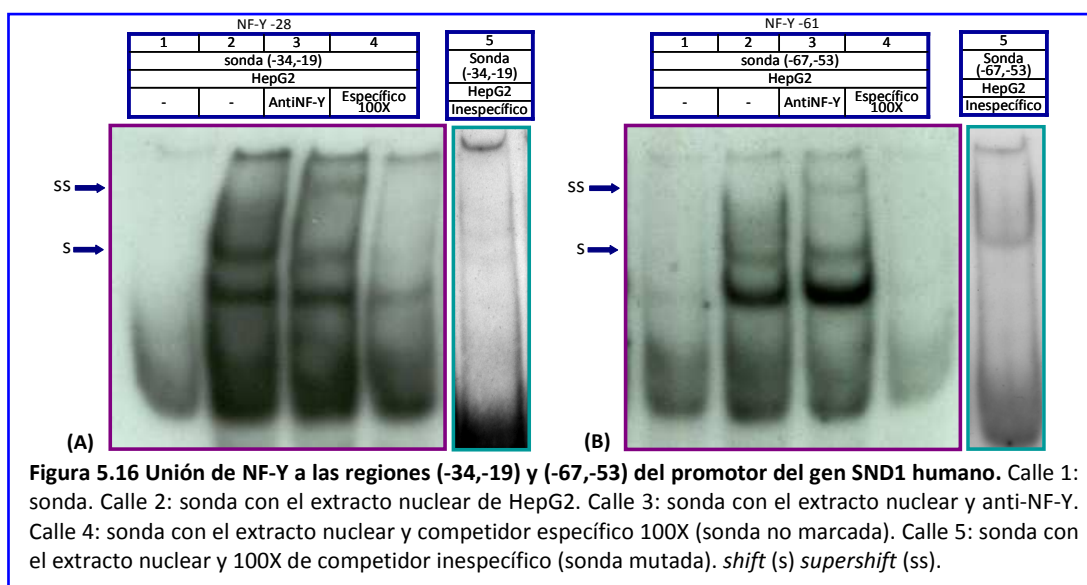
Figura 5.14 Unión del factor de transcripción Sp1 a las regiones (A:-412,-382), (B:-315,-286), (C:-294,-263), (D:-262,-223), (E:-183,-151), (F:-100,-69), (G:-62,-33), (H:-41,-6), (I: +119,+156) y (J:+12,+48) del promotor del gen SND1. Se emplean las sondas A-J, la proteína recombinante rhSp1, competidores específicos 100X (sonda no marcada), inespecíficos 100X (Oct2A y sonda mutada) y anti- Sp1. *shift (s) supershift (ss)*

Cuando los ensayos EMSA se realizan con extractos nucleares de HepG2, se obtienen resultados similares a los observados con la proteína rhSp1 para la región F:(-100,-69), como se muestra en la Figura 5.15.



De manera similar, se identifica la unión de NF-Y a las dos cajas CCAAT invertidas localizadas en las posiciones -61 y -28 del promotor de SND1 humano. Se emplean sondas con los lugares de unión de NF-Y y extracto nuclear de HepG2 como fuente del factor de transcripción. En la Figura 5.16 se muestra la banda específica de la unión de NF-Y a las sondas (calle 2), que se desplaza en presencia del anti-NF-Y (calle 3, ss) y desaparece al añadir el competidor específico (la propia sonda sin marcar) (calle 4), pero se mantiene en presencia del competidor inespecífico (en este caso se utiliza la propia sonda con el lugar de NF-Y mutado) (calle 5).

Los resultados demuestran la unión *in vitro* de NF-Y con las cajas CCAAT-61 y -28 del promotor de SND1 humano analizadas.

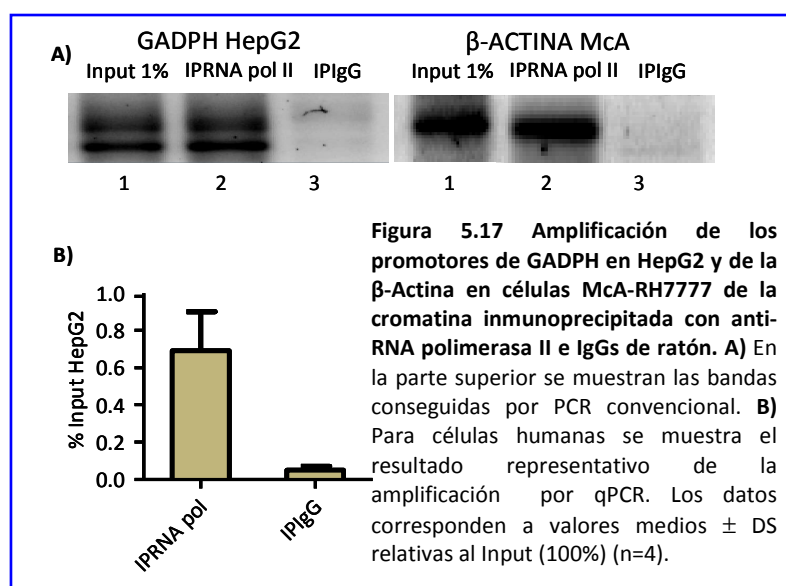


5.5.2 LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP) REVELA LA ASOCIACIÓN *in vivo* DE Sp1 Y NF-Y A LOS PROMOTORES DE SND1 HUMANO Y DE SNDp102 DE RATA

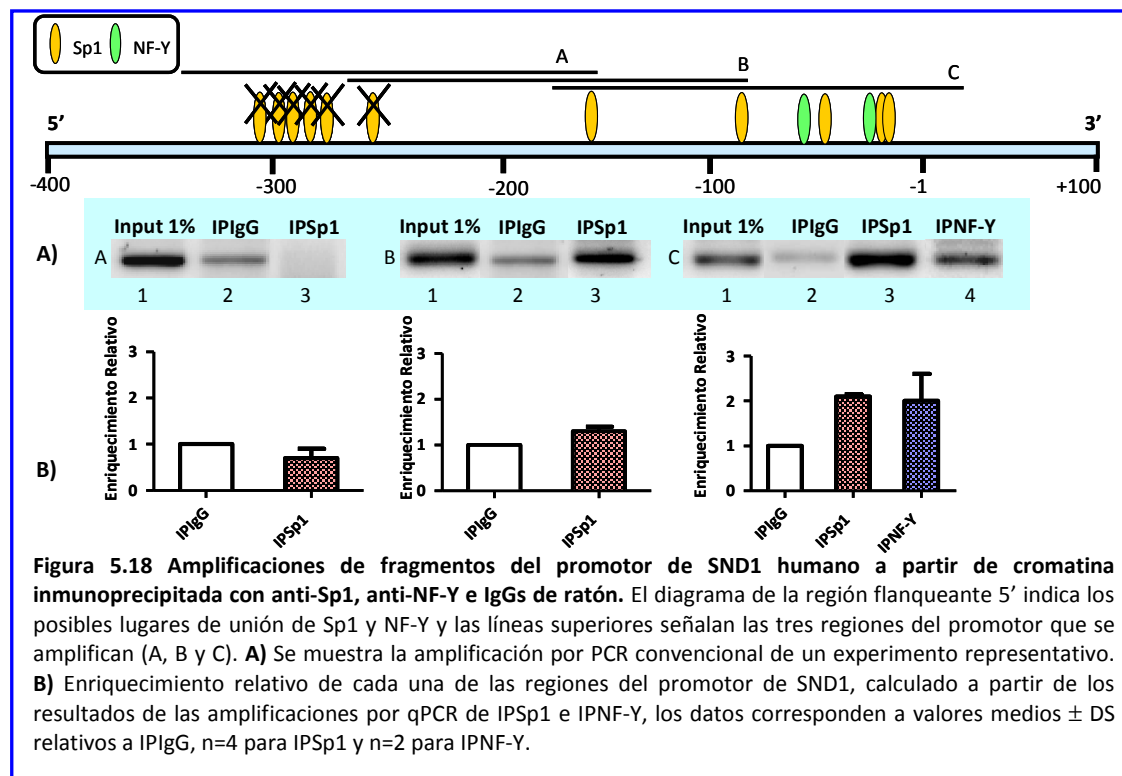
Para confirmar la interacción *in vivo* de Sp1 y NF-Y en los promotores endógenos de SND1 y SNDp102, se realizan ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de células de hepatoma humano HepG2 y de rata McA-RH7777 utilizando los anticuerpos anti-Sp1 y anti-NF-Y. La muestra de cromatina inmunoprecipitada se analiza por PCR convencional o por PCR a tiempo real, enfocando el estudio en la región del promotor donde aparecen la mayoría de los lugares de unión para Sp1 y NF-Y.

Para cada ensayo del ChIP se realizan siempre los controles positivos y negativos, aunque no todos se muestran en las figuras.

Como control positivo del ensayo ChIP se inmunoprecipita la cromatina de las dos líneas celulares, HepG2 y McA-RH7777, con el anticuerpo anti-RNA polimerasa II y como control negativo se inmunoprecipita la cromatina de las dos líneas celulares con IgGs de suero no inmune de ratón. A partir de los inmunoprecipitados (IPs) y el Input, que corresponde al 1% del total de la cromatina inmunoprecipitada, se amplifica una región del promotor de GADPH, en el caso de HepG2 y de β -Actina, en el caso de McA-RH7777. En la Figura 5.17 A, se muestran los resultados de las amplificaciones por PCR convencional para ambos promotores y se observa la señal en el input (calle 1) y en el producto de la IPRNApol II (calle 2), mientras que en la calle 3 no aparece producto porque no hay precipitaciones de complejos inespecíficos. Las IPs realizadas en células HepG2 se analizan también mediante qPCR y, como se muestra en la Figura 5.17 B, el control positivo (IPRNApol) es un 0,7% del Input, mientras que la fracción de las IPIgG es menor de un 0,03% del Input.



En la Figura 5.18 se representan los sitios de unión para los factores de transcripción Sp1 y NF-Y, además del resultado de la amplificación de las IPs con los oligonucleótidos específicos diseñados para las regiones A(-345,-166), B(-268,-73) y C(-176,+4) del promotor de SND1.



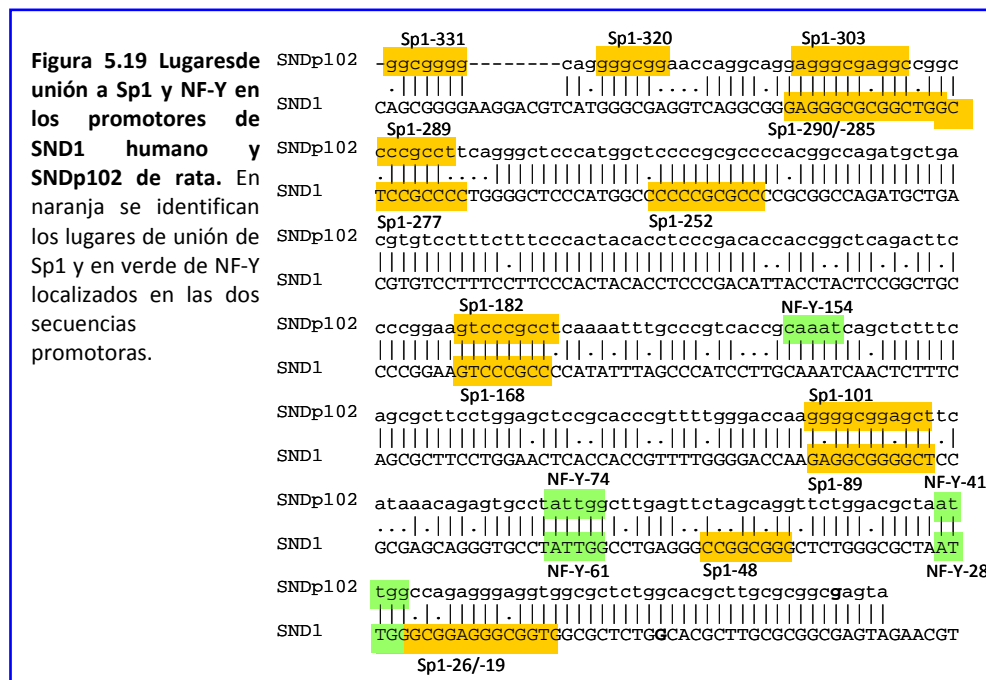
Los resultados obtenidos de la amplificación por PCR convencional de las regiones B y C (Figura 5.18, A), demuestran la habilidad de Sp1 y NF-Y para unirse específicamente a los lugares localizados en la región promotora de SND1 humano (-240,+4), donde se encuentran cinco lugares de unión a Sp1 y dos lugares de unión a NF-Y. Se observa una leve banda del producto de la amplificación con las IgG, que funciona como control negativo del ensayo.

Los resultados de las amplificaciones por qPCR (Figura 5.18, B) de las regiones B y C de las muestras IPSp1 y IPNF-Y nos indican que contienen un 3-7% del Input y están enriquecidos 1,5-2 veces.

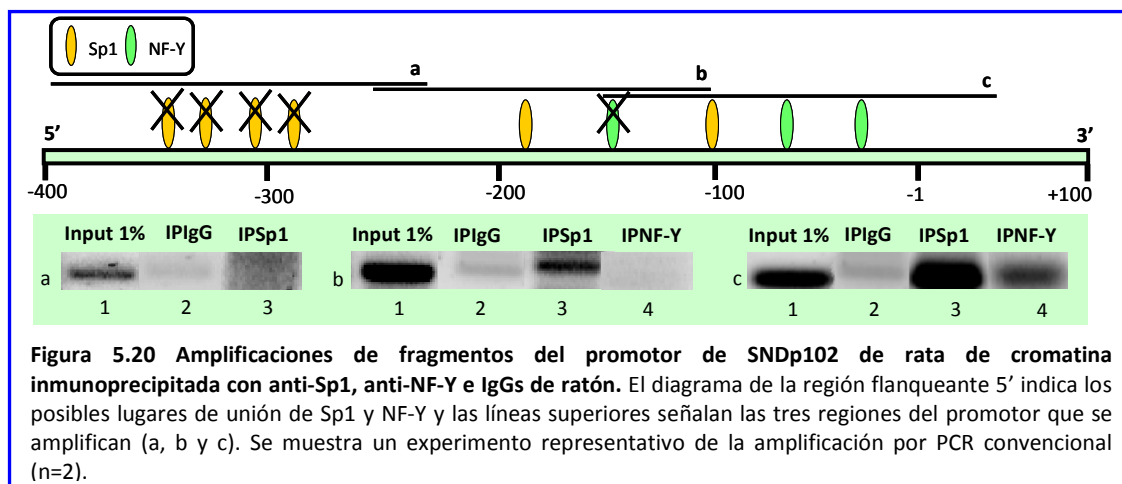
La falta de producto en las amplificaciones de la IPSp1 en la región A y de la IPNF-Y en las regiones A y B, descarta la funcionalidad de los lugares de unión que se encuentran en ellas bajo nuestras condiciones experimentales.

Estudios previos de nuestro grupo sobre el promotor del gen SNDp102 de rata habían demostrado mediante EMSA la unión *in vitro* de Sp1 a las cajas GC localizadas en las posiciones -331, -320, -303, -289, -182 y -101 y la unión de NF-Y a las cajas CCAAT -154, -74 y -41 (Rodríguez et

al., 2006; Rodriguez et al., 2007). Muchos de estos elementos de unión coinciden con lugares de unión similares en la secuencia el promotor del gen SND1 humano (Figura 5.19).



Para analizar cuáles de estos lugares de unión de Sp1 y NF-Y son funcionales, se realizan ensayos ChIP en la línea de hepatoma de rata, McA-RH7777 (Figura 5.20). Las amplificaciones por PCR convencional de las regiones a(-396,-223), b(-249,-104) y c(-151,+50) de las distintas IPs confirman, por un lado, la unión de NF-Y en la región c, donde se localizan los dos lugares -74 y -41, pero no el lugar de unión -154 en la región b. Por otro lado, los productos de las amplificaciones de las IP_{Sp1} en las regiones b y c demuestran la unión de Sp1 en los lugares de unión Sp1-182 y Sp1-101 del promotor. Sin embargo, la ausencia de amplificación en la región a indica que la unión de Sp1 no parece tener lugar en las células de rata.

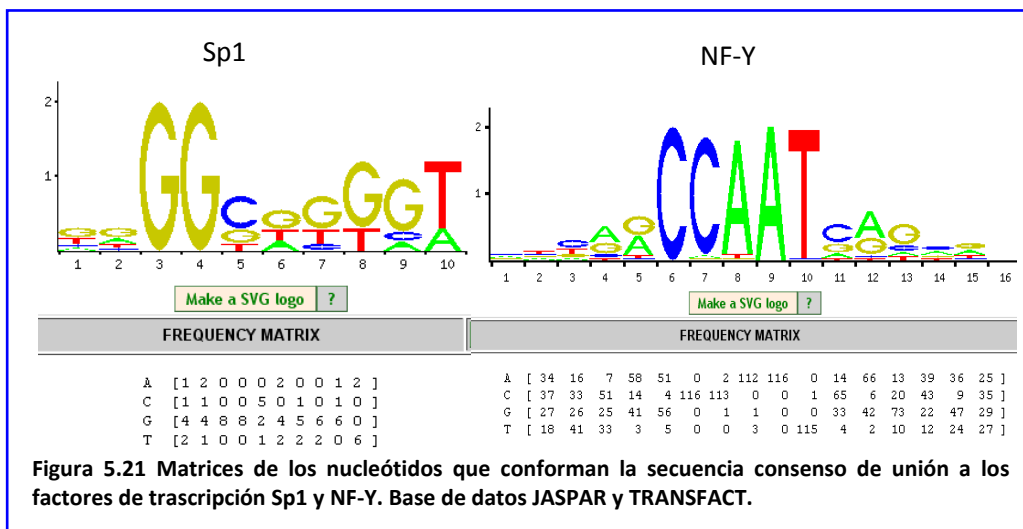


De los resultados obtenidos se demuestra la unión *in vivo* de Sp1 y NF-Y a los lugares Sp1-168, Sp1-89, Sp1-48, Sp1-26, Sp1-19, NF-Y-61 y NF-Y-28 del promotor del gen SND1 humano y a los lugares Sp1-182, Sp1-101, NF-Y-74 y NF-Y-41 del promotor del gen de SNDp102 de rata. El resto de elementos no parecen tener un papel funcional en los promotores, según las condiciones experimentales ensayadas.

5.5.3 LAS MUTACIONES DE LUGARES DE UNIÓN DE Sp1 Y NF-Y EN EL PROMOTOR DE SND1 HUMANO REDUCEN SU ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

Los lugares de unión confirmados por CHIP presentan localizaciones conservadas en ambos promotores, lo que sugiere un papel determinante de Sp1 y NF-Y en la actividad promotora de esta familia de genes. Para determinar si estos lugares de unión son funcionales en las células HepG2, se realizan mutaciones dirigidas en los sitios de unión Sp1-168, Sp1-89, Sp1-48, NF-Y-61 y NF-Y-28 para estudiar cómo afectan a su actividad transcripcional. Estudios similares realizados en el promotor del gen SNDp102 de rata condujeron a marcados descensos en la actividad transcripcional del promotor al mutar NF-Y -41 y -74 y Sp1 -101 y -182.

La Figura 5.21 muestra la secuencia consenso de la caja GC para la unión de Sp1 $G^1G^2G^3G^4C^5G^6G^7G^8G^9$, en la que G^3 , G^4 , G^8 y G^9 son las cuatro posiciones más conservadas, que se modifican en los oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida. La secuencia consenso de unión del factor de transcripción NF-Y es $C^1C^2A^3A^4T^5$ y las tres posiciones más conservadas de esta secuencia son la C^1 , A^4 y T^5 , que se sustituyen en la mutagénesis dirigida.



Los plásmidos construidos con los fragmentos de delección 5' p100/112, p100/274 y p100/416 de la región promotora de SND1 humano son sometidos a mutagénesis dirigida para contener mutaciones individuales o combinadas de los lugares de unión especificados en la siguiente tabla:

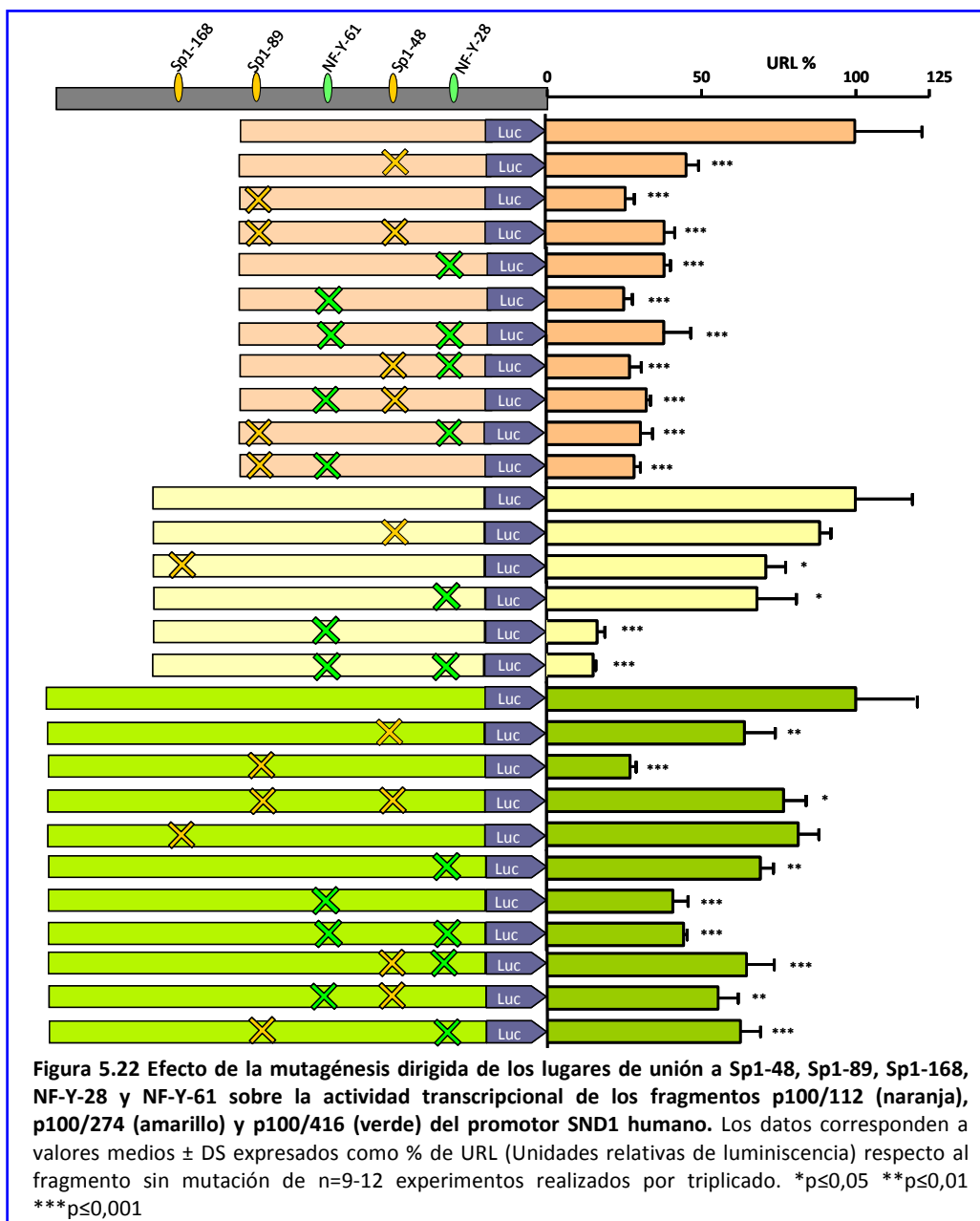
FT	Posición	Secuencia inicial	Secuencia mutada	Mutado
Sp1	(-48,-40)	CCGGCGGGC	CCATCGATC	Sp1-48
	(-89,-81)	GAGGCGGGG	GAATCGGTA	Sp1-89
	(-168,-160)	TCCCGCCCC	TCTAGCCAT	Sp1-168
NF-Y	(-28,-24)	ATTGG	CCTGT	NF-Y-28
	(-61,-57)	ATTGG	CCTGT	NF-Y-61

Como se observa en la Figura 5.22, la mutación del lugar de unión Sp1-89 produce un descenso del 75% de la actividad transcripcional tanto en el fragmento p100/112 como en el fragmento p100/416, siendo de menor magnitud (20-25%) el provocado por la mutación del elemento de unión Sp1-48 en el plásmido p100/112 y sin cambios significativos en el fragmento p100/274. En los fragmentos que contienen los dos elementos mutados, la actividad transcripcional se reduce de forma similar al del mutado en Sp1-48. La mutación Sp1-168 provoca un 30% de reducción en p100/274 sin modificaciones en el fragmento p100/416.

La mutagénesis dirigida a las cajas GC del promotor humano indica una mayor dependencia de la actividad del elemento Sp1-89, aunque el resto de cajas GC también juegan cierto papel en la regulación transcripcional.

Las mutaciones puntuales de las cajas CCAAT localizadas en las posiciones -28 y -61 provocan un descenso de la actividad transcripcional en los tres fragmentos estudiados, oscilando entre un 50-75%. El descenso más acusado es el provocado por la mutación NF-Y-61. En los fragmentos que contienen simultáneamente las dos mutaciones se observa que el descenso de la actividad transcripcional se mantiene similar al de la mutación de NF-Y-61, lo que sugiere que es un elemento determinante en la regulación transcripcional del gen SND1.

Cuando se realizan mutaciones combinadas de cajas GC y CCAAT en los fragmentos p100/112 y p100/416, no se observan cambios en los % de disminución de la actividad transcripcional, sino que tienen valores similares al de algunas de las mutaciones individuales. En general, se puede observar que en el fragmento p100/112 las mutaciones simples o combinadas provocan un descenso de un 70% de la actividad transcripcional y sin embargo, en el fragmento p100/416 el descenso es de menor magnitud, entre un 35 y un 45% (Figura 5.22).



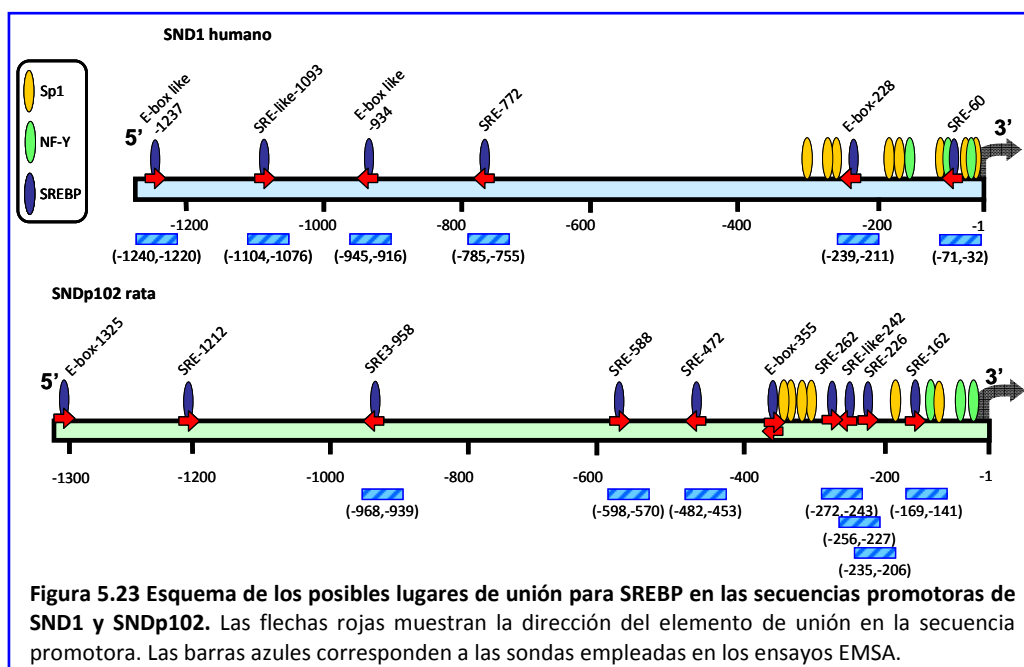
Estos resultados nos sugieren que Sp1-89 y NF-Y-61 podrían ser claves para la transcripción del gen SND1 humano, aunque no se descarta el papel regulador de otros lugares de unión de Sp1, NF-Y u otros factores de transcripción pueden tener sobre la expresión del gen SND1.

En el caso del promotor de rata SNDp102 se obtuvieron resultados similares respecto a la mutagénesis de las cajas GC y CCAAT, y a la implicación funcional de Sp1 y NF-Y en la transcripción del gen SNDp102.

5.6 IMPLICACIÓN DE SREBP EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES SND1 HUMANO Y SNDp102 DE RATA

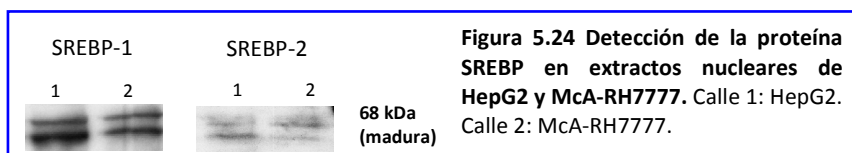
Una vez demostrada la participación de los factores de transcripción basales Sp1 y NF-Y, en este apartado se exponen los resultados del estudio sobre el papel de SREBP (*Sterol regulatory element-binding protein*) en la regulación de la transcripción de los genes homólogos SND1 y SNDp102.

El análisis bioinformático de los dos promotores identifica varios lugares de unión para SREBP, cajas E (*E-box*), cajas E degeneradas (*E-box like*), secuencias SRE y secuencias similares a SRE (*SRE-like*). Su distribución se esquematiza en la Figura 5.23 y refleja su proximidad a los lugares de unión de Sp1 y NF-Y.

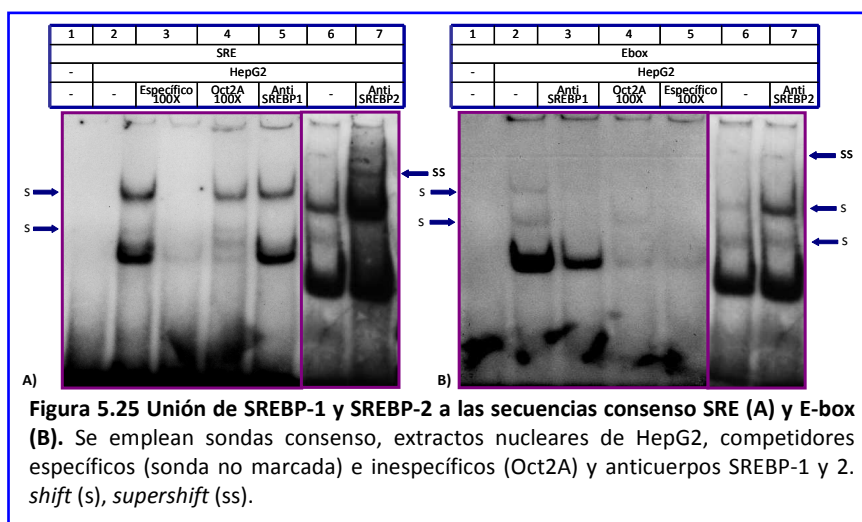


5.6.1 ESTUDIO DE LA UNIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SREBP MEDIANTE EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

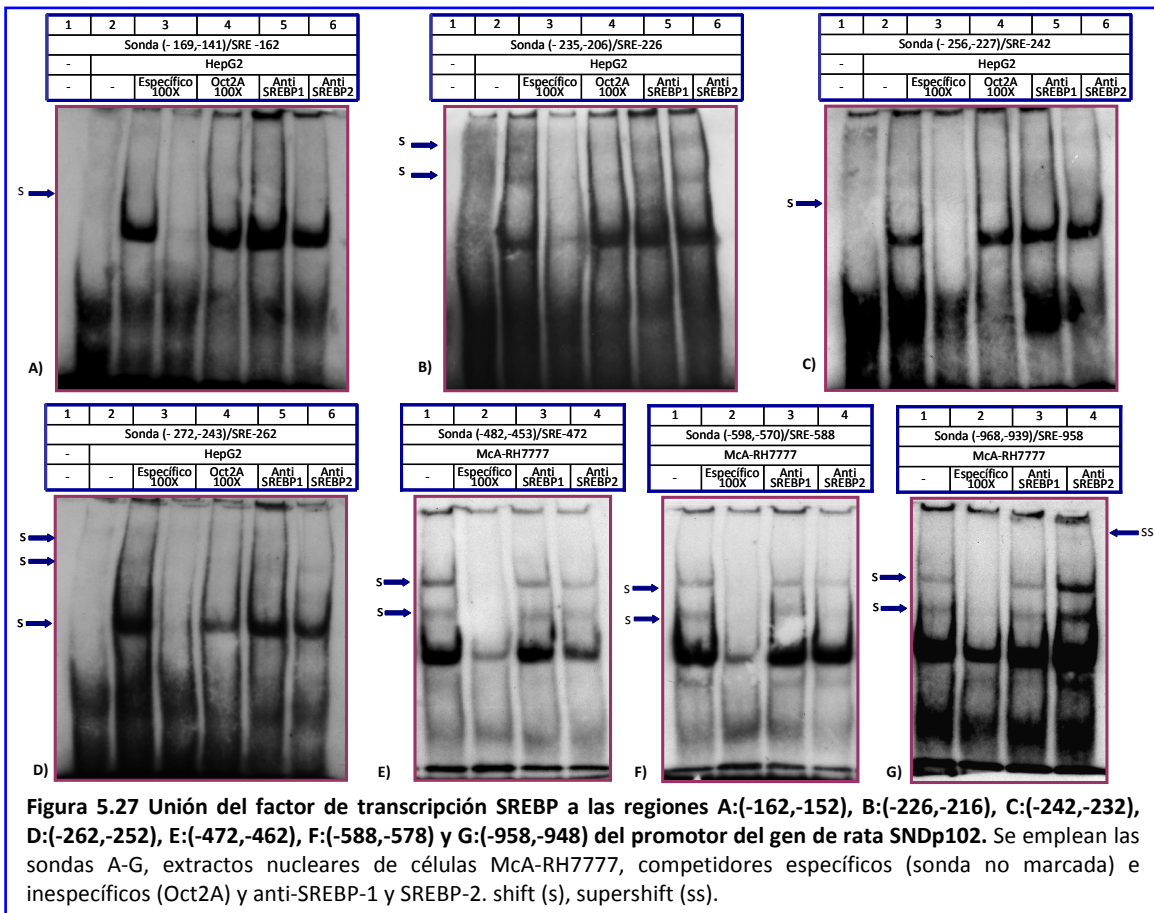
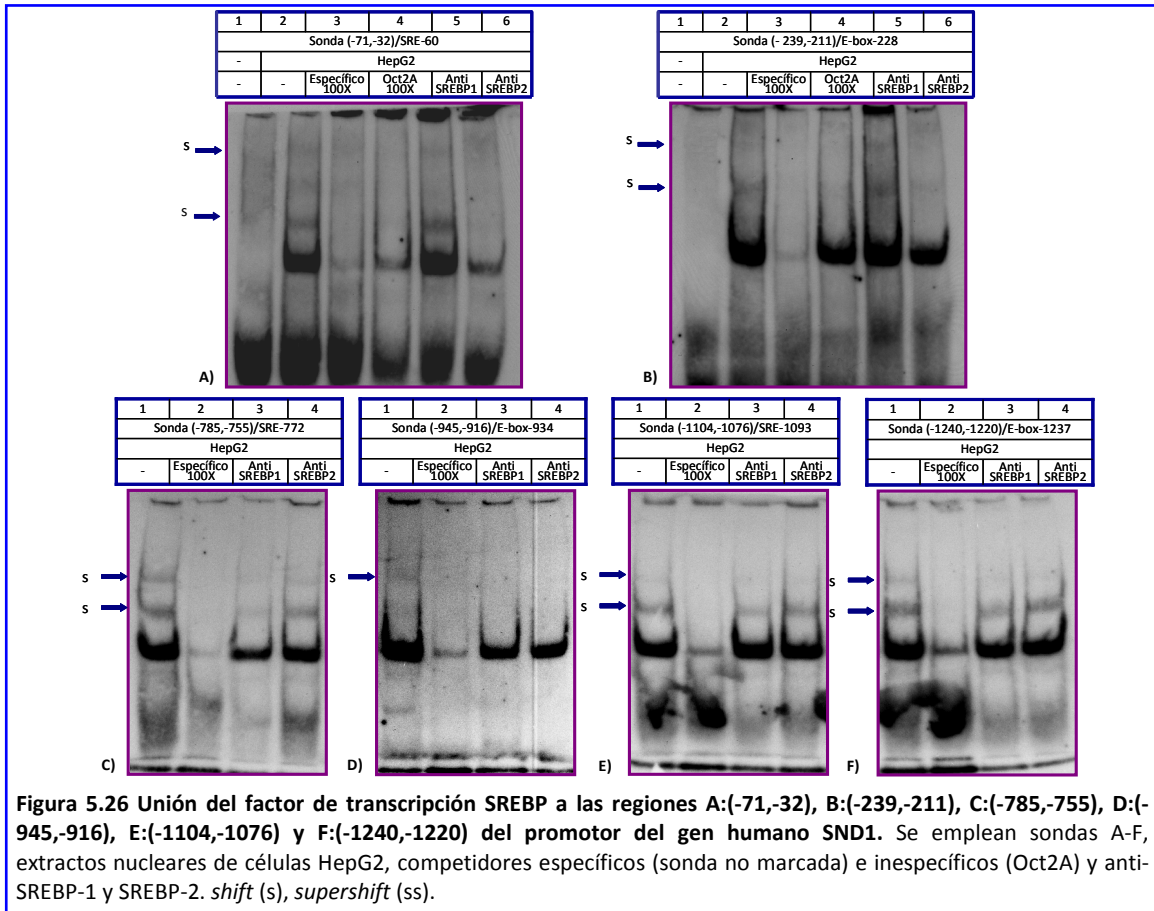
Se ha descrito que diversos tipos celulares sin estimular muestran una baja presencia de SREBP, por lo que se estima mediante western blot la existencia de las proteínas SREBP-1 y 2 en las células HepG2 y McA-RH7777, utilizadas en nuestros ensayos. Las formas maduras de las dos isoformas de SREBP se detectan en los extractos nucleares de los dos tipos celulares (Figura 5.24).



La unión de SREBP de los extractos nucleares de HepG2 se comprueba en primer lugar mediante EMSA, utilizando sondas que portan la secuencia consenso SRE (5'-ATCACCCAC-3') y la caja E-box (5'-CACGTG-3'). Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 5.25, confirman la unión de SREBP-2 a las secuencias consenso SRE y E-box dado que se observa *supershift* al añadir anti-SREBP-2 (Figura 5.25 A y B: calle 7, ss). La unión de SREBP-1 a las dos sondas muestra la formación de dos complejos con el DNA y al añadir el anticuerpo anti-SREBP-1 las bandas desaparecen sin observarse *supershift* (Figura 5.25 A: calle 5 y B: calle 3).



La unión de SREBP a los promotores de SND1 humano y SNDp102 de rata, se ensaya con los extractos nucleares de HepG2 o McA-RH7777 y las sondas indicadas en la Figura 5.23 para cada promotor. Según los resultados que se muestran en las Figura 5.26 y Figura 5.27, no se detecta unión específica de ninguna de las isoformas de SREBP (-1 o -2) a las sondas analizadas de ambos promotores. Las únicas excepciones son los lugares de unión del promotor SND1 humano -771 y -934 donde al añadir anti-SREBP-1 o 2 las bandas se atenúan (Figura 5.26, C y D, calles 3 y 4) y en la sonda que contiene el lugar -958 de SNDp102, donde se observa el único *supershift* (Figura 5.27,G: calle 4, ss).

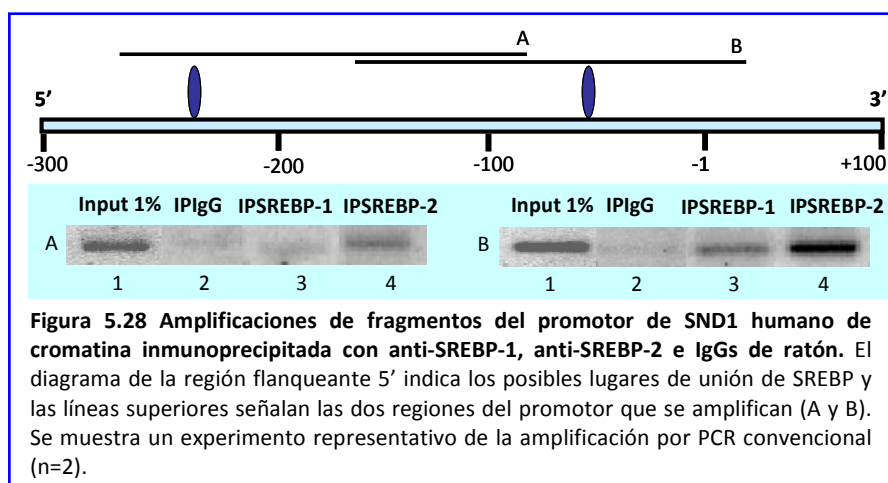


Para los ensayos EMSA realizados se diseñan sondas que contienen elementos de unión identificados por bioinformática aunque, a causa de la gran diversidad de combinaciones de las bases que forman las múltiples secuencias consenso descritas, puede que muchas de ellas no se hayan reconocido. Hay que considerar la posibilidad de que la unión de SREBP sea de forma indirecta mediante la interacción de otra proteína que se une directamente con el promotor.

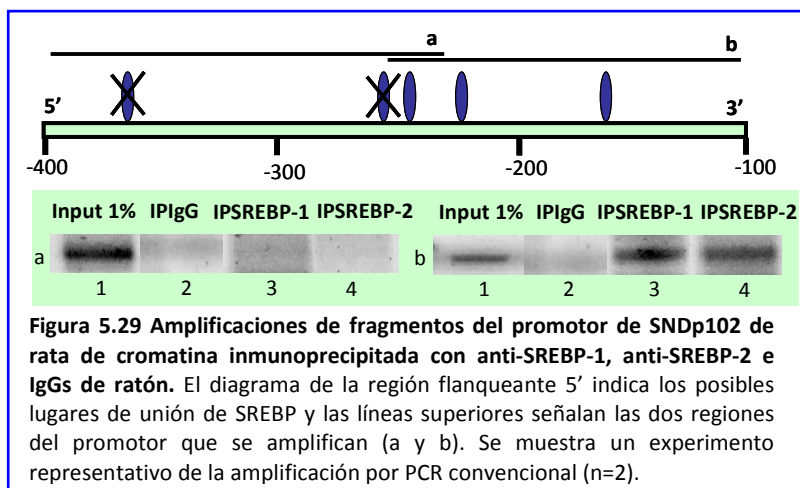
5.6.2 LA INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP) REVELA LA ASOCIACIÓN *in vivo* DE SREBP-1 y SREBP-2 A LOS PROMOTORES DE SND1 Y DE SNDp102

Para conocer si SREBP se une *in vivo* a los promotores SND1 y SNDp102 se realizan inmunoprecipitaciones de la cromatina (IPs) de células HepG2 y McA-RH7777 con anti-SREBP-1 y -2 y se cotejan los resultados con los obtenidos *in vitro* de los ensayos EMSA.

Las IPs de células HepG2 se amplifican mediante PCR convencional las regiones del promotor proximal del gen SND1 A(-268,-73) y B(-176,+4), donde se localizan los lugares de unión Ebox-228 y SRE-60. La Figura 5.28 muestra que tanto SREBP-1 como SREBP-2 se unen al promotor en la zona amplificada B, donde se localiza el sitio de unión -60 y únicamente SREBP-2 une a la región A, donde se localiza el lugar de unión Ebox-228.



Los productos de las PCRs del ChIP de células de rata se muestran en la Figura 5.29. Los resultados de las amplificaciones de las regiones a(-396,-223) y b(-249,-104) del promotor de SNDp102 sugieren que tanto SREBP-1 como SREBP-2 se unen únicamente a la región b en uno o varios de los elementos identificados SRE-162, SRE-226 y SRE-like-242.



Los resultados obtenidos mediante ChIP reflejan la unión *in vivo* de SREBP a los promotores de los genes SND1 y su homólogo de rata SNDp102 en los lugares más cercanos a los extremos 3' a unas 250 pb corriente arriba desde el origen de transcripción. Los datos obtenidos mediante EMSA junto con los resultados del ChIP, apuntan a un efecto de SREBP que podría atribuirse a la unión indirecta del factor de transcripción al promotor.

5.6.3 REGULACIÓN POR SREBP DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES SND1 Y SNDp102

Se utilizan dos aproximaciones al estudio del papel regulador de SREBP sobre la transcripción de SND1 y SNDp102.

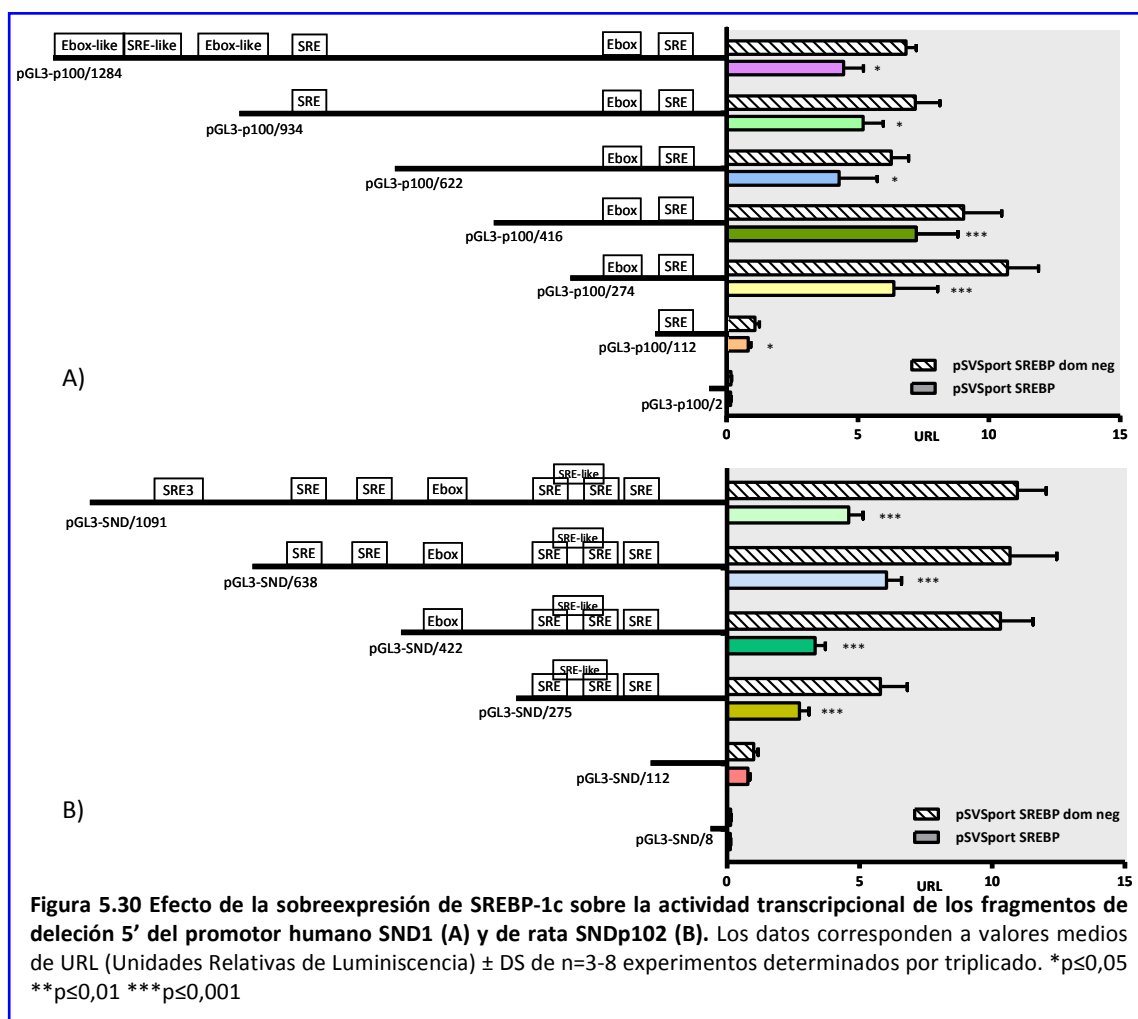
- ✚ Se valora el efecto de la sobreexpresión de SREBP-1c sobre la actividad transcripcional de los promotores de SND1 humano y SNDp102 de rata.
- ✚ Se modifican los niveles de expresión de SREBP-2, alterando la concentración intracelular de colesterol, mediante el tratamiento de las células con simvastatina (inhibidor de la HMG-CoA reductasa) o con mevalonolactona (precursor de la vía de síntesis del colesterol).

5.6.3.1 Efecto de la sobreexpresión de SREBP-1c sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102

En primer lugar, la sobreexpresión de SREBP-1c se comprueba en células de hepatoma humano transfectadas con el vector de expresión pSV Sport SREBP-1c junto con el vector FAS *promoter luciferase*, que contiene el promotor de la enzima ácido graso sintasa (FAS), en el que se han descrito varios lugares de unión para SREBP. La presencia del vector de expresión de SREBP-

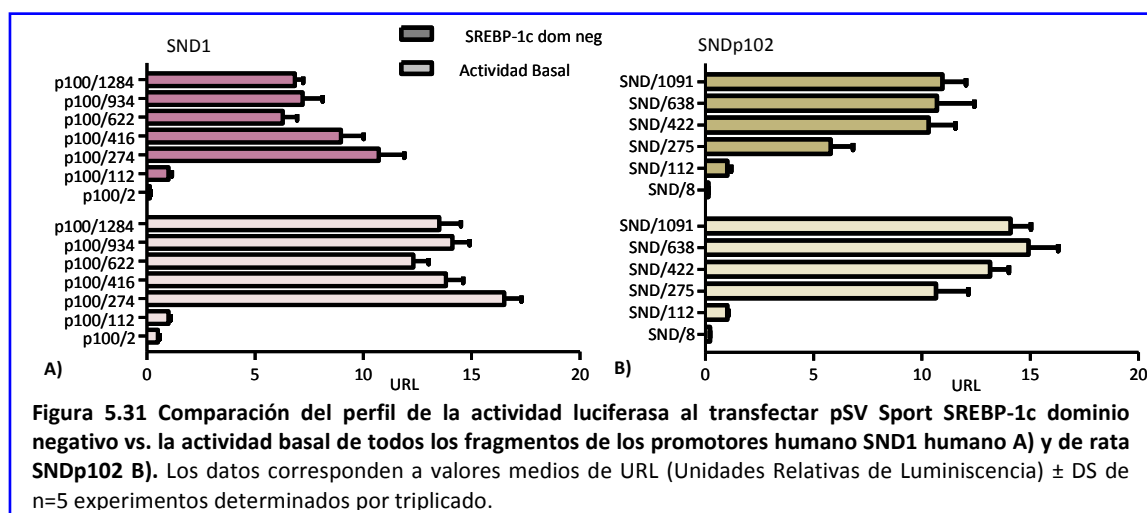
1c se refleja en un aumento de 6 veces ($\pm 0,2$) de la actividad luciferasa respecto a la actividad de su control no funcional pSV Sport SREBP-1c dominio negativo.

A continuación, se estudia el efecto del vector pSV Sport SREBP-1c en la actividad luciferasa de los fragmentos de delección 5' del promotor de SND1 humano. Se observa un descenso significativo, entre un 25 y un 40%, al sobreexpresar SREBP-1c en células HepG2, excepto en el fragmento más corto, el cual no posee ningún lugar de unión a SREBP (Figura 5.30, A). El descenso de la actividad luciferasa se observa en el fragmento p100/112 (25%), que contiene el lugar de unión SRE-60, y es mucho más pronunciada cuando la secuencia del promotor incorpora el elemento Ebox-228, en el fragmento p100/274 (40%). En los demás fragmentos la inhibición de la actividad se mantiene en un 20-35%. Estos resultados sugieren que los elementos de respuesta identificados podrían participar en la regulación de la transcripción del promotor del gen humano mediante SREBP-1c, ya que la inhibición no se modifica cuando se incorporan al promotor más elementos de respuesta en los fragmentos mayores del promotor.



Por otro lado, en las células de rata la sobreexpresión de SREBP-1c también provoca una disminución, en este caso más marcada, de la actividad luciferasa (44-57%) a en el fragmento pGL3-SND/275 y mayores, que son los que poseen elementos de unión a SREBP. En el fragmento de delección pGL3-SND/275 se incorporan cuatro elementos de unión al factor de transcripción SREBP, tres de los cuales probablemente interaccionan con SREBP-1 o -2 *in vivo*. Los fragmentos más pequeños (pGL3-SND/8 y /112), que no contienen elementos de unión, no muestran cambios en su actividad (Figura 5.30, B).

Es bien sabido, que el hecho de añadir varios plásmidos a la mezcla de transfección, puede afectar a la eficiencia del reactivo. En los ensayos de sobreexpresión de SREBP-1c se tiene en cuenta que el perfil de la actividad luciferasa de los fragmentos no se modifica al transfectar con el vector control SREBP-1c dominio negativo, en comparación con el perfil de la actividad basal de todos los fragmentos sin el vector (Figura 5.31).



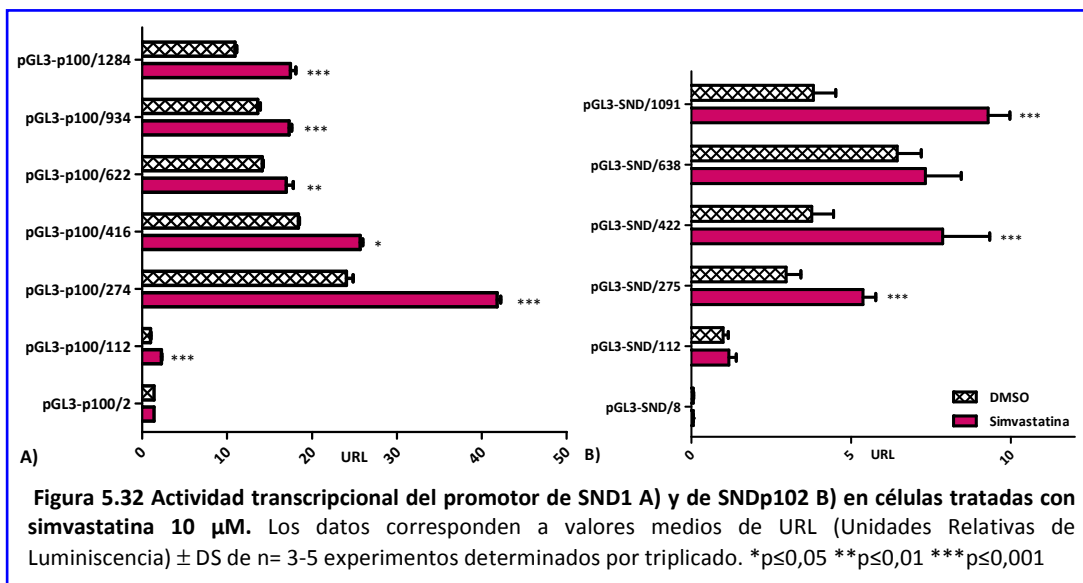
5.6.3.2 Efecto de simvastatina y mevalonolactona sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102

La simvastatina es un inhibidor de HMG-CoA reductasa, enzima clave de la síntesis de colesterol, por lo tanto al disminuir la concentración de colesterol celular, se activa la liberación de SREBP-2 al núcleo. Se ha descrito que el factor de transcripción SREBP-2 es más activo que las otras isoformas de SREBP en la regulación de genes implicados en la síntesis del colesterol en hígado. Para comprobar si la concentración de simvastatina empleada (10 μ M) es efectiva en la activación de SREBP celulares, se determina la actividad luciferasa del promotor de la FAS y se confirma que aumenta 5,6 veces (\pm 0,23) con el tratamiento.

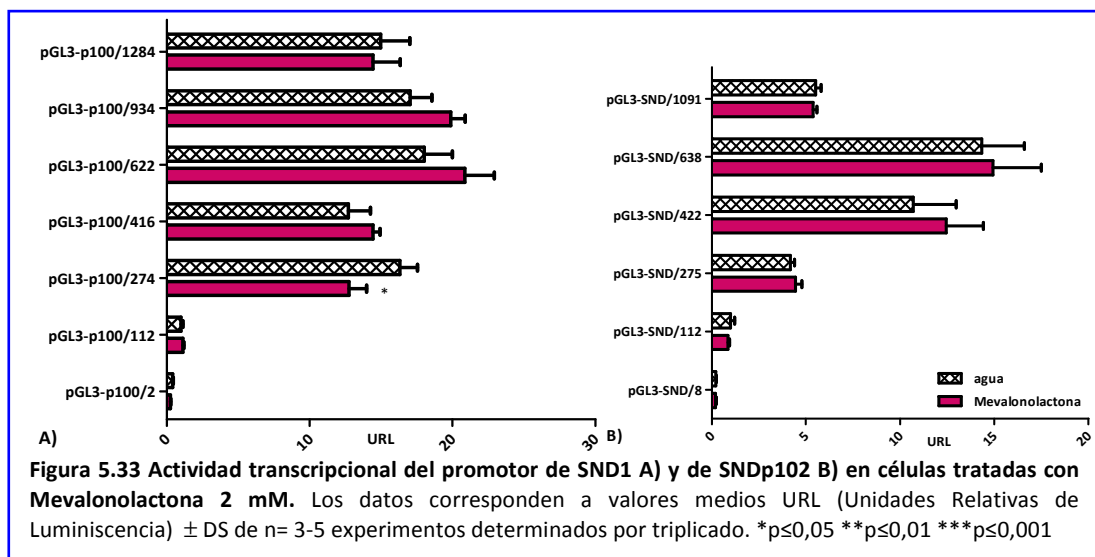
En el caso de los promotores en estudio, se observa que la presencia de simvastatina, al contrario de lo esperado, provoca un aumento de la actividad luciferasa en todos los fragmentos

de la región promotora tanto del gen SND1 humano como del gen SNDp102 de rata, alcanzando máximos de 120-140% de activación, efecto de signo opuesto al que se observa sobreexpresando SREBP-1c (Figura 5.32, A y B).

Los aumentos de actividad observados en los fragmentos desde p100/112 humano y SND/275 de rata sugieren un papel en la regulación transcripcional de SREBP-2 en los lugares de unión SRE-60 y Ebox-228 en el promotor de SND1 y de los sitios de unión para SREBP -162, -226, -242 y -262 del promotor del gen SNDp102.



Por otro lado, la mevalonolactona (2 mM) activa la biosíntesis de colesterol y en consecuencia, inhibe la liberación de SREBP-2 al núcleo. La disminución de SREBP-2 en la célula no parece afectar a las regiones promotoras de SND1 y de SNDp102. Únicamente en el fragmento p100/274 (Figura 5.33, A) es visible una disminución del 22% estadísticamente significativa, manteniéndose la actividad transcripcional inalterada en el resto de fragmentos.

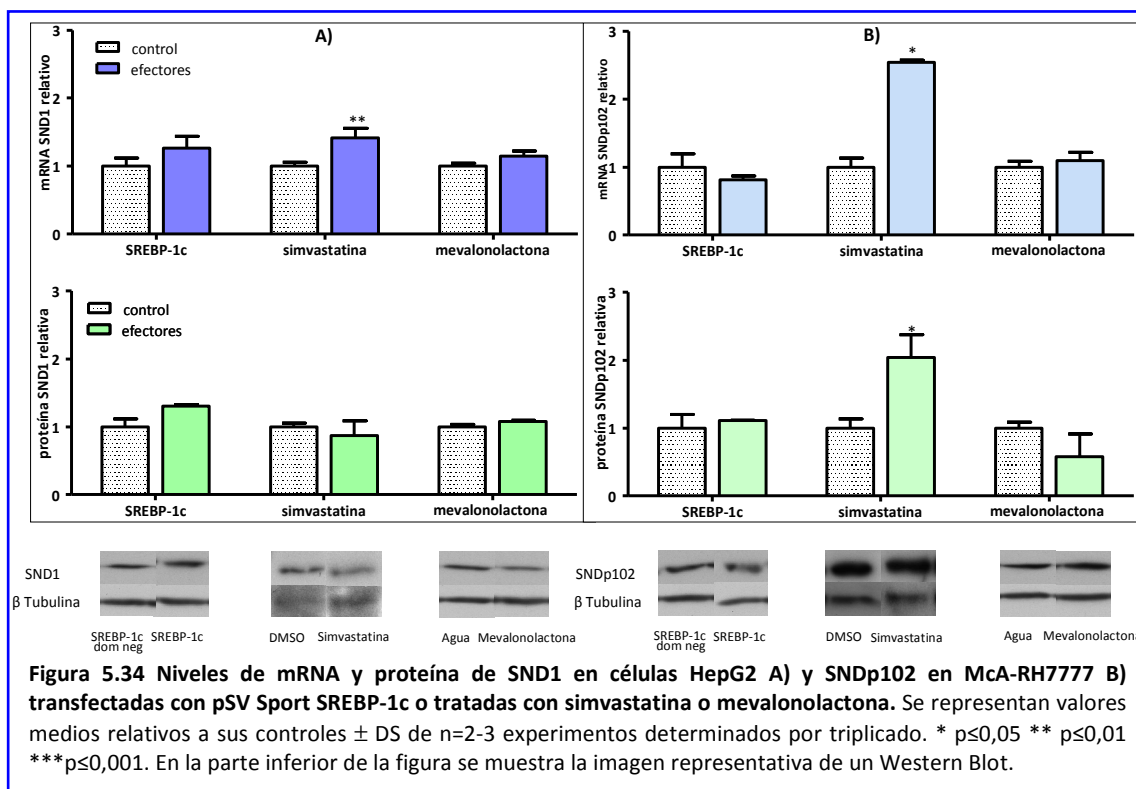


Mientras la sobreexpresión de SREBP-1c se ha observado que provoca inhibición de la actividad luciferasa en los promotores SND1 y SNDp102, sorprendentemente, en respuesta a la simvastatina, SREBP-2 tiene el efecto opuesto, estimulando la actividad transcripcional de ambos promotores, y la mevalonolactona no produce modificación alguna.

5.6.4 NIVELES DE mRNA Y PROTEÍNA DE SND1 Y DE SNDp102

Se determinan los niveles de mRNA y de proteína de SND1 y SNDp102 en células HepG2 y McA-RH7777 transfectadas con pSV Sport SREBP-1c y tratadas con simvastatina (10 μ M) y mevalonolactona (2 mM), para estudiar si hay correlación con la actividad de sus promotores.

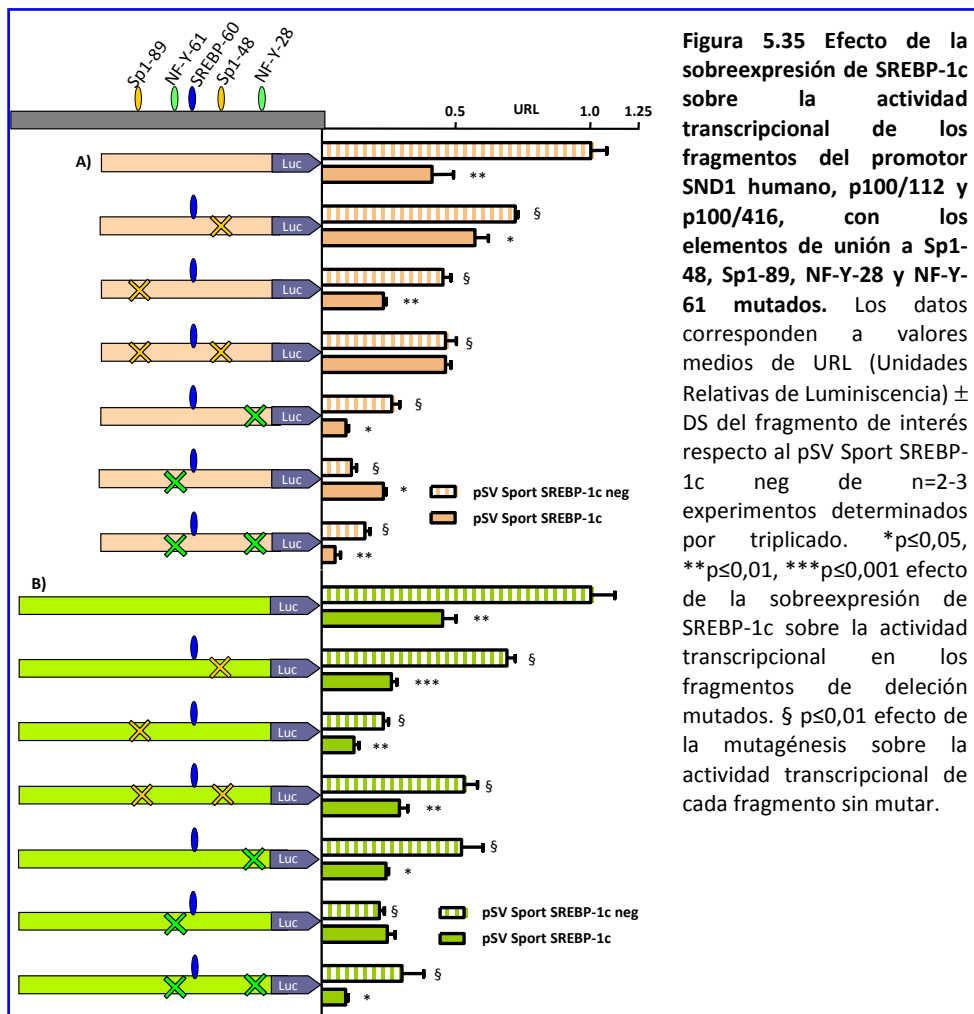
En la Figura 5.34 se muestra que el tratamiento con simvastatina provoca un aumento únicamente del mRNA de SND1 en HepG2 (A), y en las células McA-RH7777 (B) el aumento se refleja tanto en el mRNA como en la proteína de SNDp102. El tratamiento con mevalonolactona y la sobreexpresión de SREBP-1c no producen cambios en la expresión génica de SND1 humano ni de SNDp102 de rata.



5.6.5 EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE SREBP-1c SOBRE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE SND1 CON LOS LUGARES DE UNIÓN DE Sp1 Y NF-Y MUTADOS

Está descrito que algunos genes regulados por SREBP requieren de la cooperación de otros factores transcripcionales como Sp1 o NF-Y para un control eficiente de la transcripción. En el promotor del gen SND1 se localizan lugares de unión para los factores de transcripción basales Sp1 y NF-Y próximos a lugares de unión a SREBP. La secuencia de unión SRE-60 se encuentra entre los elementos de unión Sp1-48 y NF-Y-61, y cerca del lugar de unión de Sp1-89 y de NF-Y-28 (Figura 5.35). El elemento Ebox-228 también se encuentra rodeado por tres elementos de unión a Sp1 corriente arriba: Sp1-290, Sp1-277 y Sp1-252 y por Sp1-168 corriente abajo.

Para estudiar la posible colaboración entre los factores de transcripción Sp1, NF-Y y SREBP, se cotransfectan células HepG2 con el plásmido de expresión de SREBP-1c, junto con los fragmentos p100/112 o p100/416 de la región promotora de SND1 que contienen mutaciones en los elementos de unión Sp1-48, Sp1-89, NF-Y-28 y NF-Y-61 (Figura 5.35).



A pesar de que las mutaciones en los lugares de unión de Sp1 y NF-Y provocan un marcado descenso de la actividad transcripcional, en la mayoría de los fragmentos mutados se sigue observando la inhibición debida a la sobreexpresión de SREBP-1c, excepto en tres casos: el caso del doble mutado Sp1-48 y Sp1-89 del fragmento p100/112, en el que no se registra ningún cambio, la mutación del lugar de unión NF-Y-61 del fragmento p100/112, que provoca un aumento en la actividad transcripcional, lo contrario de lo que ocurría al sobreexpresar SREBP-1c junto con el mismo fragmento sin mutaciones, y el mismo mutado NF-Y-61 en el fragmento p100/416. En este último caso, no se observa modificación en la actividad, lo que podría ser debido a la presencia de más lugares de unión a otros factores de transcripción.

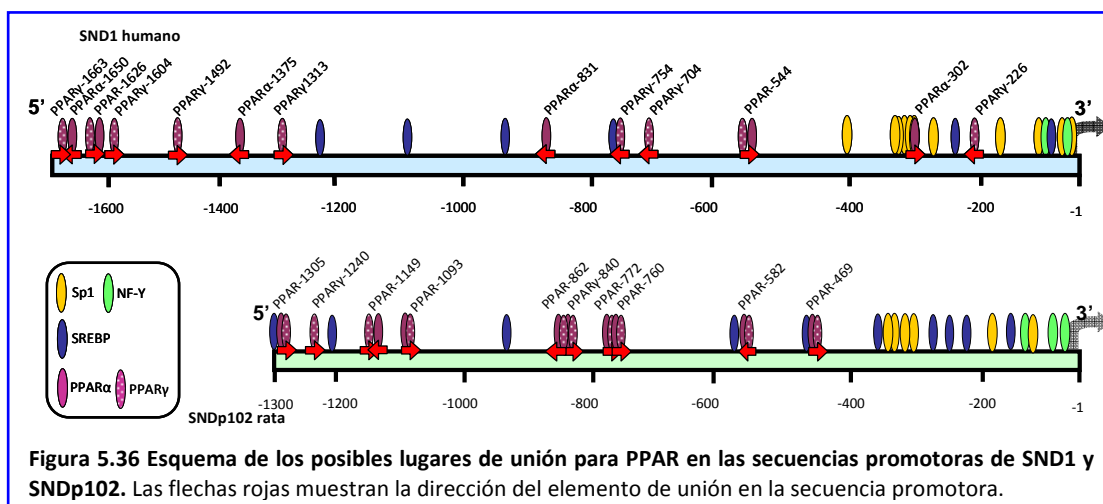
Los resultados obtenidos sugieren que para que SREBP ejerza su efecto inhibitor sobre la actividad promotora de SND1 puede requerir la participación adicional de los factores de transcripción Sp1 y NF-Y, y señala a los lugares de unión Sp1-48, Sp1-89 y NF-Y-61 como colaboradores específicos de SREBP-1c en la inhibición transcripcional del gen SND1.

Los resultados de EMSA y ChIP, que sugieren que la unión de SREBPs al promotor SND1 humano podría ser indirecta, indicarían que Sp1 y NF-Y actúan de enlace entre el promotor y SREBP-1c. Sin embargo, no se descarta la unión directa al promotor, ya que la mutación del lugar de unión de NF-Y-61 podría alterar el lugar de unión SRE-60 de SREBP-1c.

En cualquier caso, los resultados indican que SRE-60 sería un lugar clave para la acción de SREBP-1c en el promotor de SND1 humano.

5.7 IMPLICACIÓN DE PPAR EN LA REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES SND1 HUMANO Y SNDp102 DE RATA

En este apartado se estudia la posible implicación de PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) en la regulación transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102, dada su relación con el metabolismo lipídico. El análisis bioinformático revela la presencia de múltiples lugares de unión (PPRE) para PPAR α y para PPAR γ , aunque en muchos de los programas de análisis no se hace distinción entre isoformas, ya que los lugares de unión son muy similares (Figura 5.36).



Los lugares de unión a PPAR se localizan mayoritariamente en la región más alejada del inicio de transcripción de 200 pb en el promotor de humano y de 400 pb en el de rata. Los más cercanos a 3' en el promotor humano se encuentran próximos a elementos de unión de Sp1 y SREBP y en el promotor de rata algunos PPRE están próximos a lugares de unión a SREBP.

5.7.1 REGULACIÓN POR PPARs DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS PROMOTORES SND1 Y SNDp102

La participación de PPAR se estudia con la misma estrategia que en el apartado anterior para SREBP:

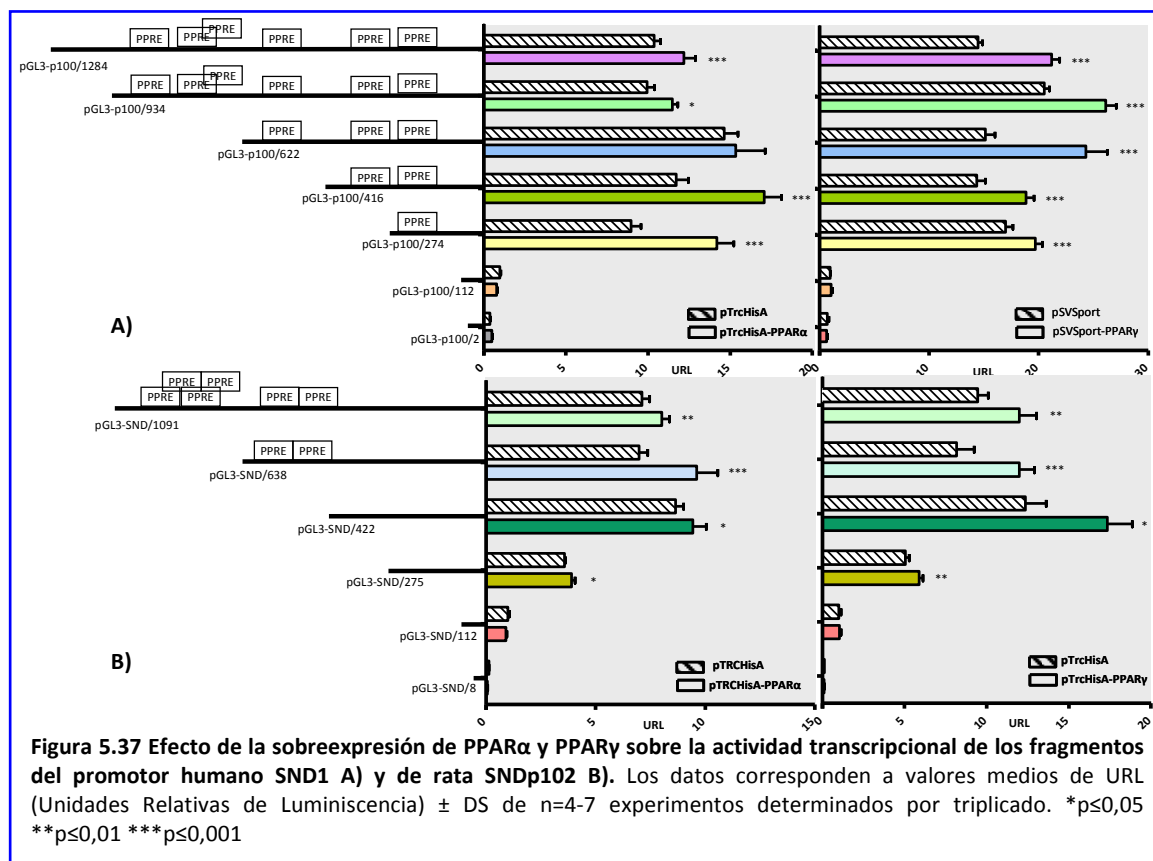
- ✚ En primer lugar, se analiza la actividad transcripcional de los promotores de SND1 humano y SNDp102 de rata, sobreexpresando en células de HepG2 y McA-RH7777 los factores de transcripción PPAR α y PPAR γ .
- ✚ En segundo lugar, se tratan células HepG2 y McA-RH7777 con activadores de PPAR.

5.7.1.1 Efecto de la sobreexpresión de PPAR α y PPAR γ sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102

Como comprobación de la introducción en las células de los plásmidos de expresión pTrcHisA PPAR α y pSV Sport PPAR γ , éstos se cotransfectan en células junto con el vector PPRE-Luc, el cual contiene la secuencia consenso PPRE como promotor del gen luciferasa. Se observa que la luminiscencia aumenta 5 veces ($\pm 0,8$) o 2,6 veces ($\pm 0,05$) al transfectar las células con PPAR α o con PPAR γ respectivamente.

Como se observa en la Figura 5.37 A, en células HepG2 las transfecciones con los vectores de expresión de PPAR α o de PPAR γ durante 24h provocan un aumento (20-60%) en la actividad transcripcional del fragmento p100/274 y mayores. El promotor de rata también presenta un perfil similar, detectándose el mayor aumento, sobre un 40%, en el fragmento SND/638 (Figura 5.37, B).

Los resultados apuntan a una posible acción de PPAR α y PPAR γ en el lugar de unión PPRE-226 del promotor del gen SND1 y sobre los PPRE -582 y/o -469 del promotor del gen SNDp102.



5.7.1.2 Efecto de los activadores de PPARs sobre la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102

Los compuestos WY-14643 y GW7647 son agonistas de PPARα, GW1929 es agonista de PPARγ y bezafibrato activa las dos isoformas de PPAR. El compuesto T0901317 es agonista de LXR (*Liver X receptor*), que se ha descrito que suprime los efectos de los PPAR al competir por la unión a RXR (*Retinoid X receptor*), aunque por otro lado, puede activar la transcripción de PPARα mediante la unión de LXR a su promotor.

En la Figura 5.38 se representan las actividades de los promotores en estudio con los efectores de PPAR. El promotor del gen SND1 se activa en respuesta a los efectores WY-14643 (100 μM) (A) o GW7647 (100 nM) (C) de manera muy similar a la sobreexpresión de PPARα y con porcentajes de aumento entre 20 y 100 %. Sin embargo en células de rata (B y D) sólo afectan al fragmento mayor, aumentando ligeramente su actividad transcripcional (20%). En los demás fragmentos no hay cambios significativos.

El compuesto GW1929 (100 nM) (E y F), agonista selectivo de PPARγ, no modifica las actividades transcripcionales de las regiones promotoras de los genes SND1 y SNDp102, salvo en el fragmento SND/275 y SND/422 del promotor de rata, que aumentan 20 y 45% respectivamente (Figura 5.38).

Se estudia el efecto de la activación general de PPAR tratando las células con bezafibrato (100 μ M). En la Figura 5.38, G se muestra que la actividad luciferasa aumenta en todos los fragmentos (15-45%) del promotor de SND1, obteniéndose un perfil similar al registrado con la sobreexpresión de PPAR α o PPAR γ . Sin embargo, el tratamiento no afecta a la actividad transcripcional del promotor SNDp102 (H).

Cuando se tratan las células HepG2 con T0901317 (10 μ M), aumenta significativamente la actividad en todos los fragmentos de delección del promotor de humano (35-140%) (I), como ocurre cuando se sobreexpresan PPARs. En células de rata la actividad aumenta (43%) únicamente en el fragmento SND/422 (J).

La activación de las isoformas de PPAR por distintos tratamientos afecta al promotor del gen humano SND1 de forma similar, provocando un aumento de la actividad en casi todos los fragmentos, al igual que ocurre cuando se sobreexpresan ambas isoformas del factor de transcripción. El compuesto GW1929 es el único que no provoca cambios en SND1.

En el promotor del gen SNDp102 de rata, la activación de PPAR α , por WY-14643 y GW7647, provoca un aumento de la actividad transcripcional del fragmento mayor, mientras que la activación de PPAR γ por GW1929 provoca un aumento en los fragmento SND/422 y SND/275. El compuesto T0901317 provoca un aumento significativo de la actividad del fragmento SND/422 y el bezafibrato no afecta a la actividad transcripcional. Las respuestas desiguales en los diferentes fragmentos pueden ser debidas a las distintas afinidades de unión entre PPAR α y γ .

El fuerte aumento de la actividad transcripcional en los fragmentos del promotor SND1 provocado por el efector T0901317 puede ser debido al lugar de unión de LXR localizado en -545, aunque en los fragmentos menores, que no contienen LXR, se sugiere que puede haber activación por PPAR.

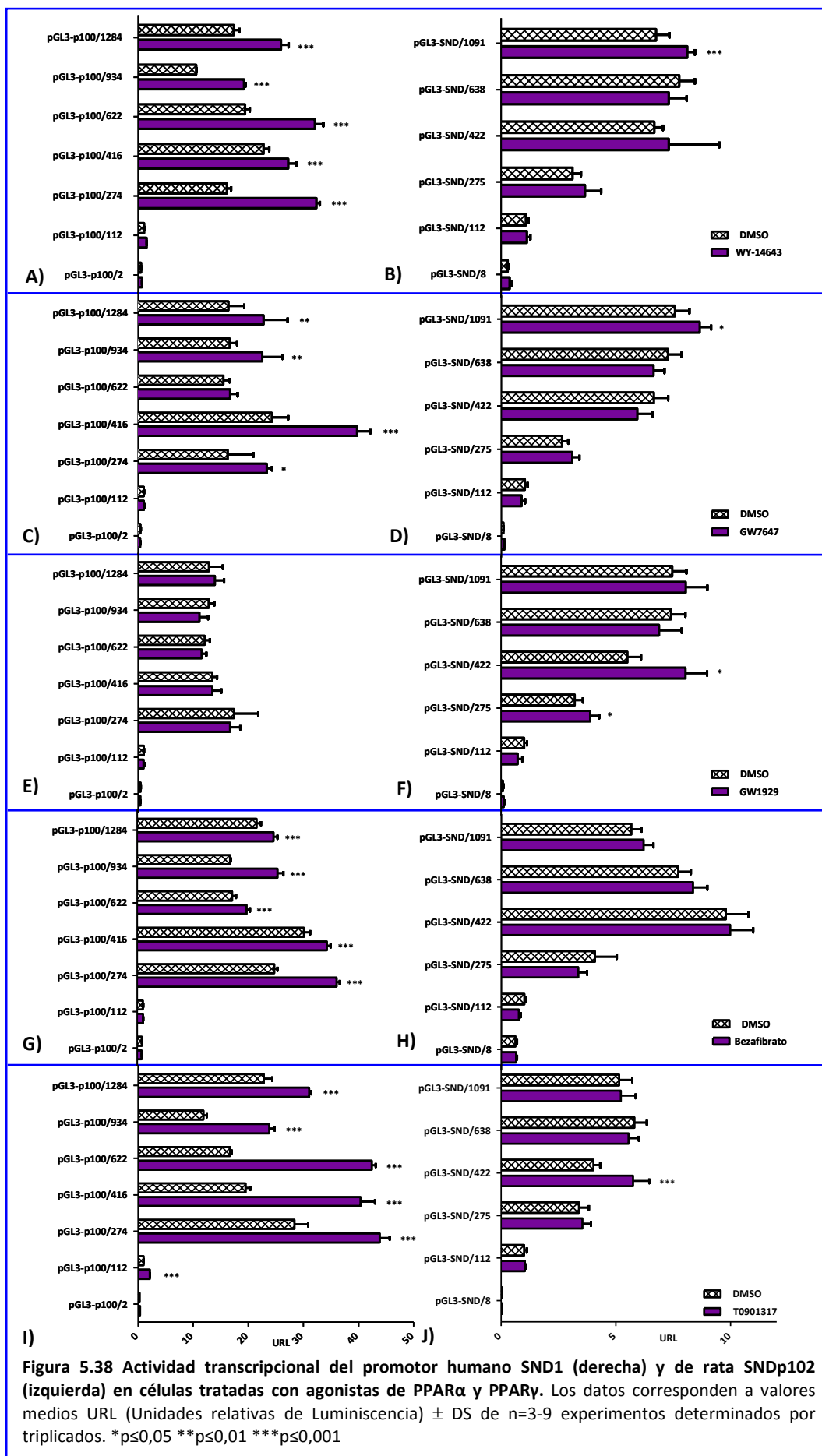


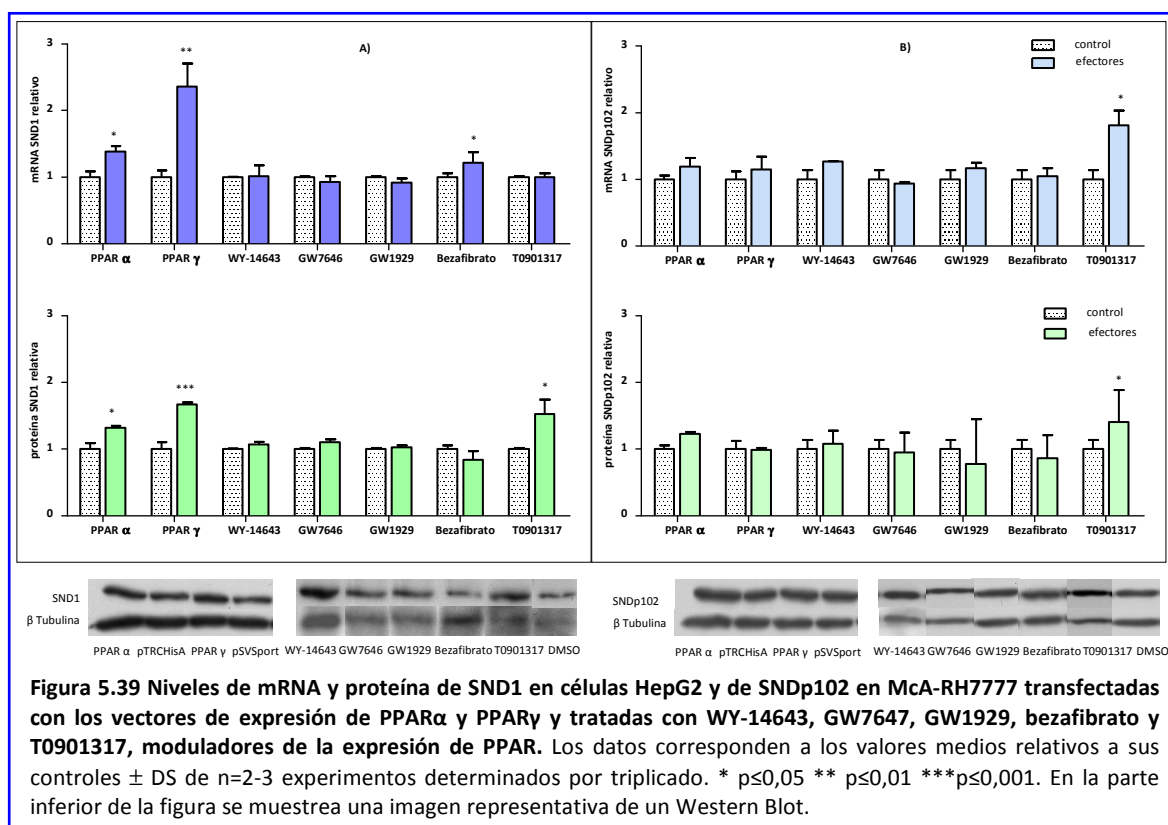
Figura 5.38 Actividad transcripcional del promotor humano SND1 (derecha) y de rata Sndp102 (izquierda) en células tratadas con agonistas de PPAR α y PPAR γ . Los datos corresponden a valores medios URL (Unidades relativas de Luminiscencia) \pm DS de n=3-9 experimentos determinados por triplicados. *p \leq 0,05 **p \leq 0,01 ***p \leq 0,001

5.7.2 NIVELES DE mRNA Y PROTEÍNA DE SND1 Y DE SNDp102

Se analizan los niveles de mRNA y de proteína de SND1 y SNDp102 en células que sobreexpresan PPAR y tratadas con efectores que los activan (Figura 5.39).

La sobreexpresión de cualquiera de las dos isoformas de PPAR mediante vectores de expresión produce un aumento de la actividad transcripcional de los fragmentos de SND1, que queda reflejado también en un aumento de mRNA y de proteína. Sin embargo, en el caso de SNDp102 no se modifican ni los niveles de mRNA ni de proteína.

Los distintos tratamientos con activadores de PPARs tienen diferentes efectos. El bezafibrato incrementa, levemente, los niveles de transcrito pero no modifica los niveles de proteína. El tratamiento con T0901317 provoca un aumento de proteína SND1. En cambio, en el promotor de rata, T0901317 no afecta a su actividad pero sí produce un incremento de los niveles de mRNA y de proteína SNDp102. Los demás efectores no modifican los niveles de mRNA ni proteína, ni en células de humano ni de rata.



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES

MÉTODOS

RESULTADOS

6. DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BILBIOGRAFIA

6 DISCUSIÓN

La proteína SND1, también denominada p100, Tudor-SN o SNDp102 en rata, participa en diferentes procesos biológicos y está implicada en varios eventos celulares. SND1 ha sido relacionada con la transcripción génica como coactivador, interaccionando con diferentes factores de transcripción como EBNA-2 (Tong et al., 1995), c-Myb (Dash et al., 1996), STAT6 (Valineva et al., 2005; Low et al., 2006; Valineva et al., 2006; Yang et al., 2007) y STAT5 (Paukku and Silvennoinen, 2004) también tiene un papel en el ensamblaje del espliceosoma, en la estabilidad del mRNA (Shaw et al., 2007; Yang et al., 2007) y forma parte del complejo RISC (Caudy et al., 2003).

Considerando las múltiples funciones conocidas de la proteína humana y de sus homólogos en distintas especies, nuestro grupo se ha centrado en el estudio de la regulación de la expresión de los genes SND1 humano y SNDp102 de rata mediante el análisis de sus promotores.

En lo que concierne a SND1 humano, se secuencian 3.808 pb correspondientes a su región promotora, que es remitida a la base de datos de GenBank y recibe el número de acceso EF690304. Esta secuencia se sitúa en el cromosoma 7 de humano, inmediatamente corriente arriba del extremo 5' del cDNA descrito de SND1 (GenBank NM_014390) y se le asigna el inicio de transcripción a 227 pb corriente arriba del inicio de traducción. De manera similar, nuestro grupo había aislado previamente una secuencia de 1.688 pb correspondiente al promotor del gen SNDp102 de rata (GenBank AY957585), describiendo su inicio de transcripción a 216 pb corriente arriba del inicio de traducción (Rodríguez et al., 2006).

Generalmente, la regulación transcripcional eucariota está mediada por la unión de múltiples factores de transcripción a los promotores de los genes, lo que posibilita la integración de varias vías de señalización en el núcleo celular. Una cuestión fundamental en los estudios sobre la expresión génica es poder determinar qué secuencias de DNA del promotor contienen los elementos donde se unen factores transcripcionales y poder averiguar su relevancia biológica.

Dado el elevado número de potenciales lugares de unión a factores de transcripción que predicen los programas bioinformáticos, diferenciamos en nuestro estudio entre lugares de unión necesarios para el inicio de la transcripción y los que controlan el grado de activación y son responsables de la transcripción regulada; estos elementos se localizan en el promotor basal o proximal respectivamente, aunque en muchas ocasiones resulta complicado delimitar claramente estas secuencias.

Un paso fundamental en el inicio de la transcripción es la interacción de la maquinaria responsable de la transcripción basal con los elementos diana en el área del promotor cercana al inicio de la transcripción (Butler and Kadonaga, 2002; Lewis and Reinberg, 2003; Smale and

Kadonaga, 2003), los más comunes son la caja TATA (Singer et al., 1990), el BRE (Lagrange et al., 1998; Littlefield et al., 1999), la secuencia Inr (Smale and Baltimore, 1989) y el DPE (Kutach and Kadonaga, 2000; Butler and Kadonaga, 2001; Kadonaga, 2002). Los promotores pueden contener uno o más de estos elementos, aunque no hay ninguno que sea absolutamente esencial para la funcionalidad del promotor (Hahn, 2004). De hecho, se han descrito otros modos de formar el complejo de inicio de la transcripción, según los cuales TFIID actúa en cooperación con elementos del promotor basal o con factores de transcripción específicos como Sp1, YY1, NF-Y o CBF (Aso et al., 1994; Roeder, 1996). El análisis bioinformático del promotor del gen SND1 humano, al igual que el promotor SNDp102 (Rodríguez et al., 2006), muestra que carece de caja TATA, BRE, Inr o DPE. En los promotores génicos sin caja TATA, los elementos como las cajas GC de unión a Sp1, y las cajas CCAAT de unión a NF-Y, adquieren especial importancia en la etapa iniciadora de la transcripción, ya que contribuyen al mantenimiento del estado hipometilado del DNA y son capaces de estimular y reclutar factores de transcripción generales que permiten a la RNA polimerasa II encontrar el lugar para la iniciación de la transcripción (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994; Weiss et al., 1996; Wierstra, 2008). La región promotora del gen SND1 humano contiene una isla CpG situada en (-881,+316), que coincide con la que se localizó en el promotor de rata (Rodríguez et al., 2006), donde se identifican múltiples cajas GC además de cajas CCAAT. Este tipo de secuencias se han encontrado en aproximadamente la mitad de los promotores de mamíferos, lo que sugiere que juegan un papel fundamental en la transcripción (Antequera and Bird, 1993; Suzuki et al., 2001). Además, en la mayoría de promotores sin caja TATA, las islas CpG son las únicas estructuras identificables del promotor basal (Butler and Kadonaga, 2002). Se ha descrito que las cajas CCAAT reconocidas por el factor de transcripción NF-Y aparecen con orientación inversa, ATTGG, y distribuidas en posiciones específicas dentro de la región (-40,-80) de la mayoría de los promotores sin caja TATA (Mantovani, 1998). El promotor de SND1 se ajusta a estas características y presenta dos cajas CCAAT en los sitios -61 y -28 con orientación inversa. Cuando comparamos las secuencias de los promotores de SND1 humano y SNDp102 de rata y otras secuencias génicas de diferentes especies incluidas en las bases de datos, se observa la conservación de las dos cajas CCAAT y un alto grado de homología (80-85%) en las primeras 300 pb cercanas al inicio de transcripción, que contienen además la mayoría de las cajas CG, lo que sugiere que esta zona puede conservar lugares de unión estratégicos para la expresión de esta familia de genes.

Los ensayos con el gen indicador luciferasa muestran que la secuencia entre -112 y +2 es suficiente para que se produzca la transcripción basal del gen SND1 en células de hepatoma humano. Esta estructura mínima del promotor cuenta con cuatro lugares de unión a Sp1, dos cajas CCAAT inversas y un elemento de unión a SREBP. La actividad transcripcional máxima se

alcanza en el fragmento que se extiende hasta el nucleótido -274, que supone la incorporación de dos nuevos lugares de unión a Sp1, un elemento de unión a SREBP y un elemento de unión a PPAR. Los fragmentos de delección del promotor de SND1 que se extienden hasta la posición -1284 mantienen la actividad máxima transcripcional alcanzada por el fragmento 274.

Aunque no se puede asegurar que se incluyan todos los elementos responsables de la regulación transcripcional del gen SND1 en la región promotora aislada, ya que se han descrito genes en cuya regulación participan elementos reguladores situados a varias kilobases del origen de transcripción (Blackwood and Kadonaga, 1998; Bulger and Groudine, 1999), consideramos que abarca una región suficientemente amplia para regular la actividad transcripcional y controlar la expresión del gen.

Los ensayos EMSA revelan la unión directa de NF-Y a las cajas CCAAT -61 y -28, y de Sp1 a los lugares de unión -400, -308, -298, -290/285/277, -252, -168, -89, -48 y -26/19 del promotor de SND1 humano. No se descarta que en las regiones GC localizadas participen otros miembros de la familia de Sp, como Sp3, que pueden reconocer los mismos elementos de unión que Sp1 y regular coordinadamente la velocidad de transcripción (Hagen et al., 1992). Resultados similares se habían obtenido en estudios previos con el promotor de SNDp102 de rata en los cuales se demostró la unión de Sp1 y NF-Y a elementos de unión homólogos a los de humano (Rodríguez et al., 2006; Rodríguez et al., 2007).

En línea con los resultados obtenidos mediante EMSA, los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) de células humanas y de rata y la mutagénesis dirigida corroboran la funcionalidad *in vivo* de los lugares de unión de Sp1 y NF-Y en las zonas proximales (-200,+1) de ambos promotores. La única excepción es el elemento -154, del promotor de rata que presenta capacidad de unir NF-Y *in vitro*, pero no parece tener función endógena ya que no mostró resultado positivo en el ChIP en las condiciones estudiadas.

La mutagénesis dirigida a los sitios de unión de Sp1-48, -89, -168 y NF-Y -61 y -28 del promotor SND1 provoca un marcado descenso (70%) de la actividad transcripcional basal del fragmento 112 y de la actividad máxima (30-45%) del fragmento 416, lo que indica que tiene un papel clave en la transcripción basal. La localización de los sitios de unión de Sp1 y NF-Y cerca del origen de transcripción sugiere que interactúan con la maquinaria de transcripción basal, pudiendo generar el complejo de preiniciación (Smale and Kadonaga, 2003). Se ha demostrado que, en algunos promotores, Sp1 y NF-Y interactúan físicamente y cooperan entre sí para inducir la actividad transcripcional; sin embargo, en el promotor de SND1 humano parece que Sp1 y NF-Y actúan independientemente en la regulación transcripcional del promotor. A diferencia de lo que ocurre en el promotor humano, las mutaciones en el promotor de rata de los sitios homólogos Sp1 provocan un efecto inhibitorio más débil. Si a estos resultados añadimos que la

actividad promotora máxima en rata se alcanza en un fragmento mayor que en humano (Kadonaga, 2004), podemos considerar la existencia de aspectos diferenciales en la regulación de cada promotor con la participación de otros factores de transcripción adicionales, aún sin caracterizar.

Está descrito que Sp1 puede estimular la transcripción al conectar cajas GC próximas y distantes al origen de transcripción mediante la formación de dímeros o tetrámeros de Sp1 (Rodríguez et al., 2007). Por ello, no se descarta la implicación de los lugares de unión de Sp1 más alejados del inicio de transcripción en la regulación transcripcional de SND1 y de SNDp102.

Teniendo en cuenta los trabajos anteriores que relacionan a las proteínas SND1 y SNDp102 con el metabolismo de lípidos, se analiza la participación de elementos reguladores en la transcripción de ambos genes, centrando nuestra atención en los lugares de unión a los factores de transcripción SREBP y PPAR, sensibles a los niveles intracelulares de colesterol y ácidos grasos.

La sobreexpresión de SREBP-1c reduce la actividad transcripcional de los promotores entre un 40% y un 60%. Esto sugiere que las secuencias SRE y E-box localizadas en la región proximal de los promotores están implicadas en la regulación transcripcional mediante SREBPs. La reducción de la actividad de ambos promotores no conlleva cambios significativos en la cantidad de mRNA ni de proteína en las células transfectadas bajo las condiciones experimentales utilizadas.

El tratamiento de las células con simvastatina es utilizado con frecuencia para activar el SREBP endógeno. Sorprendentemente, y al contrario del efecto de la sobreexpresión de SREBP-1c, la actividad de los promotores de los genes SND1 y SNDp102 aumenta marcadamente (120-140%) en respuesta al tratamiento con simvastatina. La simvastatina, reduce la colesterogénesis hepática al ser un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y conduce a una activación de SREBP, mayoritariamente de la isoforma 2, implicada en la regulación de genes relacionados con el metabolismo de colesterol. El efecto activador de la simvastatina sobre el promotor se refleja, en este caso, en una mayor cantidad del mRNA de SND1 y SNDp102, aunque sólo se observa aumento de la proteína SNDp102 en las células de rata.

Por otro lado, el tratamiento con mevalonolactona, del que se espera una inhibición del SREBP nuclear endógeno por incremento de la biosíntesis de colesterol, no provoca ningún cambio significativo en la actividad transcripcional, ni en la cantidad de mRNA ni de proteína en ambos tipos celulares.

Habitualmente, la activación de los SREBPs conduce a una estimulación de la transcripción de sus genes diana. No obstante, se han descrito algunas excepciones, como la inhibición mediante las isoformas SREBP-1 y SREBP-2 de los genes MTP (*Microsomal triglyceride transfer protein*) (Sato 1999) y LRP-1 (*Low density lipoproteína receptor-related protein*) (Mastrangelo et al., 1991; Hua et al., 1993; Matsushita et al., 1998) o el bloqueo de la actividad del promotor del

gen PEPCK-C por SREBP-1c (Costales et al., 2010). También se ha demostrado que SREBP-1 y -2 pueden producir efectos de signo contrario en el promotor de la esterol 12 α -hidroxilasa, cuya transcripción es activada por SREBP-1 e inhibida por SREBP-2 (Chakravarty et al., 2001). Dentro de este último grupo se podrían incluir los genes de nuestro estudio de acuerdo a los resultados obtenidos.

Para determinar si existen diferencias en la unión *in vivo* de las isoformas SREBP-1 y SREBP-2 a los genes SND1 y SNDp102, se inmunoprecipita la cromatina de células humanas y de rata y se comprueba que SREBP-1 y SREBP-2 se unen a la región proximal de ambos promotores. SREBP-1 se une exclusivamente al lugar SRE-60 en SND1 y a los elementos del promotor de rata SRE-242, -226 y -162. Por otro lado, SREBP-2 se une a las mismas regiones que SREBP-1 en ambos promotores, además de al elemento E-box-228 en SND1.

Los resultados de los ensayos EMSA no permiten identificar de manera clara la unión de ninguna de las isoformas de SREBP a los lugares de unión proximales. Únicamente se observa un *supershift* con anti-SREBP-2 en el lugar SRE-958 del promotor de rata. Hay que considerar que la secuencia del elemento de respuesta SRE funcional puede variar enormemente entre unos genes y otros, lo que dificulta la asignación de la secuencia consenso y podría suceder la unión en otras regiones del promotor que no hemos ensayado. Con esta consideración, nuestros resultados podrían explicar el efecto de los SREBPs sobre la actividad de los promotores SND1 y SNDp102 mediante una unión indirecta de SREBP y la interacción con otro u otros factores de transcripción. Dado que la unión de SREBP-1 y SREBP-2 tiene lugar en la misma región de unión de los factores de transcripción Sp1 y NF-Y, se sugiere su participación en un mecanismo coordinado para la regulación de ambos promotores.

Se han descrito numerosos casos en los que la presencia de los factores de transcripción Sp1 y NF-Y son requeridos para que SREBP pueda ejercer el efecto transcripcional óptimo. Estudios *in vitro* han demostrado que la unión de NF-Y al DNA puede estar asociada con un lugar SRE adyacente, presuntamente como resultado de una interacción directa entre ambas proteínas (Castillo-Olivares and Gil, 2002). Estudios con el promotor del receptor de LDL demostraron que Sp1 interacciona con SREBP para formar un complejo más estable y activar la transcripción (Ericsson et al., 1996; Edwards et al., 2000); aunque también se ha observado que hay casos donde Sp1 puede impedir la unión de SREBP como en el promotor de PEPCK-C (Sanchez et al., 1995; Chakravarty et al., 2005). En el caso del promotor SND1 humano, existen lugares de unión a Sp1 y a NF-Y que se encuentran cercanos al SRE-60. Para conocer la posible interacción entre ellos, determinamos el efecto de la sobreexpresión de SREBP-1c sobre la actividad transcripcional de los fragmentos 112 y 416 cuando se mutan los lugares de unión de Sp1-89, -48 y de NF-Y-61 y -28. El efecto inhibitorio de SREBP-1c sobre la actividad promotora se atenúa con la mutación de los

lugares de unión Sp1-89 y -48. La mutación de NF-Y-61 produce un aumento de la actividad transcripcional en el fragmento 112 y una recuperación del estado basal en el fragmento 416 del promotor de SND1, posiblemente debido a la presencia de otros elementos reguladores. La atenuación en el efecto de SREBP-1c al mutar los elementos de unión de Sp1 y NF-Y indica que estos factores de transcripción podrían cooperar en la unión al SRE del promotor SND1. La posición relativa de los elementos de unión de NF-Y y SRE es crítica para su cooperación (Chakravarty et al., 2005), y se ha descrito que deben distar entre 10-20 pb y cualquier cambio puede alterar su actividad, incluso presentar efectos negativos en la transcripción (Ericsson et al., 1996; Inoue et al., 1998). Este hecho podría explicar el efecto inhibitorio de SREBP-1c sobre los promotores de SND1 y SNDp102, ya que en ambos casos, los lugares de unión a SREBP y a NF-Y no guardan la distancia descrita, de hecho, en SND1, SRE-60 contiene la secuencia de unión para NF-Y-61 superpuesta en la hebra complementaria.

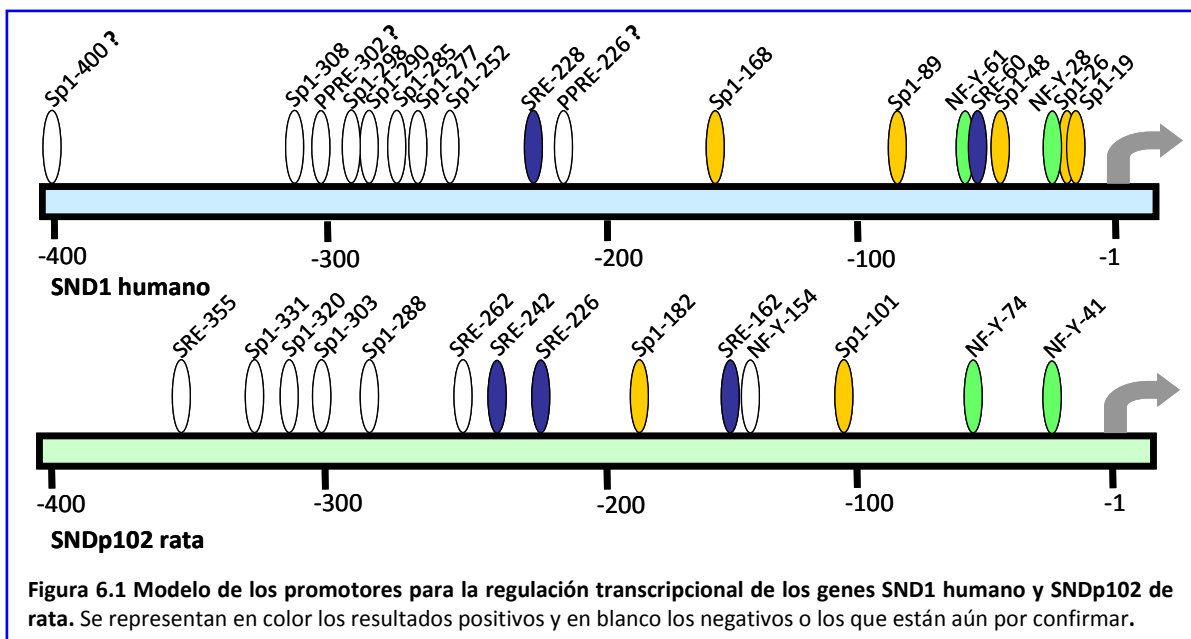
El efecto regulador de signo opuesto de SREBP-1c y SREBP-2 sobre la transcripción de SND1 y SNDp102 podría ser secundario a la disponibilidad de colesterol, ácidos grasos o incluso glucosa en la célula, aunque dilucidar sobre este punto requiere trabajos adicionales.

Por otro lado, los promotores de SND1 y SNDp102 han sido analizados como dianas del factor de transcripción PPAR. La sobreexpresión de PPAR α y PPAR γ provoca activaciones (20-60%) en ambos promotores, sugiriendo que el lugar de unión más cercano al origen de transcripción es el principal responsable de dicha activación. La activación de la transcripción inducida por PPAR se refleja en incrementos en la cantidad de mRNA y proteína de SND1 en humano, pero no se detectan cambios en el caso de rata.

El uso de ligandos sintéticos que activan a estos receptores nucleares con mayor o menor especificidad por cada isoforma, mostró una fuerte respuesta positiva (WY-14643, GW7647, bezafibrato y T0901317) en el caso de SND1 en células HepG2. Sin embargo, las células de rata responden de manera diferente frente a la activación de PPARs y no se observaron cambios de la actividad del promotor en ningún caso. Los efectos de los ligandos sobre los niveles de mRNA y proteína fueron muy diversos. Así, en el caso de SND1 humano, sólo bezafibrato provoca un aumento en el nivel de mRNA y T0901317 en la proteína. Inesperadamente, T0901317 produce un aumento de la cantidad tanto de mRNA como de proteína SNDp102, que no se corresponde con la falta de respuesta de su actividad transcripcional. Los resultados tan distintos, y a veces divergentes, de los efectos sobre la actividad transcripcional y sobre los niveles de mRNA y proteína en ambos genes, pueden ser debidos a cambios postranscripcionales o postraduccionales (Mantovani, 1998; Mantovani, 1999).

En un principio, se pensó que SNDp102 y SND1 eran genes de expresión constitutiva, incluso contienen algunas características comunes a este tipo de genes, como la ausencia de caja TATA y la presencia de múltiples cajas GC en sus secuencias promotoras. Considerando los resultados de este trabajo, se podría asignar un papel en el metabolismo de lípidos tanto a SND1 como a SNDp102 a través de una transcripción regulada mediado por de SREBP y PPAR, aunque se requiere continuar con las investigaciones para poder detallar los mecanismos de regulación utilizados por cada gen y especificar qué factor de transcripción, o isoforma en su caso, participa en cada mecanismo.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, proponemos un modelo de promotor para cada uno de los genes estudiados (Figura 6.1). Se ha determinado que tanto las cajas CCAAT, las cajas GC, los motivos SRE y posiblemente los PPRE son elementos funcionales de los promotores de los genes SND1 y SNDp102. Muchos de esos elementos están conservados en los dos promotores, aunque también se han identificado algunos lugares de unión específicos de promotor en cada especie, lo que podría explicar diferencias en las actividades transcripcionales e incluso en la expresión y traducción de SND1 y SNDp102 en humano y en rata.



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES

MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

7. CONCLUSIONES

BILBIOGRAFIA

7 CONCLUSIONES

- 1- Hemos aislado una región de 3.808 pares de bases correspondiente a la región promotora del gen humano SND1. El promotor de SND1 carece de caja TATA y presenta una isla CpG en la región (-881,+316).
- 2- La mínima actividad promotora se encuentra en la región (-112,+221) y la máxima actividad transcripcional a partir de la región (-274,+221).
- 3- La unión de Sp1 y NF-Y a las cajas GC y cajas CCAAT invertidas, es necesaria para la regulación específica de la transcripción de los genes SND1 y SNDp102.
- 4- La sobreexpresión de SREBP-1c inhibe la actividad transcripcional de los promotores de los genes SND1 y SNDp102. A pesar de que en los ensayos EMSA no se observa unión de SREBP con las sondas diseñadas de los promotores, los ensayos CHIP confirman la unión de SREBP-1 y -2 en las regiones que contienen lugares de unión SRE/Ebox de los promotores de humano y rata.
- 5- Los ensayos de mutagénesis indican la cooperación de los lugares de unión de Sp1 y NF-Y con el lugar de unión SRE-60 en la región proximal del promotor humano SND1.
- 6- La sobreexpresión de PPAR α y PPAR γ estimula la actividad transcripcional de los promotores SND1 y SNDp102. Además, el tratamiento con agonistas sintéticos de PPAR también causa un incremento en la actividad transcripcional en el promotor humano, aunque no en el de rata.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES

MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFIA

8 BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, N., Lieber, M.R., 2002. Bidirectional gene organization: A common architectural feature of the human genome. *Cell*. 109(7), 807-809.
- Alsford, S., Kemp, L.E., Kawahara, T., Horn, D., 2010. RNA interference, growth and differentiation appear normal in African trypanosomes lacking Tudor staphylococcal nuclease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 174(1), 70-73.
- Antequera, F., Bird, A., 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(24), 11995-11999.
- Aso, T., Conaway, J.W., Conaway, R.C., 1994. Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. *J. Biol. Chem.* 269(42), 26575-26583.
- Aufiero, B., Neufeld, E.J., Orkin, S.H., 1994. Sequence-specific DNA binding of individual cut repeats of the human CCAAT displacement/cut homeodomain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(16), 7757-7761.
- Baumann, M., Pontiller, J., Ernst, W., 2010. Structure and basal transcription complex of RNA Polymerase II core promoters in the mammalian genome: An overview. *Mol. Biotechnol.* 45(3), 241-247.
- Beck, F., Plummer, S., Senior, P.V., Byrne, S., Green, S., Brammar, W.J., 1992. The ontogeny of peroxisome-proliferator-activated receptor gene expression in the mouse and rat. *Proc. Biol Sci.* 247(1319), 83-87.
- Bellorini, M., Lee, D.K., Dantonel, J.C., Zemzoumi, K., Roeder, R.G., Tora, L., Mantovani, R., 1997. CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Res.* 25(11), 2174-2181.
- Bennett, M.K., Osborne, T.F., 2000. Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(12), 6340-6344.
- Bennett, M.K., Lopez, J.M., Sanchez, H.B., Osborne, T.F., 1995. Sterol Regulation of Fatty Acid Synthase Promoter. *J. Biol. Chem.* 270(43), 25578-25583.
- Bernecky, C., Grob, P., Ebmeier, C.C., Nogales, E., Taatjes, D.J., 2011. Molecular architecture of the human Mediator-RNA polymerase II-TFIIF assembly. *PLoS Biol.* 9(3), e1000603.
- Bird, A.P., 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 321(6067), 209-213.
- Bist, A., Fielding, P.E., Fielding, C.J., 1997. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(20), 10693-10698.

- Blackwood, E.M., Kadonaga, J.T., 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*. 281(5373), 60-63.
- Blanco, M.A., Aleckovic, M., Hua, Y., Li, T., Wei, Y., Xu, Z., Cristea, I.M., Kang, Y., 2011. Identification of staphylococcal nuclease domain-containing 1 (SND1) as a Metadherin-interacting protein with metastasis-promoting functions. *J. Biol. Chem.* 286(1083-351; 22), 19982-19992.
- Bolognese, F., Wasner, M., Dohna, C.L., Gurtner, A., Ronchi, A., Muller, H., Manni, I., Mossner, J., Piaggio, G., Mantovani, R., Engeland, K., 1999. The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated. *Oncogene*. 18(10), 1845-1853.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., Wahli, W., 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 137(1), 354-366.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., Cedar, H., 1994. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. 371(6496), 435-438.
- Brito, G.C., Fachel, A.A., Vettore, A.L., Vignal, G.M., Gimba, E.R., Campos, F.S., Barcinski, M.A., Verjovski-Almeida, S., Reis, E.M., 2008. Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma. *Mol. Carcinog.* 47(10), 757-767.
- Broadhurst, M.K., Lee, R.S., Hawkins, S., Wheeler, T.T., 2005. The p100 EBNA-2 coactivator: a highly conserved protein found in a range of exocrine and endocrine cells and tissues in cattle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1681(2-3), 126-133.
- Broadhurst, M.K., Wheeler, T.T., 2001. The p100 coactivator is present in the nuclei of mammary epithelial cells and its abundance is increased in response to prolactin in culture and in mammary tissue during lactation. *J. Endocrinol.* 171(2), 329-337.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 89(3), 331-340.
- Bulger, M., 2005. Hyperacetylated chromatin domains: lessons from heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 280(23), 21689-21692.
- Bulger, M., Groudine, M., 1999. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.* 13(19), 2465-2477.
- Butler, J.E., Kadonaga, J.T., 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16(20), 2583-2592.

- Butler, J.E.F., Kadonaga, J.T., 2001. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes and Development*. 15(19), 2515-2519.
- Callebaut, I., Mornon, J.P., 1997. The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *Biochem. J.* 321 (Pt 1), 125-132.
- Cao, S., Kumimoto, R.W., Siriwardana, C.L., Risinger, J.R., Holt III, B.F., 2011. Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE*. 6(6).
- Castillo-Olivares, A.D., Gil, G., 2002. Differential effects of sterol regulatory binding proteins 1 and 2 on sterol 12 α -hydroxylase. SREBP-2 suppresses the sterol 12 α -hydroxylase promoter. *J. Biol. Chem.* 277(8), 6750-6757.
- Caudy, A.A., Ketting, R.F., Hammond, S.M., Denli, A.M., Bathoorn, A.M., Tops, B.B., Silva, J.M., Myers, M.M., Hannon, G.J., Plasterk, R.H., 2003. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*. 425(6956), 411-414.
- Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., Hanson, R.W., 2005. Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40(3), 129-154.
- Chakravarty, K., Leahy, P., Becard, D., Hakimi, P., Foretz, M., Ferre, P., Fougère, F., Hanson, R.W., 2001. Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Mimics the Negative Effect of Insulin on Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* 276(37), 34816-34823.
- Chalkley, G.E., Verrijzer, C.P., 1999. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 18(17), 4835-4845.
- Chen, J.D., Evans, R.M., 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 377(6548), 454-457.
- Cheriyath, V., Novina, C.D., Roy, A.L., 1998. TFIID regulates β promoter activity through an initiator element. *Mol. Cell. Biol.* 18(8), 4444-4454.
- Chinetti, G., Fruchart, J.C., Staels, B., 2006. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol trafficking by PPAR α and LXR. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1128-1131.
- Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.C., Chapman, J., Najib, J., Staels, B., 1998. Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* 273(40), 25573-25580.
- Chiose, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Luo, J., Mantha, G., Sobol, R.W., Dacic, S., 2007. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 67(5), 2345-2350.

- Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1(2), 581-585.
- Costales, P., Aledo, R., Véria, S., Das, A., Shah, V.H., Casado, M., Badimon, L., Llorente-Cortés, V., 2010. Selective role of sterol regulatory element binding protein isoforms in aggregated LDL-induced vascular low density lipoprotein receptor-related protein-1 expression. *Atherosclerosis.* 213(2), 458-468.
- Cristobal, S., Ochoa, B., Fresnedo, O., 1999. Purification and properties of a cholesteryl ester hydrolase from rat liver microsomes. *J. Lipid Res.* 40(4), 715-725.
- Dash, A.B., Orrico, F.C., Ness, S.A., 1996. The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev.* 10(15), 1858-1869.
- Deng, W., Roberts, S.G.E., 2005. A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes and Development.* 19(20), 2418-2423.
- Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20(0163-769; 0163-769; 5), 649-688.
- Diep, Q.N., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2000. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension.* 36(0194-911; 5), 851-855.
- DiRenzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliastro, M.H., Ricote, M., Ingre, S., Horlein, A., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol. Cell. Biol.* 17(4), 2166-2176.
- Edwards, P.A., Tabor, D., Kast, H.R., Venkateswaran, A., 2000. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1529(1-3), 103-113.
- Ericsson, J., Jackson, S.M., Edwards, P.A., 1996. Synergistic Binding of Sterol Regulatory Element-binding Protein and NF- κ B to the Farnesyl Diphosphate Synthase Promoter Is Critical for Sterol-regulated Expression of the Gene. *J. Biol. Chem.* 271(40), 24359-24364.
- Ericsson, J., Jackson, S.M., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., Edwards, P.A., 1997. Identification of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase as an Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1- and Sterol Regulatory Element-binding Protein-responsive Gene. *J. Biol. Chem.* 272(11), 7298-7305.
- Fresnedo, O., De Heredia, M.L., Martinez, M.J., Cristobal, S., Rejas, M.T., Cuezva, J.M., Ochoa, B., 2001. Immunolocalization of a novel cholesteryl ester hydrolase in the endoplasmic reticulum of murine and human hepatocytes. *Hepatology.* 33(3), 662-667.

- Gao, X., Ge, L., Shao, J., Su, C., Zhao, H., Saarikettu, J., Yao, X., Yao, Z., Silvennoinen, O., Yang, J., 2010. Tudor-SN interacts with and co-localizes with G3BP in stress granules under stress conditions. *FEBS Lett.* 584(16), 3525-3532.
- Garcia-Arcos, I., Rueda, Y., Gonzalez-Kother, P., Palacios, L., Ochoa, B., Fresnedo, O., 2010. Association of SND1 protein to low density lipid droplets in liver steatosis. *J. Physiol. Biochem.* 66(1), 73-83.
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196(2), 261-282.
- Gbaguidi, G.F., Agellon, L.B., 2002. The atypical interaction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha with liver X receptor alpha antagonizes the stimulatory effect of their respective ligands on the murine cholesterol 7alpha-hydroxylase gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta.* 1583(2), 229-236.
- Gearing, K.L., Crickmore, A., Gustafsson, J.A., 1994. Structure of the mouse peroxisome proliferator activated receptor alpha gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199(0006-291; 0006-291; 1), 255-263.
- Gelman, L., Fruchart, J.C., Auwerx, J., 1999. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol. Life Sci.* 55(1420-682; 1420-682; 6-7), 932-943.
- Ghosh, S., Grogan, W.M., 1992. Immunological characterization of neutral cholesteryl ester hydrolase from rat liver cytosol. *Biochem. Cell Biol.* 70(9), 800-803.
- Guan, G., Jiang, G., Koch, R.L., Shechter, I., 1995. Molecular cloning and functional analysis of the promoter of the human squalene synthase gene. *J. Biol. Chem.* 270(37), 21958-21965.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., Suske, G., 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: A family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 20(21), 5519-5525.
- Hahn, S., 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol.* 11(5), 394-403.
- Heinlein, C.A., Ting, H.J., Yeh, S., Chang, C., 1999. Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 274(23), 16147-16152.
- Heinzel, T., Johnson, A.T., Wharam, D.A., Kotthaus, J.P., Bohm, G., Klein, W., Trankle, G., Weimann, G., 1995. Coulomb-blockade oscillations in a quantum dot strongly coupled to leads. *Phys. Rev. B Condens. Matter.* 52(23), 16638-16645.
- Ho, J., Kong, J.W., Choong, L.Y., Loh, M.C., Toy, W., Chong, P.K., Wong, C.H., Wong, C.Y., Shah, N., Lim, Y.P., 2009. Novel breast cancer metastasis-associated proteins. *J. Proteome Res.* 8(2), 583-594.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., ., 1995. Ligand-independent repression by the thyroid

- hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377(6548), 397-404.
- Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., Shimano, H., 1998. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* 101(11), 2331-2339.
- Hossain, M.J., Korde, R., Singh, P.K., Kanodia, S., Ranjan, R., Ram, G., Kalsey, G.S., Singh, R., Malhotra, P., 2010. Plasmodium falciparum Tudor Staphylococcal Nuclease interacting proteins suggest its role in nuclear as well as splicing processes. *Gene*. 468(1-2), 48-57.
- Hsu, M.H., Palmer, C.N., Song, W., Griffin, K.J., Johnson, E.F., 1998. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J. Biol. Chem.* 273(43), 27988-27997.
- Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1995. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J. Biol. Chem.* 270(49), 29422-29427.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Wang, X., 1993. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(24), 11603-11607.
- Ide, T., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., memiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yatoh, S., Iizuka, Y., Tomita, S., Ohashi, K., Takahashi, A., Sone, H., Gotoda, T., Osuga, J., Ishibashi, S., Yamada, N., 2003. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol. Endocrinol.* 17(7), 1255-1267.
- Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W., Desvergne, B., 1997. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J. Biol. Chem.* 272(32), 20108-20117.
- Inoue, J., Sato, R., Maeda, M., 1998. Multiple DNA elements for sterol regulatory element-binding protein and NF-Y are responsible for sterol-regulated transcription of the genes for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and squalene synthase. *J Biochem.* 123(0021-924; 0021-924; 6), 1191-1198.
- Ishimoto, K., Tachibana, K., Hanano, I., Yamasaki, D., Nakamura, H., Kawai, M., Urano, Y., Tanaka, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., Doi, T., 2010. Sterol-regulatory-element-binding protein 2 and nuclear factor Y control human farnesyl diphosphate synthase expression and affect cell proliferation in hepatoblastoma cells. *Biochem. J.* 429(2), 347-357.
- Ito, Y., Zhang, Y., Dangaria, S., Luan, X., Diekwisch, T.G.H., 2011. NF-Y and USF1 transcription factor binding to CCAAT-box and E-box elements activates the CP27 promoter. *Gene*. 473(2), 92-99.

- Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B., Smale, S.T., 1994. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14(1), 116-127.
- Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A.G., Wahli, W., Meier, C.A., Desvergne, B., 1997. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* 272(40), 25252-25259.
- Kadonaga, J.T., 2002. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp. Mol. Med.* 34(4), 259-264.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., Tjian, R., 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 51(6), 1079-1090.
- Kahn, B.B., McGraw, T.E., 2010. Rosiglitazone, PPARgamma, and type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 363(27), 2667-2669.
- Keenan, T.W., Winter, S., Rackwitz, H.R., Heid, H.W., 2000. Nuclear coactivator protein p100 is present in endoplasmic reticulum and lipid droplets of milk secreting cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523(1), 84-90.
- Kelleher, R.J., III, Flanagan, P.M., Kornberg, R.D., 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell.* 61(7), 1209-1215.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103(11), 1489-1498.
- Kim, H.J., Ko, M.S., Kim, H.K., Cho, W.J., Lee, S.H., Lee, B.J., Park, J.W., 2011. Transcription factor Sp1 regulates basal transcription of the human DRG2 gene. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms.* 1809(3), 184-190.
- Kim, J.B., Spotts, G.D., Halvorsen, Y.D., Shih, H.M., Ellenberger, T., Towle, H.C., Spiegelman, B.M., 1995. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol. Cell. Biol.* 15(5), 2582-2588.
- Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., Kornberg, R.D., 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell.* 77(4), 599-608.
- Kliewer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M., 1992. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature.* 355(6359), 446-449.
- Kota, B.P., Huang, T.H.-., Roufogalis, B.D., 2005. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research.* 51(2), 85-94.
- Kuruma, H., Kamata, Y., Takahashi, H., Igarashi, K., Kimura, T., Miki, K., Miki, J., Sasaki, H., Hayashi, N., Egawa, S., 2009. Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 as a potential tissue marker for prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 174(6), 2044-2050.

- Kutach, A.K., Kadonaga, J.T., 2000. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol. Cell. Biol.* 20(13), 4754-4764.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., Ebright, R.H., 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12(1), 34-44.
- Lemberger, T., Desvergne, B., Wahli, W., 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 335-363.
- Lerner, L.E., Peng, G.-., Gribanova, Y.E., Chen, S., Farber, D.B., 2005. Sp4 is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with Crx. *J. Biol. Chem.* 280(21), 20642-20650.
- Letovsky, J., Dynan, W.S., 1989. Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res.* 17(7), 2639-2653.
- Levenson, J.D., Koskinen, P.J., Orrico, F.C., Rainio, E.M., Jalkanen, K.J., Dash, A.B., Eisenman, R.N., Ness, S.A., 1998. Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol. Cell.* 2(4), 417-425.
- Lewis, B.A., Reinberg, D., 2003. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J. Cell. Sci.* 116, 3667-3675.
- Li, C.L., Yang, W.Z., Chen, Y.P., Yuan, H.S., 2008. Structural and functional insights into human Tudor-SN, a key component linking RNA interference and editing. *Nucleic Acids Res.* 36(11), 3579-3589.
- Li, L., Davie, J.R., 2008. Association of Sp3 and estrogen receptor alpha with the transcriptionally active trefoil factor 1 promoter in MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 105(2), 365-369.
- Lienard, P., Riviere, M., Van, V.P., Szpirer, C., Szpirer, J., 2000. Assignment of SND1, the gene encoding coactivator p100, to human chromosome 7q31.3 and rat chromosome 4q23 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 90(3-4), 253-254.
- Littlefield, O., Korkhin, Y., Sigler, P.B., 1999. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(24), 13668-13673.
- Lopez, J.M., Bennett, M.K., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M., Osborne, T.F., 1996. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(3), 1049-1053.
- Low, S.H., Vasanth, S., Larson, C.H., Mukherjee, S., Sharma, N., Kinter, M.T., Kane, M.E., Obara, T., Weimbs, T., 2006. Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev. Cell.* 10(1), 57-69.

- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., Bird, A.P., 1994. Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev.* 8(19), 2282-2292.
- Magana, M.M., Koo, S.H., Towle, H.C., Osborne, T.F., 2000. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* 275(7), 4726-4733.
- Maity, S.N., De Crombrughe, B., 1998. Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem. Sci.* 23(5), 174-178.
- Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M., 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 83(6), 841-850.
- Mantovani, R., 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene.* 239(1), 15-27.
- Mantovani, R., 1998. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* 26(5), 1135-1143.
- Martinez, M.J., Hernandez, M.L., Lacort, M., Ochoa, B., 1994. Regulation of rat liver microsomal cholesterol ester hydrolase by reversible phosphorylation. *Lipids.* 29(1), 7-13.
- Mastrangelo, I.A., Courey, A.J., Wall, J.S., Jackson, S.P., Hough, P.V.C., 1991. DNA looping and Sp1 multimer links: A mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(13), 5670-5674.
- Mater, M.K., Thelen, A.P., Pan, D.A., Jump, D.B., 1999. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274(46), 32725-32732.
- Matsushita, K., Hagihara, M., Sugiura, Y., 1998. Participation of oligomerization through C-terminal D domain region of Sp1 in DNA binding. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 21(10), 1094-1097.
- Matsusue, K., Miyoshi, A., Yamano, S., Gonzalez, F.J., 2006. Ligand-activated PPARbeta efficiently represses the induction of LXR-dependent promoter activity through competition with RXR. *Mol. Cell. Endocrinol.* 256(1-2), 23-33.
- Naar, A.M., Beurang, P.A., Robinson, K.M., Oliner, J.D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J.T., Tjian, R., 1998. Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev.* 12(19), 3020-3031.
- Natarajan, R., Ghosh, S., Grogan, W.M., 1998. Molecular cloning of the promoter for rat hepatic neutral cholesterol ester hydrolase: evidence for transcriptional regulation by sterols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243(0006-291; 0006-291; 2), 349-355.
- O'Connell, M.A., Keegan, L.P., 2006. Drosha versus ADAR: Wrangling over pri-miRNA. *Nature Structural and Molecular Biology.* 13(1), 3-4.

- Oelgeschlager, T., Chiang, C.M., Roeder, R.G., 1996. Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature*. 382(6593), 735-738.
- Oate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*. 270(5240), 1354-1357.
- Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., Imagawa, M., 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J. Biol. Chem.* 271(7), 3891-3896.
- Osborne, T.F., 2000. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275(42), 32379-32382.
- Palacios, L., Ochoa, B., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J.V., Fresnedo, O., 2006. Overexpression of SND p102, a rat homologue of p100 coactivator, promotes the secretion of lipoprotein phospholipids in primary hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1761(7), 698-708.
- Pascal, E., Tjian, R., 1991. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes and Development*. 5(9), 1646-1656.
- Pauku, K., Kalkkinen, N., Silvennoinen, O., Kontula, K.K., Lehtonen, J.Y., 2008. p100 increases AT1R expression through interaction with AT1R 3'-UTR. *Nucleic Acids Res.* 36(13), 4474-4487.
- Pauku, K., Silvennoinen, O., 2004. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(6), 435-455.
- Pauku, K., Yang, J., Silvennoinen, O., 2003. Tudor and nuclease-like domains containing protein p100 function as coactivators for signal transducer and activator of transcription 5. *Mol. Endocrinol.* 17(9), 1805-1814.
- Phan, D., Cheng, C.-., Galfione, M., Vakar-Lopez, F., Tunstead, J., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Najjar, S.M., Yu-Lee, L.-., Lin, S.-., 2004. Identification of Sp2 as a Transcriptional Repressor of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 in Tumorigenesis. *Cancer Res.* 64(9), 3072-3078.
- Plutzky, J., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology and atherosclerosis: emerging insights for evolving paradigms. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2(4), 327-335.
- Ponting, C.P., 1997a. P100, a transcriptional coactivator, is a human homologue of staphylococcal nuclease. *Protein Sci.* 6(2), 459-463.
- Ponting, C.P., 1997b. Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem. Sci.* 22(2), 51-52.
- Porta, A., Colonna-Romano, S., Callebaut, I., Franco, A., Marzullo, L., Kobayashi, G.S., Maresca, B., 1999. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially

- expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254(0006-291; 0006-291; 3), 605-613.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K., 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391(6662), 79-82.
- Roder, K., Wolf, S.S., Larkin, K.J., Schweizer, M., 1999. Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1. *Gene.* 234(1), 61-69.
- Rodriguez, L., Bartolome, N., Ochoa, B., Martinez, M.J., 2006. Isolation and characterization of the rat SND p102 gene promoter: putative role for nuclear factor-Y in regulation of transcription. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1091, 282-295.
- Rodriguez, L., Ochoa, B., Martinez, M.J., 2007. NF-Y and Sp1 are involved in transcriptional regulation of rat SND p102 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356(0006-291; 0006-291; 1), 226-232.
- Roeder, R.G., 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21(9), 327-335.
- Roy, A.L., Du, H., Gregor, P.D., Novina, C.D., Martinez, E., 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(23), 7091-7104.
- Sakai, J., Duncan, E.A., Rawson, R.B., Hua, X., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1996. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell.* 85(7), 1037-1046.
- Sakamoto, K., Yamasaki, Y., Kaneto, H., Fujitani, Y., Matsuoka, T., Yoshioka, R., Tagawa, T., Matsuhisa, M., Kajimoto, Y., Hori, M., 1999. Identification of oxidative stress-regulated genes in rat aortic smooth muscle cells by suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett.* 461(1-2), 47-51.
- Sanchez, H.B., Yieh, L., Osborne, T.F., 1995. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* 270(3), 1161-1169.
- Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T., Maeda, M., 1996. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 271(43), 26461-26464.
- Sato, R., Miyamoto, W., Inoue, J., Terada, T., Imanaka, T., Maeda, M., 1999. Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274(35), 24714-24720.
- Scadden, A.D., 2005. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12(6), 489-496.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* 37(5), 907-925.

- Seizl, M., Lariviere, L., Pfaffeneder, T., Wenzek, L., Cramer, P., 2011. Mediator head subcomplex Med11/22 contains a common helix bundle building block with a specific function in transcription initiation complex stabilization. *Nucleic Acids Res.*
- Seo, J.B., Moon, H.M., Kim, W.S., Lee, Y.S., Jeong, H.W., Yoo, E.J., Ham, J., Kang, H., Park, M.G., Steffensen, K.R., Stulnig, T.M., Gustafsson, J.A., Park, S.D., Kim, J.B., 2004. Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol. Cell. Biol.* 24(8), 3430-3444.
- Shaw, N., Zhao, M., Cheng, C., Xu, H., Saarikettu, J., Li, Y., Da, Y., Yao, Z., Silvennoinen, O., Yang, J., Liu, Z.J., Wang, B.C., Rao, Z., 2007. The multifunctional human p100 protein 'hooks' methylated ligands. *Nat. Struct. Mol Biol.* 14(8), 779-784.
- Shih, H.M., Liu, Z., Towle, H.C., 1995. Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription. *J. Biol. Chem.* 270(37), 21991-21997.
- Shimano, H., 2001. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* 40(6), 439-452.
- Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1996. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.* 98(7), 1575-1584.
- Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99(5), 846-854.
- Singer, V.L., Wobbe, C.R., Struhl, K., 1990. A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes and Development.* 4(4), 636-645.
- Smale, S.T., Baltimore, D., 1989. The 'initiator' as a transcription control element. *Cell.* 57(1), 103-113.
- Smale, S.T., Kadonaga, J.T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449-479.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1), 76-85.
- Sugawara, A., Uruno, A., Kudo, M., Ikeda, Y., Sato, K., Taniyama, Y., Ito, S., Takeuchi, K., 2002. Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 277(12), 9676-9683.
- Sundstrom, J.F., Vaculova, A., Smertenko, A.P., Savenkov, E.I., Golovko, A., Minina, E., Tiwari, B.S., Rodriguez-Nieto, S., Zamyatnin, A.A., Jr., Valineva, T., Saarikettu, J., Frilander, M.J., Suarez, M.F., Zavialov, A., Stahl, U., Hussey, P.J., Silvennoinen, O., Sundberg, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V., 2009. Tudor staphylococcal nuclease is an

- evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat. Cell Biol.* 11(11), 1347-1354.
- Suzuki, M.M., Bird, A., 2008. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics.* 9(6), 465-476.
- Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Nakamura, Y., Suyama, A., Sakaki, Y., Morishita, S., Okubo, K., Sugano, S., 2001. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res.* 11(5), 677-684.
- Szutorisz, H., Dillon, N., Tora, L., 2005. The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment. *Trends Biochem. Sci.* 30(11), 593-599.
- Tabor, D.E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., Edwards, P.A., 1998. Transcriptional activation of the stearoyl-CoA desaturase 2 gene by sterol regulatory element-binding protein/adipocyte determination and differentiation factor 1. *J. Biol. Chem.* 273(34), 22052-22058.
- Tobin, K.A., Steineger, H.H., Alberti, S., Spydevold, O., Auwerx, J., Gustafsson, J.A., Nebb, H.I., 2000. Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 14(5), 741-752.
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G., Kieff, E., 1995. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol. Cell. Biol.* 15(9), 4735-4744.
- Tsuchiya, N., Nakagama, H., 2010. MicroRNA, SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis. *Mutat. Res.* 693(1-2), 94-100.
- Tsuchiya, N., Ochiai, M., Nakashima, K., Ubagai, T., Sugimura, T., Nakagama, H., 2007. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 67(19), 9568-9576.
- Usheva, A., Shenk, T., 1996. YY1 transcriptional initiator: protein interactions and association with a DNA site containing unpaired strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(24), 13571-13576.
- Valineva, T., Yang, J., Palovuori, R., Silvennoinen, O., 2005. The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6. *J. Biol. Chem.* 280(15), 14989-14996.
- Valineva, T., Yang, J., Silvennoinen, O., 2006. Characterization of RNA helicase A as component of STAT6-dependent enhanceosome. *Nucleic Acids Res.* 34(14), 3938-3946.
- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.C., Staels, B., Auwerx, J., 1995. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Clin. Invest.* 96(2), 741-750.

- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J.C., Auwerx, J., Staels, B., 1994. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J. Biol. Chem.* 269(49), 31012-31018.
- Wahli, W., Martinez, E., 1991. Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *FASEB J.* 5(9), 2243-2249.
- Wang, D., Sul, H.S., 1997. Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.* 272(42), 26367-26374.
- Weis, L., Reinberg, D., 1997. Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17(6), 2973-2984.
- Weiss, D.L., Hural, J., Tara, D., Timmerman, L.A., Henkel, G., Brown, M.A., 1996. Nuclear factor of activated T cells is associated with a mast cell interleukin 4 transcription complex. *Mol. Cell. Biol.* 16(1), 228-235.
- Wierstra, I., 2008. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372(0006-291; 1), 1-13.
- Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Henke, B.R., 2000. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J. Med. Chem.* 43(4), 527-550.
- Wright, K.L., Moore, T.L., Vilen, B.J., Brown, A.M., Ting, J.P., 1995. Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene expression is up-regulated by cooperative interactions of Sp1 and NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 270(36), 20978-20986.
- Yang, J., Aittomaki, S., Pesu, M., Carter, K., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Kieff, E., Silvennoinen, O., 2002. Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II. *EMBO J.* 21(18), 4950-4958.
- Yang, J., Valineva, T., Hong, J., Bu, T., Yao, Z., Jensen, O.N., Frilander, M.J., Silvennoinen, O., 2007. Transcriptional co-activator protein p100 interacts with snRNP proteins and facilitates the assembly of the spliceosome. *Nucleic Acids Res.* 35(13), 4485-4494.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 110(4), 489-500.
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1993. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* 75(1), 187-197.
- Yoo, B.K., Emdad, L., Lee, S.-., Su, Z.-., Santhekadur, P., Chen, D., Gredler, R., Fisher, P.B., Sarkar, D., 2011a. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. *Pharmacology and Therapeutics.* 130(1), 1-8.

- Yoo, B.K., Santhekadur, P.K., Gredler, R., Chen, D., Emdad, L., Bhutia, S., Pannell, L., Fisher, P.B., Sarkar, D., 2011b. Increased RNA-induced silencing complex (RISC) activity contributes to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 53(5), 1538-1548.
- Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., memiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Yatoh, S., Kitamine, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Sekiya, M., Takahashi, A., Hasty, A.H., Sato, R., Sone, H., Osuga, J., Ishibashi, S., Yamada, N., 2003. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol. Endocrinol.* 17(7), 1240-1254.
- Zhao, C.T., Shi, K.H., Su, Y., Liang, L.Y., Yan, Y., Postlethwait, J., Meng, A.M., 2003. Two variants of zebrafish p100 are expressed during embryogenesis and regulated by Nodal signaling. *FEBS Lett.* 543(1-3), 190-195.
- Zhu, Y., Qi, C., Calandra, C., Rao, M.S., Reddy, J.K., 1996. Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr.* 6(3), 185-195.
- Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Rao, M.S., Reddy, J.K., 1997. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Biol. Chem.* 272(41), 25500-25506.
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S., Reddy, J.K., 1995. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(17), 7921-7925.

APPENDIX: ENGLISH SUMMARY

**TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF
SND1 (*Homo sapiens*) AND SNDp102 (*Rattus
norvegicus*) GENES**

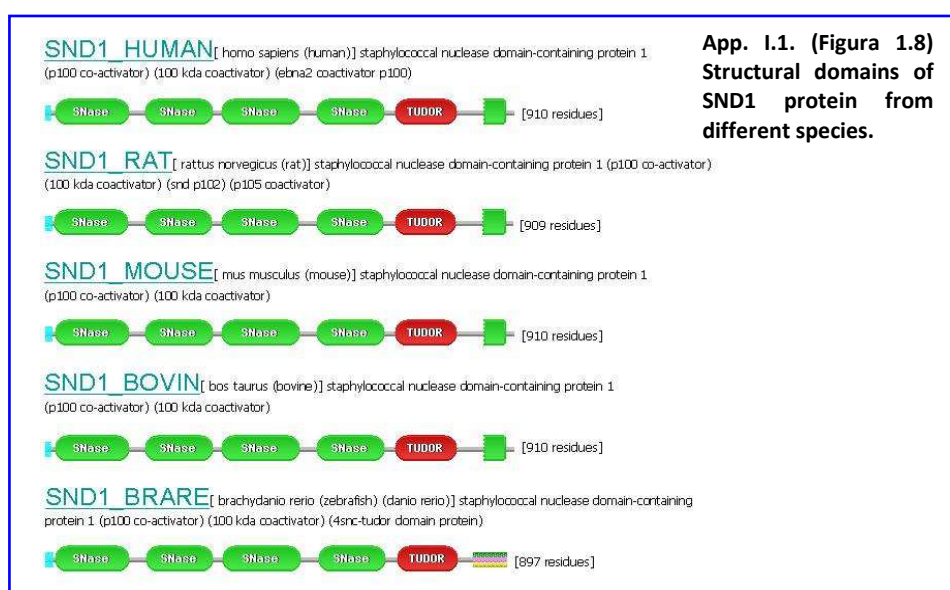
In this summary the most relevant figures have been included with the prefix App. The text between brackets corresponds to the large version in Spanish. The bibliography can be found in the last chapter of the Spanish version as *Bibliografía*.

I INTRODUCTION

I.1 SND1

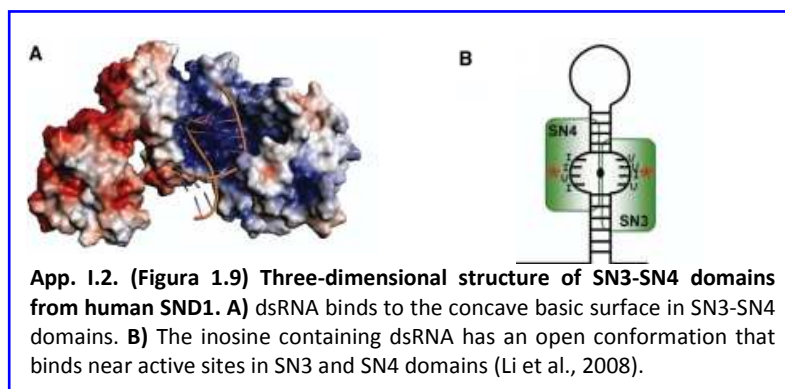
SND1 (*Staphylococcal Nuclease Domain 1*), also known as Tudor-SN, p100 or TSN, is the protein encoded by human SND1 gene, located at 7q31.3 chromosome (Lienard et al., 2000).

As shown in App. I.1., the structure of SND1 is highly conserved and contains four similar domains to *Staphylococcal aureus nuclease* (SN1-4), a Tudor domain and a fifth truncated SN domain at the C-terminal end (Callebaut and Moron, 1997; Ponting, 1997a; Ponting, 1997b).



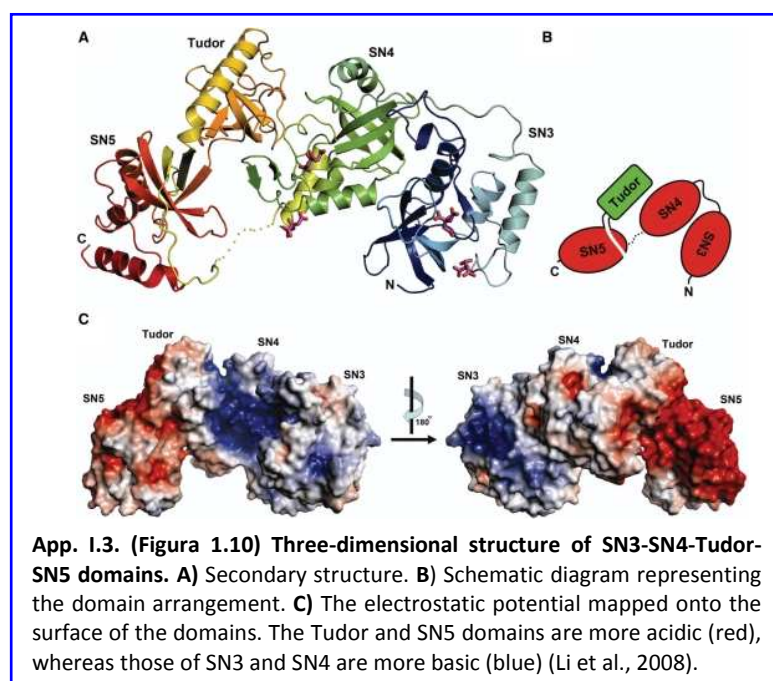
The SN domains of SND1 have been reported to interact with nucleic acids and proteins, mediating the main function of this protein (Tong et al., 1995; Callebaut and Moron, 1997; Ponting, 1997b; Pauku et al., 2003; Valineva et al., 2005; Shaw et al., 2007). Although SN domains appear to lack the essential residues for the nuclease activity, it has been shown that SND1 may function as RNase, preferably against double-stranded RNA (dsRNA) and hyperedited microRNA (miR) containing multiple inosines (Caudy et al., 2003; Scadden, 2005; O'Connell and Keegan, 2006). According to recent evidence, the RNase activity is blocked when Tudor-SN5 domain is proteolytically separated by caspase-3 (Sundstrom et al., 2009).

The three-dimensional model describes a structural compact module composed of SN3 and SN4 domains that generates a basic surface suitable for the recognition and cleavage of double-stranded RNA (Shaw et al., 2007; Li et al., 2008) (App. I.2).

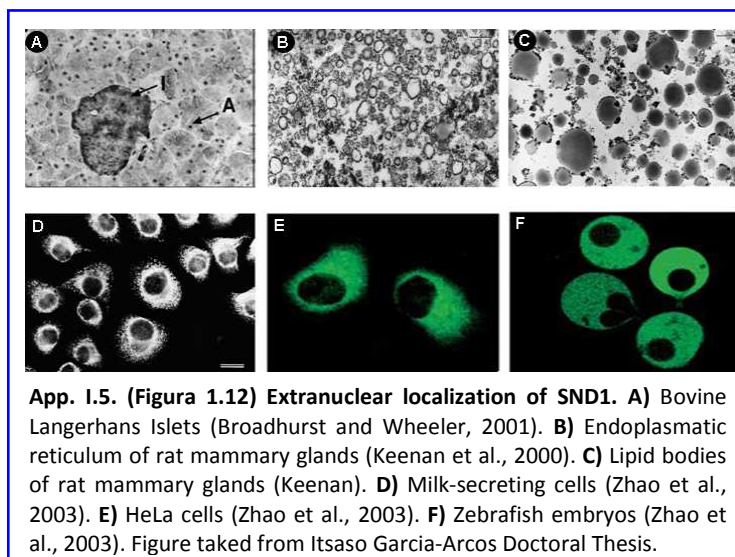
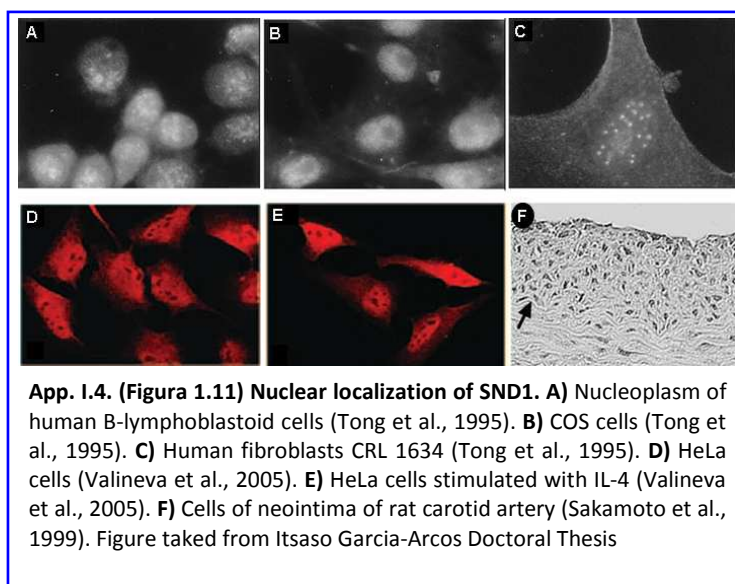


The structure of human Tudor domain reveals an aromatic cage to trap methyl groups of ligands, such as snRNP (*Small nuclear ribonucleoproteins*) and arginine dimethylated Sm proteins, which are members of the spliceosome, or lysine methylation marks on histone proteins (Shaw et al., 2007; Yang et al., 2007).

The electrostatic potential of SN5 domain is highly acidic, suggesting that it is unlikely to be involved in nucleic acids interactions (Li et al., 2008) (App. I.3).



The subcellular localization of SND1 depends on the cell type and conditions. In several studies, SND1 protein has been detected in both nuclei (App. I.4) (Tong et al., 1995; Sakamoto et al., 1999; Broadhurst et al., 2005; Valineva et al., 2005) and extranuclear localization, as endoplasmic reticulum, cytosol or lipid bodies (App. I.5) (Keenan et al., 2000; Zhao et al., 2003; Broadhurst et al., 2005).



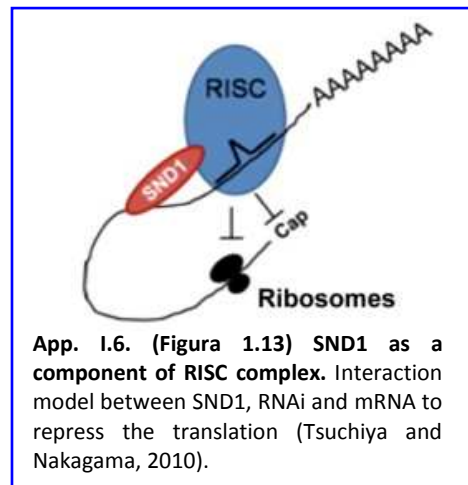
The main functions attributed to SND1 protein are associated with the regulation of gene expression, including transcription and pre-mRNA splicing, as well as translation and RNA interference.

SND1 was initially characterized as a transcriptional coactivator of EBNA-2 (*Epstein-Barr nuclear antigen-2*) and the general transcription factor TFIIE (Tong et al., 1995). Subsequently, it was shown that SND1 interacted directly with STAT6 (Yang et al., 2002), STAT5 (Paukku et al., 2003) and c-Myb. It can also recruit transcriptome proteins such as RNA polymerase II (Yang et al., 2002), CBP (Valineva et al., 2005), RNA Helicase A (Valineva et al., 2006), Pim-1 (Dash et al., 1996; Levenson et al., 1998) or other proteins like Policistin-1 (Low et al., 2006).

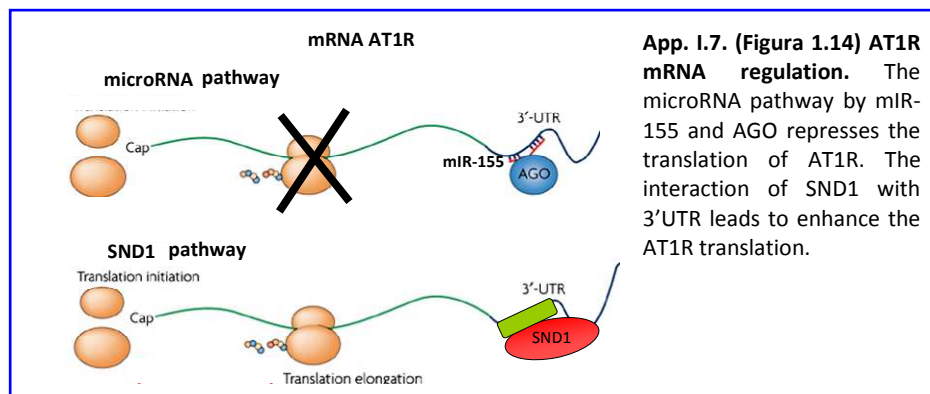
In some studies on RNA maturation, it has been demonstrated that SND1 interacts with the components of the spliceosome (U1-U6) and accelerates their assembly (Yang et al., 2007).

Appendix: English summary

SND1 has been implicated in the posttranscriptional processes acting with RNA interference machinery, promoting the mRNA degradation or suppressing the translation. SND1 is a component of the RNA-induced silencing complex (RISC) of *D. melanogaster*, *C. elegans* and human cell lines HeLa and HEK293 (Caudy et al., 2003). The RISC complex reduces gene expression by the gene silencing through the Argonaute (AGO) action. The RNA interference (siRNA or microRNA), product of enzymatic digestion of double-stranded RNA, is guided by Argonaute to the complementary region in mRNA for suppressing the translation. SND1 was found to interact with Argonaute (Paukku et al., 2008) and may serve as a platform, providing a molecular bridge between mRNA and RISC by incorporating the RNAi specific of mRNA as depicted in App. I.6 (Tsuchiya and Nakagama, 2010).



It has also been reported that SND1 increases the translation by inhibiting mRNA degradation through a interaction with 3'UTR of AT1R mRNA (*Angiotensin II type 1 receptor*) (Paukku et al., 2008) (App. I.7).

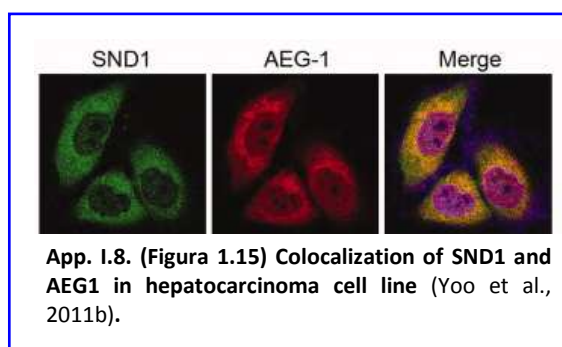


Although the biological function of SND1 is not fully determined, there is evidence than it is related to cell growth and development. Underexpression of SND1 has been related to the arrest of cellular growth and even with cell death (Tong et al., 1995), and its overexpression with events that induce diverse pathologies, among them cancer of lung (Chiosea et al., 2007), colon (Tsuchiya et al., 2007; Tsuchiya and Nakagama, 2010), kidney (Brito et al., 2008), breast (Ho et al., 2009; Blanco et al., 2011), prostate (Kuruma et al., 2009) and liver (Yoo et al., 2011b).

Differential expression of SND1 in rat aorta smooth muscle cells in response to oxidative stress, suggests that SND1 may play an important role in the development of atherosclerosis

(Sakamoto et al., 1999). In addition, SND1 has been linked to the pathogenesis of autosomal-dominant polycystic kidney disease since it was found to be overexpressed in the affected cells (Low et al., 2006).

SND1 was identified as a member of stress granules, which can be found in tumoral cells to protect RNA from damaging conditions. Thus, SND1 may play an important role in maintaining the RNA balance of cancer cells (Gao et al., 2010). By the other site, recently, two independent groups have identified SND1 as a novel binding partner of AEG-1 (*Astrocyte elevated gene-1*) in hepatocarcinoma and breast cancer. AEG1, also known as MTDH (*Metadherin*), interacts with components of the RISC complex, and has been observed that the elevation of AEG-1 in tumor cells correlates with tumor progression. SND1 is proposed to promote the resistance to apoptosis and regulate the expression of genes associated with metastasis (Blanco et al., 2011; Yoo et al., 2011a; Yoo et al., 2011b) (App. I.8).



Upregulation of SND1, together with higher miRs activity in cancer cells, might lead to increase the activity of RISC and to improve degradation of tumor suppressor mRNAs by onco-miRs. Thus, this disruption in RNA interference pathway could degenerate in a cancer progression (Tsuchiya and Nakagama, 2010; Yoo et al., 2011b).

Previous works from our research group with the rat homologue protein SNDp102 have demonstrated its relationship with lipid metabolism in the liver.

SNDp102 is immunolocalized in the endoplasmic reticulum of rat, mouse and human liver, as well as HepG2 cells. It hydrolyzed more than 90% of the cholesteryl esters in microsomes of rat hepatocytes and has a 97% homology with human SND1 (Cristobal et al., 1999; Fresnedo et al., 2001; Palacios et al., 2006). SNDp102 gene is localized at rat 4q23 chromosomal region (Lienard et al., 2000).

In other studies, a relationship between SND1, and its homologues, and lipid metabolism has been demonstrated. SND1 is upregulated in lipid deposition in artery injuries under oxidative stress conditions (Sakamoto et al., 1999), it has been localized in milk precursory lipid droplets in

Appendix: English summary

the mammary gland of rat and cow (Broadhurst and Wheeler, 2001; Broadhurst et al., 2005), in lipid bodies of mouse adipocytes (Keenan et al., 2000) and also in rat and human hepatocytes under steatotic conditions (Garcia-Arcos et al., 2010). In our laboratory, using recombinant adenoviruses encoding the cDNA of SNDp102 or an anti-sense sequence, we have demonstrated that SNDp102 facilitates the transfer of phospholipids into lipoproteins for their secretion from rat hepatocytes (Palacios et al., 2006).

To further understand the physiological role of this protein, and considering the relevance of knowing the mechanism of SND1 gene expression, our group isolated and characterized the promoter of rat SNDp102 gene (GenBank AY957585). Transcription start site was located 216 pb upstream the ATG translation start codon. Bioinformatics analysis of the promoter region of SNDp102 showed the lack of the typical TATA box, DPE, BRE or Inr elements (Rodriguez et al., 2006) and the presence of GC-rich motifs and inverted CCAAT boxes recognized by Sp1 and NF-Y (Rodriguez et al., 2007). Promoter activity of the 5' deletion fragments by luciferase reporter vector assays demonstrated basal transcriptional activity at region -112 and the full promoter activity was observed in constructs extending to -422.

In this context, our main interest has been to further study the rat SNDp102 promoter and initiate the analysis of human SND1 promoter. Ongoing characterization studies of rat and human promoters will identify the transcription factors participating in the mechanism of transcriptional regulation.

II OBJECTIVES

Taking into account the actual knowledge on human SND1 and the studies carried out in our laboratory about the promoter of the rat gene SNDp102, our main interest is the characterization of the transcriptional regulation mechanisms of both genes and the study of their differences and similarities.

The objectives of this work entitled “**Transcriptional regulation of SND1 (*Homo sapiens*) and SNDp102 (*Rattus norvegicus*) gene promoters**” are the following:

- 1- Cloning and characterization of the human SND1 promoter region.
- 2- Identification of the functional binding sites for the basal transcription factors Sp1 and NF-Y in human SND1 and rat SNDp102 gene promoters.
- 3- Involvement of the regulatory transcription factors SREBP and PPAR in the promoter activity of SND1 and SNDp102 genes.

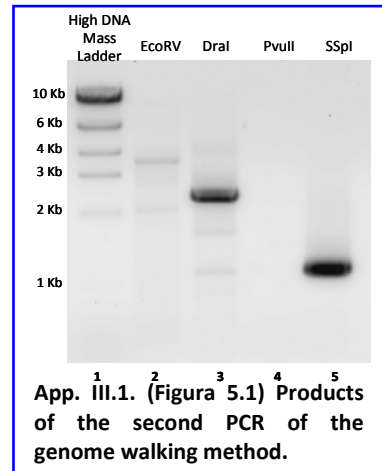
III RESULTS AND DISCUSSION

III.1 ISOLATION OF THE HUMAN SND1 GENE PROMOTER REGION

A genome walking method based on two consecutive PCRs was used to isolate the promoter region of the human SND1 gene. Human genomic DNA libraries, obtained by digestion of genomic DNA with different endonucleases (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII* and *SspI*), and ligation to an adaptor sequence, were used as template for the first PCR. The products of the first PCR were used as templates for nested PCRs. Both PCRs used as reaction primers, AP2 complementary to the adaptor sequence of genomic DNA, and GSP1 complementary to the region (+284,+318) or GSP2 complementary to the region (+142,+171)

of SND1 cDNA. The cDNA sequence of human SND1 gene (GenBank NM_014390) define the initiation of transcription (+1), the translation start site (+227) and the resulting protein (NP_055205).

Fragments of 2.38 kb (*DraI*), 1.21 kb (*SspI*) and 3.67 kb (*EcoRV*) were amplified and purified from the PCR products (App. III.1), and other PCRs were performed in order to elongate the isolated sequence to achieve a unique and complete sequence. In this way, a region of 3,808 bases upstream of ATG start codon was isolated and located on chromosome 7, according to the previously reported location for the SND1 gene (Leverson et al., 1998). The last 227 bases corresponded to the 5' region of the cDNA sequence of the human SND1 mRNA and 3,492 bases corresponded to a new sequence upstream the cDNA. The promoter region of the human SND1 mRNA was deposited at the GenBank with the accession number EF690304 (App. III.2).



Appendix: English summary

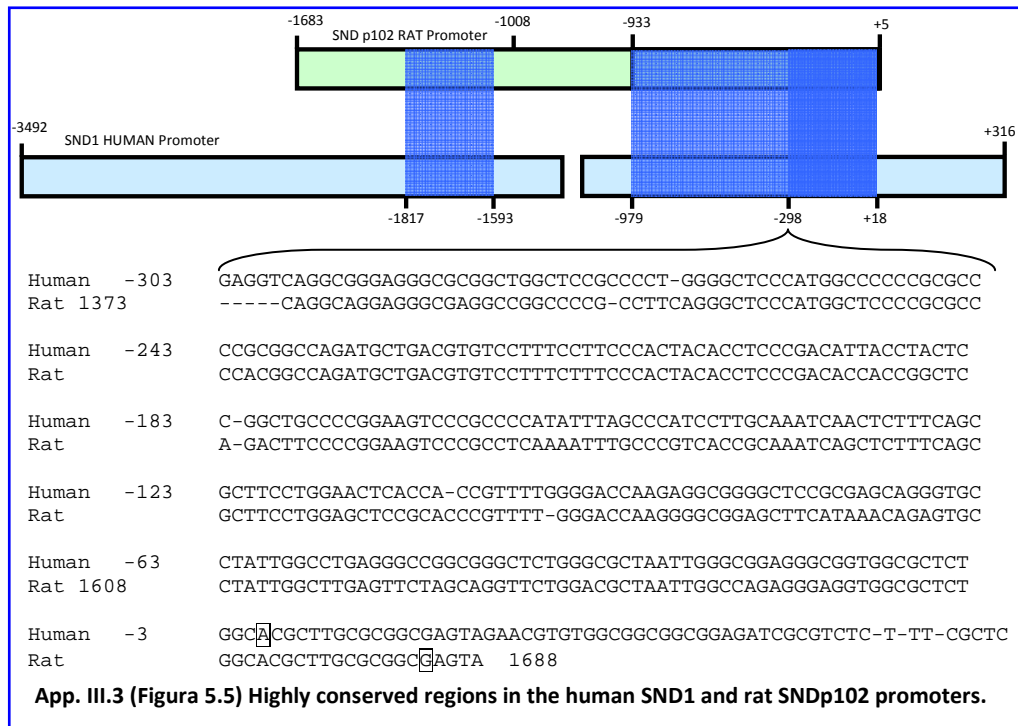
```

-3492 tatctggaga tggatgtgga atgaaggaaa aatttattta attaattgaa ttttacaag
-3432 caagaaattht gagaataactt aagtgtctaat gaggtctggtc tgaaggtagt gttatatcaa
-3372 ctgattgttc gctgccagtt atagattgaa ctccctgttc tactcttttt taagattaaa
-3312 aaaaatthttt taatgctaata gaggagaacc taggataaac tgagaagctg taaaaaccgg
-3252 agagggaaatg attggaatg tggagggggc agatcaagaa ctaagacgaa gatttagcc
-3192 tgaagagtag gagggagatt ttctttgtaa tgtgagacaa ggtagcaaat gtaagaagcc
-3132 atgtttcctc atttctgctt ctccagcagaa tttcacaag ccctgactg tgacaatgac
-3072 acaccgctac cctgaaagat gctctgaaga aaaaacagga taaagcacac ggccccagt
-3012 gtctcttgcc tgagtcaatg tagtccataa aagataaatg accttagtcc ttgctttcc
-2952 ctgacacataa gataacatct gacagagtta gtggttctgc ttctaactg tataaccaa
-2892 tgtacttttag agatctataa ccagatgtac tcttaacacc caagctttga tgtgattttg
-2832 catgtactga acctccacct cctatatata tgaatggggc tgaacactg tgcagggca
-2772 gtctgacaac cgctcctggg ctatatgtag tccttggggc tcagtaagac ttctggataa
-2712 aactaacttht aattctthtaa aagcttgatt tttttttctt tagttgacag taacaagggg
-2652 taagagagga atgagaagga agataagatt ttagattcag tggggggaaa ttgaaagggt
-2592 tcttgatgat tttttctccc aagtaggagg ccttatcact ttcagagtgt gggaaacagt
-2532 ggagtcagtt aaaaacaaact caatagagtt caaggctgaa ctgactgaat aaagagaaga
-2472 aattccaggg accgtgtgag ggccatthaa ttaattcact gtggcaccaa ctgacagaat
-2412 tgagatthttt ctccaggtaa gtggtaggtt tgaagaaagt agagactat acgcaactca
-2352 gagttgaggt tttgacaggt gggcccagtg aaagacaatg ggaattacag atgaagatat
-2292 tggtaggaaa ggggctaaaa tgatggacag tgcattggagt ctagccaagg atccaggaga
-2232 aggcagaggg gagctggtaa agcaagggtg gtgagttcag ggactthaaa ttctagttaa
-2172 cgcttgtcct ctgttgtctc tcaactgtctc tgatggaaac cagctgttat gttgtgagtt
-2112 gccctatgga gagaccatg tagaaggaaa ctgaaccact gaaaaactga ggtcttagt
-2052 ccaacatctt gaggaactga atctgtcag caactatgag tgagctggg aagcaactca
-1992 ccttcagtca gagggaggacc ttcagatgag accacagtcc ccttcccaac tcccctgac
-1932 acctgactg cagctthata agagaagacc tggaggaaaa ggcaggcacc caccctcagat
-1872 tccttaccct caaaaactgt gagataaatg cttattgttt tctttagtat ttaagttttg
-1812 gggcaaattht ttatgtaact aatacaagat ataagataat taactgaatg agaagggaga
-1752 gaggacagca gttatgatca aagacaaagt gtttgagttt acaatcgtac ctatgaagtt
-1692 atgggtthttt atctgtctgg agaactgctt aaattggtgc agaggtcaag tttactgaag
-1632 atgagatcaa ggagcaaaga ggtcagggta tgggataagt catgctcgta gatattgaag
-1572 tatttcagga ttattggctg aagaccgtgc accaagtgtt aacaatttca atgaatgaca
-1512 cggtagaaat aggggtacgg tagataaaaa gccacgagat agagaggggt ataactctgat
-1452 ggaaccaact tccacagagg tttttttttt tttttttttt ttttgaaaaa ggggtgcaaa
-1392 ttagggatct aagaaggtga cctcaaaact taacctggg atatgtttag tgtgggagaa
-1332 taaacttaca atctthtaag agagcaaggg gccatgcact gtggttaatg catgtaatac
-1272 cagcactthta ggaggccgag gtaggagat agcttgagcc caggagacca gctgggcaa
-1212 catagtgaaa tctcagctct acaaaaaaaa aattagctgg cgtggtgagc cgggaccgt
-1152 ggtaccagct ccagctacac aggagactga ggcaggagga tgccttgagc ctgggagtg
-1092 caaggctgca gtgagccgtg atcgtgccc cgcactccag cctgagcgac agagcgagac
-1032 tttgtctcaa aaaagccaca aaaccaaaaga aacaaaaaga actgcaaggg aagtactgtc
-972 ttcagtgtag agccaagttt tacgattaaa tgacataaca catgcaaggt ccttggttcc
-912 acatagtggg cactcaacga atattagttc tgcctaaaca gtcactthaa tatthgtagg
-852 ccttggcttht cccgttctt ccccgactct tttactgggg ctagggaagg tatctgggg
-792 ctggaggcgc ttcacactgg gtccgggtgag agcgtgaagc gagccttht cctaacgtca
-732 cgggagcagc tgggaagaga ccgaagaac agggctactc tcccctgtat acgtggcatg
-672 tccttctctt aagagacatt tttctctcc accaacaac ataatggaa cgcctcaca
-612 gtgctagacc ccagcgacac aaacaagggc gaggcacact ctctgactac aaaaagggcg
-552 cgcggccgcg tggcaggtca aagccacat cggtaggagg ttccacaag ctctgatttt
-492 ccaagttctc tccatacttt tagccaaggt aaaatgtcgg aagtcgagtg gagcgggtac
-432 ggagattcct ccaggactct gcctgcgtgg ctccacctc ccaggccgca ttcccgggta
-372 cagcggcgc cacttaggtg ggtatacaag tgtgcgccc tgaggccagc ggggaaggac
-312 gtcattggcg aggtcaggcg ggaggcgcg gctggctccg ccctggggc tcccattggc
-252 ccccgccccc cgcggccaga tgctgacgtg tccttctct cccactacac ctcccagat
-192 tacctactcc ggctgccccg gaagtcccgc cccatattta gccatcctt gcaaatcaac
-132 tctttcagcg ctctctggaa ctccaccaagc ttttggggac caagagggcg ggtcccgcga
-72 gcagggtgct tattggctg agggccggcg ggtctgggg gctaatggg cggagggcg
-12 tggcgctctg gca→cgcttgc gcggcgagta gaacgtgtgg cggcggcgga gatcggctc
+49 ctttgcgtcc gtgtccgct gctgctctg tgagcggccg gcgagtcgt cccgtccacc
+109 gtccgcagct ggtagccagc ctgcccctcg cctcgactcc ctttcccaa caccgacacc
+169 cacattgaca cctccagtc ggccagcgc tccactcgtt gcctttgcat ctccacacat
+229 ggcgtcctcc gcgcagagcg gcggctcctc cgggggacc gcgggtccca ccgtgcagcg
+289 gggcatcacc aagatggtcc tctcaggg

```

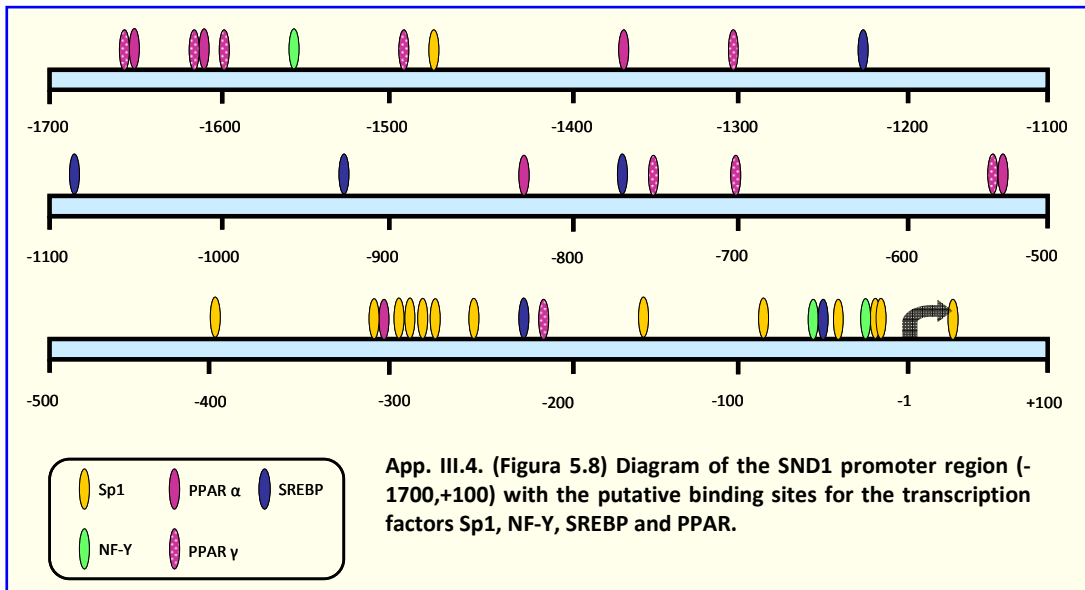
App. III.2. (Figura 5.4) Isolated promoter region of the human SMD1 gene (GenBank EF690304). ATG translation start site (+227) in bold. Transcription start site (+1) is marked with an arrow.

Comparative analysis of isolated sequence with the rat SNDp102 gene promoter, previously isolated by our group, illustrated that the region of 300 pb upstream of transcription initiation site are highly conserved in both promoters and probably contain similar binding elements responsible for the transcription of these genes (App. III.3).



III.2 CHARACTERIZATION OF THE HUMAN SND1 GENE PROMOTER REGION

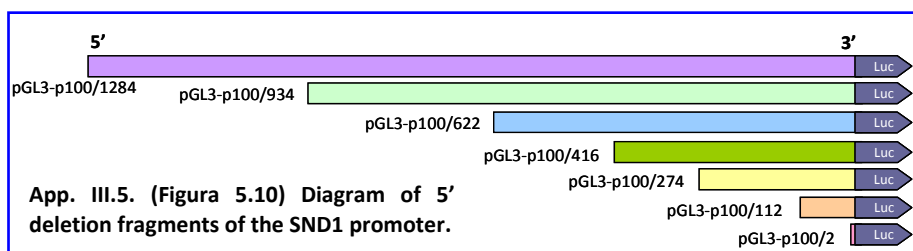
Bioinformatic analysis of the isolated promoter sequence was performed using TESS, MatInspector and Jaspar. The analysis revealed that it is a TATA-less promoter, and contained a CpG island, CCAAT boxes and different putative binding sites for transcription factors involved in both basal, Sp1 and NF-Y, and regulated transcription processes, SREBP and PPAR (App. III.4).



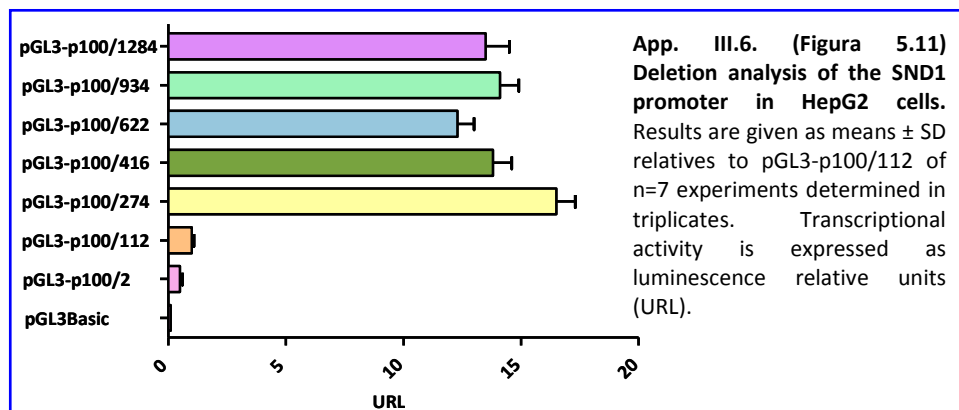
CpG islands, typical element in promoters, are CG-rich regions with a size ranging from 0.5 to 2 kb (Antequera and Bird, 1993; Takai and Jones, 2002) and usually appear in genes promoters without TATA boxes. The CpG island in human SND1 promoter (-881,+316) matches with the CpG island found in rat SNDp102 promoter region. One common feature of CpG islands is the presence of multiple binding sites for transcription factor Sp1 which may direct the preinitiation complex to the initiation site. In addition to GC boxes, the CCAAT boxes, recognized by NF-Y, are common elements in eukaryotic promoters with or without TATA box. In the absence of TATA box, NF-Y can function as a recruiting factor for the general transcriptional machinery, allowing RNA polymerase II to find the start site (Bucher, 1990; Weiss et al., 1996).

III.3 FUNCIONAL ANALYSIS OF THE SND1 GENE PROMOTER

Transcriptional activity was determined in HepG2 cells transiently transfected with a series of constructs obtained as 5' deletion fragments of the SND1 promoter cloned upstream of luciferase reporter gene (App. III.5).



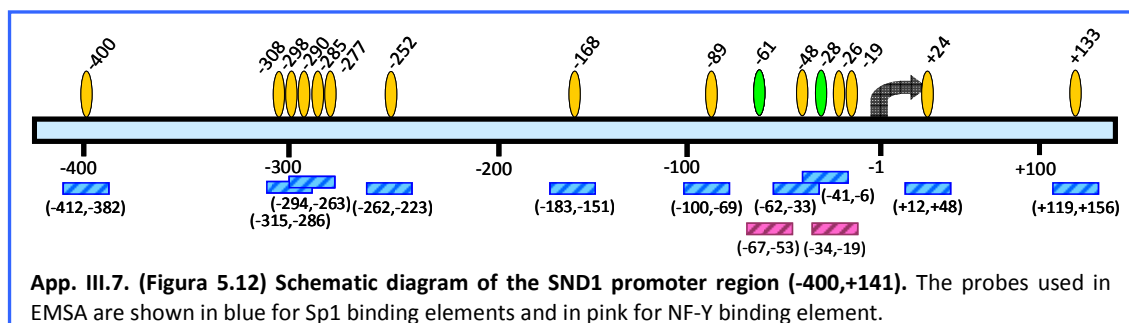
Resulting activity data in human hepatoma cells revealed the presence of a minimal promoter activity at region at (-112,+221) containing seven GC boxes, two reverse CCAAT boxes and a SRE (Sterol response element). Full promoter activity was detected in the construct extending to -274 pb and was maintained up to -1,284 pb. Analysis of the region spanning from -112 to -274 revealed the presence of two additional GC boxes, one SRE, one PPRE and other potential regulatory elements (App. III.6).



III.4 INVOLVEMENT OF Sp1 AND NF-Y IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN SND1 AND RAT SNBP102 GENES

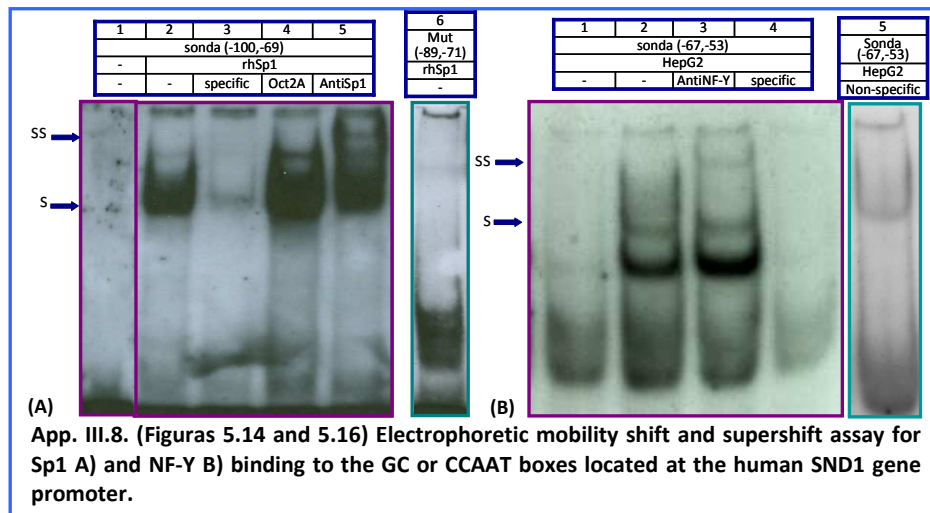
According to the results, we deal with the possible participation of Sp1 and NF-Y in the regulation of gene promoter activity of SND1.

The Sp1 and NF-Y binding elements are mainly located within the region with the highest luciferase activity. Firstly, we examine the binding of Sp1 and NF-Y to the ten GC elements and the two CCAAT boxes localized in the region (-400,+141) of SND1 promoter. We performed EMSA analysis using digoxigenin-labelled specific double-stranded oligonucleotides which contain the GC binding elements for Sp1-400, -308, -298, -252, -168, -89 and -48 and CCAAT boxes for NF-Y-28 and -61 (App. III.7).



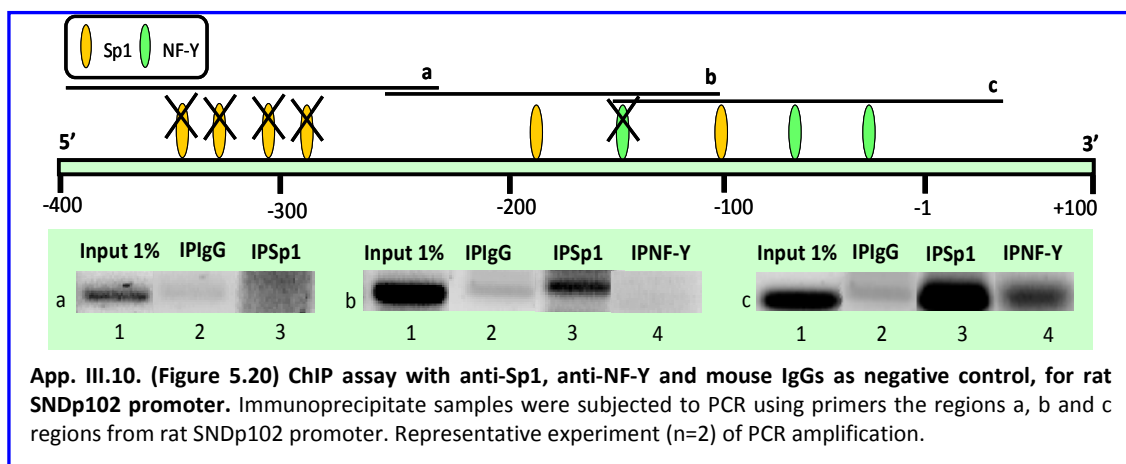
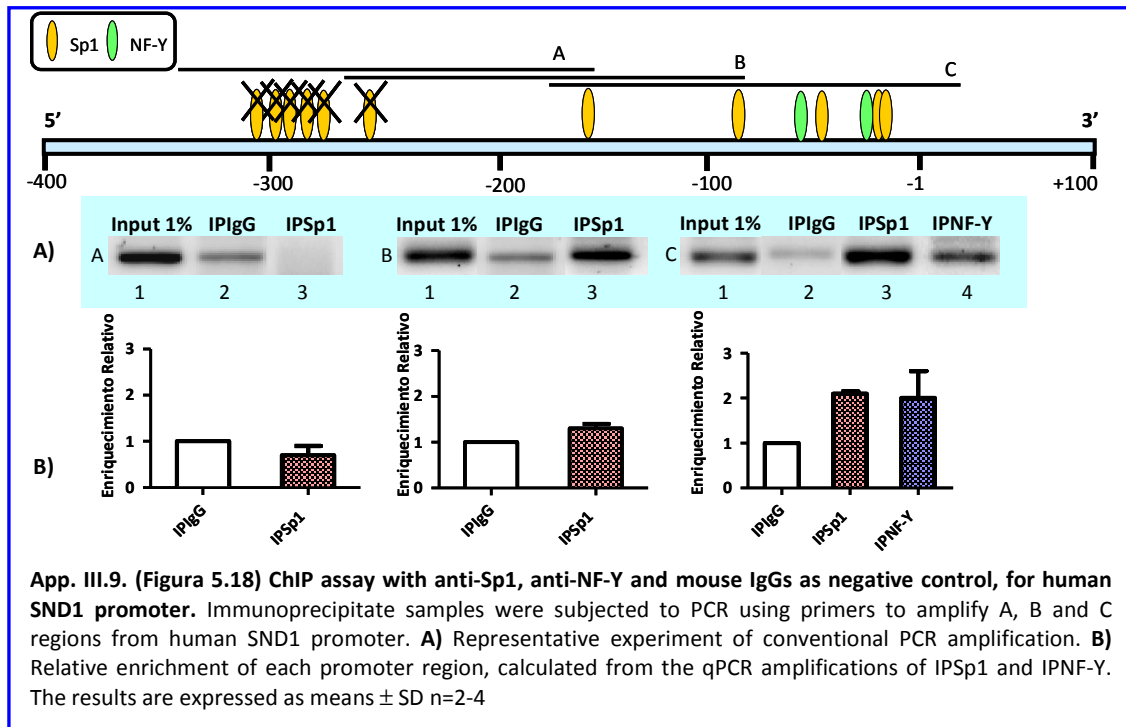
Appendix: English summary

The probes we incubated with Sp1 human recombinant protein or nuclear extract from HepG2 cells and produced one specific DNA-protein complex (s), which was eliminated by an excess of unlabelled specific and mutated probe, but not with the non-specific probe. The specificity of Sp1 and NF-Y binding was confirmed by adding monoclonal antibodies anti-Sp1 or anti-NF-Y to produce a single supershift complex (ss). The App. III.8 shows representative EMSA assays for Sp1 binding to the GC box-89 A) and NF-Y binding to the CCAAT box located at -61 B). Similar results were obtained for all the probes analyzed.

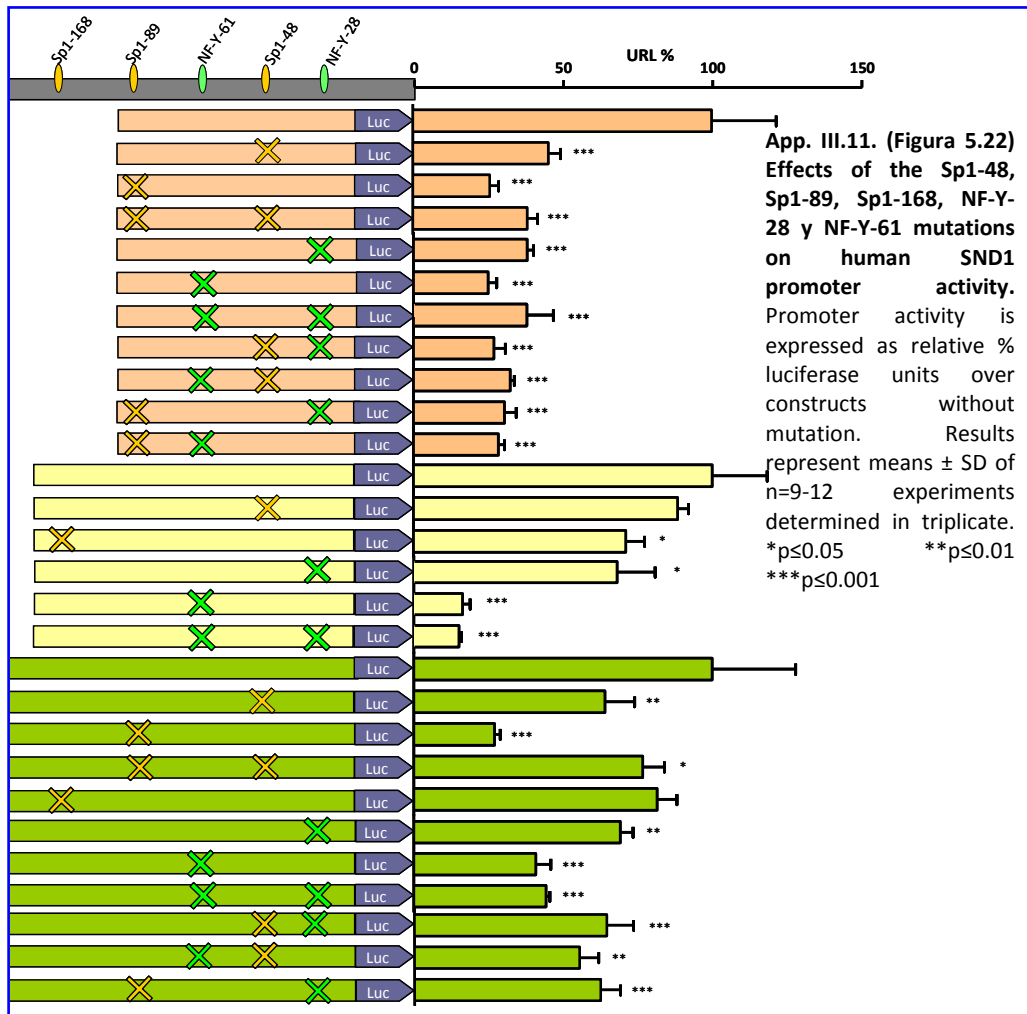


Previous EMSA analysis in rat SNDp102 promoter had revealed the binding of Sp1 and NF-Y in homologue GC and CCAAT boxes (Rodriguez et al., 2006; Rodriguez et al., 2007). Taking together, the results suggest that these transcription factors may be implicated in a similar mechanism of transcriptional regulation for rat and human promoters.

ChIP experiments were conducted to determine whether Sp1 and NF-Y can bind to the regulatory region of the endogenous SND1 and SNDp102 genes in the HepG2 and McA-RH7777 cell lines. Genomic DNA was immunoprecipitated with anti-Sp1 or anti-NF-Y and the primers A, B, C, a, b and c encompassing the GC and CCAAT boxes amplified exclusively the proximal region (-200,+1) of human SND1 and rat SNDp102 promoters from genomic DNA input chromatins (App. III.9 and App. III.10). No amplification was detected for the NF-Y-154 SNDp102 promoter element and for other GC elements located upstream form -200 to -400 pb. These results show that the Sp1 and NF-Y transcription factors that bind within the region (-200,+1) may indeed participate in the promoter regulation of both genes *in vivo*.



In order to determine whether the elements Sp1-168, Sp1-89, Sp-48, NF-Y-61 and NF-Y-28 are essential for SND1 promoter activity, single and combined point mutations of GC and CCAAT consensus sequences were performed in SND1 promoter fragments, pGL3-p100/112 (orange), pGL3-p100/274 (yellow) and pGL3-p100/416 (green) (App. III.11).



The results showed that single mutation of GC or CCAAT boxes decreased transcriptional activity in all the analyzed deletion fragments, being more accentuated in the shorter fragment 112. Combined mutations did not produce further reduction than that caused by single mutations, suggesting that Sp1 and NF-Y contribute independently to the transcriptional regulation of SND1 promoter.

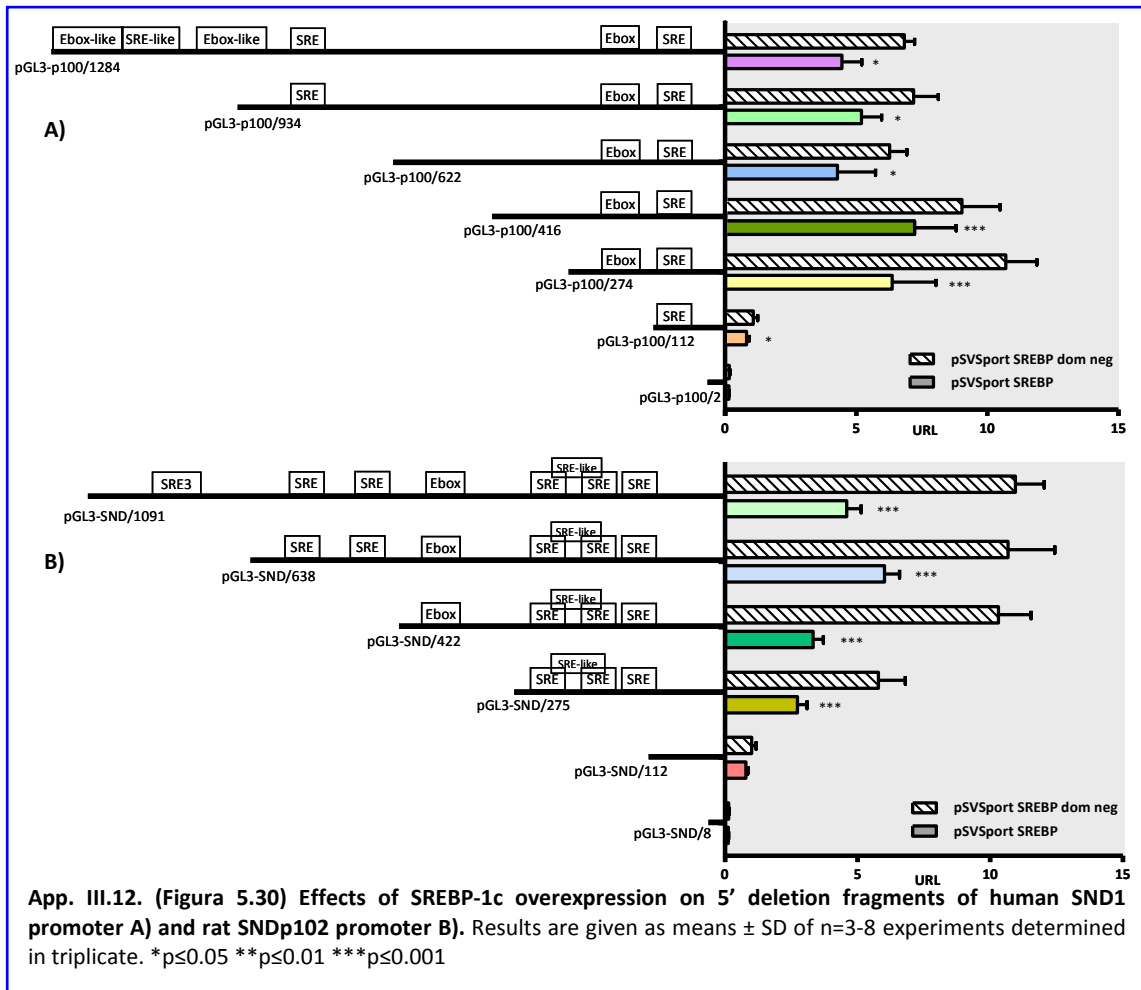
In an earlier work, we reported that rat SNDp102 promoter activity was strongly dependent on two reversed CCAAT boxes and the maximal transcriptional activity required the participating of additional GC boxes (Rodriguez et al., 2007).

All these results provide strong evidence for Sp1 and NF-Y as transcription factors to bind in conserved elements in rat and human promoters, and may define a mechanism for basal transcription of both genes without discarding the involvement of additional transcription factors that could operate specifically in each promoter.

III.5 INVOLVEMENT OF SREBP IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN SND1 AND RAT SNDp102 GENES

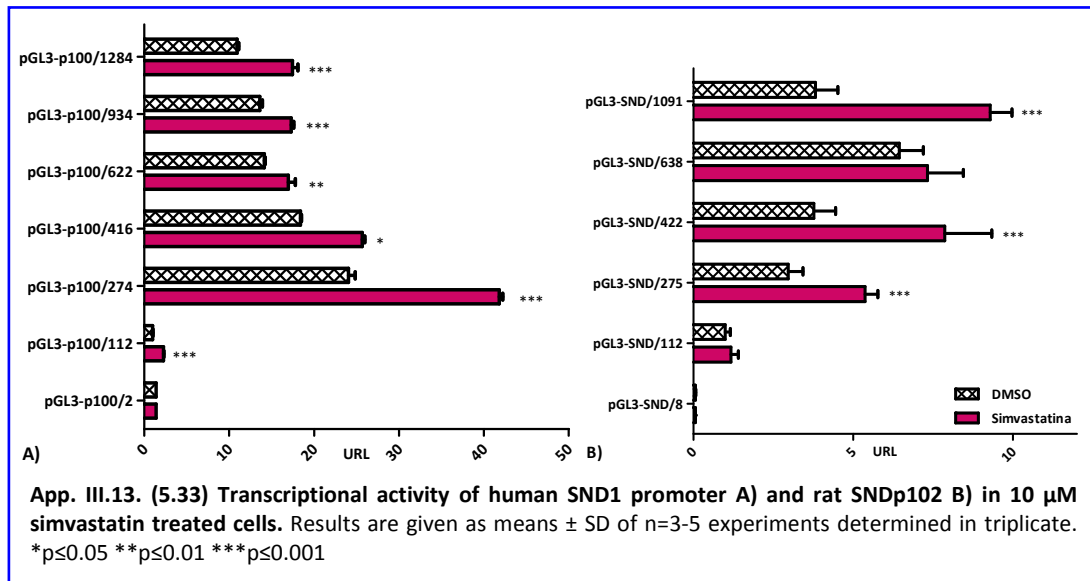
We analyzed the implication of the factor SREBP in SND1 and SNDp102 promoters. Bioinformatic analysis showed that SND1 and SNDp102 promoters contain putative SREBP-response elements SRE/Ebox, as described in promoters of genes involved in cholesterol and fatty acid metabolism.

To study the effects of SREBPs on SND1 and SNDp102 promoters, HepG2 and McA-RH7777 were cotransfected with deletion constructs of promoters and with a SREBP-1c expression plasmid. pSV Sport SREBP-1c dom neg is a vector that expresses a non-functional mature form of SREBP-1c, so it is used as negative control. The App. III.12 shows that SREBP-1c inhibited (25-40%) the reporter activity of all SND1 constructs from -112 to -1284, which contain the proximal elements SRE-60 and Ebox-228, suggesting that these are important sequences for transcriptional regulation of the SND1 by SREBP. Similar results were obtained in rat hepatoma cells, although the reduction of promoter activity (40-60%) was observed not in region -112 but in fragments -275 to -1091, coinciding with the presence of the elements SRE-162, SRE-226, SRE-242 and SRE-262. Despite the reduced promoter activity, the levels of mRNA or protein of SND1 and SNDp102 did not change under these experimental conditions.



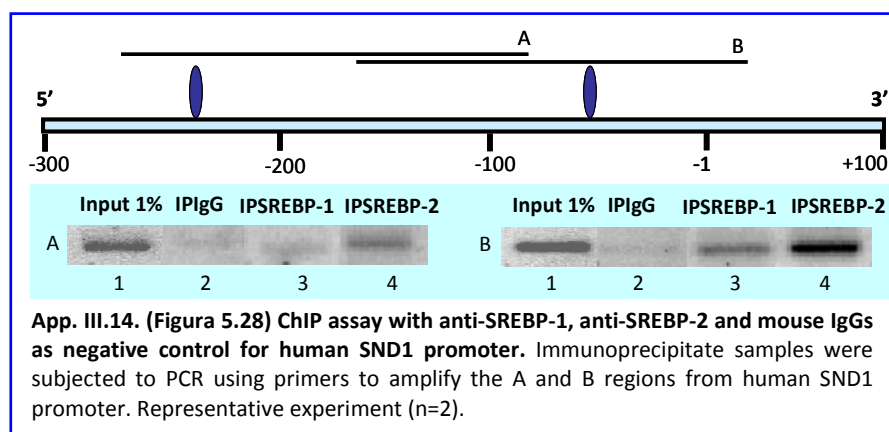
Mevalonolactone, a cholesterol precursor, enhanced the intracellular cholesterol content and then; inhibit the formation of mature SREBP-2. Treatment of hepatoma cells with 2 mM mevalonolactone did not change neither the transcriptional activity of human SND1 and rat SNDp102 promoters, nor mRNA and protein levels.

On the other hand, simvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, activates particularly, isoform SREBP-2 in response to the reduction in the hepatic cholesterol content (Sato, 2010). Treatment with 10 μ M simvastatin caused an activation of the transcriptional activity of both promoters, the opposite effect to that observed with the overexpression of SREBP-1c (App. III.13). The response to simvastatin treatment is reflected in the rise of SND1 and SNDp102 mRNA, but protein content was unaltered only the rat cells.



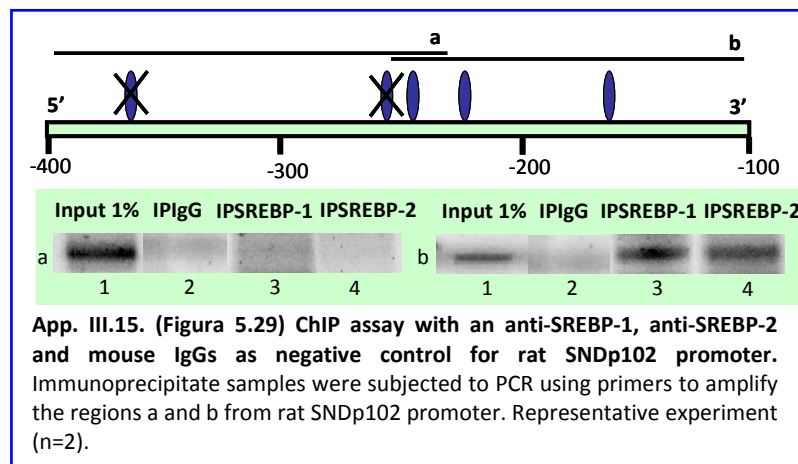
The most frequent effect of SREBP on its target genes is described as the stimulation of transcription, however there are several studies in which the inhibition of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) (Sato et al., 1999) and low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) (Costales et al., 2010) genes by isoforms -1 and -2, or the blocking of the PEPCK-C promoter activity by SREBP-1 are reported (Chakravarty et al., 2005). Opposite effects of both SREBP isoforms have been described in the 12 α -hydroxylase promoter, while SREBP-1 activates, SREBP-2 reduces the transcription of the gene (Castillo-Olivares and Gil, 2002). According to our results, human SND1 and the rat homologue could be included in this last group of genes as their promoters were inhibited by SREBP-1c overexpression and stimulated when SREBP-2 is activated.

As a relevant approach to determine the putative role of SREBP-1 or -2 on the endogenous SND1 and SNDp102 gene, we performed ChIP analyses focussing on the proximal promoter regions, which showed the occurrence of SREBP binding sites (App. III.14 y App. III.15).



Appendix: English summary

The union of both SREBP-1 and -2 to their binding sites on the SND1 gene promoter was confirmed by CHIP analysis using specific antibodies against to each of these transcription factors. As show in App. III.14, PCR amplification of the regions containing SRE at both -60 and -228 of the SND1 gene promoter resulted in bands from immunoprecipitates with anti-SREBP-2. However, antibodies to SREBP-1 detected that the protein bounds only to the putative site -60 on the SND1 gene promoter.



In the case of endogenous SNDp102 gene PCR amplifications of the proximal promoter region, it is shown that either SREBP-1 or SREBP-2 could bind to -162, -226 and -242 sites. However, no amplification was detected in the (a) region of the promoter.

To investigate whether SREBP-1 and -2 bind to these SRE/Ebox sites in the SND1 and SNDp102 promoters, or act through indirect effects, we performed EMSA assays with nuclear extracts from HepG2 or McA-RH7777. In no case, detectable complex of SREBP-1 or SREBP-2 with the DNA probes was observed.

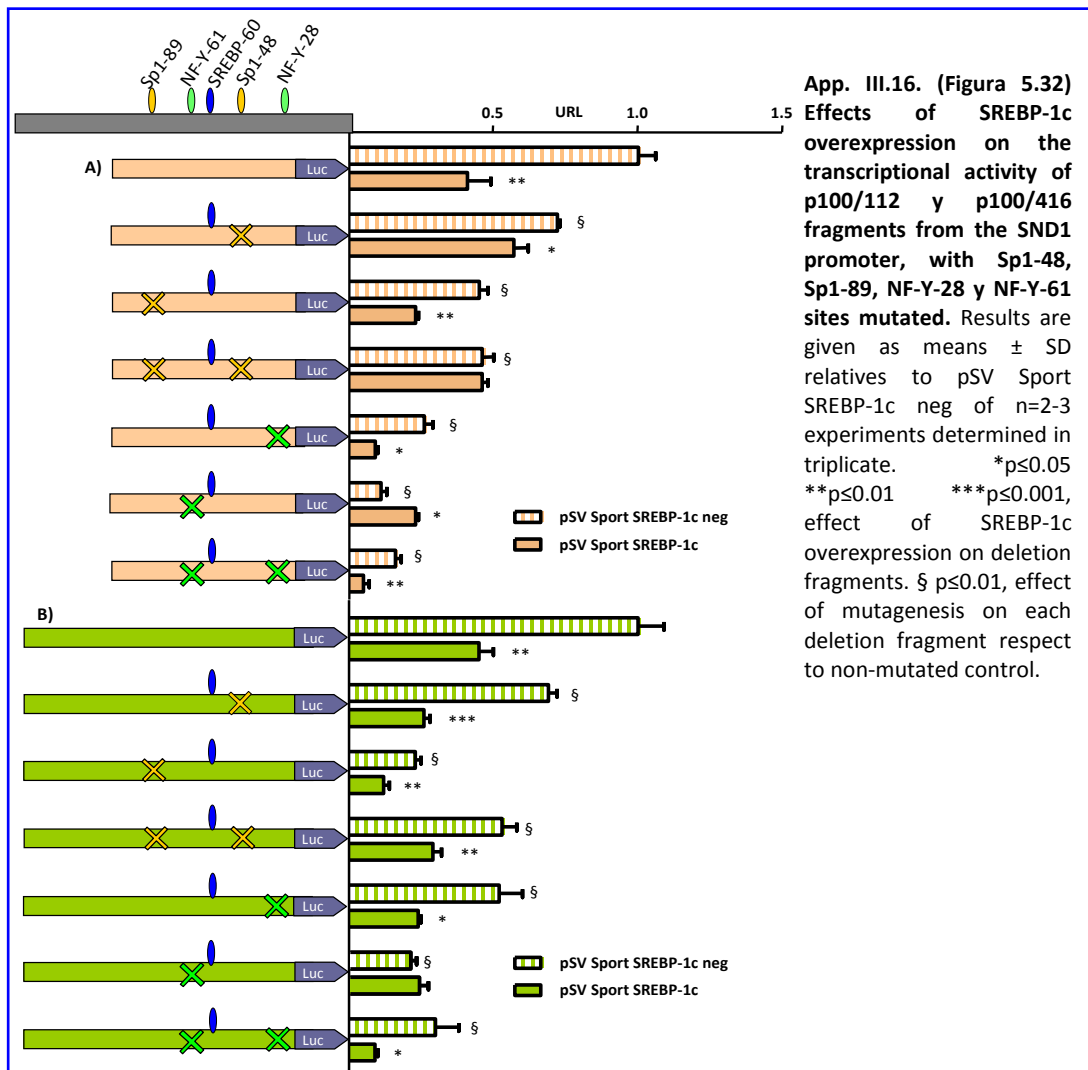
In summary, we could consider that the inhibition of SND1 and SNDp102 promoters by SREBP-1c and the activation by simvastatin treatment might be due to indirect binding of SREBP to these genes, and may require the involvement of other transcription factors could cooperate in the regulatory mechanism.

This finding may be compared with previous studies on 12 α -hydroxylase and 7 α -hydroxylase, where the effect of SREBP on the promoters was reported to occur without direct binding. SREBPs alone are weak transcriptional activators and require the intervention of other factors to enhance their activation potency. In vitro studies have shown cooperation of SREBP with NF-Y for binding to adjacent SRE site (Ericsson et al., 1996). Studies with LDL receptor promoter showed that Sp1 also interacts with SREBPs to form a more stable complex and to

activate transcription (Sanchez et al., 1995; Chakravarty et al., 2005), although it has been found also to prevent the binding of SREBP and in PEPCK-C promoter (Chakravarty et al., 2005).

We investigate whether the binding of Sp1 to GC boxes -89 and -48, or binding of NF-Y to the CCAAT boxes -61 and -48 could cooperate with the binding of SREBP to SRE-60 in the SND1 promoter. Site-directed mutagenesis was performed in GC and CCAAT boxes and the resulting fragments cotransfected in HepG2 cells with the SREBP-1c expression vector (App. III.16).

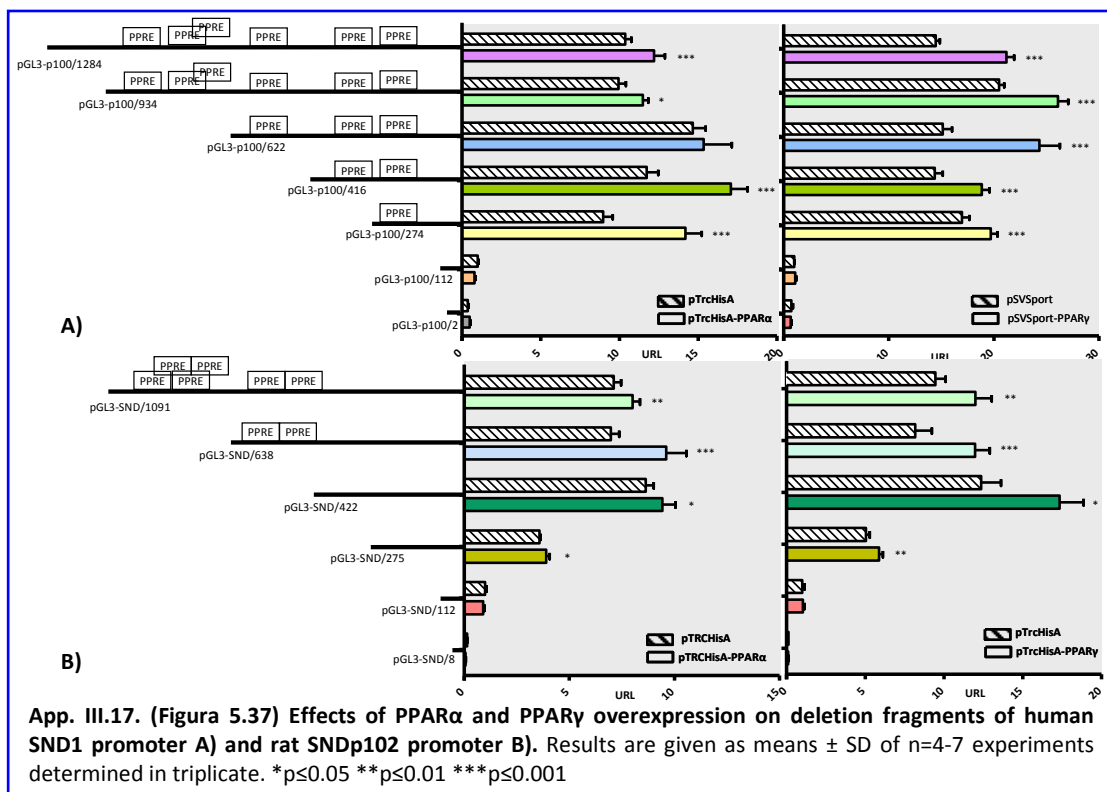
The reduction in the luciferase activity caused by SREBP-1c was maintained in the mutated constructs, with the exception of mutated binding site NF-Y-61, that resulted in enhanced promoter activity in the 112 construct and recovery of the basal activity in the 416 fragment. It was also observed that mutations of two GC boxes -48 and -89 resulted in mitigation of relative luciferase activity in presence of SREBP-1c. The different effect at the longest fragment may be due to the presence of a number of binding sites for Sp1 without mutation.

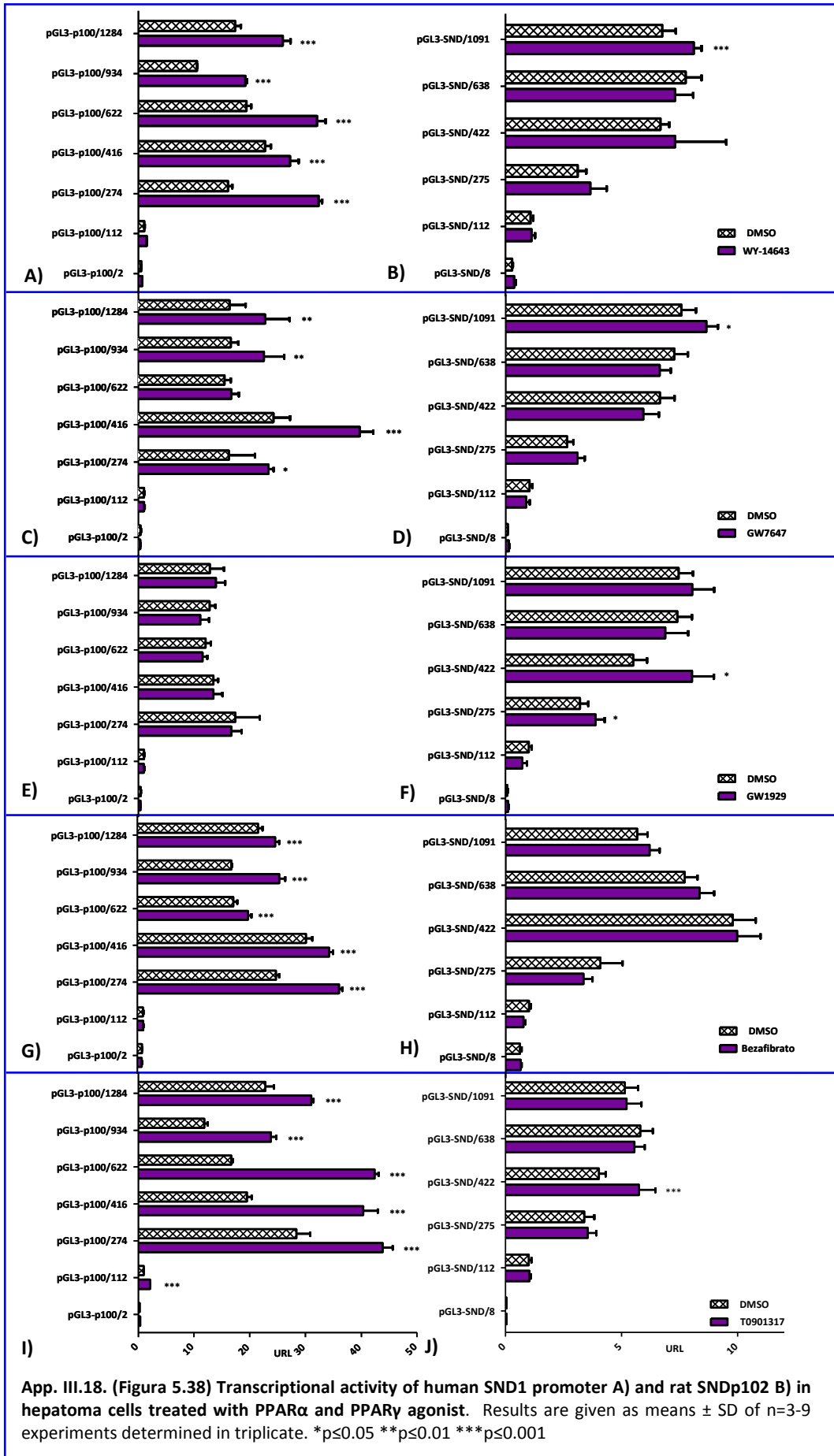


The resulting data suggest that Sp1 and NF-Y could cooperate with SREBP in regulating SND1 gene promoter. Moreover, it has been reported that the relative position of NF-Y and SRE is critical and could change the effect of SREBP binding. Although the results pointed to an indirect union, we can not rule out a direct union of SREBP with SND1 promoter, at least in SRE-60 which are overlapped with NF-Y-61, suggesting that the mutation in the CCAAT box -61 could affect the binding of NF-Y and also perturb the interaction of SREBP-1c, avoiding the inhibitory effect.

III.6 INVOLVEMENT OF PPAR IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN SND1 AND RAT SNDp102 GENES

Another transcription factor related with lipid metabolism is the transcription factor PPAR. Bioinformatic analysis showed that SND1 and SNDp102 gene promoters contain several PPAR-response elements (PPRE). Cotransfection with plasmids encoding PPAR α and PPAR γ and cell treatment with synthetic activators ligands were performed in order to characterize the effect of PPAR transcription factor on promoter activity.





Appendix: English summary

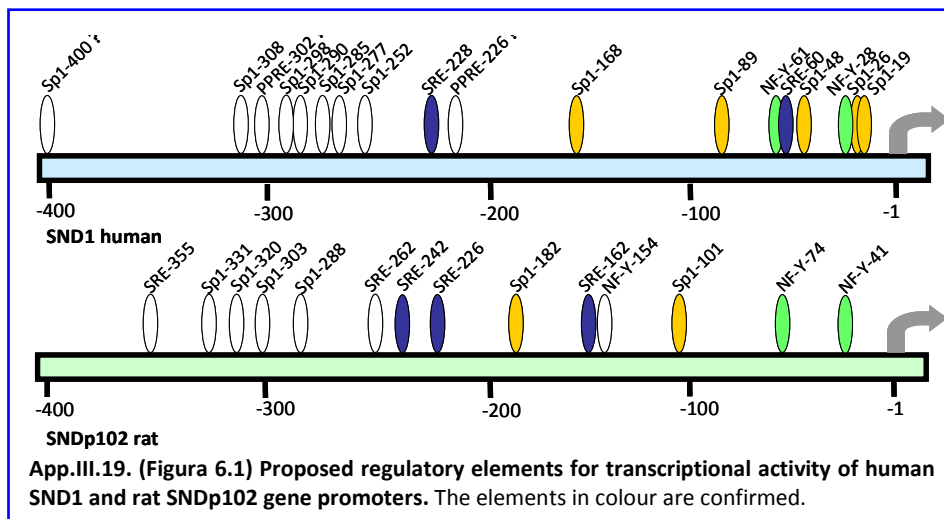
As shown in App. III.17, either isoforms of PPARs enhanced transcriptional activity of both promoters in almost all tested fragments. This stimulatory effect on the promoter activity was correlated to increases in mRNA and protein levels only in the case of human SND1, whereas no modification was detected in rat SNDp102 mRNA and protein.

According to these results, induction of the SND1 gene promoter activity was achieved by the PPAR activators WY-14643, GW7646, bezafibrate and T0901317, but not GW1929, in HepG2 cells; while in most of the cases on the SNDp102 promoter no effect was observed (App. III.18).

The mRNA and protein amount remained unchanged, except for an increase in the SND1 mRNA or protein in response to bezafibrate or T0901317 respectively. T0901317 produces an increase in both mRNA and protein levels of SNDp102, despite its unchanged transcriptional activity.

These results point to a likely role of PPAR transcription factors on the regulation of human and rat promoters, nevertheless further studies have to be preformed to clarify their implication in the transcriptional and/or posttranscriptional modifications.

The data shown in this work, summarized in the App.III.19 diagram, demonstrates that CCAAT boxes, GC boxes, SRE motifs, and probably PPRE sites, are significant element for transcriptional regulation of both human SND1 and rat SNDp102 genes. Many of these elements are conserved in both promoters, however some specific binding sites could have significance in the differences of transcriptional activities of human and rat promoters.



IV CONCLUSIONS

- 1- We have isolated a sequence of 3,808 pb corresponding to the promoter region of the human SND1 gene. It is a TATA-less promoter and contains a CpG island in the region (-881,+316).
- 2- Core promoter activity is located between nucleotide -112 and +221, and the maximum transcriptional activity corresponds to the region (-274, +221).
- 3- Binding of Sp1 and NF-Y to GC boxes and inverted CCAAT boxes are crucial in the mechanism that specifically regulates human SND1 and rat SNDp102 gene transcription.
- 4- Overexpression of SREBP-1c inhibits the transcriptional activity of SND1 and SNDp102 gene promoters. Despite no complex SREBP-DNA was observed by EMSA assays, ChIP analysis confirmed the binding of SREBP-1 and -2 to the human and rat promoters in a SRE/E-box containing region.
- 5- Site-directed mutagenesis points to cooperation of Sp1 and NF-Y binding sites with SRE-60 in human SND1 proximal promoter.
- 6- Overexpression of PPAR α and PPAR γ stimulates transcriptional activity of SND1 and SNDp102 promoters. In addition, cell treatment with PPARs synthetic ligands causes an increase in transcriptional activity in the human promoter, but not in the rat promoter.

*A veces podemos pasarnos años sin vivir en absoluto,
y de pronto, toda nuestra vida se concentra en un solo instante.*

- Oscar Wilde -

