



Centre d'Investigacions en
Bioquímica i Biologia Molecular
CIBBIM

Tesi Doctoral

**NOUS ASPECTES EN LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN QUE
CODIFICA PER LA KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN EN RELACIÓ
A LA SEVA ESPECIFICITAT DE TEIXIT I CONTROL HORMONAL**

Realitzada per

Neus Teixidó i Travesa

Per tal d'optar al grau acadèmic de Doctora

Treball realitzat al Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM)
de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron sota direcció de

Dra. Anna Meseguer i Navarro

Tesi adscrita al Departament de Genètica, programa de Genètica (Bienni 2002-2004), de la
Universitat de Barcelona.

Tutora: Dra. Susana Balcells i Comas

Neus Teixidó i Travesa

Dra. Anna Meseguer i Navarro

Dra. Susana Balcells i Comas

Barcelona, Abril de 2007

a la mare

al pare

al Marc, la Mariona i la Gemma

Per ser la millor família que es pot tenir

al Guillermo

Per ensenyar-me a viure

ÍNDEX

Llistat d'abreviatures.....	7
INTRODUCCIÓ.....	11
1. La transcripció gènica.....	11
1.1 Mecanisme general de transcripció gènica eucariota.....	11
1.2 Control Transcripcional de l'expressió gènica a eucariotes.....	11
1.2.1 Elements reguladors del gen: el promotor eucariota.....	12
1.2.2 Transcripció basal: maquinària general de transcripció.....	13
1.2.3 Regulació de la transcripció basal.....	14
• Factors de transcripció seqüència específics.....	14
• Coreguladors transcripcionals.....	16
2. Les hormones en el control de l'expressió gènica.....	17
2.1 Consideracions generals.....	17
2.2 Les hormones esteroïdals com a reguladores de l'expressió gènica.....	19
2.3 Els andrògens.....	20
2.3.1 Bioquímica, biosíntesi i respostes biològiques.....	20
2.3.2 El ronyó com a model per l'estudi de l'acció androgènica.....	22
• Gens regulats per andrògens al ronyó.....	23
2.4 Els glucocorticoides.....	24
• Bioquímica, biosíntesi i respostes biològiques.....	24
3. La superfamília dels receptors nuclears.....	25
3.1 Característiques estructurals.....	26
3.2 Interaccions amb el DNA.....	28
3.3 El receptor d'andrògens.....	29
3.3.1 Estructura del receptor d'andrògens.....	29
3.3.2 Modulació de l'activitat del receptor d'andrògens.....	31
• Modificacions post-traduccional del receptor d'andrògens.....	31
• Coreguladors del receptor d'andrògens.....	31
3.3.3 Unió selectiva del receptor d'andrògens al DNA.....	32
3.4 El receptor de glucocorticoides.....	34
3.4.1 Estructura del receptor de glucocorticoides.....	35
3.4.2 Regulació de la transcripció per GR.....	35

3.4.3	Modulació de l'activitat del receptor de glucocorticoides.....	36
3.4.4	Relacions entre AR i GR.....	37
3.5	Steroidogenic Factor-1 (SF-1).....	38
3.5.1	Estructura de SF-1.....	39
3.5.2	Regulació de la transcripció per SF-1.....	39
3.5.3	Gens regulats per SF-1.....	39
3.5.4	Coreguladors de SF-1: l'Helicasa DDX20.....	40
4.	Els factors de transcripció Sp.....	41
4.1	Estructura dels factors Sp.....	42
4.2	Sp1: <i>Specificity Protein-1</i>	43
4.2.1	Regulació de la transcripció per Sp1.....	43
4.2.2	Interaccions d'Sp1 amb altres factors de transcripció.....	45
4.2.3	Interacció d'Sp1 amb els receptors nuclears: Sp1i AR.....	47
4.3	Sp3: <i>Specificity Protein-3</i>	47
4.3.1	Regulació de la transcripció per Sp3.....	48
4.3.2	Interaccions d'Sp3 amb altres factors de transcripció.....	49
5.	Els factors de transcripció <i>CAAT/Enhancer Binding Proteins</i>	49
5.1	Estructura dels factors C/EBP.....	49
5.2	Distribució tissular dels factors C/EBP.....	50
5.3	Regulació de la transcripció per C/EBPs.....	51
5.4	Regulació de l'Activitat de C/EBPs: C/EBP α i C/EBP β	52
•	C/EBP α	52
•	C/EBP β	52
6.	Els factors de transcripció GATA.....	53
6.1	Distribució tissular dels factors GATA.....	53
6.2	Els factors GATA al ronyó: GATA-3.....	54
7.	El ronyó.....	55
7.1	Estructura renal.....	56
•	La nefrona.....	56
7.2	El túbul proximal.....	57
7.3	El model cel·lular: la línia cel·lular PCT.....	59
8.	La <i>Kidney Androgen-regulated Protein</i> (KAP).....	60
8.1	La proteïna KAP.....	60
8.1.1	Característiques principals.....	60

8.1.2 La funció de KAP: indicis del seu paper en cicle cel·lular i protecció enfront la nefrotoxicitat.....	62
8.1.3 Regulació posttraduccional de la proteïna KAP: la importància de controlar-ne els nivells.....	63
8.2 L'mRNA de la KAP: expressió i distribució tissular.....	65
8.3 Regulació hormonal del gen de la KAP.....	66
8.3.1 El promotor del gen de la KAP.....	66
• Ús del promotor del promotor del gen de la KAP en transgènics.....	68
8.3.2 Regulació del gen de la KAP a les cèl·lules S3.....	68
8.3.3 Regulació de l'expressió del gen de la KAP als segments S1/S2 i a la línia cel·lular PCT3 que en deriva.....	70
• Regulació per andrògens.....	70
• Regulació per T ₃ : desenvolupament postnatal.....	71
• Mecanismes moleculars de la regulació del gen de la KAP per T ₃ : C/EBPs	72
• C/EBP α i β al promotor del gen de la KAP.....	74
OBJECTIUS.....	79
MATERIALS.....	83
1. Animals i teixits.....	83
1.1 Ratolins (<i>Mus musculus</i>).....	83
1.2 Procediment quirúrgic.....	83
1.2.1 Extracció de teixits.....	83
2 Línies cel·lulars.....	83
2.1 Cèl·lules.....	83
• PKSV-PCT.....	83
• COS-1.....	84
2.2 Medis de cultiu.....	84
• Medi PKSV-PCT.....	85
• Medi COS-1.....	85
3 Soques bacterianes.....	85
4 Vectors i constructes.....	86
4.1 Vectors.....	86
4.2 Constructes.....	87
5 Oligonucleòtids.....	88
5.1 Assajos de retard en gel (EMSA).....	88

5.2	Amplificació per PCR o RT-PCR.....	89
5.3	Mutagènesi dirigida.....	90
5.4	RT-PCR/ <i>Southern</i>	90
6	Anticossos.....	91
7	Reactius químics.....	92
8	Instrumentació i aparells.....	92
MÈTODES		97
1.	Purificació d'àcids nucleics	97
1.1	Extracció de RNA total	97
1.1.1	Mètode Chomczynski-Sacchi.....	97
1.1.2	Extracció d'RNA amb el <i>kit RNeasy</i> de QUIAGEN.....	98
1.2	Purificació de DNA plasmídic	98
1.2.1	Purificació a petita escala de DNA plasmídic (<i>Miniprep</i>).....	98
1.2.2	Purificació a gran escala de DNA plasmídic (<i>Maxiprep</i>).....	99
1.3	Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa	99
1.4	Purificació dels productes de PCR o RT-PCR	99
2.	Anàlisi d'àcids nucleics	99
2.1	Electroforesi en gels d'agarosa	99
2.1.1	Electroforesi analítica.....	100
2.1.2	Electroforesi preparativa.....	100
2.2	<i>Southern blot</i>	100
2.3	Amplificació d'àcids nucleics	102
2.3.1	PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>).....	102
2.3.2	RT-PCR (<i>REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION</i>).....	104
2.3.3	Mutagènesi dirigida.....	104
2.4	Seqüenciació de DNA	105
3.	DNA recombinant	106
3.1	Clonatge i subclonatge de DNA	106
3.1.1	Clonatge de productes de PCR	107
	• Preparació de l'insert.....	107
	• Lligació de l'insert amb el vector pCR®2.1-TOPO®.....	107
3.1.2	Subclonatge de DNA	108
	• Digestió del DNA.....	108
	• Defosforilació del vector.....	109
	• Purificació del DNA a clonar.....	109
	• Lligació entre l'insert i el vector a clonar.....	109

3.2	Transformació de bacteris competents.....	110
3.2.1	Preparació de bacteris competents per transformar per xoc tèrmic.....	110
3.2.2	Transformació per xoc tèrmic.....	111
	• Soca BL21(DE31)pLys.....	111
	• Soca <i>One-Shot</i> [®] TOP10.....	111
4.	Cultius cel·lulars i transfeccions.....	112
4.1	Cultius cel·lulars.....	112
4.1.1	Línies i medis de cultiu.....	112
4.1.2	Tripsinització.....	112
4.1.3	Recompte de cèl·lules.....	113
4.1.4	Conservació de cèl·lules.....	113
4.1.5	Descongelació de cèl·lules.....	114
4.1.6	Depleció d'esteroides del sèrum fetal.....	114
4.2	Transfecció transitòria.....	115
4.3	Transfecció transitòria de construccions reporteres.....	116
4.4	Assaig de gens reporters.....	118
4.4.1	Assaig d'activitat luciferasa.....	118
4.4.2	Assaig d'activitat SEAP.....	119
5.	Extracció de proteïnes.....	121
5.1	Extracció de proteïnes totals.....	121
5.1.1	Extracció de proteïnes totals a partir de cultiu cel·lular.....	121
5.1.2	Extracció de proteïnes totals a partir de teixit.....	122
5.2	Extracció de proteïnes nuclears.....	122
5.2.1	Extracció de proteïnes nuclears a partir de cultiu cel·lular.....	123
5.2.2	Extracció de proteïnes nuclears a partir de teixit.....	124
6.	Expressió proteïca <i>in vitro</i> : traducció <i>in vitro</i> mitjançant reticulòcits de conill.....	126
7.	Tècniques immunològiques.....	127
7.1	Anàlisi de proteïnes per SDS-PAGE i <i>Western Blot</i>	127
7.1.1	Electroforesi en gels d'acrilamida.....	127
7.1.2	Electrotransferència de proteïnes: <i>Western Blot</i>	128
8	Tècniques d'interacció DNA-Proteïna.....	130
8.1	Assaig de retard en gel (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>).....	130
8.1.1	Marcatge radioactiu dels oligonucleòtids i <i>annealing</i>	130
8.1.2	Purificació de les sondes radioactives.....	131
8.1.3	Anàlisi de retard en gel (<i>Shift</i> i <i>Supershift</i>).....	132
8.2	Cromatografia d'afinitat.....	134
Annex:	composició de tampons i medis.....	136

RESULTATS.....	141
1. Regulació androgènica del gen de la KAP: Solapament entre ARE i TATA.....	141
1.1 Anàlisi de la unió d'AR a l'element de resposta a andrògens.....	141
1.2 Anàlisi de la funcionalitat de la putativa caixa TATA.....	143
2. Estudi d'una caixa GC al promotor del gen de la KAP.....	146
2.1 Estudi de la funcionalitat de la caixa KAP GC: Assajos de <i>Binding</i>	146
2.2 Estudi de la presència dels membres Sp1/Sp3 en les cèl·lules PCT3.....	149
2.3 Anàlisi del paper regulador dels factors Sp1 i Sp3 en el gen de la KAP.....	151
2.4 Estudi de la relació funcional entre AR/Sp1 al promotor del gen de la KAP...	154
3. Anàlisi de les caixes -429 i -457 com a putatius lloc d'unió per C/EBPs.....	155
3.1 Estudi de la unió de C/EBP α i C/EBP β en extractes nuclears de PCT3.....	155
3.2 Estudi de la unió de C/EBP α i C/EBP β en extractes nuclears de ronyó.....	158
4. Estudi del factor que uneix la seqüència -429 del promotor del gen de la KAP.....	161
4.1 Predicció <i>in silico</i> TFSEARCH: Anàlisi de la possible unió per GATA-3.....	162
4.1.1 Estudi de l'expressió dels factors GATA a la línia cel·lular PCT3.....	162
4.1.2 Anàlisi de la putativa unió de GATA-3 a la caixa -429.....	164
4.2 Cromatografia d'afinitat de DNA: Anàlisi de la possible unió per SF-1.....	165
4.2.1 Cromatografia d'afinitat: l'RNA Helicasa DDX20.....	165
4.2.2 Anàlisi de la putativa unió d'SF-1 a la caixa -429.....	167
4.3 Predicció <i>in silico</i> TESS: Anàlisi de la possible unió per GR.....	171
4.3.1 Inducció del promotor proximal del gen de la KAP per GR i dexametasona.....	172
4.3.2 Estudi de la unió de GR a l'ARE i la caixa -429 del promotor del gen de la KAP.....	174
4.3.3 Inducció del promotor proximal del gen de la KAP per andrògens i glucocorticoides.....	175
5. Anàlisi de la interrelació entre els diferents elements reguladors de l'activitat transcripcional del promotor proximal del gen de la KAP.....	177
DISCUSSIÓ.....	185
CONCLUSIONS.....	209
BIBLIOGRAFIA.....	213
ANNEX.....	237

ABREVIATURES

aa	aminoàcid
b, kb	base, kilobase
bp	parells de bases
cDNA	DNA còpia d'un mRNA obtingut per transcripció reversa
Ci	Curie
Da, kDa	Dalton, kilodalton
Dex	dexametasona
DHT	dihidrotestosterona
DNA	àcid desoxirribonucleïc
g	gram
h	hora
m	metre
M	molar
min	minut
mRNA	RNA missatger
o/n	<i>overnight</i>
RNA	àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
RT	temperatura ambient
s	segon
UV	ultraviolat
Vf	volum final

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. LA TRANSCRIPCIÓ GÈNICA

1.1 Mecanisme General de la Transcripció Gènica Eucariota

La transcripció gènica és el procés pel qual la informació genètica codificada al DNA és copiada en forma de RNA. En el cas del DNA codificant per proteïnes la transcripció suposa l'inici d'un procés que es coneix com a expressió gènica que ve seguit del processament i maduració del RNA primari a mRNA, el transport d'aquest al citoplasma i

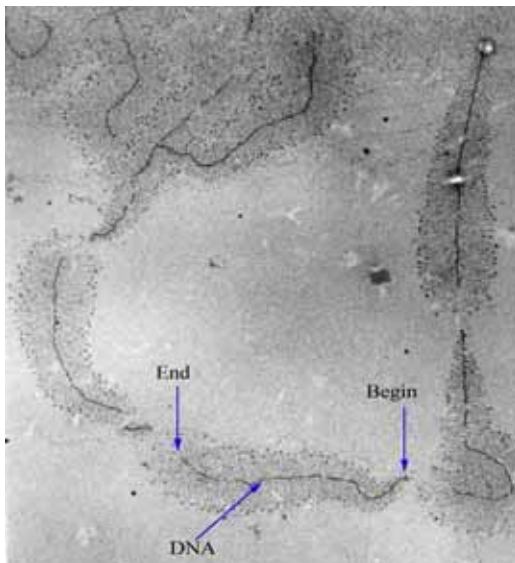


FIGURA 1. Transcripció eucariota.

Microfotografia que mostra la transcripció eucariota d'un gen codificant per a RNA ribosomal *Begin* indica l'extrem 5' del DNA on s'inicia la síntesi del RNA i s'aprecien transcrits encara petits *End* indica l'extrem 3' del gen on els transcrits primaris són ja quasi complets. Adaptat d'Alberts *et al*, 2002

la traducció finalment per part dels ribosomes del codi genètic contingut en l'mRNA a un pèptid o proteïna.

La regulació de l'expressió gènica (regulació gènica) és el control cel·lular de la quantitat i la freqüència de producció (*inducció*) del producte funcional d'un gen. Qualsevol punt del procés d'expressió gènica pot ésser modulats, des del pas de la transcripció DNA-RNA, passant per l'estabilitat del mRNA i fins a les modificacions post-traduccionals d'una proteïna. La regulació gènica permet el control cel·lular de l'estructura i funció i resulta la base de la diferenciació cel·lular, la morfogènesi i la versatilitat, idiosincràsia i adaptabilitat de qualsevol organisme.(Maniatis *et al.*, 2002).

1.2 Control Transcripcional de l'Expressió Gènica a Eucariotes

El control de la transcripció es produeix mitjançant regions de DNA en molts casos no codificants que generalment es troben prèviament al punt d'inici de la transcripció dels gens i que en constitueixen la denominada *regió reguladora*. En aquestes zones, hom troba elements de DNA que donada la seva característica seqüència serveixen de punts d'ancoratge als factors de transcripció.

Els factors de transcripció són proteïnes que en unir-se a les seves seqüències diana a les regions reguladores dels gens faciliten o inhibeixen la transcripció. Mitjançant aquest procés regulen doncs l'expressió gènica.

La regió reguladora d'un gen sol incloure el segment de DNA que precedeix immediatament el punt d'inici de la transcripció del gen, el *promotor* i regions reguladores de la transcripció distals, localitzades varies kilobases abans o després del punt d'inici de la transcripció, els *enhancers*. A les seves regions reguladores els gens eucariotes presenten conjunts complexos de seqüències de DNA que combinen elements comuns pel promotor amb elements *enhancer* àmpliament diversificats i gen específics que hi cooperen per a definir perfils d'expressió gènica específica. (Kadonaga *et al.*, 1998).

1.2.1 Elements reguladors del gen: El Promotor Eucariota

La regió nucli o *core* dels promotors eucariotes inclou els 35 nt anteriors i posteriors a l'inici de transcripció, i és reconeguda per la RNA polimerasa II i la maquinària basal de transcripció. Dins la seva seqüència el promotor *core* sol contenir elements de DNA com la caixa TATA, l'element iniciador (Inr), el *Downstream Core Promoter Element* (DPE) i el *TFIIB Recognition Element* (BRE). Els promotors però no solen contenir tots aquests elements de manera simultània. Contràriament, en lloc de ser un lloc passiu per a l'ensamblatge de la maquinària basal de transcripció, el *core* i la seva composició pot determinar, per exemple, quin *enhancer* cooperarà o no amb el promotor (Ohtsuki *et al.*, 1998).

La caixa TATA es troba aproximadament en un terç dels promotors humans (Suzuki *et al.*, 2001), situada entre -25 i -30 de l'inici de transcripció i és reconeguda per la *TATA-Binding Protein* (TBP). L'element iniciador conté un o més inicis de transcripció, és unit per les *TBP-Associated Proteins* (TAFIIs) del complex TFIID i per la RNA Polimerasa II i pot funcionar sense la caixa TATA (Evans *et al.*, 2001). L'element DPE es troba generalment als promotors que no tenen caixa TATA (denominats *TATA-less*) localitzat després de l'inici de transcripció, entre +28 i +32 bp. En la transcripció basal DPE-dependent, l'element Inr és necessari per a la interacció de TFIID (Kutach *et al.*, 2002).

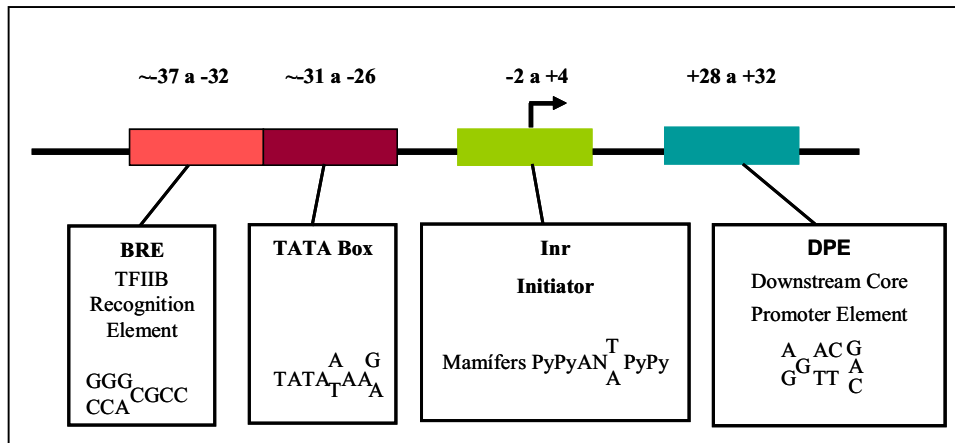


FIGURA 2. Promotor *core* dels gens eucariotes.

Esquema de la regió nucli o *core* dels promotors eucariotes amb les principals seqüències *cis* reguladores que típicament sol o pot contenir en les que s'articula la maquinària basal de transcripció. Adaptat i modificat de Smale i Kadonaga, 2003.

En les proximitats de la regió del promotor *core* (de -100 a -200 bp) trobem en canvi seqüències d'entre 6 ~ 20 nt de llargada (com ara la caixa CCAAT o la caixa Sp1) que típicament contribueixen a l'eficiència de l'inici de la transcripció i que integren el determinat *promotor proximal*.

1.2.2 Transcripció Basal: Maquinària General de Transcripció

La transcripció basal de la polimerasa II és un procés que inclou múltiples etapes, on l'estadi de preiniciació ve seguit de la iniciació, l'elongació, la terminació i el processament del mRNA. S'ha postulat que l'estat de fosforilació del denominat *Carboxy-Terminal Domain* (CTD) de la subunitat grossa de la Pol II determina la progressió al llarg d'aquestes cinc fases del cicle de transcripció. El complex de preiniciació (PIC) està format per la Pol II i en cada promotor diferents conjunts de Factors de Transcripció Generals (GTFs) que són TFIID,-B,-E,-F,-H i -A i (Muller & Tora, 2004). Als promotors TATA-less són els denominats *TBP-like factors* (TLFs) els que juguen papers similars en la regulació transcripcional (Ohbayasi *et al.*, 2003) i és TFIID qui inicia la formació del PIC. Als promotors amb caixa TATA, TBP s'uneix al *core* i estableix tot girant 90° el DNA, una superfície d'unió per a la resta de components de la maquinària de transcripció, mentre altres TAFIIs interaccionen amb l'Inr i el DPE (Chalkley *et al.*, 1999). L'element BRE facilita la unió de TFIIB al complex TBP-DNA i juntament amb TFIIA l'estabilitza. Tot seguit, TFIIB recluta TFIIF juntament amb la polimerasa II i la transcripció s'inicia quan TFIIE i TFIIH s'incorporen al complex de preiniciació (PIC). Es creu que la

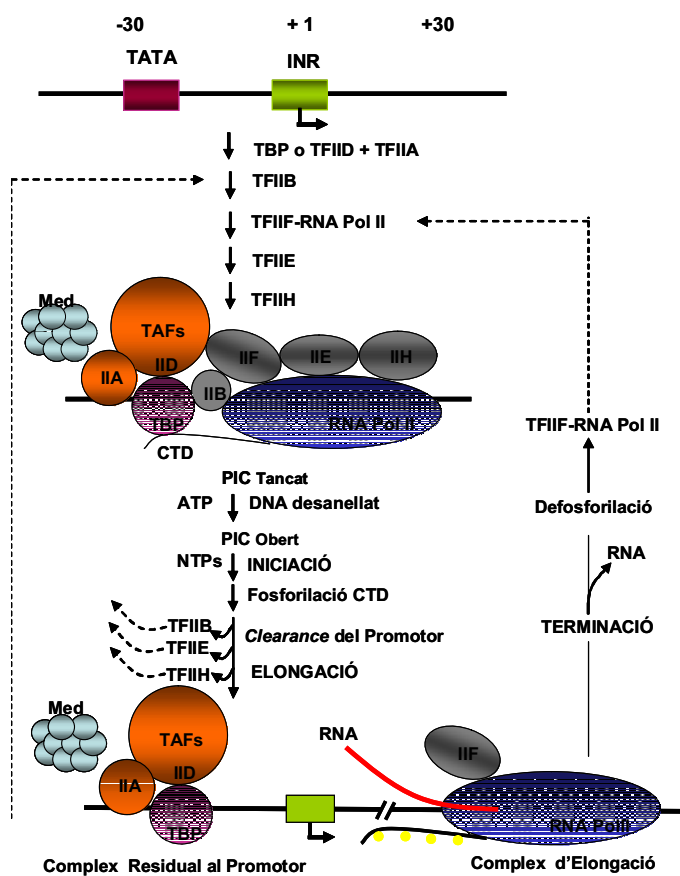


FIGURA 3. Transcripció basal dels gens eucariotes. Esquema que recull els diferents passos de la transcripció basal eucariota. TBP: *TATA-Binding Protein*. TAF: *TBP-Associated Factor*. PIC: Complex de Pre-Iniciació. Med: Mediator. Extret i adaptat de www.biochem.ucl.ac.uk

interacció entre la pol II i el PIC podria estar a més mitjançada pel denominat complex Mediator (Malik & Roeder, 2005). Un cop TFIIF hiperfosforila la polimerasa II al seu domini CTD, aquesta abandona el promotor i entra en la fase d'elongació de la transcripció. El complex PIC romanent (TFIID-TFIIA) i/o el complex Mediator queden al promotor apunt per iniciar un segon PIC. En la fase d'elongació es produeix la defosforilació de la Ser5 del domini CTD de la Pol II i la fosforilació de la Ser2, i es va produint l'aparició de l'mRNA naixent que simultàniament a la seva síntesi va patint els diferents processaments de *5'-capping*, *splicing* d'introns i maduració de l'extrem 3'. La terminació de la transcripció es produeix 4 kb després de senyal de poliA i

suposa la dissociació del DNA de la Pol II i factors d'elongació procés pel qual fa falta la total defosforilació del CTD. D'aquesta manera la Pol II pot ser de nou carregada a la regió promotora (Sims *et al.*, 2004)

1.2.3 Regulació de la Transcripció Basal:

Factors de Transcripció Seqüència Específics

Als eucariotes, hi ha milers de gens codificants per proteïnes la transcripció via Pol II dels quals està predominantment mitjançada per una xarxa de nombrosos factors de

transcripció que s'uneixen al DNA en seqüències específiques. Aquests factors s'uneixen al promotor proximal i a les regions reguladores distals, *enhancers* o *silencers*, localitzades *upstream* del promotor i indueixen o reprimeixen l'expressió del gen a través de la seva associació amb la Pol II, els factors de transcripció generals i cofactors (Tijan & Maniatis, 1994).

Els factors de transcripció són proteïnes per tant que es caracteritzen per presentar un domini d'unió a DNA (DBD) que els permet interaccionar de manera específica amb determinades seqüències. S'han descrit diversos DBDs en diferents factors de transcripció com són per exemple el domini bàsic hèlix-loop-hèlix (bHLH) que es troba al factor de transcripció miogènic D (MyoD) o la cremallera de leucines (bZip) que presenta el factor *Activator Protein-1* (AP-1) (Ma *et al.*, 1994; Glover & Harrison, 1995). El dit de zinc és el domini d'unió característic dels receptors nuclears i es troba també a la Promoter Specificity Protein-1 (Sp1) (Kadonaga *et al.*, 1998). El domini hèlix-loop-hèlix que integra els homeodominis i ETS-dominis es troba al factor Hox8 i al Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) trobem el domini de làmina β (Cho *et al.*, 1994).

De tota manera regions externes al DBD i certes interaccions proteïna-proteïna entre diferents factors de transcripció poden incrementar l'especificitat de la unió al DNA. Així per exemple, els dominis hèlix-loop-hèlix, la cremallera de leucines i el dit de zinc permeten la seva dimerització quan s'uneixen al DNA.

Els factors de transcripció solen estar constituïts a més per mòduls funcionals tals com el domini d'activació (AD) o el domini de repressió (ID). Aquests dominis són regions molt variables que poden actuar de plataforma per a altres reguladors transcripcionals tals com els coactivadors i els corepressors permetent així potenciar o modular l'acció del propi factor de transcripció. Aquest control pot donar-se també a través de regions reguladores com el domini d'unió a lligand dels receptors nuclears que determina l'actuació d'aquests factors sols en presència de l'hormona lligand.

D'altra banda, als factors de transcripció es troben també dominis de di- o multimerització i senyals de localització nuclears (NLS).

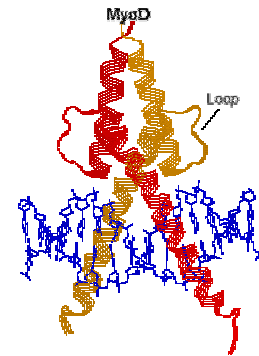


FIGURA 4. Domini bHLH

Representació esquemàtica de la interacció del domini hèlix loop hèlix present al factor MyoD amb el DNA.

Obtingut de www.web-books.com

Coreguladors Transcripcionals

Els coreguladors són proteïnes que interaccionen amb certs factors de transcripció específics de seqüència (sobretot amb els Receptors Nuclears) i que juguen un paper molt important en mitjançar o facilitar els efectes d'aquests factors sobre la maquinària basal de transcripció. Els coreguladors poden potenciar la transcripció gènica, esdevenint coactivadors, o bé reprimir-la, essent llavors corepressors, i exerceixen el seu efecte per interacció directa amb la maquinària basal o bé a través de la modificació de l'estructura de la cromatina circumdant. (McKenna & O'Malley, 2002).

Els coreguladors poden classificar-se en quatre categories (Malik & Roeder, 2005):

- i) **Modificadors covalents d'histones:** inclou les acetiltransferases d'histones (HATs), les metiltransferases d'histones (HMTs) i les desacetilases d'histones (HDACs) enzims tots ells que s'encarreguen respectivament d'afegir grups acetil i metil o eliminar grups acetil de les histones i regular d'aquesta manera l'accés a la cromatina d'altres moduladors transcripcionals. (Schreiber and Bernstein, 2002).
- ii) **Complexos modeladors de la cromatina dependents d'ATP** com per exemple són els membres de la família *Switch/Sucrose Non-Fermentable* (SWI/SNF), els quals disminueixen la condensació de la cromatina i incrementen l'accés a dels reguladors transcripcionals d'una forma no covalent.
- iii) **Mediadors** com TRAP/DRIP que actuen com a factors pont o d'enllaç entre la maquinària basal de transcripció i els factors de transcripció mitjançant interaccions proteïna-proteïna.
- iv) **Coreguladors de funció diversa o desconeguda:** per exemple el *Breast Cancer susceptibility gene* (BRCA1) que amb combinació amb BARD (*BRCA1-Associated RING Domain protein 1*) posseeix activitat ubiquitina ligasa i interacciona amb diversos factors de transcripció actuant com a coactivador per a p53 i AR i com a corepressor pels receptors nuclears no units a lligand (Brzovic *et al.*, 2001). Aquí també hi trobem les proteïnes PIAS (*Protein Inhibitor of Activated Signal transducer and activator of transcription*) que són SUMO ligases capaces de modular l'activitat dels receptors nuclears (Kootaja *et al.*, 2002). Finalment s'inclouen també en aquest grup els corepressors de receptors nuclears N-CoR (*Nuclear Receptor Corepressor*) i SMRT (*Silencing Mediator for RAR and TR*) que uneixen els receptors nuclears no units a lligand i recluten desacetilases d'histones per a silenciar l'expressió gènica (Wen *et al.*, 2000).

Actualment sembla establert que la coactivació i la corepressió transcripcional és el resultat d'un intercanvi dinàmic de diferents i múltiples complexos coreguladors i de la ràpida associació i dissociació dels diversos coreguladors que ocorre de manera temporal i cíclica. (Liu *et al.*, 2004). A més, sembla que no hi ha un ordre específic per a la funció dels coreguladors contràriament, cada promotor disposa del seu propi ordre característic a l'hora de reclutar i desplaçar factors de transcripció i coreguladors.

2. LES HORMONES EN EL CONTROL DE L'EXPRESSION GÈNICA

2.1 Consideracions Generals

Per tal que es produeixi la integritat funcional pròpia dels organismes complexos és necessari el funcionament coordinat de totes les seves cèl·lules. L'establiment d'aquesta coordinació requereix una intrincada xarxa de senyalitzacions, capaç d'orquestrar de manera precisa el funcionament cel·lular. Les senyals endocrines, vehiculades en hormones, representen una d'aquestes principals vies de comunicació entre cèl·lules. Entre totes elles, les hormones esteroïdals constitueixen un grup de productes naturals estructuralment relacionats implicat en el control de processos de desenvolupament i d'altres activitats fisiològiques dels eucariotes.

En base a la seva funció biològica podem identificar tres tipus principals d'esteroides: Esteroides suprarenals, glucocorticoides i mineralcorticoides, involucrats en l'homeòstasi i la resposta a estrès, Esteroides sexuals, andrògens, estrògens i progestàgens, responsables del desenvolupament i manteniment de la funció sexual i Vitamina D i els seus metabòlits derivats, implicats en el metabolisme del fòsfor i el calci. En la següent taula es detallen les principals accions biològiques de les hormones esteroïdals així com les seves característiques bàsiques.

Per tal que les hormones esteroïdals puguin desenvolupar les seves accions biològiques, un cop han estat sintetitzades a les corresponents glàndules endocrines són secretades per aquestes al corrent sanguini a través del qual seran transportades fins als seus teixits diana. Donada la seva naturalesa lipòfila aquest transport es realitza mitjançant l'annexió de les hormones esteroïdals a proteïnes transportadores. Un cop assolit el teixit diana, l'hormona penetra en les seves cèl·lules per difusió simple o bé per mecanismes de transport actiu (Willnow *et al.*, 2002). Els efectes causats i les respostes engegades per

l'hormona ocorren segons el model clàssic *genòmic* i de manera principal, mitjançant la regulació transcripcional que els receptors intracel·lulars de l'hormona, els receptors nuclears, exerceixen en unir-s'hi (Beato *et al.*, 1996). Les hormones per tant, realitzen les seves accions modulant la transcripció gènica en les cèl·lules diana i constitueixen en aquest sentit un dels principals mecanismes de regulació gènica a eucariotes. En els darrers anys però, han anat creixent les evidències de l'existència de respostes més ràpides, *no genòmiques* de les hormones esteroïdals que vindrien mitjançades per la seva intervenció en vies de senyalització cel·lular (Wehling *et al.*, 2006).

TAULA 1. Característiques principals i accions biològiques de les hormones esteroïdals

Tipus d'Esteroides	Hormona	Origen	Teixits diana	Accions principals
ESTEROIDES ADRENALS	Glucocorticoides (ex. cortisol)	Glàndules Suprarenals	múscul, fetge	resposta a l'estrès / síntesi de glicogen / lipòlisi
	Mineralcorticoides (ex. aldosterona)	Glàndules Suprarenals	Ronyó	retenció d'aigua i sodi/ excreció de potassi
ESTEROIDES SEXUALS	Andrògens (ex. testosterona)	Testicle, còrtex suprarenal	Sistema reproductor, organisme	desenvolupament i diferenciació embrionaris / caràcters sexuals masculins secundaris / reproducció efectes anabòlics
	Estrògens (ex. estrona)	Ovari, placenta	Sistema reproductor, organisme	desenvolupament i diferenciació embrionaris / caràcters sexuals femenins secundaris/ reproducció
	Progestàgens (ex. progesterona)	Ovari, placenta	Sistema reproductor, organisme	manteniment de l'embaràs
VITAMINA D i derivats metabòlics	Vitamina D	Fetge, pell, ronyó	Intestí, os	control del metabolisme del calci i el fòsfor

Adaptat i modificat de Bolander, 2004.

2.2 Les Hormones Esteroïdals com a Reguladores de l'Expressió Gènica

Per tal d'exercir els seus efectes sobre la transcripció, les hormones esteroïdals interaccionen en l'interior cel·lular amb els seus receptors específics, els Receptors Nuclears que essent factors de transcripció i veure's activats per la presència del seu lligand, desenvoluparan les seves accions reguladores sobre la transcripció gènica.

La figura 5 resumeix esquemàticament les etapes necessàries per fer efectiva l'acció de l'hormona: l'hormona circula en el torrent sanguini unida a proteïnes transportadores de les quals es dissocia per penetrar en la cèl·lula; l'hormona travessa la membrana plasmàtica per difusió simple i en certs casos per exportació o captació activa. Un cop dins la cèl·lula

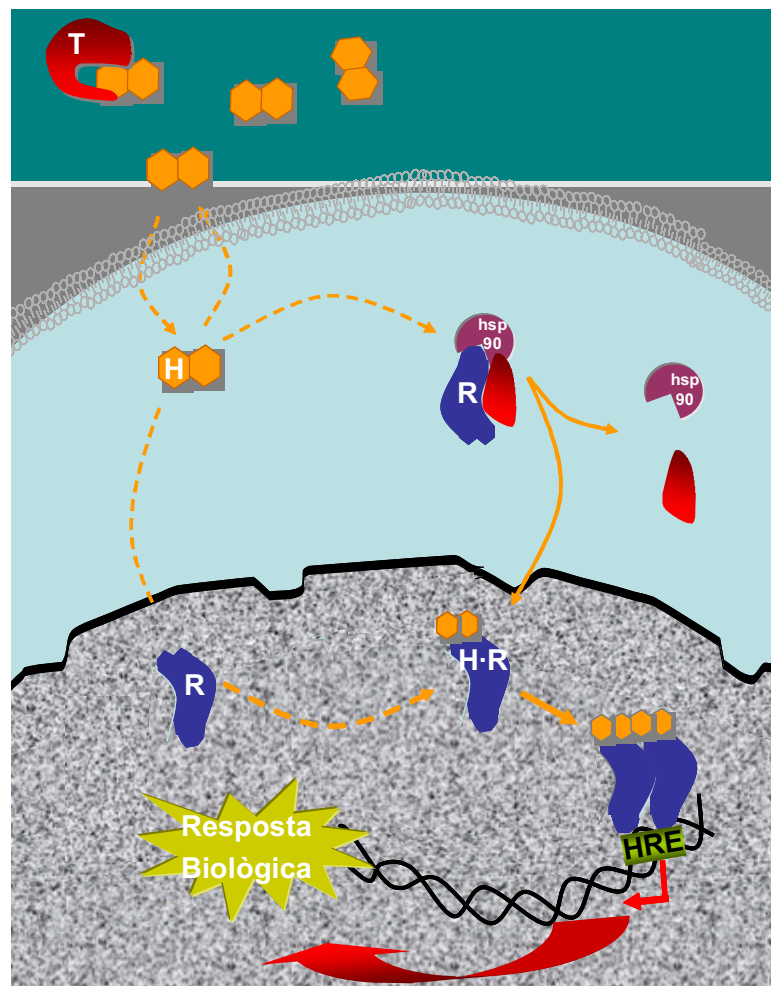


FIGURA 5. Mecanisme d'acció de les hormones esteroïdals.

Les hormones (H) circulen majoritàriament unides a proteïnes transportadores (T), penetren dins la cèl·lula per difusió, i s'uneixen als seus receptors específics (R) que poden estar localitzats al nucli al citoplasma. El complex receptor-hormona (R·H) es transloca al nucli quan cal, i dimeritza. El dímer s'uneix posteriorment als elements de resposta específics (HRE) i provoca la transactivació del gen.

L'hormona interacciona amb el seu receptor, el mediador de l'acció hormonal. La localització dels receptors abans d'unir-se a l'hormona és variable i mentre el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor d'andrògens (AR) o el receptor d'estrògens (ER) es troben en equilibri dinàmic entre el nucli i el citoplasma, el receptor retinoic X (RXR), receptor de l'hormona tiroïdal (TR) o el receptor de l'àcid retinoic (RAR) per exemple es troben permanentment al nucli (Tsai *et al.*, 1994). En absència de lligand els receptors més grossos –AR, GR, etc- es troben en forma de monòmers acomplexats amb proteïnes de plegament xaperones, Hsp90 i Hsp70, i amb immunofil·lines, Hsp 56 i Hsp 59, que els mantenen en estat inactiu. La unió del lligand hormonal al receptor provoca la dissociació de les xaperones associades i un conseqüent canvi conformacional que el fa apte per poder unir amb elevada afinitat els seus llocs acceptors en el DNA situats als promotors dels seus gens diana, els denominats Elements de Resposta a Hormona (HRE). Un cop unit a la regió reguladora del gen, el receptor participarà en la transcripció modulant la síntesi de mRNA i producció de proteïnes que alteraran la funció, creixement, senyalització o diferenciació cel·lular, canalitzant per tant els efectes genòmics de les hormones esteroïdals.

Altres receptors de mida inferior com TR o RXR i la majoria dels receptors orfes, no s'associen a xaperones en absència de lligand i es troben inactius directament units com a monòmers o dímers als seus HRE. La unió a la hormona els indueix el canvi conformacional necessari per a activar-los i permetre la seva intervenció en la regulació dels seus gens diana.

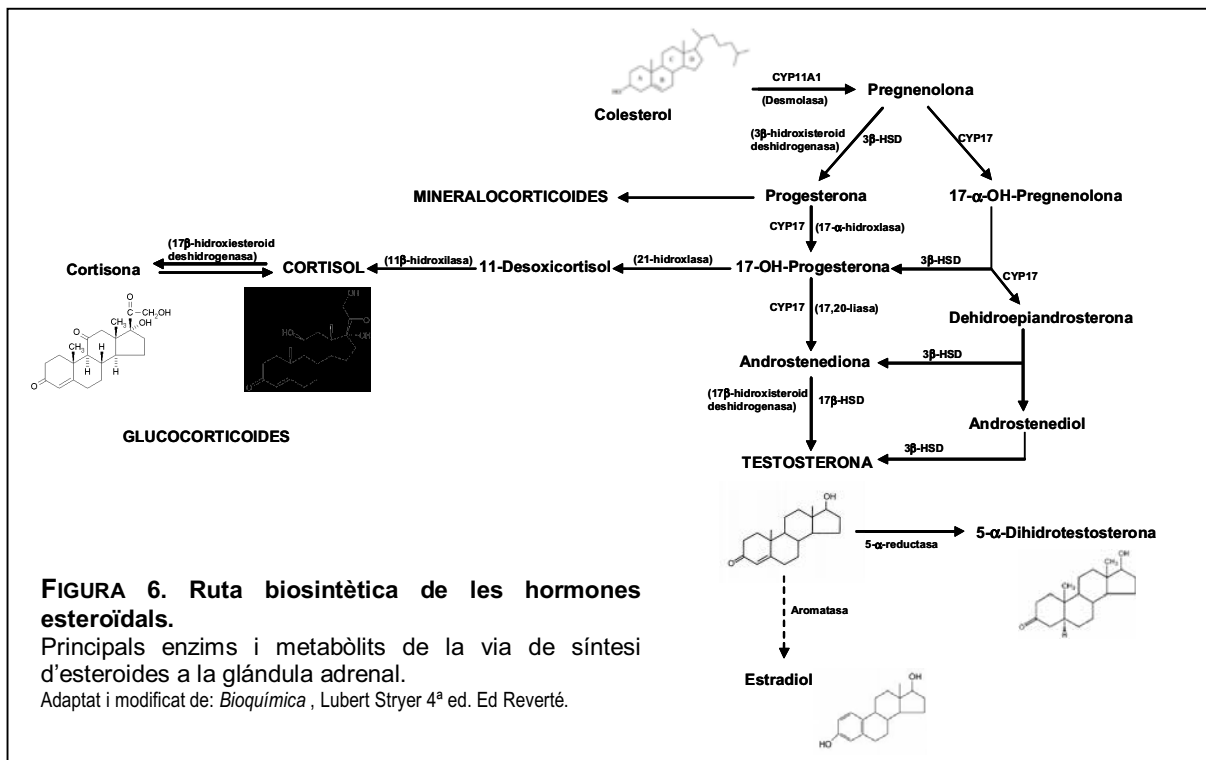
2.3 Els Andrògens

2.3.1 Bioquímica, Biosíntesi i Respostes Biològiques

Com ja s'ha dit, els andrògens són les hormones implicades en l'establiment de la funció reproductora masculina. Però a més d'induir la diferenciació i maduració dels òrgans reproductius i el desenvolupament dels caràcters sexuals secundaris, les hormones androgèniques regulen un ampli nombre d'esdeveniments fisiològics des de la modificació de l'expressió gènica fins al control del creixement i diferenciació cel·lular tant dins dels teixits reproductius com dels no reproductius dels mamífers. Estructuralment es caracteritzen per ser esteroides de 19 carbonis amb un nucli de ciclopentperhidrofenantré que conté un grup funcional oxigenat al carboni-3 i al carboni-17. Les dues hormones esteroïdals més importants en el mascle adult són la testosterona (T) principal androgen

produït pels testicles, i el seu derivat 5 α -dihidrotestosterona (DHT). En les femelles els ovaris i la placenta sintetitzen traces de testosterona i l'escorça suprarenal pot produir esteroides en determinades circumstàncies en ambdós sexes.

El precursor dels esteroides és el colesterol que, adquirit per dieta o per síntesi endògena entra en la ruta biosintètica de formació de testosterona als testicles i al còrtex suprarenal per acció de l'enzim desmolasa que en catalitza la seva transformació a pregnenolona. La conversió subseqüent de pregnenolona fins a testosterona requereix



d'una sèrie de quatre reaccions que poden transcórrer en dues rutes paral·leles: en l'anomenada Δ^5 s'obté com a intermediari la 17-hidroxipregnenolona i en la via Δ^4 en canvi s'obté 17-hidroxiprogesterona. Mentre que als testicles humans preval la via Δ^5 als rosegadors predomina la Δ^4 (Griffin *et al.*, 1998). Tot aquest conjunt de reaccions està catalitzat per membres de la família dels citocroms P450 (CYP). La testosterona és l'hormona principal sintetitzada en aquesta ruta tot i que per acció de l'enzim aromataasa pot derivar en estradiol i l'acció de la 5- α -reductasa present a la majoria de teixits perifèrics de l'organisme la transforma a dihidrotestosterona.

2.3.2 El Ronyó de Ratolí com a Model per l'Estudi de l'Acció Androgènica

Els andrògens actuen als teixits diana reproductors en una gran varietat de teixits no reproductors, com el teixit ossi, l'adipós, el nerviós, el múscul esquelètic, la pròstata, el fetge i el ronyó (Wu, 1997).

El ronyó de ratolí és un dels teixits extragonadals més androgen-dependent (Lund *et al.*, 1991) i ofereix un seguit de característiques que faciliten l'estudi dels efectes androgènics a nivell de transcripció gènica:

1) Els andrògens promouen al ronyó un efecte hipertròfic amb baixa estimulació de la síntesi de DNA (Berger *et al.*, 1989). Aquests efectes específics, probablement no reflecteixen diferències en els mecanismes d'acció androgènica sinó en la identitat dels gens diana.

2) La *testosterona 5 α -reductasa* presenta una activitat mínima, motiu pel qual la generació de DHT al teixit és limitada. Al ronyó de ratolí l'efector fisiològic del fenotip androgènic és la testosterona (Catterall, *et al.*, 1986) simplificant la interpretació de les dades en l'estudi dels efectes primaris dels andrògens en les cèl·lules diana.

3) Els andrògens indueixen l'expressió d'un nombre variat de gens fins a nivells òptims per a ser analitzats. Dins del ronyó, el principal lloc d'acció de l'hormona són les cèl·lules epitelials del túbul proximal on estimulen la hipertròfia (Berger *et al.*, 1989).

4) Existeix una àmplia disponibilitat de soques de ratolí genèticament defectives per determinats gens, com la Tfm/Y que presenta una alteració en el receptor d'andrògens (AR) que el fa insensible a l'hormona. D'altra banda, el ratolí ha demostrat ésser útil en l'anàlisi de l'expressió gènica, permet una fàcil manipulació i la possibilitat de realitzar múltiples intervencions quirúrgiques i farmacològiques.

El fenotip masculí d'un determinat teixit diana es pot interpretar com la conseqüència de la suma d'expressions dels diferents gens regulats pels andrògens. Cal esmentar que dins d'una mateixa cèl·lula existeixen variacions en les cinètiques de resposta i temps d'inducció entre els diferents gens regulats pels andrògens (Catterall *et al.*, 1986), suggerint que la interacció del receptor d'andrògens amb cada gen diana és única ja sigui per la diferent afinitat d'unió, la configuració local de la cromatina, o pel requeriment de diferents quantitats de receptor i proteïnes accessòries per induir cada resposta. Entendre les bases moleculars d'aquest control genètic és de considerable interès i ha esdevingut particularment important en l'estudi de la genètica i l'evolució dels patrons d'expressió gènica en els organismes superiors (Asadi *et al.*, 1994)

El dimorfisme sexual en el ronyó es manifesta en diferents aspectes tant a nivell morfològic com molecular, i s'observen diferències entre sexes de grandària, ultraestructurals, en el metabolisme i excreció d'anions i cations orgànics (Bowman *et al.*, 1972), en l'aclariment i farmacocinètica de diferents fàrmacs, en les respostes de creixement compensatori, en les respostes enfront del dany renal, etcètera.

Gens Regulats per Andrògens al Ronyó

El tractament amb andrògens indueix l'expressió renal d'una sèrie de productes gènics principalment a les cèl·lules del túbul proximal. S'han descrit un conjunt de gens que s'indueixen en el túbul proximal en resposta a la testosterona (Berger *et al.*, 1989).

TAULA 2. Classificació funcional d'alguns gens resultats per andrògens a ronyó

Categoria funcional	Gen	Referència
Enzims hidrolítics	β-Glucuronidasa (<i>Gus</i>)	Bardin <i>et al.</i>, 1978
Metabolisme aminoàcids /poliamines	Ornitina decarboxilasa (<i>Odc</i>)	Pajunen <i>et al.</i>, 1982
	Arginasa	Swank <i>et al.</i>, 1997
	<i>Spermidine/Spermine N1-acetyltransferase</i> (SSAT)	Betuzzi <i>et al.</i>, 2001
Enzims de la Fase I del metabolisme oxidatiu	Citocrom P450 2e1 (<i>Cyp2e1</i>)	Davis <i>et al.</i>, 1993
	Citocrom P450 4b1 (<i>Cyp4b1</i>)	Imakoa <i>et al.</i>, 1995
	Citocrom P450 4a12 (<i>Cyp4a12</i>)	Holla <i>et al.</i>, 2001
	Alcohol deshidrogenasa 1 (<i>Adh-1</i>)	Felder <i>et al.</i>, 1988
Enzims de la Fase II del metabolisme oxidatiu	amilamina N-acetiltransferasa 2 (<i>Nat2</i>)	Smolen <i>et al.</i>, 1993
	UDP-glucuronosiltransferases (<i>UGTs</i>)[#]	Rush <i>et al.</i>, 1983
Metabolisme lipídic	S_A (<i>Acil-CoA sintetasa</i>)	Melià <i>et al.</i>, 1998
Sistema renina angiotensina	Angiotensinògen (<i>Ang-n</i>)	Ellison <i>et al.</i>, 1989
Transport d'anions i de cations orgànics	<i>Organic anion transporting polipeptide 1</i> (<i>Oatp1</i>)	Isern <i>et al.</i>, 2001
	<i>Organic anion transporting polypeptide-d</i> (MJAM)	Isern <i>et al.</i>, 2003
	<i>Organic cation transporter 2</i> (<i>Oct2</i>)[#]	Urkanami <i>et al.</i>, 2000
Altres	<i>Sex-limited protein</i> (<i>Slp</i>)	Nelson <i>et al.</i>, 1997
	<i>Kidney androgen-regulated protein</i> (KAP) *	Meseguer <i>et al.</i>, 1989
	"<i>androgen-inducible RP2 mRNA</i>" (<i>D7Rp2e</i>)	King <i>et al.</i>, 1986
Senyalització cel·lular	<i>c-met</i> (Receptor de HGF)	Dudkowska <i>et al.</i>, 2001

[#] En rares; * Tema central de la Test

Entre ells trobem (vegeu T_{AULA} 2) gens de proteïnes enzimàtiques com la β -glucuronidasa (β -gluc) (Bardin *et al.*, 1978), l'alcohol deshidrogenasa (Felder *et al.*, 1988), l'ornitina descarboxilasa (ODC) (Pajunen *et al.*, 1982), o gens que codifiquen per a proteïnes de funció desconeguda, com la *Kidney Androgen-regulated Protein* (KAP) (Meseguer *et al.*, 1987), tema principal d'aquesta tesi del que es fa una descripció detallada al final d'aquesta introducció, o la D7Rp2 (King *et al.*, 1986). A tots aquests gens clàssics regulats pels andrògens s'han anat afegint nous gens identificats en els darrers anys tant en ratolí com en rata. Donat que no es coneix el significat fisiològic de l'acció androgènica al ronyó, l'estudi d'aquest gens podria aportar informació sobre la significació del dimorfisme sexual renal.

L'estudi dels gens diferencialment regulats per andrògens al ronyó de ratolí ha estat un dels principals focus d'estudi del nostre laboratori i és per això que s'ha aprofundit en l'estudi del gen S_A (Aresté *et al.*, 2005) o s'ha pogut identificar el gen MJAM un membre de la família dels transportadors d'anions orgànics Oatp (Isern *et al.*, 2001).

2.4 Els Glucocorticoides

Bioquímica, Biosíntesi i Respostes Biològiques

Com ja s'ha anat esmentant les hormones esteroïdals són constituents essencials de la comunicació intercel·lular que manté l'homeòstasi dels organismes. Els glucocorticoides, una de les subclasses de les hormones esteroïdals, modulen un gran nombre de funcions metabòliques, cardiovasculars, immunològiques i de comportament.

Els glucocorticoides són produïts al còrtex de les glàndules suprarenals en la mateixa via biosintètica a partir del colesterol que origina les hormones sexuals i els mineralcorticoides (vegeu FIGURA 6). La seva síntesi és potenciada per l'hormona corticotropina (ACTH) alliberada per la glàndula pituïtària en resposta als factors hipotalàmics vasopressina (AVP) i factor alliberador de corticotropina (CRH). Aquest eix hipotalàmic-pituïtari-adrenal

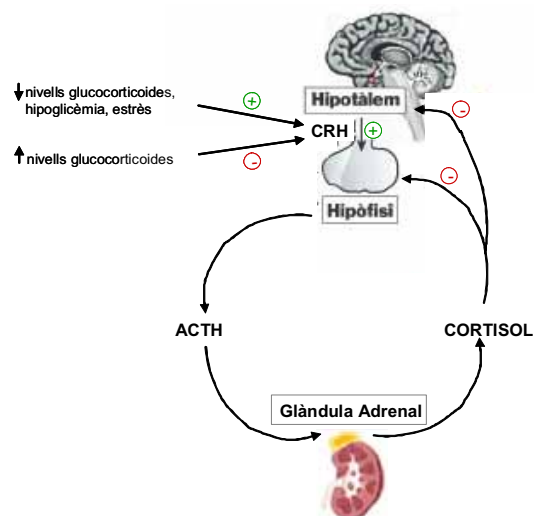


FIGURA 7. L'eix hipotalàmic-pituïtari-adrenal. Esquema diagramàtic on es mostren els diferents sistemes i interrelacions positives i negatives que hi intervenen. Extret de <http://kcampbell.bio.umb.edu>

(HPA) és mantingut en equilibri pels efectes inhibidors que els glucocorticoides circulants, sobretot el cortisol, tenen sobre la secreció d'ACTH, de CRH i de forma menys important, d'AVP. En condicions de repòs de l'organisme els nivells basals de CRH, AVP, ACTH i cortisol són alliberats de manera pulsativa i circadiana. En aquests nivells basals, la funció principal del cortisol és mantenir la glucèmia i evitar la hipertensió arterial. L'activació de l'eix HPA durant l'estrès físic o emocional i l'increment dels nivells plasmàtics de cortisol són requerits per a engegar la resposta a estrès: activació del sistema nerviós central, augment de la glucosa en sang, i increment de la pressió sanguínia. A més, el cortisol regula la transducció de senyals en el sistema immunitari i en la reacció inflamatòria (Bamberger *et al.*, 1996).

3. LA SUPERFAMÍLIA DELS RECEPTORS NUCLEARS

Els mediadors de les accions biològiques de les hormones esteroïdals, i principalment dels seus efectes sobre la transcripció són els Receptors Nuclears (NR), una superfamília de factors de transcripció, la més important quantitativament, que de manera general modulen la seva activitat mitjançant la unió als seus lligands, els esteroides, els retinoides i les hormones tiroïdals.

Aquest ampli grup de factors de transcripció proveeix als organismes pluricel·lulars d'un control directe de l'expressió gènica en resposta a una gran varietat d'estímuls ambientals, fisiològics i epigenètics. La possibilitat de modular els efectes hormonals per tants elements ve donada pel control que s'exerceix de l'activitat dels NR mitjançant la unió del propi lligand, modificacions posttraduccionals del propi receptor (fosforilació, sumoïlació,...) i interaccions proteïna-proteïna amb altres factors de transcripció o amb coreguladors alguns d'ells capaços de modificar l'estructura de la cromatina i l'accés als promotors gènics. Cal tenir en compte a més, la capacitat d'activació independent de lligand de la majoria dels NR inclosos en vies de senyalització i les seves accions ràpides *no genòmiques* no exercides a través de la regulació transcripcional.

Generalment, els receptors nuclears es distingeixen i classifiquen en tres tipus:

- Tipus I: són els receptors d'hormones esteroïdals: receptor d'andrògens (AR), receptor d'estrògens (ER), receptor de glucocorticoides (GR), receptor de mineralcorticoides (MR) i receptor de progesterona (PR). Formen homodímers.

- Tipus II: inclou els receptors nuclears que uneixen hormones tiroïdals (TR) retinoides (RXR, RAR) i la vitamina D (VDR). Generalment heterodimeritzen amb el receptor retinoic X.
- Tipus III: engloba un conjunt de receptors nuclears que presenten seqüències molt similars i una gran homologia estructural amb receptors nuclears coneguts però en la majoria dels casos se'n desconeix el seu lligand específic. Se'ls denomina “receptors orfes” (Manglesdorf *et al.*, 1995). Actualment hi ha 24 receptors orfes dels quals no s'ha pogut identificar lligand (Groenmeyer *et al.*, 2004). En són exemple els receptors PPAR (*Peroxisome-Proliferator Receptor*) i l'SF-1 (*Steroidogenic Factor 1*).

3.1 Característiques Estructurals

Els receptors nuclears presenten una estructura característica altament conservada integrada per diferents dominis o regions funcionals independents capaces de cooperar entre elles. En funció del membre analitzat, als receptors nuclears podem distingir els següents dominis:

- *Domini modulador N-terminal* (Domini A/B): és la regió més variable d'entre els diferents membres de la família. Presenta la capacitat transactivadora *Activation Function 1* (AF-1) que és independent de la unió a lligand i s'ha descrit com a contínuament activa (Tora *et al.*, 1989). Desenvolupa la seva funció per interacció amb GTF de la maquinària basal de transcripció i s'ha vist que per interacció directa o mitjançada per coactivadors amb l'extrem C-terminal del propi receptor és com obté la màxima resposta en la transcripció (Hentschke & Borgenmeyer, 2003).

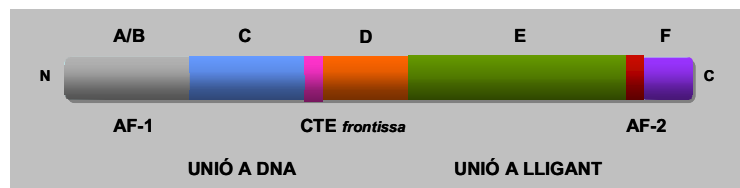


FIGURA 8. Estructura dels Receptors d'hormones esteroïdals. Esquema on es mostren els diferents dominis funcionals i estructurals que els caracteritzen.

- *Domini d'unió a DNA* (Domini C): integrat per 66-68 aminoàcids, és la regió més conservada entre els NR tant pel què fa a seqüència com a estructura. Conté dos mòduls de dit de zinc, en els que quatre residus de cisteïna coordinen un ió de Zn^{+2} (Freedman *et al.*, 1988). Inclou també dues hèlix α de les quals una es troba darrere del primer dit de zinc i és responsable de la unió específica del factor al solc ample del DNA en la meitat del palíndrom que conforma l'element de resposta a hormona (HRE) on s'uneixen els NR. El segon dit de zinc s'encarrega juntament amb el domini N-terminal de permetre la dimerització amb un segon monòmer de NR que ocuparà l'altre meitat del HRE (Glass, 1994).
- *Domini frontissa (Hinge)* (Domini D): identificat com a regió flexible que actua de frontissa entre el domini d'unió a DNA (DBD) i el domini d'unió a lligand (LBD). Té cert paper en la unió al DNA i regula l'activitat transcripcional mitjançant la regulació de la interacció entre el domini N-terminal i el LBD (Zhou *et al.*, 1994). En alguns membres, AR, ER, GR i PR, és aquí on es troba la senyal de localització nuclear. Estudis de mutagènesi suggereixen que aquest domini és un punt d'unió de corepressors (Hörlein *et al.*, 1995)
- *Domini d'unió a lligand* (Domini E): situat a l'extrem C-terminal del polipèptid presenta residus que li confereixen la naturalesa hidrofòbica necessària per interactuar amb molècules orgàniques de baix pes molecular com els esteroides. Els aminoàcids no conservats entre els diferents membres de la família poden ser importants per proporcionar especificitat d'unió de cada NR amb la seva hormona (Diaz-Chico *et al.*, 1996) tot i que hi ha certa promiscuïtat en aquest àmbit. Aquesta regió presenta el domini major de dimerització que s'estructura en una cremallera de leucines. Conté l' *Activation Function 2* (AF-2) que resulta important per a la unió de coreguladors (Danielain *et al.*, 1992) i de fet s'ha descrit la unió de corepressors en absència de lligand a aquest domini que estableixen la conformació del receptor lliure de lligand (Pissios *et al.*, 2000). Els coactivadors que tenen com a seqüència diana les zones riques en leucines uneixen efectivament aquesta regió. S'ha vist també com el LBD pot unir *Heat shock proteins* (Hsp) i formar dímers en absència de DNA (Depoix *et al.*, 2001).
- *Domini F*: localitzat sols a l'extrem final d'alguns receptors, és altament variable i no se n'ha pogut determinar encara la funció.

3.2 Interaccions amb el DNA

Els NR interaccionen amb el DNA en seqüències específiques de les regions promotores dels seus gens diana, els elements de resposta a hormona o HRE (*Hormone Response Element*).

Els HRE es caracteritzen generalment per ser palíndroms imperfectes hexanucleotídics en orientació directa o inversa separats per un nombre variable de nucleòtids espaiadors en funció del NR que es consideri. Aquesta doble seqüència diana permet que els receptors s’hi uneixin com a dímers amb la interacció de cada monòmer amb la corresponent part simètrica de l’element.

TAULA 3. Elements de resposta a hormones (HRE) de diferents receptors esteroïdals

Receptor	HRE Consens	Complex d’unió	Orientació
GR, PR, MR, AR	GGTACA n ₃ TGTTCCT	Homodímer	Inversa
ER	GTACA n ₃ TGACC	Homodímer	Inversa
TR α , TR β	AGGTCA n ₂ AGGTCA AGGTCA n ₄ AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe
RAR α , β , γ	AGGTCA n _{5,2,7} AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe
RXR α , β , γ	AGGTCA n ₃ AGGTCA	Homodímer Heterodímer	Directe
VDR	AGGTCA n ₂ AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe
PPAR α , β , γ	AGGTCA n AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe

Adaptat i modificat de *Williams Textbook of Endocrinology (9th ed)*, pp.62, i de *Hormones (2nd ed)*, pp. 41.

S’han pogut identificar els HRE consens per a diferents hormones (vegeu Taula 3) i d’aquesta manera s’ha pogut veure com mentre AR, GR, MR, PR i ER s’uneixen al DNA com a homodímers i reconeixen elements de resposta palindròmics, altres receptors com TR, RAR, RXR i VDR reconeixen repeticions directes de la seqüència AGGTCA separades per cap, 1, 2, 3 i fins a 7 bp i que són propensos a formar heterodímers amb RXR.

S’ha determinat que la unió dels NR als HRE es produeix a través dels dominis en dits de zinc del seu domini d’unió a DNA. La regió C terminal de cada dit forma una hèlix α que s’introdueix al solc gros del DNA i hi estableix contactes específics. És per això que diferències subtils en aquest domini determinen la preferència dels NR per un HRE o un

altre. Malgrat tot però, l'especificitat en les diferents respostes originades pels receptors AR, GR, MR i PR, que reconeixen exactament el mateix HRE no està del tot resolta. Se

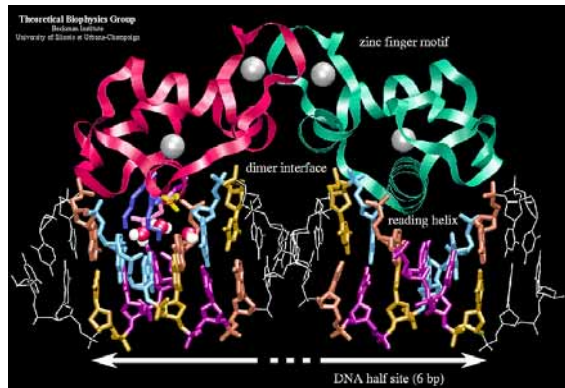


FIGURA 9. Estructura tridimensional del domini d'unió a DNA del Receptor d'Estrògens.

S'aprecien els dominis hèlix α dels dits de zinc introduïts al solc gros del DNA. Extret del web de la Universitat d'Illinois (www.ks.uiuc.edu)

sap que la conformació del NR un cop unit al DNA hi juga un paper important i que les diferències d'expressió de cada receptor i les interaccions proteïna-proteïna amb altres components de la maquinària hi poden contribuir. De fet s'ha vist com el canvi conformacional del receptor en unir-se al HRE influeix a la interacció del seu extrem N terminal amb els coreguladors (Brodie & McEwan, 2005) i se sap que HRE que *in vitro* poden no mostrar especificitat, dins el context i la dinàmica de la cromatina en cada

promotor poden aportar especificitat i resposta a l'hormona per la qual són acceptors (Robins, 2005).

3.3 El Receptor d'Andrògens

Al llarg de tota la vida d'un individu, els andrògens regulen el desenvolupament i manteniment del fenotip masculí. Les senyals androgèniques incideixen en el metabolisme i funcionament cel·lular mitjançant la modificació que el seu receptor nuclear, l'AR, causa en els perfils d'expressió gènica (Lee i Chang, 2003).

Com tots els receptors nuclears, l'AR presenta una estructura modular conservada on cada domini juga un important paper en la funció i senyalització androgènica i la clonació del seu cDNA en diferents espècies ha permès avançar en la caracterització molecular i cel·lular de la fisiologia i fisiopatologia dels andrògens. (Chang *et al.*, 1988; Lubahn *et al.*, 1988).

3.3.1 Estructura del Receptor d'Andrògens

L'estructura i organització genòmica del gen de l'AR està altament conservada dins els mamífers des de l'home fins al ratolí. (Gelman, 2002). La proteïna deduïda per l'AR tant

d'humà, com de rata i de ratolí és aproximadament de 99 kDa (no fosforilada) o de 110 kDa (quan ha patit fosforilació post-transcripcional).

L'AR presenta en la seva estructura modular, típica de NR, on cada domini presenta les seves propietats específiques i actua en sinèrgia o antagonisme amb la resta permetent la regulació de les accions genòmiques dels andrògens als seus teixits diana. (Beato *et al.*, 1995).

El NTD de l'AR funciona regulant el reclutament del complex de preiniciació transcripcional (PIC) als promotors dels gens de resposta a andrògens (Beato i Sanchez-Pacheco 1996; Lee i Chang, 2003) gràcies a les interaccions que estableix amb factors de la transcripció basal com TFIIF (Kumar *et al.*, 2004). La seva característica principal però, és la presència del domini d'activació AF1 que en el cas de l'AR és extremadament potent i independent d'hormona (Rundlett *et al.*, 1990) en valors comparables als obtinguts amb la integritat de l'AR unit a lligand (Jenster *et al.*, 1995; Ikonen *et al.*, 1997)

El DBD és la regió més conservada de l'AR i s'observa una homologia del 100% entre l'humà i el de rata. Els DBDs de PR i GR comparteixen un 79%, 76% d'homologia amb el d'AR (Gelman, 2002). De nou, seguint amb la paradoxa de les hormones esteroïdals, el control d'un rang divers de processos fisiològics és dirigit per DBDs altament similars. El DBD de l'AR consisteix en dos dits de zinc rics en leucines que regulen la unió i reconeixement dels elements de resposta a andrògens (ARE) (Freedman, 1992). El primer dit de zinc defineix l'especificitat de la interacció amb el DNA i el segon està involucrat en la determinació de l'espai entre els dos palíndroms de l'ARE i la dimerització del receptor (Luisi *et al.*, 1991).

La regió frontissa de l'AR conté un senyal bipartit de localització nuclear que permet el direccionament del receptor activat al nucli (Poukka *et al.*, 2000). S'hi troba també una seqüència PEST important en la degradació del receptor pel proteasoma i com a punt de fosforilació (Tanner *et al.*, 2004). D'altra banda s'han identificat diverses proteïnes coreguladores que interaccionen amb el DBD i la regió frontissa (Horlein *et al.*, 1995).

El LBD uneix andrògens en l'AR activat i interacciona amb xaperones Hsp 90, Hsp 70 i la coxaperona FKBP52-BP quan aquest és inactiu sense hormona al citoplasma (Cheung-Flynn *et al.*, 2005). La funció d'activació 2 dependent d'hormona rau al LBD i a diferència de la resta de NR, l'AF2 de l'AR és transcripcionalment dèbil (Moilanen *et al.*, 1997) tot i que resulta important per la interacció NTD/LBD. A més la regió AF2 modula el reclutament de coreguladors. La butxaca d'unió a lligand (LBP) del LBD la conformen diverses hèlix α integrades principalment per aminoàcids hidrofòbics i pot unir tant lligands amb efecte antgonista (activador) com antagonista (repressor) sobre l'activitat

d'AR (Nagy & Schwabe, 2004). Sols els agonistes permetran una conformació del LBD adient per obtenir un AR transcripcionalment actiu.

3.3.2 Modulació de l'Activitat del Receptor d'Andrògens:

Modificacions Post-traduccionals del Receptor d'Andrògens

L'AR pateix un conjunt de modificacions posttraduccionals que acaben influint en la seva funció i activitat. Són concretament fosforilació, sumoïlació i ubiquitinació (Gioeli *et al.*, 2002; Poukka *et al.*, 2000; Dehm & Tindall, 2005) de les quals no sempre es pot deduir l'efecte clar sobre la funció del receptor per la interacció que es produeix entre les diferents vies de senyalització.

La fosforilació de l'AR ocorre 10 minuts després de la seva síntesi de manera hormona independent i és necessària per a l'obtenció de la capacitat d'unió a lligand. Un cop el receptor ha unit l'hormona pateix fosforilacions androgen-dependents que el protegeixen de la degradació proteolítica i que són requerides per al transport nuclear i per la unió a DNA (Brinkmann *et al.*, 1999; Gioeli *et al.*, 2005). La fosforilació es produeix en un total de 10 posicions sobre l'AR i constitueix un important mecanisme de regulació que proporciona un nexa comú entre nombroses cascades de senyalització per cinases. Hi ha certa controvèrsia entre els efectes de les cinases sobre l'activitat de l'AR i es creu que les discrepàncies observades es deuen a l'expressió cel·lular específica de coreguladors.

D'altra banda, s'ha vist que l'AR, com la majoria de proteïnes, pot ser ubiquitinat (McKenna *et al.*, 1999). En general, la ubiquitina és un senyal per a la degradació de les proteïnes via proteasoma i aquesta degradació dirigida té un paper primordial en la regulació de la funció cel·lular. Tot i així, probablement les mateixes lisines de l'AR que resulten dianes per a la ubiquitinació (Muller *et al.*, 2001) poden ser també sumoïlades (Poukka *et al.*, 2000). Les proteïnes SUMO estan estructuralment relacionades amb l'ubiquitina però suposen un marcatge diferent dels seus substrats. La sumoïlació no és un senyal de degradació sinó que regula una munió d'altres processos com l'activitat dels factors de transcripció, la formació de estructures subnuclears i la distribució nuclear de les seves proteïnes diana (Muller *et al.*, 2001; Gill, 2005).

Coreguladors del Receptor d'Andrògens

La majoria de coreguladors (vegeu 1.2.3 INTRODUCCIÓ) implicats en la regulació transcripcional per hormones no són específics i exclusius d'un sol NR sinó que es troben

participant en els complexos transcripcionals articulats pels diferents membres de la superfamília. N' existeix un ampli ventall, la descripció de nous elements és constant i el seu paper concret depèn del context del promotor en qüestió.

En el cas d'AR molt sovint es descriu la seva interacció amb SRC-1 en una acció coactivadora de l'efecte androgènic (Ikkonen *et al.*, 1997). També és freqüent la presència de CBP facilitant la interacció entre els extrems N i C terminals d'AR interactuant amb membres SRC (Aarnisalo *et al.*, 1998) i d'ARA54 augmentant l'activació per AR en presència de DHT (Kang *et al.*, 1999). ARA70, al seu torn, augmenta l'estabilitat del receptor unit a lligand i potencia la transactivació i ARA24/Ran podria ser responsable de l'augment del transport del mRNA d'AR al citoplasma (Gorlich i Kutay, 1999). Pel què fa a corepressors per a AR no se n'han identificat gaires i destaca la ciclina D1 com a inhibidora de la transactivació androgènica (Knudsen *et al.*, 1999)

3.3.3 Unió selectiva del Receptor d'Andrògens al DNA. Especificitat d'acció

Per tal d'induir els seus efectes a nivell transcripcional, el receptor d'andrògens s'uneix als elements de resposta a andrògens (ARE) presents al DNA. La seqüència consens d'aquests ARE va ser identificada mitjançant un assaig de selecció de llocs d'unio al DNA a partir d'una barreja d'oligonucleòtids susceptibles de ser units per AR (Roche *at al.*, 1992) i es va veure que era pràcticament idèntica a la seqüència canònica de l'element de resposta a glucocorticoides (GRE). Més tard s'ha observat que els receptors AR, GR, PR i MR poden reconèixer *in vitro* els mateixos elements de resposta, organitzats en una repetició invertida espaiada per tres nucleòtids de seqüències

TAULA 4. Seqüències d'alguns elements de resposta a andrògens (ARE) identificats en diferents gens

ARE	Seqüència	Ref
ARE canònic	AGAACA n ₃ TGTTCT	Roche, <i>et al.</i> , 1992
PB _{ARE-1}	ATAGCA tct TGTTCT	Rennie, <i>et al.</i> , 1993
PB _{ARE-2}	AGTACT cca AGAACC	“ ”
PSA _{ARE-1}	AGAACA gca AGTGCT	Cleutjens, <i>et al.</i> , 1997
C3(1) Element C	AGTACG tga TGTTCT	Tan, <i>et al.</i> , 1992
*TAT _{GRE2}	TGTACA gga TGTTCT	Beato, 1989
KLK-2	GGAACA gca AGTGCT	Murtha <i>et al.</i> , 1993
arMEP24 _{ARE}	TGTTGA gag AGAACA	Ghyselinck <i>et al.</i> , 1993
p21 _{ARE}	AGCAG cga GGTCC	Lu <i>et al.</i> , 1999
Slp _{HRE-2}	TGGTCA gcc AGTTCT	Adler <i>et al.</i> , 1993
Slp _{HRE-3}	GAAACA gcc TGTTCT	“ ”
Gus _{DHS-3}	AGTACT tgt TGTTCT	Lund <i>et al.</i> , 1991
Odc _{ARE}	AGTCCC act TGTTCT	Crozat <i>et al.</i> , 1992
MVDP _{ARE}	TGAAGT tcc TGTTCT	Darne <i>et al.</i> , 1997
*MMTV _{DISTAL}	GTTACA aac TGTTCT	Gowland i Buetti 1989
*MMTV _{PROXIMAL}	GGTATC aaa TGTTCT	“ ”

Abreviacions: PB, *Probasina*; PSA, *prostatic specific antigen*; TAT, *tyrosine aminotransferase*; KLK2, *glandular kallikrein 2*; arMEP24, *murine epididymal protein 24kDa*; Slp, *sex-limited protein*; Gus, *β-glucuronidase*; Odc, *ornithine decarboxylase* MMTV, *mouse mammary tumour virus*; Ref, *referències*.

*Elements de resposta a glucocorticoides

semblants a 5'-TGTTCT-3' (Claessens *et al.*, 2001), els denominats elements de Classe I.

L'estudi concret dels ARE presents en els promotors de diferents gens regulats per andrògens ha permès detectar algunes divergències d'aquests respecte al consens, fet que permet una regulació específica (vegeu T_{AULA} 4). La majoria dels gens dels quals s'ha caracteritzat l'ARE són d'expressió prostàtica i els més descrits, entre d'altres, són:

PROBASINA (PB). Gen que codifica per una proteïna nuclear que és secretada per les cèl·lules epitelials de la pròstata de rata. Regulada per andrògens *in vivo*, i en menor mesura pels glucocorticoides, s'ha vist com els dos ARE presents al seu promotor cooperen en la regulació del gen (Rennie *et al.*, 1993).

C3. És una de les 3 subunitats (C1, C2 i C3) de la prostateïna, principal proteïna secretada per la pròstata de rata. Les tres subunitats estan codificades per gens diferents i la C3 és la única regulada per andrògens. S'han identificat diversos ARE putatius tant en regions intròniques com en la regió promotora i s'ha vist com l'anomenat Element C o C3(1)-ARE present al primer intró és el de major activitat en la regulació androgènica del gen (Tan *et al.*, 1992).

PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN (PSA). És una serina proteasa sintetitzada per les cèl·lules de l'epiteli luminal de la pròstata humana que s'utilitza com a marcador tumoral del càncer de pròstata. S'han identificat dos AREs, ARE I i ARE II, funcionalment actius al seu promotor proximal (Cleutjens *et al.*, 1996; Cleutjens *et al.*, 1997).

Malgrat la caracterització a nivell molecular d'una gran part dels gens de resposta androgènica i la creixent incorporació de nous elements de resposta a andrògens identificats en altres gens, els mecanismes moleculars mitjançant els quals s'assoleix *in vivo* una resposta selectiva i teixit específica encara resten poc compresos. Com ja s'ha comentat, els nivells d'expressió concrets de cada NR en els diferents tipus cel·lulars poden contribuir a discriminar accions hormonals però en el cas de l'AR és molt freqüent la seva coexistència amb d'altres NR.

Un dels mecanismes que opera en la resposta específica a andrògens s'estableix amb la presència de proteïnes coreguladores com és ara la proteïna ARA70, que en determinats contextos pot actuar de coactivador específic del AR (Yeh *et al.*, 1996).

Una altra de les estratègies discriminatòries per l'AR és la presència d'altres factors de transcripció diferents amb llocs d'unió pròxims a l'ARE que en potencien la capacitat activadora en detriment de la resta de NR. En aquest sentit és recurrent la presència de llocs d'unió adjacents per OCT-1 (*Octamer Transcription Factor 1*), NF-1 (*Nuclear Factor 1*), o Sp1 (*Specific protein 1*) involucrats en l'establiment de la plena resposta AR-específica en aquests contextos (Adler *et al.*, 1993).

Un tercer mecanisme de selectivitat hormonal pot derivar-se de l'arquitectura i distribució particular dels diferents llocs d'unió dins del promotor, per promoure respostes preferencials per un receptor determinat, com aquelles configuracions particulars de HRE que poden actuar cooperativament per un tipus de receptor determinat. Aquest cas es dona en el promotor del gen prostàtic de la probasina, que conté dos AREs que col·laboren en la inducció del gen mitjançada per l'AR. De tota manera, en el cas del promotor del MMTV, que és activat tant per GR com per PR i AR, la multiplicitat d'elements de resposta presents en ell fracassa en discriminar entre els varis tipus de receptor (Gowland *et al.*, 1993). En el promotor de la subunitat β de la hormona fol·licle estimulant (FSH) per contra, trobem tres elements de resposta a hormona que són ocupats diferencialment pels corresponents NR a l'hora de permetre la inducció del gen per andrògens, glucocorticoides i progestàgens (Thackray, 2006). Són també per tant petites variacions en determinades posicions nucleotídiques dels HRE, i en els nucleòtids flanquejants del palíndrom, les que poden proporcionar una unió preferencial per un tipus de receptor (Nelson *et al.*, 1999), fet que proporciona un cinquè nivell de selectivitat en la resposta hormonal.

En qualsevol cas però, la funcionalitat d'un element comú per als diferents NR permet que una gran ventall de gens molt diversos, com poden ser la monoamina oxidasa A neuronal (Ou *et al.*, 2006), el pepsinogen C (Balbín *et al.*, 1996) o l'apolipoproteïna D (Simard *et al.*, 1992) entre d'altres puguin veure's regulats per més d'un senyal hormonal a través del mateix lloc al DNA del seu promotor i això subministra una plataforma per a l'establiment de relacions sinèrgiques, additives o antagòniques entre AR, GR, PR i MR.

3.4 El Receptor de Glucocorticoides

A nivell cel·lular els efectes dels glucocorticoides són mitjançats pel receptor de glucocorticoides (GR) que, com la resta de NR, mitjançant la seva unió a l'element de resposta a hormona GRE regula l'expressió d'un conjunt ampli de gens.

El GR és una proteïna de ~94 kDa que un cop activat per unió als seu lligand, es dissocia d'un complex de xaperones que el mantenen al citoplasma, homodimeritza i entra al nucli on s'unirà als corresponents GRE. En la seva transactivació de manera similar al descrit anteriorment per AR, interacciona tant amb factors de la maquinària basal, com amb factors de transcripció específics, adaptadors i coreguladors. A més, també participa en la col·laboració i interacció amb altres vies de transducció de senyals. I tal i com ocorre amb AR, és capaç de regular la transcripció de manera independent a la seva interacció amb el DNA mitjançant interaccions proteïna-proteïna amb factors de transcripció.

3.4.1 Estructura del Receptor de Glucocorticoides

L'estructura del GR és la general compartida per tots els NR descrita anteriorment (Vegeu INTRODUCCIÓ 3.1). Així doncs al domini N-terminal del GR trobem la regió $\tau 1$ una de les dues funcions activadores dels gens diana que interacciona amb la maquinària basal i amb altres factors de transcripció (Dahlman-Wright *et al.*, 1994). A la regió central de la proteïna trobem els dos altament conservats dits de zinc que constitueixen el domini d'unió a DNA (Guiguere *et al.*, 1986) que també intervé en la dimerització del receptor, la translocació nuclear i la transactivació (Lefstin *et al.*, 1994). A l'extrem C-terminal trobem el domini d'unió a lligand (LBD) que conté la segona regió transactivadora denominada $\tau 2$. Cal destacar que el LBD del GR, tot i presentar grans similituds amb la resta de NR, adopta en dimeritzar una configuració especial en làmina β que genera una butxaca d'unió a lligand més petita i específica pels glucocorticoides (Bledsoe *et al.*, 2002)

3.4.2 Regulació de la Transcripció per GR

Com a conseqüència del procés d'activació del GR i unió d'aquest als GRE dels seus gens diana, es produeixen canvis, majoritàriament l'increment, en els nivells de proteïnes expressades en resposta als glucocorticoides. En la majoria dels casos, conseqüentment a l'acció del GR es produeix una regulació negativa del propi GR que porta a una repressió de l'expressió de GR. En alguns casos però es descriu una retroalimentació positiva del GR sobretot en estadis inicials de l'apoptosi (Tonko *et al.*, 2001) o com a conseqüència d'una infecció viral (Erlandsson *et al.*, 2002).

Tant important com l'activació gènica exercida pel GR és la repressió transcripcional que aquest receptor realitza sobretot en la resposta antiinflamatòria i immunosupressora, en

gens com la col·lagenasa i la interleuquina-2 (Northrop *et al.*, 1992). Els gens inhibits per GR no presenten GRE als seus promotors i són induïts per altres factors de transcripció, en la majoria dels casos per AP-1 (*Activating Protein-1*), un factor de transcripció integrat per dímers de la família Jun i Fos (Angel i Karin, 1991). L'activitat d'AP-1 està regulada per factors de creixement i citocines via MAPK que controlen la seva unió a dianes específiques als promotors que hi responen (Karin, 1995). El GR sense unir-se al DNA i per interacció directa amb c-Jun impedeix la transactivació d'AP-1 unit als seus elements diana (Schüle *et al.*, 1990; Yang-Yen *et al.*, 1990). De manera similar, GR modula la transrepressió d'altres factors com NF- κ B (Scheinman *et al.*, 1995), Oct-1 (Kutogh *et al.*, 1992) i altres NR com ER (Meyer *et al.*, 1989) i TR (Yen *et al.*, 1995).

3.4.3 Modulació de l'Activitat del Receptor de Glucocorticoides: Coreguladors

Com amb la resta de NR, la presència de coreguladors que mitjancen i col·laboren en la regulació gènica exercida per GR és molt important. De manera predominant es tracta de coreguladors comuns per a altres NR o fins i tot per a altres factors de transcripció. És habitual la interacció de GR amb coactivadors com SRC-1, GRIP-1, TIF-2, p300, pCAF, CREB-binding protein (Li *et al.*, 2006; He *et al.*, 2002) o corepressors com NCoR i SMRT i enzims modificadors de la cromatina com SWI/SNF i HDACs (Barnes, 2006) en els promotors regulats per glucocorticoides (Wang *et al.*, 2004). I la descripció de noves relacions entre ells és constant com ocorre amb Hic5 (ARA55) que implicat en l'activació transcripcional per GR i per AR, recentment s'ha vist que interacciona amb la quinasa ERK8 reprimint la coactivació gènica per part d'AR i GR (Saelzler *et al.*, 2006). Com sempre, l'efecte sobre la transcripció exercida per GR i els coactivadors associats dependrà del context cel·lular i de la fisonomia del promotor en concret.

Apart dels coactivadors, GR és capaç d'interaccionar amb una gran varietat de factors de transcripció amb els quals sol establir una relació sinèrgica en l'activació gènica. Entre aquests trobem Sp1 (Kolla i Litwack, 1999) C/EBP α i β (Boruk *et al.*, 1998), CREB (MacKey i Cidlowsky, 2000), el propi GR que facilita de manera cooperativa la unió d'altres homodímers de GR en GRE adjacents (Müller i Rentkawitz, 1991) etc.

3.4.4 Relacions entre AR i GR

Tot i que les hormones esteroïdals es caracteritzen per engegar i regular cadascuna d'elles un conjunt molt determinat de processos i mecanismes del metabolisme que els són específics, la interferència, cooperació i/o antagonisme entre elles es produeix en diversos casos. Així, tot i que cada NR s'encarrega de regular concretament un set determinat i molt diferent de gens en resposta al seu lligand hormonal, i malgrat les múltiples estratègies moleculars per evitar el solapament entre ells, la interacció funcional entre els diferents membres ocorre molt sovint.

En el cas concret d'AR i GR són especialment abundants les inhibicions mútues que es profereixen en molt dels seus gens diana compartits, però també destaquen certes cooperacions sinèrgiques entre ells. D'entrada és senzill pensar que andrògens i glucocorticoides regulin esdeveniments molt diferents, però certes situacions com la resposta a estrès en mascles o el propi manteniment del dimorfisme sexual en certs òrgans, poden requerir una interacció positiva d'ambdues vies.

En primer lloc, és àmpliament descrita la capacitat de molts promotors regulats per andrògens de respondre també a glucocorticoides. La pròpia expressió del gen PSA en cèl·lules LNCaP, paradigma de la regulació androgènica, es veu potenciada tant per AR com per GR a través dels diferents HRE que presenta. Els efectes d'ambdues transactivacions però difereixen, ja que mentre els andrògens són capaços d'estimular el creixement cel·lular de les LNCaP, els glucocorticoides no generen aquesta resposta (Cleutjens, *et al.*, 1997).

En aquesta mateixa línia trobem molts altres gens que es veuen activats per AR i GR de maneres diferents. L'expressió de la subunitat β de l'hormona fol·licle estimulant (FSH- β) per exemple, està potenciada a nivell de la glàndula pituïtària de manera similar tant per andrògens, com per glucocorticoides o progestàgens i tot i compartir la unió *in vitro* d'un mateix HRE, que implicaria competició entre els tres NR, cadascun dels receptors mostra afinitats pròpies diferenciades per la unió dels altres 5 HRE (Thackray *et al.*, 2006). En un altre exemple, el gen de la monoamino oxidasa A (MAO A) incrementa la seva expressió en cèl·lules de neuroblastoma en presència de dexametasona i, de manera menys important, en presència d'andrògens. Ambdós receptors s'uneixen al promotor en el mateix HRE i interaccionen amb factors Sp1 que presenten llocs d'unió circumdants. En el cas de GR però, el complex transcripcional que forma pot incorporar el cofactor R1 i en aquest cas R1 interaccionarà amb GR i Sp1 inhibint posteriorment la transcripció engegada per dexametasona (Ou *et al.*, 2006).

En moltes ocasions aquesta compartició d'HRE genera interaccions negatives entre AR i GR. De fet, molts agonistes d'AR com l'oxandrolona, actuen d'antagonistes de GR decantant l'activació gènica cap als andrògens (Zhao *et al.*, 2004). S'han postulat diversos mecanismes per a la inhibició mútua entre AR i GR, un dels més acceptats és la formació d'heterodímers AR-GR. En l'estudi de les respostes contràries d'andrògens i glucocorticoides sobre l'anabolisme o catabolisme de les proteïnes musculars, es veié com AR i GR eren capaços d'heterodimeritzar sobre els HRE comuns influenciant mútuament les seves respostes (Chen *et al.*, 1997)

Finalment, trobem també contextos cel·lulars i gènics on es produeix la sinèrgia o additivitat entre les respostes hormonals d'andrògens i glucocorticoides. Per exemple, el pepsinogen C, proteïna majoritària del suc gàstric de rosegadors (Furihata *et al.*, 1980), es veu induït per dexametasona i DHT independentment i de manera additiva en cèl·lules T-47D (Balbín i Lopez-Otín, 1996). La mateixa repercussió s'ha observat en el promotor de l'apolipoproteïna D, que essent reprimat per estrògens, és activat per andrògens, menys importantment per glucocorticoides i de manera additiva per ambdues hormones sobretot quan es produeix el tractament concomitant amb estrògens (Simard *et al.*, 1992). Un estudi *in vivo* al seu torn, mostrà efectes sinèrgics de glucocorticoides o andrògens amb l'hormona tiroïdal en la inducció d'EGF en ratolins hipofisectomitzats, mentre que no s'apreciava interacció funcional entre glucocorticoides i andrògens aïlladament (Hosoi *et al.*, 1992).

Serà per tant, la situació fisiològica, la idiosincràsia cel·lular i l'especificitat del promotor a regular el què determini el tipus de relació que s'estableixi tant entre GR i AR com entre tots el NR entre si.

3.5 *Steroidogenic Factor 1 (SF-1)*

L'*Steroidogenic Factor 1 (SF-1)* és un receptor nuclear orfe que juga un paper essencial en el desenvolupament de les glàndules suprarenals, els testicles, els ovaris, la glàndula pituïtària i l'hipotàlem (Luo *et al.*, 1994). També denominat NR5A1, SF-1 pertany a la subfamília NR5A de receptors nuclears que s'uneixen al DNA com a monòmers i regulen un gran nombre de gens essencials per a una correcta funció endocrina i reproductora (Val *et al.*, 2003).

3.5.1 Estructura de SF-1

Tots els membres NR5A comparteixen l'arquitectura en dominis de la resta de NR però a SF-1 manca el domini de transactivació típicament situat a l'extrem N-terminal. Així doncs, SF-1 està integrat per un domini N-terminal, dos dits de zinc que conformen el domini d'unió a DNA, un putatiu domini d'unió a lligand i dimerització, pel qual no s'ha identificat lligand, i un extrem C-terminal que presenta la funció transactivadora AF-2 (Mangelsdorf, *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1998). Es creu que la seva activació al citoplasma ve donada per la fosforilació del residu de serina 235 que comporta l'adopció d'una conformació activa i conseqüent translocació al nucli (Desclozeaux *et al.*, 2002).

3.5.2 Regulació de la Transcripció per SF-1

Els factors NR5A, com la majoria de NR monomèrics, reconeixen una seqüència de 9 bp que comprèn un HRE canònic i una seqüència de 3 bp situada a 5' de l'element de resposta. Experiments d'unió *in vitro* van conduir a la identificació de llocs d'unió d'alta afinitat per aquests factors dels que se'n deduí la seqüència consens: YCAAGGYCR, on Y és T/C i R és G/A (Ueda i Hirose, 1991). Però, els llocs d'unió naturals, *in vivo*, de les regions promotores dels gens diana de SF-1 exhibeixen diferències molt significatives respecte aquesta consens (Little *et al.*, 2006).

Un altre fet destacable de la regulació exercida per SF-1 és que molts dels seus gens diana estan regulats en col·laboració de factors units en les proximitats al seu element de resposta. Alguns d'aquests factors, estructuralment molt diversos són CREB, C/EBP β , Sp1, *pituitary homeobox* (Pitx), GATA-4, *early growth response protein 1* (EGR-1), β -catenina, receptor d'estrògens, i la família de factors de transcripció E2F (Val *et al.*, 2003).

3.5.3 Gens regulats per SF-1

SF-1 regula l'expressió d'una gran varietat de gens involucrats en l'esteroidogènesi i la reproducció tant importants com la desmolasa o citocrom CYP11A1 (P450 *Side-Chain Cleavage* P450_{SCC}) que regula la primera etapa en la formació d'hormones esteroïdals en hidrolitzar la cadena lateral del colesterol i produir pregnenolona (Chau *et al.*, 1997) (vegeu FIGURA 6). Entre les seves dianes trobem també l'aromatasa (CYP19) que regula el pas de testosterona a estradiol i altres enzims d'aquesta via (Fitzpatrick i Richards, 1993).

Cal destacar també la regulació d'*Steroidogenic Acute Regulatory Protein* (StAR) (Sugawara *et al.*, 1996).

A nivell del sistema nerviós central, SF-1 és determinant per a l'establiment de l'eix HPA ja que regula l'expressió del receptor de GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) (Zhao *et al.*, 2001) i de la subunitat β de la hormona luteïnitzant (Halvorson *et al.*, 1998).

Finalment SF-1 és molt interessant també la participació d'SF-1 en la determinació del sexe i la diferenciació sexual ja que en humans i porc s'ha comprovat la influència que aquest factor presenta sobre la regulació d'SRY, el factor determinant del sexe masculí (de Santa Barbara *et al.*, 2001).

En els darrers anys diversos estudis de transfecció transitòria han demostrat la participació de SF-1 en la regulació de tots els enzims de la via de biosíntesi d'esteroïdes a l'escorça de les glàndules suprarenals i a les gònades. A causa del patró tant teixit específic d'aquests gens, SF-1 és òbviament un factor clau en la determinació d'aquest patró. En aquest sentit, Dalla Valle *et al.* s'han interessat per la possibilitat de producció d'hormones esteroïdals fora dels teixits esteroïdogenics clàssics i han pogut descriure l'expressió en el ronyó de rata dels enzims CYP11A1 i P450c17 (Dalla Valle *et al.*, 2002; Dalla Valle *et al.*, 2004). Aquests autors van voler corroborar també la presència simultània dels factors de transcripció determinants per a l'esteroïdògenesis i van comprovar per RT-PCR la presència del mRNA de SF-1 i StAR a ronyó de rates mascles.

No va ser fins darrerament que un estudi sistemàtic de l'expressió de diferents NR al ronyó de ratolí, va poder descartar la presència d'SF-1 a les cèl·lules del túbul proximal renal (Suh *et al.*, 2006).

3.5.4 Coreguladors de SF-1: l'Helicasa DDX20

Tal com fan els NR lligand-dependents, SF-1 interacciona amb múltiples cofactors que el relacionen amb la maquinària transcripcional. Entre els coactivadors d'SF-1 trobem SRC-1, RIP140, TIF2, p/CIP i GCN5 (Ito *et al.*, 1998; Sugawara *et al.* 2001; Hammer *et al.*, 1999; Borud *et al.*, 2002; Jacob *et al.*, 2001). Aquestes interaccions, independents d'un lligand extern, són dependents de la funció transactivadora AF-2. Cap d'aquests coactivadors és específic per SF-1 i cap d'ells presenta un patró d'expressió restringit als teixits esteroïdogenics.

Pel què fa als corepressors relacionats amb SF-1 ha estat d'especial interès en aquest treball DP103, una RNA helicasa que desenvolupa activitats reguladores de la transcripció mitjançant la seva interacció amb un nombre molt restringit de factors de transcripció entre els que es troba SF-1. També denominada DDx20, DP103 va ser inicialment aïllada

associada amb les proteïnes nuclears EBNA2 i EBNA3C del virus de l'Epstein-Barr controlant la transcripció de gens virals i cel·lulars (Fuller-Pace, 2006). Pertany a la família de les proteïnes *DExD/H-box* caracteritzades per conservar aquesta seqüència en la seva estructura i per actuar com a RNA helicases dependents d'ATP participant en diversos aspectes de la síntesi i funció del RNA (Tanner *et al.*, 2001). Recentment un gran nombre d'evidències ha relacionat diferents membres d'aquesta família amb múltiples funcions en la cèl·lula, en les quals no participa la seva activitat helicasa. Així, es veié com DP103 intreccionava amb SF-1 a través del seu domini C-terminal, en una regió que posseeix una capacitat autònoma repressora de la transcripció i que inhibeix la funció activadora d'SF-1 (Yan *et al.*, 2003). Tot i que no tots els gens diana de SF-1 es veuen reprimits per DP103, fet que suggereix una especificitat de promotor en aquesta repressió, en la seva presència s'observa per exemple disminució de l'activitat del promotor de P450_{SCC} (Yan *et al.*, 2003). S'ha suggerit que la repressió de DP103 sobre SF-1 ve donada per la sumoïlació que l'helicasa indueix i que podria comportar un reclutament d'enzims desacetilases d'histones HDACs (Lee *et al.*, 2002; Gill, 2005).

4. ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ Sp

La família Sp/XKLF (Specificity protein/Krüppel-like factor) comprèn un gran nombre de factors de transcripció homòlegs, tots ells caracteritzats per tenir una seqüència altament conservada de tres dits de zinc que integra el seu domini d'unió a DNA.

Es poden distingir dos grans grups en la família i) les proteïnes Sp, anomenades a partir del factor Sp1 i que presenten totes elles motius similars als seus extrems N-terminals: i ii) les proteïnes KLF que engloben un conjunt de pèptids més heterogeni.

En el grup de les proteïnes Sp hi trobem actualment 8 membres, Sp1, Sp2, Sp3, Sp4, Sp5, Sp6, Sp7 i Sp8. Es tracta de factors de transcripció que presenten gran afinitat per la unió a seqüències riques en G com són les anomenades *caixes GC*, amb seqüència consens GGGCGG (Klevit *et al.*, 1991). D'entre els factors Sp més coneguts destaquen especialment Sp1 i Sp3 per la seva expressió ubiqua en tots els teixits dels organismes superiors i per la letalitat que la seva absència en ratolins *knockout* suposa (Marin *et al.*, 1997; Bouwman *et al.*, 2000).

4.1 Estructura dels Factors Sp

Tots els factors Sp presenten dominis estructurals similars (vegeu FIGURA 10). Els dos dominis rics en glutamines (A i B) resulten essencials per la seva capacitat transcripcional. Els dominis rics en serines/treonines resulten dianes per a les modificacions posttraduccional i són imprescindible per a la multimerització i l'activació sinèrgica (Courey i Tijan 1988). Els tres dits de zinc es troben prop de l'extrem C-terminal i són suficients i necessaris per a la unió a DNA però no ho són per a l'activació transcripcional.

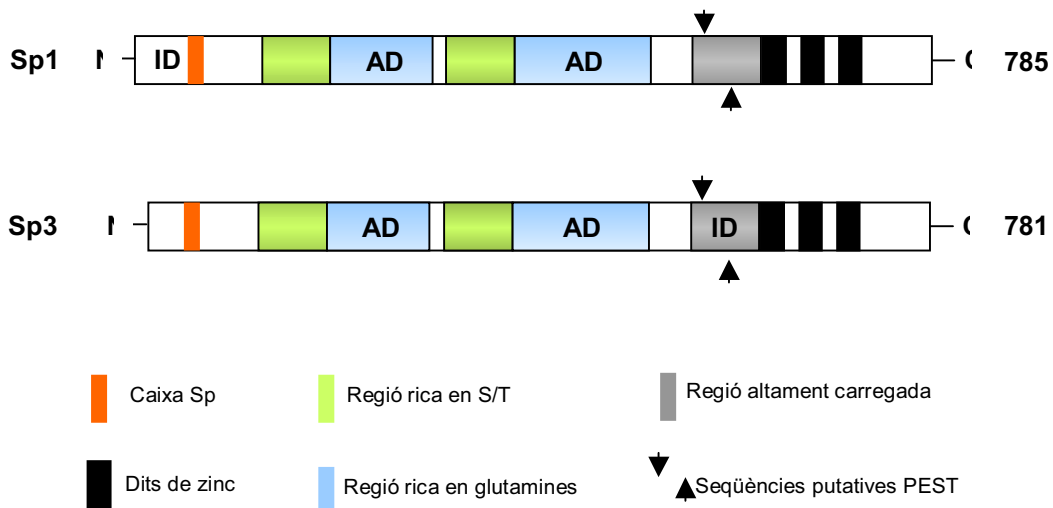


FIGURA 10. Esquema de l'estructura dels factors Sp1 i Sp3.

Es mostren els diferents dominis funcionals i estructurals que els caracteritzen. Adaptat d Bouwman i Philipsen, 2000.

S'ha identificat un domini inhibidor (ID) en la proteïna Sp1 (Murata *et al.*, 1994) i dos dominis activadors (AD) també presents en altres membres de la família. L'existència de varis dominis d'activació independents els profereix la capacitat d'unir-se i actuar en una àmplia varietat de distàncies en relació a l'inici de transcripció i en les dues orientacions possibles.

4.2 Sp1- *Specificity Protein 1*

Sp1 és el factor de transcripció més estudiat i conegut de la família ja que fou el primer factor de transcripció clonat en mamífers (Kadonaga *et al.*, 1987). Es tracta d'una proteïna de 781 aminoàcids en humans que en electroforesi es resol com a dues espècies diferents de 95 i 105 kDa corresponents a diferents estats de fosforilació (Briggs *et al.*, 1986). A ratolí s'ha descrit addicionalment una altra isoforma de 49 kDa, mSp1-S, generada per *splicing* diferencial a la qual li manquen els dominis necessaris per transactivar (Persengiev *et al.*, 1995).

Certes modificacions posttraduccionals confereixen a Sp1 canvis en la capacitat d'unió a DNA i/o en l'activitat transactivadora. Així doncs, els nivells de fosforilació de la proteïna estan regulats al llarg del cicle cel·lular (Jensen *et al.*, 1997) i en la diferenciació (Legget *et al.*, 1995) mitjançant l'acció de múltiples quinases com la proteïna quinasa A (Rohlf *et al.*, 1997), la proteïna quinasa C ξ (Pal *et al.*, 2001), la ciclina A/Cdk2 (Haidweger *et al.*, 2001) o la MAP quinasa (p42/p44) (Merchant *et al.*, 1999; Miliani-Mongiat *et al.*, 2002) entre d'altres. Algunes fosforilacions augmenten la capacitat d'unió a DNA de Sp1 i d'altres no l'afecten. La glicosilació de la proteïna al seu torn, regula la seva degradació alterant-ne l'estabilitat (Han i Kudlow 1997) i participant en l'associació de Sp1 amb altres factors (Roos *et al.*, 1997). S'ha postulat també que la glicosilació determinaria el transport de Sp1 al nucli: mentre la hiperglicosilació del factor facilitaria la seva translocació al nucli i conseqüent activació de la transcripció, l'estat hipoglicosilat faria Sp1 més susceptible a la degradació proteasòmica i el mantindria de forma poc activa al citoplasma (Keembiyehetty *et al.*, 2002).

4.2.1 Regulació de la Transcripció per Sp1

Sp1 s'uneix al DNA en seqüències riques en GC, anomenades *caixes GC*, i a seqüències relacionades com les caixes CACCC o les caixes GT (Thiesen i Bach 1999). La seqüència consens per Sp1 és GGGCGG (Kadonaga *et al.*, 1986) i malgrat la seva assimetria, és funcional en qualsevol orientació. Els promotors que responen a Sp1 sovint presenten múltiples llocs d'unió per a aquest factor i en aquests casos, el lloc més important sol ser el més pròxim a l'inici de transcripció (Kadonaga *et al.*, 1987).

El factor de transcripció Sp1 ha estat descrit des dels seus orígens com un activador de la transcripció (Pascal i Tijan, 1991). En aquest sentit es veié que Sp1 és capaç de formar

multímers d'acció sinèrgica: una primera molècula d'Sp1 s'uneix al DNA i posteriorment, per interaccions directes proteïna-proteïna que no impliquen noves unions al DNA, es formen complexos d'ordre superior. Diferents multímers units a seqüències allunyades en el DNA poden interaccionar entre ells formant llaços al DNA i creant una interfase proteica que incrementa de manera sinèrgica l'activació transcripcional mitjançada per Sp1 (Pascal & Tijan, 1991; Su *et al.* 1991).

Sp1 s'ha relacionat amb la transcripció de gens que no tenen caixa TATA (Pugh i Tijan, 1991) i és capaç d'interactuar amb una gran varietat d'altres proteïnes (vegeu apartat següent) formant grans complexos que regulen l'activitat transcripcional. I és que Sp1 s'ha identificat com a integrador del complex coactivador CRSP (Cofactor Required for Sp1 Activation) més tard també denominat Mediador (Med) (Ryu *et al.*, 1999). Buscant cofactors putatius que mitjancesin els elevats nivells d'activació produïts per Sp1, es va aïllar aquest gran complex coactivador multimèric capaç d'interaccionar a través de les 15 subunitats que el componen amb la RNA polimerasa II (Näär *et al.*, 2002), amb factors generals de la maquinària de transcripció, amb coactivadors/corepressors i amb una sèrie específica de factors de transcripció que l'aporten als promotors dels seus determinats gens diana (Taatjes i Tijan, 2004). De manera que el CRSP suposa un pont d'unió entre la maquinària basal de transcripció i els factors de transcripció i permet també coordinar els efectes sobre la transcripció de dues vies diferents, per exemple els de Sp1 i els receptors nuclears ja que tots dos poden utilitzar CRSP com a coactivador per a la seva activació transcripcional (Rachez *et al.*, 1999; Lemon *et al.*, 2001). El CRSP és doncs seleccionat per a participar en la transactivació de gens que estiguin regulats específicament per factors de transcripció capaços d'interaccionar amb alguna de les seves subunitats com són Sp1, SREBP1 (Näär *et al.*, 1998), la proteïna d'adenovirus E1A (Boyer *et al.*, 1999) i un gran nombre de receptors nuclears com ER (Burakov *et al.*, 2000), GR (Hittelman *et al.*, 1999), TR, VDR, RXR, etc. (Fondell *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1998).

Ocasionalment s'ha descrit que Sp1 pot actuar com a repressor de la transcripció, com ocorre en el promotor de la translocasa de nucleòtids d'adenina-2 (ANT2) en el qual, a part de tenir la funció activadora típica gràcies a la presència de diferents caixes GC que actuen sinèrgicament, la posició propera a la caixa TATA d'una de les seqüències GC fa que Sp1 competeixi amb la formació del complex de transcripció basal (Li *et al.*, 1996). De tota manera estudis recents estan demostrant la repressió transcripcional exercida per enzims histona desacetilases (HDAC3) que exerceixen el seu efecte ancorant-se al DNA via Sp1 unit a les caixes GC presents als promotors de p15 (INK4b) i p21 (WAF1/cip1) (Huang *et al.*, 2006).

Pel què fa a les vies regulades per Sp1 se l'ha implicat en l'activació d'una gran varietat de gens essent tant *housekeeping*, com específics de teixit o regulats al llarg del cicle cel·lular. De forma similar s'ha involucrat a Sp1 en la regulació de diferents processos cel·lulars com el cicle cel·lular, la remodelació de la cromatina i la propagació de zones lliures de metilació (Macleod *et al.*, 1994; Datta *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1996; Karlseder *et al.*, 1996).

4.2.2 Interaccions d'Sp1 amb altres Factors de Transcripció

Sp1 participa en el procés d'activació de la transcripció unint-se a un conjunt d'altres factors que permetran la iniciació de la transcripció per la RNA polimerasa II. En aquest sentit s'han detectat interaccions físiques de Sp1 amb tres components del factor de transcripció IID (TFIID) entre els que trobem la *TATA-Binding Protein* (TBP) (Gill *et al.*, 1994). D'altra banda, als promotors que no disposen de caixa TATA s'ha descrit la interacció entre el factor *Ying-Yang 1* (YY-1) unit a l'element Iniciador (Inr) i Sp1 (Lee *et al.*, 1993).

Mitjançant els seus dits de zinc, Sp1 és capaç d'interaccionar amb una gran varietat de proteïnes que es troben regulant els mateixos promotors diana. Entre elles trobem diferents membres de la família de factors Rel, com la subunitat RelA (p65) de NF- κ B (Sif *et al.*, 1993). De forma similar, l'extrem C-terminal de Sp1 pot d'interaccionar amb el factor de transcripció E2F-1 (Karlseder *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996). Al promotor de l'inhibidor 1 de l'activador del plasminogen (PAI-1) s'ha detectat interacció funcional entre Sp1 i Sp3 i HTLF (*Helicase-Like Transcription Factor*) (Ding *et al.*, 1999). També s'ha descrit la seva cooperació funcional i interacció física *in vivo* i *in vitro* amb el factor de transcripció Oct-1 (Octamer-1) mitjançant el domini ric en glutamines (Janson i Pettersson, 1990; Ström *et al.*, 1996). Per a la inducció del gen CYP11A1 Sp1 interacciona amb AP-2 (Pena *et al.*, 1999) i en una gran varietat de promotors s'ha observat la unió a NF-YA (*Nuclear Factor-Y*, subunitat A) (Liang *et al.*, 2001).

S'han descrit també interaccions de Sp1 amb supressors de tumors com p53 (Gualberto i Baldwin, 1993). Aquesta interacció pot augmentar o disminuir la capacitat d'unió al DNA de Sp1 o alterar la seva interacció amb la maquinària basal (Lee *et al.*, 2000b). També s'ha descrit la interacció física de Sp1 amb la proteïna del retinoblastoma (pRB) (Chang *et al.*, 2001), causant inhibició de l'activitat transactivadora de Sp1, per exemple al promotor de la manganès superòxid dismutasa (MnSOD) (Dhar *et al.*, 2006) o potenciant l'activació per Sp1, al promotor de p21 (Koutsodontis *et al.*, 2001). A més s'ha vist com, en promotors com el del gen de la telomerasa, MDM2 uneix Sp1 reprimint-lo (Zhao *et al.*, 2005) i s'ha

descriu com la unió MDM2-Sp1 pot ser desplaçada per pRB en unir-se a MDM2 en la mateixa zona que Sp1 restaurant així la seva activitat transcripcional (Johnson-Pais *et al.*, 2001). Sp1 també interacciona amb altres oncogens i supressors de tumors com BRCA1 (Maor *et al.*, 2001) i c-jun (Chen i Chang, 2000). També cal destacar la unió de Sp1 a ciclina A (Haidweger *et al.*, 2001) i l'efecte inhibidor de l'activitat transcripcional d'Sp1 que exerceix la ciclina D1 en unir-s'hi (Opitz i Rustgi, 2000).

A nivell d'enzims modificadors de la cromatina s'ha detectat la unió de Sp1 a diferents histona desacetilases (Doetzlhofer *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006) fet que sol comportar la repressió del gen.

Recentment s'ha observat que certes interaccions d'Sp1 amb altres factors de transcripció poden donar-se via coactivadors que farien de pont connector entre activadors transcripcionals amb dianes al mateix promotor. N'és un bon exemple SNURF (*Small Nuclear RING Finger Protein*) un coactivador que interacciona amb Sp1 i amb altres factors de transcripció com SF-1 (*Steroidogenic Factor 1*). Així per exemple, en l'activació del gen LH β (*Luteinizing Hormone β*) estimulada per GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) es produeix doncs una sinèrgia entre Sp1 i SF-1 gràcies a la connexió que entre ells suposa SNURF (Curtin *et al.*, 2004).

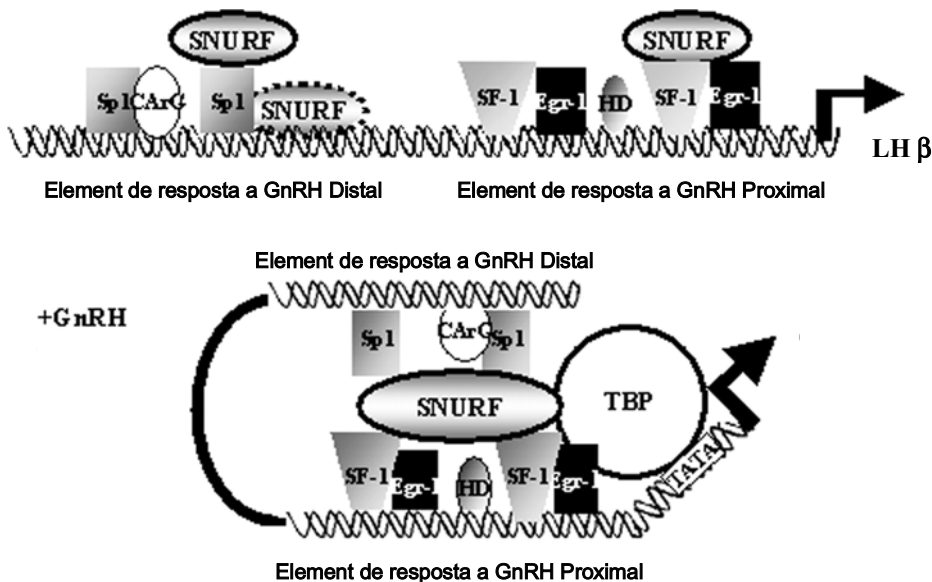


FIGURA 11. Model de la interacció d'Sp1 i SF-1 a través de SNURF.

Curtin *et al.* proposen la formació d'un bucle al DNA del promotor del gen de LH β que permet connectar les seves regions distal i proximal de resposta a GnRH gràcies a les interaccions del cofactor SNURF amb Sp1 i SF-1 en cadascuna d'elles. Extret i modificat de Curtin *et al.* 2004.

4.2.3 Interacció d'Sp1 amb els Receptors Nuclears: Sp1 i AR

En els promotors de molts dels gens regulats per hormones es troben caixes GC i sovint s'ha implicat el factor Sp1 en la regulació transcripcional mitjançada per receptors nuclears (Husmann, *et al.*, 2000). Aquesta cooperació en el control de l'expressió gènica es realitza via interaccions entre Sp1 i una gran varietat de receptors nuclears (Yuan *et al.*, 2005). Així doncs, el receptor d'estrògens per exemple pot formar un complex amb Sp1 que provoca la transactivació del promotor del gen de la *heat shock protein 27* en absència d'un element de resposta a estrògens identificat (Porter *et al.*, 1997). De manera similar, la progesterona activa l'expressió del gen p21^{WAF1} mitjançant un mecanisme que implica la interacció entre el receptor de la progesterona i Sp1 (Owen *et al.*, 1998). Més recentment s'ha descrit que la interacció del receptor d'andrògens pot interaccionar amb Sp1 causant transactivació o supressió de l'expressió dels seus gens diana. Estudis de Curtin *et al.* demostren que en rata els andrògens inhibeixen l'expressió del gen LH β estimulada per GnRH a través de la interacció proteïna-proteïna que es produeix entre AR i Sp1 causant d'una reducció en la unió d'Sp1 al DNA (Curtin *et al.*, 2004). Tot i això, l'associació d'AR i Sp1 resulta en una activació sinèrgica en el promotor del gen p21^{WAF1} (Lu *et al.*, 2000) i s'ha descrit que cofactors com SNURF (*Small Nuclear RING Finger Protein*) són capaços de potenciar l'activació tant d'AR com de Sp1 i de tots dos conjuntament interaccionant de manera simultània amb aquests (Moilanen *et al.*, 1998). Per tant, el fet que la interacció entre Sp1 i AR resulti en una transactivació o supressió gènica pot dependre del gen diana particular, del tipus cel·lular o d'ambdues coses (Yuan *et al.*, 2005).

4.3 Sp3 - *Specificity Protein 3*

El factor de transcripció Sp3 és una proteïna de 697 aminoàcids (Kingsley i Winoto, 1992) de la qual es detecten tres isoformes diferents, una d'uns 110-115 kDa i les altres dues entre 60-70 kDa pel que sembla procedents de dues seqüències ATG molt properes entre si situades a 3' de l'inici de traducció de la isoforma grossa (Kennett *et al.*, 1997). Hi ha hagut però moltes discrepàncies a l'hora de determinar tant en la localització cromosòmica del gen com el seu inici de traducció.

Es creu que es pot produir la fosforilació d'Sp3 als dominis de dits de zinc tal com passa a Sp1, donada l'elevada similitud que ambdues proteïnes presenten. També s'ha

observat que l'activitat transcripcional de Sp3 està regulada mitjançant l'acetilació puntual d'una lisina de la regió inhibidora essencial per a que el factor exerceixi aquesta funció (Braun *et al.*, 2001).

4.2.1 Regulació Transcripcional per Sp3

El paper regulador de la transcripció d'Sp3 ha estat molt controvertit. Clàssicament se'l presentava com a repressor per competició pel lloc d'unió a DNA de la transcripció mitjançada per Sp1 (Hagen *et al.*, 1994; Majello *et al.*, 1994; Majello *et al.*, 1995). Tot i això, treballs posteriors han identificat l'existència en la proteïna de dominis repressors que permetrien una repressió activa més enllà de la mera competició pel lloc d'unió (De Luca *et al.*, 1996). Aquests autors identifiquen una regió activadora rica en glutamines a l'extrem N-terminal de Sp3 (l'homòloga al domini A de Sp1) i una regió inhibidora (ID) anterior als dits de zinc (vegeu FIGURA10). El grup proposa que Sp3 és un factor bifuncional l'activitat del qual depèn del context cel·lular (Majello *et al.*, 1997).

Treballs posteriors citen la isoforma de 110 kDa de Sp3 com a activadora transcripcional i les isoformes truncades com a repressores que exercirien el seu efecte per interacció amb la maquinària basal de transcripció (Kennett *et al.*, 2002). Aquest aspecte no està encara ben definit i resulta molt complex davant les antagoniques descripcions de l'activitat d'Sp3 que es troben en la literatura. Així per exemple alguns articles citen fins i tot activitats repressores d'Sp1 i activadores de Sp3 sobre els promotors de la sintasa d'àcids grassos (FAS) o la citrat-liasa (ACL) (Fukuda *et al.*, 1999). En aquest sentit però, sembla que l'estequiometria i els nivells d'expressió d'Sp1 i Sp3 presents en el tipus cel·lular en concret juguen un paper important per a l'establiment de la funció de cadascun d'ells tal i com passa al promotor de la *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) (Xu *et al.*, 2007).

Entre els gens diana de Sp3 de nou tornem a trobar-nos tant gens *housekeeping*, com específics de teixit o gens regulats al llarg del cicle cel·lular. En presentar la mateixa seqüència diana per a la unió que Sp1 es troba justament regulant majoritàriament el mateix conjunt de gens i serà en funció del context cel·lular i del propi promotor el que determini el tipus d'interacció i relació que entre ambdós factors s'estableixi.

4.2.2 Interacció d'Sp3 amb altres Factors de Transcripció

Davant l'elevada similitud estructural i de seqüència que Sp1 i Sp3 presenten, és molt probable que tots dos presentin la capacitat d'unir-se a les mateixes proteïnes. Recolzant aquest argument s'ha descrit la interacció de Sp3 amb components de la maquinària basal (Kennett *et al.*, 2002), amb el factor E2F-1 (Rotheneder *et al.*, 1999) i amb el factor de transcripció NF-Y (Yamada *et al.*, 2000). S'observà també la unió de Sp3 amb la proteïna del retinoblastoma (pRb) (Udvardia *et al.*, 1995) i amb diferents histones desacetilases (Sun *et al.*, 2002).

Recentment però, s'ha descrit la capacitat del factor de transcripció *Neuron-Restrictive Silencer Factor* (NRSF) per interaccionar de manera exclusiva amb Sp3, ja que no s'ha pogut detectar la seva interacció ni canvi amb Sp1 (Kim *et al.*, 2006)

5. ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ CCAAT/Enhancer Binding Proteins

Les *CCAAT/Enhancer Binding Proteins* (C/EBPs) constitueixen una família de factors de transcripció caracteritzats per presentar un domini bàsic de cremallera de leucines (bZIP) al seu extrem C-terminal implicat en la dimerització i en la unió al DNA. Les semblances entre els seus membres suggereixen una història en l'evolució de duplicacions genètiques amb una subseqüent pressió de diversificació. La família de proteïnes resultant varia en l'especificitat de teixit i la capacitat de transactivació. Fins a l'actualitat s'han aïllat 6 membres de la família (C/EBP α -C/EBP ζ) que presenten certa diversificació afegida a causa de les diferents isoformes descrites per alguns d'ells i per un extensiu ventall d'interaccions proteïna-proteïna dins de la família i amb altres factors de transcripció. L'expressió de les C/EBPs està regulada a múltiples nivells en diverses situacions fisiològiques i patològiques per acció d'un ampli rang de factors que inclouen hormones, mitògens, citoquines, nutrients i certes toxines.

5.1 Estructura dels Factors C/EBP

Totes les isoformes de C/EBP comparteixen una gran homologia, ~90 %, al seu extrem C-terminal en el qual es troba el domini bZIP (Johnson i McKnight, 1989; Williams *et al.*,

1991; Hurst, 1995;) (Vegeu FIGURA 12). Aquest domini consisteix en una regió rica en aminoàcids bàsics que s'uneix al DNA seguit del motiu de dimerització ric en leucines que adquireixen una configuració helicoïdal permetent que dues d'aquestes repeticions disposades paral·lelament puguin interdigitar (Landschulz *et al.*, 1989). La dimerització a més és un requisit per a la unió al DNA que es realitza a través de la zona bàsica i que ve determinada per la seva seqüència aminoacídica (Johnson, 1993). Gràcies a l'elevat grau de conservació del domini bZIP, les diferents C/EBPs són capaces de formar heterodímers en totes les combinacions possibles dins la família i, excepte C/EBP ζ, reconeixen la mateixa seqüència de DNA diana (Ron *et al.* 1992). La seqüència consens d'unió és PuPuPuTGCAAT(A/C)CCC, on Pu és una purina.

El domini N-terminal de les C/EBPs en canvi és, a excepció de tres petites subregions conservades, força divergent. Aquestes subregions conformen el domini d'activació (absent a C/EBP γ) i són responsables de la interacció amb la maquinària basal de transcripció i de la transactivació exercida per les C/EBPs (Nerlov *et al.*, 1994).

5.2 Distribució tissular dels factors C/EBPs

Tot i l'existència de 6 gens, el nombre de C/EBPs presents en un tipus cel·lular pot ser

més elevat (Vegeu FIGURA 12). Això es degut a l'ús alternatiu de codons d'inici de traducció en un mateix mRNA per degoteig en la lectura ribosomal, en el cas de C/EBP α i β, o a l'ús de promotors alternatius i *splicing* diferencial de C/EBP ε (Lekstrom-Himes, 2001). Així l'mRNA de C/EBP α pot donar lloc a dos polipèptids de 42 kDa i 30 kDa (Ossipow *et al.*, 1993). C/EBP β presenta tres isoformes de 38 kDa (LAP*), 35 kDa (LAP) i 20 kDa (LIP) essent els dos darrers els més abundants en cèl·lules (Descombes i Schibler, 1991). LAP conté tant el domini d'activació com el bZIP

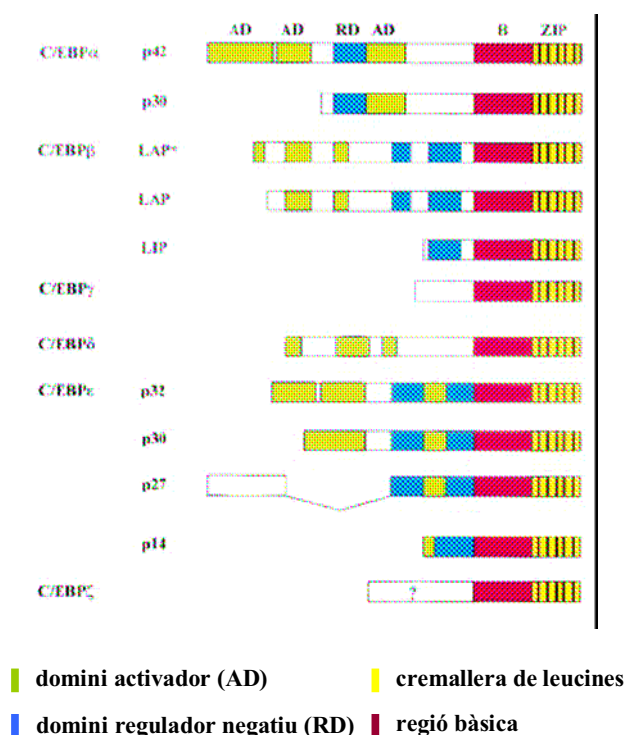


FIGURA 12. Estructura dels factors C/EBPs. Esquema on es mostren els diferents dominis funcionals estructurals que caracteritzen els membres C/EBP. Extret de Ramji *et al.*, 2002.

mentre sols aquest darrer és present a LIP que resulta un inhibidor dominant negatiu.

La formació d'heterodímers entre tots els diferents membres C/EBP amb un potencial d'activació propi, així com les interaccions amb altres factors de transcripció, encara compliquen més l'escenari de la regulació gènica exercida per aquesta família (Hsu *et al.*, 1994).

El perfil d'expressió de les diferents isoformes de C/EBP ha estat determinat a nivell de mRNA i proteïna i s'ha detectat que sovint no es correlacionen indicant l'existència de regulació posttranscripcional teixit específica (Descombes *et al.*, 1990). En general, C/EBP α s'expressa amb alts nivells al teixit adipós, al fetge, a l'intestí, als pulmons, a les glàndules adrenals, en cèl·lules mononuclears i a la placenta (Cao *et al.*, 1991). L'expressió constitutiva de C/EBP β és particularment elevada al fetge, intestí, pulmó, teixit adipós, melsa i ronyó (Chang *et al.*, 1990; Kousteni *et al.*, 1998) i la de C/EBP δ es dona al teixit adipós, al pulmó i a l'intestí (Kinoshita *et al.*, 1992). C/EBP γ i C/EBP ζ s'expressen de manera ubiqua (Ron *et al.*, 1992) i C/EBP ϵ està restringida a cèl·lules limfoides (Chumakov *et al.*, 1997).

5.3 Regulació de la Transcripció per C/EBPs

Els factors C/EBP tenen efectes pleiotròpics en la regulació transcripcional dels mamífers i se'ls ha involucrat en un gran nombre de processos com diferenciació, resposta inflamatòria, regeneració del fetge, control del metabolisme i manteniment de respostes cel·lulars específiques. Els patrons d'expressió de ratolins *knockout* per C/EBPs indiquen que es produeix certa redundància entre ells a l'hora de regular els diferents gens diana. Cal tenir present a més, que com a mínim *in vitro*, tots els factors C/EBP són capaços d'unir la mateixa seqüència (Ramji i Foka, 2004).

Entre els gens regulats per C/EBPs destaquen l'albumina, la proteïna C-reactiva, la glucosa-6-fosfatasa, la glicogen sintasa, l'haptoglobina, enzims del cicle de l'ornitina i la fosfoenol-piruvat carboxiquinasa (PEPCK) als hepatòcits, la leptina als adipòcits, TNF α i interleuquines a les cèl·lules mieloides, proteïnes surfactants al pulmó, etcètera.

5.4 Regulació de l'Activitat de C/EBPs: C/EBP α i C/EBP β

Les activitats dels factors C/EBP estan sotmesos a diversos nivells de regulació des del control transcripcional dels seus gens, a nivell d'interacció amb altres proteïnes i per modificacions transcripcionals com la fosforilació i l'acetilació que determinen canvis tant en les seves afinitats d'unió al DNA com en el seu potencial activador i en la localització nuclear. A més, s'han descrit mecanismes de regulació específics de cèl·lula, de teixit i fins i tot d'espècie (Buck *et al.*, 2001).

C/EBP α

El principal regulador de l'expressió de C/EBP α és l'hormona tiroïdal que a través d'un element de resposta TH situat al promotor proximal del gen n'activa la transcripció. De fet s'ha vist com ratolins hipotiroïdals congènits presenten una davallada important en l'expressió tant de C/EBP α com de C/EBP β al fetge (Menéndez-Hurtado *et al.*, 2000). També es descriuen però al promotor de C/EBP α llocs d'unió per Sp1, NF-1 i pels propis membres C/EBPs i s'ha vist com la transfecció en línies cel·lulars de plàsmids d'expressió per C/EBP α/β causen una autoactivació de la seva expressió (Legraverend *et al.*, 1993).

C/EBP β

Pel què fa a C/EBP β , s'ha descrit que tant en ratolí com en humà el seu promotor està subjecte a autoregulació (Niehof *et al.*, 2001). Cal destacar també la regulació per part del factor CREB (*cAMP-Response Element Binding Protein*) que mitjança l'activació de l'expressió de C/EBP β en resposta a cAMP (Niehof *et al.*, 1997). Però la proteïna C/EBP β es veu regulada a molts nivells tant pel què fa a expressió com del seu potencial activador, localització nuclear o capacitat d'unió al DNA per efecte d'una gran varietat de factors. Així per exemple l'hormona del creixement en potencia l'expressió (Clarkson *et al.*, 1995) i paral·lelament en col·laboració amb la via de les MAP quinases el seu desplaçament cap a zones del DNA heterocromàtiques (Piwien-Pilipuk, *et al.*, 2003). Diverses interleuquines i les vies de senyalització d'EGF i de TGF- β potencien la seva activitat mitjançant fosforilacions que anul·len el seu domini inhibitor (Rana *et al.*, 1995) mentre que la fosforilació causada per PKA impedeix la unió de C/EBP β al DNA (Trautwein *et al.*, 1994).

Molt recentment s'ha descrit com l'acetilació d'un grup de leucines de l'extrem N-terminal de C/EBP β promoguda per glucocorticoides potencia de manera molt important la seva activitat transactivadora en la diferenciació dels preadipòcits. En aquest estudi s'observa com el tractament amb dexametasona indueix l'acetilació de C/EBP β per part dels cofactors PCAF i GCN5 impedit que aquesta interaccioni amb l'histona desacetilasa 1 (HDAC1) capaç d'exercir repressió gènica (Wiper-Wergeron *et al.*, 2007). Un article coetani descriu l'acetilació de C/EBP β en preadipòcits realitzada pels coactivadors p300 i *p300/CREB-binding protein associated factor* i potenciada per l'hormona del creixement (Cesena *et al.*, 2007). Els autors conclouen que cada promotor té uns requeriments específics d'acetilació/modificació transcripcional de C/EBP β per a què es doni la seva regulació concreta. En aquest sentit, un estudi anterior realitzat en cultiu primari de cèl·lules de pulmó de ratolí, assenyalava com el receptor de glucocorticoides, en presència de lligand, promou, en aquest cas, la fosforilació de C/EBP, que es produeix en el residu de treonina 235 i potencia de manera molt efectiva la unió del factor al DNA sense generar síntesi *de novo* (Berg *et al.*, 2005).

Sembla clar per tant, que els efectes i repercussions dels diferents múltiples reguladors de les C/EBPs depenen tant del context cel·lular com del propi promotor regulat.

6. ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ GATA

La família de factors de transcripció GATA està integrada per 6 membres que presenten el més elevat grau de conservació en els seus dominis d'unió a DNA, integrats per dos dits de zinc (MacNeill *et al.*, 1997). Amb una seqüència d'unió consens comuna i representada per A/TGATAA/G, els factors GATA són importants reguladors de la diferenciació dels llinatges cel·lulars durant el desenvolupament i de la transcripció de cèl·lules diferenciades dels vertebrats (Bresnick *et al.*, 2005).

6.2 Estructura dels Factors GATA

Els factors GATA exerceixen les seves activitats biològiques tant a través de l'activació com de la repressió dels seus gens diana. Una de les característiques essencials per exercir les seves funcions és el l'extrem C-terminal on presenten els dos dominis en dit de zinc que els permeten unir-se al DNA. A GATA-1 per exemple, s'ha vist com el segon d'aquests dominis permet la unió del factor a la seqüència diana (Ko i Engel, 1993),

mentre que el primer dit és responsable de la interacció dels factors GATA amb els coreguladors FOG (*Friend of GATA*) i estabilitza la unió a certs motius de DNA com GATC (Svensson *et al.*, 1999; Newton *et al.*, 2000). Es creu que l'extrem N-terminal al seu torn, mitjançant la transactivació (Visvader *et al.*, 1995) i s'ha vist que pacients de síndrome de Down amb leucèmia megacarioblàstica presenten versions N-terminal truncades de GATA-1 fet que denota la importància d'aquesta regió encara poc estudiada (Mundschau *et al.*, 2003).

6.2 Distribució Tissular dels Factors GATA

Cadascun dels membres GATA es troba regulat transcripcionalment de manera teixit específica i se'ls pot dividir en dues subfamílies en base a les similituds funcionals i principals teixits diana (Laverriere *et al.*, 1994):

- **GATA-1, -2 i -3:** controlen passos crítics en el desenvolupament eritroctari i limfoide i s'expressen majoritàriament en cèl·lules hematopoiètiques (Fujiwara *et al.*, 1996)
- **GATA-4, -5 i -6:** controlen el desenvolupament del cor, cèl·lules musculars i òrgans derivats de l'endoderm com estómac, intestí, fetge, pàncrees. (MacNeill *et al.*, 1997)

6.3 Els Factors GATA al Ronyó: el Factor GATA-3

GATA-3, a part de participar en el desenvolupament hematopoiètic, s'expressa de manera molt important al ronyó i estudis en embrions de ratolí i humans l'han descrit com un factor determinant en el desenvolupament renal (Van Esch *et al.*, 2001). De fet, l'haploinsuficiència de GATA-3 així com mutacions en el seu gen s'han associat com a responsables de la síndrome d'hipotiroïdisme, sordesa i displàsia renal (*Hypoparathyroidism, Deafness and Renal dysplasia syndrome*, HDR) (Van Esch *et al.*, 2000). En aquesta patologia s'observen anormalitats en el tracte renal com deformitats de la pelvis i calzes renals, i compressions del glomèruls i els túbuls que solen portar a la insuficiència renal apart de provocar també alteracions congènites en les glàndules paratiroides i a l'orella interna (Muroya *et al.*, 2001). Fins a l'actualitat, la manera precisa en què les mutacions de GATA-3 causen aquestes anormalitats resta per ser identificada.

La caracterització de les diferents mutacions observades en famílies amb HDR han portat a determinar que les que afecten al dit de zinc C-terminal suposen una pèrdua de la unió de GATA-3 al DNA mentre que les que comprometen l'altre domini en dit comporten una alteració de les interaccions amb FOG2 i altres factors de transcripció com Sp1, GATA-1, GATA-2 o un canvi en l'afinitat d'unio (Ali *et al.*, 2007). Però aquestes anàlisi de les mutacions de GATA-3 associades a HDR no permeten establir una correlació amb el fenotip i no han permès identificar els gens diana de GATA-3 a ronyó (Nesbit *et al.*, 2004).

Un altre exemple de la importància de GATA-3 a ronyó es troba en la síndrome nefrítica del lupus. En aquesta patologia recentment s'ha associat la inflamació intrarenal que s'hi produeix amb nivells elevats d'expressió al túbul i interstici renal de GATA-3 i certes interleuquines (Chan *et al.*, 2007).

Finalment, també cal destacar ja fora del context renal, la importància de 6 llocs d'unio per a factors GATA presents al promotor i *enhancer* del gen *prostate-specific antigen* (PSA) els quals s'han descrit com a essencials per a una inducció androgènica òptima. Aquest estudi suggereix per tant una col·laboració indispensable entre AR andrògens i els membres GATA majoritàriament expressats a pròstata, GATA-2 i GATA-3, per assolir la màxima resposta a andrògens (Perez-Stable *et al.*, 2000.)

7. EL RONYÓ

El ronyó constitueix l'òrgan fonamental de l'aparell urinari propi dels vertebrats. Joga un paper fonamental en el manteniment del medi intern de l'organisme mitjançant la secreció tubular selectiva de toxines i substàncies de desfet, la reabsorció de substàncies metabòliques importants per a l'organisme i la importació i exportació de grans volums d'aigua en resposta a diferents situacions fisiològiques. Tots aquests processos regularan finalment la concentració dels productes del metabolisme, la pressió osmòtica, el balanç àcid-base, la composició iònica i el volum del medi intern.

D'altra banda, el ronyó també participa en dos mecanismes homeostàtics de vital importància mitjançats per hormones com són la síntesi d'eritropoietina, implicada en la producció d'eritròcits a la medul·la òssia, i el manteniment i regulació de la pressió sanguínia pel sistema renina-angiotensina, principalment a través de la secreció de renina.

7.1 Estructura Renal

Els ronyons de mamífer són dos òrgans parells situats a la part posterior de l'abdomen sota el peritoneu que es localitzen a cada banda de la columna vertebral. Estan envoltats per un embolcall fibrós que conforma una làmina ferma que recobreix tot l'òrgan.

En la majoria de mamífers cada ronyó s'alimenta d'una sola artèria renal que emana directament de l'aorta abdominal de manera que, rep la sang arterial a la màxima pressió disponible. Un cop filtrada al glomèrul, la sang surt del ronyó per la vena renal.

En un tall longitudinal, al ronyó es poden diferenciar dues zones l'escorça o còrtex,

situada a la part externa, i la medul·la, situada a la part interna. La medul·la es presenta com una sèrie de masses estriades còniques, les piràmides renals, les bases de les quals es troben en la regió límit còrticomedul·lar mentre que els seus àpexs convergeixen en el sinus renal. Als mamífers petits, com rata i ratolí, el ronyó és unipapil·lar pel que presenta una sola piràmide i en les espècies de mida superior, com l'home o el gos, el ronyó és multipapil·lar i conté múltiples piràmides.

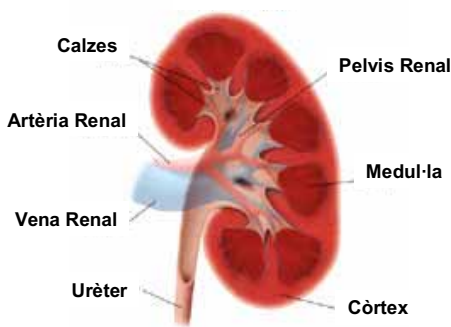


FIGURA 13. Secció vertical del ronyó.
Extret i adaptat de www.anatomia.tripod.com

La Nefrona

La unitat funcional del ronyó és la nefrona. Un ronyó de rata adulta conté unes 30000 nefrones mentre que un ronyó humà en presenta ~1 milió. Cada nefrona està constituïda seqüencialment pel corpuscle renal, l'aparell juxtaglomerular, el túbul proximal, la nansa de Henle i el túbul distal. Funcionalment la nefrona es divideix en diferents segments caracteritzats cadascun d'ells per desenvolupar funcions específiques i diferents que en últim terme venen determinades pels gens que s'hi expressen.

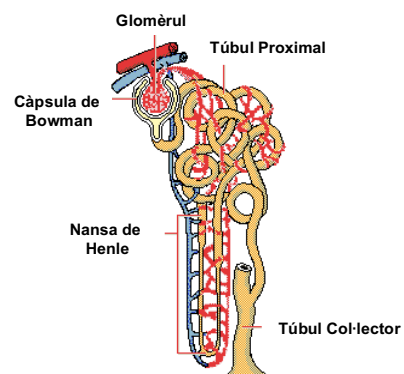


FIGURA 14. Esquema de la nefrona.
Extret i adaptat de www.anatomia.tripod.com

Així doncs, la funció renal comença al corpuscle renal que està constituït per un cabdell entortolligat de capil·lars sanguinis, el glomèrul, i una coberta membranosa que l'envolta, la càpsula de Bowman. Els elements del plasma es filtren pels capil·lars glomerulars i el filtrat glomerular és conduït al túbul renal. Al llarg del recorregut pel túbul proximal el filtrat glomerular esdevé orina en produir-s'hi la reabsorció d'ions (Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ ...) aigua i soluts orgànics com la glucosa i secreció d'àcids i bases orgàniques. Seguidament el pas per la nansa de Henle suposa una reabsorció continuada de sodi, clor i aigua i determina el manteniment de l'equilibri hídric de l'organisme. A continuació el túbul distal segueix amb la reabsorció d'ions sodi i clor però ja resulta poc permeable a l'aigua i secreta protons i potassi. Finalment el túbul col·lector recull l'orina dels túbuls distals de diverses nefrones i desemboca al conducte papil·lar de Bellini intervenint també en el balanç hídric sota el control de l'hormona antidiurètica.

Cal destacar també el paper de l'aparell juxtaglomerular, encarregat del manteniment de la pressió arterial per secreció de renina, integrat per una porció del túbul distal que entra en contacte amb el glomèrul.

Tots aquestes regions de la nefrona es poden trobar tant en nefrones corticals, que presenten el corpuscle a l'escorça renal i la nansa de Henle curta de manera que pràcticament no penetren en la medul·la o en nefrones juxtamedul·lars que presenten nanses de Henle llargues que penetren profundament en la medul·la.

7.2 El Túbul Proximal

Els tubúls renals proximals s'originen al pol urinari dels glomèruls. Consisteixen en llargs segments cilíndrics de trajectòria entortolligada que desemboquen en la nansa de Henle. Pel seu interior circula el filtrat glomerular que anirà madurant al llarg del seu recorregut fins a esdevenir orina. Topològicament es distingeix en dos components: la part inicial cortical enrevessada formant la *pars convoluta* o contorta, immediata continuació de l'epiteli de la càpsula de Bowman, i la *pars recta* que la segueix de manera rectilínia endinsant-se cap a les zones més internes en les projeccions medul·lars.

Al túbul proximal de rata, ratolí, conill i certs simis - però no en humans- es poden distingir tres segments morfològicament diferents: S_1 , S_2 i S_3 . El segment S_1 és la porció inicial del túbul i transcorre en la part contorta constituint-ne les primeres 2/3 parts. El segment S_2 inclou el darrer terç del contort i el principi del túbul proximal recte. En darrer lloc, el segment S_3 comprèn la resta del túbul proximal recte situat al còrtex intern i a la

zona externa de la medul·la. Les característiques funcionals i morfològiques de les cèl·lules epitelials van variant al llarg del túbul de manera que a cada segment distingim el seu propi tipus cel·lular conegut també com S₁, S₂ i S₃ (FIGURA 15).

La cèl·lula tubular epitelial tipus té forma columnar i una membrana apical amb rivet de raspall o *brush border* molt desenvolupada. Està altament polaritzada i la seva compartimentalització apical/basolateral resulta essencial per a la funció tubular.

Les característiques estructurals que distingeixen els tipus cel·lulars presents als tres segments del túbul proximal han estat descrites amb detall en rata i es fan extensives al ratolí (Tischer *et al.*, 1996). Les cèl·lules S₁ presenten una àmplia membrana apical tipus ribet de raspall que incrementa la superfície de contacte amb la llum del túbul i incrementa així la seva capacitat per reabsorvir petits compostos orgànics del filtrat glomerular. Les microvellositats que conformen el rivet estan recoberts per glicocàlix i contenen una gran varietat d'enzims -fosfatasa alcalina, peptidasa,...- involucrats en la degradació de pèptids i altres substàncies en productes que poden ser transportats a l'interior cel·lular. Posseeixen també un aparell vacuolar i lisosomal molt desenvolupat, la funció del qual és l'endocitosi i degradació de macromolècules de l'ultrafiltrat, com l'albumina o altres proteïnes plasmàtiques de baix pes molecular. El nucli és gran i es troba en el centre de la cèl·lula. La superfície basolateral d'aquestes cèl·lules també s'amplifica per prolongacions que s'interdigiten amb les prolongacions de les cèl·lules adjacents deixant un espai intercel·lular. Contenen un gran nombre de mitocondris que al microscopi electrònic llargs i tortuosos i es localitzen en els processos cel·lulars laterals pròxims a la membrana plasmàtica. Les cèl·lules S₂ presenten microvil·lis més curts i menys densos que els de S₁, així com una menor complexitat en les prolongacions laterals i un menor nombre de mitocondris més petits. En les cèl·lules S₃, els processos laterals són virtualment absents i s'hi troba un nombre reduït de mitocondris repartits a l'atzar

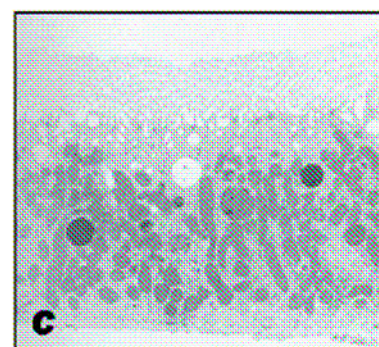
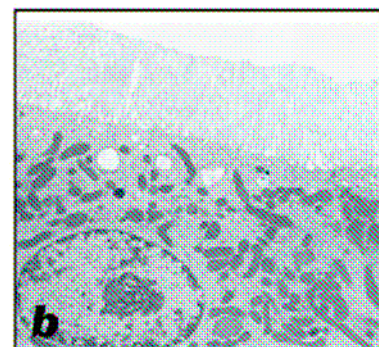
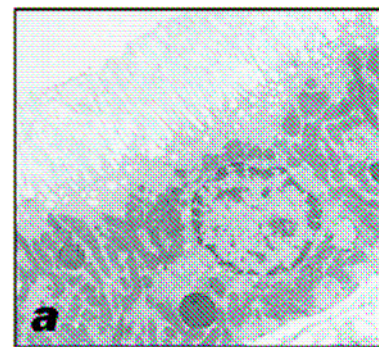


FIGURA 15. Segments del túbul proximal renal.

Microfotografies electròniques dels segments S₁ (a), S₂ (b) i S₃ (c) del túbul proximal renal de rata (x10.600) Adaptat i modificat de Brenner, B.M. *The Kidney*.

per la cèl·lula i un abundant compartiment peroxisomal que indica participació al metabolisme lipídic.

Mentre que el pas del segment S_1 a S_2 és progressiu, el de S_2 a S_3 sol ser abrupte en diferents espècies com ara rata i ratolí. Al llarg del túbul es produeix una disminució de la maquinària de transport i de l'aparell endocític i lisosomal que respon als canvis que va patint el filtrat.

7.4 El Model Cel·lular: La Línia Cel·lular PCT

Cartier *et al.*, van establir dues línies cel·lulars del túbul proximal renal, PKSV-PCT i PKSV-PR provinents de la microdissecció de la part contorta i (PCT) i del final de la part recta (PR) de túbuls proximals superficials de ratolins mascles transgènics L-PK/Tag. Els cultius confluents d'aquests tipus cel·lulars estan organitzats en monocapes de cèl·lules cuboïdals polaritzades amb microvil·lis apicals desenvolupats i formen doms (Cartier *et al.*, 1993).

Les cèl·lules PKSV-PCT presenten les principals característiques morfològiques i funcionals de les cèl·lules S_1/S_2 de les quals deriven (Lacave *et al.*, 1993; Ouar *et al.*, 1998) i representen el model cel·lular idoni i únic fins a l'actualitat per a poder desenvolupar l'estudi *in vitro* de la regulació transcripcional que es produeix *in vivo* en aquesta regió del túbul proximal renal. Al nostre laboratori han resultat de gran utilitat per a l'estudi de la regulació transcripcional del gen de la KAP (Soler, *et al.*, 2002) dels gens *Oatp1* i *Cyp4b1* (Isern, *et al.*, 2001; Isern, *et al.*, 2003), del gen S_A (Aresté *et al.*, 2004) així com per a l'estudi funcional de les proteïnes KAP i S_A . És per això que les cèl·lules PCT3 han estat l'eina d'estudi de la majoria d'assajos desenvolupats en aquesta tesi.

Cal mencionar però, que tot i suposar un exclusiu model per a l'estudi de la regulació del gen de la KAP, els passes actuals de la línia cel·lular PCT3 presenta algunes peculiaritats a tenir en compte. És especialment rellevant la pèdua d'expressió del receptor d'andrògens del qual no es detecta expressió per RT-PCR (resultats no publicats). Aquest fet ha suposat que al llarg de l'estudi de la regulació androgènica hagi estat necessària la transfecció transitòria de la proteïna. Un altre fet rellevant a destacar, possiblement derivat de l'anterior, és la reduïda expressió del gen de la KAP en cèl·lules PCT3. Mentre que a nivell de proteïna no es pot detectar per *western blot*, a nivell d'mRNA sols s'observa una minsa expressió detectada per RT-PCRq. Aquestes característiques de la principal eina de treball d'aquesta tesi han imposat certes limitacions i a la vegada han suscitat l'estudi de les possibles causes que les provoquen.

8. LA KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN

La *Kidney Androgen-regulated Protein* (KAP) es va identificar per primer cop a partir de la traducció *in vitro* de l'mRNA procedent de ronyons de ratolins mascles (Toole *et al.*, 1979). Es va observar com l'mRNA de la KAP representava entre el 4 i 5 % del total en ronyó de ratolí mascle on esdevenia un dels més abundants. S'apreciava però, un evident dimorfisme sexual ja que en femelles l'expressió de KAP era 10 vegades inferior i en mascles castrats disminuïa 200 vegades. L'administració exògena de testosterona en femelles i mascles castrats era capaç d'induir KAP fins a assolir els nivells propis de mascles. A més, un anàlisi de la seva expressió mostrà que KAP pràcticament no es trobava en cap altre teixit fora del ronyó.

Aquest particular patró d'expressió fa que l'aprofundiment en l'estudi de la regulació transcripcional del gen de la KAP i de la funció de la pròpia KAP resultin aspectes altament atractius i determinants per a l'avenç en la comprensió tant dels mecanismes moleculars que controlen la regulació hormonal de l'expressió gènica com dels que controlen l'especificitat tissular.

8.1 La Proteïna KAP

8.1.1 Característiques Principals

La proteïna KAP està codificada per un gen de còpia única altament polimòrfic al genoma de ratolí (Toole *et al.*, 1979). Els estudis de localització cromosòmica el situen a la posició 63,7 cM del cromosoma 6 de ratolí. Té 3807 nucleòtids de longitud distribuïts en 4 exons i 3 introns. El cDNA de KAP és de 607 nucleòtids amb una pauta oberta de lectura de 363 nucleòtids codificants (Meseguer *et al.*, 1989).

La proteïna deduïda consta de 121 aminoàcids en els que es descriu un possible pèptid senyal entre els residus 1 i 8 i l'anàlisi de la seqüència primària amb programes de predicció de dominis funcionals assenyalen l'existència d'una possible seqüència PEST entre els aminoàcids 53 i 80. Els programes de predicció de possibles modificacions posttraduccionals indiquen 3 possibles llocs de fosforilació per la PKC i 5 possibles llocs de fosforilació per CK2 els quals s'han demostrat com a veritables dianes d'aquesta quinasa i com a responsables de promoure'n la degradació (Tesi Dra. O. Tornavaca). Les anàlisi computacionals no identifiquen cap domini estructural o funcional en la proteïna

KAP per la qual cosa i donada la manca de similitud o homologia de seqüència amb cap altre proteïna de qualsevol espècie coneguda, la seva funció al ronyó roman encara per ser establerta.

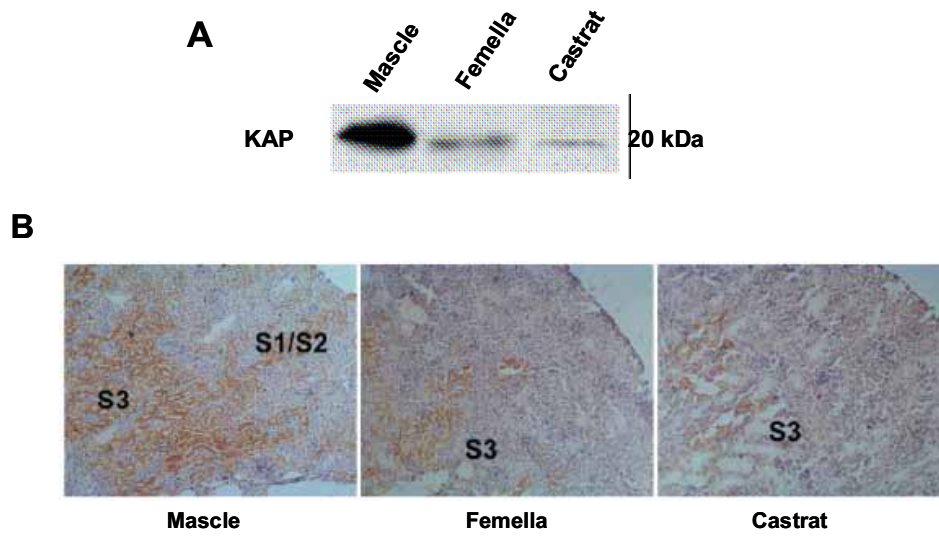


FIGURA 16. Dsitribució androgen-dependent de la proteïna KAP a ronyó.

A. Anàlisi per *Western blot* d'extractes de ronyó de mascle, femella i mascle castrat.
B. Immunohistoquímica de crioseccions de ronyó de ratolí sota diferents condicions hormonals. Extret i modificat de Cebrián, C. *et al.*, 2001.

En assajos de *western blot* la proteïna KAP apareix en extractes de ronyó de ratolí com un pèptid de 20 kDa i l'anàlisi immunohistoquímic de la seva localització la situa exclusivament al túbul proximal renal on segueix el mateix patró androgen-dependent que el seu mRNA. La utilització de proteïnes de fusió GFP-KAP han permès dilucidar la distribució de la proteïna en les cèl·lules de túbul proximal PCT3 que adopta un patró reticular citoplasmàtic i al voltant del nucli (Cebrian *et al.*, 2001). Estudis posteriors al nostre laboratori demostren la presència de la proteïna KAP secretada als medis de cultiu i també la seva presència puntual al nucli d'aquestes cèl·lules (Tesi de la Dra. O. Tornavaca).

8.1.2 La Funció de KAP: indicis del seu paper en cycle cel·lular i protecció enfront la nefrotoxicitat

Davant l'absència d'homologia estructural o de seqüència de la proteïna KAP amb cap

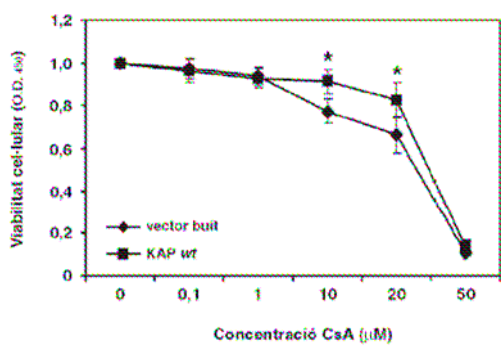


FIGURA 17 Toxicitat induïda per CsA en cèl·lules PCT3.

Cèl·lules PCT3 transfectades transitòriament amb un vector d'expressió buit o amb la proteïna KAP wt sotmeses a tractament de dosis creixents de CsA. L'anàlisi de la viabilitat cel·lular mostra un efecte protector de KAP sobre la mortalitat induïda per CsA. Extret de la Tesi de la Dra. Tornavaca.

altra proteïna coneguda, inicialment al nostre laboratori es va realitzar un assaig de dos híbrids en llevat per tal de buscar possibles proteïnes que interaccionessin amb KAP i proporcionessin indicis sobre la seva funció. D'aquesta manera es va identificar la interacció de la proteïna KAP amb la ciclofilina B (CypB), un membre de la família de les immunofilines amb activitat peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa que exhibeix la capacitat d'unir-se al fàrmac immunosupressor i altament nefrotòxic ciclosporina A (CsA) (Cebrian *et al.*, 2001). Assajos de colocalització demostraren la interacció de KAP i CypB a l'interior de les cèl·lules del túbul proximal. Seguidament es van testar els efectes del tractament amb

CsA en ratolins i s'observà que el fàrmac suposava una disminució significativa dels nivells de KAP en extractes de ronyó (Cebrian *et al.*, 2001). Al seu torn la sobreexpressió de KAP en la línia PCT3 de túbul proximal disminuïa significativament els efectes nefrotòxics del fàrmac (Cebrian *et al.*, 2001; Tesi de la Dra. Tornavaca). La relació funcional entre KAP, CypB i la nefrotoxicitat mediada per ciclosporina A restà per tant evident i suggereix un paper clau de KAP en la fisiologia renal.

Estudis posteriors i més recents del nostre grup han demostrat que la sobreexpressió de KAP redueix el creixement de cèl·lules en cultiu i s'ha vist que aquest efecte es dona per una disminució de la proliferació i no pas per un augment de la mortalitat. A més s'ha vist que una major presència nuclear de KAP indueix un efecte més acusat sobre la inhibició de la proliferació. Analitzant la distribució de cèl·lules en les diferents fases del cycle cel·lular s'observa que la proteïna KAP indueix un bloqueig a G0/G1 impedit la progressió del cycle cel·lular. Aquest efecte es dona per la manca d'expressió, en presència de KAP, de les ciclins de tipus D, imprescindibles per a la correcta progressió de la fase G1 i per la

transició de G1 a S. S'atribueix per tant a KAP un paper en la regulació del cicle cel·lular (Tesi de la Dra. O. Tornavaca).

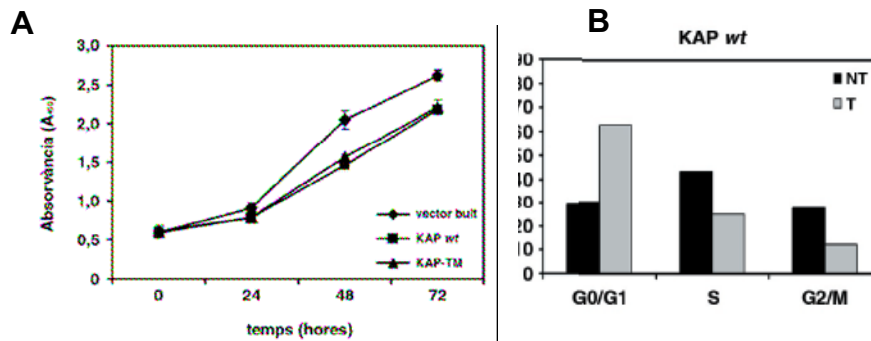


FIGURA 18 . Efectes de la sobreexpressió de KAP en la proliferació i progressió del cicle cel·lular.

A. Creixement de les cèl·lules PCT3 transfectades amb el vector d'expressió buit o amb KAP wt. S'aprecia una proliferació disminuïda en cèl·lules que sobreexpressen KAP, tant la salvatge com la mutada per fosforilació (KAP-TM) **B.** Distribució en les diferents fases del cicle cel·lular de cèl·lules PCT transfectades (T) i no transfectades (NT) amb KAP. Mostra una acumulació de cèl·lules que sobreexpressen KAP a la fases S i G2/M i una disminució de les que es troben en fase G0/G1 en comparació a les control.

L'anàlisi i estudi dels ratolins transgènics per a la proteïna KAP desenvolupats al nostre laboratori aportaran noves dades i ajudaran a seguir dilucidant la funció de la proteïna KAP (Tesi de Gloria Pascual).

8.1.3. Regulació Posttraduccional de la Proteïna KAP: la importància de controlar-ne els nivells

L'estudi exhaustiu de la KAP realitzat al nostre laboratori ha posat de manifest l'ampli ventall d'esdeveniments moleculars que exerceixen les seves conseqüències sobre la proteïna. D'aquesta manera KAP queda sotmesa a una exquisida regulació posttraduccional que lluny de ser atzarosa s'encarrega de determinar específicament els nivells, distribució intracel·lular, secreció, degradació i en últim terme la seva funció, activitat biològica i conseqüències per a la cèl·lula del túbul proximal on s'expressa de manera tan selectiva.

La fosforilació és una de les principals modificacions posttraduccional que regulen la KAP. L'anàlisi de la seqüència primària de KAP identifica diferents llocs de fosforilació per a la proteïna quinasa CK2 i assajos de fosforilació *in vitro* i *in vivo* han desvetllat que

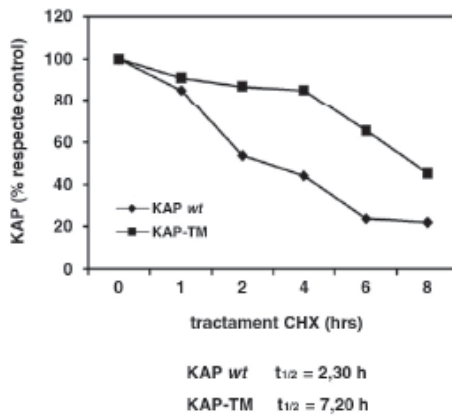


FIGURA 19 La mutació dels dominis de fosforilació estabilitza KAP.

La versió mutada KAP-TM presenta una vida mitja molt superior a la salvatge KAP-wt que disminueix més ràpidament els seus nivells davant un inhibidor de la síntesi proteïca (CHX). Extret de la Tesi de la Dra Tornavaca.

KAP és un bon substrat de fosforilació per a aquesta quinasa. El més important és que s'ha pogut atribuir un paper important a aquesta modificació ja que s'ha comprovat que el mutant per fosforilació KAP-TM té una vida mitja tres cops superior a la proteïna salvatge. La fosforilació per tant, és necessària per a una eficient degradació de la proteïna ja que senyalitza la KAP com a substrat per a la proteasa calpaïna la qual s'ha demostrat capaç de degradar-la *in vitro* (Tesi de la Dra. O. Tornavaca). A part d'afectar l'estabilitat de la proteïna el paper de la fosforilació va més enllà, ja que si bé no afecta a la distribució cel·lular de KAP, sí que intervé en la seva secreció per part de les cèl·lules. En aquest sentit s'ha vist com la

proteïna salvatge KAP, apta per a ser fosforilada, és secretada més eficientment que la versió deficient per a fosforilació KAP-TM que comparativament se secreta menys. Sembla per tant, que la secreció de KAP es veu afavorida per la fosforilació.

Un element que s'havia vist implicat en la disminució de nivells de la KAP és el fàrmac immunosupressor i nefrotòxic CsA. La reducció promoguda per CsA no era deguda a regulació transcripcional ja que els nivells de mRNA de KAP incrementaven en els animals tractats (Cebrian *et al.*, 2001) i es suggerien per tant que els efectes del fàrmac sobre la quantitat de KAP al ronyó es donaven a nivell de proteïna. Els estudis posteriors del nostre grup (Tesi Dra. Tornavaca) han revelat que el tractament amb CsA suposa una acceleració de la secreció de KAP al medi. La principal acció

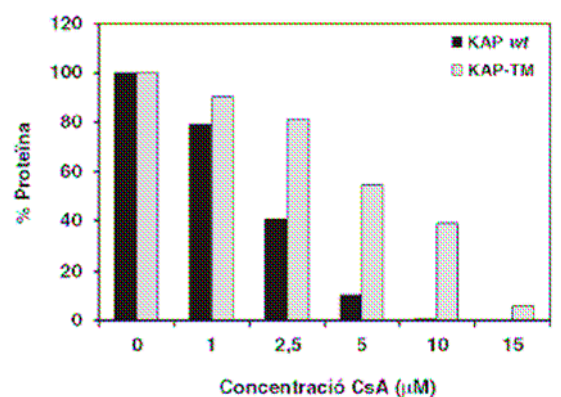


FIGURA 20. Degradació dosi dependent de KAP per CsA.

S'observa la disminució en els nivells de KAP en presència de quantitats creixents de CsA. La versió mutada per fosforilació KAP-TM és més resistent a aquest efecte. Extret de la Tesi de la Dra Tornavaca.

de CsA detectada en aquest estudi és promoure la degradació de KAP a temps i dosi dependent per tant el paper de la fosforilació induïnt a la proteòlisi també té un paper clau en aquest àmbit.

Finalment cal esmentar també la regulació que s'observa en la distribució de KAP al nucli. Com ja s'ha dit, s'ha demostrat que en PCT3 la KAP es localitza intracel·lularment al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi i que algunes cèl·lules presenten també una clara distribució nuclear de la proteïna. Un estudi més ampli ha assenyalat però que aquest complex patró núcleo-citoplasmàtic de KAP és variable entre cèl·lules d'una mateixa línia i també entre diferents línies cel·lulars. Es suggereix per tant l'existència d'un procés dinàmic i regulat en el qual participa el senyal d'export nuclear que KAP presenta. Donades les repercussions d'inhibició de la proliferació cel·lulars que la presència nuclear de KAP reporta resulta altament suggerent la possibilitat d'una regulació estricta d'aquest procés.

Tot i que la funció de la proteïna KAP no ha estat del tot establerta, els importants processos en els quals intervé com són la protecció davant la nefrotoxicitat i la inhibició del creixement cel·lular indiquen la necessitat d'una fina i selecta regulació que com s'ha vist és extensa a nivell de proteïna i s'extén fins a nivells magníficament sofisticats a nivell de transcripció.

8.2 L'mRNA de la KAP: Expressió i Distribució Tissular

L'mRNA del gen de la KAP és un dels més abundants del ronyó de ratolí mascle (Toole *et al.*, 1979; El-Many *et al.*, 2000). En talls histològics d'aquest òrgan s'observa que la *hibridació in situ* del mRNA de KAP sols es detecta a les cèl·lules epitelials dels túbuls corticals renals mentre que no hi ha senyal en altres túbuls del còrtex o la medul·la ni al glomèrul (Meseguer *et al.*, 1987).

Les primeres anàlisi de la distribució tissular de KAP van reflectir l'absència del seu mRNA en qualsevol teixit fora del ronyó (Toole *et al.*, 1979; Melià *et al.*, 1998), tot i que després se'l localitzà també en l'úter de femelles gestant tres dies previs al part (Kasik i Rice, 1993).

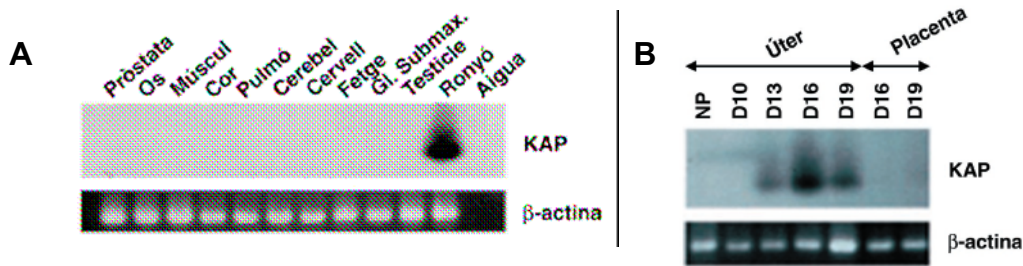


FIGURA 21. Distribució tissular de l'mRNA de KAP.

A. Anàlisi de l'expressió de KAP per RT-PCR/Southern blot de diversos teixits de ratolí. **B.** Expressió de KAP a úter RT-PCR/Southern blot en mRNA extret d'úter i placenta de ratolins femella a diferents dies de gestació (D10 a D19). NP: no gestant. S'emprà la β -actina com a control intern. Adaptat de Cebrián, C. *et al.*, 2001.

8.3 Regulació Hormonal del Gen de la KAP

L'especificitat tissular tan restringida que presenta l'expressió del gen de la KAP així com el dimorfisme sexual que manifesta són especialment suggerents d'una regulació transcripcional altament específica i influenciada per l'estat hormonal. L'estudi detallat del patró d'expressió del gen en diverses soques de ratolins deficientes per a diferents combinacions d'efectors hormonals ha permès aprofundir en el paper que cadascun d'ells juga en la regulació del gen així com poder distingir dos patrons diferents dins les cèl·lules S1/S2 i S3 del mateix i pràcticament únic teixit posseïdor de KAP. L'aproximació experimental a través de l'estudi *in vitro* del promotor del gen poc a poc va traduïnt les respostes fisiològiques observades en l'animal en la descripció dels més bàsics mecanismes i esdeveniments moleculars que ocorren a nivell transcripcional en les privilegiades cèl·lules que expressen KAP.

8.3.1 El Promotor del Gen de la KAP

La regió proximal 5' flanquejant de l'inici de transcripció del gen de la KAP presenta múltiples seqüències susceptibles de ser unides per reguladors transcripcionals, en molts casos receptors nuclears.

D'entrada al promotor de la KAP es troba una putativa seqüència TATA en la posició -28 bp a -23 bp, TATAAA, respecte a l'inici de transcripció i un element CCAAC des de -

69 bp a -65 bp, elements descrits com a típics de molts gens eucariotes transcrits per la RNA polimerasa II.

Per similitud amb altres seqüències conegudes i consens, han estat identificats altres motius que poden funcionar com a elements reguladors al promotor de la KAP. Així, s'ha detectat un element de resposta a andrògens (ARE) que es localitza a -39 bp i es troba parcialment solapat amb la caixa TATA (Ham *et al.*, 1988). A -92 pb es troba un lloc putatiu d'unió per a Sp1 i a -261 una seqüència d'unió per AP-2. S'han identificat quatre putatives caixes per a factors C/EBPs situades a -66 pb, -110 pb, -429 pb i -457 pb.

En una posició allunyada de l'inici de transcripció, a -1189 pb, es troba un element de resposta a estrògens (ERE) no consens molt similar al descrit en el promotor del gen de la uteroglobina (Slater *et al.*, 1990). També es troben mitjos palíndroms d'ERE en zones més properes, posicions -604 i -264, que podrien actuar en la regulació del gen de la KAP donada la identificació de mitjos ERE funcionals molt similars en el promotor del gen de l'ovoalbúmina de pollastre (Tora *et al.*, 1988).

També s'identifica a -609 pb un putatiu element de resposta a hormona tiroïdal (HRE) i en la posició -886 pb una seqüència similar a mig element de resposta per a la vitamina D (VDRE).



FIGURA 22. Seqüència nucleotídica d'1 kb de la regió promotora del gen de la KAP. S'indiquen els putatius elements reguladors *cis* predits computacionalment, la majoria dels quals de resposta a hormones, que clàssicament s'han anat considerant per a l'estudi de la regulació transcripcional específica i hormonal del gen.

La funcionalitat dels elements identificats al promotor del gen de la KAP ha estat constatada o descartada per a algun d'ells o roman inexplorada en d'altres. Al llarg d'aquesta tesi s'aborda justament aquesta qüestió i s'hi intenten aportar noves dades.

Ús del Promotor del Gen de la KAP en Transgènics

L'especificitat cel·lular i la regulació androgènica de l'expressió de KAP fan del seu promotor una eina molt útil a l'hora de dirigir l'expressió de transgens al túbul proximal renal. Fina al moment s'han realitzat dos models de ratolins transgènics amb el promotor proximal del gen de la KAP, el KAP-hAGT (Ding *et al.*, 1997) amb el que s'analitza el sistema renina-angiotensina i el KAP-Luc (Malstrom *et al.*, 2004) per a l'assaig *in vivo* d'andrògens i antiandrògens.

En la construcció d'aquests models s'han emprat els primers 1542 pb del promotor proximal de KAP. Aquest fragment ha conduït l'expressió del corresponent transgen exclusivament a les cèl·lules eptiel·lials de la regió cortical del túbul proximal i de manera androgen dependent. Els transgènics, per tant, han permès aprofundir en el comportament del promotor *in vivo* i han mostrat que en els primers -1542 pb es troben els elements reguladors suficients per a dirigir l'expressió cel·lular específica i dependent d'andrògens que s'observa en les cèl·lules S1/S2 per a KAP. La manca d'expressió a S3 però denota la mancança en aquest fragment del promotor dels elements reguladors responsables de l'expressió de KAP en aquesta zona.

8.3.2 Regulació del Gen de la KAP a les Cèl·lules S3

Tal i com s'ha anat esmentant, l'expressió del gen de la KAP presenta un clar dimorfisme sexual que és palès en les quantitats de mRNA i proteïna detectats a mascles i femelles. Aquestes diferències quantitatives són el producte de diferències qualitatives en l'expressió entre els dos sexes: mentre que a dosis fisiològiques d'andrògens, és a dir en mascles, el gen de la KAP s'expressa en tots els segments del túbul proximal, a femelles i mascles castrats l'expressió únicament es localitza en les cèl·lules del segment S3, en la zona externa de la medul·la del ronyó (FIGURA 23).

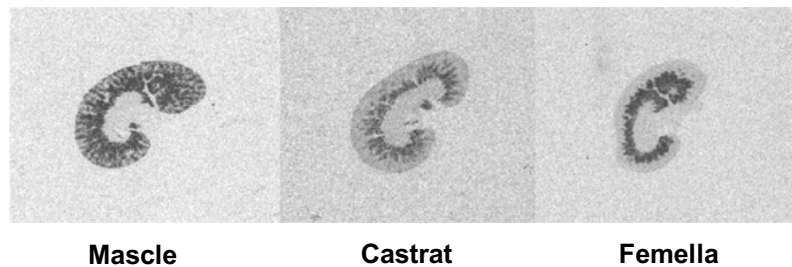


FIGURA 23. Distribució de l'mRNA de KAP a ronyó.

Anàlisi de la distribució de l'mRNA de KAP per hibridació *in situ* en seccions de ronyó de ratolí mascle, mascle castrat i femella de la soca C57BL/6. Imatge cedida per la Dra. Esther Solé.

El fet que ratolins mascles deficientes en AR, soca Tfm/Y, tractats amb testosterona presentessin senyal de KAP en les cèl·lules S3 en assajos d'hibridació *in situ*, va fer pensar que els estrògens, subproductes de l'aromatització dels andrògens, eren capaços de potenciar l'expressió en aquest segment (Meseguer *et al.*, 1990). Amb el tractament hormonal amb estradiol d'aquests animals es va poder constatar que efectivament, les cèl·lules S3 incrementen l'expressió de KAP en resposta a estrògens, mentre que les cèl·lules S1/S2 no responen a l'acció estrogènica.

Tot i aquest efecte inductor de les hormones esteroïdals al segment S3, es va veure com l'eliminació dels seus nivells circulants per ovariectomia i ablació de les glàndules suprenals no suposava la desaparició del senyal de KAP en aquestes cèl·lules (Meseguer *et al.*, 1990). L'absència total de senyal a S3 si que s'observava en canvi en animals hipofisiectomitzats. El tractament selectiu d'aquests animals amb diferents hormones de la hipòfisi anterior així com l'ús de ratolins de la soca *little*, deficientes en GH i PRL (Lin *et al.* 1993), de la soca *dwarf*, deficientes en GH, PRL i TSH (Li *et al.*, 1990) permeteren determinar l'hormona tiroïdal T₃ com a responsable de l'expressió de KAP a les cèl·lules S3 (Meseguer i Catterall, 1992).

De manera que l'expressió de KAP al segment S3 del túbul proximal de ratolí depèn de la presència de T₃ i es veu incrementada per estrògens i per andrògens (en femelles castrades i tractades amb DHT).

8.3.3 Regulació de l'Expressió del Gen de la KAP als Segments S1/S2 i a la Línia Cel·lular PCT3 que en deriva

Regulació per Andrògens

Des de la identificació del gen de la KAP durant l'estudi dels mRNA diferencialment expressats en mascles i femelles a ronyó (Toole *et al.*, 1979) s'havia vist que l'expressió del gen a la regió cortical del ronyó era dependent de la presència d'andrògens. Per tal de reproduir en un sistema *in vitro* aquesta transactivació androgènica es va estudiar la capacitat inductora d'AR i DHT sobre constructes de diferents fragments del promotor proximal de KAP en les cèl·lules PCT3 derivades de la regió cortical del túbul proximal renal. Així es veié que el fragment -224 pb del promotor (K224), que inclou el putatiu ARE situat a -39 pb, és suficient per dirigir l'expressió androgen dependent en forma d'1 µM de DHT al túbul proximal. La conseqüent mutagènesi de l'ARE a K224 abolia aquesta transactivació per DHT i indicava la funcionalitat d'aquest element que seria la clau de la resposta a andrògens del promotor de la KAP. (Soler *et al.*, 2002)

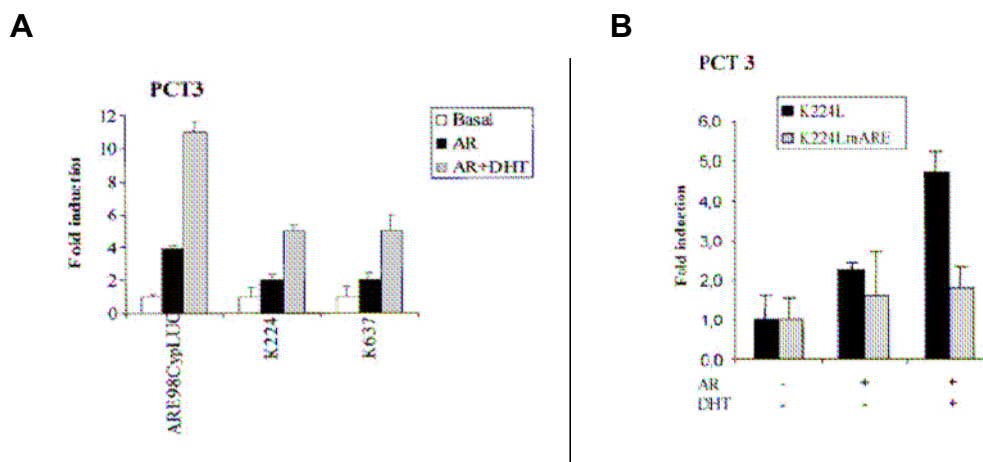


FIGURA 24. Resposta a andrògens del promotor del gen de la KAP en PCT3.

A. Cèl·lules PCT3 foren transfectades amb els constructes K224 i K637 del promotor del gen i s'observà que el fragment dels primers 224 pb (K224) és suficient per a dirigir la resposta a andrògens del promotor per la cotransfecció d'AR i el tractament amb DHT. Les activitats luciferases obtingudes en cada cas es compararen i referiren a les del plàsmid control de resposta androgènica ARE98CypLUC **B.** La mutagènesi de l'ARE de -39 bp generada al constructe K224LmARE suposava la caiguda de la inducció d'activitat luciferasa per andrògens. Es representen les activitats luciferasa en forma d'induccions relatives normalitzades per les activitats *Renilla*. Adaptat de Soler *et al.*, 2002.

A banda d'aquesta clara regulació androgènica, l'estudi d'animals *hyt/hyt* deficients en hormona tiroïdal emprats en la caracterització de l'expressió a S3, mostrava paral·lelament que tot i que T₃ no exercia cap efecte a S1/S2 en mascles castrats, la seva privació sí que causava una clara disminució de la resposta cortical dependent d'andrògens (Solé *et al.*, 1996). El tractament exogen amb T3 restablí els nivells control de KAP en aquests animals suggerint una col·laboració d'aquesta hormona amb els andrògens per a l'expressió cortical màxima. De fet, es veié com l'hormona tiroïdal modulava la resposta androgènica fins al punt que en induir la seva total absència des del dia 10 de gestació fins al moment d'eutanàsia, el gen de la KAP no s'expressava al còrtex renal (Solé *et al.*, 1996). De manera que es conclouia, contràriament al que inicialment es deduïa del dimorfisme sexual, que els andrògens són necessaris però no suficients per a la inducció de l'expressió de KAP al còrtex i que per assolir-la és també necessària la presència de T3.

Regulació per T3: Desenvolupament Postnatal

Un cop vist que T3 s'encarregava de determinar la presència de KAP a S1/S2 en resposta a andrògens, es va voler determinar en quin moment es produïa l'efecte d'aquesta hormona sobre la regulació del gen.

Mitjançant la inducció farmacològica d'hipotiroïdisme sever, juntament amb la deficiència associada de GH que comporten els baixos nivells de T3 (Garcia-Villalba *et al.*, 1993) i l'administració puntual de T3 i/o GH a animals en diferents moments del desenvolupament pre i postnatal, es va poder determinar que cal una presència puntual de T3 després del naixement per obtenir l'expressió cortical mitjançada per andrògens del gen de la KAP.

La combinació afegida amb GH a més, potencia l'efecte produït per l'hormona tiroïdal tot i que de manera aïllada GH no és capaç d'emular les accions de T3 sobre la resposta androgènica a S1/S2 (Tesi de la Dra. M. Soler; Teixidó *et al.*, 2006). De fet, s'havia vist com el tractament amb IGF-I potenciava la inducció androgènica de KAP en cèl·lules PCT3 i es postulava que GH seria la responsable *in vivo* d'engegar la via de senyalització d'IGF-I i facilitar la resposta a andrògens per mecanismes de fosforilació (Soler *et al.*, 2002). Donat el control de l'eix GH/IGF-I que T3 exerceix (Tomita *et al.*, 1995), part de l'efecte produït per l'hormona tiroïdal sobre l'expressió de KAP podria donar-se per tant, per aquesta via.

La determinació del període crític en què T3 intervé per facilitar la resposta androgènica en cèl·lules S1/S2 es feu permetent la síntesi endògena puntual d'hormona

tiroïdal en diferents períodes de l'etapa postnatal d'animals hipotiroïdeus induïts farmacològicament i analitzant si s'observava l'expressió cortical de KAP deguda a andrògens als 40 dies després del naixement. Aquests assajos van desvetllar que la presència de T3 és indispensable i suficient per permetre la resposta a andrògens al voltant dels dies 13-15 postnatsals (Tesi de la Dra. M. Soler; Teixidó *et al.*, 2006) coincidint amb l'inici de la pubertat dels ratolins, moment caracteritzat per un pic fisiològic en els nivells plasmàtics d'hormona tiroïdal que desencadena el creixement somàtic i canvis metabòlics, en part per estimulació de les cèl·lules pituïtàries productores de GH (Tomita *et al.*, 1995).

Per tant, T3 engega l'expressió de KAP al còrtex renal i l'efecte perpetuador d'aquesta expressió depèn de l'estat androgènic de l'animal. Al seu torn, la GH, possiblement mitjançant IGF-1, participaria en mecanismes de fosforilació que faciliten la resposta androgènica (Soler *et al.*, 2002).

Mecanismes Moleculars de la Regulació del Gen de la KAP per T3: C/EBPs

Passant ja al pla més molecular i buscant elements reguladors de l'expressió de KAP que poguessin encaixar en tal entramat hormonal, es van considerar els factors *CCAAT/Enhancer-Binding Protein* (C/EBP) com a candidats. Anteriorment ja s'havia comprovat que l'hormona tiroïdal (1 μ M) no induïa el promotor proximal de KAP en cèl·lules PCT3 i que en aquest context presentava un efecte inhibidor tant de la inducció androgènica del constructe K224 com de l'expressió endògena de KAP potenciada per DHT (Soler *et al.*, 2002). Els efectes de T3 en l'activació cortical androgènica havien de ser indirectes mitjançades per altres efectors intermediaris que coordinessin la cooperació hormona tiroïdal-andrògens.

La vàlua dels factors C/EBP venia donada pel seu important paper en el desenvolupament així com per ser un nexa molecular freqüent entre hormona tiroïdal i expressió gènica gràcies a la seva presència en la via de senyalització induïda per T3 o GH (Liao *et al.*, 1999; Rastegar *et al.*, 2000) i per l'estat androgènic (Garcia *et al.*, 1999); a més s'havia descrit la seva intervenció en la regulació transcripcional a ronyó (Crosson *et al.*, 2000) i la disminució en els nivells de C/EBP α i β en l'hipotiroïdisme congènit (Menéndez-Hurtado *et al.*, 1997) i al promotor proximal del gen de la KAP es donava la presència de diversos putatius llocs d'unió per a C/EBPs.

Es van inspeccionar els nivells de C/EBP α i β per *western blot* en ratolins mascle control, hipotiroïdeus induïts i castrats. D'aquesta manera es va poder constatar que els nivells propis en ronyons de mascles de C/EBPs desapareixien quan se'ls deprivava de T₃ i disminuïen significativament en mascles castrats (FIGURA 25). Seguidament s'analitzà l'expressió del mRNA de KAP per RT-PCR semiquantitativa en les mateixes mostres de ronyó i es veié com en relació als controls, aquesta disminueix 30 vegades en mascles hipotiroïdeus i 8 vegades en mascles castrats. Al seu torn l'administració exògena de T₃ en els animals sotmesos a hipotiroïdisme farmacològic restablí la presència de C/EBP α i β als extractes de ronyó així com l'expressió de KAP al còrtex renal (FIGURA 25).

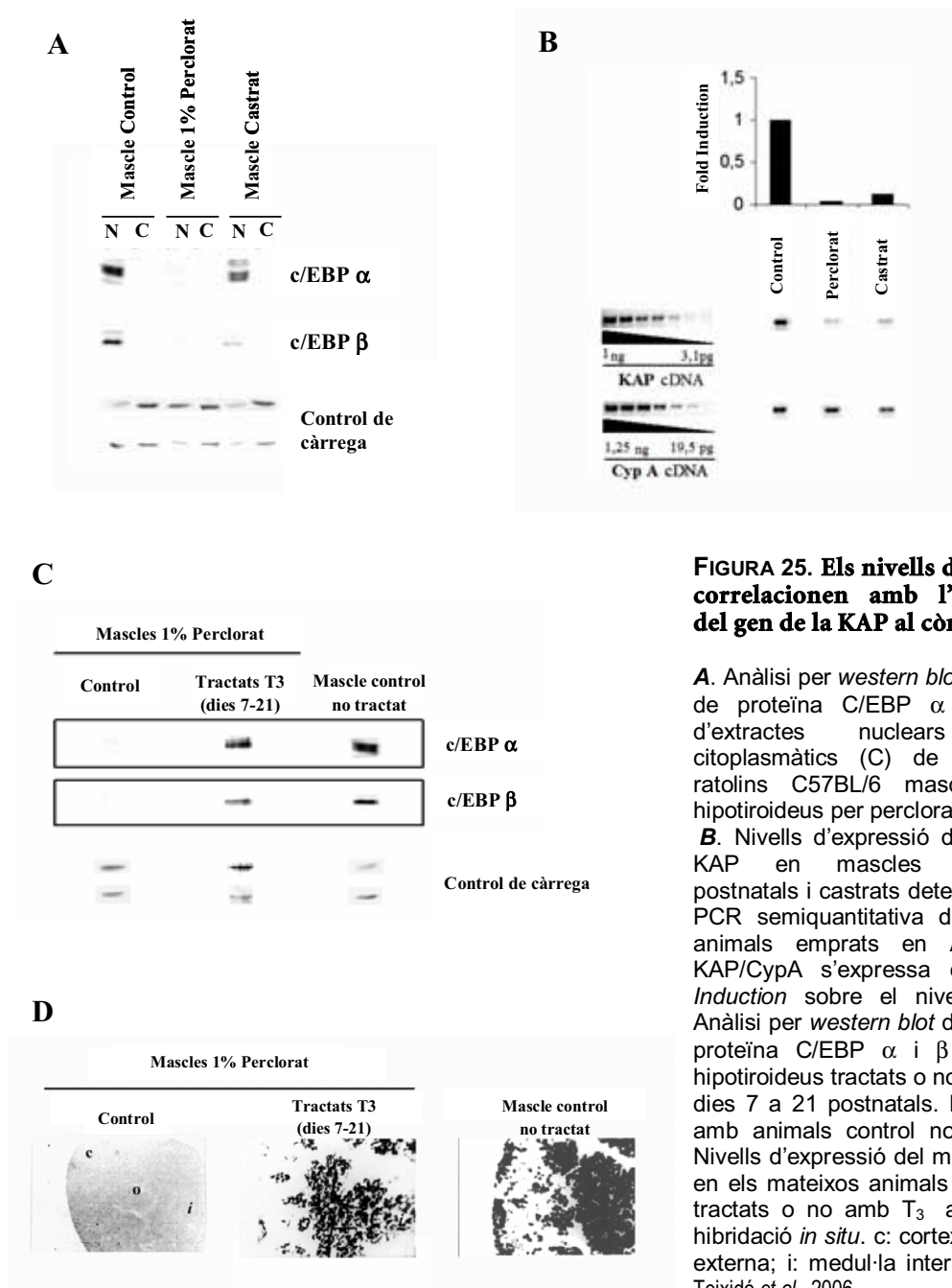


FIGURA 25. Els nivells de C/EBPs correlacionen amb l'expressió del gen de la KAP al còrtex.

A. Anàlisi per *western blot* dels nivells de proteïna C/EBP α i C/EBP β d'extractes nuclears (N) i citoplasmàtics (C) de ronyons de ratolins C57BL/6 mascles control, hipotiroïdeus per perclorat i castrats. **B.** Nivells d'expressió del mRNA de KAP en mascles hipotiroïdeus postnatsals i castrats detectats per RT-PCR semiquantitativa dels mateixos animals emprats en A. La ratio KAP/CypA s'expressa com a *Fold Induction* sobre el nivell basal. **C.** Anàlisi per *western blot* dels nivells de proteïna C/EBP α i β en animals hipotiroïdeus tractats o no amb T₃ dels dies 7 a 21 postnatsals. Es comparen amb animals control no tractats. **D.** Nivells d'expressió del mRNA de KAP en els mateixos animals hipotiroïdeus tractats o no amb T₃ analitzats per hibridació *in situ*. c: còrtex; o: medul·la externa; i: medul·la interna. Adaptat de Teixidó *et al.*, 2006.

Resultava per tant evident la correlació directa a ronyó de ratolí entre l'estat hormonal de l'animal, els nivells de C/EBPs i l'expressió de KAP fet que suggeria la participació dels membres C/EBPs en la regulació transcripcional del gen de la KAP.

C/EBP α i β al Promotor del Gen de la KAP

Per tal de reproduir i estudiar a nivell molecular la correlació C/EBP/KAP detectada *in vivo* a nivell de l'expressió endògena de KAP, es van realitzar assajos funcionals del seu promotor en el model cel·lular PCT3 on es testà la capacitat transactivadora de C/EBP α i β . Es va utilitzar el constructe K638 que en estar integrat pels primers 638 bp del promotor de KAP fusionats al gen reportador de la cloramfenicol-acetil-transferasa (CAT) incloïa les 4 seqüències d'unió putatives per a membres C/EBPs identificades. Els resultats indicaren que tant la transfecció de C/EBP α com de C/EBP β induïa ~3 cops l'activitat basal del constructe K638 i que en presència d'AR i DHT eren capaces de mostrar un efecte additiu sobre la transactivació androgènica (Tesi Dra. M. Soler; Teixidó *et al.*, 2006).

C/EBP α i β transactivaven el promotor proximal de KAP i a més col·laboraven amb els andrògens en l'expressió cortical de KAP representada en cèl·lules PCT3. Es va voler per tant determinar la funcionalitat de les 4 caixes putatives per C/EBP presents al promotor situades a -66-56 bp, -101-110 bp, -429-420 bp i -457-448 bp. A tal efecte s'emprà la metodologia de la mutagènesi dirigida per generar constructes del gen reportador luciferasa i el fragment 638 pb del promotor del gen de la KAP que incorporava delecions de cadascuna de les caixes o combinacions d'aquestes. En realitzar assajos de transfecció transitòria es veié com la delecio simultània de les caixes -429 i -457 suposava una davallada de ~40 cops respecte l'activitat basal de K638 en PCT3. Quan l'assaig es realitzava en un medi deplecionat d'andrògens, aquesta disminució passava a ser de ~ -150 vegades, indicant de nou una col·laboració entre C/EBPs i andrògens al promotor de KAP. Aquest indicatiu es feia encara més palès quan directament es realitzava la mutació conjunta dels dos llocs C/EBPs i l'ARE de -39 bp en presència d'andrògens, assaig en el qual també s'obtenia una davallada similar de ~ -123 cops. (Tesi Dra. M. Soler; Teixidó *et al.*, 2006).

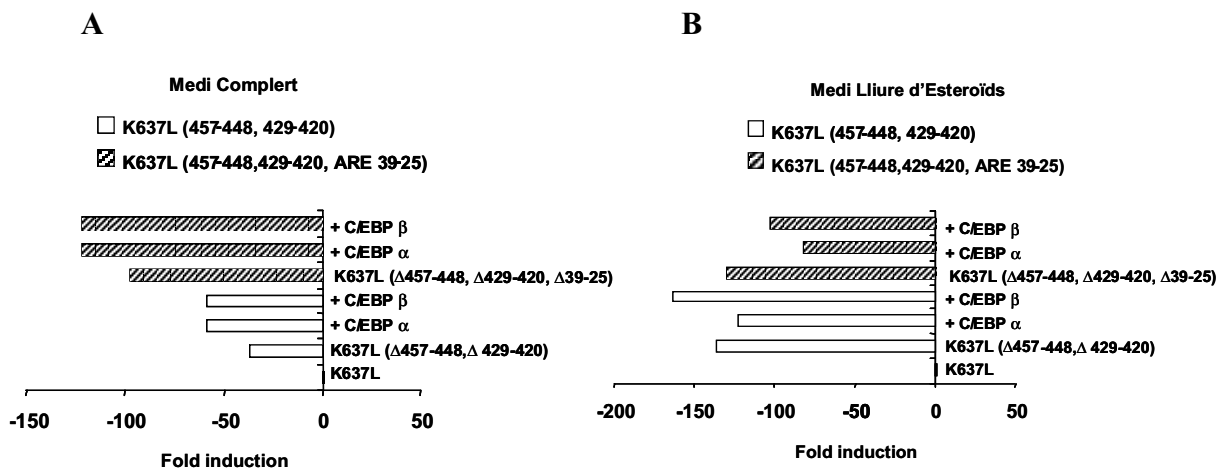


FIGURA 26. Anàlisi funcional dels putatius llocs C/EBP situats a -429 i -457 pb del promotor del gen de la KAP i de la seva col·laboració amb l'ARE de -39 bp.

Assajos de transfecció transitòria de les versions mutades del constructe LUC K638 del promotor amb les delecions de les caixes -429 i 457 K637L (457-429) i de l'ARE K637L (457-429, ARE) en cèl·lules PCT3 incubades en medi complert (A) o lliure d'hormones esteroïdals (B). Es transfectaren plàsmids d'expressió per C/EBP α (+C/EBP α) i β (+C/EBP β) i es mesurà l'activitat luciferasa obtinguda per a cada constructe referint-la a l'activitat basal del constructe K638. Adaptat de Teixidó *et al.*, 2006.

De manera que quedava clar que les caixes -429 i -457 putativament unides per C/EBPs són importants en la regulació del gen de la KAP i que col·laboren amb AR en l'activació transcripcional. Calia però comprovar quins factors unien aquestes dues caixes.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

El gen que codifica per la *Kidney Androgen-regulated Protein* s'ha utilitzat com a model d'estudi del control de l'expressió gènica en ronyó de ratolí, tant per la seva expressió teixit específica com pel control multihormonal cel·lular específic que presenta. L'aprofundiment en l'estudi d'aquest gen esdevé un bon mitjà per avançar en la comprensió tant dels mecanismes moleculars que controlen la regulació gènica a través de la regulació hormonal com dels que la controlen i restringeixen a nivell de teixit.

El treball d'aquesta tesi s'inicia a partir dels resultats previs obtinguts al nostre laboratori sobre l'expressió del gen de la KAP al ronyó de ratolí i en la línia cel·lular PCT3, i que han aportat dades rellevants en la descripció dels mecanismes moleculars que menen la regulació androgènica i tiroïdal que li és característica *in vivo*.

Per tal d'intentar aportar nous coneixements a aquesta matèria dins el context dels segments S1/S2 de ronyó de ratolí i de la línia cel·lular PCT3 que en deriva es proposaren els següents objectius:

1. Anàlisi de la regulació androgènica del gen de la KAP a través de l'Element de Resposta a Andrògens (ARE) situat a -39 pb del seu promotor: estudi del solapament de l'ARE amb la putativa caixa TATA del gen.
2. Estudi de putatives seqüències diana per a factors de transcripció col·laboradors en la resposta androgènica: anàlisi de la seqüència GC situada a -100 pb.
3. Anàlisi de les seqüències situades a -429 pb i -457 pb del promotor del gen de la KAP com a putatius llocs d'unió per als factors C/EBP com a mediadors de la resposta a hormona tiroïdal del gen. Caracterització d'altres possibles factors que s'hi uneixin.
4. Caracterització de la interrelació que s'estableix entre els diferents reguladors transcripcionals que participen en la inducció de l'expressió del gen de la KAP en el context del seu promotor proximal.

MATERIALS

MATERIALS

1. ANIMALS I TEIXITS

1.1 Ratolins (*Mus musculus*)

S'han utilitzat ratolins mascles de la soca consanguïna C57BL/6 adquirits al criador IFFA C_{REDO} a l'edat de 6-7 setmanes que han estat estabulats a temperatura constant (22°C) en les dependències del nostre centre en règims de llum/foscors de 12 hores i alimentats amb dieta estàndard (P_{ANLAB}) i aigua *ad libitum*.

1.2 Procediment Quirúrgic

1.2.2 Extracció de teixits

Els animals han estat manipulats a les 7-8 setmanes d'edat després d'un període de quarantena i adaptació a l'estabulari (~1 setmana) que transcorre des de la seva arribada procedents del criador. Un cop acabada la quarantena, els animals han estat sacrificats per dislocació cervical. A continuació, s'han recollit immediatament els ronyons en condicions lliures de RNases i s'han descapsulat abans de congelar-los tot submergint-los en nitrogen líquid. S'han conservat a -80 °C. Tots els procediments experimentals amb animals s'han realitzat d'acord amb les normatives institucionals vigents, en compliment dels requeriments establerts pel Govern Nacional i per la Unió Europea (*Real Decreto 223/1988: B.O.E. N° 256, 25/10/1990*).

2. LÍNIES CEL·LULARS

2.1 Cèl·lules

En els diferents estudis en què s'ha requerit l'ús de cèl·lules eucariotes, s'han utilitzat les següents línies cel·lulars de mamífer:

PKSV-PCT3

Línia cel·lular epitelial immortalitzada derivada de túbul proximal renal de ratolí. Fou obtinguda a partir de ronyons de ratolins transgènics per l'antigen T-gran i t-petit del virus

de simi 40 (SV40) sota el control del promotor de la piruvat quinasa de rata dels quals es va extreure per microdissecció la porció contorta del túbul i d'on van establir-se les cèl·lules (Cartier *et al* 1993). La sublínia PCT3 va ésser subclonada per dilució al límit de la línia parental PKSV-PCT i seleccionada per al seu ús en el nostre laboratori en ser la que presentava una expressió de la proteïna KAP en resposta a andrògens més elevada (Soler *et al.*, 2002). Es tracta de cèl·lules adherents que creixen en monocapa i tenen la capacitat de formar *doms* després de diversos dies de post-confluència (Lacave *et al.*, 1993). S'ha vist que han retingut les característiques de les cèl·lules parentals de les quals deriven i en elles es va poder observar per primer cop la inducció de l'expressió de gens sota el tractament amb andrògens (DHT) com ara KAP i β -glucoronidasa (Ouar *et al.*, 1998).

La línia PCT va ser amablement cedida pel Dr. Alain Vandewalle al nostre grup.

COS-1

Línia cel·lular renal de prima derivada de la línia cel·lular CV-1 que va ser establerta a partir de ronyó de mico africà verd (*Cercopithecus aethiops*) mascle adult i originalment immortalitzada mitjançant l'antigen nuclear 1 del virus Epstein-Barr (EBNA-1) (Jensen *et al* 1964). La línia COS-1 s'establí mitjançant la transformació de l'antigen T gran del virus SV40 (Gluzman *et al*, 1981). Són cèl·lules adherents, amb morfologia epitelial de tipus fibroblast.

Les cèl·lules COS-1 han estat amablement cedides pel Dr. Olli Jänne.

2.2 Medis de cultiu

Les línies cel·lulars amb les que s'ha treballat han estat mantingudes i expandides a 37° C en un incubador amb atmosfera humida (al 5% de CO₂) seguint els procediments i les pràctiques estàndard requerides pel treball amb cultiu en condicions estèrils (Davis 2002).

A continuació es descriu la formulació dels diferents medis de cultiu emprats. Tots els procediments de preparació han estat realitzats en condicions estèrils.

Medi PKSV-PCT3

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
DMEM	50% (v/v)	GIBCO	011880-028M
Ham's F12	50% (v/v)	GIBCO	31765-027M
HEPES pH 7.4	20 mM	GIBCO	03025-027M
Glutamina	2 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
D-(+)-Glucosa	12,5 mM	SIGMA	G-7021
Transferrina	5 µg/mL	SIGMA	T-1438
Insulina	5 µg/mL	SIGMA	I-6634
Dexametsona	50 nM	SIGMA	D-8893
Triiodotironina	1 nM	SIGMA	T-5516
Selenat de sodi	30 nM	SIGMA	S-9133
EGF	10 ng/ml	SIGMA	E-4127
Sèrum fetal boví	2% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
Penicil·lina // Estreptomicina	100 U/ml 100 µg/ml	GIBCO	15240-052

Medi COS-1

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
DMEM	1:1 (v/v)	GIBCO	011880-028M
Sèrum fetal boví	10 % (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
Penicil·lina / Estreptomicina	100 U/ml 100 µg/ml	GIBCO	15240-052

3. SOQUES BACTERIANES

Soca	Genotip	Característiques	Proveïdor
TOP10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG</i>	Soca comercial optimitzada pel clonatge de tot tipus de plasmidis. Presenta una elevadíssima eficiència de transformació	I _{NVITROGEN}
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(rK-,rK+) relA1 supE44 Δ(lac-proAB)[F-traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>	Soca deficient en recombinases utilitzada per el creixement i la clonació de plasmidis. Presenta una elevada eficiència de transformació. Permet realitzar selecció blau/blanc en presència d'IPTG i d'X-gal.	P _{ROMEGA}

4. VECTORS I CONSTRUCTES

4.1 Vectors

A continuació es mostren els diferents vectors utilitzats en aquest treball amb les seves característiques principals.

Nom	Característiques	Mapa
pCR[®]2.1-TOPO[®]	Vector de clonatge per a productes de PCR mitjançant el mètode “TA”. Plasmidi lineal amb els extrems activats per la unió covalent de Topoisomerasa I, que afavoreix l’acomodació del DNA a clonar. Conté múltiples llocs de restricció al MCS per facilitar el subclonatge. Confereix resistència a ampicil·lina per a la seva selecció en bacteris. És de la casa comercial INVITROGEN .	
pBluescript II	Vector multicòpia de clonació per propòsits generals de clonatge. Disposa d’un lloc múltiple de clonatge (MCS) amb nombroses dianes de restricció, selecció blau-blanc i resistència a ampicil·lina.	
pGL3 - basic	Plasmidi reportador per a l’anàlisi de seqüències promotores i reguladores. Permet la clonació del fragment de DNA d’interès fusionat amb la seqüència codificant del gen de la luciferasa, l’activitat de la qual servirà d’indicador de la capacitat d’activació transcripcional del fragment de promotor clonat, en assajos de transfecció transitòria.	
pSEAP – control	Plasmidi d’expressió en cèl·lules eucariotes de l’enzim reportador fosfatasa alcalina secretada (SEAP) sota el control del promotor víric de SV40. S’utiitza com a control de l’eficiència de transfecció. El fet que contingui elements com l’ <i>early promoter</i> i l’ <i>enhancer</i> de SV40 assegura uns nivells d’expressió elevats en la majoria de línies cel·lulars.	
pSG5	Plasmidi d’expressió en cèl·lules eucariotes. Permet l’expressió <i>in vivo</i> de l’insert clonat gràcies al promotor SV40 de què disposa. També permet l’expressió en sistemes de transcripció <i>in vitro</i> mitjançant el promotor T7 que també presenta.	

4.2 Constructes

Seguidament es cita més detalladament cadascuna de les construccions emprades.

CONSTRUCTE	CARACTERÍSTIQUES / APLICACIÓ	ORIGEN
K 638	Fragment de 638 pb del promotor del gen de la KAP clonat a pGL3 davant cDNA de l'enzim luciferasa. Assajos funcionals promotor	Tesi de M. Soler, 2002
K 638-AREm	Fragment de 638 pb del promotor del gen de la KAP amb els nt de -39 a -35 delecionats clonat a pGL3 davant cDNA de l'enzim luciferasa. Assajos funcionals promotor	Tesi de M. Soler, 2002
K638-Sp MUT	Fragment de 638 pb del promotor del gen de la KAP amb els nt de -429 a -420 substituïts per una diana de l'enzim EcoRI clonat a pGL3 davant cDNA de l'enzim luciferasa. Assajos funcionals promotor	Mutagènesi dirigida <i>Primers Sp KAP</i>
K638-429	Fragment de 637 pb del promotor del gen de la KAP amb els nt de -429 a -420 delecionats clonat a pGL3 davant cDNA de l'enzim luciferasa. Assajos funcionals promotor	Tesi de M. Soler, 2002
K638-457	Fragment de 638 pb del promotor del gen de la KAP amb els nt de -457 a -448 delecionats clonat a pGL3 davant cDNA de l'enzim luciferasa. Assajos funcionals promotor	Tesi de M. Soler, 2002
K638-429/457	Fragment de 638 pb del promotor del gen de la KAP amb els nt de -429 a -420 i de -457 a -448 delecionats clonat a pGL3 davant cDNA de l'enzim luciferasa. Assajos funcionals promotor	Tesi de M. Soler, 2002
pSV-AR_o	Plasmidi d'expressió del receptor d'andrògens humà sota el control del promotor víric de SV40. Sobreexpressió en assajos funcionals del promotor	Amablement cedit pel Dr. Lopez-Otín. Universitat d'Oviedo
pSG5-ARwt	cDNA complet de la proteïna AR humana clonat al plàsmid d'expressió pSG5. Expressió <i>in vitro</i> de la proteïna i posterior ús en assajos d'EMSA	Amablement cedit pel Dr. Jänne Universitat d'Hèlsinki
pSG5-ARmut	plàsmid d'expressió pSG5 per a una versió truncada de la proteïna AR humana a la qual manca el domini d'unió a DNA. Expressió <i>in vitro</i> de la proteïna i posterior ús en assajos d'EMSA	Amablement cedit pel Dr. Jänne Universitat d'Hèlsinki
pMSV-LAP	cDNA complet de la proteïna C/EBP β de ratolí clonat al plàsmid d'expressió pMSV. Sobreexpressió en assajos funcionals del promotor	Amablement cedit per la Dra. Giralt Universitat de Barcelona
pCMV-Sp1	cDNA complet de la proteïna Sp1 humana clonat al plàsmid d'expressió pCMV. Sobreexpressió en assajos funcionals del promotor i obtenció d'extractes nuclears enriquits.	Amablement cedit pel Dr. Ciudad Universitat de Barcelona
pCMV- Sp3	cDNA complet de la proteïna Sp3 humana clonat al plàsmid d'expressió pCMV. Emprada per sobreexpressar aquesta proteïna en assajos funcionals del promotor del gen de la KAP i obtenció d'extractes nuclears enriquits.	Amablement cedit pel Dr. Ciudad Universitat de Barcelona
pSG5-GATA 3	cDNA complet de la proteïna GATA 3 de ratolí clonat al plàsmid d'expressió pSG5. Sobreexpressió en assajos funcionals del promotor i expressió <i>in vitro</i>	cDNA de GATA3 obtingut per RT-PCR a partir de RNA d'embrió. <i>Primers GATA3Xp</i>

pCMV-SF1	cDNA complet de la proteïna SF1 humana clonat a pCMV. Sobreexpressió en assajos funcionals del promotor	Amablement cedit pel Dr. Marrero Universitat de Barcelona
pSG5-SF1	cDNA complet de la proteïna SF1 humana clonat pSG5. Expressió <i>in vitro</i> posterior ús en assajos d'EMSA.	Amablement Cedit pel Dr. Marrero Universitat de Barcelona
pSG5-GR	cDNA complet de la proteïna GR humana clonat a pSG5. Sobreexpressió en assajos funcionals del promotor i expressió <i>in vitro</i> i posterior ús en EMSA	Amablement Cedit pel Dr. Jänne Universitat d'Hèlsinki

5. OLIGONUCLEÒTIDS

5.1 Assajos de retard en gel (EMSA)

S'han emprat oligonucleòtid representatius de les seqüències per la qual es volia investigar la unió de factors de transcripció i s'han marcat en els extrems 5' amb [γ -³²P] ATP.

T_{AULA} 5. Oligonucleòtids utilitzats en assajos EMSA

Nom	Seqüència	Referència
SEQÜÈNCIES CONSENS / CONTROL		
C/EBP WT	TGCAGATTGCGCAATCTGCAA	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
C/EBP MUT	TGCAGAGACTAGTCTCTGCAA	"
GATA WT Up	CACTTGATAACAGAAAGTGATAACTCT	"
GATA WT Low	AGAGTTATCACTTTCTGTTATCAAGTG	"
GATA MUT Up	CACTTCTTAACAGAAAGTCTTAACTCT	"
GATA MUT Low	AGAGTTAAGACTTTCTGTTAAGAAGTG	"
C(3)1 ARE	AGTACGTGATGTTCT	Tan <i>et al.</i> , 1992
GRE Up	AGAGGATCTGTACAGGATGTTCTAGAT	Rundlett, 1995
GRE Low	ATCTAGAACATCCTGTACAGATCCTCT	"
AROMATASE Up	CCTGAGTCTCCCAAGGTCATCCTTGTTTT	Ito <i>et al.</i> , 2000
AROMATASE Low	AAAACAAGGATGACCTTGGGAGACTCAGG	"

SEQÜÈNCIES PROMOTOR DEL GEN DE LA KAP		
KAP ARE Up	GGGAGAGGGTACAGGATGTATAAAAGCCCAG	-
KAP ARE Low	CTGGGCTTTTATACATCCTGTACCCTCTCCC	-
KAP Sp1 Up	AACCCCTCCCCGCCCCCTTTT	-
KAP Sp1 Low	AAAAGGGGGCGGGGAGGGGTT	-
TATA Mut Up	GGGAGAGGGTACAGGATGTGTAAAAGCCCAG	-
TATA Mut Low	CTGGGCTTTTCTACATCCTGTACCCTCTCCC	-
429 Up	CTTCACTGTTCTCCAGCAATCTGCCAGGAT	-
429 Low	ATCCTGGCAGATTGCTGAGAACAGTGAAG	-
457 Up	GATAGTTCTGCTTTTGTCAATGAGCAGTTCT	-
457 Low	AGAAGTCTCATTTGCAAAAGCAGAACTATC	-

5.2 Amplificació per PCR o RT-PCR

Les parelles de *primers* emprades en l'amplificació d'àcids nucleics s'han dissenyat seguint els paràmetres necessaris per a obtenir unes condicions d'amplificació òptimes. De manera que s'ha tingut en compte que la llargada i T_m dels dos oligonucleòtids fos similar, que el percentatge GC s'aproximés el màxim possible al 50%, que el *primer* no presentés complementarietat ni amb ell mateix ni amb la parella corresponent,...Per al disseny s'ha utilitzat el web http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi (Rozen i Skaletsky, 2000) i el proveïdors encarregats de la síntesi dels oligonucleòtids han estat QUIAGEN i THERMO.

T_{AULA 6}. Oligonucleòtids utilitzats en PCR o RT-PCR

Nom	Seqüència 5'-3'	Diana	$T_m(^{\circ}C)$	Orientació
GATA 1 Up	TTGTGAGGCCAGAGAGTGTG	-	59.4	<i>fwd</i>
GATA 1 Low	CAGCAGAGGTCCAGGAAAAG	-	59.4	<i>rev</i>
GATA 2 Up	GGGCGTCAAGTACCAAGTGT	-	59.4	<i>fwd</i>
GATA 2 Low	CCCTTCCTTCTTCATGGTCA	-	57.3	<i>rev</i>
GATA 3 Up	CTTATCAAGCCCAAGCGAAG	-	57.3	<i>fwd</i>

GATA 3 Low	GTAGAAGGGGTCGGAGGAAC	-	61.4	rev
GATA 4 Up	TCTCTTTCCCGGGGACTACT	-	59.4	fwd
GATA 4 Low	GGTGGTGGTAGTCTGGCAGT	-	61.4	rev
GATA 5 Up	CACAGCCTCTTCTCCCACTC	-	61.4	fwd
GATA 5 Low	GAACCTTTGCCAGCTGCTAC	-	61.4	rev
GATA 6 Up	ATCACCATCACCCGACCTAC	-	59.4	fwd
GATA 6 Low	TGTTACCGGAGCAAGCTTTT	-	55.3	rev
Cyp A Up	ATGGTCAACCCACCGTG	-	60	fwd
Cyp A Low	CAGATGGGGTAGGGACG	-	60	rev
GATA 3 Xp Up	ATATGAATTCACCATGGATGGAGGTGACTGCGG	EcoRI	78.3	fwd
GATA 3 Xp Low	ATATATAGATCTCTAACCCATGGCGGTGACCAT	BglII	72.1	rev

5.3 Mutagènesi dirigida

Els oligonucleòtids emprats per a realitzar la mutagènesi dirigida s'han dissenyat seguint les indicacions del protocol del kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* de STRATAGENE. Principalment s'ha contemplat la inclusió de la mutació desitjada als dos primers per tal que hibridessin amb cadascuna de les cadenes del DNA diana, que la mutació es trobés al centre de l'oligonucleòtid i que la llargada fos la voltant de 40 bases.

TAULA 7. Oligonucleòtids utilitzats per la mutagènesi dirigida

Nom	Seqüència 5'-3'	T _m (°C)	Comentaris
TATA Mut Up	GGGAGAGGGTACAGGATGTGTAAAAGCCCAG	67°C	Emprats per generar el constructe K638 TATA Mut
TATA Mut Low	CTGGGCTTTTCTACATCCTGTACCCTCTCCC	67°C	
Sp KAP Up	CCTTCCCAAACCCCTGAATTCCCCCCTTTTTT	78°C	Emprats per generar el constructe K638 Sp Mut
Sp KAP Low	AAAAAAGGGGAATTCAGGGTTTGGGAAGG	78°C	

5.4 RT-PCR Southern

Per a la verificació dels productes amplificats en les RT-PCR dels factors GATA a partir d'embrió de ratolí, ha calgut buscar regions específiques en la seqüència de

cadascun dels 6 membres i reproduir-les en oligonucleòtids que després s'han marcat radioactivament per emprar-los com a sondes específiques.

T_{AULA} 8. Oligonucleòtids utilitzats com a sondes en la RT-PCR *Southern*

Nom	Seqüència 5'-3'
GATA 1 <i>south</i>	TTGTGAGGCCAGAGAGTGTG
GATA 2 <i>south</i>	GGGCGTCAAGTACCAAGTGT
GATA 3 <i>south</i>	CTTATCAAGCCCAAGCGAAG
GATA 4 <i>south</i>	TCTCTTTCCCGGGGACTACT
GATA 5 <i>south</i>	CACAGCCTCTTCTCCCACTC
GATA 6 <i>south</i>	ATCACCATCACCCGACCTAC

6. ANTICOSSOS

Al llarg d'aquest treball s'han emprat anticossos en l'execució d'assajos de retard en gel *supershift* de la casa comercial S_{ANTA} C_{RUZ} B_{IO}T_{ECHNOLOGY} en el format especial per a la tècnica a una concentració de 1 µg/ 0,1 µl. En les immunodeteccions dels corresponents factors de transcripció s'han emprat les versions dels mateixos anticossos usats als EMSAs 10 cops menys concentrats, a 1 µg/ 0,1 µl.

Anticòs	Casa Comercial	Referència
AR (PG-21)	U _P STATE	06-680
Sp1 (PEP-2)	S _{ANTA} C _{RUZ} B _{IO} T _{ECHNOLOGY}	sc-59 x*
Sp3 (D-20)	S _{ANTA} C _{RUZ} B _{IO} T _{ECHNOLOGY}	sc-644 x*
C/EBP α (14-AA)	S _{ANTA} C _{RUZ} B _{IO} T _{ECHNOLOGY}	sc-61 x
C/EBP β (C-19)	S _{ANTA} C _{RUZ} B _{IO} T _{ECHNOLOGY}	sc-150 x
GR (M-20)	S _{ANTA} C _{RUZ} B _{IO} T _{ECHNOLOGY}	sc-1004 x*
GATA3 (HG3-31)	S _{ANTA} C _{RUZ} B _{IO} T _{ECHNOLOGY}	sc-268x
SF-1 (E-18)	S _{ANTA} C _{RUZ} B _{IO} T _{ECHNOLOGY}	sc-10976 x*
Secundari <i>Anti-rabbit</i>	D _A KO	P0448

* les versions per a *western blot* tenen la mateixa referència sense "x"

7. REACTIUS QUÍMICS

Els reactius i productes químics utilitzats han estat subministrats principalment per les cases B_{OEHRINGER-M}_{ANHEIM/R}_{OCHE}, F_{LUKA}, M_{ERCK}, P_{ANREAC} i S_{IGMA} entre d'altres.

Els reactius marcats amb isòtops radioactius, com el [γ -³²P] ATP i el Trans ³⁵S-Label, han estat subministrats per A_{MERSHAM B}_{IOSCIENCES/GE}.

8. INSTRUMENTACIÓ I APARELLS

CATEGORIA	APARELL	FABRICANT	MODEL
Grans Aparells	Autoclau	M _{ATACHANA}	
	Grans centrifugues	S _{ORVALL}	RT6000D
		S _{ORVALL}	RC5C
	Reveladora	A _{GFA}	CURIX 60
	Seqüenciador automàtic	P _{ERKIN E} _{LMER}	A _{BI PRISM 310 Molecular analyzer}
Congeladors i Neveres	Ultracongeladors (-80°)	R _{EVCO}	
	Nevera/ congeladors (-20°)	L _{IEBHERR}	
Cultius	Campanes de Flux	T _{ELSTAR}	BIO II A
		T _{ELSTAR}	AV-30/70
	Incubador de CO ₂	T _{HERMO}	
	Contenedor de N ₂	L _{ERY-F} _{RANCE}	BR 2100 C _{RYO D} _{IFFUSION}
Sistemes de Purificació d'H ₂ O	Font aigua destil·lada	M _{ILLIPORE}	M _{ILLI-RO} ®
	Font d'aigua bidestil·lada	M _{ILLIPORE}	M _{ILLI-Q} _{plus}
Sistemes de Buit / Dessecació	<i>Speed-Vac</i>	S _{AVANT}	SC100
	Assecador de gels	B _{IO-R} _{AD}	
Centrífugues de sobretaula	Centrifuga refrigerada	E _{PENDORF}	4514R
		H _{ERAEUS}	S _{EPA} _{TECH}
	Microfuga	B _{ECKMAN}	M _{ICROFUGUE E} TM
		S _{IGMA}	112
		H _{ETTICH}	E _{BA} 12
Material d'Electroforesi	Cubetes	E _{COGEN}	(diferents mides)
		B _{IO-R} _{AD}	M _{INI SUB-CELL} ® CELL GT
		B _{IO-R} _{AD}	SUB-CELL® CELL
		L _{IFE T} _{ECHNOLOGIES}	S2

		B _{IO} -R _{AD}	M _{INIPROTEAN} II
		B _{IO} -R _{AD}	M _{INIPROTEAN} III
		B _{IO} -R _{AD}	P _{ROTEAN} ® II xi CELL
	Fonts d'electroforesi	P _{HARMACIA}	LKB-GPS 200/400
		P _{HARMACIA}	EPS 500/400
		B _{IO} -R _{AD}	P _{OWER} PAC300
Fonts de Calor	Estufes	M _{EMEMRT}	
		H _{ERAEUS} (37°)	
	Banys d'aigua termostatitzats	T _{HERMOMIX} MM. B B _{RAUN}	
		A _{QUA} S _{HAKER}	A _{DOLF} K _{ÜHNER} AG
	Plaques calefactores / Agitadors magnètics	P _{SELECTA}	T _{HERMOBLOCK}
		T _{HERMOLINE}	N _{UOVA} II S _{TIR} PLATE
	Forns d'hibridació	H _{YBAID}	
E _{COGEN}			
Agitadors	<i>Shaker</i>	A _{DOLF} K _{ÜHNER}	
	Agitador orbital	L _{UCKHAM}	CM100
	Vòrtex	H _{EIDOLPH}	R _{EAX} 2000
Microscopia	Microscopi Òptic	O _{LYMPUS}	BX40
Espectrofotòmetres i altres aparells d'anàlítica	Espectrofotòmetre UV-VIS	U _{BIKON}	
	Espectrofotòmetre UV	P _{HARMACIA}	G _{ENE} Q _{UANT} II
	Luminòmetre de plaques	L _{ABSYSTEM}	L _{UMINOSCAN} RS
Termocicladors	<i>peltier</i>	M _J R _{ESEARCH} I _{NC.}	PTC-100
	<i>block</i>	P _{ERKIN} E _{LMER}	<i>Geneamp</i> PCR system 2400
		P _{ERKIN} E _{LMER}	<i>Geneamp</i> PCR system 9600

MÉTODES

1. PURIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

1.1 EXTRACCIÓ DE RNA TOTAL

1.1.1 Mètode de Chomczynski-Sacchi

L'extracció de RNA s'ha realitzat principalment seguint el mètode del tiocianat de guanidini/fenol-cloroform (Chomczynski *et al.*, 1987) amb algunes modificacions. Les quantitats estan ajustades per processar peces de teixit de 200-300 mg –pes aproximat d'un ronyó de ratolí adult– de les quals es recuperen entre 400 i 700 mg de RNA total. Per homogeneïtzar els teixits s'ha utilitzat un homogeneïtzador Politron. Material i reactius lliures de RNAses.

Reactius

- Solució D
- Fenol
- Cloroform/alcohol isoamílic 49:1 (v/v)
- Acetat sòdic 2 M, pH 4,0
- Alcohol isopropílic
- Etanol 70% (v/v)

Procediment

1. Homogeneïtzar cada teixit en 4 ml de solució D
2. Passar l'homogenat a un tub Corex® de vidre i afegir-hi respectant l'ordre:
 - 400 ml d'acetat sòdic 2 M (pH 4,0)Barrejar per inversió
 - 4 ml de fenol;agitar
 - 800 ml de cloroform/alcohol isoamílic 49:1; agitar amb força
3. Deixar reposar en gel 15 min
4. Centrifugar 30 min a 10.000 *rpm* (4°C); Recuperar la fase aquosa
5. Afegir 5,5 ml d'alcohol isopropílic fred (a -20°C) i agitar vigorosament
6. Incubar-ho a -20°C durant un mínim de 2 h
7. Centrifugar 20 min a 10.000 *rpm* (4°C)
8. Descartar el sobrenedant i ressuspendre el *pellet* en 700 ml de solució D
9. Afegir 700 ml d'alcohol isopropílic fred i agitar amb força
10. Incubar a -20°C durant un període mínim de 60 min
11. Centrifugar 15 min a 13.000 g (4°C)
12. Decantar el sobrenedant i rentar el *pellet* de RNA amb Etanol al 70% (v/v)
13. Repetir el pas núm 11
14. Decantar el sobrenedant i deixar assecar breument el *pellet*
15. Ressuspendre el RNA en H₂O-DEPC (entre 100-200 ml) i valorar la concentració resultant a l'espectrofotòmetre (llegir a 260 nm).

Un cop obtingut, l'RNA posterior utilització.
s'emmagatzema a -80°C fins a la seva

1.1.2 Extracció d'RNA amb el *kit RNeasy* de QUIAGEN

També s'ha utilitzat, a part del mètode clàssic de Chomzcynsky, el kit d'extracció d'RNA total de la casa comercial QUIAGEN. Es basa principalment en l'ús de columnes cromatogràfiques d'afinitat que eviten la manipulació de substàncies potencialment tòxiques, com el fenol i el cloroform. Aquest *kit* representa un estalvi important de temps i permet processar un nombre més elevat de mostres mantenint un elevat grau de reproductibilitat. En l'extracció d'RNA a partir de teixit s'han usat uns 300 mg de mostra per columna i quan el material d'origen han estat cèl·lules s'ha processat una placa de 10 cm per columna. S'han seguit les instruccions subministrades pel fabricant.

1.2 PURIFICACIÓ DE DNA PLASMÍDIC

1.2.1 Purificació a petita escala de DNA plasmídic (*Miniprep*)

Per a la preparació de plasmidi a partir de cultiu bacterià d' *E. coli*, s'ha utilitzat el kit comercial *Wizard® plus SV Minipreps Purification System* de PROMEGA. A partir de 5 ml de cultiu s'obté un rendiment de 15-20 µg de DNA de prou puresa i qualitat per a ser utilitzats directament en reaccions de seqüenciació automàtica i digestions enzimàtiques. Aquest *kit* es basa en el mètode de lisi alcalina i en l'adsorció del DNA a una resina especial. S'han seguit les instruccions subministrades pel fabricant, els passos principals d'aquestes es resumeixen a continuació:

- Recollida i resuspensió de les cèl·lules bacterianes.
- Lisi alcalina.
- Neutralització i precipitació proteica i del DNA genòmic.
- Unió del DNA plasmídic a la resina de la columna.
- Rentats de la columna per centrifugació.
- Elució

1.2.2 Purificació a gran escala de DNA plasmídic (*Maxiprep*)

En les ocasions en què s'han requerit grans quantitats de DNA plasmídic, per exemple, en digestions preparatives o transfeccions, s'ha procedit a purificar el DNA recombinant a partir de cultius d'*E. coli* de volums superiors, entre 400 i 500 ml. A tal efecte s'ha utilitzat el kit *Nucleobond® AX-500* de M_{ACHEREY-N_{AGEL}} seguint el protocol de la casa comercial.

1.3 PURIFICACIÓ DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA

Els fragments de DNA resolts electroforèticament en un gel d'agarosa es poden recuperar i purificar a partir del gel per utilitzar-se en posteriors aplicacions. En primer lloc es separa electroforèticament el DNA d'interès en un gel d'agarosa-BrEt (vegeu els apartats 2.1.1 i 2.1.2). En segon lloc, es retalla la banda a recuperar amb una fulla de bisturí estèril, sota la llum ultraviolada. Per a purificar el DNA de la banda d'agarosa escindida s'utilitza l'*Agarose gel DNA extraction kit* de R_{OCHE}, basat en la utilització de pols de sílice que reté adsorbit el DNA en presència de sals caotrópiques. S'ha seguit el protocol suggerit pel fabricant.

1.4 PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR O RT-PCR

Els productes resultants de l'amplificació per PCR o RT-PCR s'han purificat separant-los de les restes de sals, *primers* i enzims amb el *High Pure™ PCR product purification kit* de R_{OCHE}. Aquest *kit* es basa en l'ús d'unes columnes de polímer capaç de retenir el DNA en determinades condicions. Amb aquest sistema es poden purificar fragments de DNA entre 0,1 i 10 Kb de grandària. S'han seguit les instruccions indicades pel fabricant.

2 ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS

2.1 ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA

El material d'electroforesi utilitzat ha estat principalment el següent: cubetes tipus minigel i de mida mitjana de les cases comercials B_{IO-R_{AD}} i E_{COGEN}, i fonts d'electroforesi de les cases comercials H_{OEFFER} i B_{IO-R_{AD}}.

El DNA a analitzar s'ha diluït 1/10 en tampó de càrrega 10x: 50% Glicerol, 0,21% Blau de bromofenol, 0,21% *Xylene cyanol FF* i 0,2M EDTA pH 8,0.

2.1.1 Electroforesi analítica

Per visualitzar el resultat de digestions de DNA i l'amplificació d'àcids nucleïcs o s'ha realitzat electroforesi en gels d'agarosa [*agarosa estándar grado medio*, ECOGEN] preparats en tampó TAE 1x. El percentatge d'agarosa dels oscil·la entre 0,7 i 2,5% (p/v) segons la grandària dels productes a separar. Per tal de visualitzar el DNA mitjançant llum UV s'incorpora al gel bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg/ml. L'electroforesi es resol a voltatges d'entre 70 i 115 V.

2.1.2 Electroforesi preparativa

En electroforesi on el propòsit ha estat la purificació del DNA d'interès a partir del gel per a una posterior aplicació s'ha utilitzat agarosa de màxima puresa [*molecular biology grade agarose* de PROMEGA]. En aquests casos es treballa amb dimensions i volums de càrrega més grossos, entre 50 i 100 µl per pou, i es resol a voltatges més baixos, 40-60 V, durant un període de temps més llarg.

En ambdues electroforesis, les mostres a carregar s'han preparat diluint-les 1/10 en tampó de càrrega (tampó de càrrega 10x: 50% Glicerol, 0,21% Blau de bromofenol, 0,21% Xylene cyanol FF i 0,2M EDTA pH 8,0).

2.2 SOUTHERN BLOT

La transferència de DNA de gels d'agarosa a membranes per a la seva posterior hibridació amb sondes radioactives és una tècnica que ens permet validar la identitat dels fragments amplificats en les reaccions de transcripció reversa. En el *southern* a partir de productes amplificats per RT-PCR, el DNA es separa primer mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa i es transfereix per capil·laritat en presència de sals a un filtre de nitrocel·lulosa, on es fixarà utilitzant radiació ultraviolada (no és necessària la desnaturalització del DNA amb sosa ja que els productes de RT-PCR són de cadena simple).

S'ha seguit la guia de Sambrook 1989 #30, basat en les consideracions inicials de Southern (1974) així com les indicacions del fabricant de membranes *Zeta-probe® GT Membrane* [BIO-RAD].

Reactius

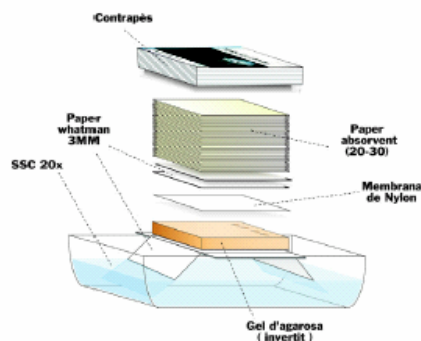
- Agarosa (*agarosa estàndar grado medio*, E_{COGEN})
- TAE 1x (Vegeu A_{NNEX})
- *Polynucleotide Kinase* [P_{ROMEGA}]
- γ [³²P]-ATP [A_{MERSHAM}]
- *Microspin™ G-25 Column* [A_{MERSHAM}]
- Membranes de niló *Zeta-probe® GT Membrane* [B_{IO-RAD}]
- Tampó de transferència [NaOH 0.4 M]
- Solució de Prehibridació [0.5x formamida desionitzada, 125 mM Na₂PO₄, 1 M Na Cl, 7% SDS]
- Solució d'Hibridació [solució de prehibridació amb el volum total de sonda marcada i purificada afegit]

Procediment

1. Preparar un gel d'agarosa en TAE 1x; el percentatge d'agarosa dependrà de les mides de l'ADN que es vulgui separar (des del 0.6% d'agarosa per mides d'1 a 20 kb fins al 2% per mides de 0.1 a 2 kb).
2. Barrejar la mostra de DNA amb el volum desitjat de tampó de càrrega i resoldre en gel a voltatge constant fins que els fragments estiguin ben separats.

Transferència del DNA

3. Rentar el gel a una safata *Pyrex* amb aigua destil·lada. Agitar suaument durant 10 min.
4. Muntar la transferència. Disposar un muntatge clàssic de transferència per capil·laritat (vegeu esquema)
5. Transferir durant 12-16 h (*o/n*)
6. Desmuntar la transferència i fixar el DNA a la membrana amb



radiació UV (*UV Stratalinker™ 1800*, S_{TRATAGENE})

Marcatge de la sonda

7. Incubar 60 min a 37°C :

<u>Quantitat</u>	<u>Component</u>
H ₂ O	fins a 10 µl
oligonucleòtid 10µM	1 µl
γ[³² P]-ATP	5 µl
<i>Polynucleotide Kinase</i>	1 µl
10x <i>Polynucleotide Kinase Buffer</i> [#]	1 µl

8. Aturar la reacció incubant 10 min 65°C

9. Purificació de la sonda mitjançant *Microspin™ G-25 Column* seguint les indicacions de la casa comercial.

Hibridació i exposició

1. Prehibridar la membrana durant 5 min amb la solució de prehibridació preescalfada a una temperatura $\sim T_m(\text{sonda}) - 5^\circ \text{C}$
2. Afegir 10⁶ cpm/ml de solució d'hibridació
3. Hibridar a una temperatura $\sim T_m(\text{sonda}) - 5^\circ \text{C}$ 12-18 h (o/n)
4. Rentar amb tampó 2x SSC 0.1% SDS 15 min RT
5. Rentar amb tampó 0.5x SSC 0.1% SDS 15 min 68° C
6. Rentar amb tampó 0.1x SSC 0.1% SDS 15 min 68° C
7. Exposar una pel·lícula d'autoradiografia (*KODAK X-Omat AR Film*, KODAK)
8. Revelar

2.3 AMPLIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

L'amplificació d'àcids nucleics permet obtenir una quantitat important de DNA a partir d'un àcid nucleic motlle (ja sigui RNA o DNA) alhora que fa possible la introducció de modificacions específiques com ara l'addició d'una diana de restricció o *tags* als extrems del DNA, mutagènesi dirigida, etc.

Les condicions d'amplificació depenen en gran mesura del fragment a amplificar, de les característiques dels *primers* a utilitzar i de l'enzim d'elecció.

Els aparells utilitzats han estat el termociclador *geneamp 2400* de P_{ERKIN ELMER} i el *PCT-100™ Programmable Thermal controller* de M_{J R}_{ESEARCH}.

2.3.1 PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

L'amplificació del DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa o PCR s'ha convertit en un procediment bàsic al laboratori de biologia molecular. Cada reacció d'amplificació s'ha d'optimitzar de manera individualitzada, i a part del disseny adequat

individualitzat dels *primers* per a cada gen o situació, s'han d'ajustar específicament la temperatura d'anellament (T_a), el nombre de cicles de la reacció i la concentració de Mg^{2+} .

Les propietats de polimerasa utilitzada seran en funció de l'aplicació posterior que donem al producte de PCR. En la majoria de situacions s'ha utilitzat *EcoTaq* d' E_{COGEN} , mentre que en els casos en què ha estat important la fidelitat en l'amplificació s'ha optat per polimerases amb activitat correctora (*proofreading*) com la *FastStart* de R_{OCHE} o la *Pfu turbo* de $S_{TRATAGENE}$.

A continuació s'indiquen unes condicions bàsiques de PCR aplicables com a punt de partida previ a l'optimització de qualsevol reacció de PCR.

Reactius:

- Enzim Taq Polimerasa amb tampó corresponent
- $MgCl_2$ 50 mM
- dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP equimolars 10 μM)
- Tubs *eppendorf* per PCR de paret fina
- *Primers forward* i *reverse* 10 μM
- H_2O *mili-Q* estèril

Procediment

1. Preparar la reacció següent en gel:

$$V_{\text{final}} = 50 \mu L$$

<u>Component</u>	<u>Concentració final</u>
H_2O <i>mili-Q</i> estèril	fins al V final
DNA motlle*	x μl
10x <i>Taq buffer</i> †	1x
$Mg Cl_2$	1'5 mM
dNTPs mix 10 mM	200 μM
<i>forward primer</i> 10 μM	1 μM
<i>reverse primer</i> 10 μM	1 μM
<i>Eco Taq</i>	1-2,5 U

* Les quantitats de DNA motlle varien segons es tracti de DNA genòmic (25-100ng) o DNA plasmídic (0,1-1 ng)

† Subministrat amb la DNA polimerasa específica utilitzada.

2. Col·locar cada reacció al termociclador i executar el programa de PCR. Les condicions d'amplificació tipus són:

94° C	5 min	} x 30 cicles
94° C	30 seg	
T_a #	30 seg	
72° C	1 min / Kb	
72° C	5 min	
4° C	∞	

Temperatura d'anellament, sovint $\sim T_m$ (*primers*) - 5° C

2.3.2 RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION - POLYMERASE CHAIN REACTION)

La transcripció inversa-PCR o RT-PCR permet obtenir un cDNA de doble cadena partint d'un mRNA motlle corresponent. La tècnica consta de dues etapes, primer es produeix la transcripció inversa (RT) a partir de l'mRNA i utilitzant un *primer* antisentit específic o un oligonucleòtid oligo-dT17, i en segon lloc ocorre l'amplificació per PCR de la cadena de cDNA sintetitzada inicialment. Tot i que tradicionalment aquestes dues etapes es realitzaven separadament, existeixen *kits* comercials que mitjançant formulacions d'una barreja de transcriptasa inversa i *Taq* polimerasa permeten realitzar la síntesi de cDNA acoblada a la PCR en un únic tub, utilitzant un parell de *primers* específics.

S'ha emprat el *kit SUPERScript™ One-Step RT-PCR with PLATINUM® Taq* de INVITROGEN que consisteix en una mescla dels enzims *SUPERScript II H-Reverse Transcriptase* i *PLATINUM Taq*, una *Taq* DNA polimerasa acomplexada amb un anticòs que inhibeix l'activitat polimerasa a temperatura ambient però que permet la recuperació d'aquesta activitat després de la desnaturalització a 94°C durant la PCR. Aquest *Hot start* automàtic permet incrementar la sensibilitat, l'especificitat i el rendiment de la reacció de PCR. S'han seguit les instruccions subministrades per la casa comercial.

2.3.3 Mutagènesi dirigida

La mutagènesi dirigida *in vitro* ens permet estudiar la rellevància d'una determinada seqüència inclosa en la regió reguladora d'un gen. Per introduir mutacions puntuals o deletar DNA de doble cadena s'ha utilitzat el *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit* de STRATAGENE seguint les instruccions del fabricant.

Com a DNA motlle s'utilitza un vector plasmídic que conté el DNA d'interès i, com a *primers*, dos oligonucleòtids sintètics que contenen la mutació desitjada, cada un d'ells complementari a cada una de les cadenes oposades del plasmidi. Mitjançant la *Pfu Turbo DNA polymerase* s'extenen els *primers* generant un nou plasmidi de doble cadena que conté la mutació. Per eliminar el DNA parental s'afegeix a la mescla l'enzim de restricció *Dpn I*, endonucleasa específica de DNA metilat i hemimetilat. Així s'aconsegueix seleccionar el DNA mutat que és transformat en la soca de bacteris *One-Shot® TOP10 d'E. Coli* de la casa comercial INVITROGEN. De les colònies obtingudes se n'extreu el DNA i es seqüencia per tal de corroborar que s'ha produït la mutació pretesa.

Les condicions de la reacció s'han d'ajustar en funció del nombre de canvis que volem introduir i de la grandària del plasmidi que conté el DNA motlle a mutar. Les condicions generals són:

Reactius

- *Pfu Turbo polymerase* amb el seu corresponent tampó (S_{TRATAGEN})
- dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP equimolars a 10 mM)
- tubs *ependorf* de paret fina
- *Primers* mutats *forward* i *reverse* 10 μM
- H₂O *milli-Q* estèril
- DpnI 10 U / μL [R_{OCHE}]
- One-Shot® *TOP10* [I_{NVITROGEN}]

Procediment

1. Preparar la següent reacció:

Component	Concentració final
------------------	---------------------------

H ₂ O <i>milli-Q</i> estèril (V _{final})	fins a 50 μL
DNA motlle	50 ng
10x <i>Pfu buffer</i> *	1x
dNTPs mix 10 mM	250 μM
<i>forward primer</i> 10 μM	200 nM
<i>reverse primer</i> 10 μM	200 nM
<i>Pfu Turbo polymerase</i>	2,5 U

2. Col·locar les reaccions al termociclador i executar el programa de PCR

95° C	30 seg	} x 12/16/ 18 cicles#
95° C	30 seg	
55° C	1 min	
68° C	2 min / Kb plasmidi	
4° C	∞	

12 cicles per mutacions puntuals
16 cicles per mutacions de 2 nt
18 cicles per mutacions de 3 nt

3. Afegir 1 μL d'enzim de restricció *DpnI* a la reacció de PCR i incubar 1 hora a 37° C
4. Transformar per xoc tèrmic una alíquota de bacteris competents One-Shot® *TOP10* amb 2 μL de la reacció de PCR digerida
5. Sembrar tot el volum de la transformació en plaques de LB amb l'antibiòtic adient per seleccionar els bacteris transformants.

2.4 SEQÜENCIACIÓ DE DNA

Les seqüències s'han realitzat al servei intern de seqüenciació del centre amb el seqüenciador automàtic *ABI PRISM 310 genetic analyser* de P_{ERKIN} E_{LMER} B_{IOSYSTEMS}.

Les reaccions de seqüència s'han obtingut amb el *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* d'*APPLIED BIOSYSTEMS* i s'han optimitzat al termociclador P_{ERKIN} E_{LMER} *GeneAmp PCR System 2400*.

Reactius

- *Big Dye v1.1* [APPLIED BIOSYSTEMS]
- H₂O *milli-Q* estèril
- *Primers* específics 5 μM
- Etanol 100 % i 70 % (v/v)

Procediment

Reacció de seqüència

1. Preparar la següent reacció:

<u>Component</u>	<u>Quantitat</u>
H ₂ O <i>milli-Q</i> estèril (V _{final})	fins a 20 μL
DNA motlle*	x μL
<i>primer</i> 5 μM	1 μL
5x BD <i>buffer</i>	4 μL
2x Dil <i>buffer</i>	

* Producte de PCR (200 ng); Plasmidi (1 μg)

2. Posar la reacció al termociclador i executar el següent programa:

96° C	2 min	} x 25 cicles
96° C	10 seg	
T _a [#]	5 seg	
60° C	4 min	
4° C	∞	

Temperatura d'anellament, generalment -5°C per sota la T_m dels *primers*

Precipitació de la reacció de seqüència

1. Afegir a la reacció:
H₂O *milli-Q* 16 μl
Etanol 95% 64 μl
2. Vortexar, precipitar 15 min a temperatura ambient.
3. Centrifugar 20 min a 14000 rpm.
4. Rentar el *pellet* amb 250 μl d'etanol al 70%.
5. Deixar assecar.
6. Ressuspensar el *pellet* en 15 μl de TSR.
7. Desnaturalitzar 3 min a 94°C.
8. Centrifugar breument i posar en gel.
9. Guardar a 4°C i a les fosques fins a la injecció la mostra a l'analitzador.

3 DNA RECOMBINANT

3.1 CLONATGE I SUBCLONATGE DE DNA

L'estratègia més habitual ha estat el clonatge de productes de PCR en vectors comercials específics per a aquesta comesa i el posterior subclonatge de l'insert en d'altres plasmidis d'interès concret per a cada aplicació.

3.1.1 Clonatge de productes de PCR

L'estratègia generalment emprada per a la clonació de productes de PCR aprofita l'activitat transferasa 3' terminal que algunes polimerases, com la Taq o la Tfl, presenten i que suposa l'afegidor d'una desoxiadenosina extra als extrems 3'de les cadenes amplificades. Aquesta característica permet que vectors comercials que presenten una desoxitimidina protuberant als seus extrems 3' siguin compatibles amb el fragments de DNA amplificats a clonar i d'aquesta manera incrementen notablement l'eficiència de lligació.

A aquest efecte s'ha utilitzat el vector *TOPO TA Cloning*[®] d'*INVITROGEN* i bàsicament s'han seguit els següents passos del *kit* que són:

1. Preparació de l'insert a clonar.
2. Lligació de l'insert al vector de clonatge
3. Transformació dels productes de la lligació en bacteris competents.
4. Anàlisi dels clons resultants.

Preparació de l'insert

Els fragment de DNA amplificat a clonar s'ha de purificar abans de sotmetre'l a la lligació. En les ocasions en què en la reacció d'amplificació diferents fragments de DNA,, s'ha procedit a resoldre electroforèticament el producte de PCR i s'ha retallat del gel la banda corresponent al fragment d'interès. El DNA contingut en aquesta banda s'ha purificat seguint el protocol ja descrit (vegeu l'apartat 1.4). En els casos en què s'ha obtingut un producte únic durant l'amplificació, aquest ha estat purificat directament utilitzant *kits* comercials de purificació de productes de PCR (vegeu l'apartat 1.5).

En qualsevol cas s'ha comprovat la puresa i la concentració del DNA purificat mitjançant electroforesi en gels d'agarosa (vegeu l'apartat 2.1.1) i la mesura espectrofotomètrica, abans de continuar amb el procés de clonatge.

Lligació de l'insert amb el vector pCR[®]2.1-TOPO[®]

1. Preparar la següent reacció:

Component	Quantitat
H ₂ O <i>milli-Q</i>	fins a 6 µl
producte de PCR†	0,5-4 µl
<i>Salt solution</i> *	1 µl
<i>pCR[®]2.1-TOPO[®]</i> *#	1 µl

* Subministrat amb el *kit*. # A 10 ng/µl.

† Cal optimitzar la relació insert(I)/vector(V); normalment s'ha utilitzat la relació molar I:V de

3:1. La quantitat final d'insert s'ha calculat amb la fórmula descrita més avall‡.

2. Barrejar i incubar de 5 a 10 min a temperatura ambient.

3. La lligació es pot guardar a -20 C fins a la seva utilització

$$\frac{\text{quantitat de V (ng)} \times \text{mida de l'I (kb)}}{\text{mida del V (kb)}} \times \text{relació molar} = \text{ng d'I}$$

3.1.2 Subclonatge de DNA

Parlem de subclonatge quan els inserts a clonar provenen de la digestió d'un constructe generat prèviament que els contenia, és a dir, quan el que pretenem és canviar l'insert de plasmidi degut a les diferents propietats que aquests ofereixen.

El protocol de subclonatge ha estat la següent:

1. Digestió de l'insert i del vector.
2. Defosforilació del vector
3. Purificació del DNA, tant de l'insert com del vector.
4. Anellament d'oligonucleòtids
5. Lligació de l'insert al vector de clonatge.
6. Transformació del producte de la lligació en bacteris competents.
7. Identificació de les colònies recombinants.

Digestió del DNA

Sempre que ha estat possible, per a la digestió d'insert i vector s'han escollit enzims de restricció que generessin extrems protuberants diferents per tal de permetre la clonació direccional de l'insert.

Les digestions s'han realitzat amb enzims de restricció de la casa comercial R_{OCHE} a una concentració aproximada d'1 U/μg de DNA. El protocol emprat ha estat:

1. Preparar la següent reacció:

Component	Concentració final
H ₂ O <i>milli-Q</i>	fins a 50 μl
DNA	10 μg
Enzim/s [#]	2 U/μg DNA
Tampó 10x ^{*†}	1x

* Subministrat amb l'enzim de restricció.

1 o 2 enzims en funció de si hem pogut triar 2 dianes diferents a cada extrem i de la compatibilitat del seus tampons.

- † Si s'empren 2 enzims cal usar el tampó més compatible amb els dos.
2. Incubar la reacció o/n a 37° C.
 3. Comprovar que la digestió és completa per electroforesi en gel d'agarosa (vegeu protocol 2.1.1).
 4. La digestió es pot guardar a -20°C fins a la seva utilització.

Defosforilació del vector

En els casos en què s'ha digerit el vector amb un sol enzim o amb enzims generadors d'extrems roms o extrems cohesius compatibles ha calgut defosforilar el vector per tal d'evitar-ne la relligació, fenomen que disminueix l'eficiència de lligació.

S'ha emprat l'enzim CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) de R_{OCHE} i s'ha seguit el següent protocol:

1. Preparar la reacció de defosforilació:
 - Plasmidi digerit (10 µg)
 - 1/10 del volum de 10x CIAP *buffer**
 - 1 µl (1U) de l'enzim CIAP
 2. Barrejar i incubar 60 min a 37°C.
 3. Inactivar tèrmicament la fosfatasa a 65°C durant 15 min
- *Subministrat amb l'enzim.

Purificació del DNA a clonar

Un cop digerit i defosforilat el DNA s'ha procedit a purificar-lo. Tant per l'insert com pel vector s'ha seguit el protocol d'extracció d'àcids nucleics a partir de gels d'agarosa (vegeu l'apartat 1.4).

Lligació entre l'insert i el vector

Un cop estimada la concentració aproximada de DNA (a partir de la intensitat que presenta 1 µL en un gel d'agarosa després de la purificació) es calcula la quantitat molar de vector (V) i d'insert (I) a incloure en la lligació. En general com a relació de partida s'ha utilitzat una I:V de 3:1.

Per a la lligació s'ha emprat el *Rapid DNA Ligation kit* de R_{OCHE}, el protocol del qual a grans trets detalla a continuació:

1. Preparar en un tub:
 - 10 µl de DNA (vector més insert) †

en *DNA dilution buffer** 1x
10 µl *T4 DNA ligation buffer** 2x
1 µl *T4 DNA ligase**

* Subministrat amb el *kit*.

† S'ha d'optimitzar la relació insert (I) / vector (V); normalment s'ha utilitzat una relació molar I:V de 3:1. Generalment s'ha utilitzat uns 100 ng de vector i la quantitat final d'insert s'ha calculat amb la fórmula descrita en l'apartat *Lligació de l'insert amb el vector* del protocol 3.1.1.

2. Incubar la reacció 5 min a temperatura ambient.
3. Aturar la reacció a -20°C o procedir amb la transformació.

3.2 TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS

Els bacteris competents són aquells capaços d'incorporar DNA exogen mitjançant la seva transformació. Hi ha soques comercials que ofereixen aquesta capacitat, com els bacteris àmpliament utilitzats en aquest treball One-Shot® TOP10 d'*E. coli*, d'INVITROGEN, fets competents químicament i amb una eficiència de transformació de 10^7 - 10^8 cfu/µg. Però la competència també es pot induir al laboratori mitjançant tractament dels bacteris previ a la transformació per tal d'induir l'estat transitori que permet l'adquisició de DNA.

3.2.1 Preparació de bacteris competents per transformar per xoc tèrmic

El tractament de les soques d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS amb sals com el MgCl₂ i el CaCl₂ permet que esdevinguin competents per xoc tèrmic. El protocol següent ha estat el següent:

Reactius

- Plaques de LB-agar (vegeu l'Annex)
- MgCl₂ 100 mM
- CaCl₂ 100 mM
- CaCl₂ 85 mM – glicerol 15%

Procediment

1. Sembrar bacteris de la soca d'*E. coli* escollida en una placa de LB sense antibiòtic i créixer *o/n* a 37°C.
2. Inocular un cultiu líquid de 3 ml de LB amb una colònia aïllada i créixer *o/n* a 37°C i en agitació (225 rpm).
3. Inocular 250 ml de LB amb els 3 ml del cultiu crescut *o/n*, en erlenmeyer d'1 L. Incubar a 37°C en agitació (225 rpm) fins que el cultiu assoleixi la fase exponencial (A_{595} 0,7-0,8).

4. Centrifugar el cultiu a 4000 rpm, durant 5 min i a 4°C, descartar el sobrenedant.
5. Ressuspendre el *pellet* de bacteris amb 50 ml de MgCl₂ 100 mM temperat a 4°C.
6. Incubar els bacteris en gel durant 30 min.
7. Centrifugar a 4000 rpm, durant 5 min i a 4°C, descartar el sobrenedant.
8. Resuspendre el *pellet* de bacteris amb 50 ml de CaCl₂ 100 mM temperat a 4°C.
9. Incubar els bacteris en gel de 30 a 90 min.
10. Centrifugar a 4000 rpm, durant 5 min i a 4°C, descartar el sobrenedant.
11. Resuspendre el *pellet* amb 20 ml de CaCl₂ 85 mM – 15% glicerol.
12. Repartir els bacteris ressuspesos en alíquotes de 100 o 200 µl i congelar-les ràpidament en un bany d'acetona/neu carbònica.
13. Conservar els bacteris competents a -80°C.

3.2.2 Transformació per xoc tèrmic

El xoc tèrmic ha estat l'estratègia escollida per a la transformació tant de bacteris competents generats al laboratori com dels de la soca comercial *One-Shot*[®] *TOP10*, tot i que el protocol seguit ha variat lleugerament en un cas o en l'altre.

Soca BL21(DE31)pLys

1. Descongelar en gel una alíquota de bacteris competents.
2. Diluir 1 µl de plasmidi en 19 µl de H₂O *milli-Q* i afegir-lo als bacteris competents.
3. Incubar en gel durant 20 min.
4. Realitzar el xoc tèrmic a 42°C durant 2 min 30 seg.
5. Sembrar tot el volum de la transformació en una placa amb medi selectiu per identificar els bacteris transformants.
6. Incubar la placa *o/n* a 37°C.

Soca *One-Shot*[®] *TOP10*

1. Descongelar en gel una alíquota de bacteris *One-Shot*[®] *TOP10*.
2. Afegir a la suspensió de bacteris 2 µl d'una lligació de producte de PCR (vegeu l'apartat 3.1.1) o bé de 2-5 µl d'una lligació estàndard (vegeu l'apartat 3.1.2) i barrejar suaument.
3. Incubar un mínim de 30 min en gel.
4. Realitzar el xoc tèrmic mitjançant 30 seg d'incubació a 42°C.

5. Transferir immediatament la barreja al gel.
6. Afegir 250 μ l de medi SOC prèviament temperat a 37°C.
7. Incubar a 37°C amb agitació (200-225 rpm) 1 h.
8. Sembrar 100-150 μ l en una placa amb medi selectiu adient per identificar els bacteris transformants.
9. Incubar la placa *o/n* a 37°C.

4. CULTIUS CEL·LULARS I TRANSFECCIONS

4.1 CULTIUS CEL·LULARS

4.1.1 Línies i medis de cultiu

Les línies cel·lulars* emprades en aquest treball són d'origen renal i han estat: PCT3 i COS-7. Totes les línies cel·lulars han estat mantingudes i expandides a 37°C en un incubador amb atmosfera humida (al 5% en CO₂), seguint els procediments i les pràctiques estàndard requerides pel treball amb cultius en condicions estèrils (Davis, 2002)

* vegeu l'apartat 1.1 de M_ATERIALS

4.1.2 Tripsinització

Totes les línies amb les que s'ha treballat creixen de manera adherent sobre un suport sòlid. La tripsinització s'ha realitzat quan el cultiu ha assolit entre un 80 i un 90% de confluència.

Reactius

- PBS 1x estèril (vegeu l'ANNEX)
- Tripsina-EDTA al 0.05% [BIOLOGICAL INDUSTRIES]
- Medi de cultiu (vegeu apartat 1.2 de M_ATERIALS]

Procediment

1. Temperar la tripsina, el PBS i el medi de cultiu a 37°C.
2. Rentar la monocapa de cèl·lules amb PBS 1x.
3. Retirar el PBS 1x i afegir la tripsina a les cèl·lules, aproximadament, tenint en compte la relació volum/àrea: 3 ml /T-25 (25 cm² d'àrea).
4. Incubar 5 min a 37°C dins l'incubador de cultius.

5. Neutralitzar la tripsina amb un volum de medi de cultiu i traspasar les cèl.lules desenganxades a un tub de 15 ml.
6. Centrifugar les cèl.lules a 1000 rpm 5 min.
7. Descartar el sobrenedant i ressuspendre el *pellet* amb 1-2 ml de medi.
8. Sembrar la quantitat de cèl.lules desitjada en una nova placa i incubar a 37°C en una atmosfera al 5% CO₂.

4.1.3 Recompte de cèl.lules

En els casos que cal sembrar una quantitat concreta de cèl.lules hem de determinar-ne prèviament la concentració. El protocol de comptatge és el següent:

Reactius

- Blau de tripà [SIGMA]
- Càmera de comptatge de Neubauer

Procediment

1. Agafar una alíquota de la suspensió cel·lular i preparar una dilució 1:10 en blau de tripà.
2. Omplir la càmera de Neubauer amb la dilució preparada, comptar el número de cèl.lules viables - no tenyides- en els diferents camps i realitzar el càlcul següent:

$$\text{núm. cèl.lules/ ml} = \text{núm. cèl.lules promig dels 4 camps} \times 10 \times 10^4$$

4.1.4 Conservació de cèl.lules

Les cèl.lules eucariotes es poden conservar congelades en un medi que inclogui un criopreservadors i en nitrogen líquid. El protocol de congelació ha estat el següent

Reactius

- DMSO [SIGMA]
- Criotubs

Procediment

1. Tripsinitzar el cultiu cel·lular que ha arribat a confluència i ressuspendre'l en 1 ml de medi, comptar el número de cèl·lules.
2. Afegir en un criotub 100 µl de DMSO i refredar en gel fins que aquest solidifiqui.
3. Afegir 900 µl de la suspensió cel·lular (0,5-1x10⁶ cèl·lules totals) al criotub que conté el DMSO.
4. Barrejar fins que el DMSO s'hagi líquat, col·locar el criotub en un contenidor especial de congelació (Mr.Frosty)[N_{ALGENE}] i deixar-ho *o/n* a -80°C per permetre una congelació gradual de les cèl·lules.
5. Transferir el criotub en un tanc de N₂ líquid

4.1.5 Descongelació de cèl·lules

La descongelació de cèl·lules ha de ser un procés ràpid que eviti la pèrdua de la viabilitat de les cèl·lules que són descongelades.

Procediment

1. Treure les cèl·lules congelades del N₂ líquid i descongelar-les en un bany a 37°C fins que només quedi una petita porció central congelada.
2. Afegir al vial 1 ml de medi de cultiu fred (a 4°C) i barrejar bé.
3. Transferir-ho tot a un tub amb 8 ml de medi fred (a 4°C).
4. Centrifugar 5 min a 4°C a 1000 rpm
5. Descartar el sobrenedant i ressuspendre el *pellet* en 1 ml de medi.
6. Sembrar la totalitat de la suspensió cel·lular en una nova placa de cultiu.

4.1.6 Depleció d'esteroides del sèrum fetal

El sèrum boví fetal que s'utilitza per preparar els medis de cultiu, conté en quantitats no determinades i variables entre els diferents lots de producció hormones esteroïdals tals com andrògens, estrògens i glucocorticoides. Per realitzar els estudis d'inducció amb andrògens i glucocorticoides, cal eliminar-los prèviament per tal de poder controlar la quantitat d'hormones assajada realment. Donada l'elevada hidrofobicitat de les hormones esteroïdals, el sèrum fetal pot ser deplecionat d'aquestes per la seva adsorbcio en partícules de carbó actiu.

Així, per preparar sèrum fetal boví deplecionat d'hormones esteroïdals, es segueix el següent protocol:

Reactius

- Sèrum fetal inactivat tèrmicament
- H₂O·DEPC
- Carbó actiu (*Carchoal* [SIGMA])

Procediment

1. Afegir 50 mg de *Carchoal* per cada ml de sèrum a tractar
2. Incubar amb agitació orbital durant 30 min a temperatura ambient
3. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm per fer sedimentar el carbó actiu
4. Esterilitzar el sèrum deplecionat resultant mitjançant filtració amb filtre de 0,22 mm [MILLIPORE]
5. Conservar a -20°C

4.2 TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA

La transfecció consisteix en la introducció de DNA plasmídic dins de cèl·lules eucariotes. Existeixen diferents mètodes físico-químics per fer-ho entre els quals hi ha l'electroporació, la precipitació amb fosfat càlcic o la vehiculització del DNA en vesícules lipídiques.

La transfecció transitòria, concretament, es caracteritza perquè el temps en què el DNA exogen es manté en les cèl·lules és curt, entre 3 i 4 dies aproximadament.

Per a transfectar transitòriament les nostres línies cel·lulars s'ha utilitzat un mètode basat en liposomes, concretament el producte LIPOFECTAMINE™ PLUS de la casa comercial INVITROGEN. Es tracta d'una barreja liposòmica (3:1) del lípid policatiònic 2,3-dioleiloxi-N-[2(sperminecarboxamido)etil]-N,N'-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetat (DOSPA) i el lípid neutre dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El reactiu PLUS s'acomplexa amb el DNA afavorint el seu empaquetament amb els liposomes i produint així l'augment del rendiment de la transfecció.

El percentatge de cèl·lules que incorporen el material genètic extern en la transfecció transitòria és habitualment reduït, tot i que això depèn de la línia cel·lular utilitzada. En la línia PCT3 el percentatge de transfecció, després de l'optimització de les condicions de treball, està al voltant d'un 30%.

Reactius

- Reactiu L_{IPOFECTAMINE}[™] [I_{NVITROGEN}]
- Reactiu P_{LUS} [I_{NVITROGEN}]
- Medi OPTI-MEM [G_{IBCO}]
- PBS 1x (Vegeu A_{NNEX})

Procediment

1. El dia previ a la transfecció, sembrar el número adequat de cèl·lules per assolir aproximadament un 60% de confluència en el moment de la transfecció (T_{AULA 9}).
2. Preparar la solució A diluint el DNA en el volum adequat de medi OPTI-MEM i afegir-hi la quantitat corresponent de reactiu P_{LUS}. Incubar 15 min a temperatura ambient.
3. Preparar la solució B diluint el reactiu L_{IPOFECTAMINE} en OPTI-MEM.
4. Combinar la barreja de DNA-P_{LUS} amb el reactiu L_{IPOFECTAMINE} preparat en el pas anterior. Incubar 15 min a temperatura ambient.
- 5.
6. Rentar les cèl·lules amb PBS 1x temperat a 37°C.
7. Afegir a la barreja final de transfecció el volum necessari d'OPTI-MEM per arribar al volum final de transfecció (T_{AULA 9}), i distribuir-ho bé per tota la placa.
8. Incubar les cèl·lules amb els complexos DNA/lípids durant 3 h a l'incubador de cultius (37°C i 5% CO₂).
9. Rentar les cèl·lules amb PBS 1x.
10. Mantenir les cèl·lules amb medi complet a 37°C i 5% de CO₂.
11. Assajar l'expressió del DNA exogen, normalment a les 16-48 h post-transfecció.

T_{AULA 9}. Quantitats i volums de transfecció

Mida Placa	Nombre Cèl·lules	DNA (µg)	P _{LUS} (µl)	L _{IPOFECTAMINE} [™] (µl)	Volum Solució A/B (µl)	Volum Final Transfecció(ml)
24 pous	60000	0.4	4	1	25	0,250
6 pous	250000	2	6	4	100	1
60 mm	650000	5	8	12	250	2,5
100 mm	1,5x10 ⁶	12	20	30	750	6

4.3 TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DE CONSTRUCCIONS REPORTERES

Per a l'estudi del promotor del gen de la KAP *in vitro*, s'han utilitzat construccions d'aquest promotor fusionat a un gen reporter – luciferasa (Luc) en el nostre cas. Les cèl·lules són transfectades transitòriament i s'assaja l'activitat del gen reporter en els extractes cel·lulars 48 h després. Com a control intern per normalitzar les diferents

eficiències de transfecció, s'ha utilitzat un plasmidi codificant per l'enzim fosfatasa alcalina secretada (SEAP). Aquest ha estat introduït en el còctel de transfecció en una ratio molar vector-Luc/SEAP de 1:25 i la seva activitat s'ha mesurat al medi de cultiu dels pous transfectats a les 48 hores post-transfecció simultàniament a la luciferasa.

S'han utilitzat plaques de 24 pous, transfectades de la manera descrita en l'apartat previ. Per a cada construcció i situació experimental s'han transfectat idènticament 3 o 6 pous de manera que s'han realitzat 3 o 6 rèpliques.

L'esquema general de l'assaig és:

DIA 0 Sembrar 60.000 cèl·lules/pou (placa de 24)

DIA 1 Transfectar les següents quantitats

0,3 µg totals de DNA/pou	
0,288 µg constructe- <i>Luc</i>	0,012 µg plasmidi SEAP-basíc

DIA 2 Canvi dels medis de cultiu (afegir 0,5 ml / pou)

DIA 3 Recollida de medis per mesurar l'activitat SEAP i recollida dels homogenats cel·lulars per assajar-hi l'activitat Luc

Quan s'ha estudiat el possible paper regulador de certs membres de la família dels Receptors Nuclears, ha calgut realitzar tractaments hormonals durant el desenvolupament de l'assaig luciferasa. En aquests casos s'ha seguit el següent disseny experimental:

DIA 0 Sembrar 60.000 cèl·lules/pou (placa de 24) en medi deplecionat d'hormones (vegeu apartat)

DIA 1 Transfectar les barreges següents:

Situació Factor de Transcripció -		
0,045 µg totals de DNA/pou		
0,288 µg constructe- <i>Luc</i>	0,012 µg plasmidi SEAP-basíc	0,10 µg plasmidi <i>pBluescriptII</i>

Situació Factor de Transcripció +		
0,045 µg totals de DNA/pou		
0,288 µg constructe- <i>Luc</i>	0,012 µg SEAP- basic	0,10 µg de cada plasmidi d'expressió del Factor(s) de Transcripció estudiat(s)

Incubar 3 hores a 37°C i 5% de CO₂ (incubador de cultius) Retirar medi de transfecció i afegir medi complet deplecionat d'hormones suplementat amb 1 µM DHT i/o 100 nM dexametasona segons correspongui

- DIA 2 Canviar el medi de cultiu (mantenint les mateixes condicions hormonals necessàries)
- DIA 3 Recollida dels medis per a la mesura de l'activitat SEAP i recollida i lisi de les cèl·lules per a determinar-ne l'activitat luciferasa

4.4 ASSAIG DE GENS REPORTERS

4.4.1 Assaig d'activitat luciferasa

Per mesurar l'activitat luciferasa en homogenats cel·lulars, s'ha utilitzat el kit de PROMEGA, basat en la utilització del substrat quimioluminiscent luciferina, el qual en presència d'ATP i altres cofactors és hidrolitzat per l'enzim amb la consegüent emissió de llum. La llum emesa és llegida en un luminòmetre de plaques i quantificada.

Aquest assaig és molt sensible i té un rang de linealitat molt ampli, que cobreix fins a quatre ordres de magnitud.

Reactius

- CCLR 5x *buffer**
- Substrat quimioluminiscent luciferina LAR (Luciferase Assay Reagent)*

* Aquests reactius són subministrats amb el kit

Procediment

Habitualment es lisen les cèl·lules 48 h després d'haver-les transfectat transitòriament, i cal realitzar un canvi de medi entremig a les 24 h. IMPORTANT: primer de tot recollir els medis de cultiu dels pous per fer l'assaig SEAP!

Preparació dels Lisats :

1. Aspirar els medis de cultiu de cada pou.
2. Rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS 1x fred, aspirar bé.
3. Afegir el tampó de lisi CCLR 1x (175 ml per pou de placa de 24)
4. Posar les plaques a l'agitador durant 10-30 min
5. Recollir la totalitat del lisat amb una punta groga tallada (és viscos), passar a un tub *ependorf*.
6. Vortexar 15 seg els lisats cel·lulars.
7. Centrifugar 30 seg a màxima velocitat
8. Transferir el sobrenedant a un nou tub *ependorf* o alternativament col·locar-los ja 10 µl en una placa de 96 pous.
9. Guardar els tubs/plaques congelats a -80°C

Assaig LUC quimioluminiscent adaptat a placa de 96 pous

1. Descongelar els lisats cel·lulars i deixar-los temperar.
2. Disposar 10 µL de cada lisat en una placa blanca opaca de luminòmetre de 96 pouets [N_{UNC}]
3. Carregar la placa al luminòmetre
4. Executar el programa adient

Paràmetres del programa Luciferasa:

gain: LOW

injecció de 50 µL de substrat per pou,

delay : 2 sec

integració del senyal:15,0 s

4.4.2 Assaig d'activitat SEAP

L'assaig de l'activitat fosfatasa alcalina secretada (SEAP) es realitza en els sobrenedants dels medis de cultiu, recuperats de les cèl·lules cotransfectades amb el vector pSEAP2-basic, que s'utilitzarà per normalitzar les diferents eficiències de transfecció entre pous. L'assaig es basa en

una reacció enzimàtica catalitzada per la fosfatasa alcalina, en la qual s'hidrolitza un substrat quimioluminiscent (el CSPD™) amb l'emissió corresponent de llum, que serà registrada pel luminòmetre. S'ha utilitzat el kit Great EscAPe™ SEAP Reporter system 3 [CLONTECH]

Reactius:

- *Assay buffer**
- *Dilution buffer**
- Substrat quimioluminiscent CSPD*
- *Chemiluminiscent Enhancer**

* Aquests reactius són subministrats amb el kit

Procediment

Habitualment es recullen els medis de cultiu 48 h després d'haver transfectat transitòriament les cèl·lules, amb un canvi de medi entremig a les 24 h.

1. Retirar 175 ml de medi de cada pou, alternativament traslladar-ho a una placa de 96 pouets)
passar a tub *ependorf*
2. Centrifugar 15 sec a màxima velocitat (13.000 rpm)
3. Transferir el sobrenedant (~100 ml) i passar-lo a un tub nou / o
4. Guardar congelat a -80°C

Assaig SEAP quimioluminiscent adaptat a plaqueta de 96 pous

1. Descongelar els medis de les transfeccions i deixar temperar a RT
2. En una placa de PCR de 96 pous afegir (per pouet): 10 ml medi + 30 ml 1x *dilution buffer*
3. Incubar 30' a 65°C
4. Refredar les mostres breument en gel, deixant-les reequilibrar tot seguit a RT
5. Afegir a cada pou 40 ml de *assay buffer*, remenar
6. Incubar 5 min
7. Mentrestant, preparar el substrat: diluir 1/20 el substrat CSPD amb *Chemiluminiscent enhancer* (mantenir protegit de la llum)
8. Traspasar el contingut de cada pouet a la placa blanca de 96 pous per llegir-la al luminòmetre
9. Afegir 40 ml de substrat diluït a cada pouet, barrejar lleugerament. Tapar la placa amb paper d'alumini per mantenir-la a les fosques
10. Incubar 10 min a T^a ambient
11. Llegir la llum emesa al luminòmetre mitjançant el programa adient:
Paràmetres del programa:
Gain: LOW
Integració del senyal: 15 sec

5. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES

5.1 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES TOTALS

Per tal de determinar caracteritzar la idiosincràsia i particularitat del teixit renal de ratolí i concretament de les cèl·lules del túbul proximal ha estat necessària l'obtenció d'extractes proteics. Per a determinar les entitats proteiques que prenen part en la regulació del gen de la KAP hem realitzat extractes nuclears que inclouen les proteïnes selectivament localitzades al nucli cel·lular com extractes totals que inclouen, a més, les proteïnes citoplasmàtiques.

5.1.1 Extracció de proteïnes totals a partir de cultiu cel·lular

Reactius

- Tampó de lisi RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS]
- Inhibidors de proteases: leupeptina 5 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml i PMSF 200 mM.
- Inhibidors de fosfatases: ortovanadat de sodi 250 mM i fluorur de sodi 1M
- PBS 1x (vegeu l'A_{NNEX})

Procediment

1. Suplementar el tampó de lisi amb els inhibidors de proteases i fosfatases en el moment d'utilitzar-lo en les següents concentracions:
 - leupeptina 1 µg/ml
 - aprotinina 5 µg/ml
 - PMSF 2 mM
 - Na₃OV₄ 1 mM
 - NaF 10 mM
2. Descartar el medi de cultiu i rentar les cèl·lules tres vegades amb PBS 1x fred.
3. Afegir el volum adequat de tampó de lisi fred a la placa (500 µl / placa de 6 cm de diàmetre) i rascar les cèl·lules, sobre gel, per desprendre-les de la placa.
4. Transferir les cèl·lules parcialment lisades a un *eppendorf* i passar-les per una xeringa de 21G x 20 en gel 5 vegades.
5. Mantenir el lisat en gel durant 30 min per permetre una lisi completa.
6. Centrifugar durant 30 min a 4°C i 15000 rpm. El sobrenedant es considera el lisat total en condicions natives.
7. Aliquotar el lisat i guardar-lo a -80°C.

5.1.2 Extracció de proteïnes totals a partir de teixit

Per a l'obtenció d'extractes proteics totals a partir de teixit hem aplicat el mateix mètode basat en el tampó d'extracció RIPA i hem partit de teixit acabat d'extreure o bé conservat a -80° C fins a la seva utilització. El teixit més emprat en aquest treball ha estat el ronyó de ratolí, el qual ha de ser descapsulat abans de congelar i/o utilitzar i per a fer-ne extractes totals hem partit d'uns 100 mg, pes que equival aproximadament a la totalitat d'un ronyó de ratolí adult.

Reactius

- Tampó de lisi RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS]
- Inhibidors de proteases i fosfatases (vegeu apartat 5.1.1)

Procediment

1. Afegir els inhibidors de proteases i fosfatases tal i com es descriu a l'apartat 5.1.1
2. Homogeneïtzar el teixit a 4°C amb 500 µl de tampó de lisi per cada 200 mg de teixit en un homogeneïtzador d'èmbol.
3. Transferir el lisat a un *ependorf* i passar-lo per una xeringa de 21Gx20 en gel 10 vegades.
4. Incubar el lisat 30 min en gel.
5. Centrifugar a 15000 rpm durant 30 min a 4°C i recuperar el sobrenedant, que serà considerat el lisat total en condicions natives.
6. Aliquotar el lisat i guardar-lo a -80°C.

5.2 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES NUCLEARS

Donada la minsa representació dels factors de transcripció en el conjunt del proteoma cel·lular, per a poder detectar-ne la presència mitjançant assajos de retard en gel o columnes d'afinitat és necessari aconseguir extractes del contingut proteic nuclear exclusivament. A tal efecte, cal realitzar una purificació prèvia dels nuclis de les cèl·lules del cultiu o teixit, a partir dels quals mitjançant la seva lisi obtindrem les proteïnes que selectivament embolcallen.

5.2.1 Extracció de proteïnes nuclears a partir de cultiu cel·lular

Procediment basat en el protocol descrit per Dignam *et al.* (1986) amb algunes modificacions a fi i efecte de concentrar al màxim les proteïnes purificades i minimitzar-ne la pèrdua i degradació.

Reactius

- Tampó A [Hepes pH 7.9 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1mM]
- Tampó C [Hepes pH 7.9 20 mM, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, glicerol 25%, DTT 1mM]
- Inhibidors de proteases: leupeptina 5 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml i PMSF 200 mM
- Cultiu cel·lular: 10 plaques de 10 cm de diàmetre amb un ~ 80 % de confluència cel·lular

Procediment

1. Afegir els inhibidors de proteases just abans d'emprar els tampons A i C en les següents concentracions:
 - Aprotinina
 - Leupeptina
 - PMSF 100 mM
2. Rentar les plaques amb PBS 1x
3. Rascar les cèl·lules en 1 ml PBS/placa
4. Passar el raspat a tub de 15 ml i centrifugar 5 min 1000 rpm 4°C
5. Ressuspendre el pellet en 4x PCV (*Volum Empaquetament Cel·lular*, o sia volum del pellet) de tampó A, agitant suaument amb una vareta de vidre
6. Deixar 10 min en gel
7. Centrifugar 10 min 2500 rpm 4°C (Centrifuga Sorvall® 6000D)
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 2x PCV de tampó A agitant suaument
9. Lisar les cèl·lules amb homogeneïtzador tipus *Dounce* de pistó ample (en gel) mitjançant 10 passades de pistó
10. Comprovar la lisi cel·lular: dilució 10 µL PBS, 10µL Tripán Blue (Sigma), 3-4 µL homogenat cel·lular. Cal un mínim de 90 % de nuclis tenyits (lisats)
11. Centrifugar l'homogenat 10 min 2500 rpm 4°C. Descartar sobrenedant i repetir centrifugació
12. Resuspendre el *pellet* (nuclis) amb 3xPCV tampó C
13. Lisar nuclis amb homogeneïtzador tipus *Dounce* de pistó estret (en gel) mitjançant 10 passades de pistó
14. Mantenir l'homogenat en agitació orbital 4°C 1h

15. Centrifugar 30 min 15000 rpm 4°C (Ultracentrífuga Sorvall® RC5C)
16. Recuperar el sobrenedant (Extracte nuclear) i congelar-lo immediatament en N₂ líquid

5.2.2 Extracció de proteïnes nuclears a partir de teixit

Procediment basat en el protocol descrit per Gorski *et al.* (1986) amb les modificacions de Landshulz *et al.* (1988) i posat apunt en el nostre cas per tal de concentrar al màxim les proteïnes purificades i minimitzar-ne la pèrdua i degradació. Consisteix en l'obtenció de preparacions enriquides en nuclis mitjançant centrifugacions en gradients de sacarosa seguida de la posterior lisi d'aquests per precipitar les proteïnes nuclears de forma selectiva.

Concretament, hem aplicat aquesta tècnica per a l'obtenció de proteïnes nuclears procedents de ronyó de ratolí i hem hagut de partir de 3-4 g de teixit (20-30 ronyons de ratolí) per tal d'aconseguir extractes mitjanament concentrats que assegurin la representació de totes les espècies proteiques nuclears .

Reactius

- Tampó d'homogenització (TH) [Hepes pH 7.6 10 mM, KCl 25 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 2 M, glicerol 10%, espermina 0.1 mM, espermidina 0.5 mM]
- Tampó de lisi (TL) [Hepes pH 7.6 10 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, glicerol 10%]
- Tampó de diàlisi (TD) [Hepes pH 7.6 25 mM, KCl 40 mM, glicerol 10%, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM]
- Inhibidors de Proteases: benzamidina 1 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml, leupeptina 5 mg/ml, pepstatina 1 mg/ml, PMSF 200 mM
- Sulfat amònic 3,29 M (a saturació a 4°C)
- 22-25 ronyons de ratolí (~ 3.5 g) extrets, descapsulats i congelats immediatament en N₂ líquid

Procediment Cal realitzar-lo tot a 4°C

Homogeneïtzació de teixits

1. Afegir els inhibidors de proteases just abans d'emprar els tampons TH, TL i TD en les següents concentracions:

Benzamidina 2.5 mM
Aprotinina 10 µg/ml

Leupeptina 1 µg/ml
Pepstatina A 1 µg/ml
PMSF 0,5 mM

2. Polvoritzar els ronyons congelats amb morter en neu carbònica evitant que la mostra es descongeli durant el procés.

3. Col·locar el teixit polvoritzat en un homogeneïtzador tipus *Dounce* amb 12 ml de TH i homogeneïtzar 8-10 cops.
4. Passar l'homogenat a una proveta de vidre i rentar el *Dounce* amb un màxim de 15 ml de TH.
5. Repartir l'homogenat en 6 tubs de rotor basculant tipus *BECKMAN* (5 ml) als quals prèviament hem dipositat un coixí de 3 ml de TH.
6. Centrifugar els tubs en un rotor basculant (*BECKMAN* SW55Ti) 30 min 26000 rpm 2°C
7. Retirar la capa superficial de restes de teixit i abocar el sobrenedant.
8. Ressuspendre el precipitat de cada tub amb 1 ml de mescla TH:glicerol 9:1 suaument per no trencar els nuclis obtinguts.
9. Fer dos rentats, amb 800 µl cadascun, de cada tub i passar precipitat i rentats a 6 nous tubs on prèviament haurem dipositat 2 ml de TH:glicerol.
10. Centrifugar 30 min 26000 rpm 2°C.

Lisi nuclear

11. Decantar el sobrenedant i ressuspendre el precipitat amb 1'5 ml de **TL** a cada tub.
12. Repartir els precipitats en 2 nous tubs (posar a cadascun els precipitats de 3 tubs, o sia 4.5 ml) i precipitar les proteïnes afegint 1/10 part del volum (0.5 ml) de sulfat amònic 3.29 M gota a gota i agitant el tub per evitar que precipitin les proteïnes de la fase superior per excessiva concentració de sulfat amònic.
13. Mantenir tubs 30 min en agitador horitzontal
14. Centrifugar 60 min 35000 rpm 0°C
15. Passar el sobrenedant a un altre tub mesurant-ne el volum amb cura de no arrossegar el precipitat que conté ADN i proteïnes associades.
16. Afegir sulfat amònic en pols a raó de 0.3g de sulfat amònic/ml sobrenedant. Agitar per inversió i deixar 20 min a 4°C.
17. Centrifugar 20 min 26000 rpm 2°C.
18. Descartar el sobrenedant i ressuspendre el precipitat en el mínim volum possible, 600 µl de **TD** repartits en tres rentats.
19. Congelar immediatament en N₂ líquid.
20. Conservar a -80°C.

En tots els casos s'ha determinat la concentració de proteïna amb el *kit DC Protein Assay* de B_{IO}-R_{AD} seguint les especificacions del fabricant.

6. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES *IN VITRO*: TRADUCCIÓ *IN VITRO* MITJANÇANT RETICULÒCITS DE CONILL

Aquest mètode d'expressió de proteïnes es basa l'ús d'extractes comercials lisats de reticulòcits de conill que contenen tota la maquinària cel·lular i elements necessaris per a realitzar la transcripció reversa i la traducció simultània dels transcrits generats sistema exogen i artificial com un tub incubat a 30° C.

El procés de síntesi *in vitro* de proteïnes en tres etapes essencials. En primer lloc cal clonar el cDNA de la proteïna d'interès en un vector adient que disposi del promotor viral T3 per tal que dirigeixi la transcripció. A partir d'aquest motlle, la transcriptasa reversa viral present als lisats sintetitzarà els cRNAs corresponents. Finalment tindrà lloc la traducció dels transcrits generats a polipèptids que aniran incorporaran metionina marcada amb sofre-35 afegida al còctel. Això ens permetrà testar l'eficiència de la reacció en resoldre l'extracte en un gel d'acrilamida i exposar-lo a un film on seran visibles les bandes radioactives dels pèptids sintetitzats..

Reactius

- *kit* TnT [P_{ROMEGA}]
- Redivue L-[³⁵S]Metionina (300 mCi/mmol) [A_{MERSHAM}]
- Material per a minigels d'acrilamida

Procediment

1. Compondre la següent reacció:

Quantitat	Component
H ₂ O <i>nuclease free</i> *	fins a 50 µl
plàsmid cDNA d'interès 1µg/µl	1 µl
[³⁵ S]-Metionina #	2 µl
lisat de reticulòcit*	40 µl

En els casos en què la finalitat de l'expressió és l'ús de la proteïna en assajos d'EMSA, s'usa Metionina no marcada, subministrada amb el *kit*

* Subministrats amb el kit

2. Incubar 90 min a 30°C

3. Analitzar els resultats de la traducció en un gel d'acrilamida/SDS-PAGE:

- i) Carregar 5 ml de cada mostra (diluïda 1/5 en tampó de càrrega)
- ii) Córrer el gel, fixar-lo 30 min en tampó de fixació:
 - Metanol al 50% (v/v)
 - Àcid acètic al 10% (v/v)
- iii) Incubar 10 min en sal·licilat sòdic 1M (solució fluorogràfica)
- iv) Incubar el gel 5 min en la següent solució:
 - Metanol al 7% (v/v)
 - Àcid acètic al 7% (v/v)
 - Glicerol al 1% (v/v)
- v) Assecar el gel sobre paper Whatman 3MM 1-2h a 80°C sotmès a buit

4. Exposar el gel assecat en un film de raigs X, KODAK a -70°C . revelar al cap de 6-24 h

7. TÈCNiques IMMUNOLÒGIQUES

7.1 ANÀLISI DE PROTEÏNES PER SDS-PAGE I WESTERN BLOT

7.1.1 Electroforesi en gels de poliacrilamida

L'electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE) és la tècnica analítica emprada per separar proteïnes. L' SDS-PAGE permet separar les proteïnes concretament en funció del seu pes molecular. D'una banda la barreja d'acrilamida/bisacrilamida forma una xarxa complexa en polimeritzar, en gel, a través de la qual han de migrar les proteïnes quan s'hi aplica un camp elèctric; de l'altra la presència de l' SDS, detergent amfipàtic que desnaturalitza les proteïnes i els confereix una densitat de càrrega global negativa, permet per tant separar-les principalment segons el seu pes molecular.

Hem emprat el sistema d'electroforesi *mini-PROTEAN II* de BIO-RAD i hem confeccionat els gels d'entre 10 i 15 % d'acrilamida en funció del pes molecular de les proteïnes a resoldre.

Reactius

- Tampó de càrrega o de *Laemmli 3x**
- Tampó d'electroforesi *
- Tinció blau de *Coomassie* *
- Solució destenyidora al 10% d'àcid acètic

*(vegeu l'ANNEX)

Procediment

1. Preparar els gels de poliacrilamida (*T_AULA4*).
2. Preparar les mostres de proteïna diluint-les en tampó de càrrega 3x, bullir-les 5 min i mantenir-les en gel.
3. Muntar els gels en la cubeta d'electroforesi, cobrir amb el tampó d'electroforesi i carregar les mostres de proteïna als pous.
4. Córrer les mostres a amperatge constant, 20 mA / gel, durant 1 h o fins que surti el front.
5. Tenyir els gels durant 10 min amb la tinció blau de *Coomassie*.
6. Destenyir els gels amb 10% d'àcid acètic fins a observar bandes discretes en el gel.

T_{AULA 10} Volums necessaris per a la preparació de 2 gels d'acrilamida per a SDS-PAGE

Gel Separador			
Components	Percentatge d'acrilamida		
	10%	12%	15%
30% acril/0,8 bis	5 ml	6 ml	7,5 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	3'75 ml	3'75 ml	3'75 ml
H ₂ O	6'25 ml	5'25 ml	3'75 ml
10% PA	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

Gel Concentrador	
Components	Quantitat
30% acril/0,8 bis	0,65 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
10% PA	0,025 ml
TEMED	0,01 ml

7.1.2 Electrotransferència de proteïnes: *Western Blot*

Un cop separades per SDS-PAGE, les proteïnes poden ésser transferides a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) o de niló mitjançant una segona electroforesi realitzada en poc temps i a alt voltatge en direcció a l'eix major del gel. D'aquesta manera les proteïnes queden adherides a la membrana en la mateixa posició i ordre que ocupaven al gel d'acrilamida.

La presència de proteïnes es revela amb anticossos específics de les proteïnes d'interès i amb anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa o fosfatasa alcalina, biotina, etc.

S'ha utilitzat el *Mini Trans Blot-Cell* de la casa comercial B_{IO}-R_{AD}.

Reactius

- Tampó de transferència (A_{NNEX})
- Metanol
- H₂O destil·lada
- Membranes *WESTRAN*[®] PVDF [SCHLEICHER & SCHUELL]

Procediment

1. Després de l'electroforesi, equilibrar els gels en tampó de transferència.
2. Activar la membrana *WESTRAN*[®] PVDF submergint-la en metanol durant 5 s.
3. Rentar-la amb aigua destil·lada 3 cops.
4. Equilibrar la membrana en tampó de transferència.
5. Muntar la transferència seguint les instruccions de l'aparell i transferir a 400 mA durant 90 min.
6. Desmuntar la transferència i procedir a la immunodetecció

Immunodetecció***Reactius***

- Llet en pols desnatada
- BSA
- Tween-20
- PBS 1x (vegeu l'A_{NNEX})
- Anticòs primari i secundari (*T_{AULA 5}*)
- StreptABCComplex/HRP [D_{AKO}]
- ECL Plus [A_{MERSHAM}]

Procediment

1. Bloquejar la membrana 1 hora a temperatura ambient amb 5% de llet desnatada i 0,1% Tween-20 en PBS 1x.
2. Incubar amb l'anticòs primari amb 1% de llet desnatada i 0,1% Tween-20 en PBS 1x durant 1 hora a temperatura ambient.
3. Rentar la membrana amb 0,1% Tween-20 en PBS 1x durant 10 min; repetir fins a un total de 3 vegades.
4. Incubar la membrana amb l'anticòs secundari adient durant 1 hora a temperatura ambient.
5. Rentar la membrana amb 0,1% Tween-20 en PBS 1x durant 10 min; repetir 2 vegades més.
6. Revelar mitjançant el sistema de detecció ECL Plus seguint les instruccions del fabricant.

T_{AULA 11} Anticossos emprats en la immunodetecció per *western blot*

Anticòs	Origen	Proveïdor / Referència	CONDICIONS DE WESTERN	
			Concentració de Treball	Temps d'Incubació
PRIMARI	Anti-Sp1	S _{SANTACRUZ} B _{BIOTECHNOLOGIES} PEP-2	1:500	1 h
	Anti-Sp3	S _{SANTACRUZ} B _{BIOTECHNOLOGIES} D-20	1:500	1 h
	Anti-GR	S _{SANTACRUZ} B _{BIOTECHNOLOGIES} M-20	1:1000	1 h
SECUNDARI	Anti-rabbit	D _{AKO} P0048	1:2000	1 h

8. TÈCNiques D'INTERACCIÓ DNA-PROTEÏNA

8.1 ASSAIG DE RETARD EN GEL (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Mètode emprat per detectar la unió específica de proteïnes a determinades seqüències de DNA. Es basa en l'habilitat dels factors proteics per a retardar (*shift*) la mobilitat de fragments de DNA marcats radioactivament en sotmetre'ls a una electroforesi en gel d'acrilamida no desnaturalitzant. Els complexos DNA-proteïna formats així poden ser observats com a bandes discretes en una autoradiografia.

Quan se sospita de la naturalesa del factor proteic que s'està unint a la seqüència assajada i està provocant el retard de l'oligonucleòtid, s'afegeix a la reacció d'interacció, un cop obtinguts els complexos DNA-proteïna, l'anticòs específic contra el factor sospitat. La unió de l'anticòs a la proteïna acomplexada amb l'oligonucleòtid suposa un augment de pes molecular del complex i provoca un *sobreretard* (*supershift*) d'aquest, fet que es tradueix en una migració de la banda corresponent a l'ensamblatge oligo-proteïna cap a una posició superior en el gel.

La realització d'aquest tipus d'assaig suposa l'execució d'una sèrie de procediments previs tals com el marcatge radioactiu del DNA d'interès, la seva purificació, l'obtenció d'extractes nuclears concentrats i/o l'expressió en reticulòcit de la proteïna d'interès, l'anàlisi de les concentracions òptimes de competidors inespecífics per a la unió de cada proteïna estudiada i finalment explorar les condicions de correguda del gel que assegurin el manteniment del complex d'interacció al llarg del procés de resolució. A grans trets el protocol preliminar seguit en els assajos d'EMSA ha estat el següent:

8.1.1 Marcatge radioactiu dels oligonucleòtids i *annealing*

Reactius

- Oligonucleòtids *Upper* i *Lower* a 10µM representant la seqüència de DNA a estudiar (~20 nt) (vegeu T_{AULA} 6)
- γ [³²P]-ATP 3000 µCi/µl [A_{MERSHAM}]
- *Polynucleotide Kinase* (10 U/µl) [P_{ROMEGA}]
- 10x *Polynucleotide Kinase Buffer* [P_{ROMEGA}]
- ATP 1mM
- Fenol [S_{IGMA}]
- Cloroform [S_{IGMA}]
- NaCl 4 M
- Policrilamida 0,25% soluble
- Etanol 70% a -20°C
- Etanol 100% a -20 °C
- 1x M *SuRE/Cut Buffer* [R_{OCHE}]
- H₂O destil·lada

Procediment

1. Incubar 60 min a 37°C :

<u>Quantitat</u>	<u>Component</u>
H ₂ O	fins a 10 µl
oligonucleòtid Up/Low 10µM	1 µl
γ[³² P]-ATP	2 µl
<i>Polynucleotide Kinase</i>	1 µl
10x <i>Polynucleotide Kinase Buffer</i> [#]	1 µl

subministrat amb la *PN Kinase*

2. Als 45 min d'incubació afegir 1 µl d'ATP 1 mM *fred* (no radioactiu) per mantenir la concentració d'ATP per sobre del llindar òptim de treball de la quinasa.
3. Aturar la reacció de marcatge afegint 40 µl H₂O i 50 µl fenol/cloroform (1:1)
4. Agitar vigorosament (*vòrtex*) i centrifugar 10 min 13000 rpm

5. Mentrestant disposar en un tub per a cada oligonucleòtid marcat
oligo complementari
Low/Up 10µM 1.3 µl
poliacrilamida soluble 0,25 % 5 µl
NaCl 4 M 6 µl
etanol 100% 180 µl
6. *Vortexar*, incubar 10 min a -20°C i centrifugar 10 min 13000 rpm microfuga
7. Rentar el precipitat amb 200 µl d'etanol 70%
8. Ressuspendre en 30 µl 1x M *SuRE/Cut Buffer* (Roche) (200 ng/30 µl)
9. **Annealing**: incubar 3 min a 100° en un bany d'aigua en agitació, apagar el calefactor i deixar baixar la temperatura fins a assolir la temperatura ambient (normalment *o/n*)

8.1.2 Purificació de les sondes radioactives

Mitjançant un gel preparatiu d'acrilamida separem els oligonucleòtids marcats dels que no han incorporat el fòsfor radioactiu i dels oligonucleòtids productes inacabats de síntesi.

Reactius

- Oligonucleòtids marcats (sondes)
- TBE 10 x (Vegeu A_{NNEX})
- Colorant Orange G (Vegeu A_{NNEX})
- TE 1x (Vegeu A_{NNEX})
- NaCl 4 M
- Acrilamida soluble 0,25 %
- Etanol 70 % a -20°C
- Etanol 100 % a -20°C
- 2-butanol

Procediment

1. Preparar un gel 8% acrilamida 0.5x TBE d'1 mm de gruix
2. Precórrer el gel 20 min a 150 V RT
3. Carregar les mostres: 30 µl de sonda + 5 µl de colorant Orange G [20mM EDTA, 50% glicerol, Orange G]

4. Còrrer fins que el colorant assoleixi 2/3 parts del gel
5. Exposar el gel (havent tret el vidre petit) 3 min
6. Revelar la pel·lícula d'exposició i posar-la sota el gel de manera que mostri els punts que contenen els oligonucleòtids marcats sintetitzats i marcats correctament
7. Tallar les regions del gel que contenen els oligonucleòtids marcats
8. Posar els fragments de gel en tubs d'1'5 ml amb 1 ml de TE
9. Eluir *o/n* en agitador de ròtula RT
10. Recuperació de les sondes: recuperar l'eluït i passar-lo per filtre 0.22 µm; rentar tub amb 500 µl de TE
11. Concentració de la: afegir als eluïts tot el volum possible de 2-butanol, agitar amb vòrtex i centrifugar 10 min 1000 rpm.
12. Descartar la fase superior i repetir pas 11 fins que la fase inferior tingui un volum d'uns 300 µl
13. Per a la precipitació de la sonda afegir:
 - NaCl 4 M 50 µl
 - acrilamida soluble 0.25% 10µl
 - etanol absolut 1.5 mlagitar amb vòrtex i incubar 10 min -20°C
14. Centrifugar 10 min 1000 rpm microfuga
15. Descartar el sobrenedant i rentar precipitat amb etanol 70%
16. Agitar amb vòrtex i centrifugar 10 min 1000 rpm microfuga
17. Descartar sobrenedant i ressuspèndre el precipitat amb 30 µl TE
18. Mantenir sondes a -20°C

8.1.3 Anàlisi de Retard en Gel (*Shift* i *Supershift*)

Reactius

- Tampó de *Binding* 2x [40 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM KCl, 1% Nonidet® P-40, 20% glicerol, 2mM DTT]
- Poly (dI-dC) (assajos amb caixa -457, Sp1, ARE)
- Poly (dG-dC) (assajos caixa -429)
- Albúmina bovina acetilada [SIGMA]
- Oligonucleòtids representatius de la seqüència a testar marcats amb γ [³²P]-ATP purificats en gel
- Extracte proteic que contingui la proteïna a testar: extracte nuclear cel·lular (línia PCT3)/ extracte nuclear de ronyó de ratolí / extracte Reticulòcit

Procediment

1. Preparar un gel no desnaturalitzant al 5% d'acrilamida 0.5x TBE i realitzar una preelectroforesi d'aquest durant la incubació de 20 min 150 V RT

2. Preparar la mescla de reacció que per cada reacció d'unió conté#:

H ₂ O destil·lada	fins a 20 µl
tampó de <i>binding</i> 2x	10 µl
PolydIdC/ PolydGdC	100 ng
albúmina bovina acetilada	50 ng
oligonucleòtid marcat*	~30 cps

#preparar la mescla per n+1 carrils a assajar

* empíricament, s'agafa el volum de sonda necessari per a obtenir una lectura al comptador Geiger d'uns 30 comptes per segon

3. Aliquotar la mescla de reacció als tubs
4. En els assajos de competència afegir ara els oligonucleòtids *freds* (no marcats radioactivament)‡;

5. Realitzar la incubació amb les proteïnes: afegir volum necessari d'extracte proteic†.

6. Incubar 30 min a 37°C en un bany d'aigua

7. En el cas del *Supershift* passats els 30 min d'incubació DNA-proteïna afegim 1 µg d'anticòs específic contra el factor de transcripció a detectar a cada assaig d'unió i incubem 10 min més a 37°C en un bany d'aigua

8. Carregar les mostres al gel precorreut i realitzar l'electroforesi durant 2h 15 min 150 V RT

9. Assecar el gel en assecador de gels ~2h 80°C i exposar 12-48h

† En els extractes nuclears la quantitat de µg a incubar en cada cas depèn de la qualitat de l'extracte (que és força variable d'un extracte a un altre) i cal assajar-la cada cop que se'n prepara un nou lot. Això es fa mitjançant una titolació de *volum* d'extracte afegit (normalment d'1 µl a 5 µl amb una concentració mitjana d'1.8 mg/ml pels extractes nuclears de cèl·lules PCT3 i 3µg/µL pels extractes nuclears de ronyó de ratolí). En el cas de les proteïnes expressades *in vitro* mitjançant extractes de reticulòcit, un cop comprovada l'eficiència de l'expressió mitjançant l'exposició autoradiogràfica durant 24h de 5 µl d'extracte obtingut amb [³⁵S] metionina, se sol incubar de 5 a 10 µl d'extracte (ajustant els volums de la reacció de *binding*).

‡ Per als assajos de competició els oligonucleòtids *freds* es preparen afegint 1µl d'oligonucleòtid (*up*) 100 µM (~ 1 µg) i 1 µl de l'oligonucleòtid complementari (*low*) 100 µM a 28 µl de 1x M *SuRE/Cut Buffer* (Roche) i sotmetent-los a *annealing* (com al punt 6 del marcatge d'oligos). D'aquesta manera obtenim oligonucleòtids *freds* a una concentració de 2000 ng/30 µl; per a calcular el volum d'oligonucleòtids *freds* a afegir a la reacció d'unió per tal d'assolir l'excés (5x,10x,...,300x) desitjat considerem la concentració final dels oligonucleòtids marcats de 200 ng/30 µl i estimem els ng de DNA marcat de cada reacció en funció del volum requerit per assolir les 30 cps.

8.2 CROMATOGRAFIA D'AFINITAT

Per a aquelles caixes d'interès a les que no es pot identificar la naturalesa del factor de transcripció assenyalat en les prediccions *in silico* (assaig de *supershift* negatiu), s'han de posar apunt tècniques alternatives per a la purificació i posterior identificació del factor que realment s'uneix a la caixa.

Per tant, hem realitzat cromatografies d'afinitat emprant com a fase d'atracció oligonucleòtids representatius de la zona del promotor en qüestió (caixa) units a boles magnètiques, basant-nos en el protocol proposat per Kumar *et al.* (2001). Mitjançant la incubació de la columna d'afinitat així generada amb els extractes proteïcs positius en els assajos de retard en gel, és a dir, que contenen proteïnes capaces d'unir la seqüència de DNA assajada, s'elueixen proteïnes que presumptivament són les responsables del retard detectat als EMSAs..

Reactius

- Fragments de 157/147 pb del promotor de KAP que abarquen de la posició -487 a -330 pb amb l'extrem 5' de la cadena *antisens* modificat per unió covalent d'una molècula de biotina; s'empren dos tipus de fragments:
 - ★ **429wt** seqüència original d'aquesta regió del promotor, conté, per tant, la caixa -429
 - ★ **429mut** seqüència d'aquesta regió del promotor tret dels nucleòtids -429 a -419 pb que han estat delecionats a fi i efecte d'eliminar la caixa -429, sense biotina

S'han obtingut mitjançant la realització de PCR (apartat 2.3.1) a partir de plàsmid pGL3B on està clonat el fragment de -607 pb del promotor del gen de la KAP per a 429wt i de plàsmid pGL3B on està clonat el fragment de -637 pb del promotor del gen de la KAP amb els nucleòtids -429 a -419 delecionats per a 429mut (clonatges i delecio realitzats per M. Soler) amb els *primers*: **429 UP:** CACATGGTCTGGAACCTTCTA **429LOW:** CCCCAAAGATGGTTTTGTGT modificat en extrem 5' per una molècula de biotina en el cas dels fragments 429wt; els productes de PCR han estat purificats de gel d'agarosa (apartat 1.3) i seqüenciats (apartat 2.4). Es provoca l'*annealing* de les dues cadenes dels fragments amplificats (veure apartat 8.1.1) abans de ser units a les boles magnètiques.

- Boles magnètiques recobertes de molècules d'avidina (*Streptavidin Magnetic Particles* [ROCHE])
- Tampó de *Binding* 1x dels assajos de retard en gel (apartat 8.1.3)
- Extracte nuclear cèl·lules PCT3 (la totalitat d'un lot, ~800 µl, apartat 5.2.1)

Procediment:Preparació columna d'afinitat 429wt

1. Siliconitzar 2 tubs d'1.5 mL afegint-los 1 gota de *Sigmacote* [SIGMA] que fem córrer per tota la superfície interior i rentar l'excés amb etanol absolut
2. Afegir 150 µl de solució de boles al tub i incubar-les amb 150 pmols del fragment 429wt, segons indicacions del fabricant per a provocar la unió entre el DNA biotinat i les boles magnètiques

Bloqueig de les columnes

3. Incubar les boles ja unides a l'DNA amb 400 µl de 1x tampó de *binding* 5 mg/ml d'albumina bovina *o/n* a 4°C en agitació orbital

Cromatografia d'afinitat

4. Incubar la columna **429wt** amb el lot d'extracte nuclear de cèl·lules PCT3 al qual prèviament afegim 1 M benzamidina i 1 µg/ml pepstatina A i els competidors inespecífics d'unió ADN-proteïna: 3 µg PolydGdC i 1.5 µg albumina bovina acetilada (quantitats escalades per volum a partir de les emprades en els assajos de retard); incubem 5 h a 4°C en agitació orbital
5. Recollir boles amb imant al fons del tub i descartar el sobrenedant.
6. Fem tres rentats d'1 h en agitació orbital i a 4°C de la columna **429wt** amb 500 µl de tampó de *binding* que incorpora 150 pmol dels fragments **429mut** lliures per eliminar les proteïnes no unides a la caixa en estudi.
7. Eluïm les proteïnes unides al DNA de la columna afegint 100 µl de tampó de càrrega SDS-PAGE (*Laemmli*) i sotmetent a 100°C durant 5 min.
8. Recuperem el sobrenedant i el resollem en electroforesi SDS-12% PAGE.
9. Tinció del gel amb nitrat de plata compatible amb M_{ALDI}-TOF©
10. Anàlisi de proteïnes diferencialment unides respecte l'extracte cru i identificació per espectrometria de masses. Servei de Proteòmica LP-CSIC/UAB dirigit pel Dr. Avian.

ANNEX: COMPOSICIÓ DE TAMPONS I MEDIS

TAMPONS GENERALS			
NOM	COMPOSICIÓ		COMENTARIS
PBS 1x	NaCl KCl Na ₂ PO ₄ KH ₂ PO ₄	137 mM 2,5 mM 10 mM 1,4 mM	Autoclavar
TE 1x	Tris HCl pH 8 EDTA	10 mM 1 mM	Autoclavar
TAE 1x	Tris base Àcid acètic EDTA	40 mM 2 mM 0,2 mM	Ajustar el pH a 8,1 Autoclavar
TBE 1x	Tris base Àcid bòric EDTA	89 mM 89 mM 2 mM	Autoclavar
H ₂ O-DEPC	DEPC	0,1 % (v/v)	Agitar intensament i deixar actuar <i>o/n</i> . Autoclavar per inactivar el DEPC
Solució D	Tiocianat de Guanidini Citrat sòdic, pH 7,0 N-Lauril Sarcosina	4M 25 mM 0,5 % (v/v)	Preparar en H ₂ O-DEPC. Guardar a 4°C; abans d'utilitzar afegir β-Mercaptoetanol fresc (7,2 μl / ml solució D)
TAMPONS PER SDS-PAGE I WESTERN BLOT			
NOM	COMPOSICIÓ		COMENTARIS
TRIS-HCl 4x pH 6,8	Tris- HCl pH 6,8 SDS	0,5 M 0,4 % (w/v)	Filtrar el Tris-HCl amb filtre 0,45 μm abans d'afegir SDS. Conservar a 4°C
TRIS-HCl 4x pH 8,8	Tris- HCl pH 8,8 SDS	1,5 M 0,4 % (w/v)	Filtrar el Tris-HCl amb filtre 0,45 μm abans d'afegir SDS. Conservar a 4°C
TAMPÓ D'ELECTROFORESI 5 X	Tris base Glicina SDS	125 mM 0,96 M 0,5 % (w/v)	Conservar a 4°C
TAMPÓ DE TRANSFERÈNCIA 3 X	Tris base Glicina SDS	172 mM 1,32 M 11,8 mM	Conservar a 4°C

BLAU DE <i>COOMASSIE</i>	Metanol Àcid acètic Blau de <i>Coomassie</i>	40 % (v/v) 7 % (v/v) 0,025 % (w/v)	Conservar a RT
TAMPÓ <i>LAEMMLI</i>	Tris- HCl pH 6,8 Glicerol SDS β -Mercaptoetanol Blau de bromofenol	188 mM 30 % (v/v) 6 % (v/v) 15 % (v/v) 0,02 % (w/v)	Conservar a RT
MEDIS PER A BACTERIS			
NOM	COMPOSICIÓ		COMENTARIS
MEDI LB (1LITRE)	Triptona [D _{IFCO}] Extracte de llevat NaCl	10 g 10 g 5 g	Ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i autoclavar
LB AGAR (1LITRE)	Medi LB pH 7,5 Agar	1 l 15 g	Autoclavar. Deixar refredar fins a ~50 °C i afegir, si cal, l'antibiòtic de selecció. Distribuir en plaques i deixar solidificar. Conservar a 4 °C
AMPICIL·LINA	Ampicil·lina [G _{IBCO}]	50 mg/ml	Diluir l'Amp en H ₂ O <i>milli-Q</i> estèril. Aliquotar i conservar a -20°C
KANAMICINA	Kanamicina [S _{IGMA}]	100 mg/ml	Diluir l'Amp en H ₂ O <i>milli-Q</i> estèril. Aliquotar i conservar a -20°C

RESULTATS

1. Regulació androgènica del gen de la KAP: Solapament entre ARE i TATA

1.1 Anàlisi de la unió d'AR a l'element de resposta a andrògens

L'element de resposta a andrògens situat a -39 bp de l'inici de transcripció del gen de la KAP va ser determinat com a responsable de la resposta androgènica que es produeix als segments S1/S2 del túbul proximal renal mitjançant assajos de transfecció transitòria en cèl·lules PCT3 (Soler *et al.*, 2002). La deleció del primer hexàmer palíndrom que integra aquest ARE suposava la caiguda de l'activitat luciferasa que la transfecció d'AR i el tractament amb DHT engegaven sobre el constructe K224 intacte (Vegeu INTRODUCCIÓ).

Una de les particularitats de l'ARE del promotor del gen de la KAP situat a -39 bp és el solapament que els quatre darrers bp del segon hexàmer del palíndrom de l'element presenten amb la putativa seqüència TATA que comença a -28 pb.

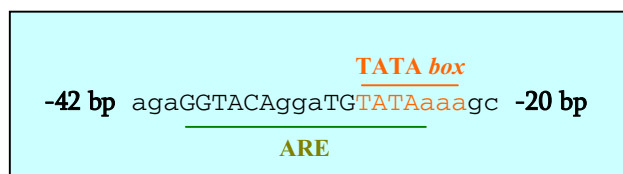


FIGURA 27. Solapament entre l'ARE i la putativa caixa TATA al promotor del gen de la KAP. Representació esquemàtica de la disposició d'aquests dos elements dins el promotor.

La possible incompatibilitat estèrica de la coexistència simultània de dos factors de transcripció tals com l'homodímer del receptor d'andrògens i la *TATA-Binding Protein* (TBP) en una mateixa seqüència diana ens va portar a constatar, en primer lloc, la unió real d'AR al putatiu ARE de KAP.

A tal efecte es van realitzar assajos de retard en gel o EMSA. Es sintetitzaren oligonucleòtids corresponents als 30 nt del promotor del gen de la KAP que s'extenen de -46 bp a -16 bp i que per tant inclouen la seqüència de l'ARE. (vegeu T_{AULA} 5). Com a oligonucleòtid control s'emprà el representatiu de la seqüència C3 (1) Element C del gen C3 que inclou un ARE funcional.

La línia cel·lular PCT presenta una pèrdua de l'expressió d'AR comprovada per assajos de RT-PCRq (resultats no mostrats). De manera que per a l'obtenció d'extractes nuclears proteics rics en AR es van transfectar cèl·lules (vegeu M_{ÈTODES}) de la línia renal de mico verd africà COS-1 amb el vector d'expressió pSG5-hARwt, que codifica per la forma

madura salvatge *wt* de l'AR humà o amb el vector pSG5-hARmut, que codifica per una versió truncada incapaç d'unir el DNA (Thompson *et al.*, 2001). Les cèl·lules transfectades van ser sotmeses a tractament androgènic (testosterona 100 nM) o l'equivalent en etanol com a vehicle durant 48h post-transfecció i seguidament es processaren per a l'extracció proteica nuclear (vegeu MÈTODES). D'altra banda, aprofitant el promotor T7 que presenta el plàsmid pSG5 també es sintetitzà l'AR *wt in vitro* mitjançant reticulòcit de conill (vegeu MÈTODES).

Els extractes nuclears procedents de cada situació assajada es van incubar durant 45 min a RT amb els oligonucleòtids marcats radioactivament amb ^{32}P i el resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0,5x (vegeu MÈTODES).

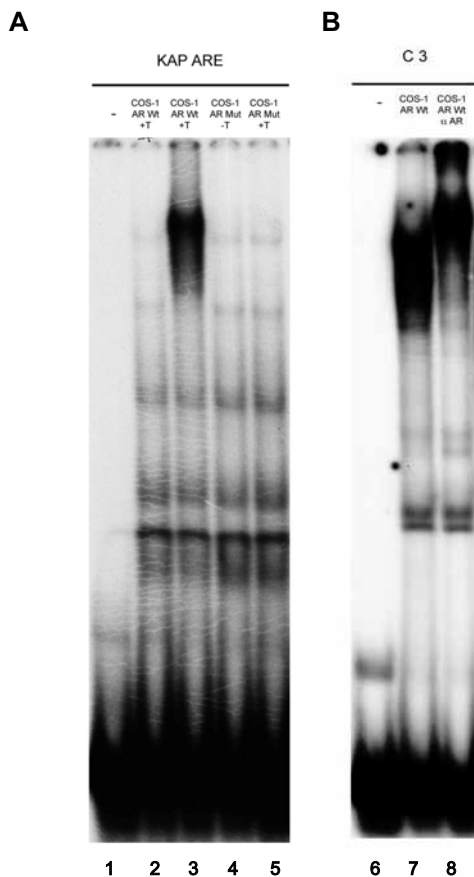


FIGURA 28. Anàlisi per la tècnica d'EMSA de la putativa unió d'AR a l'ARE del promotor del gen de la KAP. **A** L'oligonucleòtid representatiu de l'ARE estudiat marcat amb ^{32}P s'incubà 30 min a RT amb els diferents extractes nuclears de cèl·lules COS transfectades amb el plàsmid d'expressió per AR salvatge *wt* o mutat *Mut*, tractades amb testosterona (+T) o etanol (-T). El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0,5% que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia. **B** Com a control positiu del retard observat a A s'incubà l'extracte COS-1 AR *wt* +T amb l'ARE funcional de l'element C3 i amb un anticòs anti-AR i se'n constatà l'identitat amb l'aparició del *supershift*.

D'aquesta manera es va poder constatar que l'element ARE de -39 pb del promotor del gen de la KAP presentava un retard en la seva migració en presència d'extracte nuclear de cèl·lules COS-1 transfectades amb AR *wt* (FIGURA 28. A. carril 3). Aquest retard no

apareixia quan KAP ARE s'incubava amb l'extracte nuclear de cèl·lules transfectades amb la versió truncada de l'AR, que no presenta el domini d'unió al DNA (carril 5). Tampoc s'obtenia retard amb l'extracte de cèl·lules transfectades amb l'AR *wt* tractades amb etanol en substitució de la testosterona, fet que impedia la dimerització i translocació del receptor hormonal al nucli (carril 2).

Com a control positiu s'incubà també l'oligonucleòtid C3(1) amb l'extracte de COS-1 transfectades amb AR *wt* i tractades amb testosterona i de nou s'obtingué un evident retard (carril 7). Amb la intenció de verificar la identitat del factor proteic responsable del retard, es van afegir a la incubació DNA-extracte anticossos policlonals contra l'AR. Aquesta afegició suposà un desplaçament del *shift* obtingut cap a una posició superior del gel, és a dir *supershift*, fet que assenyalava l'AR com la proteïna unida a l'oligonucleòtid (carril 8.).

1.2 Anàlisi de la funcionalitat de la putativa caixa TATA

La funcionalitat i unió de l'ARE del promotor del gen de la KAP per part d'AR ens feu plantejar la possibilitat que la suposada caixa TATA en conseqüència no fos funcional i en realitat la transcripció del gen s'articulés en d'altres seqüències del promotor *core* deixant KAP com un gen TATA-*less*.

Per tal doncs de comprovar la funcionalitat de la suposada caixa TATA hi induïrem el canvi A<G en la primera A, mutació descrita com a total desestabilitzadora de la seva capacitat transactivadora en suposar la pèrdua de reconeixement per part de la TBP (Quian *et al.*, 2001). Mitjançant mutagènesi dirigida introduïrem aquest canvi al constructe K638 que conté el fragment dels primers 638 bp del promotor del gen de la KAP fusionats al gen reporter luciferasa generant el constructe *K638 TATAm*.

Es van realitzar assajos de transfecció transitòria en cèl·lules PCT3 del constructe control K638, el constructe K638 AREm que presenta la deleció del primer hexàmer de l'ARE i el constructe K638 TATAm juntament amb el plàsmid d'expressió per AR. Les cèl·lules es sotmeteren a tractament androgènic d'1µM DHT o l'equivalent etanol com a vehicle durant 48 hores. Per estandaritzar i normalitzar els valors deguts a les diferències en l'eficiència de transfecció, les cèl·lules es varen cotransfectar amb el vector de l'enzim secretat de la fosfatasa alcalina (SEAP) pSEAP2 i se'n mesurà l'activitat en els sobrenedants dels medis de cultiu. Els assajos de transfecció transitòria es realitzaren en plaques de 24 pous i les activitats luciferasa i SEAP es mesuraren 48 hores posttransfecció. Per a cada situació s'inclogueren 3 rèpliques en almenys 3 experiments diferents.

La gràfica següent mostra es resultats obtinguts.

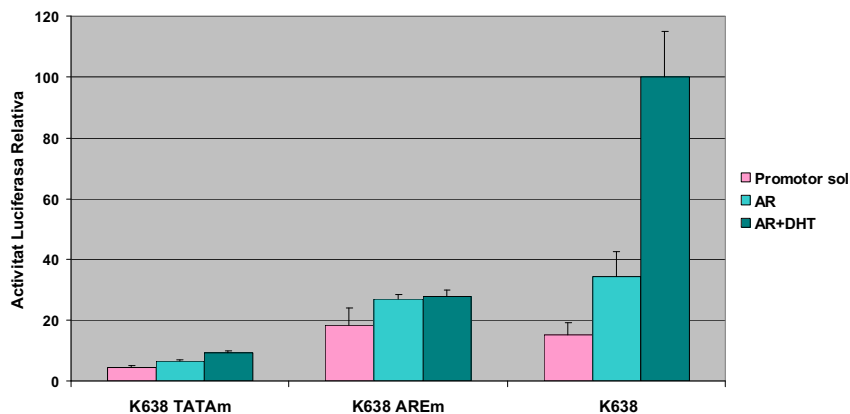


FIGURA 29. Anàlisi de la funcionalitat de la caixa TATA del promotor del gen de la KAP. Activitat del constructe K638 i les versions mutades K638 TATA MUT i K638 ARE MUT en resposta a andrògens en cèl·lules PCT3. Els diferents constructes van ser cotransfectats amb el plàsmid pSV-AR₀ codificant per AR en presència i absència de μ M de DHT. Els valors estan estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitjana + SD (desviació estàndard) d'un mínim de tres experiments independents, realitzats per triplicat.

D'entrada veiérem com la mutació induïda en la seqüència TATA a K638 TATAm semblava causar una caiguda de l'activitat basal del promotor en comparar-la amb la que presentava K638 tot sol. Si seguidament ens fixàvem en les activitats induïdes per AR i el tractament androgènic observàvem que pel constructe K638 TATAm no eren les obtingudes ja anteriorment al nostre grup d'uns ~5 cops l'activitat basal que si apreciàvem al constructe control. La inducció androgènica era pràcticament nul·la quan la putativa caixa TATA estava mutada. Semblava per tant, que efectivament la seqüència de -28 pb actuava en el promotor del gen de la KAP com a diana per a TBP i articuladora de la formació del complex basal de transcripció que permetia canalitzar les transactivacions dels factors de transcripció inductors del gen com AR.

Ara bé, el solapament de la TATA *box* amb part de l'ARE ens plantejava la possibilitat que potser la mutació aplicada en la caixa afectés realment la unió d'AR al seu element de resposta dificultant-lo i que per tant, la caiguda en les activitats luciferasa fossin degudes a AR i no a TBP. De fet en els assajos de transfecció havíem vist com la deleció de la primera part de l'ARE tenia unes repercussions similars, tot i que menys dràstiques, en la transactivació del promotor proximal de KAP a les que presentava la mutació de TATA (FIGURA 29).

A fi de testar si la unió d'AR al seu ARE es veia afectada pel canvi d'un nucleòtid realitzat, es dissenyaren oligonucleòtids representatius del promotor en la seva regió de -46

bp a -16 bp, com els usats per a l'EMSA d'AR, incorporant aquest cop la mutació A<G a -27 bp (TATA MUT) tal i com s'havia provocat en K638 TATAm. Com a control s'usaren també els oligonucleòtids KAP ARE. Es realitzà l'expressió d'AR *wt* per traducció *in vitro* en reticulòcit de conill i l'extracte proteic obtingut fou hibridat tant amb la versió mutada d'oligos TATA Mut com amb els oligonucleòtids control KAP ARE marcats radioactivament amb ³²P. Per tal de verificar la identitat d'AR s'afegí a la incubació anticossos dirigits contra aquesta proteïna. El resultat s'analitzà en un gel d'acrilamida.

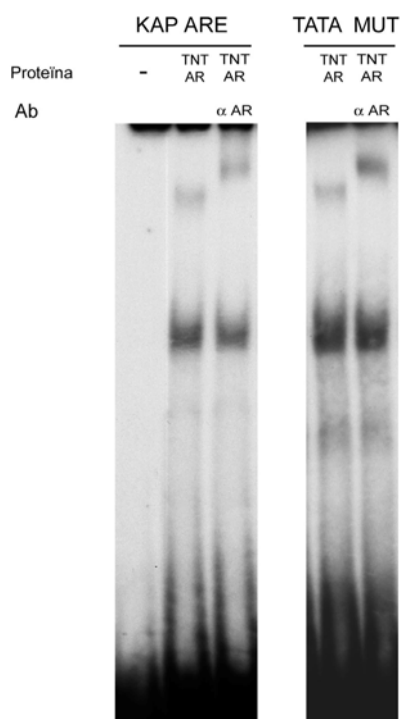


FIGURA 30. Anàlisi per la tècnica d'EMSA de la unió d'AR a la versió mutada en la TATA de l'ARE del promotor del gen de la KAP. S'incubà l'oligonucleòtid marcat amb ³²P representatiu de l'ARE incorporant el canvi A<G que muta la caixa TATA (TATA MUT) amb proteïna AR expressada *in vitro* en el sistema TNT durant 30 min a RT. S'afegiren anticossos (Ab) anti-AR (α AR) a la incubació per constatar la identitat com a responsable del retard obtingut. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0,5%. Com a control positiu s'incubà també AR expressat *in vitro* amb la versió original de l'oligo KAP ARE

Aquest assaig de retard en gel ens mostrà l'aparició d'un retard de l'oligonucleòtid TATA MUT que era desplaçat cap a zones superiors en el gel per l'anticòs anti-AR, exactament igual com ocorria pels *oligos* control KAP ARE. Això ens indicava que al menys *in vitro*, AR és capaç de seguir unint l'ARE del promotor del gen de la KAP quan aquest incorpora el canvi de nt a -27 pb i per tant, mantindria probablement la capacitat de

transactivar un promotor que presentés aquesta modificació. Podíem deduir doncs que les caigudes d'activitat luciferasa del constructe K638 TATAm no es devien a la manca d'unió d'AR sinó a l'impediment que la mutació suposa en el reconeixement i afinitat de TBP per la seva seqüència diana TATAAA.

El gen de la KAP seria per tant un gen amb caixa TATA i el seu solapament amb l'ARE no el convertiria en un gen TATA-less en els contextos d'inducció androgènica.

2. Estudi d'una caixa GC al promotor del gen de la KAP

2.1 Estudi de la funcionalitat de la caixa KAP GC: Assajos de *Binding*

Quan es realitza una cerca de seqüències putatives per a factors de transcripció del promotor de la KAP a ull nu, resulta especialment aparent la zona del voltant de -100 bp altament rica en C.

En procedir amb l'anàlisi *in silico* del promotor proximal del gen de la KAP amb programes com MatInspector (Quandt *et al.*, 1995), s'identifica un gran nombre de llocs d'unió per a reguladors transcripcionals i a la zona de -100 bp s'indica la presència d'una caixa pràcticament consens per a *Specific Factor 1* (Sp1)(FIGURA 31).

El factor Sp1 és un factor d'expressió ubiqua que regula una gran quantitat de gens, tant d'expressió específica com de *housekeeping* (Kadonaga *et al.*, 1987). Forma part de la família de factors de transcripció Sp que es caracteritzen per la seva unió selectiva a seqüències riques en GC, les caixes GC. Sp1 ha estat descrit tradicionalment com un activador de la transcripció (Pascal i Tijan, 1991) i s'ha vist que és capaç d'interactuar amb factors de la maquinària de transcripció basal com la TBP (Emili *et al.*, 1994) i amb una gran varietat d'altres factors formant grans complexos que regulen l'activitat transcripcional. Concretament s'ha demostrat la interacció física i funcional entre Sp1 i una gran varietat de receptors nuclears, entre ells el mateix receptor d'andrògens (Lu *et al.*, 2000) fet que resulta en una activació sinèrgica dels promotors diana com és el cas del promotor del gen p21.

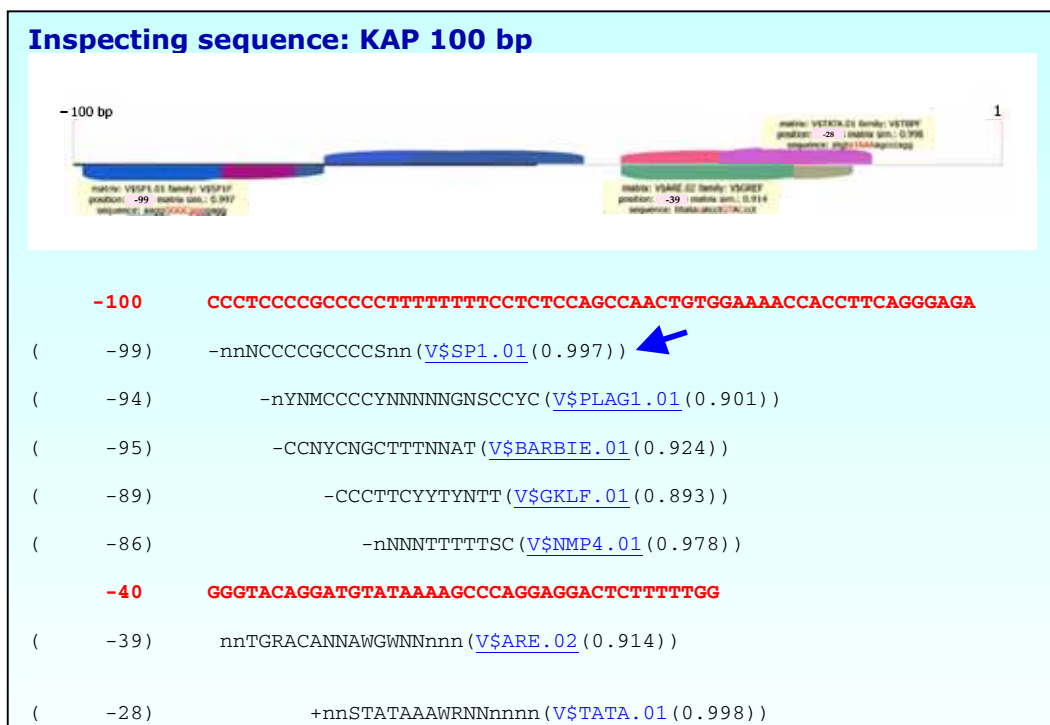


FIGURA 31. Predicció *in silico* del programa MatInspector pel promotor proximal del gen de la KAP. Es mostra la predicció de possibles elements d'unió per a factors de transcripció, en blau, en els 100 primers nucleòtids del promotor, en vermell. S'assenyala la presència de la caixa TATA a -28 bp, de l'ARE a -39 bp i del putatiu element per a Sp1 a -100 bp (fletxa). (Adaptat de Genomatix Software© GmbH)

Un altre membre de la família Sp que ens va resultar interessant com a possible element regulador del gen de la KAP en la seva caixa GC fou Sp3. Aquest factor es caracteritza també per ser d'expressió ubiqua i clàssicament se'l presentà com a repressor transcripcional per competició pel lloc d'unió al DNA de la transcripció mitjançada per Sp1 (Hagen *et al.*, 1994; Majello *et al.*, 1994). Treballs posteriors però, han postulat unes propietats bifuncionals de Sp3 l'activitat del qual depèn del promotor i el context cel·lular (Majello *et al.*, 1997).

Per tal de corroborar la predicció computacional obtinguda per la caixa GC del promotor de la KAP, es realitzaren assajos de retard en gel. Primerament, i per tal de potenciar la presència dels factors Sp1 i Sp3 als extractes proteïcs, es transfectaren cèl·lules de la línia PCT3 amb els corresponents plàsmids d'expressió pCMV-Sp1 o pCMV-Sp3 (amablement cedits pel Dr. Carles Ciudad de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona) (vegeu MÈTODES). A les 48 hores posttransfecció es processaren els corresponents extractes nuclears (vegeu MÈTODES). Per a reproduir el fragment del promotor a estudiar es dissenyaren oligonucleòtids *KAP GC Box* d'uns 20 pb que s'extenien de -110 a -90 bp englobant la putativa caixa GC situada a -100 bp. Es van

incubar extracte nuclear de cèl·lules PCT3 i extracte de cèl·lules PCT3 transfectades amb Sp1 (PCT3-Sp1) o amb Sp3 (PCT3-Sp3) durant 30 min amb l'oligonucleòtid *KAP GC Box* marcat radioactivament amb ^{32}P a 37° C. Per a les cèl·lules transfectades s'allargà la incubació 10 min en presència d'anticossos dirigits contra Sp1 (Anticòs PEP-2, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) o contra Sp3 (D-20, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY). El resultat s'analitzà en un gel d'acrilamida al 8 % en TBE 0,5x.

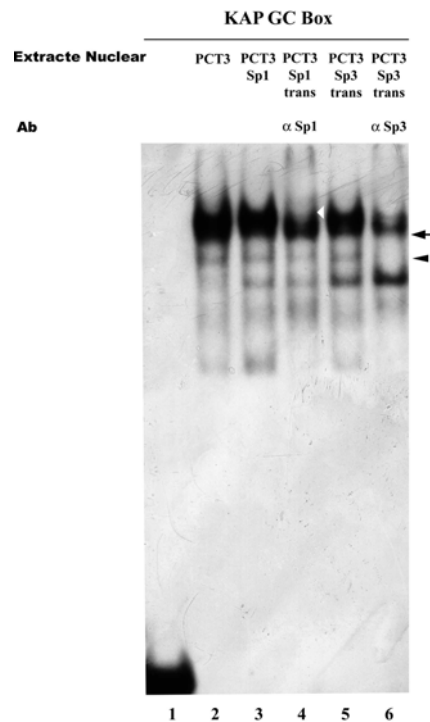


FIGURA 32. Anàlisi de la unió d'Sp1 i Sp3 a la caixa GC del promotor del gen de la KAP. Extractes nuclears de cèl·lules PCT3 transfectades amb els plasmidis d'expressió pCMV per Sp1 o Sp3 van ser incubats amb l'oligonucleòtid *KAP GC Box* representatiu del caixa GC marcat radioactivament durant 30 min a 37°C. En els casos assenyalats s'afegiren anticossos dirigits contra cada factor respectivament i s'incubaren 10 min més. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia.

Tal i com s'aprecia a la FIGURA 32, s'obtingué retard de l'oligo marcat amb els tres tipus d'extracte tot i que els patrons presentaven lleus diferències en les intensitats de les diferents bandes, segurament atenent a diferències en les concentracions relatives de cada espècie responsable presents en cadascun d'ells. La incorporació d'anticossos permeté

distingir-ne la identitat. Per a l'extracte transfectat amb Sp1, la presència de l'anticòs PEP-2 suposava la desaparició de la banda superior del retard (carril 4, sageta blanca). En l'extracte transfectat amb Sp3, la presència de l'anticòs D-20 provocava la desaparició d'una banda immediatament inferior a la corresponent a Sp1 (carril 6 sageta negra) i de la situada per sota d'aquesta que es trobava allunyada del nucli central del retard (carril 6 asterisc). Tot i l'absència de bandes aparegudes en posicions superiors com a conseqüència del *supershift* (sols es pot apreciar enfosquiment de la part alta propera als pous dels carrils amb anticòs), les tres bandes desaparegudes es corresponen individualment amb les generades per les diferents isoformes d'Sp1 i Sp3. Així assajos EMSA per Sp1 i Sp3 realitzats en altres treballs (Fandos *et al.*, 1999; Kenett *et al.*, 1997) descriuen la banda superior en el retard de caixes GC com la corresponent a la unió de Sp1. Al seu torn, la unió de les tres isoformes de Sp3 originades per un inici de transcripció alternatiu generaven 2 bandes de retard inferiors a la de Sp1, la més allunyada deguda a la isoforma més grossa (110 kDa) i la més propera a causa de la unió de les altres dues isoformes de pes molecular força semblant (70-60 kDa).

De manera que podíem concloure que, tal i com s'havia predit, la caixa GC del promotor del gen de la KAP era susceptible de ser unida per Sp1 i a més a més també per Sp3.

2.2 Estudi de la presència dels membres Sp1/Sp3 en les cèl·lules PCT3

Semblava que el retard generat per l'extracte nuclear de les cèl·lules PCT3 (FIGURA 32 carril 2) presentava les bandes degudes a Sp1 i Sp3 sense necessitat de transfecció. Vam voler comprovar mitjançant *western blot* tant la presència com l'abundància relativa de cada factor en aquest extracte. A tal efecte vam resoldre 10 µg d'extracte nuclear de PCT3 i la mateixa quantitat dels extractes procedents de PCT3 transfectades PCT3-Sp1 o PCT3-Sp3 per electroforesi en gels de poliacrilamida al 12%. Seguidament es transferiren les proteïnes a membranes de PVDF que s'hibridaren amb els anticossos contra Sp1 o bé amb anticossos anti-Sp3 (vegeu MÈTODES).

D'acord amb les indicacions de la distribuïdora dels anticossos i de l'esmentat en la literatura, en resoldre la proteïna Sp1 en un gel d'*SDS-PAGE* s'observen dues espècies diferents, de 95 i 105 kDa corresponents a diferents estats de fosforilació (Jackson *et al.*, 1990). Ambdues bandes apareixien a la nostra immunodetecció, tant a l'extracte PCT3 com al de cèl·lules transfectades PCT3-Sp1 (FIGURA 33).

Pel què fa a Sp3 la mida de la proteïna no ha quedat del tot establerta ja que sembla que hi ha tres isoformes diferents, una d'uns 110-115 kDa i dues d'entre 70-60 kDa generades a partir de dos triplets ATG molt propers entre si, a 3' de l'inici de traducció de la isoforma grossa (Kennett *et al.*, 1997). La nostra membrana per Sp3 presentava, tant en l'extracte PCT3 com al PCT-Sp3, la banda de 110 kDa i una banda inferior al voltant de 70 kDa produïda pel solapament de les dues bandes corresponents a les dues isoformes petites.

La immunodetecció detectava per tant totes les isoformes tant a l'extracte de cèl·lules PCT3 com als extractes de cèl·lules transfectades.

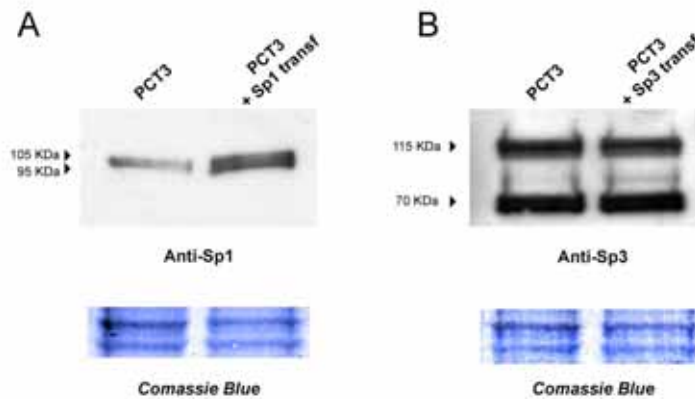


FIGURA 33. Immunodetecció dels factors Sp1 i Sp3 en extractes nuclears de cèl·lules PCT3. 10 µg d'extracte nuclear de cèl·lules PCT3 (PCT3) i de cèl·lules PCT3 transfectades amb pCMV-Sp1 (PCT3+Sp1 trans) (A) o pCMV-Sp3 (PCT3+Sp3 trans) (B) es separaren per SDS-12% PAGE i es transferiren a una membrana de PVDF. La immunodetecció es va dur terme amb l'anticòs antiSp1 i antiSp3 segons corresponia a una dilució 1: 500 tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2 de MÈTODES. Es mostren també les membranes transferides tenyides amb *blue comassie* com a control de càrrega.

Tot i la dificultat de quantificació relativa que suposa una extracció nuclear, observant *de visu* la relativa igualtat de càrrega dels diferents carrils en tenyir la membrana amb *blue comassie*, semblaria que a les cèl·lules PCT3 el factor Sp3 és més abundant que el factor Sp1. Aquest fet podria tenir repercussions a l'hora de determinar l'expressió del gen de la KAP en les cèl·lules PCT3 en funció del paper que cadascun dels dos factors tingui sobre la regulació d'aquesta.

2.3 Anàlisi del paper regulador dels factors Sp1 i Sp3 en el gen de la KAP

Haviem comprovat la unió de Sp1 i de Sp3 a la caixa GC del gen de la KAP i inferit certes diferències en les seves abundàncies relatives, calia ara determinar els efectes a nivell de regulació que això suposava. Així doncs, es van desenvolupar experiments d'inducció del promotor de KAP en resposta a aquests factors.

Es realitzaren assajos de transfecció transitòria en cèl·lules PCT3 del constructe K638 que inclou el fragment dels primers 638 pb del promotor proximal del gen de la KAP fusionat al gen reporter de la luciferasa. En aquests tipus d'assaig va ser també necessària la transfecció dels plàsmids d'expressió per als factors de transcripció estudiats pCMV-Sp1 i pCMV-Sp3 per tal d'obtenir una activitat transcripcional específica.

Per tal de constatar el veritable paper de Sp1 i Sp3 en la regulació de KAP, es transfectaren quantitats creixents del vector d'expressió de cadascun d'ells i s'analitzà així en primer lloc l'efecte que la seva presència provocava sobre el promotor i alhora si es produïa un augment de l'efecte causat en relació a l'increment de la concentració del factor. Les transfeccions de cèl·lules PCT3 es realitzaren en plaques de 24 pous i les activitats luciferasa i SEAP es mesuraren 48 hores posttransfecció dels extractes i medis corresponents a cada situació.

La FIGURA 34A. mostra els resultats obtinguts en la inducció de K638 per la transfecció de 0,05 µg, 0,15 µg i 0,3 µg del plasmidi d'expressió d'Sp1 pCMV-Sp1. El primer que podem apreciar és que la transfecció de Sp1 suposa la inducció del promotor del gen de la KAP, fet que ens indica el seu paper activador en l'expressió d'aquest. Si ens fixem en la magnitud de la resposta que Sp1 provoca, veiem com l'activitat luciferasa relativa incrementa a mesura que ho fa la quantitat de Sp1. Mentre que la transfecció 0,05 µg de vector de Sp1 suposa una inducció relativa ~12 vegades respecte al promotor sol, quan es transfecta 0,15 µg de vector s'obté aproximadament el doble d'activitat i s'arriba a pràcticament triplicar aquesta activitat assolint uns ~70 cops l'activitat basal amb 0,3 µg. Sp1 per tant, indueix el promotor del gen de la KAP i la seva capacitat activadora és dosi dependent, incrementa proporcionalment a la concentració en què es troba.

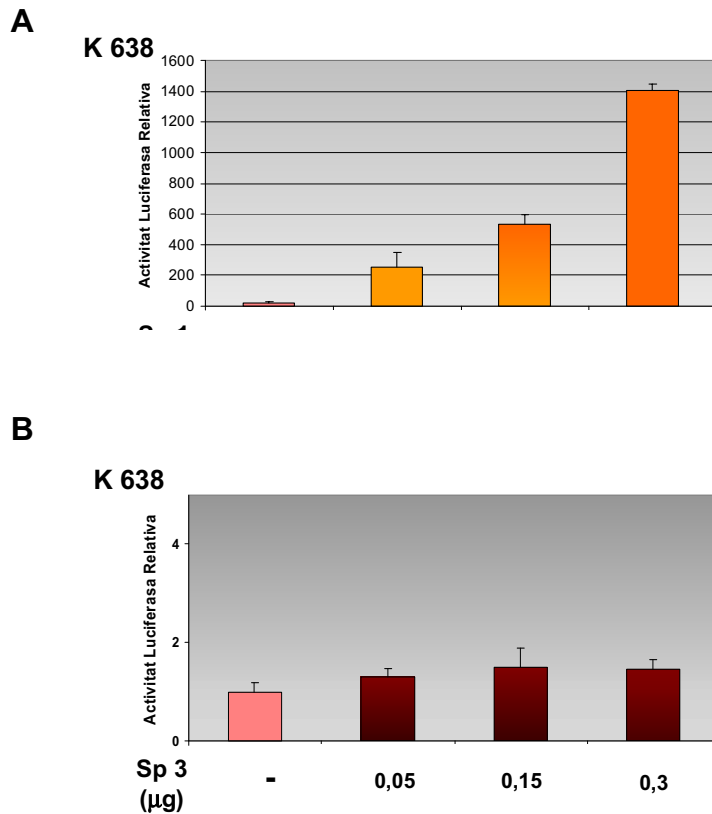


FIGURA 34. Anàlisi de l'activitat del promotor proximal del gen de la KAP en resposta a quantitats creixents dels factors Sp1 i Sp3. Mesura de les activitats luciferasa del constructe K 638 cotransfectat en cèl·lules PCT3 amb quantitats creixents 0.05, 0.15 i 0.3 mg dels plasmidis d'expressió pCMV-Sp1(A) i pCMV-Sp3 (B). Els valors estan estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja + SD (desviació estàndar) de tres experiments independents, realitzats per triplicat.

En realitzar el mateix tipus d'experiment per Sp3 en canvi, Fig X B, no podem apreciar el mateix efecte. La transfecció d'Sp3 no sembla tenir repercussió respecte a l'activitat basal del promotor 637 pb del gen de la KAP. L'increment de la concentració del vector d'expressió pCMV-Sp3 tampoc aconseguix modificar aquesta activitat. Això sembla indicar doncs que Sp3 tot sol no tindria efecte en la regulació del gen.

Davant de les múltiples interaccions entre Sp1 i Sp3 descrites en els promotors que disposen de caixes GC i havent vist en els assajos EMSA que Sp3 també uneix la del gen de la KAP, varem creure convenient fer assajos de cotransfecció transitòria d'ambdós factors per determinar la possible interacció que es produïa entre ells en el nostre promotor. Es van cotransfectar per tant cèl·lules PCT3 amb el constructe K638 juntament amb 0,15 µg del vector d'expressió per Sp1 i 0,15 µg del vector d'expressió per Sp3. Es va utilitzar la quantitat intermèdia de cada factor testada als assajos de titulació degut a la limitació imposada per la toxicitat que el DNA exogen genera en les cèl·lules en les transfeccions. El fet que l'expressió d'ambdós factors estes sota control del mateix promotor en els seus corresponents plasmidis (el del citomegalovirus) propiciaria que s'expressin de forma

quantitativament molt similar, tot i que no es pot descartar una estabilitat diferencial de l'RNA missatger o de la proteïna que evitaria aquesta equimolaritat.

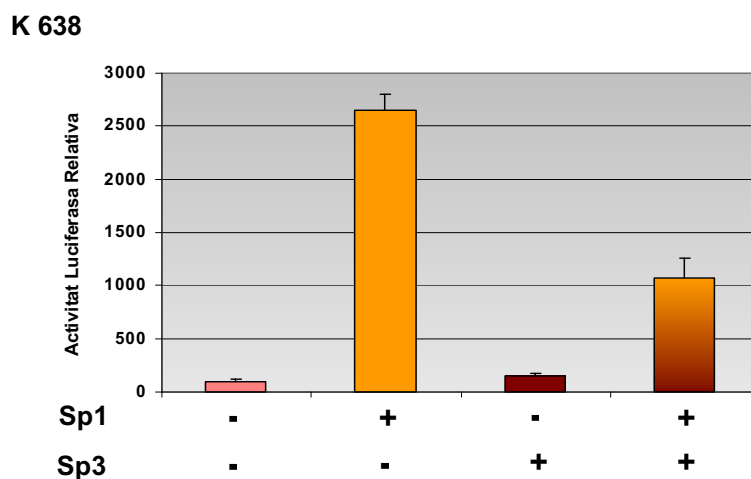


FIGURA 35. Anàlisi de l'activitat del promotor proximal del gen de la KAP en resposta a la presència simultània dels factors Sp1 i Sp3. Mesura de les activitats luciferasa del constructe K 638 cotransfectat en cèl·lules PCT3 amb els plasmidis d'expressió pCMV-Sp1(A) i pCMV-Sp3 (B). Els valors estan estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja + SD (desviació estàndar) de tres experiments independents, realitzats per triplicat.

D'aquesta manera vam poder veure com l'activitat relativa generada per Sp1, que suposa una inducció relativa de ~ 26 vegades respecte la basal de K638 que genera Sp1 es veu reduïda a ~ 11 vegades, quan es cotransfecten quantitats equivalents d'Sp3 (Fig Z). Malgrat que la presència d'Sp3 tot sol no té efecte sobre el promotor del gen de la KAP (inducció d'1,5x), quan es troba simultàniament a Sp1, Sp3 és capaç d'atenuar la resposta activadora d'Sp1. Tenint en compte els resultats previs és fàcil creure que aquesta inhibició de la inducció de Sp1 per part d'Sp3 sigui a nivell de competència pel lloc d'unió al DNA, la caixa GC. Sp3 s'uneix a la caixa però no és capaç d'engegar una resposta transcripcional efectiva i per tant, quan es troba en proporció similar a Sp1 el substitueix parcialment en la caixa impedit-li que exerceixi totalment la seva inducció.

2.4 Estudi de la relació funcional entre AR i Sp1 al promotor del gen de la KAP

Haviem vist la capacitat inductora d'Sp1 sobre el gen de la KAP i coneixíem les múltiples descripcions en la literatura de la seva cooperativitat amb d'altres factors de transcripció, especialment amb membres de la família dels receptors nuclears. Per tot això, vam voler testar quina resposta transcripcional del promotor de la KAP suposava la presència simultània de l'AR i d'Sp1, els dos activadors detectats fins al moment.

Realitzàrem assajos de cotransfecció transitòria en les cèl·lules PCT3 del constructe K637 del promotor de KAP juntament amb quantitats idèntiques, 0,15µg, del vector codificant pel receptor d'andrògens pSV-AR₀ i el vector d'expressió d'Sp1. La resposta androgènica va ser induïda mitjançant incubació de les cèl·lules transfectades en absència i presència d' 1 µM de dihidrotestosterona (DHT) durant 48 hores posttransfecció. Passat aquest temps es mesuraren l'activitat luciferasa i l'activitat SEAP que ens serveix com a normalitzadora de l'eficiència de transfecció (vegeu MÈTODES).

Aquest experiment ens mostrà la cooperació que existeix entre AR i Sp1 en el promotor del gen de la KAP (FIGURA 36). La inducció androgènica aïllada del fragment -638Luc (K638) és de ~ 5x respecte la basal, tal i com es descrigué prèviament (Soler *at al.*, 2002). La inducció per Sp1 detectada en els experiments previs ha resultat ser de ~ 26x. Doncs bé, la coexistència dels dos factors AR i Sp1 en condicions de tractament hormonal 1 DHT µM eleva la inducció fins a unes ~ 50 vegades, fent evident per tant la sinèrgia que es produeix entre ells en el context del nostre promotor.

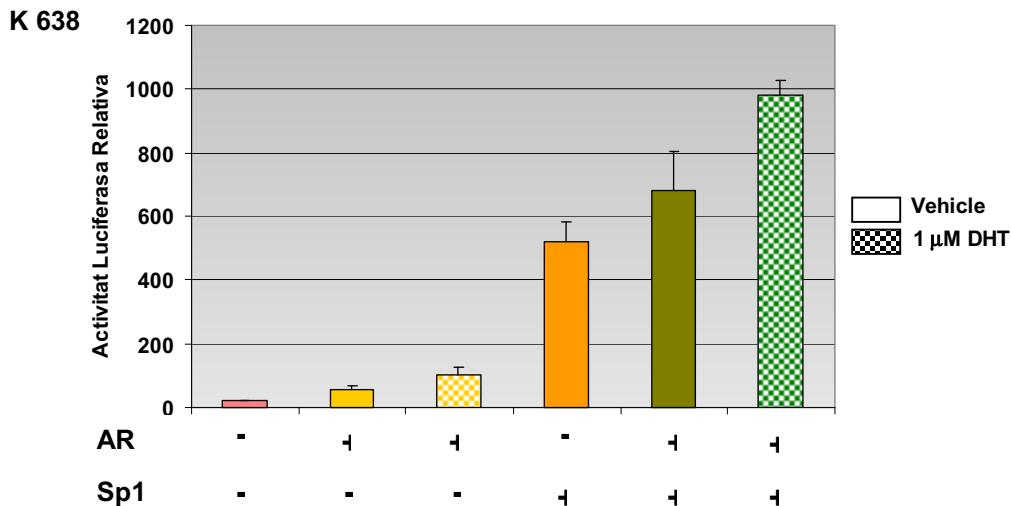


FIGURA 36. Anàlisi de l'activitat del promotor proximal del gen de la KAP en presència d'andrògens i el factor Sp1. Mesura de les activitats luciferasa del constructe K 638 cotransfectat en cèl·lules PCT3 amb els plasmidis d'expressió per AR pSV-AR₀ i Sp1 pCMV-Sp1, en absència i presència d'andrògens (1µM DHT). Els valors estan estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja + SD (desviació estàndar) de tres experiments independents, realitzats per triplicat.

3 . Anàlisi de les caixes -429 i -457 com a putatius llocs d'unió per C/EBPs

S'havia vist que perquè es produís l'expressió de KAP al còrtex renal (cèl·lules S1/S2), a banda de la presència d'andrògens que es dona als mascles, era indispensable la presència puntual de la hormona tiroïdal en els dies en què es produeix maduració gonadal. Donada l'absència aparent de llocs d'unió pel receptor de TH en el promotor proximal de KAP, es pensà en l'acció indirecta de l'hormona via control dels factors de transcripció C/EBPs. Un cop constatada la correlació que a les cèl·lules del còrtex es produeix entre el tractament amb hormona tiroïdal, l'expressió dels factors de transcripció C/EBP α i C/EBP β i els nivells d'expressió del mRNA de KAP (Tesi de Dra. M. Soler; Teixidó *et al.*, 2006), es va analitzar el promotor proximal del gen buscant putatius llocs d'unió per a aquests factors.

Els estudis previs del promotor proximal del gen de la KAP (Tesi de la Dra. Soler; vegeu INTRODUCCIÓ) havien predit la presència de 4 putatives caixes per a membres de la família de factors de transcripció CAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) en el promotor proximal de KAP. En assajos d'activitat luciferasa en les cèl·lules PCT3 es determinà la funcionalitat i rellevància de dues d'aquestes seqüències, concretament les situades a -429 i -457 pb respecte a l'inici de transcripció. La deleció dels 10 pb que constituïen aquestes caixes provocaven una caiguda molt important de la capacitat inductora del promotor i el seu efecte era molt més palès quan a més mancava la inducció androgènica.

3.1 Estudi de la unió de C/EBP α i C/EBP β en extractes nuclears de cèl·lules PCT3

Vam procedir per tant, a analitzar la putativa unió dels factors C/EBP α i β a les seqüències -429 i -457. A tal efecte es van realitzar assajos de retard en gel amb els oligonucleòtids representatius de les caixes (TAULA 5) i extractes nuclears de cèl·lules PCT3, la línia cel·lular on se n'havia determinat la funcionalitat (vegeu MÈTODES). Com a control positiu de la presència de factors C/EBPs als extractes es va emprar un oligonucleòtid que contenia la seqüència consens per als membres C/EBPs (C/EBP *WT*) i com a control negatiu la versió mutada de la consens (C/EBP *MT*) que incorpora canvis de nt que suposen la pèrdua d'unió d'aquests factors.

En un primer assaig s'incubà l'extracte nuclear de PCT3 amb cadascun dels 4 *oligos* marcats radioactivament (FIGURA 37). D'aquesta manera veiérem com tant la caixa -429 com la -457 (carrils 2 i 4 respectivament) eren unides per proteïnes presents en l'extracte.

La caixa consens per membres C/EBP presentava també retard indicant la presència d'aquests factors en l'extracte (carril 6). La versió mutada de la consens en canvi perdia pràcticament totes les bandes retardades (carril 8).

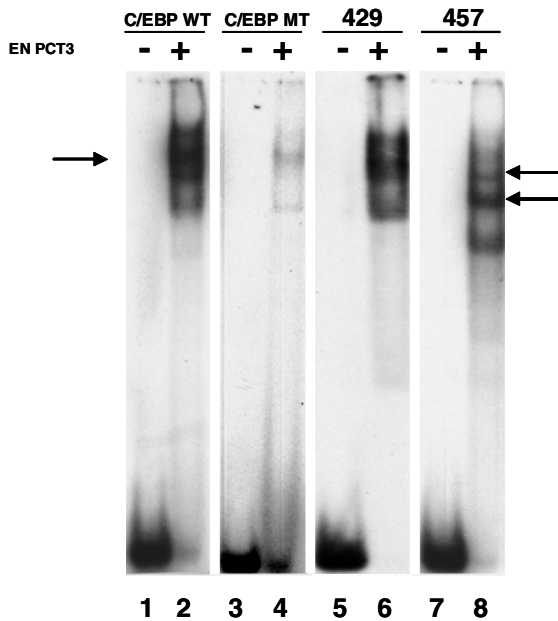


FIGURA 37. Anàlisi de la unió de proteïnes nuclears de les cèl·lules PCT3 a les seqüències -429 i -457 del promotor del gen de la KAP. Es van incubar extractes nuclears de cèl·lules PCT3 amb els oligonucleòtids 429 i 457 representatius de les corresponents caixes marcats radioactivament durant 30 min a 37°C. Com a control de la presència de factors C/EBP als extractes nuclears s'incubaren també amb oligonucleòtids representatius del motiu consens per a C/EBPs (C/EBP WT) i d'una versió d'aquest mutada (C/EBP MUT). El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia. Les fletxes indiquen les bandes retardades.

Per tal de determinar l'especificitat dels retards de -429 i -457 férem un segon experiment emprant els diferents oligonucleòtids sense marcar com a competidors freds. Així incorporarem a les incubacions de les caixes marcades amb l'extracte nuclear excessos d'unes 30 vegades respecte la sonda de la consens de C/EBP WT, la consens mutada C/EBP MUT i la pròpia caixa sense marcar. La FIGURA 38 mostra com la caixa 429 és competida lleugerament tant per la seqüència C/EBP WT com per la C/EBP MUT (carrils 8 i 9) i sols s'aconsegueix la desaparició total del seu retard en usar la mateixa 429 com a competidor fred (carril 10). La caixa 457 en canvi, és competida de manera eficient tant per ella mateixa (carril 15) com per la seqüència C/EBP WT (carril 13) i no per la C/EBP MUT (carril 14). Aquest assaig ens indicava que tot i que el retard de la caixa 429 era específic perquè sols se n'aconseguia la competició efectiva amb la seva pròpia seqüència, no semblava que fos degut a la unió d'un membre C/EBP. Els elements responsables del retard de la -457 per contra, unien també eficientment la seqüència consens per C/EBPs i era molt probable que en fossin un membre.

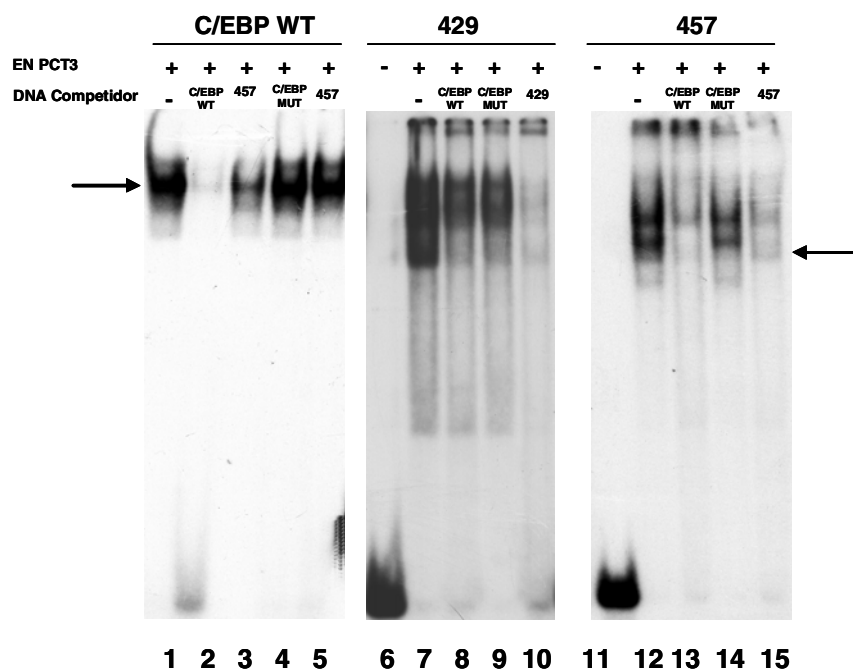


FIGURA 38. Competició dels retards obtinguts per les seqüències -429 i -457. A les incubacions dels oligonucleòtids marcats radioactivament -429 i -457 amb extractes nuclears de PCT3 s'afegiren oligonucleòtids no marcats (*DNA Competitor*) representatius del motiu consens per a C/EBPs (*C/EBP WT*) i la versió mutada (*C/EBP MUT*) i de les pròpies caixes -429 i -457 en excessos de 30x. Les diferents combinacions s'incubaren durant 30 min a 37°C. Com a control de la presència de factors C/EBP als extractes nuclears s'incubaren també amb oligonucleòtids. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia. Les fletxes indiquen les bandes retardades que són esborrades pels oligos competidors del retard.

Al control positiu de la competició emprant com a sonda la C/EBP WT ens suggeria les mateixes conclusions en veure's competida per -457 freda i no per 429.

Per acabar de determinar la identitat del factor que unia la caixa -457 vam realitzar experiments de *supershift* emprant anticossos contra C/EBP α (14-AA SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) i contra C/EBP β (C-19 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY). Es va poder observar que el retard de -457 era desplaçat per l'anticòs anti-C/EBP β (Fig L, carril 12) i que per tant aquest era el membre C/EBP que l'unia. No apreciàvem *supershift* de -457 amb l'anticòs dirigit contra C/EBP α (carril 11). El fet que al control positiu realitzat amb la sonda C/EBP WT tampoc s'obtingués desplaçament del retard per l'anticòs anti C/EBP α , i havent comprovat la funcionalitat de l'anticòs en extractes de ronyó (resultats no mostrats),

ens va fer pensar en una afinitat menor o alteració de la C/EBP α present a les cèl·lules PCT3.

La manca de canvis en el retard de -429 en presència dels anticossos (carrils 7 i 8) ens permetia descartar definitivament la possibilitat que fos unida pels factors C/EBP.

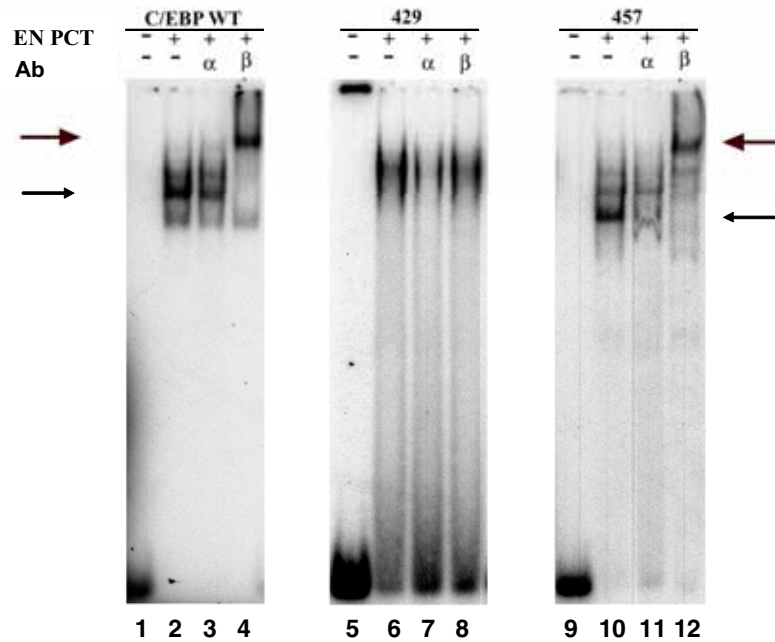


FIGURA 39. Supershift dels retards de les seqüències -429 i -457 amb anticossos anti-C/EBP α i β . A les incubacions dels oligonucleòtids marcats radioactivament -429 i -457 amb extractes nuclears de PCT3 (ENPCT) s'afegiren anticossos (Ab) dirigits contra C/EBP α (α) o C/EBP β (β). L'afegit dels anticossos es realitzà després de 30 min d'incubació dels DNAs i l'extracte a 37 °C i posteriorment s'allargà la incubació 10 min més. Com a control positiu s'assajà també el supershift de C/EBP WT. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia. Les fletxes indiquen les bandes retardades que són esborrades pels oligos competidors del retard.

3.2 Estudi de la unió de C/EBP α i C/EBP β en extractes nuclears de ronyó de ratolí

Davant dels resultats obtinguts per la caixa -457, vam voler veure també quin era el patró d'unió de la caixa -457 davant d'un extracte nuclear de tot el ronyó. Realitzarem assajos EMSA incubant l'oligonucleòtid -457 marcat radioactivament amb l'extracte nuclear obtingut a partir de ronyons de ratolins C/57BL6 mascles adults (vegeu MÈTODES). Davant del retard obtingut (FIGURA 40), vam procedir a la seva competició amb quantitats creixents (de 10x a 40x respecte la quantitat de sonda incubada) d'oligonucleòtid consens per C/EBP WT i consens mutat C/EBP MUT no marcats. L'experiment ens mostrava altre

cop la competició del *shift* de la caixa -457 per la presència de seqüència C/EBP consens (carrils 3 a 6) indicant la possible naturalesa del factor unit responsable. La manca de competició per part de la seqüència C/EBP mutada indicava al seu torn l'especificitat del retard (carrils 7 a 10).

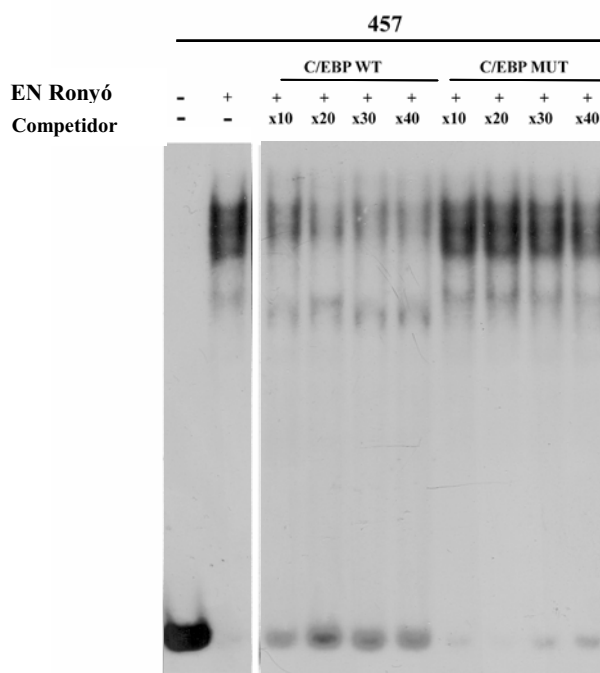


FIGURA 40. Competició del retard obtingut per la seqüència -457 amb extracte nuclear de ronyó. S'incubà l'oligonucleòtid -457 amb extracte nuclear de ronyó de ratolí mascle amb quantitats creixents (10x-20x-30x-40x) d'oligonucleòtids (*Competidor*) C/EBP WT i C/EBP MUT no marcats. Les diferents combinacions s'incubaren durant 30 min a 37°C. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia.

Per completar l'estudi, vam analitzar el desplaçament de bandes que suposava l'afegit d'anticossos anti-C/EBP α i anti-C/EBP β a les incubacions de la sonda 457 i l'extracte de ronyó. El resultat fou l'obtenció de nou d'una banda desplaçada cap a una posició superior

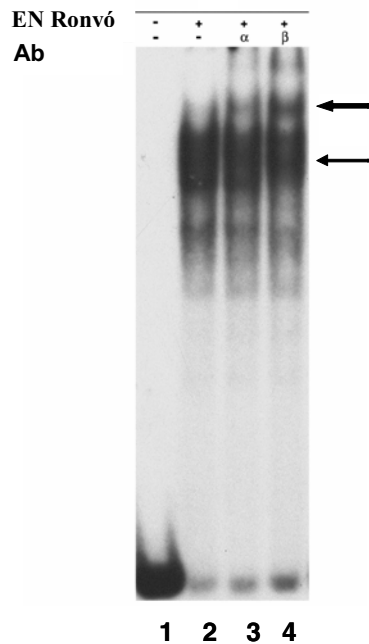


FIGURA 41 *Supershift* dels retards de la seqüència -457 amb anticossos anti-C/EBP α i β . A les incubacions dels oligonucleòtid -457 marcat radioactivament amb extracte nuclear de ronyó (EN Ronyó) s'afegiren anticossos (Ab) dirigits contra C/EBP α (α) o C/EBP β (β). L'afegit dels anticossos es realitzà després de 30 min d'incubació dels DNAs i l'extracte a 37 °C i posteriorment s'allargà la incubació 10 min més. Com a control positiu s'assajà també el *supershift* de C/EBP WT. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia. Les fletxes indiquen les bandes retardades que són esborrades pels oligos competidors del retard.

del gel quan s'addicionava l'anticòs anti-C/EBP β (carril 4) i, contràriament al que succeïa amb els extractes de PCT3, el mateix patró de *supershift* amb l'anticòs anti-C/EBP α (carril 3). De manera que tant C/EBP β com C/EBP α uneixen la caixa situada a -457 pb de l'inici de transcripció del gen de la KAP.

Les diferències en quant a la capacitat d'unió de la caixa -457 per part de C/EBP α detectades entre la línia cel·lular PCT3 i el ronyó de ratolí poden ésser degudes a un diferent origen del factor de transcripció actiu ja que el ronyó conté molts altres tipus cel·lulars a part de les del túbul proximal o bé a un comportament anormal, algun tipus d'inactivació, de la C/EBP α present a les cèl·lules PCT3.

4. Estudi del factor que uneix la seqüència -429 pb del promotor del gen de la KAP

4.1 PREDICCIÓ *IN SILICO* TFSEARCH: Anàlisi de la possible unió per GATA-3

S'havia comprovat que la seqüència de 10 pb situada a -429 pb del punt d'inici de la transcripció del gen de la KAP no era unida per un factor C/EBP.

Per tal d'esbrinar la identitat del factor que unia la caixa vàrem idear diferents estratègies entre les quals incloguérem l'anàlisi *in silico* de la seva seqüència. En introduir la caixa i els 10 pb anteriors i posteriors al programa de predicció TFSEARCH (ver. 1.3, Akyiama *et al.*, 1995), se'ns indicava la presència d'un lloc putatiu d'unió per a membres de la família dels factors de transcripció GATA.

CTTCACTGTT CTCCAGCAAT CTGCCAGGAT	entry	score
<-----	M00075 GATA-1	89.4
<-----	M00076 GATA-2	87.7
<-----	M00190 C/EBP	81.0
<-----	M00076 GATA-3	77.8

FIGURA 42. Predicció *in silico* del programa TFSARCH per la caixa -429 del promotor del gen de la KAP. Es mostra la predicció de possibles elements d'unió per a factors de transcripció presents en en la caixa -429 (en vermell) on s'assenyalen diferents membres GATA com a candidats. Adaptat de *TFSEARCH*.

La família de factors de transcripció *GATA-Binding Protein* està integrada per 6 membres altament homòlegs en el seu domini d'interacció amb el DNA caracteritzats per la seva unió al denominat motiu GATA, amb una seqüència consens (T/A)GATA(A/G) (MacNeill *et al.*, 1997)

Com a primera aproximació per confirmar la predicció per GATA, vam realitzar assajos de competició del retard de -429 amb oligonucleòtids freds que incorporaven la seqüència consens per a la família GATA (GATA WT, T_{AULA} 5). Com a control negatiu de la competició empràrem també la versió mutada de la consens (GATA MUT) que presentava el canvi de dos nt destruint el motiu GATA. Es va incubar extracte nuclear de les cèl·lules PCT3 amb l'oligonucleòtid de -429 marcat radioactivament amb ³²P en presència de quantitats creixents de la seqüència GATA WT o GATA MUT sense marcar durant 30 min a 37 °C. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0,5x. Com podem veure a la FIGURA 43, excessos de la seqüència consens per GATA WT (carrils 2 a 7) esborren progressivament el retard de -429 (carril 1). Els mateixos excessos de la seqüència consens mutada GATA MUT en canvi, no competeixen el retard. Aquest

experiment ens indicava que el factor (o factors) present als extractes nuclears de PCT3 que s'unia a -429 presentava també afinitat per la seqüència canònica dels factors de transcripció GATA i l'unia. Això suposava doncs un indicatiu que aquest element era un factor GATA. D'altra banda, amb aquest experiment tornàvem a constatar que la unió a -429 és específica en no veure's competida indiferentment per qualsevol seqüència a l'atzar.

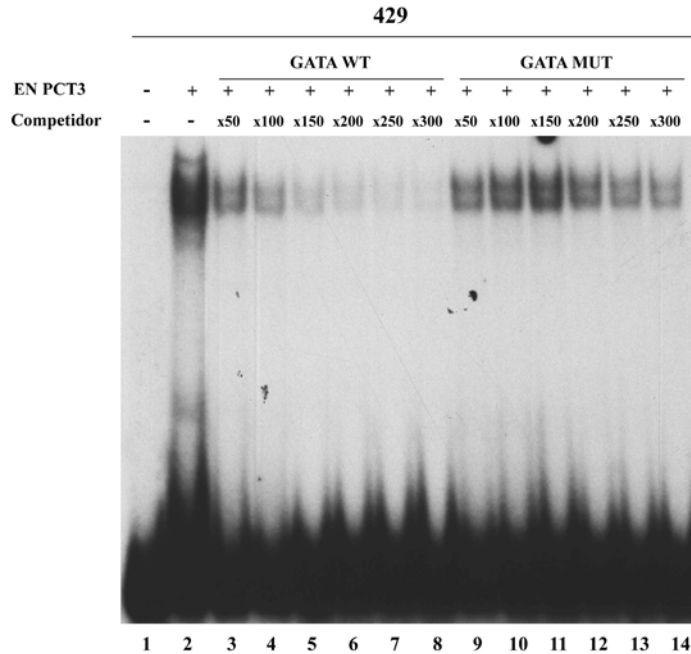


FIGURA 43. Competició del retard de la seqüència -429 amb la seqüència consens per factors GATA. S'incubà l'oligonucleòtid -429 marcat amb ^{32}P amb extracte nuclear de PCT3 en presència d'oligonucleòtids no marcats (*Competidor*) representatius del motiu consens per a GATAs (*GATA WT*) i de la versió mutada (*GATA MUT*) en excessos creixents. Les diferents combinacions s'incubaren durant 30 min a 37°C. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia.

4.1.1 Estudi de l'expressió dels factors de transcripció GATA a la línia cel·lular PCT3

La regulació transcripcional que exerceixen els diferents membres GATA està altament delimitada pels seus patrons d'expressió tissular específics. Pel què fa al ronyó concretament, és recurrent la descripció de GATA-3 com a factor determinant en el desenvolupament renal humà i de ratolí i se l'ha implicat en diverses patologies renals (Van Esch *et al*, 2001).

Aquest fet ens va portar, abans d'abordar la identificació del suposat membre GATA que podia estar unint -429, a determinar quins dels 6 factors GATA trobàvem, a nivell de RNA missatger, a la línia PCT3, context en el qual s'havia determinat la rellevància inductora de la caixa -429 en el promotor del gen de la KAP.

Es dissenyaren *primers* específics per a cadascun dels 6 factors que en permetessin l'amplificació específica, descrits en la Taula 6 (vegeu Materials). Es va extreure l'RNA total de les cèl·lules PCT3 mitjançant el protocol Chomczynsky (vegeu Mètodes) i a partir d'aquest s'intentaren amplificar els diferents membres GATA per *Reverse-Transcriptase PCR* (vegeu Mètodes). Com a control positiu del bon funcionament dels *primers* es realitzaren les mateixes reaccions de RT-PCR a partir de l'RNA total extret d'un embrió de 17 dies de ratolí de la soca C/57BL6 (de la qual procedeixen les PCT3) estadi en el qual s'expressen tots els factors GATA. Els productes de cada reacció es van separar electroforèticament en un gel d'agarosa (vegeu Mètodes). Davant de la diversitat de productes amplificats a l'RNA embrionari per algun dels GATA i la lleu intensitat dels obtinguts a partir de l'RNA de les PCT3 ens va caldre recórrer al *RT-PCR Southern*, una tècnica més sensible que ens permetés detectar quantitats infimes d'amplicons i a la vegada determinar-ne l'especificitat. A tal efecte es va fer la transferència del cDNA amplificat a una membrana de niló i realitzàrem hibridacions amb sondes específiques per a cada factor GATA (Taula 8) marcades radioactivament amb ^{32}P (vegeu Mètodes).

D'aquesta manera es determinà que l'únic factor GATA que s'expressa a la línia cel·lular PCT3 és GATA-3 (Figura 44).

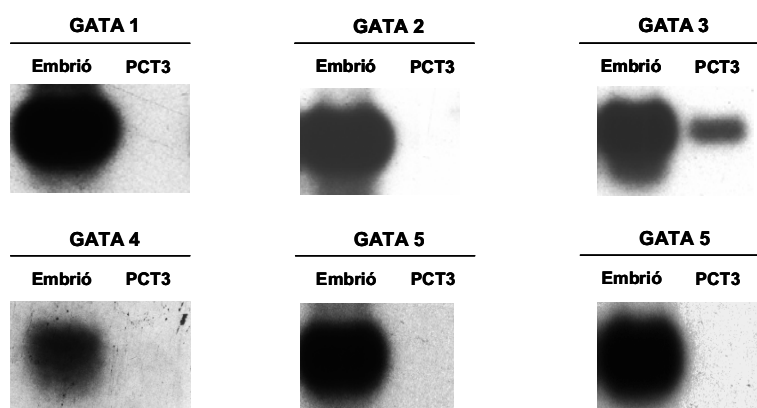


FIGURA 44. Anàlisi de l'expressió dels 6 membres GATA a la línia PCT3 per *RT-PCR-Southern blot*. A partir d'RNA d'embrió de ratolí (*Embrió*) com a control positiu i RNA de cèl·lules PCT3 (*PCT3*) s'obtingueren productes d'amplificació amb *primers* específics per a cada membre GATA. El DNA amplificat for resolt en un gel d'agarosa i posteriorment transferit a una membrana de nitrocel·lulosa on s'hibridà amb oligonucleòtids marcats radioactivament que reproduïen part de la seqüència específica dels diferents factors GATA.

4.1.2 Anàlisi de la putativa unió de GATA-3 a la caixa -429

Després del resultat anterior, es podia afirmar que si el retard obtingut amb la caixa -429 amb extracte de PCT3 era provocat per un factor GATA aquest havia de ser GATA-3. Per tal de comprovar si això era cert, es van realitzar per una banda assajos d'inducció del promotor de KAP amb aquest factor i per l'altra experiments EMSA.

Mitjançant *primers* específics, s'amplificà per RT-PCR a partir de l'RNA embrionari de ratolí, el cDNA de GATA-3 i es clonà al vector pSG5 (vegeu MÈTODES). Aquest plasmidi ens permetia tant l'expressió per transfecció en cèl·lules eucariotes com l'expressió en un sistema *in vitro* via promotor T7.

Procedirem a realitzar experiments de retard en gel. S'empraren de nou els oligonucleòtids representatius de -429 juntament amb els de la seqüència consens per a GATA WT com a control positiu. La proteïna GATA-3 s'expressà *in vitro* en el sistema de reticulòcit (vegeu MÈTODES). Per a l'assaig s'usà també l'anticòs HG3-31 de SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY dirigit contra la proteïna GATA-3 de ratolí. D'aquesta manera es va poder veure com tot i obtenir un retard en incubar la proteïna amb la caixa -429 aquest no era degut a la unió de GATA-3 (FIGURA 45). La presència de l'anticòs anti-GATA-3 no desplaçava el retard de -429 amb l'extracte de reticulòcit cap a una posició superior en el gel (carril 5). L'anticòs en canvi si que reconeixia com a GATA-3 una de les proteïnes que hibridaven amb la seqüència GATA WT provocant un *supershift* (carril 9). GATA-3 no unia per tant, com a mínim *in vitro*, la seqüència -429.

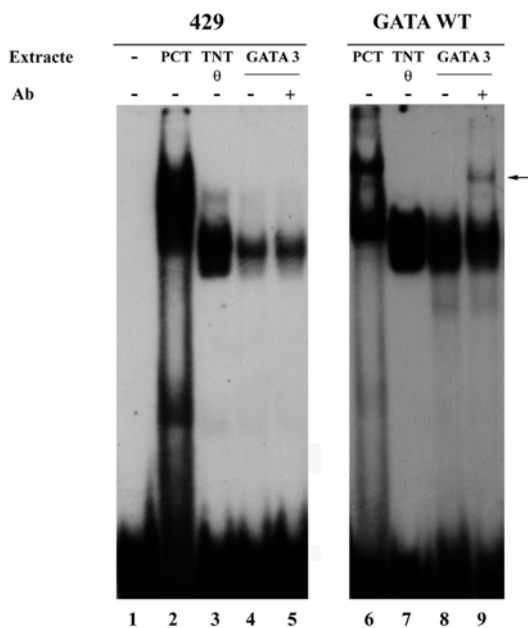


FIGURA 45. Anàlisi de la unió de GATA-3 a la caixa -429 del promotor del gen de la KAP. S'incubà l'oligonucleòtid marcat amb ³²P representatiu de -429 amb proteïna GATA-3 expressada *in vitro* en el sistema TNT durant 30 min a RT. S'afegiren anticossos (Ab) anti-GATA-3 a la incubació per constatar la identitat com a responsable del retard obtingut. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0,5%. Com a control positiu s'incubà també GATA-3 expressat *in vitro* amb la seqüència consens per factors GATA (GATA WT).

D'altra banda els assajos de transfecció transitòria de GATA-3 i el constructe K638 en cèl·lules PCT3 realitzats simultàniament reflectiren una manca d'inducció de l'activitat luciferasa per part del factor. La presència de GATA-3 no engegà una resposta incrementada del promotor del gen de la KAP respecte a la seva activitat basal en cap dels 4 assajos que es realitzaren (resultats no mostrats).

Amb totes aquestes dades decidirem descartar GATA-3 com a factor que intervingui en la regulació del gen de la KAP a través de la caixa -429 pb.

4.2 CROMATOGRAFIA D'AFINITAT: Anàlisi de la possible unió per SF-1

4.2.1 Cromatografia d'Afinitat: l'RNA Helicasa DDX20

Una altra estratègia ideada per abordar la identificació del factor de transcripció que uneix la seqüència situada a -429 pb del promotor del gen de la KAP, fou la cromatografia d'afinitat.

Seguint el protocol proposat per Kumar *at al.* (2001), es van generar els fragments de 150 pb del promotor de KAP que s'estenien de la posició -487pb a -330pb mitjançant amplificació per PCR a partir del constructe K638 amb *primers* específics (vegeu MÈTODES). L'extrem 5' d'aquests fragments, denominats d'ara endavant *429wt*, restava modificat per la unió covalent d'una molècula de biotina. D'aquesta manera es construïa la columna d'afinitat mitjançant la unió via biotina dels fragments del promotor de KAP a boles magnètiques recobertes d'estraptavidina. La columna era incubada a 4°C durant 3 hores amb la totalitat d'un lot d'extracte nuclear de cèl·lules PCT3 procedent de 10 plaques de 10 cm de diàmetre en les condicions de tampons i competidors inespecífics habituals en els assajos EMSA per la caixa -429. Posteriorment es realitzaven rentats de la columna amb tampó d'incubació que incorporava oligonucleòtids *429mut* lliures de seqüència idèntica als *429wt* integrants de la columna però que presentaven la caixa -429 delecionada. D'aquesta manera s'intentava eliminar les proteïnes que estaven unint altres regions del DNA dels fragments fora de la caixa 429. Finalment s'el·luïa la columna incubant-la amb tampó de *Laemmli* 5 min a 100 ° C. Els rentats i l'el·luït eren resolts electroforèticament en gels d'acrilamida al 12% que seguidament eren sotmesos a tinció amb nitrat de plata. Les bandes diferencialment presents en l'el·luït eren retallades del gel i

sotmeses a identificació per espectrometria de masses MALDI-TOF al Servei de Proteòmica LP-CSIC/UAB dirigit pel Dr. Avian.

Al llarg d'aquest treball s'han realitzat múltiples experiments de cromatografia d'afinitat i s'han anat adequant i modificant les condicions en cada assaig. La figura W mostra un dels gels obtinguts en les cromatografies on s'aprecien bandes diferencials en l'eluit.

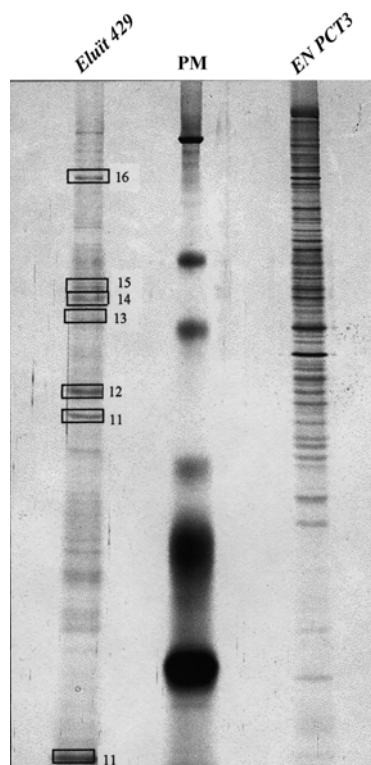


FIGURA 46. Resultat d'una cromatografia d'afinitat de DNA de la seqüència -429 del promotor del gen de la KAP. L'eluit procedent de la incubació d'una columna d'afinitat que contenia oligonucleòtids representatius de la caixa -429 amb extracte nuclear de cèl·lules PCT3 fou resolt per SDS- 12 % PAGE i posteriorment tenyit amb nitrat de plata. Els requadres indiquen les bandes diferencialment presents a l'eluit respecte l'extracte de PCT3 cru (ENPCT3) que foren analitzades per espectrometria de masses MALDI-TOF al Servei de Proteòmica LP-CSIC/UAB dirigit pel Dr. Avian. PM: marcador de pes molecular.

De totes les proteïnes identificades en aquests experiments entre les quals sovint trobàvem histones i diferents isoformes de l'estreptavidina integrant de la columna d'afinitat, una ens va cridar especialment l'atenció. En l'experiment que es resolgué en el gel de la FIGURA 46 s'identificà la banda 1.5 com a "*Probable ATP-dependent RNA helicase DDx20*". En revisar la bibliografia al respecte ens adonàrem que aquesta proteïna, tot i no interaccionar directament amb el DNA i desenvolupar com tots els membres de la família DExD/H box helicases les funcions pròpies de les RNA helicases de processament i metabolisme de l'RNA, havia estat relacionada amb la regulació transcripcional en contextos molt concrets gràcies a les seves limitades i específiques interaccions amb certs factors de transcripció (Fuller-Pace, 2006). També anomenada DP103 o Gemina 3,

Disposàvem del plasmidis pCMV-SF1 i pSG5-SF1 codificants per la forma madura de SF-1 que amablement ens cedí el Dr. Marrero del Departament de Bioquímica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Ens disposàrem doncs a testar la capacitat d'SF-1 d'induir el promotor del gen de la KAP i a la vegada la possible unió d'aquest a la caixa -429.

Per realitzar els assajos EMSA es va expressar *in vitro* la proteïna SF-1 utilitzant el vector pSG5-SF1. En un primer assaig senzillament es va incubar la proteïna amb l'oligonucleòtid de -429 en les condicions habituals per a la caixa. Com a control negatiu es va hibridar l'oligonucleòtid amb el lisat de reticulòcit mancat del plasmidi d'expressió (sense contenir per tant SF-1). El resultat (FIGURA 48) mostrà una banda retardada amb el lisat que contenia SF1 i aquesta no es corresponia amb la banda inespecífica produïda pel lisat de reticulòcit sol.

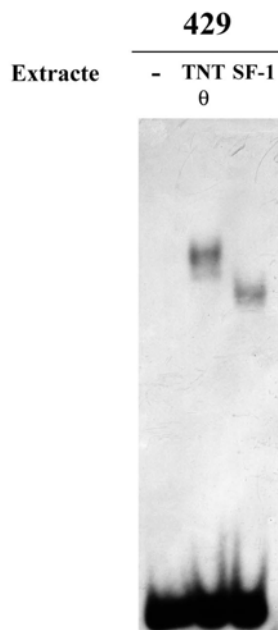


FIGURA 48. Anàlisi de la possible unió de SF-1 a la caixa -429. S'incubà proteïna SF-1 expressada *in vitro* amb l'oligonucleòtid 429 marcat amb ³²P 30 min a 37 °C. El resultat es resolgué en in gel d'acrilamida al 8 % i 0.5x TBE que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia. Com a control negatiu del retard obtingut, s'incubà també 429 amb extracte proteic de reticulòcit sense vector d'expressió (TNT θ).

Per tal de verificar la identitat de la proteïna que retardava la caixa -429 com a SF-1 realitzàrem primerament competicions del retard. El promotor del gen de l'aromatasa conté un lloc per SF-1 on aquest s'uneix amb alta afinitat regulant de manera determinant l'expressió del gen a les glàndules suprarenals (Ito *et al.*, 2000). Com a competidors freds doncs s'usaren els oligonucleòtids representatius d'aquesta regió del promotor del gen de l'aromatasa (vegeu T_{AULA} 5). La sonda de -429 fou incubada amb SF-1 expressat *in vitro*

en presència de quantitats creixents, des de 5x a 50x respecte el DNA marcat, dels oligos de l'aromatasa no marcats durant 30 min a 37°C. El gel al 5% d'acrilamida i 0,5x TBE en el qual s'obtingué el resultat ens mostrà una competició altament eficient del retard de -429 per part dels oligonucleòtids de l'aromatasa. A partir de l'addició d'un excés 10x de competidor fred, el retard obtingut anava esmorteint el seu senyal fins a pràcticament desaparèixer amb excessos 30x (FIGURA 49 carril 6). La proteïna causant del retard de -429 presentava alta afinitat per la regió del promotor de l'aromatasa al qual s'uneix SF-1.

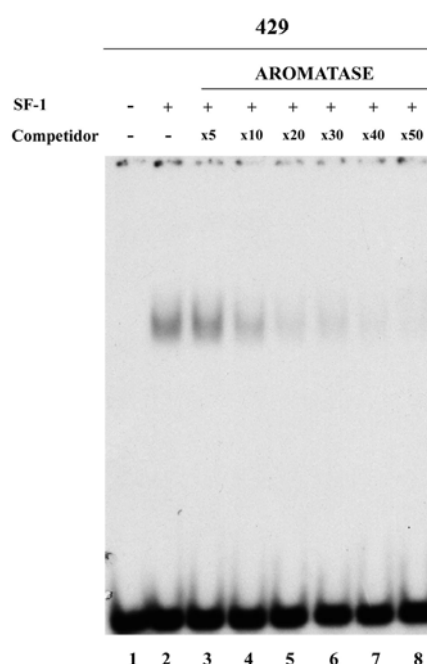


FIGURA 49. Competició del retard de la caixa -429 amb SF-1 per la seva seqüència diana del promotor de l'aromatasa. S'incubà l'oligonucleòtid -429 marcat amb ^{32}P amb proteïna SF-1 expressada *in vitro* en presència d'oligonucleòtids no marcats (*Competidor*) representatius de l'element diana per SF-1 present al promotor del gen de l'aromatasa (*Aromatase*) en excessos creixents. Les diferents combinacions s'incubaren durant 30 min a 37°C. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film

La prova definitiva de la unió de SF1 a -429 era un assaig de *supershift* amb anticossos dirigits contra SF-1. L'oferta comercial d'anticossos anti-SF1 aptes per a la tècnica no era gaire àmplia i el test de l'anticòs produït per SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY no resultà útil davant la seva incapacitat per retardar el *shift* de l'aromatasa ni reconèixer SF-1 en una immunodetecció de cèl·lules PCT3 transfectades amb el vector d'expressió per la proteïna

(resultats no mostrats). Revisant la literatura ens adonàrem de les múltiples cites en assajos EMSA a l'anticòs anti-SF-1 generat al laboratori del Dr. Morohashi de l'Institut Nacional de Biologia Bàsica d'Okazaki (Japó). Se'ns fou cedida amablement una alíquota de l'anticòs i el testàrem en els nostres experiments. A tal efecte incubàrem la sonda -429 amb SF-1 en presència i absència de l'anticòs i com a control positiu férem el mateix amb la sonda del promotor de l'aromatasa. Els resultats desgraciadament no foren informatius ja que l'afegitó del sèrum anti-SF-1 provocava una degradació de les sondes assajades que suposaven la desaparició del retard (FIGURA 50).

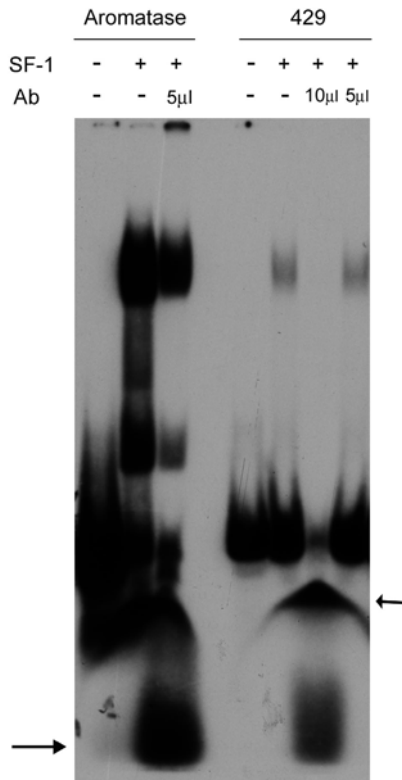


FIGURA 50. Supershift dels retards de les seqüències -429 i Aromatase amb anticòs anti-SF-1. A les incubacions dels oligonucleòtids marcats radioactivament -429 i Aromatase amb proteïna SF-1 expressada en reticulòcit s'afegiren 5 µl i 10 µl de l'anticòs (Ab) contra SF-1 cedit. L'afegitó del sèrum es realitzà després de 30 min d'incubació dels DNAs i l'extracte a 37 °C i posteriorment s'allargà la incubació 10 min més. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8%, que fou assecat i exposat a un film d'autoradiografia. Les fletxes indiquen la presència de senyal radioactiu per sota de la zona on es troba la sonda lliure, molt probablement deguda a la presència de productes de mida inferior o fins i tot el propi ³²P per degradació de les sondes en presència del sèrum d'anticòssos.

Durant la discussió de la nova estratègia a seguir per a l'obtenció d'un *supershift* fiable (novembre 2006), es produí l'aparició en la literatura de l'*ahead of print* de l'article *The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney* de Shu *et al.* en el qual es realitzava un estudi de l'expressió dels diferents receptors nuclears, entre els quals es trobava SF-1, en les diferents regions del ronyó de ratolí. Mitjançant experiments

d'immunohistoquímica, els autors pogueren descartar l'expressió de SF-1 en les cèl·lules del túbul proximal contort. Aquest fet ens va portar a abandonar la possible regulació del gen de la KAP per SF-1 a les cèl·lules S1/S2 del túbul proximal contort.

En els assajos de transfecció transitòria de quantitats creixents (de 0,05 a 0,3 µg) del vector d'expressió pCMV-SF1 en cèl·lules PCT3 no aconseguírem veure una inducció significativament superior a la basal de l'activitat luciferasa del constructe K638. La cotransfecció transitòria d'SF-1 amb AR i Sp1 i el tractament androgènic tampoc aconseguí potenciar ni modificar les respostes engegades per aquests dos activadors de l'expressió de KAP (resultats no mostrats).

4.3 PREDICCIÓ *IN SILICO* TESS: Anàlisi de la possible unió per GR

Un darrer anàlisi de la seqüència del promotor del gen de la KAP al voltant de -429 pb de l'inici de transcripció mitjançant l'algoritme de predicció Transcription Element Search System (TESS, <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) ens va indicar, entre una multitud d'altres factors entre els que es trobaven de nou C/EBPs i GATAs, la possible participació de part de la caixa en un putatiu element de resposta a receptors nuclears (Fig YY). Era especialment recurrent i ens va cridar molt l'atenció la predicció que apuntava a un element de resposta a glucocorticoides (GRE) i/o element de resposta a progesterona (PRE).

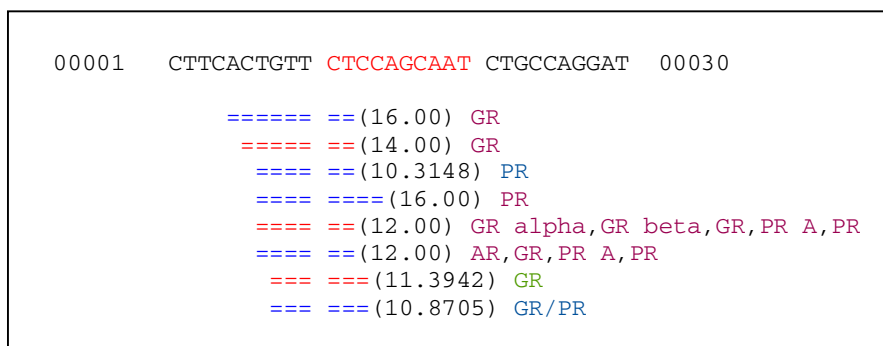


FIGURA 51. Predicció del programa TESS de factors de transcripció afins a la caixa 429. Extracte de la predicció per als 30 bp que inclouen la caixa -429 al promotor de gen de la KAP realitzada al programa TESS. Es mostren les repetitives indicacions d'elements de resposta a GR i PR.

Coneixent l'important paper que juguen les hormones en la regulació del gen de la KAP, vam creure convenient procedir a la verificació d'aquesta predicció per -429 que sorprenentment i per primer cop apuntava cap als receptors nuclears.

L'expressió de GR a les cèl·lules del túbul proximal contort de ronyó de ratolí i a la línia cel·lular que en deriva PCT3 havia estat constatada al nostre laboratori anteriorment (Ouar *et al.*, 1998). Mitjançant la immunodetecció d'un extracte proteic dels passes actuals de PCT3 amb anticossos contra GR (M-20 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) veiérem com contràriament amb el que ha succeït per AR, l'expressió de GR es manté actualment a les PCT3 (FIGURA 52).

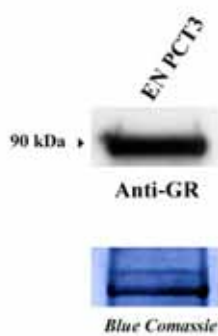


FIGURA 52. Immunodetecció de GR en l'extracte nuclear de cèl·lules PCT3. 10 µg d'extracte nuclear de cèl·lules PCT3 (PCT3) es separaren per SDS-12% PAGE i es transferiren a una membrana de PVDF. La immunodetecció es va dur terme amb l'anticòs anti-segons corresponia a una dilució 1: 1000 tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2 de MÈTODES. Es mostra també la membrana transferida tenyida amb *blue comassie* com a control de càrrega.

4.3.1 Inducció del promotor proximal del gen de la KAP per GR i dexametasona

Vam creure convenient constatar un possible efecte d'aquest nou element hormonal en joc, els glucocorticoides, sobre el promotor del gen de la KAP un cop vist a més, que el context de les cèl·lules PCT3 presentava el factor de transcripció executor de les seves accions, és a dir el GR.

Volguérem veure per tant, quina era la resposta del promotor proximal del gen de la KAP en les cèl·lules PCT3 davant la presència del receptor de glucocorticoides i el tractament hormonal amb un dels seus lligands, la dexametasona. A tal efecte es realitzaren assajos de transfecció transitòria en cèl·lules PCT3 del constructe K638 amb el plasmidi d'expressió pSG5-GR codificant per la forma madura del GR que ens fou amablement cedit pel Dr. Thompson del AR Lab dirigit pel Dr. Jänne al Dpt. de Fisiologia de la Universitat d'Hèlsinki. Donada les descripcions d'interacció i sinèrgia entre Sp1 i els

diferents receptors nuclears, i havent vist la rellevància d'Sp1 al promotor proximal de KAP, combinàrem juntament amb GR la cotransfecció d'Sp1. Les cèl·lules foren sotmeses a tractament amb 100 nM de dexametasona durant 48 hores posttransfecció moment en el que se n'obtingueren els extractes i se'n mesurà l'activitat luciferasa i SEAP. La FIGURA 53 mostra els resultats obtinguts. Mentre que la transfecció de GR no suposava un increment de l'activitat basal de K638, el tractament hormonal simultani amb 100 nM de dexametasona suposava un augment de l'activitat luciferasa d'unes 4.5 vegades respecte al promotor sol. S'observava per tant una certa resposta a glucocorticoides per part del fragment de promotor. La combinació de GR amb Sp1 en absència d'hormona pràcticament no tenia efecte sobre la resposta generada per Sp1 tot sol, però quan s'incorporava la dexametasona, l'activitat luciferasa incrementava molt, passant a ser ~34 cops la del promotor sol.

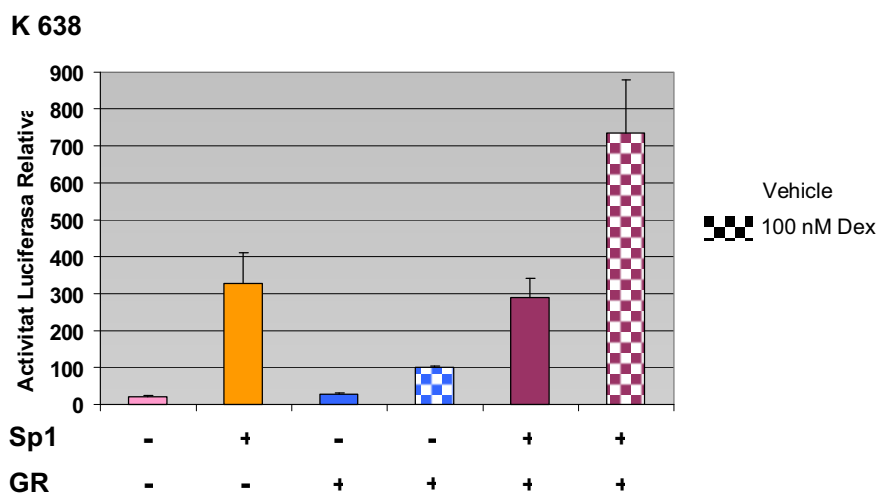


FIGURA 53. Anàlisi de l'activitat del promotor proximal del gen de la KAP en presència de glucocorticoides i el factor Sp1. Mesura de les activitats luciferasa del constructe K 638 cotransfectat en cèl·lules PCT3 amb els plasmidis d'expressió per GR pSG5-GR i Sp1 pCMV-Sp1, en absència i presència de glucocorticoides (100 nM dexametasona). Els valors estan estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja + SD (desviació estàndar) de tres experiments independents, realitzats per triplicat.

Aquests resultats tot i representar una resposta no exageradament elevada als glucocorticoides, assenyalaven en direcció a un possible efecte de GR sobre el promotor proximal del gen de la KAP. Està clarament establert però el fet que els membres de la família de receptors nuclears comparteixen afinitat per les mateixes seqüències de DNA, presentant un mateix element de resposta consens comú (Claessens *et al.*, 2001). Una conseqüència evident d'això és l'elevada promiscuïtat descrita per AR i GR a l'hora d'unir

el DNA, ja que tot dos resulten capaços en certs casos d'unir tant AREs com GREs. Tot això requeria demostrar per tant, que els efectes vistos per GR sobre el fragment de 638 pb del promotor de KAP, força similars als que obteníem per AR, no eren deguts a la unió d'aquest a l'ARE situat a -39 pb del promotor de KAP.

4.3.2 Estudi de la unió de GR a l'ARE i la caixa -429 del promotor del gen de la KAP

Es realitzaren experiments de retard en gel amb els oligonucleòtids representatius de la caixa -429 sobre la qual s'havia fet la predicció d'un HRE i dels de la seqüència ARE del gen de KAP. D'altra banda s'expressaren mitjançant el sistema de reticulòcit les proteïnes GR i AR a partir dels seus corresponents plasmidis pSG5 codificants (cedits amablement pel Dr. Jänne). Els oligonucleòtids marcats radioactivament s'incubaren amb les diferents proteïnes durant 30 min a RT, condicions que afavoreixen la unió *in vitro* dels receptors nuclears. Per a cada situació es va incloure l'addició d'anticossos específics per als receptors assajats. El resultat es resolgué en un gel al 5 % d'acrilamida, 0,01% d'NP40 i 0,5x de TBE. Aquest EMSA ens permeté veure d'entrada que l'ARE de KAP és unit *in vitro* exclusivament per AR (FIGURA 54 carrils 2 i 3). GR no generava retard de la sonda KAP ARE mentre que AR provocava l'aparició d'una banda que era específicament retardada per un anticòs anti-AR. La segona conclusió a què ens portava aquest assaig era que tot i la predicció, la caixa -429 no era un punt d'unió, al menys *in vitro*, pels receptors nuclears en no presentar retard amb cap dels dos membres assajats. Tot i això, per poder concloure taxativament que realment GR no s'uneix a l'ARE del promotor de KAP, caldria realitzar un assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) ja que la unió de factors de transcripció en els assajos EMSA es realitza en unes condicions molt allunyades de les fisiològiques *in vivo* pròpies de les cèl·lules.

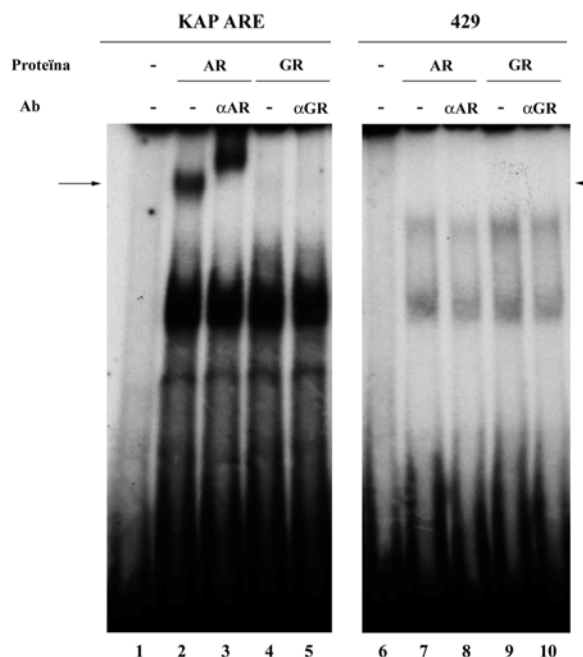


FIGURA 54. Anàlisi de la unió de GR a la caixa -429 i a l'element ARE del promotor del gen de la KAP. S'incubà l'oligonucleòtid marcat amb ^{32}P representatiu de -429 i el representatiu de l'element ARE amb proteïnes (*Proteïna*) AR o GR expresades *in vitro* en el sistema TNT durant 30 min a RT. S'afegiren anticossos (*Ab*) anti-AR o anti-GR a les incubacions corresponents per constatar-ne la identitat com a responsables dels possibles retards obtingut. El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0,5%.

4.3.3 Inducció del promotor proximal del gen de la KAP per andrògens i glucocorticoides

La inducció dels 638 pb del promotor de KAP per GR i dexametasona en principi no mitjançada per la seva unió a l'ARE ens portà a determinar quina era la resposta que s'engegava quan es produïa la coexistència amb l'AR tal i com es produeix a les cèl·lules PCT3 (que inicialment disposaven de l'AR). Aquest estudi podia ser rellevant fisiològicament ja que, si bé andrògens i glucocorticoides majoritàriament regulen gens i vies molt diferents, també es dona la descripció de gens sotmesos a la regulació d'ambdues hormones (vegeu INTRODUCCIÓ).

L'assaig de cotransfecció però presenta certes limitacions. S'ha realitzat una primera aproximació a aquest estudi que caldria desenvolupar posteriorment de manera més específica amb lligands farmacològics antagonistes específics de cada receptor nuclear per a treure'n conclusions quantitatives. Es transfectaren cèl·lules PCT3 amb el constructe

K638 i amb els plasmidis d'expressió per a AR i GR i també per a Sp1 com a factor col·laborador d'ambdós receptors vistos anteriorment. Les cèl·lules es sotmeteren a diferents combinacions de tractament amb DHT i dexametasona en les concentracions habituals durant 48 hores posttransfecció. Les activitats luciferases corresponents es representen a la FIGURA 55.

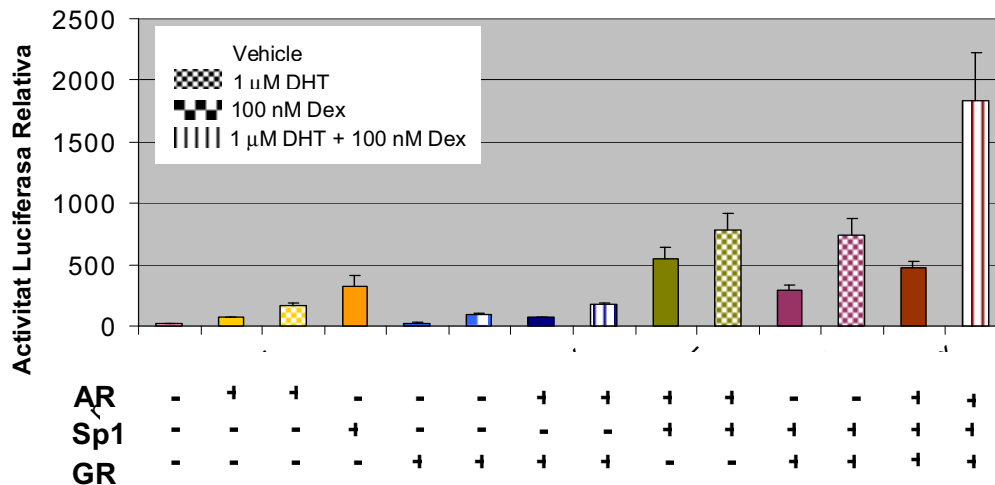


FIGURA 55. Anàlisi de l'activitat del promotor proximal del gen de la KAP en presència d'andrògens, glucocorticoides i el factor Sp1. Mesura de les activitats luciferasa del constructe K 638 cotransfectat en cèl·lules PCT3 amb els plasmidis d'expressió per AR pSV-AR₀, per GR pSG5-GR i Sp1 pCMV-Sp1, en absència i presència d'andrògens (1μM) i/o glucocorticoides (100 nM dexametasona). Els valors estan estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja + SD (desviació estàndar) de tres experiments independents, realitzats per triplicat.

L'experiment representa un indicatiu que la presència simultània d'AR i GR en cèl·lules sotmeses a l'acció tant d'andrògens com de glucocorticoides podria suposar, essent present també Sp1, una inducció superior del promotor proximal del gen de la KAP a la que provoca la presència individual de cadascun d'ells. Fins ara, la resposta màxima obtinguda en els assajos d'inducció del promotor K638 havia estat la produïda per AR i andrògens i Sp1, que és d'unes ~50 vegades respecte l'activitat basal del constructe. Si a aquesta situació hi afegim el GR i els glucocorticoides obtenim una activitat luciferasa de fins a ~80 cops la basal. Semblaria per tant que el GR podria resultar un possible factor implicat en la regulació transcripcional del gen de la KAP, potser mitjançant accions indirectes que afavoreixin l'expressió del gen en les cèl·lules PCT3 o potser realment via la seva interacció directa amb algun element del promotor.

Cal destacar però, que per obtenir un efecte combinat d'AR i GR més les seves corresponents hormones, cal que Sp1 també hi sigui present. Quan es cotransfecten

únicament els dos receptors nuclears no s'obté més activitat que la que genera la presència individual d'un d'ells, d'unes ~5 vegades la basal. Quan Sp1 és juntament cotransfectat es pot apreciar l'efecte de tots dos receptors simultàniament, efectes que se sumen i s'afegeixen al de Sp1 obtenint la inducció màxima del fragment K638 observada fins ara.

Resulta però interessant veure que GR és capaç de promoure la transcripció del gen actuant en el promotor proximal de la KAP, de manera més eficaç en presència d'Sp1, però en qualsevol cas en absència d'AR i andrògens. Seria per tant una possible via inductora del gen de la KAP en contextos no androgènics.

Malgrat la nova àrea de recerca en la regulació del gen de la KAP, que aquests resultats han encetat gràcies a la predicció del programa TESS per a la caixa -429, la identificació del factor que uneix aquesta seqüència segueix pendent. Després de les múltiples estratègies i prediccions seguides continuem deixant la porta oberta a la cerca d'aquest possible element regulador del gen de la KAP.

5. Anàlisi de la interrelació entre els diferents elements reguladors de l'activitat transcripcional del promotor proximal del gen de la KAP

Fins al moment i prenent com a regió analitzada els primers 638 pb del promotor del gen de la KAP, s'han identificat 4 seqüències o caixes capaces de modificar l'activitat transcripcional del promotor proximal en assajos d'inducció *in vitro*.

En primer lloc s'ha vist com l'element de resposta a andrògens situat a -39 bp és unit per l'AR i sota tractament hormonal amb DHT incrementa unes ~5 vegades l'activitat basal del promotor (vegeu apartat 1 de RESULTATS). A continuació trobem a -98 pb una caixa GC sobre la que es pot produir tant la unió d'Sp1 com de Sp3 i permet que Sp1 engegui una activació del promotor d'uns ~20 cops (vegeu apartat 2 de RESULTATS). El treball anterior del nostre laboratori havia determinat la rellevància de les caixes situades a -457 pb i -429 pb en comprovar la caiguda de l'activitat del promotor de KAP si es prescindia de les seves seqüències. Hem vist com la seqüència -457 és unida per C/EBP β a PCT3 i la -429 per un factor que no ha pogut ser determinat (vegeu apartat 3 de RESULTATS). Finalment, experiments anteriors del nostre grup (Tesi Dra. Soler; Teixidó *et*

al., 2006) mostraven que tant C/EBP α com C/EBP β induïen l'activitat basal de K638 de ~2 a 4 cops i que la seva cotransfecció amb l'AR tenia cert efecte additiu sobre la inducció androgènica del constructe.

Tot i que al llarg de l'anàlisi dels diferents elements reguladors del promotor del gen de la KAP ja s'ha anat detectant col·laboració entre ells, com és ara l'efecte additiu de l'activació per AR i Sp1 (vegeu apartat 2 de RESULTATS) o l'additivitat també observada entre C/EBP α i β i la inducció androgènica del constructe, ens va semblar pertinent indagar sobre les possibles relacions que s'estableixen entre tots ells, el conjunt de factors activadors del gen, a l'hora d'endegar una resposta activadora comú.

Per tal de poder incloure el factor que uneix la caixa -429 en la determinació del paper que juga cada factor en la regulació del gen de la KAP, es realitzà la mutació selectiva de cada seqüència de DNA detectada com a important en aquesta resposta i s'estudià la seva repercussió en assajos d'inducció de l'activitat luciferasa.

Es disposava de versions del constructe K638 del promotor on havia estat mutada específicament la seqüència ARE (K638 ARE MUT), la caixa -429 (K638 -429 MUT) o la caixa -457 (K638 -457 MUT) (Soler *et al.* 2002; Tesi de la Dra. Soler; Teixidó *et al.*, 2006). Es dissenyaren oligonucleòtids específics per a la caixa GC situada a -98 pb que incorporaven el canvi dels nucleòtids -96 bp -CCCCGC- -91 bp per la seqüència diana de l'enzim de restricció EcoRI, -96bp -GAATTC- -91 bp. Aquest canvi dificultava la creació atzarosa en la nova seqüència d'un nou putatiu element diana per a altres factors de transcripció sense alterar les distàncies entre seqüències ni el nombre de nucleòtids del promotor. Mitjançant mutagènesi dirigida (vegeu MÈTODES) s'incorporà aquesta mutació al constructe K638 WT generant el constructe mutat K638 Sp1 MUT.

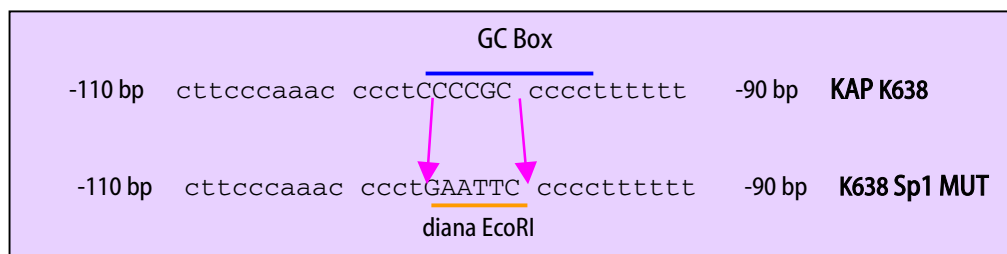


FIGURA 56. Esquema representatiu de la mutació introduïda en la caixa GC del constructe K638. Es mostra la seqüència salvatge, *wt*, corresponent a la regió de la caixa GC del promotor del gen de la KAP en la qual les fletxes assenyalen els nucleòtids substituïts en el constructe mutat K638 Sp1 MUT per una diana EcoRI amb la tècnica de mutagènesi. Aquest constructe ha permès analitzar els efectes que la manca d'unió d'Sp1 tenen sobre la transcripció del gen.

Els constructes mutants del promotor del gen de la KAP i la versió control K638 foren transfectats en cèl·lules PCT3 i s'estudià la resposta inductora que la cotransfecció dels factors C/EBP β , AR amb el pertinent tractament androgènic i Sp1 engegaven en cadascun d'ells. Els extractes cel·lulars i els medis es recolliren a les 48 hores posttransfecció i se'n determinà les activitats luciferasa i SEAP.

Els resultats d'aquest experiment (FIGURA 57) ens portaven a diverses deduccions.

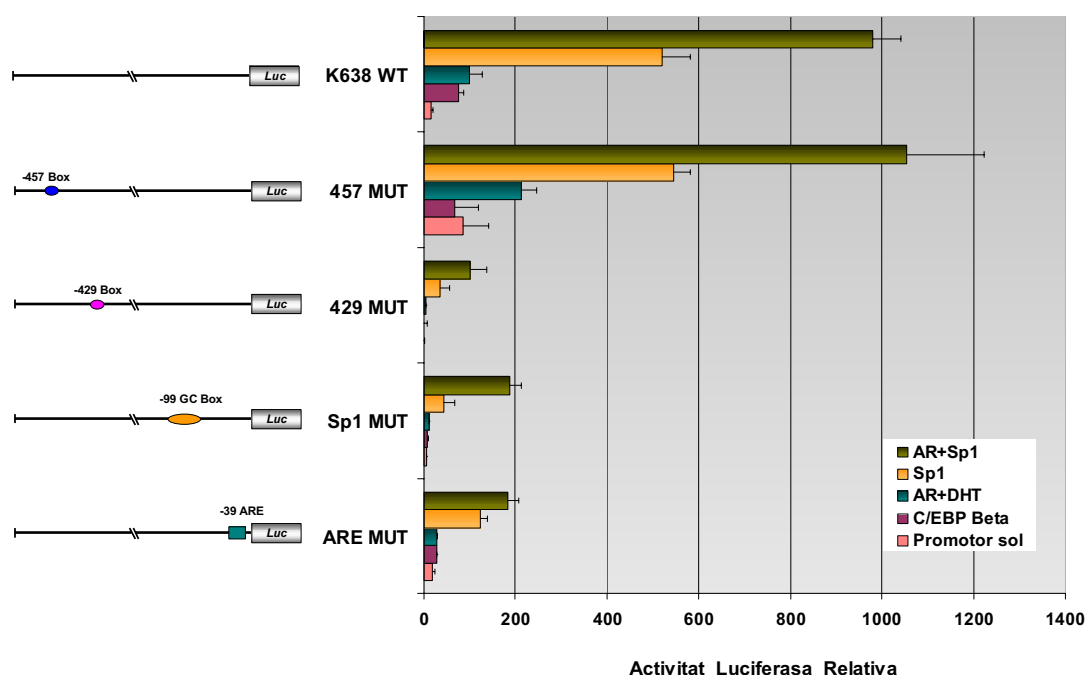


FIGURA 57. Anàlisi de l'activitat dels cosntructes mutats del promotor proximal del gen de la KAP en presència d'andrògens i els factors C/EBP β i Sp1. Es representen esquemàticament els constructes amb les seqüències que han estat mutades en cadascun d'ells. Mesura de les activitats luciferasa del constructe K 638 i dels constructes mutats generats cotransfectats en cèl·lules PCT3 amb els plasmidis d'expressió per AR pSV-AR₀, C/EBP β pMSV-LAP i Sp1 pCMV-Sp1, en absència i presència d'andrògens (1 μ M dexametasona). Els valors estan estandaritzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja + SD (desviació estàndar) de tres experiments independents, realitzats per triplicat.

En comparar les activitats obtingudes per als constructes mutants amb les que ofereix el fragment *wt* del promotor que es troba a K638, el fet més rellevant d'entrada és la caiguda de les induccions per AR i Sp1 als promotors ARE MUT, SP1 MUT i 429 MUT. En aquest sentit destaca també el manteniment de les respostes pròpies del fragment *wt* per al constructe 457 MUT. D'aquesta manera veiem com en mancar la seqüència

d'unió per a l'AR, per a Sp1 o la caixa -429 les respostes a AR i andrògens, a Sp1 i a la combinació d'ambdós factors s'atenuen molt significativament passant a ser ~ 4-5 cops inferiors. Examinant les respostes dels tres constructes amb més deteniment, s'aprecia que la mutació de l'ARE fa que pràcticament no s'obtingui més resposta que la basal en transfectar AR i tractar amb DHT. L'activitat en resposta a Sp1 disminueix molt notòriament i la combinació AR-Sp1 sols suposa un lleuger increment, ~12x, d'aquesta activitat la qual, si es té en compte l'error, bé podria correspondre's únicament a l'engegada per Sp1. Per a Sp1 MUT la caiguda de la resposta a Sp1 és encara més significativa reduint fins a ~2,7x els ~26 cops la basal del constructe K638. La resposta a AR i DHT manté encara un 2x respecte el basal i sorprenentment, la resposta combinada a AR-DHT i Sp1 tot i veure's reduïda, resulta similar a l'obtinguda en aquestes condicions per a ARE MUT. És a dir, tot i que a Sp1 MUT s'està dificultant la unió d'Sp1, la cotransfecció amb AR encara permet engegar una resposta ~12x similar a la que Sp1 aconsegueix quan AR no té lloc d'unió a ARE MUT. Aquests resultats semblen apuntar cap a una col·laboració en el promotor del gen de la KAP entre AR i Sp1 que es produeix de manera independent a la unió a DNA de cadascun d'ells, en el sentit que, tot i que un dels dos factors no es pugui unir al DNA, manté la capacitat de potenciar fins a cert punt la resposta del factor que s'uneix.

La caiguda més dramàtica de les induccions per AR i Sp1 s'obté però en mutar la caixa -429. L'absència d'aquesta seqüència suposa pràcticament la desaparició de la resposta a andrògens i una disminució de la resposta a Sp1 molt similar a la que s'obté en mutar la GC box. La col·laboració detectada tan evidentment entre AR i Sp1 al promotor del gen de la KAP s'ha de fer extensiva també al factor que uneix -429. En aquest experiment sembla clar que per tal que es doni la resposta a andrògens i Sp1 és indispensable no sols que hi hagi les seqüències d'unió per a aquests factors sinó també la seqüència de 10 nt situada a -429 pb. La inducció observada per andrògens i Sp1 seria per tant en realitat deguda a AR i Sp1 i a algun o alguns altres factors que s'unirien a -429 o les seves proximitats que col·laborarien conjuntament per permetre l'expressió de KAP en resposta a andrògens.

La mutació de la seqüència d'unió per C/EBP α/β en canvi, no té cap repercussió ni sobre l'activitat lucifèrica generada per AR i DHT ni sobre la que engega Sp1 ni sobre la deguda a tots dos factors. Amb el constructe 457 MUT obtenim unes activitats pràcticament idèntiques a les que presenta K638. Els factors C/EBP α i β no estarien intervenint en la resposta a andrògens de KAP dels primers 638 bp del promotor, ja que en aquest context la manca de la seva seqüència diana no altera aquesta resposta. D'altra banda, la transfecció del factor C/EBP capaç d'unir la caixa -457 en cèl·lules PCT3, és a

dir C/EBP β , no és capaç de generar per si sol una resposta del promotor 638 bp quan manca alguna de les seqüències ARE, GC Box o -429, ja que la resposta 5x que C/EBP β genera sobre el promotor *wt* desapareix en qualsevol dels constructes mutants. El factor C/EBP β per tant, tindria una influència poc important sobre els primers 638 bp del promotor de KAP i no seria determinant per a què es produís la resposta a andrògens que s'observa en aquest fragment.

DISCUSSION

El nostre laboratori ha estat interessat tradicionalment en l'estudi dels mecanismes de regulació androgènica en el ronyó, teixit que –particularment en ratolí– presenta una marcada inducció gènica en resposta a andrògens. Entre els gens sotmesos a aquesta regulació hormonal i amb una expressió pràcticament exclusiva del túbul renal trobem el de la *Kidney Androgen-regulated Protein*, l'estudi del qual ha centrat part de la feina duta a terme al nostre grup (Solé *et al.*, 1994; Solé *et al.*, 1996; Ouar *et al.*, 1998; Cebrian *et al.*, 2001; Soler *et al.*, 2002)

Tot i que es coneix l'existència d'un gran nombre de gens regulats per andrògens caracteritzats clàssicament a ronyó com són el mateix KAP, l'ornitina descarboxilasa o l'alcohol deshidrogenasa entre d'altres, es desconeixen a nivell molecular gran part dels mecanismes moleculars implicats en aquesta regulació específica i la seva significació fisiològica. Els andrògens al ronyó regulen un conjunt de gens coordinadament implicant l'establiment de xarxes gèniques, l'estudi de les quals pot portar a entendre el paper fisiopatològic del dimorfisme sexual renal.

En aquest sentit, l'anàlisi de les característiques funcionals de la proteïna KAP i les implicacions cel·lulars que la seva expressió suposa ha posat de manifest la importància que té en el sí de les cèl·lules del túbul proximal renal intervenint en processos tant rellevants com la progressió del cicle cel·lular o la protecció en front el dany per nefrotòxics i la immunosupressió que tan característicament i específica es produeix en aquest context cel·lular (Tesi Dra. O. Tornavaca). La rellevància funcional de la proteïna suggereix per tant el requeriment d'un control exhaustiu de les seves capacitats que com s'ha demostrat al nostre grup ocorre mitjançant diferents processos de degradació i determinació de la localització. Però la modulació de la dosi de la proteïna és un dels mecanismes fonamentals de la cèl·lula del túbul proximal per a poder delimitar-ne les accions i per tant, la regulació transcripcional del gen que la codifica esdevé primordial.

L'aprofundiment en l'estudi de la regulació del gen de la KAP desenvolupat al nostre laboratori prèviament ha permès aportar noves dades als mecanismes moleculars que determinen la regulació hormonal de l'expressió gènica a ronyó de ratolí i en aquest reball s'ha intentat modestament continuar amb aquesta escomesa.

Regulació transcripcional per andrògens al promotor de la KAP

La regulació per andrògens del gen de la KAP li és inherent i ha estat patent i evident des del mateix moment en què se'n va aïllar l'mRNA justament com un dels més abundants en el ronyó de ratolins mascles (Toole *et al.*, 1979). L'estudi exhaustiu d'aquest tipus de regulació hormonal desenvolupat al llarg dels anys al nostre laboratori ha anat assentant les bases moleculars que doten el promotor de la KAP de la seva característica inducció per andrògens. D'aquesta manera Soler *et al.* identificaren un element de resposta a andrògens situat a -39 pb del punt d'inici de la transcripció com a seqüència clau en la que s'articula la regulació androgènica. Els assajos de transfecció del promotor incorporant la delecció dels 6 primers nucleòtids del putatiu ARE assenyalaven la caiguda de l'activitat luciferasa que la transfecció d'AR i el tractament amb DHT engegaven sobre el constructe K224 intacte (Vegeu INTRODUCCIÓ). De manera indirecta per tant, s'induïa una regulació per unió directa de l'AR sobre el putatiu ARE que potenciarà la transcripció del gen en presència d'andrògens.

En la literatura però es descriuen casos com el de la secretoglobina 2A, gen clarament regulat per andrògens però de manera indirecta, sense necessitat de la unió física de l'AR al promotor del gen (Xiao *et al.*, 2005) sinó mitjançada per altres factors de transcripció units al DNA que interaccionen amb el receptor i li permeten exercir la seva acció transcripcional. També són cada cop més freqüents les descripcions d'accions no genòmiques de les hormones esteroïdals consistentes en respostes cel·lulars a les hormones no mitjançades per la seva acció directa sobre DNA sinó per activació / repressió de cascades de senyalització que acaben repercutint en altres factors de transcripció (Lösel *et al.*, 2003).

Durant l'anàlisi del promotor de la KAP es detecta la presència d'una caixa TATA consens que es troba formant part del segon hexàmer del putatiu ARE. La curiosa disposició d'ambdós elements suscita la qüestió sobre si realment es pot produir una unió simultània d'AR i de TBP sobre un mateix motiu de DNA o si al·lostèricament aquesta coincidència en l'espai és inviable. En un cas similar, al promotor del gen de l'osteocalcina es produeix un solapament total d'un element de resposta a glucocorticoides amb la caixa TATA del gen (Strömstedt *et al.*, 1991). En aquest context, GR i TFIID arriben a competir per la unió al DNA i els glucocorticoides reporten una inhibició de la transcripció.

Els experiments realitzats en aquest treball han permès veure com AR és realment capaç d'unir *in vitro* l'element de resposta a andrògens del promotor de la KAP pel què la

regulació androgènica del gen per acció directa del receptor en la regió reguladora queda força recolzada.

Restava però la incertesa de si el gen de la KAP podria arribar a comportar-se com un gen *TATA-less* en presència d'andrògens en cas que aquesta unió d'AR detectada impedisís la unió de TBP. Nous experiments de *binding* d'AR amb l'element de resposta a andrògens incorporant un canvi de nucleòtid letal per al reconeixement de la TATA per TBP (Quian *et al.*, 2001) han mostrat la capacitat mantinguda d'unio a l'element per part del receptor. Els assajos de transfecció transitòria del promotor proximal de KAP incorporant aquesta mateixa mutació han mostrat però una disminució accentuada de l'activitat luciferasa. Això ens ha portat a pensar que tot i que l'AR estigui present al promotor és necessari el reconeixement de la caixa TATA per TBP per tal que la transcripció del gen de la KAP pugui donar-se. El gen de la KAP és per tant un gen en el què la transcripció basal s'articula mitjançant una caixa TATA solapada parcialment amb l'ARE que serveix d'ancoratge a la inducció androgènica.

Tot i que als models de transgènics que aconsegueixen l'expressió androgen dependent i teixit específica utilitzant el promotor de KAP es seleccionen els primers 1542 bp (Ding *et al.*, 1997; Malstrom *et al.*, 2004), els estudis *in vitro* sobre el mínim fragment capaç de representar la resposta a andrògens assenyalaren que s'aconseguia eficientment emprant sols els primers 224 pb (Soler *et al.*, 2002). Dins d'aquest petit fragment de promotor proximal per tant, es troben els elements *cis* responsables de la resposta a andrògens. En aquest sentit havíem demostrat clarament la importància de l'ARE de -39 bp, però en la transactivació androgènica, és molt freqüent la cooperació i/o sinèrgia d'altres factors de transcripció que no essent NR, participen en la resposta a hormona. D'altra banda, la inducció per andrògens obtinguda en els assajos de transfecció d'AR en cèl·lules PCT3 assoleix uns valors modestos, d'uns ~5 cops l'activitat basal que disten força de la resposta observada *in vivo*, suggerint per tant la participació d'altres factors en aquest procés.

En els promotors de molts dels gens regulats per hormones es troben caixes GC i sovint s'ha implicat el factor Sp1 en la regulació transcripcional mitjançada per receptors nuclears (Husmann, *et al.*, 2000). Diversos estudis han mostrat la implicació de llocs d'unio per Sp1 en la inducció del receptor d'estrògens dels gens de la catepsina D, la *heat shock protein 27* (hsp27) o la uteroglobina (Krishnan *et al.*, 1994; Porter *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1998) i de manera similar en la inducció del gen de l'ubiquitina per glucocorticoides i en la inducció androgènica del gen de la *mouse vas deferens protein* (MVDP) (Karlseder *et al.*, 1996). En tots aquests casos un element de resposta a hormona conforma un element o unitat transcripcional combinada amb una caixa GC.

El promotor proximal del gen de la KAP presenta un element GC consens situat a -100 bp. S'ha testat tant la possible unió dels membres Sp com el seu putatiu paper en la regulació transcripcional del gen. D'aquesta manera s'ha comprovat que és molt probable que Sp1 esdevingui un activador transcripcional de KAP mitjançant la seva unió a la caixa GC del promotor ja que la seva transfecció en assajos d'activitat luciferasa ha suposat un increment notori, ~25 x, de l'activitat basal i s'ha constatat la seva afinitat per la seqüència en assajos de *binding*.

La cooperació transcripcional entre AR i Sp1 està àmpliament reportada en la literatura i s'han identificat diversos mecanismes que la mitjancen. Estudis de Lu *et al.* demostren que la sinèrgia detectada entre AR i Sp1 en la inducció del gen p21 és deguda no sols a la unió de cada factor als seu respectius elements diana sinó a la interacció directa d'ambdues proteïnes. Així AR i Sp1 s'acomplexen i recluten coactivadors i factors de transcripció generals que indueixen el gen (Lu *et al.*, 2000). També s'identifica la interacció proteïna-proteïna entre AR i Sp1 com a esdeveniment molecular responsable de la potenciació de la resposta a andrògens per Sp1 al promotor del gen PSA en cèl·lules LNCaP (Yuan *et al.*, 2005). Els assajos de Curtin *et al.* per contra demostren que una interacció entre AR i Sp1 suposa la inhibició per andrògens en rata de l'expressió del gen LH β estimulada per GnRH a causa del reclutament que AR fa d'Sp1 reduint en conseqüència la unió d'Sp1 al DNA (Curtin *et al.*, 2001). Altres mecanismes descrits per a la col·laboració entre AR i Sp1 inclouen per exemple l'existència de coreguladors comuns que actuen de pont entre ambdós factors. Aquest és el cas de SNURF (*Small Nuclear RING Finger Protein*) capaç de potenciar l'activació tant d'AR com de Sp1 i de tots dos conjuntament interaccionant-hi de manera simultània (Hakli *et al.*, 2002). Cal també considerar la inducció androgènica de la via de senyalització Src/Shc/Erk que pot afectar al potencial transactivador d'Sp1 (Migliaccio *et al.*, 2000) o les modificacions transcripcionals com l'acetilació i la SUMOilació que es troben també sota control hormonal i que regulen l'activitat transcripcional d'Sp1 i Sp3 (Braun *et al.*, 2001; Sapetschnig *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002). En tot cas per tant, les relacions entre Sp1 i AR poden resultar, majoritàriament, en una potenciació però també, en certs casos, en una supressió gènica i el que ocorre finalment pot dependre del gen diana particular, del tipus cel·lular o d'ambdues coses (Yuan *et al.*, 2005).

Ha estat interessant veure en aquest sentit que al promotor proximal del gen de la KAP es produeix una total cooperació positiva entre Sp1 i AR. La tímida inducció androgènica observada assoleix valors 10 vegades superiors quan es produeix en presència d'Sp1. Posteriorment, l'assaig de mutagènesi de cadascun dels elements reguladors del promotor de KAP a aportat indicis sobre en què pot consistir la potenciació entre Sp1 i AR en aquest

context. Així s'ha vist com tant la mutació de l'ARE com la de la caixa GC no han suposat la supressió de la inducció combinada d'AR i andrògens i Sp1 sinó que en un i altre cas, la combinació d'ambdós factors ha pogut mantenir $\sim 1/5$ part d'aquesta. Considerant que aquesta inducció residual fruit de la presència simultània d'AR i Sp1 és encara superior a la que individualment els factors ofereixen als corresponents promotors mutats, es podria pensar en una possible interacció proteïna-proteïna entre ells. El possible complex AR-Sp1 s'uniria al DNA mitjançant el factor que conservés el seu element diana viable, això és AR en K638 Sp1 MUT i Sp1 en K638 ARE MUT; i el factor no unit al DNA quedaria de tota manera proper i ancorat al promotor proximal podent així intervenir en la transactivació i formar potser part del complex transcripcional que s'hi organitza. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi caldria realitzar però assajos d'immunoprecipitació de comatina que ens permetessin constatar la presència d'AR o Sp1 en els complexos proteïcs units al promotor mutat per la caixa GC o al promotor mutat en ARE, respectivament. Recolzant aquesta hipòtesi trobem de nou l'exemple el promotor del gen de la secretoglobina 2A1 en el qual la mutació d'una determinada caixa per a Sp1 suposa una caiguda dramàtica en la potent inducció androgènica. En aquest promotor, en el qual no es troben AREs, és Sp1 qui s'uneix al DNA i a AR i permet així que el receptor hormonal exerceixi la transactivació del gen i la seva expressió en resposta a andrògens (Xiao *et al.*, 2005).

En tot cas però, cal també tenir present que al promotor del gen de la KAP, la resposta androgènica és també dependent del factor que uneix la caixa -429. Per tant, potser es faria falta incloure aquest element com a integrador del suposat complex AR-Sp1 encarregat de la inducció del gen en el context del seu promotor proximal.

Però dins l'estudi de la caixa GC present al promotor del gen de la KAP, cal també tenir present la potencialitat d'aquesta per unir altres membres de la família de factors Sp, com és el cas d'Sp3. L'mRNA de Sp3 s'expressa en mamífer en totes les cèl·lules que expressen Sp1 (Kingsley *et al.*, 1992). El seu paper regulador de la transcripció d'Sp3 però ha estat molt controvertit. Clàssicament se'l presentava com a repressor per competició pel lloc d'unió a DNA de la transcripció mitjançada per Sp1 (Hagen *et al.*, 1994) i treballs posteriors identificaren l'existència en la proteïna de dominis repressors que permetrien una repressió activa més enllà de la mera competició pel lloc d'unió (De Luca *et al.*, 1996). Diversos grups han mostrat que Sp3 pot funcionar tant a activador i com a repressor transcripcional i proposen que és un factor bifuncional l'activitat del qual depèn del context cel·lular (Majello *et al.*, 1997; Kennet *et al.*, 1997). Així trobem que Sp3 reprimeix la transcripció activada per Sp1 del promotor d'SV40 (Hagen *et al.*, 1994), del promotor de l'ornitina descarboxilasa (Kumar i Butler, 1997) o del domini *Long Terminal Repeat* del

virus de la immunodeficiència humana 1 (HIV-1) (Majello *et al.*, 1994) com a exemples. Per contra Sp3 estimula la transcripció de molts promotors com són el de p21 (Prowse *et al.*, 1997) o el del col·lagen $\alpha 2$ (I) humà (Ihn i Trojanowska, 1997). Aquests resultats mostren que Sp3 no és funcionalment equivalent a Sp1 i una comparació dels fenotips dels ratolins *knockouts* respectius, corroboren que ambdós factors tenen funcions diferenciades *in vivo* i que Sp3 és també crucial per a la supervivència dels ratolins (Bouwman *et al.*, 2000). Molts autors assenyalen que el paper regulador d'Sp3 es pot aduir del nombre de caixes GC presents al promotor regulat: Sp3 es comporta majoritàriament com a activador als promotors on sols es troba una seqüència GC. En canvi, Sp3 inhibeix de manera preferent l'activació d'Sp1 dels promotors que exhibeixen múltiples lloc d'unió Sp (Yu *et al.*, 2003). Tot i això, sovint es troben excepcions a aquesta generalitat com és el cas del promotor de la DNA metiltransferasa 3B, que contenint una regió rica en caixes GC, és reprimat per Sp3. De nou ens trobem que les respostes i accions d'Sp3 poden dependre del promotor i el context cel·lular (Jinawath, *et al.*, 2005).

En el cas concret del promotor de la KAP, hem pogut veure com Sp3 no és capaç d'engegar una activació transcripcional del gen i com la seva coexpressió amb Sp1 suposa una repressió de la inducció que aquest darrer factor promou. No hem detectat cap altre seqüència per factors Sp en el promotor proximal pel què ens trobaríem amb un cas d'efecte inhibidor d'Sp3 en el context d'una sola caixa GC. Els resultats semblen indicar que Sp3 causaria la disminució de l'activació per Sp1 mitjançant la competició pel lloc d'unió que comparteixen al promotor de KAP i que tots dos són capaços d'unir *in vitro*. Sp3 uniria la caixa GC però no iniciaria cap resposta transcripcional eficient i en l'equilibri dinàmic que sol donar-se als promotors entre factors de transcripció units i lliures, aniria ocupant la posició d'Sp1 en certs moments impeding que exercís el seu efecte activador. És difícil però aduir possibles relacions estequiòmriques en aquests assajos ja que són realitzats per transfecció i tot i que l'expressió tant d'Sp1 com d'Sp3 venia dirigida pel mateix promotor viral (pCMV) no es pot garantir una idèntica quantitat de proteïna. El

Cara a les implicacions transcripcionals pel promotor de la KAP que la relació Sp1 i Sp3 sembla aportar, resultava interessant determinar quins eren els nivells endògens aproximats dels dos membres Sp en les cèl·lules de túbul proximal PCT3. Tot i la dificultat que representa la quantificació d'un extracte nuclear que esdevé una mesura relativa, l'anàlisi per *western blot* del contingut nuclear de les cèl·lules PCT3 permet intuir un lleuger predomini quantitatiu de l'espècie Sp3 per sobre d'Sp1. Vist el paper negatiu que Sp3 exerciria sobre el promotor proximal del gen de la KAP resulta suggerent pensar que la seva dominació estequiomètrica respecte Sp1 podria estar limitant l'expressió de KAP en aquestes cèl·lules. Està clarament establert pel nostre grup, que la línia cel·lular PCT3

presenta una expressió disminuïda de KAP respecte a les cèl·lules progenitores de les que deriva. La proteïna no és detectable per *western blot* i l'mRNA sols es detecta a nivells molt baixos per RT-PCR (Tesi Dra. O. Tornavaca). En aquest sentit, és evidentment crucial la manca simultània d'expressió d'AR que també s'hi produeix. Però les possibles diferències quantitatives entre Sp1 i Sp3 també podrien explicar en part aquesta caiguda en l'expressió de KAP. És però, necessari, tenir molt en compte que els efectes detectats ocorren sols en el fragment de 638 pb del promotor i que en el context cel·lular l'expressió del gen està controlada per la totalitat íntegra del promotor original en el qual, es poden donar altres relacions i intervenir molts altres factors de transcripció. De tota manera, la influència de la ràtio Sp1/Sp3 ha estat molt sovint involucrada en la regulació transcripcional de molts gens. Així per exemple el grup de Krikun *et al.* suggereix que la relació Sp1/Sp3 està relacionada amb l'activació de l'expressió del factor tissular en resposta a progestina en les cèl·lules estromals endometrials. El tractament amb progestina provoca un increment dels nivells de l'activador Sp1 mentre que l'expressió d'Sp3, que és incapaç d'incentivar el promotor del factor tissular es veu reprimida (Krikun *et al.*, 2000). En un altre exemple, la hipòxia suposa en cèl·lules endotelials de la vena umbilical en cultiu, un augment de la quantitat d'Sp1 mentre que els nivells d'Sp3 romanen inalterats (Xu *et al.*, 2000). Cal mencionar a més, que en cèl·lules epitelials es quantifica una ràtio Sp1/Sp3 relativament alta en comparació a la que es troba en altres tipus cel·lulars com són ara els fibroblasts (Apt *et al.*, 1996). En la majoria de casos, l'increment de la relació Sp1/Sp3 s'ha correlacionat amb un augment de l'expressió dels gens diana. En aquests contextos cel·lulars però, els gens són activats per Sp1 i reprimits per Sp3, suggerint que la seva transcripció és regulada cooperativament per l'acció d'ambdós factors.

Anàlisi de les caixes -429 i -457 com a putatius llocs d'unió per C/EBPs

Els diversos estudis en animals realitzats al llarg dels anys al nostre laboratori sobre l'expressió del gen de la KAP en les cèl·lules S1/S2 del túbul proximal contornejat *in vivo* havien indicat que els andrògens eren necessaris però no suficients per a iniciar la resposta androgènica al ronyó. S'intuïa per tant, que altres factors importants en el desenvolupament postnatal, molt probablement regulats per l'hormona tiroïdal, hi estaven involucrats. Estudis similars en el gen de l'ornitina descarboxilasa havien demostrat l'existència d'un període crític en el període postnatal en el què l'hormona T₃ a través del control del factor de transcripció C/EBP α era indispensable per al posterior control androgènic del gen a ronyó i cor de rata (Dixon *et al.*, 2001). Es suggeria per tant, que els

membres C/EBP sota control de l'hormona tiroïdal podien constituir un fenomen general per a controlar els gens regulats per andrògens a ronyó.

Es va constatar seguidament la correlació que a les cèl·lules del còrtex es produeix entre el tractament amb hormona tiroïdal, l'expressió del factors de transcripció C/EBP α i C/EBP β i els nivells d'expressió del mRNA de KAP (Tesi de Dra. M. Soler; Teixidó *et al.*, 2006). La predicció del promotor proximal del gen de la KAP assenyalava la presència de 4 putatives caixes per a membres de la família de factors de transcripció CAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP). Els assajos d'activitat luciferasa en les cèl·lules PCT3 posteriors determinaren la funcionalitat i rellevància de les seqüències, situades a -429 i -457 pb respecte a l'inici de transcripció, les quals en ser deletionades provocaven una caiguda molt important de la capacitat inductora del promotor i el seu efecte era molt més palès quan a més mancava la inducció androgènica.

Havia quedat clara per tant la importància en la regulació del gen de la KAP i la col·laboració en la resposta a andrògens de les caixes -429 i -457 putativament unides per C/EBPs. Per a constatar la naturalesa dels factors de transcripció que uneixen aquestes seqüències hem realitzat els assajos de retard en gel corresponents i hem comprovat en primer lloc que la caixa -429 no es unida *in vitro* pels factors C/EBP α i β , fet que ens ha plantejat l'estudi de quin és l'element transcripcional que la té com a diana. La seqüència -457 en canvi, és capaç d'unir *in vitro* C/EBP β en extractes nuclears de cèl·lules PCT3 i C/EBP α i β en extractes nuclears de ronyó de ratolí mascle.

Les desavinences en la unió de la caixa 457 entre els factors de transcripció presents en les cèl·lules PCT3 i en els nuclis del conjunt de tipus cel·lulars que integren el ronyó poden explicar-se per diversos motius. D'entrada cal destacar que el membre C/EBP α present als extractes nuclears de PCT3 (comprovat per immunodetecció) tampoc no ha mostrat capacitat d'unió a una seqüència C/EBP consens. Aquest fet podria estar reflectint un comportament anormal de la proteïna endògena en la nostra línia cel·lular. S'havia vist que la transfecció de C/EBP α exògena suposava una inducció del promotor proximal del gen de la KAP $\sim 5x$ de manera que la verdadera unió del factor al promotor era força tangible.

Davant la peculiar absència d'expressió del receptor d'andrògens que presenta la línia PCT3, és senzill pensar que es derivin conseqüències d'aquest fet i la relació entre C/EBP α i l'estat androgènic està àmpliament establerta. En aquest sentit, Garcia *et al.*, veieren com la deprivació androgènica en adipòcits suposava una disminució notòria en els nivells d'expressió de C/EBP α mentre que no s'afectaven els de C/EBP β (Garcia *et al.*, 2004). Més tard, Bolduc *et al.*, refereixen una augment d'expressió de C/EBP α per tractament amb dihidrotestosterona, fet que de nou delimita les funcions transcripcionals del factor de

transcripció per AR (Bolduc *et al.*, 2004). Més enllà dels possibles canvis en els nivells de la proteïna a PCT3, que amb tot són detectables per *western blot*, s'han descrit diverses interaccions de C/EBP α que en dificulten la funcionalitat. Així per exemple trobem que la formació del complex C/EBP α - Brm (*Brahma Protein Homologue*) comporta una dèbil interacció del membre C/EBP amb els promotors de gens específics de fetge en hepatòcits repercutint en una disminució en la capacitat regeneradora del fetge (Wang *et al.*, 2007). La formació del complex està controlada per altres estímuls que finalment impedeixen la regulació transcripcional per C/EBP α . Rangatia *et al.*, descriuen el segrest de C/EBP α per part del factor c-Jun via interacció proteïna-proteïna a través del domini de cremallera en leucines, induint-li una inactivació que, d'altra banda pot ser revertida per expressió ectòpica del membre C/EBP (Rangatia *et al.*, 2003). I veiem també com modificacions posttraduccionals de la proteïna poden incrementar tant els segrests i la formació de complexos inactius com modificar-ne la pròpia capacitat funcional. Per exemple, s'ha demostrat que la ciclina D3 indueix la fosforilació de C/EBP α en la serina 193 estabilitzant el complex C/EBP α - Brm (Wang *et al.*, 2006). La pròpia fosforilació de C/EBP α per la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3) en altres residus, treonines 222 i 226, en canvi suposen un increment de la seva afinitat pel DNA incrementant l'expressió dels gens que regula (Datta *et al.*, 2007). En el cas de C/EBP β en canvi, la fosforilació per GSK3, suposa una disminució en l'afinitat del factor per unir les seves seqüències diana en hepatòcits (Piwien-Pilipuk *et al.*, 2001). Per tant, hi ha una infinitat de mecanismes que podrien estar donant-se al context particular de la línia PCT3 i que afectin les capacitats d'unió de C/EBP α sense afectar les de C/EBP β , tot i que també podria tractar-se d'una característica específica d'aquest factor en el llinatge cel·lular concret de les cèl·lules S1/S2. Cal però recordar, els minsos nivells d'expressió endògena del gen de la KAP en PCT3 que disten força dels presents en les cèl·lules progenitores del túbul proximal i que com ja s'ha dit podrien correspondre's amb aquestes peculiaritats específiques de la línia

De tota manera, les unions detectades *in vitro* sovint difereixen de les que realment es produeixen en les cèl·lules i encara que els membres C/EBP poden unir teòricament les mateixes seqüències *in vivo* presenten gens diana diferents. Per tant, tampoc podem descartar que realment sols sigui C/EBP β el factor que uneixi la caixa -457 del promotor de la KAP *in vivo*. I en aquest sentit podem destacar la importància de la intervenció de C/EBP β en la regulació de gens teixit específics com el gen específic d'os de l'osteocalcina al promotor de la qual és indispensable C/EBP β aportant el complex coregulador modificador de cromatina SWI/SNF (Villagra *et al.*, 2006). És de nou

necessari el desenvolupament d'un experiment d'immunoprecipitació de cromatina per poder arranjar aquesta debatuda qüestió.

Estudi del factor que uneix la caixa -429

Semblava que contra tot pronòstic, la seqüència situada a -429 bp de l'inici de transcripció del promotor del gen de la KAP, no era unida pels factors C/EBP α i/o β . El retard en gel de la caixa en incubar-la amb extracte nuclear de cèl·lules PCT3 sols és competit per la pròpia seqüència -429 i no per la consens dels membres C/EBPs. Però tot i això, la similitud dels 10 pb -420-429 (CTCCAGCAAT) amb l'element canònic per C/EBP (A/gTTGCGT/acAAT/c) d'aquest factors és notable, d'un 70 %, i presenta conservats nucleòtids clau per a la unió com la timina en posició 2 i les adenines en posició 8 i 9 (Osada *et al.*, 1999). Aquest fet, potser podria plantejar l'anàlisi de la unió de la caixa -429 per algun altre membre C/EBP, com és ara C/EBP δ , el qual s'ha vist implicat en la regulació teixit específica dels cotransportadors de lactat slc5a8 i slc5a12 a la membrana apical del túbul proximal de ronyó de ratolí (Thangaraju *et al.*, 2006) i juga un paper clau en la regulació d'un gen tant important al ronyó com l'angiotensinogen (Jain *et al.*, 2005). També cal tenir en compte l'elevat grau de conservació del domini d'unió a DNA entre C/EBPs i proteïnes relacionades com DBP (*D site albumin promoter Binding Protein*), Fos, Jun i CREB, fet que els permet unir seqüències molt similars i les situa com a possibles candidates a interaccionar amb la caixa -429 (Mueller *et al.*, 1990).

La recerca del putatiu factor que uneix aquesta seqüència -429 del promotor del gen de la KAP ha ocupat gran part del treball d'aquesta Tesi. L'anàlisi de les diferents prediccions computacionals ens ha portat a l'estudi de diferents grups de factors de transcripció i a la caracterització de les cèl·lules PCT3. Una de les famílies de reguladors transcripcionals suggerides ha estat la dels factors GATA. La família GATA està integrada per 6 membres estructuralment relacionats que uneixen l'element consens A/TGATAA/G i intervenen de forma molt important en la diferenciació de llinatges cel·lulars durant el desenvolupament i en la transcripció de cèl·lules diferenciades de vertebrats (Bresnick *et al.*, 2005). Tots 6 factors GATA es caracteritzen per estar regulats transcripcionalment de manera teixit específica i veure restringida la seva presència en determinats tipus cel·lulars (Levarriere *et al.*, 1994).

El fet que la deleció dels 10 pb que integren la caixa -429, en combinació amb la de -457, suposés una caiguda important de la transcripció basal (Tesi de la Dra. M. Soler) indicava que el putatiu element que uneix -429 es trobava present en les cèl·lules PCT3,

doncs en impedir-li l'accés al seu DNA diana, s'observava un clar efecte anticatalitzador de l'activitat transcripcional del promotor. Això ens portà a analitzar el contingut en membres GATA de PCT3 per restringir l'anàlisi de la predicció sobre aquesta família. A la línia cel·lular sols trobarem l'expressió del mRNA de GATA3, un dels tres membres GATA suggerits inicialment. GATA-3 juga un paper clau en el desenvolupament eritrocitari i limfoide i s'expressa majoritàriament en cèl·lules hematopoètiques (Fujiwara *et al.*, 1996). Però els estudis de Van Esch *et al.* han descrit aquest factor com a determinant en el desenvolupament renal en embrions de ratolí i humans amb una expressió molt important al ronyó adult (Van Esch *et al.*, 2001). L'haploinduficiència de GATA-3 així com mutacions en el seu gen s'han associat a la síndrome d'hipotiroïdisme, sordesa i displàsia renal (*Hypoparathyroidism, Deafness and Renal dysplasia syndrome, HDR*) (Van Esch *et al.*, 2000) en el qual es produeixen deformitats en el tracte renal que solen portar a la seva insuficiència apart d'alteracions congènites en les glàndules paratiroides i a l'orella interna (Muroya *et al.*, 2001). Actualment, la manera precisa en què les mutacions de GATA-3 causen aquestes anormalitats no ha estat identificada tot i que s'ha vist que els canvis que afecten els dominis en dit de zinc del factor comporten pèrdua d'afinitat pel DNA o alteració de les interaccions amb factors com FOG-2 i Sp1 (Nesbit *et al.*, 2004). Malgrat tot, la manca de correlació d'aquestes alteracions amb el fenotip HDR no ha permès la identificació dels gens diana de GATA-3, els quals es desconeixen. La importància de GATA-3 a ronyó d'altra banda és cada cop més evident donada la seva relació amb altres patologies renals com la síndrome nefrítica del lupus (Chan *et al.*, 2007). Dins del context del gen de la KAP i ja fora del context renal, a més, resulta especialment atractiu la col·laboració que GATA-3 i GATA-2 presenten amb la inducció androgènica del gen PSA a la pròstata, la qual és indispensable per a assolir la resposta andrògens òptima que caracteritza el seu promotor (Perez-Stable *et al.*, 2000).

Eren molts els indicis que constituïen GATA-3 com a bon candidat a la regulació del gen de la KAP però els assajos de transfecció transitòria i EMSA indicaren que no era el responsable del retard de -429. Moltes de les prediccions *in silico* posteriors segueixen insistint en la identitat de la seqüència -429 amb la de factors GATA, sobretot GATA-1. Tenint en compte a més la competició del retard de -429 per la seqüència consens GATA potser seria idoni realitzar un assaig de retard en gel amb proteïna GATA-1 ja que tot i que no n'haguem detectat l'expressió de mRNA en PCT3, les característiques de línia cel·lular disten sensiblement de les cèl·lules S1/S2 originals de ronyó.

L'estratègia de la cromatografia d'afinitat de DNA ha estat clàssicament el model d'elecció per a l'aïllament i caracterització de factors de transcripció. Així reguladors transcripcionals tant importants com Sp1 (Kadonaga i Tijan, 1986) o NF-I (Rosenfeld i

Kelly, 1986) així com la major part de receptors nuclears van ser purificats originalment a partir de cromatografies en què s'utilitzaven les seves seqüències de DNA diana unides a reïna de sefarosa com a fase d'atracció. Paral·lelament a la verificació de les diferents prediccions per a la seqüència -429, al nostre laboratori hem desenvolupat aquest tipus d'assajos de cromatografia amb la intenció d'aïllar el factor que s'hi uneix. La tècnica però s'ha vist limitada en molts casos per la reduïda quantitat de proteïna present en les bandes eluïdes i pel propi límit de detecció de l'espectrometria de masses.

Entre les proteïnes que han pogut ésser identificades als eluïts procedents de la incubació d'oligonucleòtids representatius de la caixa 429 amb extractes nuclears de les cèl·lules PCT3, ha estat especialment interessant trobar la DDX20. L'aïllament d'aquesta RNA helicasa dependent d'ATP, també denominada DP103, en una cromatografia de -429 ha esdevingut rellevant en aquest treball perquè més enllà de les seves funcions en el metabolisme i processament de l'RNA ha estat involucrada en la regulació transcripcional de determinats gens (Fuller-Pace, 2006). DP103 desenvolupa la funció transcripcional a través de les interaccions proteïna-proteïna que selectivament estableix amb determinats factors de transcripció que la incorporen així al complex transcripcional dels seus promotors diana. Entre les proteïnes que interaccionen amb DP103 trobem per tant els factors de transcripció virals d'Epstein-Barr EBNA2 i EBNA3C (Grundhoff *et al.*, 1997), el factor Egr2 (*Early Growth Response 2 transcription factor*) important en la mielinització del sistema nerviós perifèric de vertebrats (Gillian i Svaren, 2004), el repressor mitogènic d'Ets METS (membre de la família de factors de transcripció amb domini ETS) important en la diferenciació de macròfags (Sharrocks, 2001), les histona desacetilases HDAC2 i 5, que facilitarien l'efecte majoritàriament repressor de DP103 (Klappacher *et al.*, 2002) i finalment l'*Steroidogenic Factor-1* (SF-1), un receptor nuclear orfe que regula gens essencials en l'esteroïdògenesis i la diferenciació sexual (Ou *et al.*, 2001). El possible candidat més suggerent en el context i idiosincràsia del promotor del gen de la KAP d'haver estat el conductor de DP103 a un eluït de proteïnes que presumiblement interaccionen amb la caixa -429 era sense dubte SF-1. SF-1 és el regulador transcripcional de gens involucrats en la síntesi d'hormones esteroïdals tant determinants com el P450 *Side-Chain Cleavage* P450_{SCC} que controla la primera etapa de la ruta biosintètica a partir de colesterol (Chau *et al.*, 1997) o l'aromatasa (CYP19) que regula el pas de testosterona a estradiol i altres enzims d'aquesta via (Fitzpatrick i Richards, 1993). El seu paper és, per tant, primordial a les glàndules suprarenals i a les gònades i de fet se'l considera com l'element determinant de l'existència de ruta biosintètica d'esteroides en un teixit. En aquest sentit, Dalla Valle *et al.*, han reportat la possibilitat de síntesi hormonal a ronyó de rata gràcies a la determinació de la presència tant d'SF-1 com d'enzims de la via

esteroïdal (Dalla Valle *et al.*, 2002; Dalla Valle *et al.*, 2004). Cal destacar també la importància de d'SF-1 en l'establiment de la diferenciació sexual i la determinació del sexe gràcies a la regulació que exerceix del factor SRY factor determinant del sexe masculí (de Santa Barbara *et al.*, 2001).

Les dianes transcripcionals d'SF-1 poden fàcilment relacionar-se amb KAP donat el caràcter tan influenciat per la naturalesa sexual i les hormones esteroïdals de la seva expressió. Tot aquest seguit de deduccions ens ha portat a constatar la putativa unió d'SF-1 a la seqüència -429 del promotor del gen de la KAP. S'han obtingut resultats encoratjadors en els assajos de retard en gel de la caixa -429 amb proteïna SF-1 sintetitzada *in vitro*, ja que han mostrat un efectivament la formació d'un complex DNA-proteïna que d'altra banda és eficientment competit pel fragment de promotor del gen de P450_{SCC} altament afí per SF-1, indicant doncs que la proteïna en qüestió sigui probablement SF-1. Durant el procés de constatació per *supershift* d'aquesta hipòtesi, han aparegut problemes tècnics en l'obtenció d'un anticòs competent apte per al reconeixement d'SF-1, fet que d'altra banda ens havia impedit l'anàlisi de la seva presència en cèl·lules PCT3. Ha estat llavors (novembre 2006) quan s'ha produït l'aparició de l'article de Suh *et al.* en el que es descriu un estudi sistemàtic de l'expressió de diferents NR al ronyó de ratolí, i que descarta la presència d'SF-1 a les cèl·lules del túbul proximal renal (Suh *et al.*, 2006). Aquesta informació ens ha portat a no continuar amb l'estudi d'SF-1 com a regulador del gen de la KAP.

Possible activació transcripcional del gen de la KAP per glucocorticoides

La darrera anàlisi computacional per a la seqüència 429 ha aportat un possible nou element hormonal a tenir en compte en la regulació del gen de la KAP: els glucocorticoides.

Les interaccions positives i negatives entre NR a l'hora d'incidir en el transcriptoma cel·lular són nombrosament descrites en la literatura i l'aparició de noves interrelacions entre ells ocorre contínuament. Els estudis sobre la repercussió a nivell transcripcional de la coactivació simultània d'AR i de GR en gens capaços de respondre tant a andrògens com a glucocorticoides són freqüents en la caracterització de les propietats dels diferents agonistes i antagonistes sintètics. Mentre que en aquest tipus d'estudis sovint s'han descrit fenòmens d'inhibició mútua entre AR i GR per processos de formació d'heterodímers (Chen *et al.*, 1997), inhibició de l'expressió d'AR per part de GR i els seus efectes contraris en el creixement cel·lular (Zhao *et al.*, 2004), hi ha una gran quantitat de gens

regulats per hormones esteroïdals capaços de respondre tan a andrògens com a glucocorticoides i la coexistència d'ambdós receptors és patent en diversos tipus cel·lulars. Aquets és el cas de les cèl·lules del túbul proximal renal de ratolí. En la línia cel·lular derivada del PCT3, s'expressa GR i s'ha perdut la presència original descrita d'AR i hem volgut testar quin era l'efecte de l'activació simultània d'ambdós NR mitjançant el tractament amb els seus respectius lligands. D'aquesta manera hem pogut veure com, mentre que la seva coexpressió no repercuteix ni en la potenciació ni en la inhibició dels seus efectes individuals, la sobreexpressió simultània del factor Sp1, descrit com a potenciador de la transcripció tant d'AR com de GR (Strahle *et al.*, 1989), es tradueix en un increment elevat de l'activitat luciferasa en relació a l'obtinguda en resposta als dobles aïllats Sp1-AR, Sp1-GR. No s'ha pogut determinar sobre quin element de DNA es realitza la unió del GR, o si l'efecte causat pels glucocorticoides és via indirecta no unint el DNA, i caldria realitzar assajos d'immunoprecipitació de cromatina per determinar la implicació de GR al promotor proximal del gen de la KAP. La significació biològica o fisiològica d'aquesta possible potenciació de l'expressió androgènica de KAP per part de GR podria explicar-se en termes de resposta a l'estrès, que són els propis que desencadenen els glucocorticoides (Bamberger *et al.*, 1996), per exemple en relació a la protecció contra a agents tòxics, com pot ser la CsA en el context de la proteïna KAP. Els glucocorticoides actuen com a agents immunosupressors pleiotròpics que regulen positivament o negativa tota una sèrie de gens relacionats amb la resposta immunològica en funció del context cel·lular i condicions de salut de l'organisme (Lee *et al.*, 2005). Per tant, la possible intermediació en la regulació del gen de la KAP és plausible. Se sap, que tot i la capacitat per part de GR detectada d'activar la transcripció en el promotor de 638 bp del gen de la KAP *in vitro*, en els estudis d'expressió *in vivo* es veié com els glucocorticoides sols no eren capaços d'engegar l'expressió de KAP als segments S1/S2 del túbul proximal renal (Meseguer i Catterall, 1992). De manera que, tot i no estar nucleant ni articulant ni determinant l'expressió específica que en les cèl·lules d'aquesta regió es produeix per a KAP, els glucocorticoides podrien potenciar-la en situacions de resposta a estrès cooperant en l'activació transcripcional exercida per AR i Sp1.

L'anàlisi computacional del promotor del gen de la KAP indica diversos putatius elements de resposta a GR (vegeu FIGURA 58) i per tant la regulació per glucocorticoides podria donar-se per unió a alguna d'aquestes múltiples seqüències. La unió de GR al DNA es realitza en els típics motius de dos hexanucleòtids palindròmics separats per tres nucleòtids espaiadors (TGTACANNNTGTTCT) però també s'ha descrit la seva unió a seqüències que sols presenten la meitat d'aquests palíndroms (Strawhecker *et al.*, 1989; Drouin *et al.*, 1992).

```

-640  ttgatcttagccattctgactataaccatgttdttgacccattgtacagagccagca
-580  tccttggtaatgtggagttatcaactctcaaccttcaacctcccgtgggaaacgggg
-520  cgaaatggctactgctaggctactggtgagaatcacatggctctggcacttctagatagtt
-460  ctgcttttgcaatgagcagttcttcaactggtctccagcaatctgccaggatgaggactct
-400  aatgcgtacatgaggtttttccttagagtaaaacagtccatttttttgacaca aaacc
-340  atctttgggggtgcagaaaa gactagctctagcctagaggaca aagaacagcaatgggggt
-280  gatctgggtggagtagatgaccctggccattagagggtaatggtgcta atggcaatgggt
-220  ggtgcacctagtcagactttctcctaccccagattctattgtttctatggttctagtta
-160  gtttttcttaacttcttctgggtgcattctttaatagttcataaaggctctcccaaac
-100  cctccccgccccctttttttctcctccagccaactgtggaaaaccaccttcagggaga
-40  ggggtacaggatgtataaaagccaggaggactctttttgg

```

FIGURA 58 Putatius GRE presents al fragment de 638 pb del promotor del gen de la KAP

Predicció del programa TESS sobre els possibles elements de resposta específicament a glucocorticoides per als primers 640 bp del promotor del gen de la KAP. La majoria són mitjos palíndroms i sols en dos casos (*) s'indica la possibilitat d'unió pel conjunt de NR. La resta s'indiquen d'unió exclusiva per GR. En verd es marca la caixa -429. TESS: <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess>

En cas que la unió de GR al promotor de KAP no es materialitzés en cap dels putatius GRE que presenta, l'acció dels glucocorticoides podria produir-se indirectament a través de les múltiples accions hormonals indirectes o per efecte sobre altres elements reguladors. En aquest sentit veiem per exemple com GR potencia la transactivació per part de C/EBP β a través de l'acetilació de leucines de l'extrem N-terminal que li promou (Wiper-Wergeron *et al.*, 2007). Trobem també altres efectes inductors de glucocorticoides canalitzats en C/EBP β al pulmó de ratolí, on GR unit a lligant provoca la fosforilació de C/EBP al residu de treonina 235 i potencia de manera molt efectiva la unió del factor al DNA (Berg *et al.*, 2005). L'efecte cooperatiu d'andrògens i glucocorticoides observat per KAP per tant, podria també donar-se a nivell indirecte, a través de possible efectes no genòmics del GR actuant en vies de senyalització o altres processos cel·lulars molt allunyats i diferents de la transcripció que acabessin potenciant o facilitant l'expressió de KAP, cooperant per tant de manera indirecta amb AR. Aquest és el cas descrit per exemple en les cèl·lules de Leydig, on l'aldosterona potencia la formació de testosterona (Ge *et al.*, 2005). S'han descrit altres contextos de sinèrgia entre AR i GR com és ara el pepsinogen C, proteïna majoritària del suc gàstric de rosegadors (Furihata *et al.*, 1980), es veu induït per dexametasona i DHT independentment i de manera additiva en cèl·lules T-47D (Balbín

i Lopez-Otín, 1996). La mateixa repercussió s'ha observat en el promotor de l'apolipoproteïna D, que essent reprimat per estrògens, és activat per andrògens, menys importantment per glucocorticoides i de manera additiva per ambdues hormones sobretot quan es produeix el tractament concomitant amb estrògens (Simard *et al.*, 1992).

Ens trobem per tant davant de la possibilitat que un altra hormona pugui estar influent en l'expressió de KAP, complicant i diversificant més l'entramat de senyalitzadors i missatgers entre l'ambient i l'organisme que determinen tan específicament la manera en què el nostre gen és present.

Anàlisi de la interrelació entre els diferents elements reguladors del gen de la KAP

Al llarg d'aquest treball s'ha intentat estudiar els factors de transcripció que uneixen algunes de les principals seqüències vistes com a importants reguladores de l'activitat transcripcional del promotor proximal del gen de la KAP i el seu comportament dins el context de les cèl·lules PCT3. Finalment, amb la intenció d'observar quins tipus de relacions s'estableixen entre tots els elements reguladors determinats fins ara i veure'n les possibles repercussions, s'ha realitzat un experiment de cotransfecció utilitzant versions mutades del constructe K638 en cadascuna de les seqüències ARE, caixa GC, caixa -429 i caixa -457. D'aquesta manera, hem pogut observar la conseqüència que suposa la manca d'unió del corresponent factor de transcripció que uneix la seqüència mutada per a l'activitat transcripcional del promotor.

Els resultats han aportat noves dades de com ocorre la inducció androgènica en el promotor proximal del gen de la KAP. Mentre que l'absència de la seqüència de 10 pb situada a -457 bp pràcticament no modifica la resposta del fragment de 638 pb a andrògens i Sp1, la mutació de qualsevol dels elements ARE, GC o caixa -429 redueix molt significativament aquesta resposta, fins a 1/5 part de l'original. Semblaria per tant, que la presència de tots i cadascun d'aquests tres elements reguladors és indispensable per a què al promotor proximal de la KAP, i dins el context de la línia PCT3, es pugui produir la inducció androgènica que tant característica és per KAP al còrtex renal de ratolins mascles.

Tot i la relació additiva de C/EBP α i β sobre la resposta androgènica determinada anteriorment al nostre grup (Tesi de la Dra. M. Soler) i de la importància conjunta de les caixes -429 i -457, l'assaig desvetlla que la participació de -457 en la inducció per andrògens en aquest fragment del promotor és irrellevant i que per tant C/EBP β en PCT3 no intervindria directament en aquesta resposta. L'efecte potenciador de C/EBP en

l'activitat del promotor és patent i d'una magnitud no gens desestimable, similar a la que genera AR amb DHT, però aquest factor, tampoc no és capaç d'articular tot sol l'activitat transcripcional quan manquen alguna de les seqüències importants per a la resposta a andrògens, on ni tan sols aconseguix manifestar els seus efectes inductors individuals.

Sembla clar per tant, que AR, Sp1 i el factor de transcripció que uneix 429 estableixen alguna mena de relació a tres bandes la qual requereix indispensablement tots tres elements per a desenvolupar la seva funció. Aquestes dades ens porten a formular un hipotètic model: podria potser tractar-se d'un complex transcripcional multimèric integrat per tots tres membres més els diferents coreguladors que individualment aportessin o que el propi complex atragués, en el qual donades les distàncies entre les seves respectives seqüències diana, això és -39 bp, -100 bp i -429 bp, la disposició tridimensional de la cromatina o cofactors pot permetrien la interacció de tots ells. El complex format, que podria ser una espècie d'*enhanceosoma* en el sentit de promoure la transcripció però que conjuntés tots els elements reguladors del promotor proximal del promotor, podria interaccionar amb la propera maquinària de transcripció basal, articulada a la caixa TATA de -28 bp, i potenciar-ne l'activitat. C/EBP α/β al seu torn no participaria com a factor clau en la formació d'aquest possible estructura multimèrica i a nivell de la totalitat del promotor, no sols dels primers ~ 700 pb, potser faria de pont articulador i vehiculitzant els efectes i intervencions de factors i seqüències importants *upstream*. S'ha descrit la interacció i col·laboració de C/EBPs tant amb AR com amb Sp1 per tant la possible influència exercida sobre ells, quan la resta d'elements exigits és present, és més que factible (Boruk *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1994). En aquest context podríem torbar per exemple, un possible paper potenciador dels glucocorticoides sobre l'expressió de KAP que es realitzés de manera indirecta canalitzada a través de C/EBP β tal i com descriuen Wiper-Wergeron *et al.* o Berg *et al.*

La indispensabilitat individual de cadascun dels elements ARE, caixa GC i seqüència -429, pot ser reflex de la necessitat de determinades interaccions entre ells, de la formació específica d'una estructura ternària articulada en les diferents seqüències o de l'aport insubstituïble de determinats cofactors que cadascun d'ells realitzi. En aquest sentit, els estudis de Kang *et al.* per exemple, descriuen que durant l'activació per andrògens dels promotors dels gens PSA i KLK2, AR és carregat a l'ARE corresponent i seguidament orquestra el reclutament de la Pol II, del coactivador de la família p160 GRIP-1 (*Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1*) i del cointegrador CBP/p300. D'aquesta manera, s'aconsegueix un augment de l'acetilació i fosforilació de les histones

embolcallades pel DNA del promotor i es debilita la compactació de la cromatina, esdeveniment indispensable per a obtenir una bona activitat transcripcional i que en aquest cas suposa que pugui donar-se la resposta a andrògens (Kang *et al.*, 2004). Sp1 al seu torn s'ha vist involucrat en un gran nombre de complexos transcripcionals i destaca el seu paper com a integrador del complex CRSP, un dels complexos Mediator de mamífers (Ryu *et al.*, 1999). El Mediator és un gran complex coactivador multimèric capaç d'interaccionar a través de les 15-20 subunitats que el componen amb la RNA polimerasa II (Näär *et al.*, 2002), amb factors generals de la maquinària de transcripció, amb coactivadors/corepressors i amb determinats factors de transcripció que l'aporten als promotors dels seus determinats gens diana (Taatjes i Tijan, 2004). Suposa un pont d'unió entre la maquinària basal de transcripció i els factors de transcripció i permet també coordinar els efectes sobre la transcripció de dues vies diferents, per exemple els de Sp1 i els receptors nuclears ja que tots dos poden utilitzar CRSP com a coactivador per a la seva activació transcripcional (Rachez *et al.*, 1999; Lemon *et al.*, 2001).

D'altra banda, l'existència de complexos multiproteics que a través de poques seqüències diana als promotor proximals s'encarreguen de la transcripció gènica és habitual i ocorre en altres gens. Així, al promotor de la proteïna 4.2 en eritròcits, els factors de transcripció GATA-1, TAL1, LMO2 i Ldb1 formen un complex ternari d'unió a DNA que a través de l'ancoratge a dues caixes GATA-E-Box estimula l'expressió de la proteïna. A més, els autors descriuen que el complex en certes condicions incorpora també el coregulador SWI/SNF Bgr1 que mitjançant la remodelació dels nucleosomes del promotor proximal reprimeix l'expressió del gen (Xu *et al.*, 2006). Deb *et al.*, descriuen la formació d'un complex transcripcional entre els factors ATF-2, CREB i C/EBP β al promotor del gen de l'aromatasa responsable de l'activació del gen (Deb *et al.*, 2006). D'altra banda, els complexos transcripcionals són especialment freqüents en la regulació induïda per hormones esteroïdals com ocorre al promotor del gen E2F1 en el qual mitjançant dues caixes CCAAT i una caixa GC els estrògens aconseguixen la formació d'un agrupament entre Sp1, NF-Y i el propi ER que permet la inducció estrogènica (Wang *et al.*, 1999).

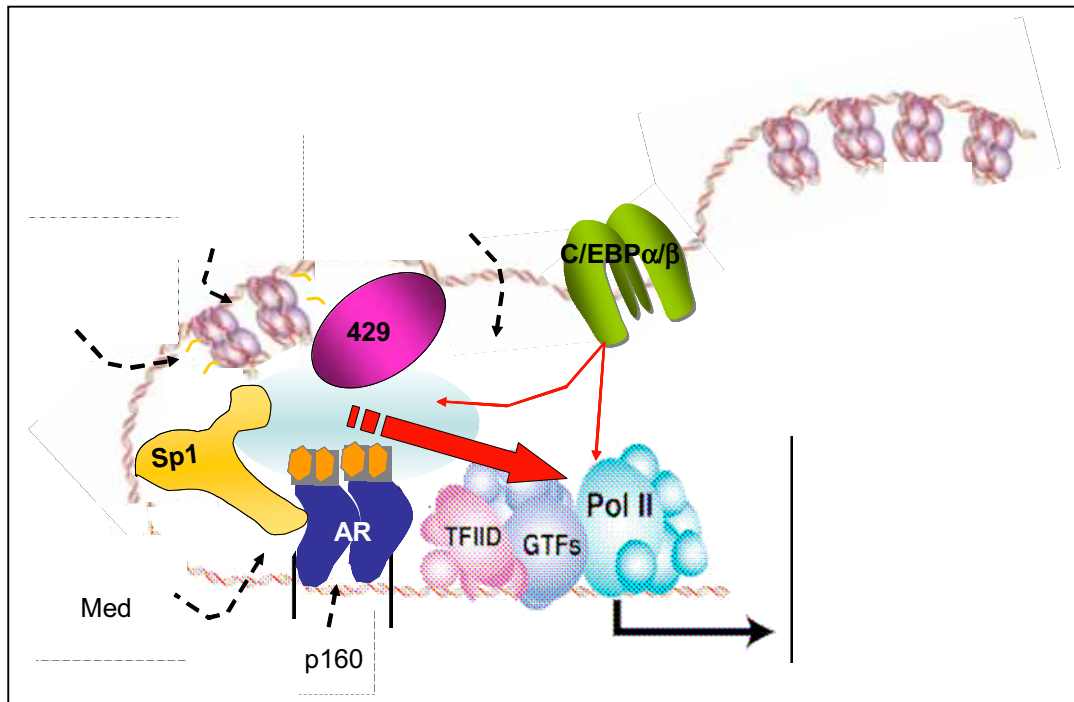


FIGURA 59. Representació esquemàtica d'un possible model de complex transcripcional que podria donar-se al promotor proximal del gen de la KAP. L'esquema representa els factors determinants per a la regulació androgènica de KAP vista en aquest treball AR, Sp1 i el putatiu factor que uneix 429. En un segon terme es representen alguns dels coregadors que podrien estar implicats en aquesta resposta.

Els nostres experiments han desvetllat en qualsevol cas, que per a obtenir una inducció important del gen de la KAP en resposta a andrògens similar a la que es pot donar en les cèl·lules S1/S2 del còrtex renal, es produeix una combinatòria d'elements essencials que pot resultar primordial en l'expressió del gen. Cal que es donin totes els requeriments i les situacions primordials i necessàries per a què el gen s'expressi, i si no hi són, no hi ha expressió. Continuant amb l'elevat grau de control de la proteïna KAP amb les múltiples regulacions posttraduccionals que en limiten l'activitat per degradació, localització i relacions moleculars amb altres espècies proteiques, el gen que la codifica està determinat per selectes i específiques condicions que en determinen l'expressió i que la impedeixen completament quan algun dels factors determinants manca.

Discussió General

A priori, resulta difícil d'imaginar i d'explicar l'especificitat de l'expressió de KAP als segments S1/S2 del túbul proximal de ronyó de ratolins mascles deguda a l'AR i Sp1. AR

s'expressa en mascles en múltiples teixits i pràcticament la totalitat de l'organisme està sotmesa a l'efecte androgènic que provoca la producció prostàtica de les hormones sexuals masculines. I al seu torn, Sp1 és un factor de transcripció ubic, implicat dins de les mateixes cèl·lules S1/S2, en l'expressió de gens de *housekeeping*. La importància del factor que s'uneix a la caixa 429 en la resposta del promotor proximal del gen en les cèl·lules PCT3 pot fer pensar en la importància d'aquest element com a determinant de l'especificitat d'expressió de KAP en els segments renals corticals. Però després de veure la promiscuïtat que presenta el factor present en els extractes que provoquen el retard de la sonda per 429, cal tenir present que ens trobem davant una seqüència o bé que resulta simplement inespecífica i per la seva composició permet la unió parcial (els assajos EMSA són realitzats en un context *in vitro*, no fisiològic i difícilment *in vivo* es podria produir aquesta flexibilitat en la unió a 429) de diversos factors de transcripció o d'una proteïna capaç d'unir diverses seqüències. Els experiments de mutagènesi de la seqüència -429 posen però de manifest la importància de la seva presència per a que es produeixi la resposta inductora additiva d'AR i Sp1. Aquest seria un altre possible argument que apostaria per a l'especificitat de la unió de -429 i concretament, en tractar-se d'una seqüència que intervé en la resposta androgènica, seria un indicatiu de la unió d'un factor de transcripció "col·laborador" d'AR. La col·laboració podria entendre's en diversos termes: en el sentit directe d'interaccionar directament amb el receptor nuclear potser estabilitzant la seva unió al DNA que balla per la limitació al·lostèrica que suposa compartir part de l'element de resposta amb la proteïna TBP, potser aportant un coactivador de l'AR especialment necessari i resolutiu per a ell en aquest context. Ara bé, el fet que la mutació de la caixa -429 es fes delecionant els 10 pb representatius d'aquesta part del promotor (Tesi de la Dra. M. Soler), també ens ha de fer contemplar la possibilitat que la caiguda de resposta androgènica i d'Sp1 quan manca 429 respongui simplement a una alteració espacial de distanciament entre factors de transcripció al llarg del DNA. És a dir, que seria possible que l'escurçament de 10 nt suposi el trencament d'interaccions entre la maquinària transcripcional, coactivadors, AR, Sp1 i d'altres possibles factors no contemplats fins ara que s'uneixen *upstream* de 429. L'assaig de mutagènesi ens estaria indicant doncs la presència d'altres elements presents als 638 primers pb del promotor del gen de la KAP que intervindrien en la resposta androgènica.

En qualsevol cas però, la impossibilitat de la identificació del factor que uneix -429 no ens permet especular gaire en el sentit de la seva intervenció en l'especificitat de l'expressió del gen. Si bé, també és cert que el fragment mínim del promotor del gen de la KAP que s'ha provat *in vivo* capaç de reproduir aquesta expressió específica és el de 1500 pb, i no el de 638 sobre el qual s'ha realitzat l'estudi de la regulació transcripcional en aquest treball (Ding *et al.*, 1997) i que per tant podria donar-se el cas que no disposéssim aquí dels elements responsables d'aquesta especificitat. Finalment però, també podríem esperar que el patró limitat d'expressió de KAP no es degués a un factor igualment específic sinó simplement al context cel·lular característic de les cèl·lules S1/S2. Ens referim doncs a la concentració dels diferents factors de transcripció, a la regulació de l'activitat transcripcional d'aquests per vies de transducció de senyals que acabin repercutint en els factor de transcripció, per "interaccions" positives i negatives que es donin entre els diferents factors (com Sp1/Sp3 per exemple) i en concret dins el context nucleotídic que suposa el promotor del gen de la KAP, la singularitat que cada promotor representa per a poder engegar l'expressió del gen que controlen en resposta a certs estímuls i no a la resta de senyals a què la cèl·lula està esposada (a nivell de disposició espacial de les seqüències reguladores per exemple). Cada promotor representa una singularitat responedora transcripcionalment parlant ja que permet que l'expressió del gen que controla sigui en resposta sols a certs estímuls i no a la resta de senyals a què la cèl·lula està exposada. Cal no oblidar d'altra banda que el fet de treballar amb una línia cel·lular també suposa una limitació a l'hora de buscar o intentar reproduir esdeveniments que es produeixen en el context de la totalitat de l'organisme on l'*input* d'elements controladors o reguladors dels processos cel·lulars, entre ells la transcripció, és molt més ampli i complex que el què es pot arribar a reproduir en el context d'una placa de petri. I el fet de treballar amb constructes de fragments del promotor insertats en plasmidis circulars, on manca tota la contextualització de la regió específicament estudiada a la qual li manquen totes les seqüències que en el context del cromosoma la circumden i on segurament s'altera tota la disposició tridimensional que el conjunt d'histones i les seves modificacions posttraduccionals com són les acetilacions i fosforilacions, les metilacions del DNA i el conjunt d'elements que determinen la compactació o distensió del DNA i l'accessibilitat de les diferents seqüències que l'integren. Les línies cel·lulars resulten l'element d'estudi més

aí a les condicions *in vivo* en mantenir part de les característiques i propietats de les cèl·lules homòlogues de les quals provenen. Però en el propi establiment de la línia i a base de divisions cada cop es van allunyant més de les cèl·lules originals i deixen de respectar la reproducibilitat *in vitro* de les condicions *in vivo*. La línia PCT3 és la única obtinguda a partir de les cèl·lules del túbul proximal de ratolí i a més capaç de reproduir la inducibilitat d'un promotor en resposta a andrògens. Però les cèl·lules PCT3 mai han presentat els nivells d'expressió de la proteïna KAP corresponent a les cèl·lules PCT del ronyó sinó nivells significativament inferiors i d'altra banda al llarg dels diferents passes, ha perdut l'expressió de l'AR endogen.

En resum doncs, és molt probable que KAP desenvolupi unes propietats molt importants i rellevants en el context de les cèl·lules del túbul proximal renal i que la limitació, control i regulació de les seves funcions en aquest context sigui de vital importància. L'exquisit i pràcticament únic i exclusiu ball de factors de transcripció, missatgers hormonals i situacions nefropatològiques que determinen l'entramat transcripcional, l'expressió i finalment la funcionalitat de la proteïna KAP fan d'aquesta un preciós element digne d'estudi i caracterització per a l'enriquiment del coneixement en el camp de la fisiologia renal.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'element de resposta a andrògens situat a -39 bp del promotor del gen de la KAP és funcional i és unit *in vitro* pel receptor d'andrògens en presència de testosterona.
2. La mutació de la putativa caixa TATA del gen situada a -35 pb suposa la caiguda de l'activitat transcripcional basal del promotor proximal com de la resposta androgènica i induïda per AR i DHT (1 μ M) en assajos de transfecció transitòria. Aquesta mutació no impedeix la unió *in vitro* d'AR a l'ARE solapat indicant la funcionalitat de la caixa TATA del promotor del gen de la KAP.
3. La seqüència CCCGCC situada a -100 bp del promotor del gen de la KAP pot ser unida pels factors Sp1 i Sp3 *in vitro* en experiments EMSA.
4. En extractes nuclears de cèl·lules PCT3 es detecta la presència dels factors Sp1 i Sp3. El factor Sp1 es troba menys representat quantitativament al extractes analitzats.
5. El factor Sp1 és capaç d'induir ~12 cops l'activitat transcripcional del constructe dels primers 638 pb del promotor del gen de la KAP (K638) en assajos de transfecció transitòria. El factor Sp3 en canvi no suposa un augment de l'activitat basal del constructe. Sp1 resulta un activador de l'expressió del gen *in vitro*.
6. El factor Sp3 inhibeix en part la inducció per Sp1 de l'activitat del promotor proximal del gen en assajos de cotransfecció transitòria. Sp3 per tant, regula negativament la funció activadora d'Sp1 al promotor de la KAP.
7. En el context del promotor del gen de la KAP existeix una cooperació entre AR i andrògens i Sp1. La cotransfecció d'Sp1 eleva de ~5 cops fins a unes ~50 vegades la inducció androgènica de K638. Sp1 potencia de forma important la resposta a andrògens del promotor proximal.
8. La seqüència situada a -457 pb del promotor és unida *in vitro* pel factor C/EBP β d'extractes nuclears de cèl·lules PCT3 i pels factors C/EBP α i C/EBP β d'extractes

CONCLUSIONS

nuclears de ronyó de ratolí C57BL/6 mascle. Resulta per tant un de tots els possibles punts d'ancoratge d'aquests factors reguladors del gen de la KAP.

9. La seqüència situada a -429 pb del promotor no és unida *in vitro* per C/EBP α o C/EBP β . S'ha descartat també la unió del factor GATA-3 i del receptor de glucocorticoides a aquesta seqüència tot i les prediccions *in silico* que els assenyalaven com a possibles candidats. No s'ha pogut demostrar la unió a -429 d'SF-1.
10. El receptor de glucocorticoides i el tractament amb dexametasona (100 nM) indueixen ~5 cops l'activitat transcripcional del promotor proximal del gen en assajos de transfecció transitòria del constructe K638. Experiments de cotransfecció indiquen una col·laboració entre GR i glucocorticoides, Sp1 i AR i andrògens obtenint la inducció màxima assolida amb el fragment de 638 pb, igual a ~80 cops l'activitat basal del constructe K638.
11. La presència simultània de les seqüències d'unió per AR, Sp1 i el factor que uneix la caixa -429 al promotor proximal del gen de la KAP és necessària i crucial per a que es doni la resposta androgènica característica del constructe K638. S'indica doncs l'existència d'una col·laboració i dependència entre els tres factors.
12. La seqüència -457 bp no és determinant en la resposta androgènica dels primers 638 pb del promotor.

BIBLIOGRAFIA

A

Aarnisalo P, Palvimo JJ, Janne OA. 1998. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2122-2127.

Adler AJ, Scheller A, Robins DM. 1993. The stringency and magnitude of androgen-specific gene activation are combinatorial functions of receptor and nonreceptor binding site sequences. *Mol Cell Biol* 13:6326-6335.

Aigueperse C, Val P, Pacot C, Darne C, Lalli E, Sassone-Corsi P, Veysiere G, Jean C, Martinez A. 2001. SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 15:93-111.

Alberts B, Johnson A, Lewi J, Raff M, Roberts K and Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Science. New York

Ali A, Christie PT, Grigorieva IV, Harding B, Van Esch H, Ahmed SF, Bitner-Glindzicz M, Blind E, Bloch C, Christin P, Clayton P, Gecz J, Gilbert-Dussardier B, Guillen-Navarro E, Hackett A, Halac I, Hendy GN, Laloo F, Mache CJ, Mughal Z, Ong AC, Rinat C, Shaw N, Smithson SF, Tolmie J, Weill J, Nesbit MA, Thakker RV. 2007. Functional characterization of GATA3 mutations causing the hypoparathyroidism-deafness-renal (HDR) dysplasia syndrome: insight into mechanisms of DNA binding by the GATA3 transcription factor. *Hum Mol Genet* 16:265-275.

Angel P, Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-157.

Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard HU. 1996. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology* 224:281-291.

Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13:2235-2246.

Arreste C, Melia MJ, Isern J, Tovar JL, Meseguer A. 2004. Sex steroid regulation and identification of different transcription units of the SA gene in mouse kidney. *J Endocrinol* 183:101-114.

Asadi FK, Dimaculangan DD, Berger FG. 1994. Androgen regulation of gene expression in primary epithelial cells of the mouse kidney. *Endocrinology* 134:1179-1187.

B

Balbin M, Lopez-Otin C. 1996. Hormonal regulation of the human pepsinogen C gene in breast cancer cells. Identification of a cis-acting element mediating its induction by androgens, glucocorticoids, and progesterone. *J Biol Chem* 271:15175-15181.

Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17:245-261.

Bardin CW, Brown TR, Mills NC, Gupta C, Bullock LP. 1978. The regulation of the beta-glucuronidase gene by androgens and progestins. *Biol Reprod* 18:74-83.

Barnes PJ. 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 148:245-254.

Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.

Beato M, Herrlich P, Schutz G. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857.

Beato M, Sanchez-Pacheco A. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17:587-609.

- Berg T, Didon L, Barton J, Andersson O, Nord M.** 2005. Glucocorticoids increase C/EBPbeta activity in the lung epithelium via phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 334:638-645.
- Berger FG, Watson G.** 1989. Androgen-regulated gene expression. *Annu Rev Physiol* 51:51-65.
- Bettuzzi S, Stocchi P, Davalli P, Marinelli M, Furci L, Corti A.** 2001. Androgen responsiveness and intrarenal localization of transcripts coding for the enzymes of polyamine metabolism in the mouse. *Biochem Cell Biol* 79:133-140.
- Birnbaum MJ, van Wijnen AJ, Odgren PR, Last TJ, Suske G, Stein GS, Stein JL.** 1995. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 34:16503-16508.
- Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, Xu HE.** 2002. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110:93-105.
- Bolduc C, Larose M, Yoshioka M, Ye P, Belleau P, Labrie C, Morissette J, Raymond V, Labrie F, St-Amand J.** 2004. Effects of dihydrotestosterone on adipose tissue measured by serial analysis of gene expression. *J Mol Endocrinol* 33:429-444.
- Borud B, Hoang T, Bakke M, Jacob AL, Lund J, Mellgren G.** 2002. The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* 16:757-773.
- Boruk M, Savory JG, Hache RJ.** 1998. AF-2-dependent potentiation of CCAAT enhancer binding protein beta-mediated transcriptional activation by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 12:1749-1763.
- Bouwman P, Gollner H, Elsasser HP, Eckhoff G, Karis A, Grosveld F, Philipsen S, Suske G.** 2000. Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *Embo J* 19:655-661.
- Bouwman P, Philipsen S.** 2002. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195:27-38.
- Bowman HM, Hook JB.** 1972. Sex differences in organic ion transport by rat kidney. *Proc Soc Exp Biol Med* 141:258-262.
- Boyer TG, Martin ME, Lees E, Ricciardi RP, Berk AJ.** 1999. Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* 399:276-279.
- Braun H, Koop R, Ertmer A, Nacht S, Suske G.** 2001. Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* 29:4994-5000.
- Brenner BM.** 1997. The Kidney 5th ed. Saunders, Philadelphia
- Bresnick EH, Martowicz ML, Pal S, Johnson KD.** 2005. Developmental control via GATA factor interplay at chromatin domains. *J Cell Physiol* 205:1-9.
- Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP, Tjian R.** 1986. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234:47-52.
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Rooter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J.** 1999. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:307-313.
- Brodie J, McEwan IJ.** 2005. Intra-domain communication between the N-terminal and DNA-binding domains of the androgen receptor: modulation of androgen response element DNA binding. *J Mol Endocrinol* 34:603-615.
- Brzovic PS, Rajagopal P, Hoyt DW, King MC, Klevit RE.** 2001. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol* 8:833-837.
- Buck M, Poli V, Hunter T, Chojkier M.** 2001. C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell* 8:807-816.
- Burakov D, Wong CW, Rachez C, Cheskis BJ, Freedman LP.** 2000. Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a

subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex. *J Biol Chem* 275:20928-20934.

Burglin TR. 1997. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* 25:4173-4180.

C

Cao Z, Umek RM, McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552.

Cartier N, Lacave R, Vallet V, Hagege J, Hellio R, Robine S, Pringault E, Cluzeaud F, Briand P, Kahn A, et al. 1993. Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci* 104 (Pt 3):695-704.

Catterall JF, Kontula KK, Watson CS, Seppanen PJ, Funkenstein B, Melanitou E, Hickok NJ, Bardin CW, Janne OA. 1986. Regulation of gene expression by androgens in murine kidney. *Recent Prog Horm Res* 42:71-109.

Catterall JF, Meseguer A. 1989. The effects of sex steroids on renal gene expression. *Semin Urol* 7:252-257.

Catterall JF, Meseguer A, Niu EM. 1991. Molecular basis of androgen regulation of male phenotypic variation. *Ann N Y Acad Sci* 626:92-100.

Cebrian C, Areste C, Nicolas A, Olive P, Carceller A, Piulats J, Meseguer A. 2001. Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J Biol Chem* 276:29410-29419.

Cesena TI, Cardinaux JR, Kwok R, Schwartz J. 2007. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem* 282:956-967.

Chalkley GE, Verrijzer CP. 1999. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *Embo J* 18:4835-4845.

Chan RW, Lai FM, Li EK, Tam LS, Chow KM, Lai KB, Li PK, Szeto CC. 2007. Intra-renal cytokine gene expression in lupus nephritis. *Ann Rheum Dis*.

Chang CJ, Chen TT, Lei HY, Chen DS, Lee SC. 1990. Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol* 10:6642-6653.

Chang CS, Kokontis J, Liao ST. 1988. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240:324-326.

Chang YC, Illenye S, Heintz NH. 2001. Cooperation of E2F-p130 and Sp1-pRb complexes in repression of the Chinese hamster dhfr gene. *Mol Cell Biol* 21:1121-1131.

Chau YM, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Olson LM, Sadovsky Y. 1997. Role of steroidogenic-factor 1 in basal and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated regulation of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the mouse. *Biol Reprod* 57:765-771.

Chen BK, Chang WC. 2000. Functional interaction between c-Jun and promoter factor Sp1 in epidermal growth factor-induced gene expression of human 12(S)-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10406-10411.

Chen S, Wang J, Yu G, Liu W, Pearce D. 1997. Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J Biol Chem* 272:14087-14092.

Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox MB, Riggs DL, Suarez-Quian C, Smith DF. 2005. Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Mol Endocrinol* 19:1654-1666.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265:346-355.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

Chumakov AM, Grillier I, Chumakova E, Chih D, Slater J, Koeffler HP. 1997. Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-epsilon transcription factor. *Mol Cell Biol* 17:1375-1386.

Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. 2001. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76:23-30.

Clarkson RW, Chen CM, Harrison S, Wells C, Muscat GE, Waters MJ. 1995. Early responses of trans-activating factors to growth hormone in preadipocytes: differential regulation of CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and C/EBP delta. *Mol Endocrinol* 9:108-120.

Cleutjens CB, Stekete K, van Eekelen CC, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J. 1997. Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression, but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. *Endocrinology* 138:5293-5300.

Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW, Trapman J. 1997. An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol* 11:148-161.

Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J. 1996. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271:6379-6388.

Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP, Tjian R. 1989. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* 59:827-836.

Crozat A, Palvimo JJ, Julkunen M, Janne OA. 1992. Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs. *Endocrinology* 130:1131-1144.

Curtin D, Ferris HA, Hakli M, Gibson M, Janne OA, Palvimo JJ, Shupnik MA. 2004. Small

nuclear RING finger protein stimulates the rat luteinizing hormone-beta promoter by interacting with Sp1 and steroidogenic factor-1 and protects from androgen suppression. *Mol Endocrinol* 18:1263-1276.

Curtin D, Jenkins S, Farmer N, Anderson AC, Haisenleder DJ, Rissman E, Wilson EM, Shupnik MA. 2001. Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LHbeta gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region. *Mol Endocrinol* 15:1906-1917.

D

Dahlman-Wright K, Almlöf T, McEwan IJ, Gustafsson JA, Wright AP. 1994. Delineation of a small region within the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1619-1623.

Dalla Valle L, Toffolo V, Vianello S, Belvedere P, Colombo L. 2004. Expression of cytochrome P450scc mRNA and protein in the rat kidney from birth to adulthood. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88:79-89.

Dalla Valle L, Vianello S, Belvedere P, Colombo L. 2002. Rat cytochrome P450c17 gene transcription is initiated at different start sites in extraglandular and glandular tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82:377-384.

Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* 11:1025-1033.

Darne CH, Morel L, Claessens F, Manin M, Fabre S, Veyssiere G, Rombauts W, Jean CL. 1997. Ubiquitous transcription factors NF1 and Sp1 are involved in the androgen activation of the mouse vas deferens protein promoter. *Mol Cell Endocrinol* 132:13-23.

Datta J, Majumder S, Kutay H, Motiwala T, Frankel W, Costa R, Cha HC, MacDougald OA, Jacob ST, Ghoshal K. 2007. Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade. *Cancer Res* 67:2736-2746.

- Datta** PK, Raychaudhuri P, Bagchi S. 1995. Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 15:5444-5452.
- Davis** JF, Felder MR. 1993. Mouse ethanol-inducible cytochrome P-450 (P450IIE1). Characterization of cDNA clones and testosterone induction in kidney tissue. *J Biol Chem* 268:16584-16589.
- Davis** JM. 2002. Basic Cell Culture: A Practical Approach, 2nd ed. Oxford University Press, England.
- De Luca** P, Majello B, Lania L. 1996. Sp3 represses transcription when tethered to promoter DNA or targeted to promoter proximal RNA. *J Biol Chem* 271:8533-8536.
- de Santa Barbara** P, Mejean C, Moniot B, Malcles MH, Berta P, Boizet-Bonhoure B. 2001. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod* 64:775-783.
- Deb** S, Zhou J, Amin SA, Imir AG, Yilmaz MB, Lin Z, Bulun SE. 2006. A novel role of sodium butyrate in the regulation of cancer-associated aromatase promoters I.3 and II by disrupting a transcriptional complex in breast adipose fibroblasts. *J Biol Chem* 281:2585-2597.
- Dehm** SM, Tindall DJ. 2005. Regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 5:63-74.
- Depoix** C, Delmotte MH, Formstecher P, Lefebvre P. 2001. Control of retinoic acid receptor heterodimerization by ligand-induced structural transitions. A novel mechanism of action for retinoid antagonists. *J Biol Chem* 276:9452-9459.
- Desclozeaux** M, Krylova IN, Horn F, Fletterick RJ, Ingraham HA. 2002. Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 22:7193-7203.
- Descombes** P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U. 1990. LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* 4:1541-1551.
- Descombes** P, Schibler U. 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67:569-579.
- Dhar** SK, Xu Y, Chen Y, St Clair DK. 2006. Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression. *J Biol Chem* 281:21698-21709.
- Dignam** JD, Lebovitz RM, Roeder RG. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11:1475-1489.
- Ding** H, Benotmane AM, Suske G, Collen D, Belayew A. 1999. Functional interactions between Sp1 or Sp3 and the helicase-like transcription factor mediate basal expression from the human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Biol Chem* 274:19573-19580.
- Ding** Y, Davisson RL, Hardy DO, Zhu LJ, Merrill DC, Catterall JF, Sigmund CD. 1997. The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 272:28142-28148.
- Dixon** TM, Daniel KW, Farmer SR, Collins S. 2001. CCAAT/enhancer-binding protein alpha is required for transcription of the beta 3-adrenergic receptor gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 276:722-728.
- Doetzlhofer** A, Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, Wintersberger E, Seiser C. 1999. Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* 19:5504-5511.
- Drouin** J, Sun YL, Tremblay S, Lavender P, Schmidt TJ, de Lean A, Nemer M. 1992. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 6:1299-1309.

Dudkowska M, Stachurska A, Chmurzyska W, Grzelakowska-Sztabert B, Manteuffel-Cymborowska M. 2001. Cross-talk between steroid-receptor-mediated and cell-membrane-receptor-mediated signalling pathways results in the in vivo modulation of c-Met and ornithine decarboxylase gene expression in mouse kidney. *Biochem J* 353:317-323.

Ellis J, Tan-Un KC, Harper A, Michalovich D, Yannoutsos N, Philipsen S, Grosveld F. 1996. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *Embo J* 15:562-568.

Ellison KE, Ingelfinger JR, Pivor M, Dzau VJ. 1989. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J Clin Invest* 83:1941-1945.

El-Meanawy MA, Schelling JR, Pozuelo F, Churpek MM, Ficker EK, Iyengar S, Sedor JR. 2000. Use of serial analysis of gene expression to generate kidney expression libraries. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F383-392.

Erlandsson AC, Bladh LG, Stierna P, Yucel-Lindberg T, Hammarsten O, Modeer T, Harmenberg J, Wikstrom AC. 2002. Herpes simplex virus type 1 infection and glucocorticoid treatment regulate viral yield, glucocorticoid receptor and NF-kappaB levels. *J Endocrinol* 175:165-176.

F

Fandos C, Sanchez-Feutrie M, Santalucia T, Vinals F, Cadefau J, Guma A, Cusso R, Kaliman P, Canicio J, Palacin M, Zorzano A. 1999. GLUT1 glucose transporter gene transcription is repressed by Sp3. Evidence for a regulatory role of Sp3 during myogenesis. *J Mol Biol* 294:103-119.

Farman N. 1988. [Receptors of steroid hormones in the kidney]. *Pathol Biol (Paris)* 36:839-845.

Farman N, Oblin ME, Lombes M, Delahaye F, Westphal HM, Bonvalet JP, Gasc JM. 1991. Immunolocalization of gluco- and mineralocorticoid receptors in rabbit kidney. *Am J Physiol* 260:C226-233.

Felder MR, Watson G, Huff MO, Ceci JD. 1988. Mechanism of induction of mouse kidney alcohol dehydrogenase by androgen. Androgen-induced stimulation of transcription of the Adh-1 gene. *J Biol Chem* 263:14531-14537.

Ferretti E, Marshall H, Popperl H, Maconochie M, Krumlauf R, Blasi F. 2000. Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* 127:155-166.

Fitzpatrick SL, Richards JS. 1993. cis-acting elements of the rat aromatase promoter required for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induction in ovarian granulosa cells and constitutive expression in R2C Leydig cells. *Mol Endocrinol* 7:341-354.

Fondell JD, Ge H, Roeder RG. 1996. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8329-8333.

Foti D, Iuliano R, Chiefari E, Brunetti A. 2003. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol Cell Biol* 23:2720-2732.

Freedman LP. 1992. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13:129-145.

Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Basavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR. 1988. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334:543-546.

Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. 1996. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12355-12358.

Fukuda H, Noguchi T, Iritani N. 1999. Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene and ATP citrate-lyase gene by Sp1 and Sp3 in rat hepatocytes(1). *FEBS Lett* 464:113-117.

Fuller-Pace FV. 2006. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important

roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 34:4206-4215.

Furihata C, Saito D, Fujiki H, Kanai Y, Matsushima T, Sugimura T. 1980. Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat stomach. *Eur J Biochem* 105:43-50.

G

Garcia E, Lacasa M, Agli B, Giudicelli Y, Lacasa D. 1999. Modulation of rat preadipocyte adipose conversion by androgenic status: involvement of C/EBPs transcription factors. *J Endocrinol* 161:89-97.

Garcia-Villalba P, Au-Fliegner M, Samuels HH, Aranda A. 1993. Interaction of thyroid hormone and retinoic acid receptors on the regulation of the rat growth hormone gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 191:580-586.

Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP. 2005. Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone is mineralocorticoid receptor mediated. *Mol Cell Endocrinol* 243:35-42.

Gelmann EP. 2002. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20:3001-3015.
Ghyselinck NB, Dufaure I, Lareyre JJ, Rigaudiere N, Mattei MG, Dufaure JP. 1993. Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 7:258-272.

Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46:645-652.

Gill G. 2005. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15:536-541.

Gillian AL, Svaren J. 2004. The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J Biol Chem* 279:9056-9063.

Gioeli D. 2005. Signal transduction in prostate cancer progression. *Clin Sci (Lond)* 108:293-308.

Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM, Christian

RE, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ. 2002. Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 277:29304-29314.

Glass CK. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407.

Glover JN, Harrison SC. 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373:257-261.

Gobinet J, Poujol N, Sultan C. 2002. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198:15-24.

Gorlich D, Kutay U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607-660.

Gorski K, Carneiro M, Schibler U. 1986. Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 47:767-776.

Gowland PL, Buetti E. 1989. Mutations in the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus differentially affect the response to progestins, androgens, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 9:3999-4008.

Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3:950-964.

Grundhoff AT, Kremmer E, Tureci O, Glieden A, Gindorf C, Atz J, Mueller-Lantzsch N, Schubach WH, Grasser FA. 1999. Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem* 274:19136-19144.

Gualberto A, Baldwin AS, Jr. 1995. p53 and Sp1 interact and cooperate in the tumor necrosis factor-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *J Biol Chem* 270:19680-19683.

H

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* 20:5519-5525.

Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. 1994. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* 13:3843-3851.

Haidweger E, Novy M, Rotheneder H. 2001. Modulation of Sp1 activity by a cyclin A/CDK complex. *J Mol Biol* 306:201-212.

Hakli M, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. 2001. The RING finger protein SNURF is a bifunctional protein possessing DNA binding activity. *J Biol Chem* 276:23653-23660.

Hakli M, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. 2005. SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res* 304:224-233.

Hakli M, Lorick KL, Weissman AM, Janne OA, Palvimo JJ. 2004. Transcriptional coregulator SNURF (RNF4) possesses ubiquitin E3 ligase activity. *FEBS Lett* 560:56-62.

Halvorson LM, Ito M, Jameson JL, Chin WW. 1998. Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone beta-subunit gene expression. *J Biol Chem* 273:14712-14720.

Ham J, Thomson A, Needham M, Webb P, Parker M. 1988. Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res* 16:5263-5276.

Hammer GD, Ingraham HA. 1999. Steroidogenic factor-1: its role in endocrine organ development and differentiation. *Front Neuroendocrinol* 20:199-223.

Han I, Kudlow JE. 1997. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* 17:2550-2558.

He Y, Szapary D, Simons SS, Jr. 2002. Modulation of induction properties of glucocorticoid receptor-agonist and -antagonist complexes by coactivators involves binding to receptors but is independent of ability of

coactivators to augment transactivation. *J Biol Chem* 277:49256-49266.

Hentschke M, Borgmeyer U. 2003. Identification of PNRC2 and TLE1 as activation function-1 cofactors of the orphan nuclear receptor ERRgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 312:975-982.

Hittelman AB, Burakov D, Iniguez-Lluhi JA, Freedman LP, Garabedian MJ. 1999. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo J* 18:5380-5388.

Holla VR, Adas F, Imig JD, Zhao X, Price E, Jr., Olsen N, Kovacs WJ, Magnuson MA, Keeney DS, Breyer MD, Falck JR, Waterman MR, Capdevila JH. 2001. Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5211-5216.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404.

Hosoi K, Maruyama S, Ueha T, Sato S, Gresik EW. 1992. Additive and/or synergistic effects of 5 alpha-dihydrotestosterone, dexamethasone, and triiodo-L-thyronine on induction of proteinases and epidermal growth factor in the submandibular gland of hypophysectomized mice. *Endocrinology* 130:1044-1055.

Hsu W, Kerppola TK, Chen PL, Curran T, Chen-Kiang S. 1994. Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol* 14:268-276.

Huang W, Tan D, Wang X, Han S, Tan J, Zhao Y, Lu J, Huang B. 2006. Histone deacetylase 3 represses p15(INK4b) and p21(WAF1/cip1) transcription by interacting with Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 339:165-171.

Hurst HC. 1995. Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* 2:101-168.

Husmann M, Dragneva Y, Romahn E, Jehnichen P. 2000. Nuclear receptors modulate the

interaction of Sp1 and GC-rich DNA via ternary complex formation. *Biochem J* 352 Pt 3:763-772.

I

Ihn H, Trojanowska M. 1997. Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res* 25:3712-3717.

Ikonen T, Palvimo JJ, Janne OA. 1997. Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* 272:29821-29828.

Imaoka S, Hiroi T, Tamura Y, Yamazaki H, Shimada T, Komori M, Degawa M, Funae Y. 1995. Mutagenic activation of 3-methoxy-4-aminoazobenzene by mouse renal cytochrome P450 CYP4B1: cloning and characterization of mouse CYP4B1. *Arch Biochem Biophys* 321:255-262.

Isern J, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Meseguer A. 2001. Functional analysis and androgen-regulated expression of mouse organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) in the kidney. *Biochim Biophys Acta* 1518:73-78.

Isern J, Meseguer A. 2003. Hormonal regulation and characterisation of the mouse Cyp4b1 gene 5'-flanking region. *Biochem Biophys Res Commun* 307:139-147.

Ito M, Achermann JC, Jameson JL. 2000. A naturally occurring steroidogenic factor-1 mutation exhibits differential binding and activation of target genes. *J Biol Chem* 275:31708-31714.

Ito M, Yu RN, Jameson JL. 1998. Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 12:290-301.

J

Jackson SP, MacDonald JJ, Lees-Miller S, Tjian R. 1990. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63:155-165.

Jacob AL, Lund J, Martinez P, Hedin L. 2001. Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5. *J Biol Chem* 276:37659-37664.

Jacobs Y, Schnabel CA, Cleary ML. 1999. Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Mol Cell Biol* 19:5134-5142.

Jain S, Li Y, Patil S, Kumar A. 2005. A single-nucleotide polymorphism in human angiotensinogen gene is associated with essential hypertension and affects glucocorticoid induced promoter activity. *J Mol Med* 83:121-131.

Janson L, Pettersson U. 1990. Cooperative interactions between transcription factors Sp1 and OTF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4732-4736.

Jensen DE, Black AR, Swick AG, Azizkhan JC. 1997. Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter. *J Cell Biochem* 67:24-31.

Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO. 1995. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 270:7341-7346.

Jinawath A, Miyake S, Yanagisawa Y, Akiyama Y, Yuasa Y. 2005. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase 3A and 3B genes by Sp3 and Sp1 zinc finger proteins. *Biochem J* 385:557-564.

Johnson PF. 1993. Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference. *Mol Cell Biol* 13:6919-6930.

Johnson PF, McKnight SL. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 58:799-839.

Johnson-Pais T, Degnin C, Thayer MJ. 2001. pRB induces Sp1 activity by relieving inhibition mediated by MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2211-2216.

K

- Kabotyanski EB**, Huetter M, Xian W, Rijnkels M, Rosen JM. 2006. Integration of prolactin and glucocorticoid signaling at the beta-casein promoter and enhancer by ordered recruitment of specific transcription factors and chromatin modifiers. *Mol Endocrinol* 20:2355-2368.
- Kadonaga JT**, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51:1079-1090.
- Kadonaga JT**, Tjian R. 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5889-5893.
- Kang Z**, Janne OA, Palvimo JJ. 2004. Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18:2633-2648.
- Karin M**. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.
- Karin M**. 1998. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 93:487-490.
- Karlseder J**, Rotheneder H, Wintersberger E. 1996. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol* 16:1659-1667.
- Kasik JW**, Rice EJ. 1993. Kidney androgen-regulated protein gene is expressed in the uterus during late pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 90:239-242.
- Keembiyehetty CN**, Candelaria RP, Majumdar G, Raghow R, Martinez-Hernandez A, Solomon SS. 2002. Paradoxical regulation of Sp1 transcription factor by glucagon. *Endocrinology* 143:1512-1520.
- Kelly SN**, McKenna TJ, Young LS. 2005. Coregulatory protein-orphan nuclear receptor interactions in the human adrenal cortex. *J Endocrinol* 186:33-42.
- Kennett SB**, Moorefield KS, Horowitz JM. 2002. Sp3 represses gene expression via the titration of promoter-specific transcription factors. *J Biol Chem* 277:9780-9789.
- Kennett SB**, Udvardia AJ, Horowitz JM. 1997. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* 25:3110-3117.
- Khan FA**, Varma GM, Vijay IK. 1999. Genomic organization and promoter activity of glucosidase I gene. *Glycobiology* 9:797-806.
- Kim CS**, Choi HS, Hwang CK, Song KY, Lee BK, Law PY, Wei LN, Loh HH. 2006. Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergic repression to the mu opioid receptor (MOR) gene. *Nucleic Acids Res* 34:6392-6403.
- King D**, Sun YH, Lingrel JB. 1986. Amino acid sequence of the testosterone-regulated mouse kidney RP2 protein deduced from its complementary DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 14:5159-5170.
- Kingsley C**, Winoto A. 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12:4251-4261.
- Kinoshita S**, Akira S, Kishimoto T. 1992. A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1473-1476.
- Klappacher GW**, Lunyak VV, Sykes DB, Sawka-Verhelle D, Sage J, Brard G, Ngo SD, Gangadharan D, Jacks T, Kamps MP, Rose DW, Rosenfeld MG, Glass CK. 2002. An induced Ets repressor complex regulates growth arrest during terminal macrophage differentiation. *Cell* 109:169-180.
- Knudsen KE**, Cavenee WK, Arden KC. 1999. D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res* 59:2297-2301.
- Ko LJ**, Engel JD. 1993. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13:4011-4022.
- Kolla V**, Litwack G. 1999. Upregulation of mineralocorticoid- and glucocorticoid-receptor gene expression by Sp-1. *Mol Cell Biol Res Commun* 1:44-47.

Kousteni S, Kockar FT, Sweeney GE, Ramji DP. 1998. Characterisation and developmental regulation of the *Xenopus laevis* CCAAT-enhancer binding protein beta gene. *Mech Dev* 77:143-148.

Koutsodontis G, Tentes I, Papakosta P, Moustakas A, Kardassis D. 2001. Sp1 plays a critical role in the transcriptional activation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) gene by the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 276:29116-29125.

Krikun G, Schatz F, Mackman N, Guller S, Demopoulos R, Lockwood CJ. 2000. Regulation of tissue factor gene expression in human endometrium by transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol Endocrinol* 14:393-400.

Krishnan V, Wang X, Safe S. 1994. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269:15912-15917.

Kumar AP, Butler AP. 1997. Transcription factor Sp3 antagonizes activation of the ornithine decarboxylase promoter by Sp1. *Nucleic Acids Res* 25:2012-2019.

Kumar NV, Bernstein LR. 2001. A new analytical scale DNA affinity binding assay for analyses of specific protein-DNA interactions. *Anal Biochem* 299:203-210.

Kumar R, Betney R, Li J, Thompson EB, McEwan IJ. 2004. Induced alpha-helix structure in AF1 of the androgen receptor upon binding transcription factor TFIIF. *Biochemistry* 43:3008-3013.

Kupfer SR, Marschke KB, Wilson EM, French FS. 1993. Receptor accessory factor enhances specific DNA binding of androgen and glucocorticoid receptors. *J Biol Chem* 268:17519-17527.

Kutoh E, Stromstedt PE, Poellinger L. 1992. Functional interference between the ubiquitous and constitutive octamer transcription factor 1 (OTF-1) and the glucocorticoid receptor by direct protein-protein interaction involving the homeo

subdomain of OTF-1. *Mol Cell Biol* 12:4960-4969.

L

Lacave R, Bens M, Cartier N, Vallet V, Robine S, Pringault E, Kahn A, Vandewalle A. 1993. Functional properties of proximal tubule cell lines derived from transgenic mice harboring L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci* 104 (Pt 3):705-712.

Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL. 1988. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev* 2:786-800.

Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. 1994. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177-23184.

Lavoie JL, Lake-Bruse KD, Sigmund CD. 2004. Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F965-971.

Lee DK, Chang C. 2003. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:41-49.

Lee GS, Choi KC, Jeung EB. 2006. Glucocorticoids differentially regulate expression of duodenal and renal calbindin-D9k through glucocorticoid receptor-mediated pathway in mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E299-307.

Lee HC, Shibata H, Ogawa S, Maki K, Ikuta K. 2005. Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor. *J Immunol* 174:7800-7806.

Lee JS, Galvin KM, Shi Y. 1993. Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6145-6149.

Lee MB, Lebedeva LA, Suzawa M, Wadekar SA, Desclozeaux M, Ingraham HA. 2005. The DEAD-box protein DP103 (Ddx20 or Gemin-3) represses

orphan nuclear receptor activity via SUMO modification. *Mol Cell Biol* 25:1879-1890.

Lee YH, Williams SC, Baer M, Sterneck E, Gonzalez FJ, Johnson PF. 1997. The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Mol Cell Biol* 17:2038-2047.

Lee YH, Yano M, Liu SY, Matsunaga E, Johnson PF, Gonzalez FJ. 1994. A novel cis-acting element controlling the rat CYP2D5 gene and requiring cooperativity between C/EBP beta and an Sp1 factor. *Mol Cell Biol* 14:1383-1394.

Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM. 2000. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 19:3717-3726.

Lefstin JA, Thomas JR, Yamamoto KR. 1994. Influence of a steroid receptor DNA-binding domain on transcriptional regulatory functions. *Genes Dev* 8:2842-2856.

Leggett RW, Armstrong SA, Barry D, Mueller CR. 1995. Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver. *J Biol Chem* 270:25879-25884.

Legraverend C, Antonson P, Flodby P, Xanthopoulos KG. 1993. High level activity of the mouse CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene promoter involves autoregulation and several ubiquitous transcription factors. *Nucleic Acids Res* 21:1735-1742.

Lekstrom-Himes JA, Xanthopoulos KG. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 273:28545-28548.

Lekstrom-Himes JA. 2001. The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells* 19:125-133.

Lemon B, Inouye C, King DS, Tjian R. 2001. Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for

ligand-activated transcription. *Nature* 414:924-928.

Levine M, Tjian R. 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424:147-151.

Li G, Heaton JH, Gelehrter TD. 2006. Role of steroid receptor coactivators in glucocorticoid and transforming growth factor beta regulation of plasminogen activator inhibitor gene expression. *Mol Endocrinol* 20:1025-1034.

Li R, Hodny Z, Luciakova K, Barath P, Nelson BD. 1996. Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) gene. *J Biol Chem* 271:18925-18930.

Li S, Crenshaw EB, 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347:528-533.

Liang F, Schaufele F, Gardner DG. 2001. Functional interaction of NF-Y and Sp1 is required for type a natriuretic peptide receptor gene transcription. *J Biol Chem* 276:1516-1522.

Liao J, Piwien-Pilipuk G, Ross SE, Hodge CL, Sealy L, MacDougald OA, Schwartz J. 1999. CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) and C/EBPdelta contribute to growth hormone-regulated transcription of c-fos. *J Biol Chem* 274:31597-31604.

Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD. 1993. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimetabolic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9606-9610.

Lin SY, Black AR, Kostic D, Pajovic S, Hoover CN, Azizkhan JC. 1996. Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol* 16:1668-1675.

Little TH, Zhang Y, Matulis CK, Weck J, Zhang Z, Ramachandran A, Mayo KE, Radhakrishnan I. 2006. Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Mol Endocrinol* 20:831-843.

Litwack G. and Norman AW. 1997. Hormones, 2nd ed. Academic Press, San Diego.

Liu Y, Kung C, Fishburn J, Ansari AZ, Shokat KM, Hahn S. 2004. Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol Cell Biol* 24:1721-1735.

Liu Z, Simpson ER. 1997. Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Mol Endocrinol* 11:127-137.

Liu Z, Simpson ER. 1999. Molecular mechanism for cooperation between Sp1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) to regulate bovine CYP11A gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 153:183-196.

Lu S, Jenster G, Epner DE. 2000. Androgen induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene: role of androgen receptor and transcription factor Sp1 complex. *Mol Endocrinol* 14:753-760.

Lu S, Liu M, Epner DE, Tsai SY, Tsai MJ. 1999. Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Mol Endocrinol* 13:376-384.

Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. 1988. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240:327-330.

Lucibello FC, Slater EP, Jooss KU, Beato M, Muller R. 1990. Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *Embo J* 9:2827-2834.

Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352:497-505.

Lund SD, Gallagher PM, Wang B, Porter SC, Ganschow RE. 1991. Androgen responsiveness of the murine beta-glucuronidase gene is associated with nuclease hypersensitivity, protein binding,

and haplotype-specific sequence diversity within intron 9. *Mol Cell Biol* 11:5426-5434.

Luo X, Ikeda Y, Parker KL. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.

M

Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO. 1994. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77:451-459.

Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP. 1994. Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8:2282-2292.

MacNeill C, Ayres B, Laverriere AC, Burch JB. 1997. Transcripts for functionally distinct isoforms of chicken GATA-5 are differentially expressed from alternative first exons. *J Biol Chem* 272:8396-8401.

Majello B, De Luca P, Hagen G, Suske G, Lania L. 1994. Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res* 22:4914-4921.

Majello B, De Luca P, Lania L. 1997. Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem* 272:4021-4026.

Majello B, De Luca P, Suske G, Lania L. 1995. Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene* 10:1841-1848.

Malik S, Roeder RG. 2000. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* 25:277-283.

Malik S, Roeder RG. 2005. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30:256-263.

Malik S, Wallberg AE, Kang YK, Roeder RG. 2002. TRAP/SMCC/mediator-dependent

transcriptional activation from DNA and chromatin templates by orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* 22:5626-5637.

Malstrom SE, Tornavaca O, Meseguer A, Purchio AF, West DB. 2004. The characterization and hormonal regulation of kidney androgen-regulated protein (Kap)-luciferase transgenic mice. *Toxicol Sci* 79:266-277.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.

Mann RS, Abu-Shaar M. 1996. Nuclear import of the homeodomain protein extradenticle in response to Wg and Dpp signalling. *Nature* 383:630-633.

Maor SB, Abramovitch S, Erdos MR, Brody LC, Werner H. 2000. BRCA1 suppresses insulin-like growth factor-I receptor promoter activity: potential interaction between BRCA1 and Sp1. *Mol Genet Metab* 69:130-136.

Mayer M, Rosen F. 1975. Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol. *Am J Physiol* 229:1381-1386.

McKay LI, Cidlowski JA. 2000. CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol Endocrinol* 14:1222-1234.

McKenna NJ, O'Malley BW. 2002. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* 143:2461-2465.

Melia MJ, Bofill N, Hubank M, Meseguer A. 1998. Identification of androgen-regulated genes in mouse kidney by representational difference analysis and random arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Endocrinology* 139:688-695.

Menendez-Hurtado A, Santos A, Perez-Castillo A. 2000. Characterization of the promoter region of the rat CCAAT/enhancer-binding protein alpha gene and regulation by thyroid hormone in rat immortalized brown adipocytes. *Endocrinology* 141:4164-4170.

Menendez-Hurtado A, Vega-Nunez E, Santos A, Perez-Castillo A. 1997. Regulation by thyroid hormone and retinoic acid of the CCAAT/enhancer binding protein alpha and beta genes during liver development. *Biochem Biophys Res Commun* 234:605-610.

Merchant JL, Du M, Todisco A. 1999. Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* 254:454-461.

Meseguer A, Catterall JF. 1987. Mouse kidney androgen-regulated protein messenger ribonucleic acid is expressed in the proximal convoluted tubules. *Mol Endocrinol* 1:535-541.

Meseguer A, Catterall JF. 1990. Cell-specific expression of kidney androgen-regulated protein messenger RNA is under multihormonal control. *Mol Endocrinol* 4:1240-1248.

Meseguer A, Catterall JF. 1990. Detection of spatially regulated gene expression by hybridization histochemistry. *Rev Esp Fisiol* 46:69-78.

Meseguer A, Catterall JF. 1992. Effects of pituitary hormones on the cell-specific expression of the KAP gene. *Mol Cell Endocrinol* 89:153-162.

Meseguer A, Watson CS, Catterall JF. 1989. Nucleotide sequence of kidney androgen-regulated protein mRNA and its cell-specific expression in Tfm/Y mice. *Mol Endocrinol* 3:962-967.

Meyer ME, Gronemeyer H, Turcotte B, Bocquel MT, Tasset D, Chambon P. 1989. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57:433-442.

Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo J* 19:5406-5417.

Milanini-Mongiat J, Pouyssegur J, Pages G. 2002. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein

kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* 277:20631-20639.

Miyamoto H, Rahman M, Takatera H, Kang HY, Yeh S, Chang HC, Nishimura K, Fujimoto N, Chang C. 2002. A dominant-negative mutant of androgen receptor coregulator ARA54 inhibits androgen receptor-mediated prostate cancer growth. *J Biol Chem* 277:4609-4617.

Moilanen A, Rouleau N, Ikonen T, Palvimo JJ, Janne OA. 1997. The presence of a transcription activation function in the hormone-binding domain of androgen receptor is revealed by studies in yeast cells. *FEBS Lett* 412:355-358.

Moilanen AM, Poukka H, Karvonen U, Hakli M, Janne OA, Palvimo JJ. 1998. Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Mol Cell Biol* 18:5128-5139.

Morohashi K, Zanger UM, Honda S, Hara M, Waterman MR, Omura T. 1993. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol* 7:1196-1204.

Mueller CR, Maire P, Schibler U. 1990. DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. *Cell* 61:279-291.

Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. 2005. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 26:898-915.

Muller F, Tora L. 2004. The multicoloured world of promoter recognition complexes. *Embo J* 23:2-8.

Muller M, Renkawitz R. 1991. The glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1088:171-182.

Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2001. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:202-210.

Mundschau G, Gurbuxani S, Gamis AS, Greene ME, Arceci RJ, Crispino JD. 2003. Mutagenesis

of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood* 101:4298-4300.

Murata Y, Kim HG, Rogers KT, Udvadia AJ, Horowitz JM. 1994. Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain. *J Biol Chem* 269:20674-20681.

Muroya K, Hasegawa T, Ito Y, Nagai T, Isotani H, Iwata Y, Yamamoto K, Fujimoto S, Seishu S, Fukushima Y, Hasegawa Y, Ogata T. 2001. GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome. *J Med Genet* 38:374-380.

Murtha P, Tindall DJ, Young CY. 1993. Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochemistry* 32:6459-6464.

N

Naar AM, Beurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, Zwicker J, Kadonaga JT, Tjian R. 1998. Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* 12:3020-3031.

Naar AM, Beurang PA, Zhou S, Abraham S, Solomon W, Tjian R. 1999. Composite coactivator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* 398:828-832.

Naar AM, Taatjes DJ, Zhai W, Nogales E, Tjian R. 2002. Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev* 16:1339-1344.

Nagy L, Schwabe JW. 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 29:317-324.

Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchofsky N, Koop BF, Rennie PS. 1999. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol Endocrinol* 13:2090-2107.

- Nelson SA, Robins DM.** 1997. Two distinct mechanisms elicit androgen-dependent expression of the mouse sex-limited protein gene. *Mol Endocrinol* 11:460-469.
- Nerlov C, Ziff EB.** 1994. Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev* 8:350-362.
- Nesbit MA, Bowl MR, Harding B, Ali A, Ayala A, Crowe C, Dobbie A, Hampson G, Holdaway I, Levine MA, McWilliams R, Rigden S, Sampson J, Williams AJ, Thakker RV.** 2004. Characterization of GATA3 mutations in the hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome. *J Biol Chem* 279:22624-22634.
- Newton A, Mackay J, Crossley M.** 2001. The N-terminal zinc finger of the erythroid transcription factor GATA-1 binds GATC motifs in DNA. *J Biol Chem* 276:35794-35801.
- Niehof M, Kubicka S, Zender L, Manns MP, Trautwein C.** 2001. Autoregulation enables different pathways to control CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) transcription. *J Mol Biol* 309:855-868.
- Niehof M, Manns MP, Trautwein C.** 1997. CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol Cell Biol* 17:3600-3613.
- Nishimura M, Naito S, Yokoi T.** 2004. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:135-149.
- Nishiyama C, Yokota T, Okumura K, Ra C.** 1999. The transcription factors Elf-1 and GATA-1 bind to cell-specific enhancer elements of human high-affinity IgE receptor alpha-chain gene. *J Immunol* 163:623-630.
- Niu EM, Meseguer A, Catterall JF.** 1991. Genomic organization and DNA sequence of the mouse kidney androgen-regulated protein (KAP) gene. *DNA Cell Biol* 10:41-48.
- Northrop JP, Crabtree GR, Mattila PS.** 1992. Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor. *J Exp Med* 175:1235-1245.
- Ohbayashi T, Shimada M, Nakadai T, Wada T, Handa H, Tamura T.** 2003. Vertebrate TBP-like protein (TLP/TRF2/TLF) stimulates TATA-less terminal deoxynucleotidyl transferase promoters in a transient reporter assay, and TFIIA-binding capacity of TLP is required for this function. *Nucleic Acids Res* 31:2127-2133.
- Opitz OG, Rustgi AK.** 2000. Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene. *Cancer Res* 60:2825-2830.
- Orphanides G, Reinberg D.** 2000. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407:471-475.
- Orphanides G, Reinberg D.** 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108:439-451.
- Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M.** 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* 271:3891-3896.
- Ossipow V, Descombes P, Schibler U.** 1993. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8219-8223.
- Ou Q, Mouillet JF, Yan X, Dorn C, Crawford PA, Sadovsky Y.** 2001. The DEAD box protein DP103 is a regulator of steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol* 15:69-79.
- Ou XM, Chen K, Shih JC.** 2006. Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A is regulated differently by R1 and Sp1. *J Biol Chem* 281:21512-21525.
- Ouar Z, Sole E, Bens M, Rafestin-Oblin ME, Meseguer A, Vandewalle A.** 1998. Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immortalized mouse proximal tubule cells. Technical note. *Kidney Int* 53:59-66.
- Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB.** 1998. Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 273:10696-10701.

O

P

- Pajunen** AE, Isomaa VV, Janne OA, Bardin CW. 1982. Androgenic regulation of ornithine decarboxylase activity in mouse kidney and its relationship to changes in cytosol and nuclear androgen receptor concentrations. *J Biol Chem* 257:8190-8198.
- Pal** S, Datta K, Khosravi-Far R, Mukhopadhyay D. 2001. Role of protein kinase Czeta in Ras-mediated transcriptional activation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 276:2395-2403.
- Pascal** E, Tjian R. 1991. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* 5:1646-1656.
- Pearson** JC, Lemons D, McGinnis W. 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 6:893-904.
- Pena** P, Reutens AT, Albanese C, D'Amico M, Watanabe G, Donner A, Shu IW, Williams T, Pestell RG. 1999. Activator protein-2 mediates transcriptional activation of the CYP11A1 gene by interaction with Sp1 rather than binding to DNA. *Mol Endocrinol* 13:1402-1416.
- Perez-Stable** CM, Pozas A, Roos BA. 2000. A role for GATA transcription factors in the androgen regulation of the prostate-specific antigen gene enhancer. *Mol Cell Endocrinol* 167:43-53.
- Persengiev** SP, Saffer JD, Kilpatrick DL. 1995. An alternatively spliced form of the transcription factor Sp1 containing only a single glutamine-rich transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9107-9111.
- Pissios** P, Tzamelis I, Kushner P, Moore DD. 2000. Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol Cell* 6:245-253.
- Piwien-Pilipuk** G, Galigniana MD, Schwartz J. 2003. Subnuclear localization of C/EBP beta is regulated by growth hormone and dependent on MAPK. *J Biol Chem* 278:35668-35677.
- Piwien-Pilipuk** G, Van Mater D, Ross SE, MacDougald OA, Schwartz J. 2001. Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 276:19664-19671.
- Porter** W, Saville B, Hoivik D, Safe S. 1997. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11:1569-1580.
- Porter** W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S. 1996. Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol* 10:1371-1378.
- Poukka** H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. 2000. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14145-14150.
- Poukka** H, Karvonen U, Yoshikawa N, Tanaka H, Palvimo JJ, Janne OA. 2000. The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor. *J Cell Sci* 113 (Pt 17):2991-3001.
- Prowse** DM, Bolgan L, Molnar A, Dotto GP. 1997. Involvement of the Sp3 transcription factor in induction of p21Cip1/WAF1 in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 272:1308-1314.
- Pugh** BF, Tjian R. 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61:1187-1197.
- ## Q
- Quandt** K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23:4878-4884.
- ## R
- Rachez** C, Gamble M, Chang CP, Atkins GB, Lazar MA, Freedman LP. 2000. The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol* 20:2718-2726.
- Rachez** C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP. 1999. Ligand-dependent

transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398:824-828.

Ramji DP, Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575.

Rana B, Xie Y, Mischoulon D, Bucher NL, Farmer SR. 1995. The DNA binding activity of C/EBP transcription factor is regulated in the G1 phase of the hepatocyte cell cycle. *J Biol Chem* 270:18123-18132.

Rangatia J, Vangala RK, Singh SM, Peer Zada AA, Elsasser A, Kohlmann A, Haferlach T, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. 2003. Elevated c-Jun expression in acute myeloid leukemias inhibits C/EBPalpha DNA binding via leucine zipper domain interaction. *Oncogene* 22:4760-4764.

Ransone LJ, Verma IM. 1990. Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol* 6:539-557.

Rao MA, Cheng H, Quayle AN, Nishitani H, Nelson CC, Rennie PS. 2002. RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 277:48020-48027.

Rastegar M, Rousseau GG, Lemaigre FP. 2000. CCAAT/enhancer-binding protein-alpha is a component of the growth hormone-regulated network of liver transcription factors. *Endocrinology* 141:1686-1692.

Rennie PS, Bruchoovsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA, Cheng H, Snoek R, Hamel A, Bock ME, MacDonald BS, et al. 1993. Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol Endocrinol* 7:23-36.

Robins DM. 2005. Androgen receptor and molecular mechanisms of male-specific gene expression. *Novartis Found Symp* 268:42-52; discussion 53-46, 96-49.

Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, Glazer RI. 1997. Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272:21137-21141.

Ron D, Habener JF. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6:439-453.

Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE. 1997. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol* 17:6472-6480.

Rosenfeld PJ, Kelly TJ. 1986. Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromatography. *J Biol Chem* 261:1398-1408.

Ross S, Best JL, Zon LI, Gill G. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10:831-842.

Rotheneder H, Geymayer S, Haidweger E. 1999. Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J Mol Biol* 293:1005-1015.

Rundlett SE, Miesfeld RL. 1995. Quantitative differences in androgen and glucocorticoid receptor DNA binding properties contribute to receptor-selective transcriptional regulation. *Mol Cell Endocrinol* 109:1-10.

Runic R, Zhu LJ, Crozat A, Bagchi MK, Catterall JF, Bagchi IC. 1996. Estrogen regulates the stage-specific expression of kidney androgen-regulated protein in rat uterus during reproductive cycle and pregnancy. *Endocrinology* 137:729-737.

Ryu S, Tjian R. 1999. Purification of transcription cofactor complex CRSP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7137-7142.

Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R. 1999. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397:446-450.

S

Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, Simburger K, Milbrandt J. 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-

cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10939-10943.

Saelzler MP, Spackman CC, Liu Y, Martinez LC, Harris JP, Abe MK. 2006. ERK8 down-regulates transactivation of the glucocorticoid receptor through Hic-5. *J Biol Chem* 281:16821-16832.

Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, Suske G. 2002. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* 21:5206-5215.

Schaak S, Cussac D, Labialle S, Mignotte V, Paris H. 2005. Cloning and functional characterization of the rat alpha2B-adrenergic receptor gene promoter region: Evidence for binding sites for erythropoiesis-related transcription factors GATA1 and NF-E2. *Biochem Pharmacol* 70:606-617.

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. 1995. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270:283-286.

Scheller A, Hughes E, Golden KL, Robins DM. 1998. Multiple receptor domains interact to permit, or restrict, androgen-specific gene activation. *J Biol Chem* 273:24216-24222.

Scholz A, Truss M, Beato M. 1998. Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium. *J Biol Chem* 273:4360-4366.

Schreiber SL, Bernstein BE. 2002. Signaling network model of chromatin. *Cell* 111:771-778.

Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM. 1990. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62:1217-1226.

Sharrocks AD. 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:827-837.

Sif S, Capobianco AJ, Gilmore TD. 1993. The v-Rel oncoprotein increases expression from Sp1

site-containing promoters in chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 8:2501-2509.

Simard J, de Launoit Y, Haagensen DE, Labrie F. 1992. Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology* 130:1115-1121.

Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D. 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* 18:2437-2468.

Slagsvold T, Kraus I, Fronsdal K, Saatcioglu F. 2001. DNA binding-independent transcriptional activation by the androgen receptor through triggering of coactivators. *J Biol Chem* 276:31030-31036.

Slater EP, Redeuhl G, Theis K, Suske G, Beato M. 1990. The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element. *Mol Endocrinol* 4:604-610.

Smale ST, Kadonaga JT. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72:449-479.

Smith RG, Syms AJ, Norris JS. 1984. Differential effects of androgens and glucocorticoids on regulation of androgen receptor concentrations and cell growth. *J Steroid Biochem* 20:277-281.

Smolen TN, Brewer JA, Weber WW. 1993. Testosterone modulation of N-acetylation in mouse kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 264:854-858.

Sole E, Calvo R, Obregon MJ, Meseguer A. 1994. Thyroid hormone controls the cell-specific expression of the kidney androgen-regulated protein gene in S3 mouse kidney cells. *Endocrinology* 135:2120-2129.

Sole E, Calvo R, Obregon MJ, Meseguer A. 1996. Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney. *Mol Cell Endocrinol* 119:147-159.

Soler M, Tornavaca O, Sole E, Menoyo A, Hardy D, Catterall JF, Vandewalle A, Meseguer A. 2002. Hormone-specific regulation of the kidney androgen-regulated gene promoter in cultured

mouse renal proximal-tubule cells. *Biochem J* 366:757-766.

Song J, Ugai H, Kanazawa I, Sun K, Yokoyama KK. 2001. Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements. *J Biol Chem* 276:19897-19904.

Southern EM. 1974. An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem* 62:317-318.

Strahle U, Schmid W, Schutz G. 1988. Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *Embo J* 7:3389-3395.

Strawhecker JM, Betz NA, Neades RY, Houser W, Pelling JC. 1989. Binding of the 97 kDa glucocorticoid receptor to the 5' upstream flanking region of the mouse c-Ha-ras oncogene. *Oncogene* 4:1317-1322.

Strom AC, Forsberg M, Lillhager P, Westin G. 1996. The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression. *Nucleic Acids Res* 24:1981-1986.

Stromstedt PE, Poellinger L, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J. 1991. The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. *Mol Cell Biol* 11:3379-3383.

Su W, Jackson S, Tjian R, Echols H. 1991. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev* 5:820-826.

Sugawara T, Abe S, Sakuragi N, Fujimoto Y, Nomura E, Fujieda K, Saito M, Fujimoto S. 2001. RIP 140 modulates transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene through interactions with both SF-1 and DAX-1. *Endocrinology* 142:3570-3577.

Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF, 3rd. 1996. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 35:9052-9059.

Suh JM, Yu CT, Tang K, Tanaka T, Kodama T, Tsai MJ, Tsai SY. 2006. The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. *Mol Endocrinol* 20:3412-3420.

Sun JM, Chen HY, Moniwa M, Litchfield DW, Seto E, Davie JR. 2002. The transcriptional repressor Sp3 is associated with CK2-phosphorylated histone deacetylase 2. *J Biol Chem* 277:35783-35786.

Svensson EC, Tufts RL, Polk CE, Leiden JM. 1999. Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:956-961.

Syms AJ, Nag A, Norris JS, Smith RG. 1987. Glucocorticoid effects on growth, and androgen receptor concentrations in DDT1MF-2 cell lines. *J Steroid Biochem* 28:109-116.

T

Taatjes DJ, Naar AM, Anel F, 3rd, Nogales E, Tjian R. 2002. Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295:1058-1062.

Taatjes DJ, Tjian R. 2004. Structure and function of CRSP/Med2; a promoter-selective transcriptional coactivator complex. *Mol Cell* 14:675-683.

Tan JA, Marschke KB, Ho KC, Perry ST, Wilson EM, French FS. 1992. Response elements of the androgen-regulated C3 gene. *J Biol Chem* 267:4456-4466.

Tanner NK, Linder P. 2001. DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 8:251-262.

Tanner T, Claessens F, Haelens A. 2004. The hinge region of the androgen receptor plays a role in proteasome-mediated transcriptional activation. *Ann N Y Acad Sci* 1030:587-592.

Teixido N, Soler M, Rivera N, Bernues J, Meseguer A. 2006. CCAAT/enhancer binding protein-mediated role of thyroid hormone in the developmental expression of the kidney androgen-regulated protein gene in proximal convoluted tubules. *Mol Endocrinol* 20:389-404.

Thackray VG, McGillivray SM, Mellon PL. 2006. Androgens, progestins, and glucocorticoids induce follicle-stimulating hormone beta-subunit gene expression at the level of the gonadotrope. *Mol Endocrinol* 20:2062-2079.

Thangaraju M, Ananth S, Martin PM, Roon P, Smith SB, Sterneck E, Prasad PD, Ganapathy V. 2006. *c/ebpdelta* Null mouse as a model for the double knock-out of *slc5a8* and *slc5a12* in kidney. *J Biol Chem* 281:26769-26773.

Thiesen HJ, Bach C. 1990. Target Detection Assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acids Res* 18:3203-3209.

Tischer CC and Madesen KM. 1996. Anatomy of the Kidney, In: *Kidney* (Brenner, BM, ed) 5th ed. Saunders. Philadelphia. Vol. I, pp. 22-24.

Tomita K, Yoshida T, Morita J, Atsumi S, Totsuka T. 1995. In vivo responsiveness of thyroid glands to TSH in normal and novel 'growth-retarded' mice: transient elevation in normal mice and impairment in 'growth-retarded' mice. *J Endocrinol* 144:209-214.

Tonko M, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Helmberg A, Kofler R. 2001. Gene expression profiles of proliferating vs. G1/G0 arrested human leukemia cells suggest a mechanism for glucocorticoid-induced apoptosis. *Faseb J* 15:693-699.

Toole JJ, Hastie ND, Held WA. 1979. An abundant androgen-regulated mRNA in the mouse kidney. *Cell* 17:441-448.

Tora L, Gaub MP, Mader S, Dierich A, Bellard M, Chambon P. 1988. Cell-specific activity of a GGTC A half-palindromic oestrogen-responsive element in the chicken ovalbumin gene promoter. *Embo J* 7:3771-3778.

Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477-487.

Tran T, Shatnawi A, Zheng X, Kelley KM, Ratnam M. 2005. Enhancement of folate receptor alpha expression in tumor cells through the glucocorticoid receptor: a promising means to

improved tumor detection and targeting. *Cancer Res* 65:4431-4441.

Trautwein C, van der Geer P, Karin M, Hunter T, Chojkier M. 1994. Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J Clin Invest* 93:2554-2561.

Tsai MJ, O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-486.

U

Udvardia AJ, Templeton DJ, Horowitz JM. 1995. Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3953-3957.

Ueda H, Hirose S. 1991. Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. *Nucleic Acids Res* 19:3689-3693.

Urakami Y, Okuda M, Saito H, Inui K. 2000. Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett* 473:173-176.

Usui T, Kuno T, Ueyama H, Ohkubo I, Mizutani T. 2006. Proximal HNF1 element is essential for the induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 by glucocorticoid receptor. *Biochem Pharmacol* 71:693-701.

V

Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veysiere G, Martinez A. 2003. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept* 1:8.

Van Esch H, Bilous RW. 2001. GATA3 and kidney development: why case reports are still important. *Nephrol Dial Transplant* 16:2130-2132.

Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Harding B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns JP, Van de Ven W, Thakker RV, Devriendt K. 2000. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 406:419-422.

Villagra A, Cruzat F, Carvallo L, Paredes R, Olate J, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Stein JL, Imbalzano AN, Montecino M. 2006. Chromatin remodeling and transcriptional activity of the bone-specific osteocalcin gene require CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent recruitment of SWI/SNF activity. *J Biol Chem* 281:22695-22706.

Visvader JE, Crossley M, Hill J, Orkin SH, Adams JM. 1995. The C-terminal zinc finger of GATA-1 or GATA-2 is sufficient to induce megakaryocytic differentiation of an early myeloid cell line. *Mol Cell Biol* 15:634-641.

W

Wang GL, Shi X, Salisbury E, Sun Y, Albrecht JH, Smith RG, Timchenko NA. 2006. Cyclin D3 maintains growth-inhibitory activity of C/EBPalpha by stabilizing C/EBPalpha-cdk2 and C/EBPalpha-Brm complexes. *Mol Cell Biol* 26:2570-2582.

Wang GL, Shi X, Salisbury E, Sun Y, Albrecht JH, Smith RG, Timchenko NA. 2007. Growth hormone corrects proliferation and transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase in livers of old mice via elimination of CCAAT/enhancer-binding protein alpha-Brm complex. *J Biol Chem* 282:1468-1478.

Wang Q, Blackford JA, Jr., Song LN, Huang Y, Cho S, Simons SS, Jr. 2004. Equilibrium interactions of corepressors and coactivators with agonist and antagonist complexes of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol* 18:1376-1395.

Wang W, Dong L, Saviile B, Safe S. 1999. Transcriptional activation of E2F1 gene expression by 17beta-estradiol in MCF-7 cells is regulated by NF-Y-Sp1/estrogen receptor interactions. *Mol Endocrinol* 13:1373-1387.

Wen YD, Perissi V, Staszewski LM, Yang WM, Kronen A, Glass CK, Rosenfeld MG, Seto E.

2000. The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7202-7207.

Wikstrom AC. 2003. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *J Endocrinol* 178:331-337.

Williams SC, Cantwell CA, Johnson PF. 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev* 5:1553-1567.

Willnow TE, Nykjaer A. 2002. Pathways for kidney-specific uptake of the steroid hormone 25-hydroxyvitamin D3. *Curr Opin Lipidol* 13:255-260.

Wilson JD, Foster DW *et al.* 1998. Williams Textbook of Endocrinology, 9th ed. Saunders, Philadelphia.

Wiper-Bergeron N, Salem HA, Tomlinson JJ, Wu D, Hache RJ. 2007. Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2703-2708.

Wu FC. 1997. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin Chem* 43:1289-1292.

X

Xiao F, Mirwald A, Papaioannou M, Baniahmad A, Klug J. 2005. Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for Sp family transcription factors. *Mol Endocrinol* 19:2964-2978.

Xiao H, Hasegawa T, Isobe K. 2000. p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J Biol Chem* 275:1371-1376.

Xing W, Danilovich N, Sairam MR. 2002. Orphan receptor chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors inhibit steroid factor-1, upstream stimulatory factor, and activator protein-1 activation of ovine follicle-stimulating hormone receptor expression via composite cis-elements. *Biol Reprod* 66:1656-1666.

Xu J, Rogers MB. 2007. Modulation of Bone Morphogenetic Protein (BMP) 2 gene expression by Sp1 transcription factors. *Gene* 392:221-229.

Xu Q, Ji YS, Schmedtje JF, Jr. 2000. Sp1 increases expression of cyclooxygenase-2 in hypoxic vascular endothelium. Implications for the mechanisms of aortic aneurysm and heart failure. *J Biol Chem* 275:24583-24589.

Xu Z, Meng X, Cai Y, Koury MJ, Brandt SJ. 2006. Recruitment of the SWI/SNF protein Brg1 by a multiprotein complex effects transcriptional repression in murine erythroid progenitors. *Biochem J* 399:297-304.

Y

Yamada K, Tanaka T, Miyamoto K, Noguchi T. 2000. Sp family members and nuclear factor-Y cooperatively stimulate transcription from the rat pyruvate kinase M gene distal promoter region via their direct interactions. *J Biol Chem* 275:18129-18137.

Yan X, Mouillet JF, Ou Q, Sadovsky Y. 2003. A novel domain within the DEAD-box protein DP103 is essential for transcriptional repression and helicase activity. *Mol Cell Biol* 23:414-423.

Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M. 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62:1205-1215.

Yeh S, Chang C. 1996. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5517-5521.

Yen PM, Liu Y, Palvimo JJ, Trifiro M, Whang J, Pinsky L, Janne OA, Chin WW. 1997. Mutant and wild-type androgen receptors exhibit cross-talk on androgen-, glucocorticoid-, and progesterone-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 11:162-171.

Yen PM, Wilcox EC, Chin WW. 1995. Steroid hormone receptors selectively affect transcriptional activation but not basal repression by thyroid hormone receptors. *Endocrinology* 136:440-445.

Yu B, Datta PK, Bagchi S. 2003. Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res* 31:5368-5376.

Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG. 1998. The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7939-7944.

Yuan H, Gong A, Young CY. 2005. Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 26:793-801.

Z

Zhang J, Thomas TZ, Kasper S, Matusik RJ. 2000. A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. *Endocrinology* 141:4698-4710.

Zhao J, Bauman WA, Huang R, Caplan AJ, Cardozo C. 2004. Oxandrolone blocks glucocorticoid signaling in an androgen receptor-dependent manner. *Steroids* 69:357-366.

Zhao J, Bilslan A, Jackson K, Keith WN. 2005. MDM2 negatively regulates the human telomerase RNA gene promoter. *BMC Cancer* 5:6.

Zhao L, Bakke M, Parker KL. 2001. Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 185:27-32.

Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. 2006. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol* 26:4111-4121.

ANNEX
