

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**DREAM : UN REPRESOR TRANSCRIPCIONAL
REGULADO POR CALCIO Y AMPC**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Francisco Ledo Gómez

Bajo la dirección del Doctor:

José Ramón Naranjo Orovio

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1699-7

<u>INDICE.</u>	Pag.
1.- ABREVIATURAS.	1
2.- RESUMEN.	4
3.- INTRODUCCIÓN	6
3.1.-Transcripción.	6
3.1.1.- Conceptos generales.	6
3.1.2.- Secuencias reguladoras.	10
3.1.3.- Factores de transcripción.	15
3.1.3.a.- Factores en la transcripción basal	16
3.1.3.b.- Factores reguladores e inducibles activadores.	21
3.1.3.c.- Represores.	24
3.1.3.d.- Dominios funcionales en factores de transcripción.	29
Dominio de unión al ADN.	29
Dominio de oligomerización.	32
Dominio de interacción con HAT / HDAC.	33
3.1.4.- Transcripción y remodelación de cromatina.	34
3.1.4.a.- Modificaciones postraduccionales en histonas.	34
3.1.4.b.- Histona acetil transferasas nucleares y coactivadores transcripcionales.	36
3.1.4.c.- Histona deacetilasas y represión transcripcional.	37
3.1.4.d.- Remodeladores de cromatina dependientes de ATP: SWI/SNF.	39
3.1.4.e.- Sumoilación.	41
Tabla Resumen: Factores generales en el control de la iniciación de la transcripción.	42
3.2.-Regulación de la transcripción por AMPc.	45
3.2.1.- Conceptos generales.	45
3.2.2.-Familia de factores de transcripción de unión al AMPc.	48
3.3.- Reguación de la transcripción por calcio.	52
3.4.- DREAM: Antagonista Modulador del sitio DRE.	57
3.4.1.- Represor transcripcional.	57
3.4.2.- DREAM = CALSENILINA = KChIP3.	68
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.	72
4.1.- Líneas celulares.	72
4.2.- Plásmidos.	73
4.2.1.- Reporteros.	73
4.2.2.- Vectores de Expresión.	74
4.3.- Transfección de células eucariotas.	75
4.3.1.- Transfección con microprecipitados de fosfato cálcico.	75
4.3.2.- Transfeccióncon agentes lipofílicos.	75
4.4.- Expresión y purificación de proteínas en bacteria.	75
4.4.1.- Cultivos bacterianos.	75
4.4.2.- Transformación.	76
4.4.4.- Obtención de plásmidos.	76

4.4.5.- Obtención de proteínas sobreexpresadas.	76
4.4.6.- Purificación de proteínas fusionadas a GST.	76
4.5.- Análisis de proteínas eucariotas.	77
4.5.1.- Extracción de proteínas nucleares.	77
4.5.2.- Western blot.	77
4.5.3.- Ensayos de retardo en gel.	77
4.5.4.- Coimmunoprecipitación.	78
4.5.5.- Interacción de proteínas in vitro (pull down)	78
4.5.6.- South-western.	78
4.6.- Inmunofluorescencia.	79
4.7.- Ensayos con reporteros CAT.	79
4.8.- Anticuerpos.	79
4.9.- Oligonucleótidos.	80
5.- OBJETIVOS.	81
6.- RESULTADOS.	82
6.1.- Análisis de la interacción DREAM-DRE.	82
6.1.a.- Análisis mutacional del DRE.	82
6.1.b.- Ensayos para la identificación del DBD en DREAM.	83
6.1.c.- Promotores diana de la regulación transcripcional por DREAM.	86
6.2.- Regulación por calcio de la actividad transcripcional de DREAM.	89
6.2.1.- Unión directa del calcio a DREAM.	89
6.2.2.- Mutantes en EF-hand de DREAM.	90
6.2.2.a.-Efecto de la mutación sobre la unión al ADN.	90
6.2.2.b.-Efecto de las mutaciones simples, dobles y triple.	92
6.2.2.c.- El mutante como dominante negativo.	93
6.3.- Regulación por AMPc de la actividad transcripcional de DREAM.	94
6.3.a.- La sobreexpresión de α CREM desreprime la transcripción dependiente del sitio DRE.	94
6.3.b.- α CREM recombinante bloquea la unión de DREAM a los sitios DRE.	96
6.3.c.- Dos LCDs en α CREM median la interacción con DREAM.	97
6.3.d.- Dos LCDs en DREAM median la interacción con α CREM.	100
6.3.e.- La desrepresión del gen de prodinorfina está mediada por la interacción DREAM- α CREM.	101
6.3.f.- El mutante DREAML47,52V actúa como dominante negativo de la desrepresión por α CREM.	102
6.3.g.- Estímulos que afectan a la unión de DREAM al DRE.	103
6.4.- Regulación por DREAM de la transcripción dependiente de AMPc.	106
6.4.a.- DREAM bloquea la unión de las proteínas CREM y CREB al CRE.	106
6.4.b.- El efecto de DREAM sobre las bandas de retardo CRE es dependiente de calcio.	107
6.4.c.- La interacción de un solo LCD es responsable del bloqueo de las bandas de retardo CRE.	109

6.4.d.- DREAM recombinante evita la unión de CBP a CREB fosforilado.	111
6.4.e.- Mutantes de DREAM impiden la activación de Gal4-CREB por CBP.	112
6.4.f.- DREAM interfiere con la transcripción dependiente del CRE.	114
6.4.g.- DREAM endógeno regula la transcripción basal dependiente del sitio CRE.	117
6.4.h.- DREAM interacciona con CREB in vivo.	118
7.- DISCUSIÓN.	119
8.- CONCLUSIONES.	140
9.- BIBLIOGRAFIA.	141
10.- INDICE DE FIGURAS.	153
11.- INDICE DE TABLAS.	157

I.ABREVIATURAS.

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico.
AP-1	Proteína Activadora 1.
AP-2	Proteína Activadora 2.
APS	Persulfato de Amonio.
ARN	Ácido Ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
ARNpol	ARN polimerasa.
ARNr	ARN ribosomal.
ARNsin	Inhibidor de ARNasas.
ATCC	Colección americana de cultivos tipo.
ATP	Adenosín trifosfato.
bHLH	Dominio básico hélice-giro-hélice.
BSA.	Albúmina de suero bovino.
CaM	Calmodulina.
CaMK	Ca ²⁺ /Proteína quinasa dependiente de calmodulina.
CARE	Elemento de respuesta a calcio.
CAT	Cloroanfenicol acetil transferasa.
CBP	Proteína de unión a CREB.
Ci	Curio.
Cols	Colaboradores.
CRE	Elemento de respuesta a AMPc.
CREB	Proteína de unión al sitio CRE.
cpm	Cuentas por minuto.
C-terminal	Carboxilo terminal.
DAG	Diacil glicerol.
DBD	Dominio de unión al ADN.
DMEM	Medio Dulbecco modificado por Eagle.
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato.
D.O.	Densidad óptica.
DRE	Elemento Regulador en posición posterior a la caja TATA.
DREAM	Antagonista modulador del sitio DRE.
DTT	Ditiotreitol.
ECL	Quimioluminiscencia.
EDTA	Etilendiaminatetracetato.
EF-hand	Dominio de unión a calcio del tipo EF.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos.
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular.
FCS	Suero fetal de ternera.
G	Gramos.
GFP	Proteína verde fluorescente.
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides.
GST	Glutation S transferasa
h	Horas.

H1, 2, ó 3	Histona 1, 2, ó 3
HAT	Histona acetil transferasa.
HDAC	Histona deacetilasa.
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazin-N'etanosulfónico.
HMT	Histona metil transferasa.
HRE	Elemento de respuesta a hormonas.
HSE	Elemento de respuesta a choque térmico.
HSP	Proteína de choque térmico.
H.P.T.	Horas postransfección.
IgG	Inmunoglobulina.
IL	Interleuquina.
IPTG	Isopentenil tiobetagalactósido.
K+	Potasio.
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons.
KID	Dominio inducible por quinasas.
LCD	Dominio cargado rico en residuos de leucina.
LTP	Potenciación a largo plazo.
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno.
Min	Minutos.
MKK	MAPK quinasa.
MKP1	MAPK fosfatasa 1.
ml	Mililitro.
mM	Milimolar.
M.M	Material y métodos.
µg	Microgramo.
µl	Microlitro.
µM	Micromolar.
ng	Nanogramo.
NGF	Factor de crecimiento neuronal.
NLS	Señal de localización nuclear.
nm	Nanómetro.
nM	Nanomolar.
NRE	Elemento regulador negativo de la transcripción
N-terminal	Amino terminal.
Oct-1 y 2	Factor de transcripción de octámero 1 y 2.
ORF	Marco de lectura abierto.
PBS	Tampón salino fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PKA	Proteína quinasa A.
PKC	Proteína quinasa C.
PLC	Fosfolipasa C.
PMA	13-acetato,16-hidroxi,12-palmitoato,forbol-ester.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil.
PS 1, 2	Presenilina 1 y 2.
RAR	Receptor de ácido retinoico.
Rb	Reticuloblastoma.
rpm	Revoluciones por minuto.

R.T.	Temperatura Ambiente.
RT-PCR	Reacción de transcriptasa inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS.
SNC	Sistema nervioso central.
SRE	Elemento de respuesta a suero.
TAF	Factor asociado a TBP.
TBP	Proteína de unión a la caja TATA.
TF	Factor de transcripción.
TFII	Factores generales de transcripción de la RNAPol II.
TPA	12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato.
TRE	Elemento de respuesta a hormonas tiroideas.
Tris	Trihidroximetilaminometano.
TSA	Tricostina.
UV	Ultravioleta.
WT	Salvaje.

2.RESUMEN

Cada uno de los millones de procesos biológicos que se dan lugar en la célula tiene un origen y un destino, por decirlo de otra manera, tiene una función y un mecanismo por el que llevarlo a cabo y rellenan la vida con sucesos desde “sencillos y minúsculos”, como las funciones de una proteína, hasta conseguir que el resultado final sea miles de veces más importante que la suma de todos esos procesos.

Todo esto supone que cada una de las funciones se realiza con total exactitud y precisión, en el momento y lugar más adecuado, que se toman las decisiones correctas para superar cada nueva situación a la vez que dicho cambio se está generando.

La transcripción génica o control del momento, cantidad y duración de la expresión de cada gen en cada situación, reúne todas y cada una de estas características.

La memoria que a continuación se detalla centra su contenido en el estudio de un nuevo factor de transcripción denominado DREAM (Carrión y cols., 1999), clonado durante la caracterización del promotor del gen de prodinorfina humana. La capacidad de DREAM de unirse a una región específica de ADN (DRE – Elemento Regulador Downstream – posterior a la caja TATA) está controlada de manera directa por calcio o por la interacción con elementos de la vía de señalización del AMPc. De esta manera DREAM no sólo se convierte en punto de convergencia entre las vías de calcio y AMPc sino que también es el primer factor de transcripción regulado directamente por calcio sin mediar procesos fosforilativos.

Tras su clonaje en nuestro laboratorio, se abrió ante nosotros la posibilidad de estudiar sus dominios funcionales así como sus principales funciones en el control de la transcripción de determinados genes diana.

Bajo esta situación, el trabajo de nuestro laboratorio, recopilado en esta memoria, presenta dos objetivos principales:

- Estudio de los dominios funcionales de la proteína DREAM. La secuencia de aminoácidos de la proteína y su posterior alineamiento permitió en un primer lugar la identificación de **cuatro dominios de unión a calcio del tipo EF-hand (manos de calcio)** (Carrión y cols., 1999), que son capaces de unir calcio lo que además supone un cambio conformacional en la proteína que provoca que ésta no pueda unirse al DRE y que tiene como efecto funcional la pérdida de represión sobre el promotor del gen diana (Carrión y cols., 1999). Del mismo modo, la mutación de una, dos o tres manos de calcio provoca una pérdida de sensibilidad de la proteína a los aumentos de calcio con lo que se bloquea la desrepresión por este ion (Ledo y cols., 2000.a).

La presencia de **dos LCDs o dominios cargados ricos en leucinas**, descritos en detalle para las interacciones de receptores nucleares (Heery y cols., 1997) abría la puerta a la posible interacción de DREAM con proteínas que también presentaran dichos dominios. Una de esa proteínas fue la nucleoproteína α CREM de la familia de proteínas de unión al CRE (Elemento de Respuesta a AMPc), en la vía de señalización del AMPc y PKA. La presencia de LCDs en ambas proteínas es fundamental para que puedan contactar provocando la pérdida de unión de DREAM al DRE y la consecuente desrepresión del promotor del gen diana (Ledo y cols., 2000.b).

La funcionalidad de los LCDs no sólo se limita a la regulación de la unión de DREAM al sitio DRE sino que la interacción de DREAM con otros factores de transcripción como los miembros de la familia CREM/CREB, a través de los LCDs, también

controla o modula la interacción de estos factores con sus sitios de regulación en el ADN, de esta manera, la interacción de DREAM, a través de su LCD colocado en posiciones 47-52, con el LCD en posición 138-141 de CREB, elimina su capacidad de unirse al sitio CRE y su interacción con CBP (Proteína de unión a CREB), controlando de esta manera la iniciación de la transcripción, o lo que es lo mismo reprimiendo la expresión de genes a través de elementos de regulación distintos al DRE (Ledo y cols., 2002).

- Identificación de genes diana de la regulación por DREAM.- El primer promotor en que se encontró un sitio DRE fue sobre el de prodinorfina humana (Carrion y cols., 1998) que sirvió como base para el aislamiento y clonaje de DREAM (Carrión y cols., 1999). A partir de ese punto buscamos aquellos promotores de genes que estuvieran regulados por DREAM, en un primer lugar fijando nuestra atención en aquellos que tuvieran un sitio DRE en posición posterior a la caja TATA y su expresión estuviera controlada por calcio.

Los primeros candidatos han sido promotores de genes tempranos como ICER, c-jun, c-fos (Carrión y cols., 1999).

Con los resultados que se mostrarán a continuación, así como con nuestras hipótesis y conclusiones presentamos una proteína sobre la que podrían convergen muy distintas vías de señalización, con una regulación extremadamente fina no sólo por modificaciones sobre determinados aminoácidos sino por unión de iones, interacción con otras proteínas, con un posible amplio abanico de genes diana controlados de manera directa por DREAM a través del sitio DRE o de manera indirecta sobre otros sitios reguladores por el contacto con otros factores de transcripción.

Además de todo esto, DREAM no es sólo un factor de transcripción sino que presenta distintas funciones en el citoplasma, descritas por otros grupos, como la interacción con las presenilinas y su posible participación en el control de los niveles de calcio en el citoplasma y el procesamiento de presenilinas durante los procesos de Alzheimer (Buxbaum y cols., 1998) o la interacción con canales de potasio dependiente de voltaje del tipo A para el control de la excitabilidad en neuronas y células del miocardio (An y col., 2000).

De esta manera, DREAM podría estar actuando como un modulador o controlador de muy distintos procesos, a distintos niveles y en muy diferentes funciones, lo que le convierte en una proteína con gran flexibilidad funcional.

3. INTRODUCCIÓN

Incluso el organismo unicelular más simple debe ser capaz de tratar con los inevitables cambios en las condiciones ambientales que pueda encontrar. Estos incluyen cambios en la temperatura, pH, presencia de nutrientes, etc. Las vías metabólicas que son apropiadas para un determinado conjunto de condiciones podrían ser innecesarias o incluso contraproducentes para otro grupo de condiciones. Ahora sabemos que normalmente los organismos superan estas demandas ambientales a través de la regulación de la expresión de genes específicos. Por supuesto, esta opción no está libre de un coste, estos mecanismos requieren proteínas específicas y síntesis de estas proteínas, lo que demanda un gasto energético.

El primer paso esencial en la conversión de la información genética del ADN a proteínas es la transcripción, que también es el principal punto de regulación de la expresión génica. Tanto los procesos de transcripción basal como la activación y represión están regulados y controlados por secuencias cortas y específicas de ADN en los promotores de los genes y en los enhancers. Estas secuencias actúan por unión específica de proteínas conocidas como factores de transcripción, los cuales influyen en los niveles de transcripción de los genes. Los activadores o represores controlan la transcripción de genes concretos en tipos celulares determinados o en respuesta a señales específicas. Una vez que ocurre esto, todos los siguientes pasos de la expresión génica se ponen en marcha para la apropiada producción de proteína en un tipo celular específico o en cualquier célula de manera inducible (Latchman., 1999).

3.1.1. CONCEPTOS GENERALES.

La transcripción implica la síntesis de una cadena de ARN que representa una cadena de la doble hebra de ADN, es decir, es una secuencia idéntica a una de las cadenas del ADN, que se denomina *cadena codificante*.

La síntesis del ARN codificante es catalizada por la enzima ARNpolIII. La transcripción comienza cuando la ARNpolIII se une a una región, el promotor, al inicio del gen. El primer par de bases que se transcribe a ARN es el llamado sitio de iniciación. Desde este sitio, la ARNpolIII se mueve sobre el molde, sintetizando ARN, hasta que alcanza una secuencia denominada terminador. Este proceso define la unidad de transcripción que comprende desde el promotor hasta el terminador. La característica más importante de la unidad de transcripción es que está constituida por un fragmento de ADN que se expresa mediante la producción de una molécula única de ARN. El transcrito primario es producto inmediato de la transcripción. Este consiste en un ARN que se extiende desde el promotor al terminador y que contiene sus extremos 5' y 3' originales. No obstante, el transcrito primario es casi siempre inestable, en procariotas es degradado rápidamente o cortado para originar los productos finales maduros (ARNr y ARNt), en eucariotas se modifican los extremos (ARNm) y/o se corta para dar lugar a los productos maduros (todos los ARNs).

La transcripción presenta 4 fases diferenciadas, en las que se crea la burbuja de transcripción, comienza la síntesis del ARN, la burbuja se mueve sobre el ADN, y por último se termina. Estas son:

*El *reconocimiento del molde*.

*La *iniciación* define la síntesis de los primeros enlaces nucleotídicos en el ARN.

**Elongación*.- Durante la elongación la enzima se mueve a lo largo del ADN y extiende la cadena creciente del ARN.

**Terminación*.- Implica el reconocimiento del punto que determina el final de la adición de bases a la cadena. Para terminar la transcripción, hay que cesar la formación de enlaces fosfodiéster y el complejo de transcripción debe desintegrarse.

La transcripción en las células eucariotas se lleva a cabo por tres tipos de ARN polimerasas:

- La ARN polimerasa I transcribe ARNr (ribosómico).
- La ARN polimerasa II transcribe ARNm (mensajero).
- La ARN polimerasa III transcribe ARNt (de transferencia) y otros pequeños ARN.

Todas las ARNpol eucariotas son proteínas grandes que aparecen como agregados de 500 KDa o más, en complejos de 8 a 14 subunidades.

El paso inicial (y en algunos casos el único) en la regulación génica es la decisión de transcribir un gen o no.

Las secuencias que se encuentran precediendo al sitio de iniciación se denominan “upstream” (corriente arriba); aquellas secuencias que se encuentran después del sitio de iniciación están “downstream” (corriente abajo). Las posiciones de las bases se numeran en ambas direcciones en referencia al sitio de iniciación al que se asigna la posición +1, aumentando corriente abajo. La base situada justo antes del sitio de iniciación corresponde a la posición -1 y los números negativos irán aumentando corriente arriba.

El genoma celular está empaquetado en estructuras que físicamente imposibilitan la iniciación de la transcripción, como en el caso de la heterocromatina donde el enrollamiento del ADN presenta estructuras muy compactas. En regiones del genoma donde la heterocromatina deja paso a la eucromatina, en la que el ADN está menos condensado, la entrada de los factores de transcripción es mucho más asequible.

La cromatina de las células eucariotas está altamente organizada en complejos formados por ADN y proteínas (Stein y cols., 1984).

La mayoría de las proteínas del cromosoma son histonas. Las histonas son pequeñas proteínas básicas con un dominio globular y un N-terminal flexible y cargado denominado “cola”, importante para la interacción nucleosoma-nucleosoma (Luger y cols., 1997). Las histonas son proteínas básicas conservadas a través de la evolución y subdivididas en 5 clases denominadas H1, H2A, H2B, H3, y H4, todas ellas necesarias desde un punto de vista funcional y estructural (Doenecke y cols., 1997) (Fig 1).

Las histonas son importantes en la estructura y estabilidad de la cromatina y muy relevantes en el control de la expresión génica, donde las colas N-terminal de las histonas son claves en el control de la transcripción.

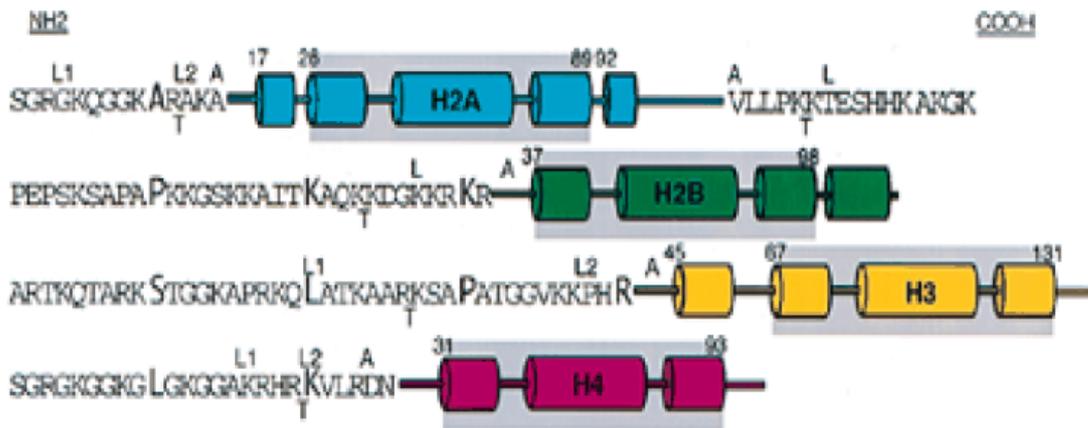


Fig (1). Secuencia y estructura secundaria de la cola y del core de las histonas. Marcados con L los aminoácidos necesarios para la formación del nucleosoma. Marcados con A los residuos necesarios en la formación del octámero de histonas. Marcados con T los residuos susceptibles de proteólisis en el nucleosoma.

El papel general de las histonas es la organización de la cromatina para formar estructuras de mayor orden. A nivel de regulación génica, las histonas son importantes por su flexibilidad para posibles modificaciones covalentes postraduccionales y la posibilidad de formar diferentes complejos en función de las histonas que se asocien. La diversidad de genes de histonas es particularmente evidente en células de mamífero. Cada clase de histona de mamífero está compuesta por una gran cantidad de variantes no alélicas, generando subtipos de histonas, las cuales varían estructuralmente y están codificadas por genes de una sola copia. Se han podido identificar 2 subtipos de H2A, 3 subtipos de H2B y 3 subtipos de H3, mientras que H4 sólo se ha podido identificar un subtipo.

La diversidad de genes de histonas junto con la expresión diferencial en distintos tejidos sugiere una variación de patrones de subtipos de histonas que puede contribuir a la modulación funcional y organización de la cromatina (Doenecke y cols., 1997).

La localización de subtipos podrían permitir la inducción de cambios regionales en la accesibilidad a la cromatina de los factores involucrados en la activación transcripcional.

La gran conservación de los genes de histonas en mamíferos y la modulación específica de tejido de los patrones de histona sugieren que la diversidad de clases de histonas es funcionalmente importante y no sólo una redundancia del sistema (Doenecke y cols.1997).

La subunidad básica de la cromatina es el nucleosoma, compuesto de unas 147 pb de ADN enrolladas en un complejo con 8 histonas (1 tetrámero H3:H4 y 2 dímeros H2A:H2B). A su vez los nucleosomas, con la participación de la H1 aumentan el grado de enrollamiento para compactar aún más la cromatina.

El ensamblaje del core de histonas depende de la heterodimerización inicial de H3 con H4 y la posterior dimerización para formar $(H3/H4)_2$ tetrámero, que puede formar un complejo estable con unas 120 pb de ADN. Las H2A y H2B se unen al complejo $(H3/H4)_2$ y aumentan el enrollamiento del ADN al nucleosoma a algo más de 160 pb. Esto crea una estructura proteica superhelicoidal $(H2A/H2B)-(H4/H3)-(H3/H4)-(H2B/H2A)$, dentro del cual está enrollado el ADN.

Las interacciones dímero-dímero H3:H3 y H2B:H4 forman una estructura similar a 4 hélices que no es estable en ausencia de ADN.

Cada contacto entre el ADN y el nucleosoma involucra a un residuo de arginina que penetra en el surco menor y la participación directa de 2 grupos fosfato consecutivos de cada hélice del ADN (Fig 2).

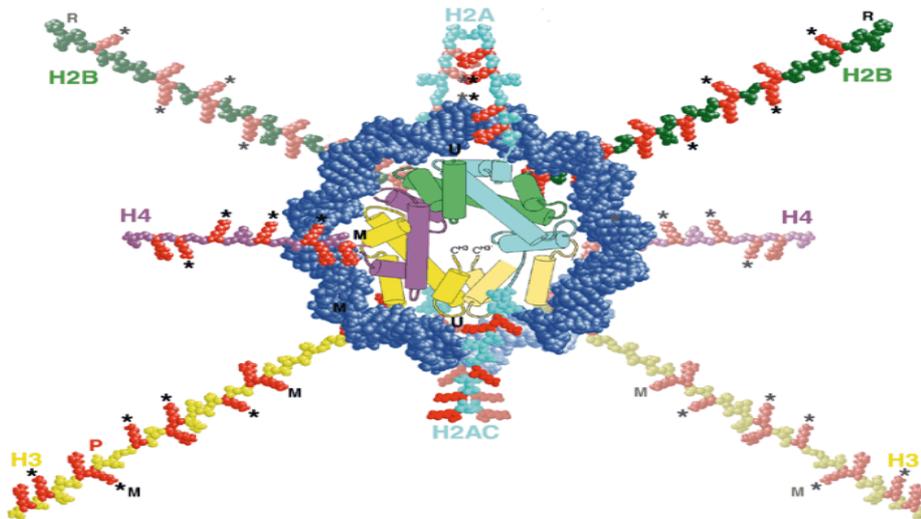


Fig (2). Esquemización del nucleosoma con el ADN enrollado sobre el core de histonas y las colas de las histonas extendidas.

La capacidad del core de histonas para interactuar en la formación de cada nucleosoma se mimetiza aparentemente por complejos de iniciación de la transcripción. La maquinaria de transcripción se asocia en complejos similares a los nucleosomas (Burly y cols.,1996), sugiriendo que complejos similares al octámero de histonas se forman en la generación de complejos de iniciación de la transcripción, puntualizando la relación entre las histonas y los factores involucrados en la regulación transcripcional. Estas similitudes no sólo se refieren al core del nucleosoma sino que, por ejemplo, el dominio de unión a ADN de H5 (homóloga a la H1 de mamíferos) tiene una estructura cristalina casi idéntica al dominio de unión al ADN de HNF3 γ (factor de transcripción específico de hígado). Estas similitudes estructurales sugieren que las histonas pueden modular el estado de represión en una determinada región de cromatina (Ramakrishnan y cols.,1993).

Con todo lo mencionado hasta el momento se plantea la situación de saber como la ARNpol encuentra los promotores en el ADN, es decir, como las proteínas distinguen sus sitios de unión específicos en el ADN respecto a otras secuencias y por otro lado conocer como las proteínas reguladoras interactúan con la ARNpol para activar o reprimir pasos específicos en la iniciación, elongación o terminación de la transcripción.

3.1.2. SECUENCIAS REGULADORAS.

Los promotores de la ARNpolII y II están situados en dirección 5' del punto de iniciación, pero algunos promotores para la ARN polimerasa III se sitúan en dirección 3' del mismo (downstream). Cada promotor contiene grupos característicos de secuencias cortas conservadas, que son reconocidas por la clase apropiada de factores. Las secuencias cortas que son reconocidas por los factores de transcripción se sitúan en dirección 5' del punto de inicio (upstream). Estos sitios de actuación en cis se suelen diseminar sobre una región mayor a 200 pb. Algunos de estos elementos y los factores que los reconocen son comunes: se encuentran en varios promotores y se utilizan de forma consecutiva. Otros son específicos: identifican clases particulares de genes y su uso está regulado. Los elementos aparecen en diferentes combinaciones en cada promotor individual.

Las secuencias componentes del promotor vienen definidas operativamente por la demanda de que deben estar localizadas en la vecindad general del sitio de iniciación y de que son requeridas para la iniciación.

Dentro de los promotores podemos encontrar tres tipos de secuencias reguladoras de la transcripción:

1/ **Elementos basales:** También conocidos como elementos mínimos o comunes ya que aparecen en todos los promotores estudiados y en ausencia de otros elementos reguladores, son los responsables de los niveles de transcripción basal.

El elemento basal más conocido y caracterizado es la *caja TATA*, rica en pares de nucleótidos A-T y cuya secuencia consenso es TATAA/TAA/T, existiendo varias subclases de elementos TATA (Simon y cols., 1988), siempre localizadas normalmente en posición -30 del inicio de transcripción, aunque pueden variar según el promotor a estudio (Carcamo y cols., 1990).

La localización de la TATA es crítica para el posicionamiento de la burbuja de transcripción y del punto de inicio de la misma (Breathmach y Chambon, 1981) (Fig 3).

Las secuencias *iniciadoras o Inr* (Smale y Baltimore., 1989) son capaces de comenzar la transcripción en un único sitio específico. Aparecen en genes como los de proteínas del mantenimiento celular y en promotores que carecen de caja TATA. La secuencia iniciadora contiene el inicio de la transcripción.

Se ha propuesto una secuencia consenso de estos elementos que sería PyPyANT/APyPy (Javahery y cols., 1994). Varias proteínas como E2F, YY1, USF, TFII-I y TFIID (Smale., 1994) y UreB1 (Gu y Iadarola., 1994) se unen a estas secuencias y hay evidencias de que la ARNpolIII por si sola tiene preferencia para iniciar la transcripción a partir de este punto (Carcamo y cols., 1991) (Fig 4).

2/ **Elementos moduladores:** Son pequeñas secuencias situadas en el 5' del inicio de la transcripción. Son reconocidas por proteínas que regulan la actividad constitutiva del promotor, de manera que el número y tipo de estos elementos determina la actividad de los promotores que los contienen.

La *caja GC* fue identificada en el promotor del virus SV40. Es una secuencia formada por repeticiones de 21 pb, con la secuencia GGGCGG en cualquier orientación. La unión de la proteína Sp1 a este elemento es el evento que desencadena el cambio en los niveles del inicio de la transcripción de los genes cuyos promotores contienen el motivo CG (Dynam y Tjan, 1983). Dentro de la caja GC hay 6 pb muy conservadas cuya secuencia se encuentra frecuentemente dentro de las 100 primeras bases 5' del inicio de la transcripción. El hecho de que el motivo central de la caja GC esté muy conservado y las regiones flanqueantes no, sugiere que las secuencias flanqueantes determinan la afinidad de Sp1 para una determinada caja GC y por consiguiente su potencia para activar la transcripción.

La *caja CAAT* está localizada entre -40 y +100 pb 5' del inicio de la transcripción. Una característica importante de este elemento es la diversidad de factores de transcripción que la reconocen (La Thange y Ribby., 1988) y una particularidad es su posible papel para determinar la transcripción durante el desarrollo así como la transcripción específica de tejido, como se ha demostrado usando la región reguladora del gen de la histona 2B, controlado durante el desarrollo (Kelmer et al., 1986) (Fig 3).

El *motivo octámero* presenta una localización similar a las dos secuencias anteriores. Posee una actividad potenciadora cuando aparece en forma de multímeros, así como también podría conferir especificidad celular a la transcripción (Ondek y cols., 1987). Varias proteínas reconocen la secuencia octámero. El factor Oct-1 es una proteína ubicua que está implicada en la transcripción de genes específicos de la fase S del ciclo celular (Fletcher y cols., 1987). Por otra parte el factor Oct-2 es una proteína específica de linfocitos que determina la transcripción del gen que codifica para la cadena ligera de las inmunoglobulinas (Scheldeneit y cols., 1987) (Fig 3).

3/ Elementos para la expresión regulada: Los niveles de expresión de gran cantidad de genes vienen determinados por señales extracelulares, que son transformadas dentro de la célula en cambios de los niveles de mensajeros secundarios, desencadenando así cascadas de señales que modifican la actividad de determinados factores de transcripción para actuar sobre la expresión de genes diana.

Estas secuencias reguladoras suelen ser pequeñas, de 8 a 10 pb, con estructura palindrómica, situadas normalmente en el 5' del inicio de la transcripción, en los 300 pb más próximos al +1, si bien también han aparecido descritas secuencias reguladoras muy lejos de la TATA (de 1 a 3 Kb), así como en posiciones 3' respecto de la TATA.

Existe un gran número de elementos reguladores, algunos de los más importantes son:

Secuencias de ADN que controlan la inducción o represión transcripcional en la regulación de la transcripción por hormonas (HRE).

- Los *HRE* poseen una estructura palindrómica consistente en secuencias de 5 pb repetida de forma invertida y separadas, generalmente, por 3 pb. Esta estructura está conservada en los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Yamamoto., 1985) y elementos de respuesta a estrógenos (ERE). En cambio, los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) contienen dos secuencias invertidas repetidas sin separación alguna (Tabla 1).

La funcionalidad, especificidad, y actividad transcripcional de las secuencias HRE vienen determinadas por las proteínas que se unen a ellas, por lo que la secuencia, el

espaciamiento de las repeticiones (Vmesono y cols., 1991), así como la multiplicidad y localización de los HRE en el promotor son fundamentales para el control de la actividad transcripcional del promotor.

- Las hormonas peptídicas así como gran cantidad de neurotransmisores (serotonina, dopamina, adrenalina, glutamato, etc) suelen finalizar en modificaciones de factores de transcripción de las familias de Fos y Jun que en complejos homo o heterodiméricos se unen a *secuencias AP-1* (Kouzarides y cols., 1988) modificando así la expresión del gen diana.

Las secuencias AP-1 constan de 7 pb muy conservadas con estructura palindrómica, localizada en las 500 pb del 5' al inicio de la transcripción (Tabla 1 y Fig 3).

+Otra secuencia reguladora destino de vías de segundos mensajeros es el *CRE* (*elemento de respuesta a AMPc*). Se han descrito dos tipo de CREs según la secuencia de pares de bases:

- CRE palindrómico o simétrico.- Importantes en la transcripción basal y regulada por fosforilación de los factores que se unen estas secuencias. Presenta gran similitud con las secuencias AP-1 lo que ha hecho predecir interacciones entre las señales de distintas vías de segundos mensajeros (Sassone-Corsi y cols., 1990).

- CRE no palindrómicos o asimétricos.- Importantes para la transcripción no regulada (Nichols y cols., 1992).

De la comparación de las secuencia CRE conocidas así como de experimentos de mutagénesis se obtiene una secuencia consenso CGTCA que es fundamental para que una determinada secuencia se comporte como un CRE.

En ocasiones, las vías de señalización provocan ondas de calcio que resultan en cambios en la expresión génica mediados por elementos CRE, denominándose en esta ocasión, elementos de respuesta a calcio, *CaRE* (Sheng y cols., 1990) (Tabla 1 y Fig 3).

Otra de las secuencias reguladoras más conocidas y estudiadas es el *SRE* (*elemento de respuesta a suero*), llamado así por ser esencial para la respuesta de promotores a la estimulación con suero (Treisman, 1990). Se encuentra en promotores de múltiples genes. Los mediadores intracelulares que influyen en la actividad del SRE son muy variados y en muchos casos con orígenes muy diferentes, a través de muy distintas vías de señalización.

La secuencia del SRE CCATATTAGG, es donde se une el factor de respuesta a suero (SRF) (Tabla 1 y Fig 3).

Secuencia Reguladora	Segundo Mensajero	Secuencia
GRE	Glucocorticoides Andrógenos	AGAACANNNTGTTCT
ERE	Estrógenos	AGGTCANNNTGACCT
TRE	Hormona Tiroidea Ácido Retinoico	AGGTCATGACCT
AP-1	DAG	TGAC/GTCA
CRE-simétrico	AMPc y Calcio	TGACGTCA
CRE-asimétrico	AMPc	NNNCGTCA

4/ **El enhancer o intensificador** es otro tipo de secuencias implicadas en la iniciación. Se identifica por la presencia de secuencias que estimulan la iniciación, pero que están localizadas a una considerable distancia del punto de inicio (Hatzopoulos y cols., 1988). Los elementos enhancer son, a menudo, puntos diana para la regulación específica tisular o temporal.

Los componentes de un enhancer recuerdan a los del promotor, formado por una variedad de elementos modulares, organizados en un grupo estrechamente unido. Los elementos de un enhancer funcionan como los de un promotor, pero en el enhancer no necesitan estar cerca del punto de inicio. No obstante, las proteínas que se unen a elementos del enhancer interaccionan también con elementos del promotor. La distinción entre promotores y enhancers es operativa, más que implicar una diferencia fundamental en el mecanismo. Esto se refuerza por el hecho de que algunos tipos de elementos se encuentran tanto en promotores como en enhancers.

Debido a que estas secuencias se encuentran muy alejadas del inicio de la transcripción, se proponen interacciones proteína-proteína para formar complejos de transcripción entre secuencias de ADN separadas, se sugiere que la unión de factores de transcripción a la región alejada debe inducir un cambio conformacional en la hélice de ADN, originando un lazo que aproxima las dos secuencias (Muller, y cols., 1988) (Fig 4).

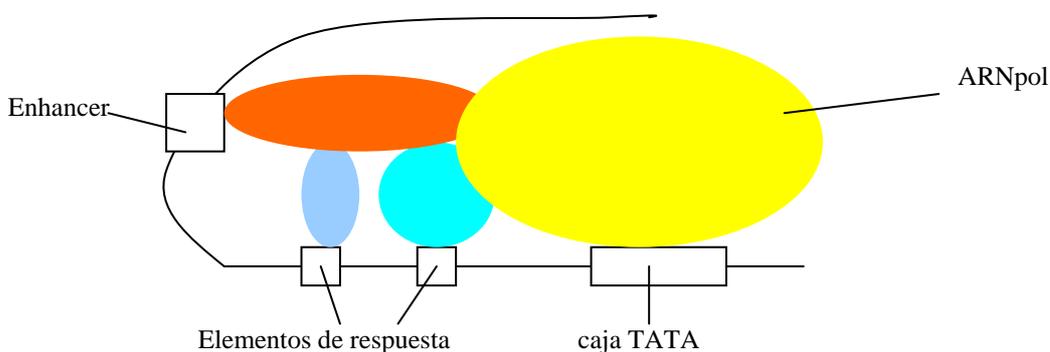


Fig (4). Interacción de proteínas unidas a elementos upstream del ADN del promotor con componentes del complejo ARNpolIII. Proteínas unidas a elementos upstream en el ADN del sitio de iniciación facilitan el ensamblaje del complejo o ayudan a que su funcionamiento sea el adecuado. El cierre de la estructura del promotor puede verse ayudada por la presencia de proteínas que curvan o pliegan el ADN. Los elementos enhancer pueden estar situados a muchas kilobases del sitio de iniciación de la transcripción y el ADN debe plegarse para permitir la unión de los elementos unidos al enhacer en el complejo de la ARNpolIII.

3.1.3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

Para la iniciación de la transcripción, además de las ARNpol, se necesitan otros factores accesorios, que son los principales responsables del reconocimiento del promotor. Estos factores auxiliares tienen cometidos muy similares en todas las ARNpol eucariotas.

Toda proteína que se necesita para la iniciación de la transcripción, pero que no sea en sí parte de la ARNpol, puede considerarse como un factor de transcripción. La unión al ADN no es el único modo de acción de un factor de transcripción (Tabla 3). Un factor puede reconocer a otro factor o puede reconocer a la ARNpol, o puede ser incorporado a un complejo de iniciación solamente en la presencia de otras proteínas distintas.

El número de factores que pueden actuar en conjunción con la ARNpolIII es grande, pudiéndose dividir en tres grupos:

- *Factores generales* son los requeridos para los mecanismos de inicio de la síntesis del ARN en todos los promotores. Se unen a la ARNpol para formar un complejo que rodea el punto de inicio, determinando el sitio de iniciación. Los factores generales, junto con la ARNpol constituyen el **aparato basal de transcripción**.
- *Factores moduladores* son proteínas de unión al ADN que reconocen elementos cortos específicos situados en dirección 5' del punto de inicio. La actividad de estos factores no está regulada; son ubicuos y actúan sobre cualquier promotor que contenga el sitio de unión apropiado en el ADN. Incrementan la eficacia de la iniciación y se requieren para que un promotor funcione a un nivel adecuado. El grupo preciso de factores requeridos para una expresión completa es característico de promotor particular.
- *Los factores inducibles* funcionan de la misma forma general que los anteriores, pero tienen un papel regulador. Se sintetizan o activan en momentos específicos o en tejidos específicos y son, por lo tanto, responsables del control de los patrones de transcripción en el tiempo y el espacio. Las secuencias a las que se unen se denominan *elementos de respuesta* (tratados en el apartado anterior y Tabla 3).

Un promotor que contiene sólo elementos reconocidos por los dos primeros grupos de factores debe poder ser transcrito en cualquier tipo celular. Tales promotores pueden ser responsables de la lectura de genes celulares que se expresan constitutivamente. Los elementos o factores de combinación no son un componente esencial del promotor, lo que sugiere que la iniciación de la ARNpolIII puede ser llevada a cabo de muchas maneras diferentes. La unión de los factores al ADN se asocia con la construcción de un complejo en el cual las interacciones proteína-proteína son importantes. Los factores situados en dirección 5' y los inducibles funcionan interactuando con el aparato basal de transcripción, de forma específica con ciertos factores generales (Fig 4).

Desde un punto de vista estructural y analizando los dominios funcionales de los factores de transcripción podemos resaltar que tanto los activadores como los represores presentan múltiples dominios funcionales de los que destacan: dominio de unión al ADN (DBD -DNA Binding Domain-), dominio de dimerización, transactivación o transrepresión transcripcional, etc (algunos de los dominios funcionales más relevantes serán repasados en puntos posteriores); que junto a la diversidad de elementos que existen en los promotores crea un complejo código cuyo balance final es una gran diversidad en los patrones de expresión génica (Struhl, 1991).

Algunos factores de transcripción no contactan directamente con el aparato basal, sino que, en su lugar, son los coactivadores los que contactan con él. Así se pueden considerar a los coactivadores como factores de transcripción cuya especificidad viene conferida por la capacidad de unirse a factores de unión al ADN pero no directamente a éste.

El contacto con el aparato basal puede hacerse a través de cualquiera de los factores basales, normalmente TFIID, TFIIB o TFIIA, que participan en un estadio relativamente precoz del ensamblaje del aparato basal. Cuando se realiza tal contacto, se sugiere que el principal efecto es influir en el ensamblaje del aparato basal de iniciación, presumiblemente incrementando alguna etapa limitante.

Los TAFs (factores asociados a TBP) pueden proporcionar distintos puntos de interacción de la maquinaria de transcripción con los factores en dirección 5', en cada caso, la interacción estabiliza el complejo de transcripción basal en un grado determinado, controlando el nivel de expresión.

En el desarrollo y la especialización celular se han seleccionado más de dos mil factores de transcripción involucrados en diferentes cascadas de control transcripcional. El uso combinatorial de este conjunto de más de dos mil proteínas podría fácilmente significar que el conjunto de reguladores para la expresión de cada gen es único, asegurando la correcta cantidad de la proteína adecuada en el momento y proceso del desarrollo concreto (Brivanlou y Darnell., 2002).

3.1.3.a. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN BASAL.

La expresión de los genes está dictada en parte por la integración de las señales intracelulares y extracelulares que controlan la actividad de las proteínas reguladoras de la transcripción. Los estados fisiológicos en los que podemos encontrar la expresión de un gen se pueden clasificar en tres: reprimido, expresión basal y expresión inducida. Un gen está reprimido cuando la estructura de la cromatina impide físicamente que la maquinaria de transcripción o cualquier otro factor pueda acceder productivamente al ADN del promotor. La expresión basal de un gen puede residir en la apertura de la cromatina que lo hace accesible a la maquinaria de transcripción; en ausencia de activadores funcionales que recluten a la maquinaria de transcripción, el gen se expresa a bajos niveles (Pugh, 2000).

El promotor típico eucariota está formado por un conjunto de elementos de respuesta para proteínas reguladoras de la transcripción y un "core" formado por una caja TATA y/o un iniciador. La maquinaria general de la transcripción se ensambla sobre el core del promotor e inicia la transcripción.

La presencia de la proteína de unión a la TATA (TBP) parece ser un paso intermedio en la activación y desactivación transcripcional. Con la ayuda de un factor transcripcional regulador unido al promotor, TBP se une a la caja TATA, con un determinado número de proteínas reguladoras. Este complejo activador/TBP a continuación o simultáneamente recluta a la ARNpolIII, permitiéndole competir de manera efectiva a los inhibidores de TBP(Lee y cols.1998) (Fig 5).

Partiendo de la capacidad de la maquinaria general de transcripción de reconocer el core del promotor *in vitro*, en general, el complejo de preiniciación no está ensamblado en las células a menos que esté facilitado por los activadores transcripcionales, con lo que la estructura o modificación de la cromatina no es enteramente responsable de prevenir el acceso de la maquinaria de transcripción al core del promotor, algunas evidencias demuestran que aunque el ADN del promotor esté accesible a la maquinaria general de transcripción, el complejo se forma de manera poco eficiente en ausencia de activadores. La fusión de TFIID o componentes de la holoenzima ARNpolIII a dominios de unión a secuencias específicas de ADN genera altos niveles de expresión génica independiente de activadores, demostrando que el reclutamiento de la maquinaria general de transcripción es un paso importante en el proceso de activación (Keaveney y cols., 1998).

El primer paso en la formación del complejo en un promotor que contiene la TATA es la unión del factor TFIID que contiene dos tipos de componentes: el reconocimiento de la caja TATA es realizado por la proteína de unión a la caja TATA (TBP) con unos 30 kDa y un grupo de subunidades llamadas TAFs (Kokubo y cols., 1995). Las distintas relaciones estequiométricas entre TBP y TAFs puede suponer un punto de especificidad en el reconocimiento de promotores concretos. Todo este conjunto tiene una masa total de unos 800 kDa (Maldonado y Reinberg., 1995) (Fig 5 y Tabla 2).

La unión de TBP al ADN es inusual, ya que se sitúa en el surco menor y provoca una curvatura en el ADN de unos 80 grados, exactamente sobre las 8 pb de la caja TATA, pero sin que se separe la doble cadena. Todo esto permite que la ARNpol y los factores de transcripción formen una asociación más estrecha de lo que sería posible en el ADN lineal.

La presencia de TBP en el surco menor, combinado con otras proteínas unidas al surco mayor, crea una alta densidad de contactos proteína-ADN en esta región.

En promotores que carecen de caja TATA ha evolucionado un mecanismo por el cual la especificidad de TBP es sustituida por interacciones directas e indirectas con factores que se unen a secuencias específicas en el promotor como los TAFII o los activadores (Pugh.2000).

En promotores con caja TATA, la mutación de la misma provoca drásticos cambios en la expresión del gen, lo que indica que la interacción entre la TATA y TBP es importante (Pugh.2000).

TBP está asociado con gran variedad de complejos, alguno de los cuales funciona de manera específica de la ARNpol (Goodrich y cols., 1994).

La iniciación requiere que los factores de transcripción basal actúen en un orden definido para construir un complejo que es unido por la ARNpol (Fig 5).

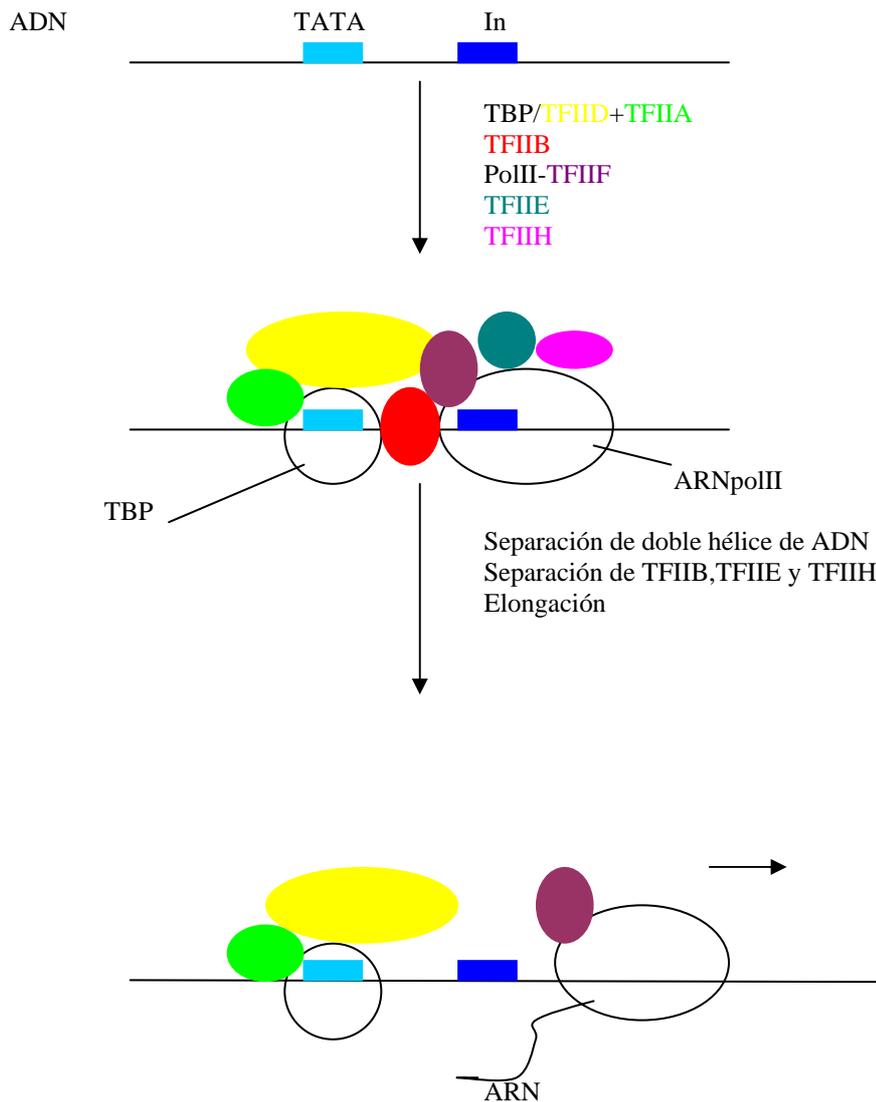


Fig (5). Proceso de ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción.

Tras la entrada en el complejo de TBP, TFIID, TFIIA, TFIIIB, se incorpora la ARNpolIII y el factor TFIIF que presenta actividad helicasa dependiente de ATP implicada en la fusión del ADN en la iniciación, y un dominio de fuerte unión a la ARNpolIII. La reacción de iniciación está definida por la formación de la primera unión fosfodiéster que puede ocurrir en esta etapa.

Se requieren algunos factores más como TFIIIE y TFIIH que presentan actividad helicasa y ATPasa, para permitir que la ARNpolIII comience su movimiento de alejamiento del promotor, además de participar en funciones de reparación del ADN y fosforilación de la ARNpolIII. Es precisamente esta fosforilación la que podría ser responsable de la liberación de los factores TFII de la ARNpolIII antes de que ésta abandone el promotor (Fig 5 y Tabla 2).

Factor	Subunidades	Tamaño (kDa)	Funciones
TFIID-TBP	1	38	Reconocer la caja TATA Reclutar TFIIFB
TFIID-TAFs	12	15- 250	Reconocer promotores sin TATA. Funciones reguladoras.
TFIIA	3	12, 19, 39	Estabilización de interacción TBP-TFA con el ADN.
TFIIB	1	35	Reclutar TFIIF y pol.II
TFIIF	2	30,74	Indicar los promotores a ARN pol II. Reducir interacciones no específicas de ARN pol III ADN.
ARN pol II	12	10-220	Síntesis de ARN. Reclutamiento de TFIIE.
TFIIE	2	34, 57	Reclutar TFIIF y modular su actividad.
TFIIH	9	35-89	Helicasa y quinasa durante la elongación.

Tabla (2). Componentes del complejo humano de iniciación de la transcripción (en orden de reclutamiento).

Represión de los complejos TBP/TATA.

La unión no regulada de TBP al ADN puede ser minimizada por represores que se unen a TBP y bloquean su asociación con el ADN y/o represores que se unen al complejo TBP/ADN e inducen la disociación o evitan el progreso desde TBP a un complejo transcripcional productivo.

La mayoría de los represores de TBP identificados parecen actuar sobre el complejo TBP/ADN.

Un mecanismo que podría prevenir el acceso de TBP al ADN del promotor, in vivo e in vitro, es la dimerización. En ausencia de ADN, TBP cristaliza como un dímero, a través de la interacción de su dominio C-terminal, bloqueando físicamente el dominio de unión al ADN (Nikilov y cols.1992). La dimerización de TBP ayuda a prevenir la expresión de algunos genes no inducidos, posteriormente, cuando la expresión de ese gen determinado es necesaria, los activadores transcripcionales pueden de manera directa o indirecta activar la disociación del dímero de TBP. En consonancia con esta hipótesis, los dímeros de TBP y TFIID son disociados de manera específica por TFIIA (Coleman y cols.,1999).

Una vez unidas al ADN los primeros factores del complejo de transcripción, factores negativos como NC2 y NOT podrían antagonizar el ensamblaje de la maquinaria basal permitiendo la adición de otros factores negativos como Mot1 y TAFII250 que inducen la disociación de TBP. Por otro lado la acción coordinada de activadores transcripcionales y la propia holoenzima ARNpol podrían competir con estos factores negativos para construir un complejo de transcripción eficiente.

De esta manera, la expresión basal de los genes está controlada por el estado fisiológico

de la célula, la translocación de los factores de transcripción, modificaciones postraduccionales, remodelación de la cromatina, ensamblaje de TBP, reclutamiento de la ARNpol, etc, y todos estos factores varían de un gen a otro y de una célula a otra (Pugh, 2000).

Todos aquellos factores de transcripción que no forman parte de la maquinaria basal, actúan modulando la eficiencia de esta en respuesta a las diferentes situaciones fisiológicas a las que la célula debe dar respuesta, son los llamados factores reguladores e inducibles de la transcripción y que en función del efecto positivo o negativo que ejercen sobre la transcripción, pueden clasificarse en dos grandes grupos: activadores y represores.

3.1.3.b. FACTORES REGULADORES E INDUCIBLES ACTIVADORES.

Son muy diferentes las situaciones celulares que requieren una respuesta de incremento de la expresión génica y dentro de la flexibilidad de los estímulos y las vías de señalización, tenemos que considerar el amplio abanico de factores de transcripción activadores que se conocen (Fig 6).

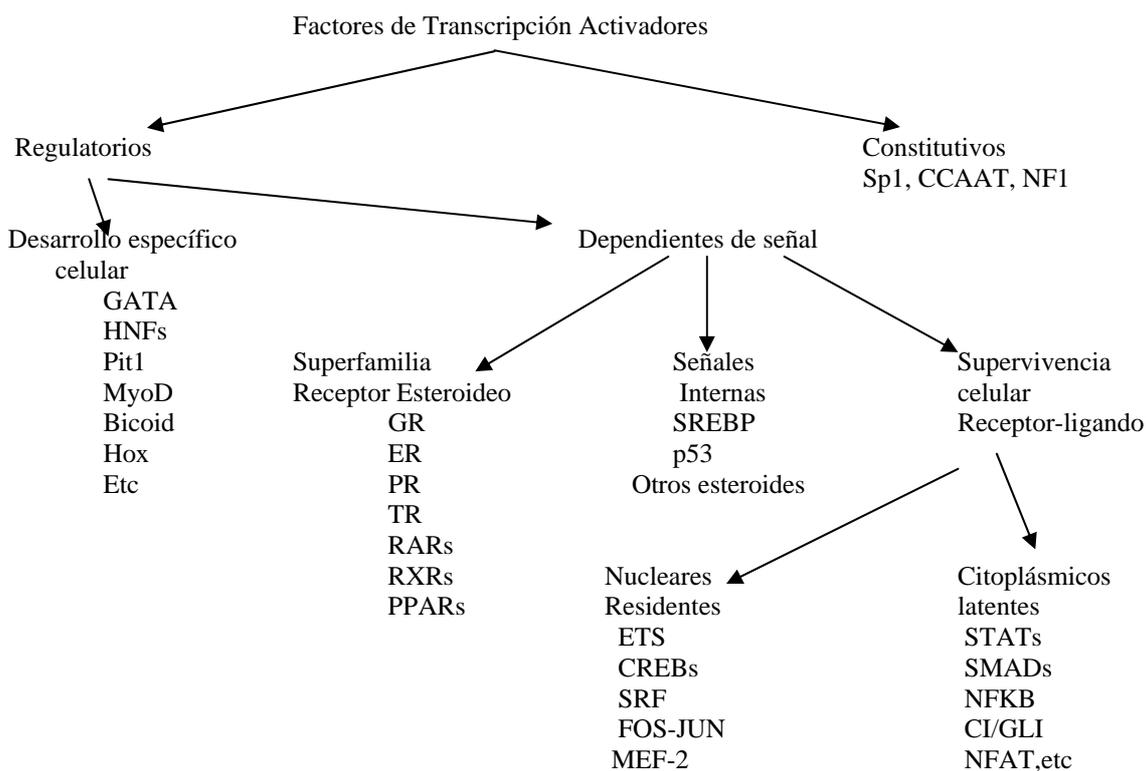


Fig (6). Clasificación de los factores de transcripción activadores.

Algunos de los factores de transcripción inducible más conocidos y sus posibles secuencias de unión en los promotores se resumen en la tabla (3).

Factor de Transcripción.	Secuencia Reguladora.
c-fos	SIE
	SRE
	TCF
	AP-1
	AP-1 (CRE)
	DR
FosB	CRE
	AP-1
	Sp1
	CRE
	SRE
	KRE
c-jun	NF-1
	AP-1 (jun2/jun1)
	FP
	NF-jun
	Sp1
	CCAAT
JunB	RSRF/MEF2
	AP-2
	SRE
	AP-1
	EBS
	KRE
JunD	CCAAT
	IR
	CRE
	CRE
	Sp1
	Oct
JunD	CCAAT
	KRE
	AP-1
	AP-1

Tabla (3). Resumen de algunos factores de transcripción activadores y los diferentes sitios de unión dentro de los promotores diana.

Factores de transcripción dependientes de señal. Estas proteínas o sus precursores polipeptídicos podrían estar restringidos durante el desarrollo o bien estar presentes en todas las células pero ser inactivos hasta que dichas células contengan proteínas que son expuestas a señales intracelulares o extracelulares apropiadas.

+ *Superfamilia de receptores esteroideos.*- Los esteroides disueltos en la bicapa lipídica de la membrana plasmática y en el interior de las células unen y activan a un receptor específico que participa en la activación específica de la transcripción de un gen determinado (Mangelsdorf y cols.,1995). Algunos miembros de esta extensa familia están restringidos a determinados tipos

celulares, y muchos de ellos son fosforilados en serinas aunque en la mayoría de los casos no se conoce la función de esta modificación. Todos excepto el receptor de glucocorticoides (GR) se encuentran desde un primer momento en el núcleo, antes de la aparición de su hormona correspondiente. GR es retenido en el citoplasma formando parte de un complejo hasta la unión del glucocorticoide y la posterior liberación del dímero GR que posteriormente entra en el núcleo (Mackem y cols. 2001).

+ *Factores de Transcripción activados por señales intracelulares.*- Pequeñas moléculas intracelulares participan en la señalización regulando factores de transcripción preexistentes. Las concentraciones de esterol interno regulan la proteólisis de precursores proteicos en la membrana para liberar SREBP (Proteína de Unión -binding- al Elemento de Respuesta a eSteroles) (Brown y cols.1999).

+ *Factores de transcripción activados por supervivencia celular. Receptor-ligando.*- Hay dos rutas principales para la señalización extracelular:

A/ Hay decenas de cascadas de fosforilación en serinas que tienen como sustratos cientos de proteínas que residen en el núcleo (2000. Cell 100. 113).

Pequeñas moléculas como la epinefrina y los leucotrienos o péptidos como la TSH y la hormona adrenocorticotropa (Boume, 1997) cuando se unen a sus receptores de membrana acoplados a proteína G, provocan un incremento en segundos mensajeros intracelulares como AMPc, fosfoinosítidos, diacilglicerol y calcio, que activan cascadas de serin-quinasas y fosforilación de factores de transcripción nucleares.

B/ Una segunda ruta de señalización similar es activada por ligandos de polipéptidos que se unen a receptores de membrana que poseen actividad tirosin-quinasa intrínseca (receptores tirosin-quinasa) (Pawson y Scott., 1997). Los factores de transcripción citoplásmicos latentes son activados tras la interacción ligando-receptor en supervivencia celular y se dirigen al núcleo para controlar la transcripción.

Ambas vías terminan con una fosforilación en serina de un determinado factor de transcripción nuclear, como pueden ser los de la familia Ets, familia c-jun—c-fos—ATM, familia CREM/CREB, familia MADS que incluye al SRF, son algunos de los grupos mejor estudiados (Cavigelli y cols., 1995).

+ *Factores citoplásmicos latentes.*- La característica principal de este grupo de factores de transcripción es la presencia de una forma inactiva en el citoplasma hasta que son activados por proteínas que se unen a receptores de la superficie celular. Las condiciones de la bioquímica intracelular que activa las proteínas de este grupo varía ampliamente, lo que hace pensar que estos factores no se encuentran juntos. (Brivanlou y Darnell., 2002) (Fig 6).

En los primeros momentos de la evolución el principal circuito regulatorio involucraba la fosforilación de serinas de factores nucleares y la duplicación de las serin-quininas provocó un incremento de la complejidad sobre las funciones nucleares. La propia regulación de genes en hongos y plantas es dependiente de estas vías de serin-quininas. En animales, además se ha amplificado el número de serin-quininas cruciales para el mantenimiento del balance de la transcripción (2000.Cell 100,113). Son muchas las proteínas nucleares que dependen de la fosforilación en serinas para maximizar su actividad e incluso son incapaces de unir ADN sin dicha fosforilación. La activación inicial de la transcripción específica de célula ha incrementado su complejidad en los animales, principalmente a través de dos grupos de factores de transcripción: factores sintetizados como resultado del desarrollo y factores activados por señales extracelulares (Brivanlou y Darnell., 2002).

3.1.3.c. REPRESORES.

La expresión génica en eucariotas en respuesta a estímulos internos o externos es un fenómeno complejo que implica la coordinación entre la activación y la represión génica por la acción de activadores y represores. Definimos como represores aquellos factores de transcripción que una vez unidos a secuencias específicas de los promotores son capaces de desencadenar el bloqueo de la actividad transcripcional del promotor.

Además, en los últimos años se han identificado correpresores que interactúan con los represores y tienen capacidad represora intrínseca y de manera activa reprimen la transcripción pero no uniéndose al ADN sino al ser reclutados por los represores transcripcionales, contribuyendo a la capacidad represora del silenciador transcripcional o bien reprimiendo la actividad transcripcional de los activadores.

La interacción específica de correpresores y represores permite un reclutamiento adicional de complejos proteicos que también presentan actividad represora intrínseca, incrementando la capacidad represora transcripcional de estos macrocomplejos, que juegan un papel muy importante en muchos procesos como la diferenciación, la proliferación, y el ciclo celular (Tabla 4).

Correpresor	Represor	Función	
SIN3	Mad, Mxi1	Oncoproteins	
	Mxi1-SR	Oncoprotein	
	Mnt	Oncoprotein	
	PLZF	Hematopoiesis	
	ETO	Oncoprotein	
	MeCP2	Methyl-cytosine binding	
	AML-1B	Hematopoiesis	
	TEL	Oncoprotein	
	p53	Tumor suppressor	
	Ikaros, Aiolos	B and T cell differentiation	
	REST	Neural specific gene regulation	
	MNF β	Myogenesis	
	NCoR, SMRT	NHR	Development, differentiation
		ETO	Oncoprotein
LAZ3/BCL6		Germinal center formation	
PLZF		Hematopoiesis	
CBF1		Neurogenesis	
Pit1		Pituitary growth	
Rpx		Pituitary determination	
Bach2		B cell development	
pbx1a		Development	
MyoD		Myogenesis	
Alien HDAC1	NHR	Development, differentiation	
	RB	Tumor suppressor	
HDAC2/mRPD3	p107/p130	Tumor suppressor	
	Sp1	Promoter factor	
	YY1	Ubiquitous multifunctional	
	TR	Development, differentiation	
HDAC4 HDAC complex Ski	MBP-1	Myc promoter binding	
	EED	Polycomb group	
	Dnmt1	DNA methyltransferase	
SnoN Mi-2/NuRD complex	MEF2	Myogenesis, neuron survival	
	BRCA1	Tumor suppressor	
	SMAD2,3,4	TGF β signaling	
dMi-2 SUN-CoR SMRTER MITR KAP1/TIF1 β /KRIP-1	RB	Tumor suppressor	
	SMAD2,3,4	TGF β signaling	
	Ikaros, Aiolos	B and T cell differentiation	
	E7	Oncoprotein	
Groucho/TLE	MBD2	Methyl-cytosine binding	
	Hunchback	Thorax development	
	NHR	Development, differentiation	
	EcR	Metamorphosis	
	MEF2	Myogenesis, neuron survival	
	Kid-1	KRAB domain	
	KOX1/ZNF10	KRAB domain	
	KRAZ1/2	KRAB domain	
	Hairy	Cell fate determination	
	E (spl) complex	Neurogenesis	
Xgro4/5 hGrg, TLE1, TLE2 CtBP1/2	Deadpan	Neurogenesis	
	AML1/2	Hematopoiesis	
	Engrailed	Segment polarity	
	Dorsal	Dorsal-ventral patterning	
	Runt	Cell fate determination	
	Runt domain proteins	Cell fate determination	
	LEF1	Hippocampal development	
	dTcf/pan	TCR enhancer binding	
	NK3/bagpipe	Smooth muscle development	
	NK4/tinman	Mesoderm development	
	Dri	Dorso-ventral polarity	
	XTcf-3	TCR enhancer binding	
	PRDI-BF1/Blimp-1	B cell differentiation	
	ZEB/AREB6	Hematopoietic/cell fate	
Kniirps	Segmentation		
Snail	Mesoderm development		

	Krüppel	Segmentation
	Hairy	Segmentation
	E(spl) mdeltaC	Neurogenesis
	BKLF	Hematopoiesis
	Evi-1	Myeloid differentiation
	zfh-1	Mesodermal cell fate
	deltaEF1	Muscle/T cell development
	XTcf-3	T cell development
	HPC2	Polycomb complex
CdP	p130/RB	Tumor suppressor
	BRCA1	Tumor suppressor
RBP1	RB	Tumor suppressor
FOG/hFOG2	GATA-1	Hematopoiesis
Co-REST	REST	Neural specific regulation
NAB1/NAB2	Egr-1/NGF1A	Immediate early gene
	Egr-2/Krox20	Immediate early gene
Rlim/Rnfl2	LIM domain proteins	Limb development
CIR	CBF1	Notch signaling
TGIF	SMAD2	TGFβ signaling

Tabla (4). Correpresores y represores transcripcionales.

En muchos casos, la interacción aberrante entre los correpresores y los represores en el complejo supone la base molecular de muchas enfermedades descritas en humanos.

Mecanismo de represión sobre la cromatina.

Los represores transcripcionales son capaces de reclutar, a través de su dominio represor, sobre determinadas regiones de los promotores, a los correpresores, y estos a su vez, reclutan HDACs cuya función es la de eliminar la acetilación de residuos específicos en las histonas de los nucleosomas. Está aceptada, de manera general, que la acetilación de los residuos de lisina en las colas de las histonas está asociada con activación transcripcional, mientras que la deacetilación de estas lisinas provoca represión transcripcional por compactación de la estructura de la cromatina y reducción de la accesibilidad de los factores de transcripción (se detallará más adelante en otros puntos de la introducción).

Se han identificado numerosas enzimas que catalizan la acetilación de histonas (HATs) y la deacetilación (HDACs), a su vez se han caracterizado dos complejos de deacetilasas en eucarotas: el complejo SIN3 y el complejo Mi-2/NuRD (descritos en mayor profundidad en puntos posteriores de esta introducción).

Mecanismo de represión sobre la maquinaria de transcripción basal.

El uso de inhibidores de HDACs como el butirato sódico o la TSA ha permitido la identificación de proteínas que están asociadas a actividad HDACs. Además ha revelado que en algunos casos no toda la capacidad represora se elimina con estos inhibidores y que los complejos represores presentan múltiples mecanismos para silenciar la expresión génica incluyendo la inhibición directa de la maquinaria basal de transcripción bloqueando la interacción de un factor de transcripción con el aparato basal. El represor DR1 impide la unión de TFIIB al complejo TFIID. Un ejemplo de mecanismo directo es que este tipo de represores tienen un papel activo en la inhibición de la formación del aparato basal de transcripción.

RevErbβ, un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, puede unirse a complejos que contienen el correpresor NCoR y los factores de transcripción basal TAFII32, TAFII70, TFIIB, SIN3 y HDAC1. Se han identificado múltiples y distintos dominios de NCoR que son necesarios para la interacción con

diferentes miembros del aparato basal de transcripción. Además el dominio represor en el N-terminal de NCoR, que puede interactuar con TFIIB y TAFII32, puede eliminar la interacción funcional entre TAFII32 y TFIIB necesaria para la activación transcripcional. De manera similar, SMRT también presenta varios dominios represores que pueden interactuar con el correpresor SIN3 y el factor basal TFIIB. Esta interacción con TFIIB está relacionada con la capacidad represora de SMRT (Wong y cols., 1998).

Miembros de la maquinaria de transcripción basal como TFIIE y TFIIF pueden ser acetilados por HATs (Imhof y cols., 1997) y aunque la acción de HDACs sobre el estado de acetilación de estas proteínas durante la represión transcripcional no se conoce, se puede suponer que sean dianas de HDACs (Burke y cols., 2000).

Represión de activadores transcripcionales.

Los complejos represores no sólo median represión sobre factores de transcripción represores sino que comienzan a conocerse interacciones entre correpresores y activadores transcripcionales. Esta asociación puede provocar el bloqueo del dominio activador y el desplazamiento del coactivador. En estos casos no sólo se reduce la activación de factor de transcripción sino que también se activa la represión. Un ejemplo es la modulación de la actividad de E2F por el supresor de tumores Rb. En ausencia de unión a Rb, E2F actúa como un activador transcripcional, la unión de Rb hace que E2F cambie su unión a una secuencia activadora por una represora a la vez que Rb se encarga del reclutamiento de HDAC1, c-Ski y CtBP (Meloni y cols., 1999).

Mecanismo de formación y disociación del complejo represor-correpresor.

La fina regulación de los complejos represor-correpresor es esencial para distintas e importantes funciones biológicas. Los múltiples mecanismos, en muchos casos desconocidos, incluyen unión a ligandos específicos, especificidad inducida por ADN, modificaciones postraduccionales, degradación proteosómica, competición por factores celulares, localización subcelular, etc.

Los receptores nucleares para hormonas reclutan correpresores de manera dependiente de ligando (Glas y cols., 2000). En ausencia de ligando están unidos al elemento de respuesta en las regiones reguladoras de los genes diana, en asociación con correpresores (N-CoR, SMRT y Alien) y reprimen activamente la transcripción. Tras la unión del ligando, los receptores cambian de conformación permitiendo la disociación de los correpresores (Chen y cols., 1995).

La formación de los complejos represores-correpresores también puede depender de la arquitectura específica del ADN. Cuando el receptor de ácido retinoico (RAR) está unido al elemento de respuesta DR5 (una repetición directa de 5 pares de bases) el correpresor se disocia con la unión del ligando al complejo, pero cuando el complejo se forma sobre el elemento de respuesta DR1, el correpresor se mantiene unido al complejo incluso tras la unión del ligando, con lo que el efecto represor no desaparece y el gen está silenciado o reprimido aún en presencia del ligando (Kurokawa y cols., 1995).

Sobre TREs negativos, llamados así por su capacidad de reprimir genes en presencia de hormona tiroidea, el receptor de hormona tiroidea recluta HDAC2 en presencia de ligando (Sasaki y cols., 1999). Opuesto a esto, sobre los elementos clásicos, la unión del ligando permite la disociación del complejo correpressor (Chen y cols., 1995).

La fosforilación de represores puede provocar cambios en el reclutamiento de correpresores. En fase temprana G1, el represor Rb hipofosforilado reprime la activación del gen E2F por reclutamiento de actividad HDAC (Kouzarides y cols., 1999). La activación de la quinasa dependiente de ciclina cdk4/6 en fase G1 tardía provoca una hiperfosforilación de Rb y una disociación de la actividad HDAC, eliminando así el efecto represor (Harbour y cols., 1999).

La proteólisis del complejo represor-correpresor es otro mecanismo que regula la duración de la represión sobre un promotor concreto. El extremo N-terminal de NCoR puede ser activado por mSiah2 (la expresión de mSiah2 es específica de célula) para degradación (Zhang y cols., 1998). Este mecanismo opera como un antirrepresor. Los represores de la familia Ski también están controlados por proteólisis. TGF- β puede inducir una rápida degradación de Ski por vía proteosómica, a la vez que permite la activación de genes diana activados por SMAD (Sun y cols., 1999).

La localización celular de los represores también regula la unión a los correpresores. Así, la activación del receptor de TGF β induce la fosforilación de SMAD2, esto provoca una heterodimerización con SMAD4 y la localización nuclear del complejo SMAD2/4 que recluta a FAST2 sobre el ADN y TGIF e histona deacetilasas para ejecutar la represión transcripcional.

La mayor parte de las interacciones entre represores y correpresores, y también entre activadores y coactivadores, descritas desde finales de los años 90, implican la participación de dominios LCDs.

Partiendo de cómo la unión de hormonas lipofílicas, retinoides y vitaminas a miembros de la superfamilia de receptores nucleares modifica la unión de estos receptores al ADN, y las propiedades transcripcionales de estos receptores para provocar una activación o represión de determinados genes diana, a través de la interacción directa con un diverso grupo de proteínas nucleares como SRC-1/p160, TIF-2/GRIP-1 y CBP/p300, que actúan como coactivadores transcripcionales, se define una pequeña secuencia o motivo LxxLL, presente en SRC-1 y CBP/p300 necesario y suficiente para mediar la unión de estas proteínas a los receptores nucleares unidos a ligando (Fig 7). Así esta pequeña secuencia facilita la interacción de diferentes proteínas con receptores nucleares (Heery y cols., 1997).

Los LCDs son dominios cargados ricos en leucinas descritos por primera vez en coactivadores nucleares (NcoA-1, p/CIP) y correpresores (N-CoR, SMRT), implicados en interacciones proteína-proteína entre receptores nucleares de hormonas y CBP (LeDouarin y cols., 1996; Heery y cols., 1997; Hu y Lazar, 1999). Los LCDs en el N- y C-terminal de CBP median la interacción con receptores nucleares y p/CIP respectivamente (Torchia y cols., 1997).

Se han definido dos clases de LCDs:

- La caja NR cuya secuencia es LxxLL
- La caja CoNRN cuya secuencia es L/IxxV/II.

Donde L es leucina, V es valina, I es isoleucina (LeDouarin y cols., 1996; Hu y Lazar, 1999).

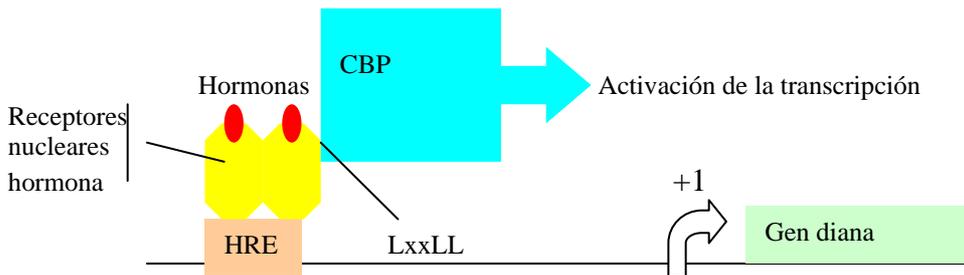


Fig (7). El LCD presente en CBP es necesario para mediar la interacción con los receptores nucleares para hormonas.

Una vez consolidado el modelo de actuación de los LCDs, se define por primera vez su capacidad reguladora en la transcripción al comprobarse que distintas isoformas del coactivador SRC1 presentan distinta capacidad para estabilizar la interacción con los receptores nucleares, a través de un cuarto LCD en su extremo C-terminal que sólo aparece en determinadas isoformas del coactivador (Kalkhoven y cols., 1998).

Se comprobó finalmente que las secuencias LxxLL presentes en CBP, SRC1 y RIP140 definían la afinidad y selectividad por los receptores de retinoico y hormonas esteroides, y se estableció a la vez un “core” mínimo de 8 aminoácidos entre las posiciones relativas de -2 a +6 (tomando como +1 la primera leucina), en el que la posición -1 está ocupada por un residuo hidrofóbico y un residuo no-hidrofóbico en la posición +2, de manera que la variación de los residuos dentro del core del LCD influyen en la afinidad y selectividad de los coactivadores por los receptores nucleares (Heery, 2001).

aa	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	aa	Prot. Y LCD	afinidad
498	T	L	L	Q	L	L	L	G	H	K	N	508	RIP140 L6	ALTA
817	G	L	L	S	R	L	L	R	Q	N	Q	827	RIP140 L8	ALTA
934	N	V	L	K	Q	L	L	L	S	E	N	944	RIP140 L9	ALTA
131	T	L	L	A	S	L	L	Q	S	E	S	142	RIP140 L2	ALTA
711	T	V	L	Q	L	L	L	G	N	P	K	721	RIP140 L7	BAJA
19	T	Y	L	E	G	L	L	M	H	Q	A	29	RIP140 L1	BAJA
265	S	Q	L	A	L	L	L	S	S	E	A	276	RIP140 L4	BAJA

Tabla (5). Secuencia del motivo LxxLL derivado de RIP140 y su afinidad relativa por el receptor nuclear.

3.1.3.d. DOMINIOS FUNCIONALES EN FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

Podemos definir como dominio funcional de una proteína aquella región de aminoácidos que por si sola comprende una determinada estructura tridimensional característica y una funcionalidad determinada. De manera que se asocia la estructura con la función.

Dominios de unión al ADN.

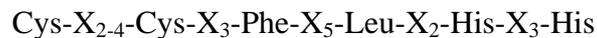
Las comparaciones entre las secuencias de muchos factores de transcripción sugieren que se pueden encontrar tipos comunes de motivos o dominios responsables de la unión al ADN. Los motivos suelen ser bastante cortos y comprenden solamente una pequeña parte de la estructura proteica.

Algunos de los dominios de unión al ADN más estudiados son:

A/ Dedos de Zinc.- Fue reconocido por primera vez en el factor TFIIA, que es requerido por la ARNpolIII para transcribir los genes del 5S ARNr. Desde entonces ha sido identificado en otros factores de transcripción.

Los dedos de zinc toman su nombre de una estructura en la cual un pequeño grupo de aminoácidos conservados se unen a un ion cinc. Dos tipos de proteínas tienen estructuras de este tipo: las proteínas clásicas “dedos de zinc” y los receptores esteroideos.

La secuencia de un dedo de zinc es:



El motivo toma su nombre del bucle de aminoácidos que sobresale desde el sitio de unión al zinc. El cinc aparece en una estructura tetraédrica formada por residuos conservados de Cys e His. La estructura en sí comprende unos 23 aminoácidos y la unión entre ellas suele tener entre 7 y 8 aminoácidos. Suelen estar organizados como series simples de secuencias repetidas. El número de dedos oscila entre 9 repeticiones, que ocupan casi toda la proteína (como en TFIIA), o sólo un pequeño dominio con dos dedos (como en el regulador ADR1 de *Drosophila*). El factor general de transcripción Sp1 tiene un dominio de unión al ADN que consta de 3 dedos de zinc.

La porción C-terminal de cada dedo forma α -hélices que se unen al ADN; la porción N-terminal forma una estructura laminar- β . Las secuencias α -hélices se colocan sobre una vuelta del surco mayor. Se cree que los aminoácidos no conservados en la porción C-terminal de cada dedo son responsables del reconocimiento de los puntos diana específicos (Fig 8).

Los receptores esteroideos y otros tipos de proteínas tienen otro tipo de dedo de zinc, basada en una secuencia de unión al zinc definida por:

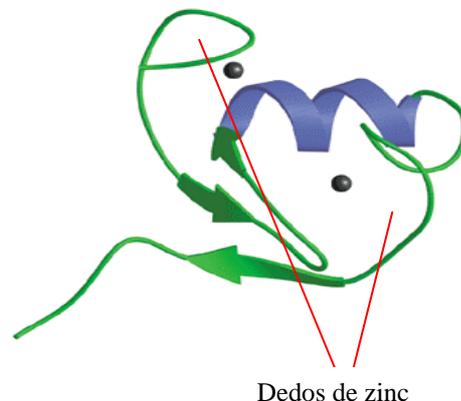


Fig (8). Dedos de zinc en el dominio RING en C-cbl. Átomos de cinc en gris.

Cys-X_x-Cys-X₁₃-Cys-X₂-Cys

Conocidos como dedos Cys₂ / Cys₂. Normalmente tienen dos dedos no repetitivos. Los sitios de unión al ADN son cortos y palindrómicos. Los contactos con el ADN también son distintos, los lados aromáticos de las α -hélices forman un centro hidrofóbico con una lámina- β que conecta las dos hélices. Un lado de la hélice N-terminal hace contacto con el surco mayor del ADN. Dos receptores de glucocorticoides se dimerizan sobre el ADN y cada uno se une a una vuelta sucesiva del surco mayor. Esto encaja con la naturaleza palindrómica del elemento de respuesta.

B/ Homeobox o homeodominios.- Codifica para un dominio de unos 60 aminoácidos. Su nombre deriva de su identificación en los loci homeóticos de *Drosophila* (cuyos genes determinan la identidad de las estructuras corporales). El homeodominio aparece normalmente cerca del extremo C-terminal y su secuencia es variable. Un ejemplo son las proteínas Oct (de unión al elemento octámero). La especificidad del reconocimiento del ADN se sitúa dentro del homeodominio. El homeodominio puede organizarse en tres regiones helicoidales, la tercera hélice se une al surco mayor del ADN y realiza la mayor parte de los contactos entre la proteína y el ADN. Muchos de los contactos que orientan la hélice en el surco mayor son realizados con el esqueleto fosfato, por lo que no son específicos de la secuencia de ADN, se sitúan, en su mayor parte, en una cara de la doble hélice y flanquean a las bases con las cuales se realizan los contactos específicos. Los restantes contactos se realizan por el extremo N-terminal del homeodominio, la secuencia que precede inmediatamente a la primera hélice se proyecta al interior del surco menor. Por ello, las regiones C-terminal y N-terminal del homeodominio son responsables, ante todo del contacto con el ADN (Fig 9).

Todos los homeodominios se unen al ADN de la misma manera, lo que significa que un número relativamente pequeño de residuos en la hélice 3 y en el extremo N-terminal son los responsables de la especificidad de los contactos con el ADN.

Las proteínas homeodominio pueden ser activadoras o represoras de las transcripción, la naturaleza del factor depende de otros dominios de la proteína, el homeodominio sólo es responsable de la unión al ADN.

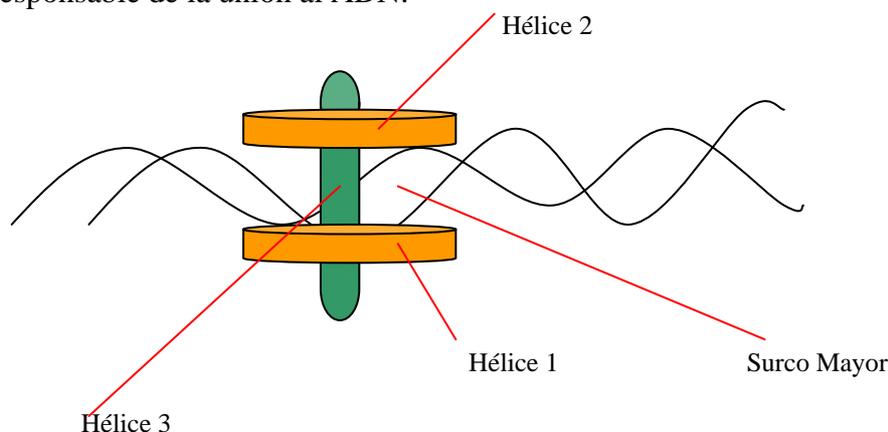


Fig (9). Esquema de la situación del homeodominio en la interacción con el ADN.

C/ Proteínas Hélice-Bucle-Hélice.- Dos hallazgos comunes en las proteínas de unión al ADN son la presencia de regiones helicoidales de unión al ADN y la capacidad de las proteínas de dimerizarse. Ambos hallazgos están representados en un grupo de proteínas hélice-bucle-hélice (HLH) que comparten un tipo común de motivo: una secuencia de 40-50 aminoácidos que contienen dos α -hélices anfipáticas en las que reside la capacidad de formar dímeros, separadas por una región ligante (el bucle) de longitud variable. Las proteínas de este grupo forman tanto homodímeros como heterodímeros por medio de interacciones entre los residuos hidrofóbicos de las caras correspondientes de las dos hélices. Las regiones helicoidales tienen una longitud de 15-16 aminoácidos y cada una contiene varios residuos conservados (Fig 10).

MyoD Ala **Asp Arg Arg** Lys Ala Ala Thr Met **Arg Gln Arg Arg Arg** Región básica. Los 6 residuos conservados en negrita

MyoD Leu Ser Lys **Val Asn** Gln Ala **Phe** Gln Thr **Leu Lys** Arg Cys Thr Hélice 1
 Id Leu Tyr Asp Met **Asn** Gly Cys **Tyr** Ser Arg **Leu Lys** Gln Leu Val

MyoD **Lys Val Gln Ile Leu** Arg Asn **Ala Ile** Arg **Tyr Ile** Gln Gly **Leu Glu** Hélice 2
 Id **Lys Val Gln Ile Leu** Gln His Val **Ile** Asp **Tyr Ile** Arg Asp **Leu Glu**

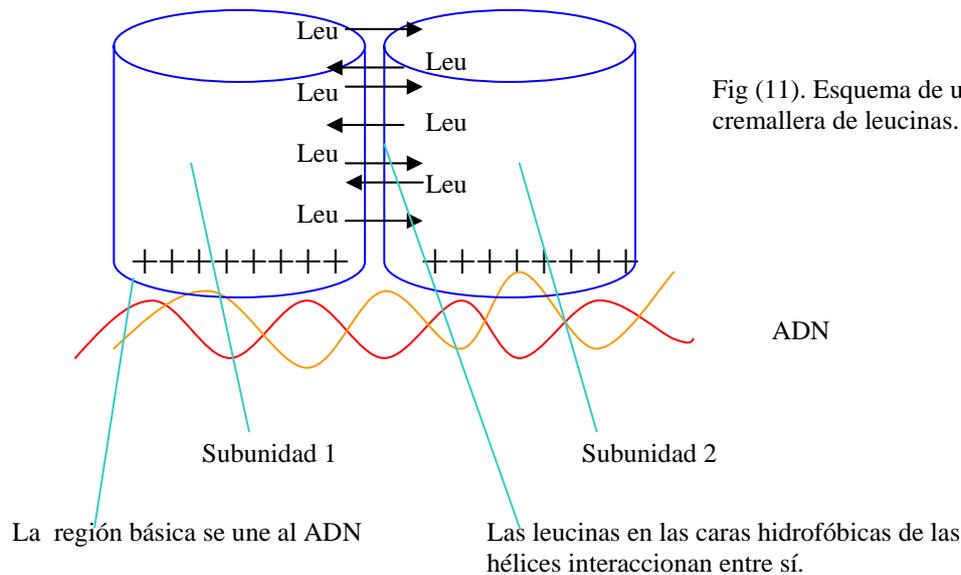
Fig (10). Residuos conservados en los dominios Hélice-Bucle-Hélice.

La mayoría de las proteínas HLH contienen una región adyacente al motivo HLH que es altamente básica, y que es necesaria para la unión al ADN. Los miembros del grupo con tal región se llaman proteínas bHLH. Las proteínas bHLH pertenecen a dos grupos generales; la clase A consiste en proteínas que se expresan de forma ubicua, incluyendo a E12/E47 de los mamíferos y la clase B consiste en proteínas que se expresan de una forma específica en tejido, incluyendo las de los mamíferos MyoD, miogenina y Muf-5 (un grupo de factores de transcripción implicados en la miogénesis).

Dominio de oligomerización.

Las cremalleras de leucinas.

La cremallera de leucinas es una secuencia de aminoácidos rica en residuos de leucina que proporciona un motivo de dimerización. La formación del dímero en sí ha surgido como un principio común en la acción de las proteínas que reconocen secuencias específicas de ADN y, en el caso de la cremallera de leucina, su relación con la unión al ADN es especialmente clara, porque podemos ver como la dimerización yuxtapone las regiones de unión al ADN de cada subunidad (Fig 11).



Una α -hélice anfipática tiene una estructura en la cual los grupos hidrofílicos (incluyendo la leucina) se colocan en una de las caras, mientras que los grupos cargados lo hacen en la otra. Las leucinas de la cremallera en una proteína pueden sobresalir de la hélice e interdigitarse con las leucinas de la otra hélice en paralelo, para formar una estructura enrollada. Las dos hélices se enrollan la una alrededor de la otra, con 3.5 residuos por vuelta, por lo que el patrón se repite íntegramente cada 7 residuos. Las leucinas ocupan los séptimos residuos en la cremallera potencial. Las dos cremalleras de leucina forman una estructura en forma de “Y”, en la que las cremalleras forman el tallo y las dos regiones básicas se bifurcan simétricamente para formar los brazos de unión al ADN. Esto se conoce como motivo estructural bZIP y explica porqué las secuencias diana para estos factores de transcripción son repeticiones invertidas (Fig 11).

Existen 4 repeticiones en la proteína C/EBP (un factor que se une como dímero a la secuencia CAAT y al enhancer del core de SV40), y 5 repeticiones en los factores Jun y Fos (que forman el factor de transcripción heterodimérico AP-1).

Dominios de interacción con HATs y HDACs.

Dominio chromo.

El dominio Chromo o dominio modificador de la organización de la cromatina está definido como una región ácida de 30 a 70 aminoácidos, encontrado en muchas proteínas implicadas en el ensamblaje de proteínas sobre la cromatina (Fig 12). Fue descrito en primer lugar en *Drosophila* en proteínas capaces de modificar la estructura de la cromatina a una morfología condensada de heterocromatina, una condición citológicamente visible, donde la expresión génica está reprimida. Algunos ejemplos de proteínas que contienen este dominio son algunos represores transcripcionales como: HP1, Polycomb, Proteína humana de unión al reticuloblastoma (RBP-1). (Ball y cols., 1997).

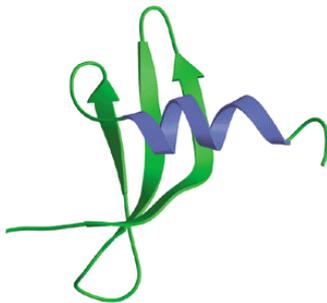


Fig (12). Dominio Chromo de la proteína modificadora 1 de ratón.

Algunas proteínas con dominio Chromo contienen uno en su extremo N-terminal y en su extremo C-terminal presentan un dominio “shadow” chromo (CSD) que presenta entre 40 y 70 aminoácidos, sólo en proteínas con dominio chromo. Su función es ensamblar estructuralmente el dominio chromo. Respecto a las interacciones proteína-proteína, crea un ambiente hidrofóbico para mediar las interacciones con el dominio chromo (Fig13).

Algunos ejemplos de proteínas que contienen ambos dominios son: Swi-6, y HP1 (Cowieson y cols., 2000).



Fig (13) . Dominio CSD en Swi-6.

Dominio Bromo.

Tiene una longitud aproximada de 110 aminoácidos y aparece en muchas proteínas asociadas a cromatina, histona acetilasas y componentes de ATPasas de determinados complejos de remodelación del nucleosoma (Fig 14).

El dominio bromo se ha identificado en más de 100 proteínas desde levaduras hasta humano.

El dominio bromo de PCAF y Gcn5p se ha demostrado que interacciona específicamente con péptidos que contienen residuos de lisina acetilados. El reconocimiento de las lisinas acetiladas lo realiza de manera similar a como las histona acetil transferasas reconocen al acetil-CoA.

Algunos ejemplos de proteínas que presentan este dominio son: PCAF, Gcn5p, Snf2, Tafil-250, CBP, etc.

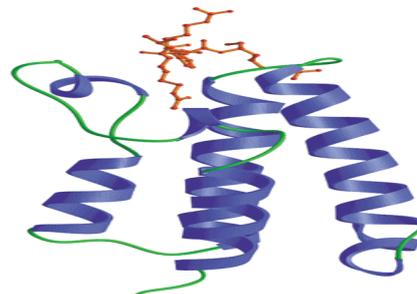


Fig (14). Dominio Bromo de Gcn5p

3.1.4.REMODELACIÓN DE LA CROMATINA. EFECTOS TRANSCRIPCIONALES.

A lo largo de los puntos tratados anteriormente se ha enfocado la transcripción en cuanto a interacciones que implican al ADN, a los factores de transcripción y a la ARN polimerasa, lo cual puede ser una descripción aproximada de los eventos que ocurren in vitro, pero falta un importante elemento de la transcripción in vivo. El genoma celular está empaquetado en estructuras que físicamente imposibilitan la iniciación de la transcripción, como en el caso de la heterocromatina donde el enrollamiento del ADN presenta estructuras muy compactas. En regiones del genoma donde la heterocromatina deja paso a la eucromatina, en la que el ADN está menos condensado, la entrada de los factores de transcripción es mucho más asequible. Este proceso está controlado por la formación y disociación de los nucleosomas como unidad básica de la organización y empaquetamiento del ADN (Introducción. Conceptos generales).

El paso entre eucromatina y heterocromatina no sólo está controlado por diversos estímulos extracelulares sino por las distintas fases del ciclo celular, y dicho control debe ejercerse antes, durante y después de la formación del complejo de iniciación de la transcripción.

Bajo esta situación, los activadores o los represores de la transcripción lo primero que deben hacer es reclutar enzimas para modificar la estructura de la cromatina favoreciendo o perjudicando, según el caso, el paso de heterocromatina a eucromatina o viceversas y la formación del complejo de iniciación de la transcripción. De esta manera se establece una competición entre las histonas y los factores de transcripción para entrar en los promotores.

3.1.4.a. Modificaciones postraduccionales en histonas.

Las enzimas remodeladoras del ADN alteran el plegamiento, la fluidez y la estructura básica de la cromatina a través de las modificaciones covalentes de residuos concretos en las colas de las histonas del nucleosoma, tales como fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, ubiquitinizaciones, ADP ribosilaciones, etc, y sus procesos inversos y en todos los casos arrastrando un gasto energético.

La *metilación* de proteínas es una modificación covalente que ocurre normalmente en los grupos carboxilo del glutamato, leucina, lisina, arginina e histidina (Clarke, 1993), si bien en el caso de las histonas, los residuos suelen ser argininas y lisinas (Zhang y Reinberg, 2001).

En la actualidad se conocen 4 familias de histona metil transferasa (HMT) denominadas PRMTI, II, III, y IV, cada una de las cuales presentan especificidad por residuos concretos de histonas determinadas.

La metilación de lisinas en H3 provoca un reconocimiento por la HP1 (Proteína de Heterocromatina 1) favoreciendo un mayor enrollamiento en lugares donde se está ejecutando un silenciamiento o represión de genes (Bannister y cols., 2001).

La **fosforilación** de histonas está más relacionada con los procesos de control estructural en meiosis y mitosis, por ejemplo la H3 se fosforila rápidamente en la serina 10 (N-terminal -cola-) cuando señales extracelulares como factores de crecimiento o ésteres de forbol estimulan a las células quiescentes a proliferar. La fosforilación global de serina 10 en H3 ocurre en cromatina pericentriolar en fase G2 tardía, extendiéndose a lo largo del cromosoma justo antes de profase de mitosis y es rápidamente eliminada durante anafase. De igual manera, bajos niveles de fosforilación de histona H3 se detectan en interfase, en relación con la preparación de la cromatina para la transcripción (Wolffe y Hayes., 1999).

La **ubiquitinización** está relacionada con activación transcripcional. La ubiquitina es un péptido de 76 aminonácidos que no afecta a la estructura del nucleosoma pero que parece intervenir evitando o previniendo la formación de estructuras de mayor nivel de enrollamiento.

La **ADP-ribosilación** del core de histonas podría indicar la localización de fibras de cromatina sin enrollar. La ADP-ribosilación juega un papel importante en la reparación del ADN.

La síntesis de una larga cadena cargada negativamente de ADP-ribosa podría facilitar una alteración parcial del nucleosoma, presumiblemente por el intercambio de las histonas por este polianión competidor (Wolffe, 1988).

Con respecto a la **acetilación y deacetilación** de las histonas, es uno de los sucesos que desde hace más tiempo se conoce su relación con la regulación transcripcional. La unión directa entre la función de la cromatina y la acetilación se estableció por el descubrimiento de complejos coactivadores necesarios para la activación de la transcripción con actividad histona acetil transferasa (Kou y cols., 1998), catalizando la transferencia de grupos acetato del acetyl-CoA a lisinas en el grupo amino en ϵ , mientras que los complejos correpresores presentan histona deacetilasas que confieren represión transcripcional catalizando la eliminación de estos grupos acetato de las lisinas (Wong y cols., 1998).

El estado de acetilación de histonas es dinámico, con una vida media de minutos en lisinas de histonas hiperacetiladas de áreas de cromatina activa a un proceso mucho más lento en histonas hipoacetiladas de regiones transcripcionalmente silentes (Zhang y cols., 1998).

El dinamismo de la acetilación de histonas provoca un atractivo mecanismo fundado por la activación y represión reversible de la transcripción.

La presencia de lisinas sin modificar en las colas N-terminales de las histonas proporciona cargas positivas que ayudan a mantener el contacto entre el ADN y el nucleosoma. Cuando estas lisinas son acetiladas, el grupo acetato convierte la carga positiva de la lisina en neutra, la atracción electrostática desaparece permitiendo la apertura de la estructura, facilitando el acceso de factores de transcripción al ADN del nucleosoma (Tse y cols., 1998).

En algunos casos, la acetilación del core de histonas causa la desestabilización de la fibra de cromatina incrementando la disociación de la H1 (Perry y Annuziati, 1989).

Todas estas transiciones estructurales pueden contribuir a facilitar la transcripción (Wolffe y Hayes, 1999).

3.1.4.b. Histona acetil transferasas (HAT) nucleares y coactivadores transcripcionales.

La evidencia más clara de la unión de las HATs a la iniciación de la transcripción viene con la purificación de HATB (designada como P55) de *Tetrahymena thermophila* y el clonaje y secuenciación del gen que la codifica. El gen tiene gran homología con GCN5 de levaduras que codifica para un regulador transcripcional. Ambas proteínas tienen actividad HAT.

La homología de la proteína Gcn5 de levaduras con otras llevó a su localización en otras especies, incluida la proteína humana (Tabla 6).

HAT	Complejo	Tamaño	Otros componentes proteicos
Levaduras			
Gcn5	HAT-A2	200 KDa	Ada 2, 3 y otras
	ADA	900 KDa	“
	SAGA	MDa	Ada 1-5, spt y prot TAFII
Esa 1	NuA4	1.3 MDa	Tra1 Tra1 + otros
Humanos			
TAFII250	TAFIID		TBP + otros TAFII
CBP/P300	Varios	Varios	Activadores específicos genes PCAF, ACTR, SRC-1 (todos con actividad HAT)
PCAF, hGcn5		20 proteínas	Ada, Spt, Tra + TAFII y otras

Tabla (6). Resumen de algunos complejos HAT en levaduras y humanos.

La unión entre HAT y transcripción fue fortalecida por el descubrimiento de que otros reguladores de la transcripción, no relacionados con Gcn5 también tenían actividad HAT, estos incluían a CBP y P300, dos proteínas muy similares involucradas, entre otras cosas, en progresión del ciclo celular y activación de genes en respuesta a moléculas de señalización celular (AMPC), funcionalmente equivalentes y a los que se suelen hacer referencia como CBP/P300 (coactivadores transcripcionales). El reclutamiento de CBP/P300 a las secuencias de ADN empaquetadas provoca un incremento de la acetilación de histonas y una apertura de nucleosomas, mejorando el acceso para componentes del complejo de iniciación de la transcripción (Fig 15). Algunas de las proteínas que unen CBP/P300 como PCAF, SRC-1 y ACTR también tienen actividad HAT.

Es conocido que diferentes activadores requieren diferentes HAT, por ejemplo, la activación de la transcripción por CREB requiere la actividad HAT de CBP, mientras que la activación mediada por el RAR requiere de PCAF y la actividad HAT de CBP no es necesaria en la vía de activación de RAR, limitado posiblemente por el correcto ensamblaje del complejo activador.

Es razonable pensar que las diferentes subunidades catalíticas HAT tienen diferente especificidad, quizás acetilando distintas histonas. Diferentes patrones de acetilación pueden ser necesarios para la optima activación de diferentes genes. Esto también hace posible que el mismo gen pueda necesitar diferentes HATs para una activación adecuada dependiendo del estado del desarrollo y la diferenciación celular.

Además, múltiples HATs, entre ellas CBP/P300, pueden reclutar proteína quinasa como pp90rsk requerida para la activación de genes que responden a Ras (supervivencia celular), lo que enfatiza el enorme potencial del ensamblaje de grandes complejos alrededor de CBP/P300 y otros coactivadores. Estos complejos podrían ser el sitio donde las cascadas de proteínas quinasas que transmiten señales del citoplasma al núcleo impactan sobre el genoma.

Recientemente se han identificado los complejos principales de histona acetil transferasas en levaduras: SAGA, ADA, NuA3 y NuA4, de los que se ha demostrado su capacidad para activar la transcripción *in vitro* dependiente de acetil-CoA. SAGA, ADA, y NuA3 preferentemente acetilan H3, mientras que NuA4 presenta preferencia por la cola N-terminal de H4.

El complejo SAGA contiene las proteínas Gcn5, Spt3, Spt7, Spt8 y Spt20/Ada5, así como Ada1, Ada2 y Ada3, también contiene un conjunto de proteínas TAF que originalmente se descubrieron como factores de la maquinaria de transcripción basal.

Se ha demostrado que los complejos SAGA y ADA interactúan con activadores tanto en levaduras como en mamífero (Xu y cols., 1999). Los complejos SAGA y NuA4 interactúan directamente con dominios de activación como VP16 del virus del herpes o el activador transcripcional Gcn4 de levaduras para estimular la transcripción y dirigir a estos activadores. Estas interacciones se suponen específicas de cada complejo puesto que en el caso de los complejos ADA y NuA3 no se producen y todavía no se han identificado los componentes activadores que pudieran interactuar con ellos en la formación del complejo.

3.1.4.c. Histona deacetilasas (HDACs).

Las HDACs fueron aisladas de un homogenizado de células humanas cultivadas utilizando una matriz con el inhibidor de HDAC específico trapoxina.

La evidencia de la implicación de las HDACs en regulación genica llegó al encontrar que el 60 % de la secuencia predicha de la HDAC1 humana era idéntica a una proteína de levaduras codificada por RPD3, un conocido regulador transcripcional.

Las HDAC1 y 2 se encuentran en asociación con proteína de reticuloblastoma (Rb), regulando el ciclo celular. Este complejo inicial se encuentra asociado con una gran variedad de proteínas, muchas de las cuales se conocen o sospechan funciones en la regulación génica. La mayoría de estas interacciones se llevan a cabo por algunas proteínas claves como Sin3a y Mi-2.

El complejo Sin3 contiene, además de HDAC1/2 y RbAp46/48, dos proteínas más pequeñas llamadas SAP30 y SAP18 (Proteínas Asociadas a Sin3). El complejo Sin3 puede unir otras dos proteínas relativamente grandes, NcoR (Correceptor del Receptor de hormona Nuclear) y SMRT (Silenciador Mediador del Receptor de hormona Tiroidea y ácido Retinoico) (Fig 15).

Alternativamente, los complejos Sin3 pueden asociarse con heterodímero de unión al ADN como mad/max o la MecP2 (Proteína de unión al ADN Metilado).

Todas estas proteínas asociadas tienen la capacidad de activar el complejo Sin3 deacetilasa en zonas particulares del genoma.

El otro complejo HDAC1/2 está basado en la proteína Mi-2 que presenta un distintivo dominio helicasa/ATPasa homólogo al que se encuentra en la subunidad helicasa del complejo SWI/SNF. Dicha actividad helicasa puede remodelar el nucleosoma, por lo que también se le denomina como complejo NuRD (histona deacetilasa remodeladora del nucleosoma).

Además de HDAC1/2, RbAp46/48 y Mi-2, en el complejo entran MBD3, una proteína con dominio de unión al ADN metilado, y MTA2, proteína homóloga a MTA1 (proteína asociada a metastasis, encontrada en tumores humanos).

Igual que para Sin3, las proteínas que se asocian al complejo Mi-2/NuRD, pueden dirigir al complejo a regiones específicas del genoma.

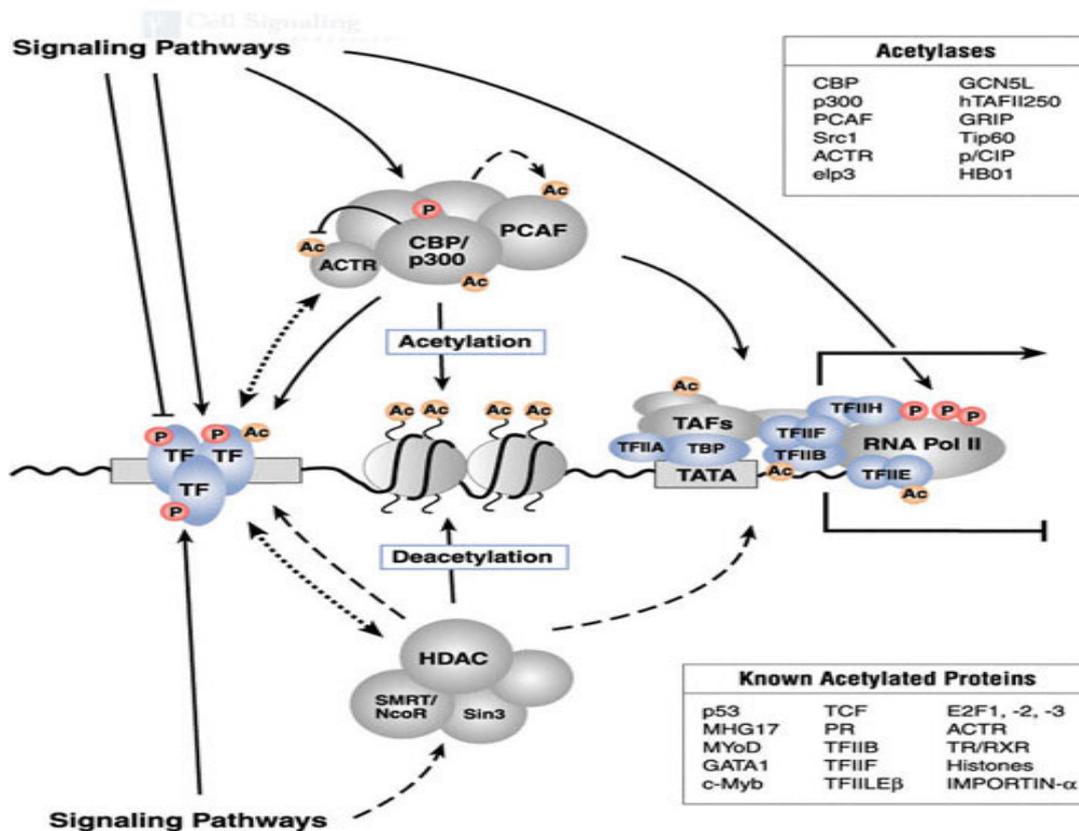
De forma general y simplificada, para estos complejos represores podemos distinguir 3 tipos de proteínas:

1/ *Catalíticas*.- HDAC1/2 son las únicas componentes con actividad HDAC, aunque otras proteínas como RbAp46 y 48 pueden tener un importante papel facilitando la actuación de las HDAC.

2/ *Indicadoras*.- Los heterodímeros mad/max o RAR/RXR dirigen los complejos a genes específicos mientras MeCP2 indica la presencia de ADN metilado.

3/ *Mediadoras*.- La utilización por las HDAC de proteínas de tamaño medio/grande como Sin3, Mi-2, NCoR, permitirían acomodar sobre ellas un gran rango de patrones de proteínas distintas.

Fig (15). Acetilación y deacetilación de histonas en la activación e inhibición de la transcripción.



Los dos complejos correpresores SIN3 y Mi-2/NuRD están involucrados en represión transcripcional mediada por metilación del ADN. La presencia de grupos CpG metilados en citosinas está asociado con regulación génica específica de tejido y desarrollo.

Factores con dominio de unión a grupos metilo son capaces de reclutar HDACs y actividad remodeladora de cromatina. MeCP2, que específicamente se une a los grupos CpG, media la represión por un dominio en el extremo C-terminal que interacciona con el correpresor SIN3A y recluta HDAC. Esta era la primera prueba de la relación entre la presencia de grupos metilo y represión transcripcional, desde entonces se han identificado más complejos represores que involucran a proteínas con dominio de unión a grupos metilo, algunos ejemplos son MBD2, MBD3 y Dnmt1 (ADN metil transferasa).

Algunos miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas tienen un papel dual, actuando como represor en ausencia del ligando y como activador de la transcripción en presencia de la hormona. La represión se debe, en parte, a la interacción del receptor de hormona con las proteínas correpresoras NCoR, SMRT y Alien que interaccionan con SIN3 y reclutan actividad HDAC (descrito en más detalle en el apartado de represores, dentro de esta introducción).

SMRT interacciona también con represores transcripcionales que contienen el dominio POZ, como el factor PLZF que está involucrado en translocación asociada a leucemia y BCL6 que está implicado en la formación del centro germinal.

La proteína Rpx que presenta un homeodominio y participa en la determinación pituitaria, requiere NCoR, SIN3 y HDAC2 para ejercer la represión.

NCoR también interacciona con el factor miogénico Myo D para reprimir los genes diana en un mecanismo dependiente de HDAC.

3.1.4.d. Familia SWI/SNF de complejos remodeladores de cromatina.

Son complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. En levaduras están formados por 11 subunidades, generando un complejo de unos 2 MDa, estas subunidades están conservadas en gran cantidad de especies desde levaduras a humanos pasando por *Drosophila*. En humanos se purificaron dos complejos diferentes SWI/SNF, homólogos con subunidades ATPasa dependiente de ADN.

Todas las ATPasas contienen un dominio bromo muy conservado en su región C-terminal (descritos en el apartado de dominios funcionales de factores de transcripción). Otro grupo de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP se han identificado en moscas, los cuales contienen ISWI (Imitación de SWI) como su subunidad ATPasa/helicasa. Otros miembros de este grupo son NURF, CHRAC y ACF.

Hay estudios bioquímicos en los que se demuestra que los complejos SWI/SNF purificados de levadura son capaces de romper la estructura del nucleosoma de manera dependiente de ATP (Imbalzano y cols., 1994).

El complejo SWI/SNF tiene la capacidad de unirse al ADN y al nucleosoma y con estas características se han propuesto dos modelos para el reclutamiento de SWI/SNF. El primero propone que el complejo es reclutado al promotor por asociación directa con la ARNpolIII, basándose en el hecho de que entre los componentes de SWI/SNF de levaduras y humanos aparece la ARNpolIII.

El segundo modelo, denominado “modelo activador”, propone que el complejo SWI/SNF es reclutado a genes diana a través de la interacción directa con activadores específicos de secuencia, mediante los dominios activadores, incluyendo Gal4-VP16, Gcn4, Hap4, y Swi5 (Yudkovsky y cols., 1999).

Experimentos de coimmunoprecipitación de cromatina en levaduras indican que la unión de SWI/SNF con el promotor se debe a la interacción con el activador transcripcional Swi5 (Cosma y cols., 1999).

Un complejo SWI/SNF en humanos, llamado E-RC1, presenta una gran importancia funcional en la regulación de la transcripción del gen de la betaglobina por EKLF (Factor eritroide similar a Kruppel) y se encontró que interaccionaba directamente con los dedos de cinc del dominio de unión a ADN de EKLF (Kadam y cols., 2000). C/EBP β también interacciona con el complejo humano SWI/SNF, permitiendo la activación de genes específicos de tejido mieloide (Kowenz-Leutz y cols., 1999). Hay muchos y diferentes estudios que demuestran la interacción de SWI/SNF con c-Myc, Myo D, EBNA, receptores nucleares de hormonas, etc.

A la vista de todos estos resultados se buscó que subunidades de los complejos SWI/SNF interaccionaban directamente con los activadores de la transcripción. Los estudios iniciales sugerían que la interacción estaba facilitada por muy distintas subunidades lo que podría explicar la especificidad sobre el promotor de la actividad remodeladora de la cromatina (Kowenz-Leutz y cols., 1999).

De esta manera, podemos diferenciar dos grandes clases de complejos que desestabilizan el nucleosoma permitiendo una activación de la transcripción: HATs y SWI/SNF.

Esto hace suponer que debe existir un mecanismo por el cual estos dos tipos de complejos y procesos de desensamblaje del nucleosoma estén coordinados y trabajen juntos en la regulación de la transcripción.

Los complejos HATs SAGA y SWI/SNF pueden ser reclutados al mismo promotor por activadores transcripcionales, de manera que estos complejos pueden actuar juntos o de manera consecutiva ya que existen evidencias de una conexión funcional solapada (Perez-Martin y cols., 1998).

En experimentos para determinar el orden del reclutamiento de los complejos modificadores de la cromatina in vivo se pudo observar que SWI/SNF era necesario para el reclutamiento del complejo HAT SAGA y que ambos complejos son importantes en el mantenimiento del estado activo de la cromatina. Así se plantea un modelo en el que SWI/SNF es reclutado al promotor por activadores transcripcionales y esto permite la unión del complejo SAGA HAT, la acetilación de las colas del N-terminal del core de histonas del nucleosoma por SAGA facilita la unión de otros activadores provocando una potenciación de la transcripción de ese promotor concreto. Además, la acetilación del nucleosoma por SAGA estabiliza la unión de SWI/SNF al promotor lo que podría deberse a una doble interacción de los dominios bromo de las subunidades Swi2/Snf2 con las histonas acetiladas (Hassan y cols., 2001).

3.1.4.e. Sumoilación.

Como último tipo de modificaciones postraduccionales, no sobre histonas sino sobre factores de transcripción y de manera muy importante sobre las HDACs, no encontramos con la **sumoilación**. La sumoilación se lleva a cabo por proteínas como SUMO-1(modificador similar a ubiquitina), y es una modificación reversible que se ejecuta sobre lisinas dentro del motivo ZKXE (donde Z representa un aminoácido hidrofóbico y X cualquier aminoácido) dentro de las proteínas diana.

La conjugación de SUMO-1 a sustratos celulares implica a una enzima conocida como SAE1/SAE2, similares a E1. SUMO-1 es transferido desde E1 a una cisteína específica de la enzima Ubc9 que cataliza la formación de un isopéptido unido entre SUMO-1 y un grupo amino en epsilon de una lisina en la proteína diana. La especificidad por una diana determinada viene marcada por Ubc9 (Fu y cols., 2002).

Hasta la fecha existen dos hipótesis para explicar el papel biológico de la sumoilación:

-La sumoilación antagoniza la ubiquitilación por competición por el residuo de lisina aceptor que es común en ambas modificaciones (Desterro y cols.,1998).

-SUMO está regulando las propiedades de interacción de las proteínas diana ya que las estabiliza (Seeler y cols.,2001).

La sumoilación como la acetilación directa sobre factores de transcripción puede modular la transcripción, en el caso del receptor de andrógenos provoca una transactivación (Poukka y cols., 2000).

La sumoilación puede ser un importante mecanismo regulador en el control de la represión transcripcional mediada por HDACs de las clases I y II. La sumoilación de HDAC4 potencia la capacidad de represión transcripcional a los mismo niveles que la actividad histona deacetilasa y dicho efecto está controlado por la vía de CaMK (Kirsh y cols., 2002).

El descubrimiento de que proteínas no histonas son dianas directas de acetilación, sumoilación, etc, plantea un nuevo mecanismo en el funcionamiento de los factores de transcripción (Stranbrough y cols., 2001).

pRB	Proteína supresora de tumor de reticuloblastoma que forma complejos con activadores E2F.
p130 p107	Proteínas relacionadas con pRb que forman complejos con los E2F represores.
Pho4	Proteína HLH. Activación de genes.
Swi5	Proteína dedos de Zinc. Activa muchos genes al final de mitosis.
SBF	Complejo Swi4/Swi6. Activa genes en el límite entre G1 y S.
Gal4	Dominio de activación y unión al ADN. Puede activar muchos genes en levaduras y eucariotas superiores.
Ume6	Proteína de unión a ADN, puede reclutar el complejo Sin3-Rpd3 y activar la deacetilación de histonas.
VP16	Activador transcripcional del virus del herpes simple, activa la iniciación de la transcripción de genes en muchos eucariotas superiores.

Coactivadores

Complejo mediador	Estimula la transcripción basal y la transducción de señales entre activadores y factores de transcripción generales.
AIB1	Potencia la actividad transcripcional de receptores nucleares de hormonas. Su actividad está amplificada en cáncer de pecho humano.
PBP	Componente de un complejo proteico con TRAP, DRIP y ARC. Participa en la activación de la transcripción por receptores nucleares.
SWI/SNF	Complejo de remodelación ATP-dependiente. Altera la estructura de la cromatina e incrementa la accesibilidad al ADN nucleosomal.
Swi2	ATP-asa que confiere la motilidad al complejo SWI/SNF.
Brm1	Homólogo a Swi2. Subunidad ATP-asa del complejo SWI/SNF humano.
SAGA	Complejo histona acetil transferasa.
Gcn5	Subunidad catalítica histona acetil transferasa del complejo SAGA.
CBP/P300	Histona acetil transferasa que funciona como un regulador global de la activación transcripcional.
PCAF	Histona acetil transferasa con funciones en la regulación transcripcional, progresión del ciclo celular y diferenciación.

PRMT1	Arginina metil transferasa que potencia la activación transcripcional por receptores nucleares de hormona.
Snf1	Quinasa implicada en activación transcripcional y respuesta metabólica al estrés.
mSin3B/HDCA1	Complejo represor compuesto por histona deacetilasa 1 y proteína represora transcripcional mSin3B.

3.2. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR AMPc.

Los segundos mensajeros constituyen un grupo de moléculas cuya función es transmitir al interior de la célula los cambios que ocurren en el ambiente externo a la membrana plasmática.

Son los iniciadores que conectan la recepción de la señal con una cascada amplificadora cuyo efecto puede ser muy diferente en función del balance de activación e inhibición de las vías de señalización presentes en cada tipo celular.

3.2.1. CONCEPTOS GENERALES..

El AMPc fue la primera molécula identificada como segundo mensajero. Los niveles de AMPc intracelular están regulados por el balance entre la actividad de dos tipos de enzimas: adenil ciclasas (AC) y las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). Existen 9 tipos diferentes de AC en mamíferos, su activación se debe a la interacción con la subunidad α de la proteína Gs. La degradación del AMPc está regulada por al menos 12 miembros diferentes de PDEs. La actividad de ACs y PDEs está regulada positiva o negativamente por otros sistemas de señalización como el calcio a través de calmodulina (CaM), CamKII, IV y calcineurina, subunidades de otras proteínas G, inositol (a través de PKC) y receptores con actividad tirosina quinasa (a través de ERK y PKB) (Fig 16).

Se han identificado tres dianas principales del AMPc: PKA, proteína EPAC (intercambio de GTP) y canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos.

PKA está formado por un complejo con dos subunidades reguladoras y dos catalíticas. La unión de AMPc a las subunidades reguladoras induce la disociación de las subunidades catalíticas que se liberan del complejo (Fig 16).

Un importante punto en el funcionamiento de PKA, es el papel de la proteína de anclaje de PKA (AKAP) que de manera específica dirige a PKA a determinados sustratos efectores según la especificidad de la señal de AMPc (Fig 16).

PKA modula la respuesta de AMPc por fosforilación de otros componentes de la vía como los receptores, ACs y PDEs (Fig 16).

PKA interfiere a diferentes niveles con otras vías de señalización, algunos ejemplos son la inhibición de PLC beta2, fosforilación de proteínas tirosina fosfatasas activando MAPKs, la inhibición de la actividad de Rho y Raf y la modulación de la permeabilidad de canales iónicos.

Desde un punto de vista de regulación génica, la PKA tiene un papel fundamental ya que fosforila directamente a numerosos factores de transcripción. CREB, CREM y ATF1 fueron identificados originalmente como activadores en respuesta a AMPc y son fosforilados en sus dominios de activación. La fosforilación es un suceso crucial en la transcripción por CREB, CREM y ATF1 porque permite la interacción con CBP/P300 (Fig 16).

De manera similar a lo que ocurre con CREB, la fosforilación de NF-kB por PKA es necesaria para la activación transcripcional, ya que se requiere para la interacción con CBP.

PKA regula la actividad de Cubitus Interruptus, en este caso la fosforilación provoca un corte específico de la proteína que se transforma de activador a represor.

La actividad de PKA, al igual que en muchas otras serina/treonina quinasas está equilibrada por fosfatasas específicas de las familias PP1 y 2.

El AMPc puede activar vías de señalización intracelular a través de la unión y modulación de la función de una familia de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos. Estos canales catiónicos relativamente inespecíficos que permiten la entrada de calcio y estimulan CaM y CaMK que a su vez controlan la producción de AMPc actuando sobre AC y PDE. Estos canales también son permeables a iones potasio y sodio lo que puede alterar el potencial de membrana en células eléctricamente activas (Fig 16).

Por último, el AMPc puede modular directamente a MAPK por unión al activador EPAC, una pequeña GTPasa Rap1 específica para el intercambio de GTP (Fig 16).

3.2.2. FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN AL ELEMENTO CRE.

En células de mamífero, el AMPc propaga innumerables señales iniciadas por hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores.

Los receptores en la superficie celular acoplados a proteínas G regulan la adenilato ciclasa y los niveles de AMPc. El AMPc actúa a través de la quinasa dependiente de AMPc (PKA) que fosforila distintas proteínas, algunas de ellas en el núcleo afectando la transcripción génica (Fig 17).

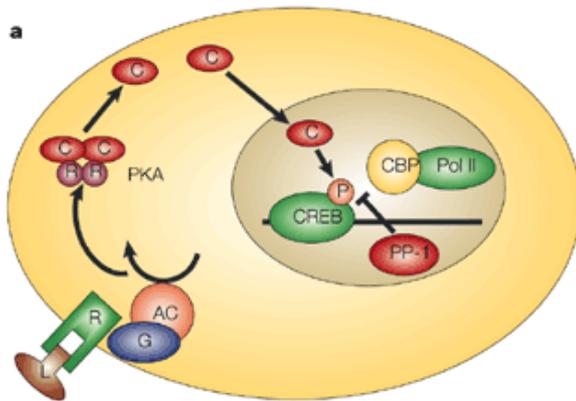


Fig (17). Esquema general de la vía de señalización del AMPc en la transducción de señales.

Así se define una familia de factores de transcripción capaces de unirse a elementos CRE en el ADN y que son dianas de la fosforilación por PKA en la vía de señalización del AMPc, formada por proteínas resultado de la expresión de 3 genes: CREB, CREM y ATF1 (Lee K.A.W. y Masson N. 1993, "Transcriptional regulation by CREB and its relatives". BBA 1174. 221-233).

CREB y ATF1 son proteínas de expresión ubicua mientras que CREM tiene altos niveles de expresión en tejido neuroendocrino (Mayr y Montminy., 2001).

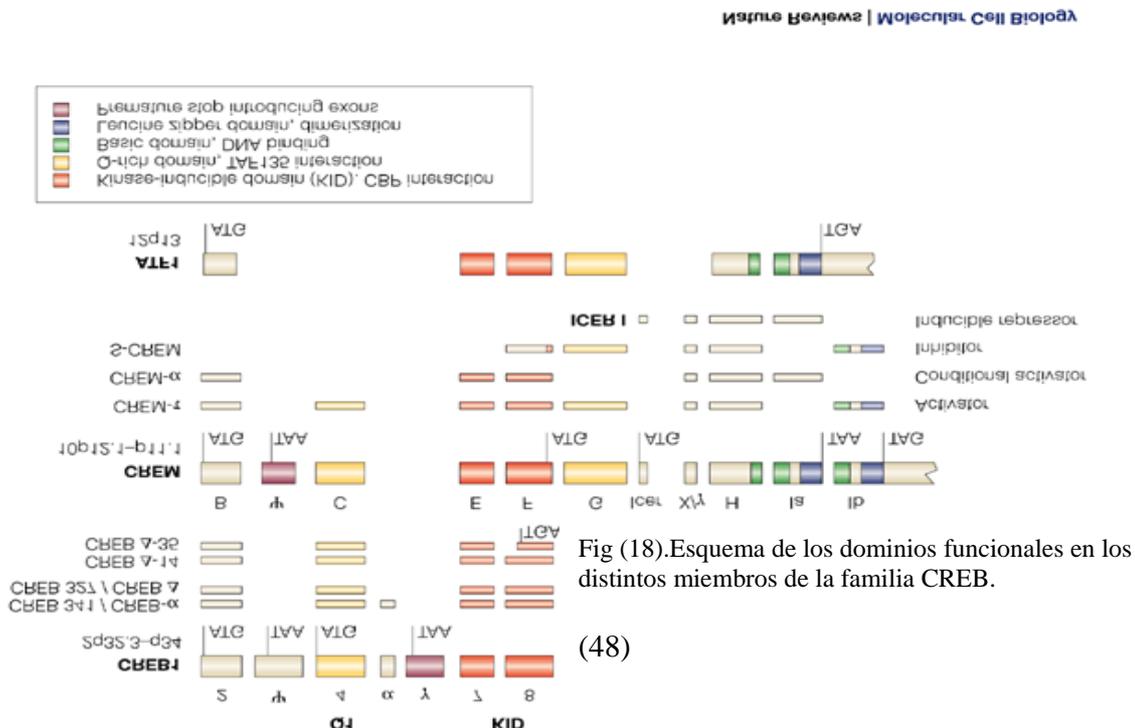
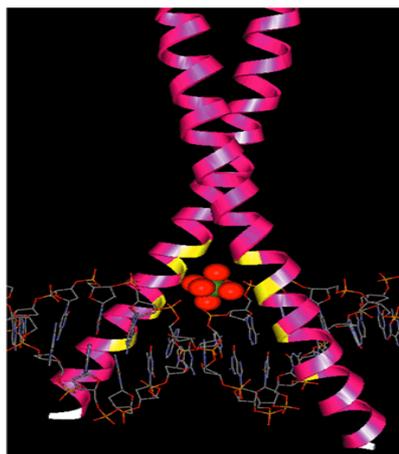


Fig (18). Esquema de los dominios funcionales en los distintos miembros de la familia CREB.

La primera estructura de la familia CREB reveló un dominio inducible por quinasas (KID) localizado en el aminoácido 60, con un sitio de fosforilación por PKA (RRPSY).

El KID está flanqueado por los dominios Q1 y Q2 (hidrofóbicos ricos en glutamina) que actúan como activadores constitutivo *in vitro* (Fig 18).

En el C-terminal aparece una región básica con una cremallera de leucina (bZIP) que actúa como dominio de dimerización y unión al ADN (Fig 19).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Fig (19). Dominio bZIP de CREB unido al ADN. Estabilizando la unión se encuentran átomos de magnesio (en rojo).

Los genes CREB y CREM por procesamiento alternativo generan polipéptidos activadores y represores. Uno de los casos más significativos es un polipéptido truncado en el bZIP de CREM al que se denomina ICER (Represor Inducible del Elemento de respuesta a AMPc), sintetizado desde un promotor alternativo que está situado en un intrón, con sitios CRE de respuesta a estimulación con AMPc (Molina y cols., 1993) (Fig.18).

La regulación diferencial de genes diana por AMPc depende de las distintas secuencias CRE y su localización. El primer CRE documentado consiste en 8 bases palindrómicas TGACGTCA (Comb y cols., 1986). El CRE también es funcional sólo con la mitad del motivo (CGTCA) aunque menos activo. Los CRE normalmente están situados entre las 100 pb por delante de la TATA y es menos activo cuando se coloca en posiciones upstream del promotor (Introducción. Secuencias reguladoras).

De los más de 100 genes con elemento CRE, la mitad tenía la secuencia palindrómica completa y la otra mitad sólo una mitad de la secuencia, 2/3 tenía el CRE localizado entre las posiciones -50 y -150, en genes con y sin caja TATA.

Los genes diana de la regulación por sitios CRE están implicados en muy distintas tareas, controlando la expresión de enzimas del metabolismo (lactato deshidrogenasa, tirosina aminotransferasa, superóxido dismutasa), factores de transcripción (EGF-1, CREM, CREB, ICER, JunD, c-Fos, receptor de glucocorticoides, etc), neuropéptidos y

neurotransmisores (encefalina, receptor de sustancia P, somatostatina), ciclo celular, supervivencia y reparación del ADN (quinasa 5 dependiente de ciclina, Bcl-2, ADN-polimerasa β), factores de crecimiento (insulina, TNF, BDNF), regulación del sistema inmune (IL2, IL6, subunidad α del receptor de la célula T), reproducción y desarrollo (espermina sintasa, huntingtina), señalización (MAPK-1, quinasa inducible por suero y glucocorticoides), transporte (ATPasa α 1 sodio/potasio humana) y funciones estructurales (fibronectina, cristalina).

CREB se une a los CRE palindrómicos como dímero aunque no está claro si la dimerización precede o no la unión al ADN.

La estructura cristalina del dominio bZIP de CREB unido al sitio CRE palindrómico muestra similitud con otros complejos de factores de transcripción como los heterodímeros jun-fos o los homodímeros GCN4. El dominio bZIP se organiza formando una sola hélice continua, estableciéndose puentes de hidrógeno entre los miembros del dímero que fortalecen la estabilidad del complejo. En el reconocimiento y unión con el ADN hay residuos conservados como Asn293, y Arg301. La Lys305 parece ser crucial para distinguir el CRE de sitios AP-1 que presentan gran similitud (TGACTCA). La Lys304 interacciona con magnesio y esto podría estabilizar selectivamente la unión de CREB al CRE (Fig 19).

La fosforilación de CREB responde a distintas vías de señalización de segundos mensajeros, desde señales de hormonas, actividad sináptica, factores de crecimiento, estrés, etc (De Cesare y cols., 1999).

La estimulación de receptores acoplados a proteína G provoca un aumento de los niveles de AMPc que activan PKA, cuyas subunidades catalíticas se translocan al núcleo para fosforilar CREB en serina 133 (111 en el caso de CREM). Esta situación está regulada y controlada por la defosforilación de este residuo por la serin/treonin fosfatasa 1 y 2 (PP1, PP2) (Fig.17).

Esa misma serina de CREB está fosforilada por CAMKIV en respuesta a aumentos de calcio (Bito y cols., 1996). Los factores de crecimiento como EGF y NGF a través de Ras/Erk y MSK también fosforilan CREB, como ejemplos de la diversidad de estímulos y vías de señalización que convergen en la fosforilación, no sólo de la serina 133 de CREB, en el control de la transcripción.

El dominio de transactivación de CREB es bipartito entre el Q2 (160-283) y el KID (100-160).

El dominio Q2 promueve la activación de la expresión génica a través de una interacción con TAFII130

(componente del complejo TFIID). La importancia funcional del dominio Q2 se pone de manifiesto en CREM E que contiene el KID pero se comporta como represor al no tener el dominio Q2, además en el dominio Q2 está presente un pequeño motivo LQTL necesario para la formación del complejo Q2-TAFII130. El dominio Q2 es constitutivamente activo in vitro pero no in vivo lo que sugiere que debe existir un mecanismo específico de represión,

quizás dependiente de cromatina que podría ser eliminado por la activación HAT de CBP unido al KID de CREB.

En contraste con la naturaleza del dominio Q2 está el KID que sólo se activa al estar fosforilado en determinados residuos. La fosforilación de serina 133 promueve la localización de coactivadores CBP/p300 sobre el promotor lo que permite que se desencadenen los procesos de iniciación de la transcripción (Fig 20).

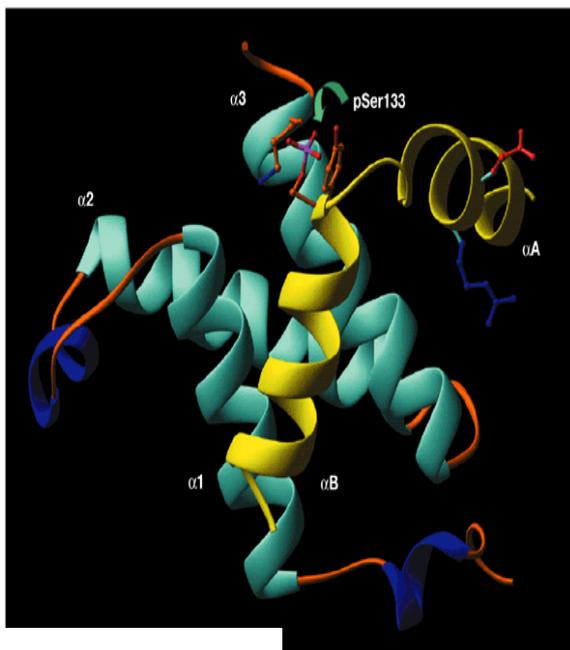


Fig (20). Estructura del KID-KIX. La estructura del complejo CREB-CBP, a través del KID-KIX respectivamente, en la que el KID está formando una estructura de 3 hélices en las que alpha1 y alpha3 son paralelos formando una región hidrofóbica. La serina133 fosforilada se encuentra entre las dos alpha-hélices del KID, una de ellas, alphaB es anfipática y establece los contactos con el KIX y estabiliza el complejo (Mayr y Montminy., 2001).

3.3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR CALCIO.

Sidney Ringe estaba estudiando la contracción en corazón de rata aislado, utilizando un medio de suspensión preparado con agua dura (alto contenido en sales de calcio), en el que el corazón se contraía. Utilizando agua destilada, los latidos comenzaron progresivamente a debilitarse hasta desaparecer (Ringe., 1883), con lo que para mantener la contracción era necesario añadir sales de calcio al medio, así una sustancia que era considerada como elemento estructural, era activa en un tejido que nada tenía que ver con hueso o diente (Carofoli., 2002). De esos días hasta hoy, el calcio ha pasado a considerarse un punto clave en los procesos celulares.

La oscilación con todos sus parámetros: amplitud, duración, frecuencia, etc, se convierte en una manera eficiente de transmitir la señal de calcio de una forma codificada para activar mecanismos específicos de acuerdo a las características de la señal de calcio, restringiéndose a efectores y dianas específicas (Mellström y cols., 2001).

Los picos u ondas de calcio repetitivas fueron observados por primera vez en hepatocitos activados por agonista (Woods., 1987) y hoy en día se han observado prácticamente en todos los tipos celulares. Los mecanismos para explicar la propagación de la onda están basados en una retroalimentación positiva en el cual el calcio aumenta en un punto inicial y se difunde a los depósitos vecinos para activar la liberación de estos y así sucesivamente (liberación de calcio inducida por calcio), añadiéndose un paso más en la cascada de señalización, convirtiendo al calcio liberado en un tercer mensajero (Carofoli., 2001) (Fig 21).

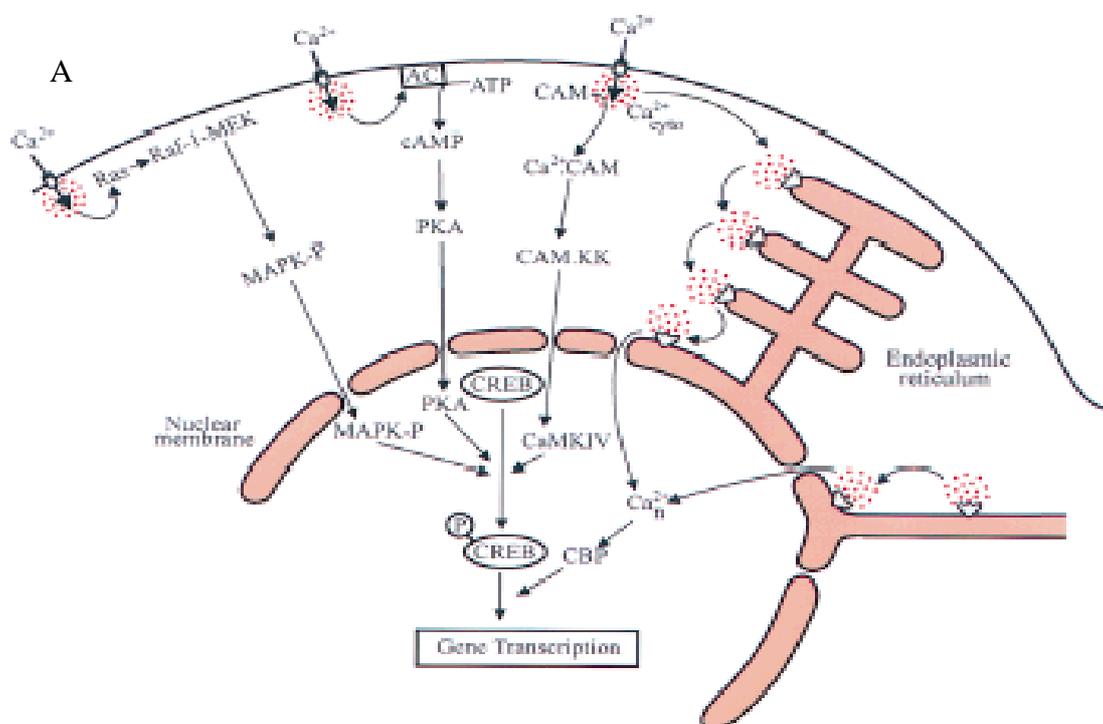


Fig (21). Ampliación de la señal de calcio en neuronas.

El calcio se ha considerado que se encuentra en las células compartimentado entre calcio citoplásmico y calcio nuclear, pero el hecho es que los iones de calcio simultáneamente activan mecanismos de acuerdo a las características de la señal de calcio y la posible localización espacial de los efectores específicos y las dianas. La detección de los incrementos de calcio intracelular se da por sensores específicos de calcio, los cuales, de forma más o menos directa, traducen la señal de calcio a cambios en el rango de transcripción de genes específicos (Fig 22). Con excepción de PKC, los sensores de calcio son proteínas que contienen EF-hand como dominios de unión a calcio (se detallarán más adelante) incluyendo la CaM (prototipo de sensor de calcio) y miembros de la subfamilia de las recoverinas (Mellström y cols., 2001).

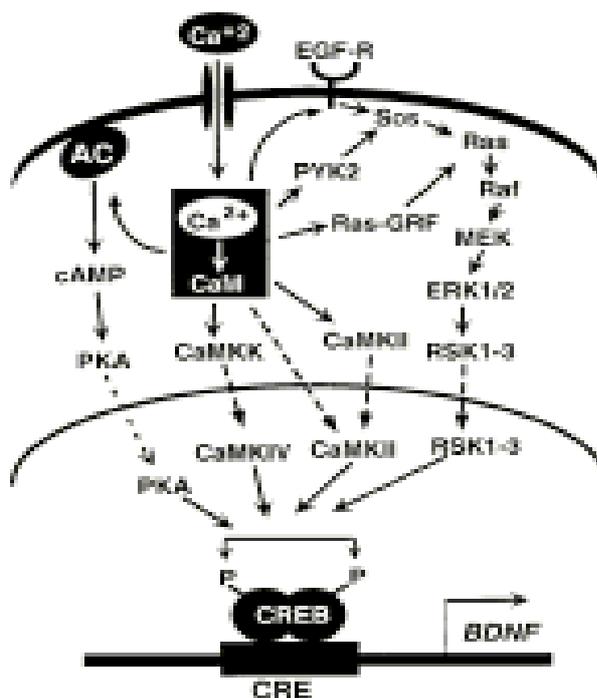


Fig (22). Calcio segundo mensajero en vías de señalización y control de la transcripción.

Hay tres mecanismos generales de actuación provocados por los incrementos de calcio intracelular que pueden alterar la expresión génica:

A/ La activación de cascadas de fosforilación y defosforilación modifican las propiedades de factores de transcripción o afectan a la estructura del nucleosoma, cambiando la accesibilidad de la ARNpolIII a genes específicos.

Cambios en los niveles de calcio libre intracelular son rápidamente transformados en cambios en la actividad de diferentes quinasas como PKA, PKC, MAPKs, CaMK y CaMKK. La fosforilación de factores de transcripción por estas quinasas, culmina en la transactivación de determinados genes (Sheng y cols., 1991).

La activación de CBP, un coactivador esencial para la transcripción dependiente del elemento CRE, requiere calcio nuclear y activación de CAMKIV, en células de pituitaria humana AtT20 (Chawla y cols., 1998) y cultivos primarios de neuronas de hipocampo y corteza. Además, en células PC12 (Hu y cols., 1999), la vía de Rap1-ERK dependiente de calcio activa a CBP independientemente de la fosforilación de CREB (Grewal y cols., 2000).

Además de la fosforilación de factores de transcripción específicos, hay quinasas dependientes de calcio que provocan modificaciones selectivas en los nucleosomas de genes específicos. Se han identificado distintas quinasas candidatas para modificar histona 3 a nivel nuclear, como Rsk-2, MSK1, CamK nuclear. A su vez, la proteína fosfatasa nuclear 1 activada por calcineurina está implicada en la desfosforilación de histona 3 (Chaadee y cols., 1999).

La inactivación de estas cascadas también es dependiente de calcio e implica a dos fosfatasas como son: calcineurina dependiente de calcio/calmodulina que activa a la proteína fosfatasa nuclear 1 (en neuronas de hipocampo y estriado controla la vida media de CREB fosforilado) y la MAPK fosfatasa 1 (MKP1), activada por la vía de MAPK-ERK, contribuye a la reducción de la señal propagada por esta misma vía (Davis y cols., 2000).

La activación de la fosfatasa calcineurina tiene profundos efectos sobre la regulación transcripcional en linfocitos T donde desfosforila NF-AT (Factor nuclear de células T activadas) para que dicho factor se transloque al núcleo y sea transcripcionalmente activo participando en la expresión de numerosas citoquinas importantes para la activación del linfocito T. La diversidad de proteínas de la familia NF-AT, su expresión diferencial en tejido y la posibilidad para interactuar con otros factores de transcripción es la base de su capacidad para decodificar distintos componentes de la señal de calcio que están orquestando respuestas transcripcionales diferentes en los distintos tipos celulares (Rao y cols., 1997).

B/ Inducción de interacciones proteína-proteína dependientes de calcio entre sensores de calcio y factores de transcripción, o proteínas involucradas en transcripción como parte del enhanceosoma.

El sensor de calcio típico, la calmodulina, es una proteína multifuncional que puede interactuar, de manera dependiente o independiente de calcio, con numerosos sustratos, quinasas y fosfatasas. Dentro de todo esto, dos tipos de interacciones son particularmente importantes en el control de la expresión de genes por calcio nuclear:

Los factores de transcripción de la clase bHLH son una familia de proteínas con más de 240 miembros, todos ellos importantes reguladores en procesos de desarrollo como neurogénesis, hematopoyesis y miogénesis.

Basándose en la distribución tisular, la capacidad de dimerización y la especificidad por la unión al ADN, las proteínas bHLH se han subdividido en siete clases (Massari y Mure., 2000).

De manera general, las proteínas bHLH forman dímero (homo y heterodímeros) a través de los dominios HLH, para unirse sobre la secuencia consenso CANNTG en el ADN, conocida como caja E, utilizando para ello el dominio básico de unión al ADN.

Después de la unión al ADN, principalmente los dímeros de la clase I, II y III activan la transcripción a través del reclutamiento de cofactores que presentan actividad HAT como p300/CBP, PCAF y los complejos SAGA (Eckner y cols., 1996 y Massari y cols., 1999), además del reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina como SWI/SNF (Cheng y cols., 1999).

La activación de los factores de transcripción bHLH está regulada a diferentes niveles:

1/ El proceso de oligomerización, importante para la unión específica al ADN y el reclutamiento de componentes transcripcionales, puede verse afectado por el contexto del ADN y la presencia de otras proteínas que modifican el proceso de oligomerización.

2/ Fosforilación.- La fosforilación puede afectar al proceso de oligomerización, modificar la afinidad por el ADN o cambiar la especificidad de un determinado dímero por una secuencia de ADN concreta (Ström y cols., 1997). Además, la fosforilación puede alterar la actividad transcripcional (Conrad y cols., 1999).

3/ Los aumentos en las concentraciones de calcio intracelular pueden inhibir la actividad de las proteínas bHLH sin afectar su estado de fosforilación (Corneliussen y cols., 1994), a través de la interacción directa de la calmodulina unida a calcio y el dominio de unión a ADN de las proteínas bHLH, con lo que se bloquea la unión de la proteína al ADN, y puesto que las proteínas bHLH de las clases I y II son activadores transcripcionales, la transcripción queda reprimida.

Además, sobre este modelo se ha propuesto que esta interacción puede bloquear el sitio de fosforilación por PKC del factor bHLH Myo D (Baudier y cols., 1995), y reducir la interacción con los componentes de la maquinaria de transcripción (Leonormand y cols., 1997), lo que propone mecanismos adicionales de bloqueo de bHLH por calcio/calmodulina.

No se ha demostrado que el calcio regule la actividad enzimática de HDACs, pero sí se ha confirmado que HDAC4 y HDAC5 son dianas nucleares de los complejos calcio/calmodulina. La unión de calmodulina bloquea la interacción de HDACs con factores de transcripción de la familia MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor 2), en un proceso con distintos puntos de control regulados por calcio, provocando importantes cambios en la expresión génica y drásticas modificaciones fenotípicas (Youn y cols., 1999).

C/ El calcio induce cambios en las propiedades del sensor de calcio para unirse a sitios específicos en el ADN.

El único ejemplo por ahora conocido es la unión del calcio a DREAM (Antagonista Modulador del sitio DRE) que se desarrollará durante el apartado de resultados y discusión de esta memoria

Las múltiples posibilidades de codificación de la señal de calcio para generar respuestas coordinadas entre el citoplasma y el núcleo, así como para activar de manera concreta un mecanismo de respuesta específico, aún permanecen fuera de nuestro alcance, al igual que otros muchos procesos necesarios en la expresión génica como la metilación del ADN, el procesamiento del ARN, ubiquitinización de proteínas, etc, en los que el calcio puede tener un papel importante, pero que aún se desconoce (Mellström y cols., 2001).

3.4. DREAM. ANTAGONISTA MODULADOR DEL SITIO DRE.

3.4.1. REPRESOR TRANSCRIPCIONAL.

La expresión del gen de prodinorfina humana, involucrado en adquisición de memoria y dolor, ha sido el objeto de estudio en nuestro laboratorio en los últimos años y sobre su promotor se pudo identificar una nueva secuencia reguladora colocada en posición posterior a la caja TATA y denominada DRE (Elemento Regulador en posición Downstream) que actúa como un silenciador génico (Carrión y cols., 1998). Utilizando esta secuencia DRE como sonda en un rastreo sobre una genoteca de ADNc de caudado humano, se pudo aislar e identificar una proteína de unión al DRE a la que se denominó DREAM (Antagonista Modulador del sitio DRE).

Para mapear el gen de prodinorfina humana, lo primero fue establecer el sitio de iniciación de la transcripción y se encontró que este gen utilizaba dos sitios de iniciación fundamentalmente, separados por 5 nucleótidos, con una localización equivalente al gen de prodinorfina de rata. La secuencia ATAAA a 50 pb por delante del sitio de iniciación definía la caja TATA en el gen de prodinorfina humana (Carrión y cols., 1998).

Para analizar los mecanismos reguladores en el control de la expresión del gen de prodinorfina humana se clonó un fragmento del promotor que comprendía la región +150 a -1660 y se prepararon construcciones reporteras con el fragmento completo y distintas deleciones en 5' unidas al gen reportero CAT (Cloroanfernicol Acetil Transferasa) (Fig 23).

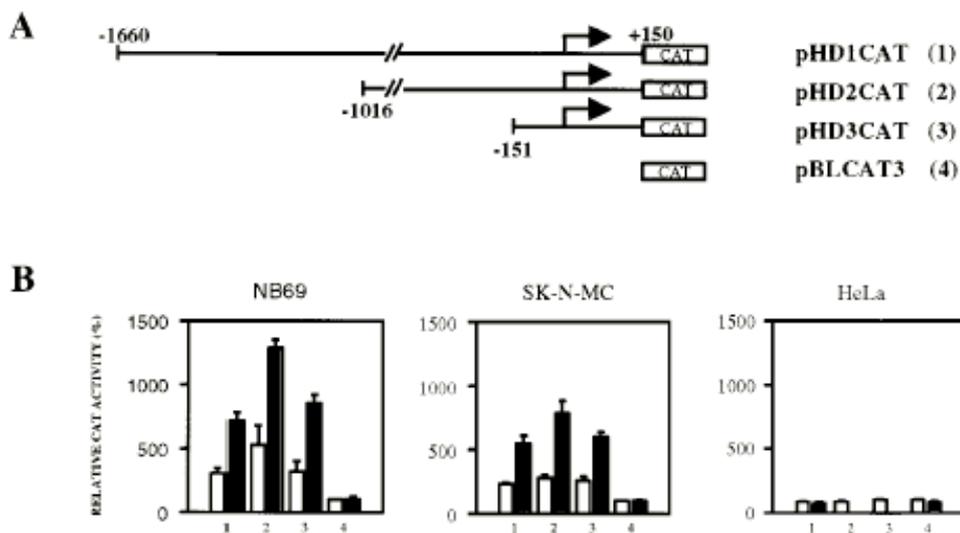


Fig (23). (A). Deleción del promotor de prodinorfina humana en el vector pBLCAT3. (B). Transfecciones transitorias en células de neuroblastoma humano NB69 y SK-N-MC y en células HeLa con los plásmidos reporteros del panel A. Resultados expresados como actividad CAT relativa al reportero vacío pBLCAT3, en ausencia de tratamiento (barras blancas) y en tratamientos con forskolina (barras negras).

Las construcciones 2 y 3 aún mantenían valores de acetilación basales similares a los de la construcción 1 y significativamente mayores que los del vector vacío.

Tras estimulación de PKA, que aumenta la expresión de prodinorfina (Col y cols., 1995), aumentó la activación en las 3 construcciones, lo que definía una región de unas 300 pb (+150 a -150), incluidas en la construcción pHD3CAT que contenían el promotor mínimo inducible de dinorfina humana. Por otro lado, la transfección de las construcciones en células HeLa, una línea celular que no expresa prodinorfina no presentó diferencias en los niveles de expresión basales ni inducidos con forskolina (Fig 23).

El análisis de la secuencia del promotor mínimo inducible mostró que las últimas 4 bases (GTCA) del elemento CRE4 del promotor de dinorfina de rata, una secuencia involucrada en la activación transcripcional del gen, estaban conservadas en el gen de prodinorfina humana en posición +40 (por detrás de la caja TATA), utilizando extractos nucleares de NB69 y oligonucleótidos de la región +30 a +50 del gen humano se obtuvieron bandas de retardo (unión de una proteína o complejo a la sonda), las cuales eran específicas de la sonda ya que sólo se compiten eficazmente con el mismo oligo y no con otros diferentes (Fig 24).

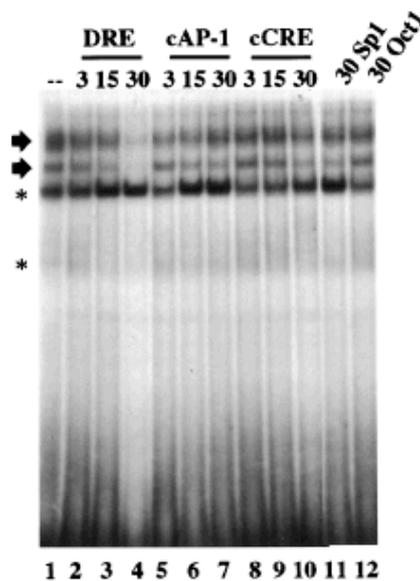


Fig (24).Ensayo de retardo de bandas utilizando el DRE del gen de prodinorfina humana. Competición de las bandas retardadas con oligo frío en exceso de los competidores arriba indicados. Bandas específicas del DRE indicadas con flechas.

A partir de estos resultados, a la secuencia reguladora putativa centrada en posición +40 se le denominó DRE (Elemento Regulador en posición Downstream) (Carrión y cols., 1998).

Los siguientes experimentos para definir la relevancia funcional del DRE se encaminaron a determinar el núcleo de la secuencia DRE, para ello se realizó mutagénesis dirigida en el DRE del reportero pHD1CAT (Fig 25), y se mutaron a adenosinas determinados nucleótidos del oligo DRE utilizado en los ensayos de retardo, analizando la capacidad de estos oligonucleótidos mutados de competir las bandas de retardación (Fig 25).

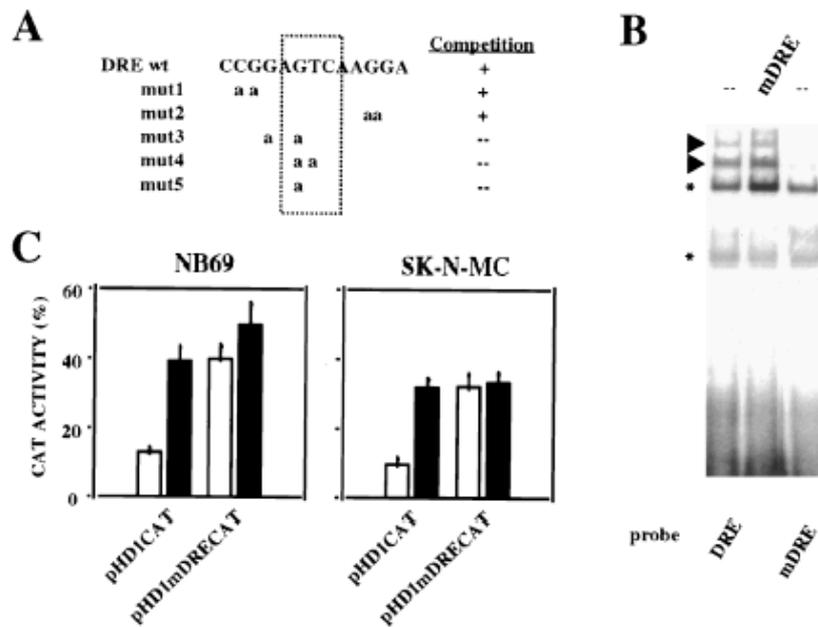


Fig (25). Mutagénesis dirigida sobre el DRE del promotor de prodinorfina humana. (A). Alineamiento de los diferentes DREs mutados y su capacidad de competir las bandas de retardo del DRE como se muestra en el panel (B) utilizando extractos nucleares de NB69 competidos con 30 veces el oligo DRE salvaje y con sonda DRE mutada. (C). Transfección transitoria del reportero pHD1CAT y el mismo mutado en el DRE, barras blancas sin tratamiento y negras con estimulación por forskolina en las dos líneas de neuroblastoma.

Los DREs mutantes 1 y 2 aún eran capaces de competir las bandas retardadas tan eficientemente como el DRE salvaje, mientras que los mutantes 3, 4 y 5 habían perdido esa capacidad (Fig 25.A). Estos resultados indican que la sustitución de la base central G a A, mutación presente en el oligo número 5 es suficiente para alterar la funcionalidad del sitio DRE. Este mismo oligo mutado presenta una clara reducción en su capacidad de producir bandas de retardo sobre extractos nucleares de NB69 y ese mismo oligo frío no es capaz de competir las bandas de retardo específicas del DRE (Fig 25.B). Tras transfección transitoria en líneas de neuroblastoma, el aumento de la actividad CAT que aparece en el reportero pHD1mDRECAT era similar al del reportero salvaje tratado con forskolina y a su vez, dicho tratamiento no modificaba apreciablemente la respuesta del reportero mutante (Fig 25.C). Estos resultados se interpretaron como una represión basal por parte del sitio DRE, ya que la ausencia de dicho sitio provoca un aumento de la expresión basal del reportero, con lo que debía ser una proteína o complejo represor el que estuviera unido al sitio DRE en situación basal, manteniendo la transcripción en niveles mínimos. En presencia de una estimulación de PKA, el complejo o proteína represora abandona el sitio DRE y se produce un aumento de la transcripción.

Utilizando estos resultados junto con los alineamientos de los promotores de dinorfina de humano, cerdo, rata y ratón se propuso una secuencia DRE consenso : PuNGTCAPuPuG.

Para determinar si el DRE podría reprimir la transcripción de promotores heterólogos, se clonó la secuencia DRE por detrás del promotor mínimo de timidina quinasa en el vector reportero pBLCAT2 (Fig 26).

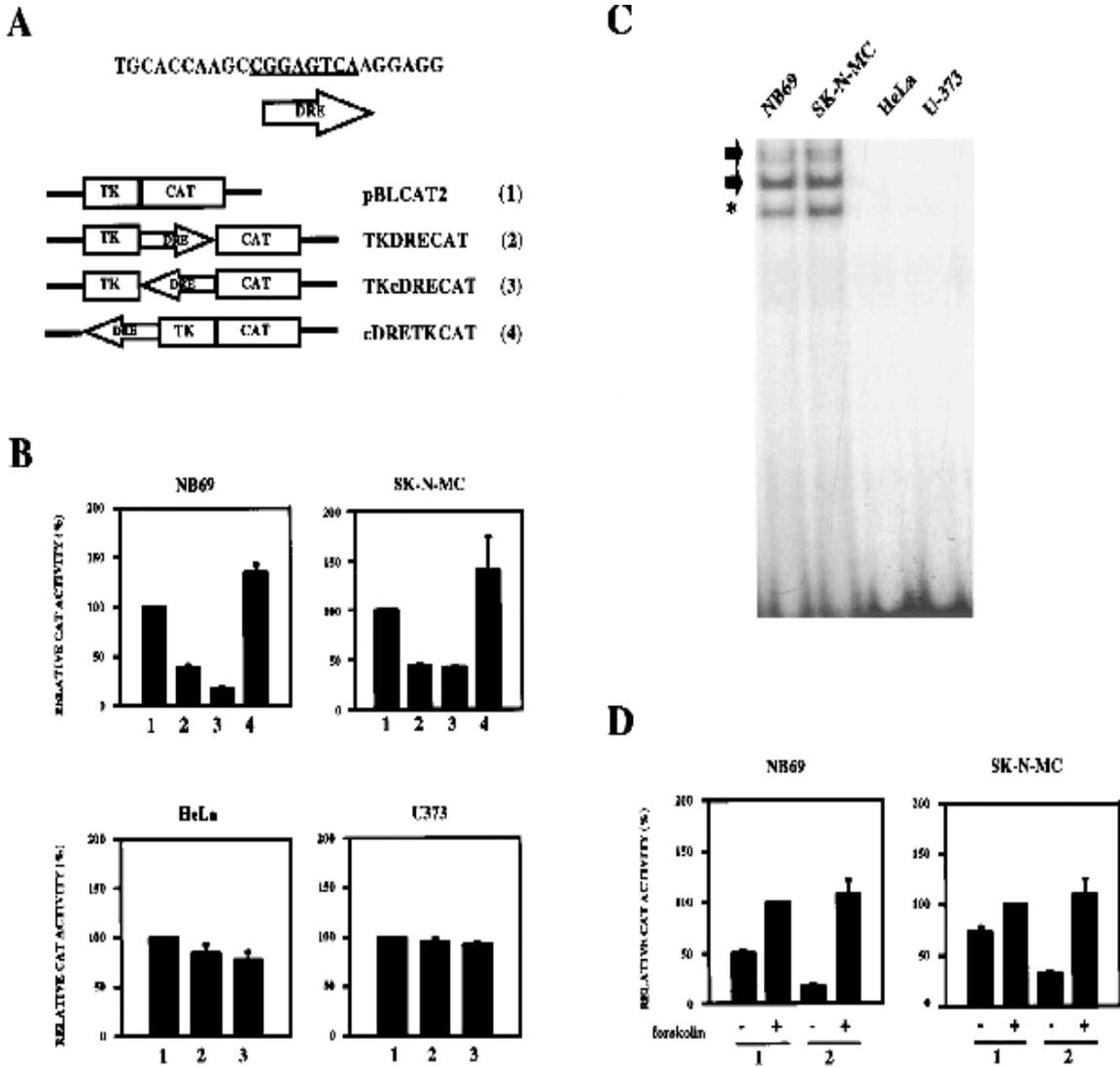


Fig (26). Represion de promotores heterólogos del gen de timidina quinasa por el DRE. (A) Esquema de las construcciones del promotor de timidina quinasa acoplado al reportero CAT y la posición relativa de los DRE introducidos en dicha construcción. (B) Ensayos de transfección y actividad CAT en las distintas líneas celulares que se indican, con las construcciones del panel A. (C) Ensayo de retardo sobre la sonda DRE de prodinorfina humana con extractos nucleares de las líneas celulares que se indican. (D) Ensayos de transfección y actividad CAT de las construcciones 1 y 2 del panel A, en presencia y ausencia de forskolina.

La transfección transitoria en NB69 y SK-N-MC reveló que la inserción del sitio DRE por detrás del promotor mínimo de timidina quinasa, independientemente de la orientación, reducía significativamente la transcripción basal. El mismo experimento en HeLa (línea de tumor de ovario humano) o U373 (glioma humano), no producía ningún cambio en la transcripción (Fig 26.B). A su vez, los extractos nucleares de HeLa y U-373 no provocaban ninguna banda de retardación sobre el oligo DRE (Fig 26.C).

Así se pudo concluir que la represión transcripcional mediada por el DRE es específica de célula y mediada por una proteína nuclear presente en NB69 y SK-N-MC que interacciona con la secuencia DRE. El DRE no afecta a la transcripción basal cuando se coloca por delante del promotor mínimo (Fig 26.B). Estos resultados indican que el DRE reprime la transcripción de manera independiente de la orientación y el contexto del promotor, pero sólo cuando se encuentra por detrás de la caja TATA.

Hasta este momento se había definido una secuencia represora denominada DRE dentro del promotor mínimo inducible de prodinorfina humana, capaz de reprimir otros promotores de manera dependiente de posición y específica de células concretas en las que se encuentra una determinada proteína o complejo represor que de manera específica se une al DRE. También se había definido una secuencia consenso del sitio DRE en la que se determinó aquellas bases que pudieran ser importantes para la formación de bandas de retardación, y también se conocía la sensibilidad del promotor a la estimulación por PKA.

Para chequear la actividad de desrepresión, se estudió la capacidad de PKA para desplazar las bandas de retardación sobre el DRE. Se prepararon extractos nucleares de las dos líneas de neuroblastoma, en condiciones basales y tratadas con forskolina a diferentes tiempos (Fig 27).

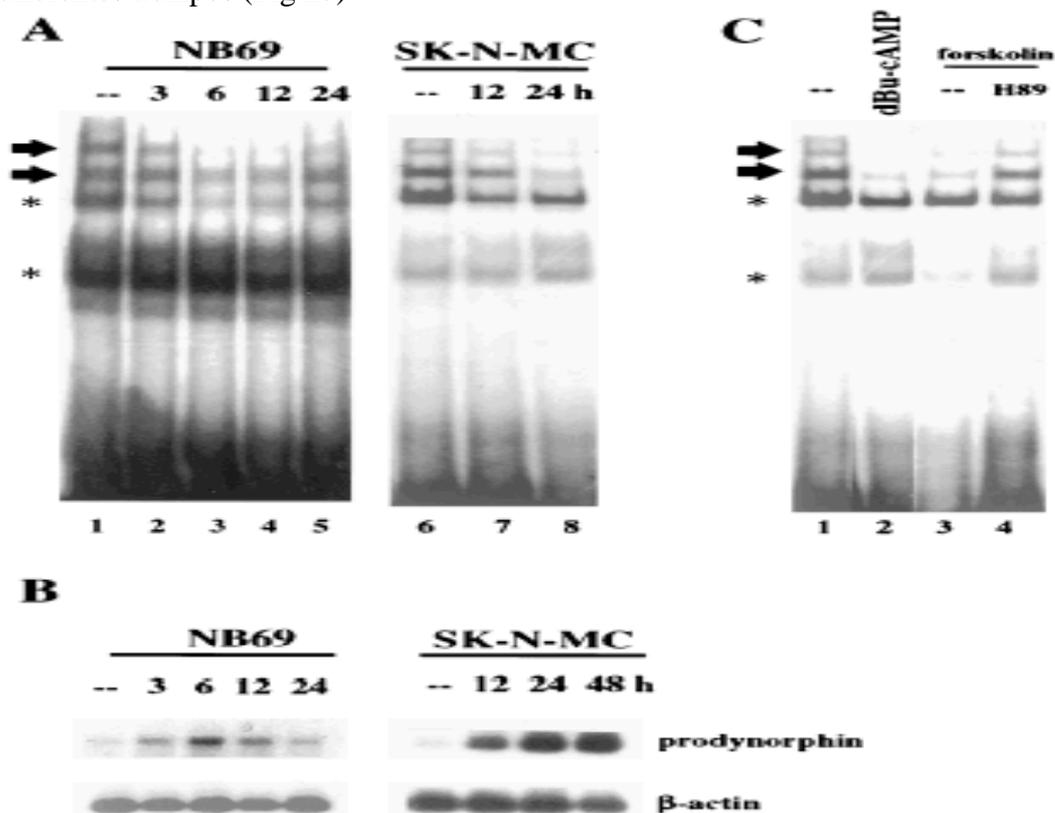


Fig (27). Bloqueo de la unión al sitio DRE y la transactivación de PKA se relaciona con el incremento de la expresión de prodinorfina en células de neuroblastoma. (A). Ensayo de ratardo mostrando la reducción en las bandas de retardo específicas del DRE (flechas) al tiempo indicado del tratamiento con forskolina (arriba). (B). Southern tras RT-PCR mostrando un incremento en la expresión de prodinorfina en neuroblastomas, a los tiempos indicados del tratamiento con forskolina (indicado arriba). (C). Ensayo de retardo mostrando la reducción específica de las bandas de retardo del DRE por di-butiril AMPc (línea 2) o forskolina (línea 3) a las 6 h de tratamiento en células NB69. El efecto de la forskolina está bloqueado por H89 (inhibidor de PKA) en línea 4.

Estos resultados soportan un mecanismo por el cual, en condiciones basales, un represor nuclear ocupa el sitio DRE, tras estimulación de PKA, el represor es liberado del DRE y la transcripción puede llevarse a cabo.

Los resultados indicaban que el DRE actúa como un silenciador transcripcional dependiente de estímulo que controla tanto la transcripción basal como la inducida por forskolina-PKA. Para caracterizar la proteína nuclear que se une al DRE se realizó un cross-linking de extractos nucleares de células NB69 incubadas con la sonda DRE (Fig 28.A) en el que se muestra la presencia del complejo de 110 kDa, pero en estas condiciones de fijación con UV también se puede observar a aparición de un complejo con un peso molecular aproximado de 60 kDa que podría indicar que el complejo de 110 kDa realmente está formado por dos complejos de 60 kDa. Experimentos de south-western muestran de manera reproducible la presencia de la banda de 110 kDa con capacidad de unirse al DRE (Fig 28.B), esto no sólo se da en líneas de neuroblastoma sino también en caudado y cerebelo humanos, lo que confirma el resultado del cross-linking.

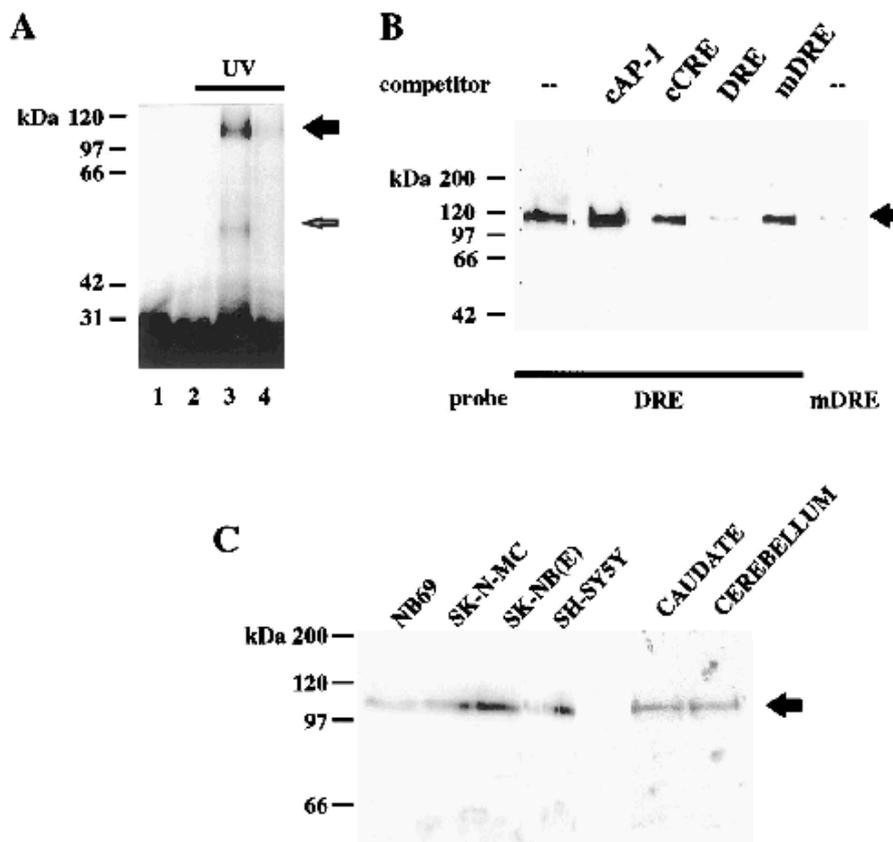


Fig (28). Caracterización de la actividad nuclear que se une al sitio DRE. (A). Extractos nucleares de NB69 en cross-linking con UV tras incubación con la sonda DRE. Tres microgramos de proteinasa K (línea 2) o un exceso de 30 veces sonda DRE fría (línea 4) elimina o reduce, respectivamente, la señal específica de la autorradiografía (línea 3). Sin radiación UV no se observa banda (línea 1). (B). Southern con extractos nucleares de NB69. Utilizando una sonda DRE se obtiene un complejo proteico de 110 KDa . La banda se compite con exceso de sonda fría pero no con sonda mutada. (C). Southwestern de extractos nucleares de neuroblastoma y algunas muestras de cerebro humano, utilizando como sonda el DRE. La flecha indica la banda específica obtenida, de 110 KDa.

Así se propone la hipótesis de que un complejo proteico de 110 KDa se une específicamente al DRE y se corresponde con una actividad represora que en condiciones basales es responsable del silenciamiento transcripcional de genes que contienen el elemento DRE en sus promotores en posición posterior a la caja TATA.

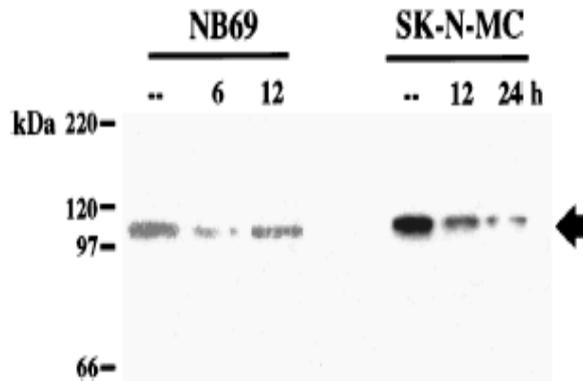


Fig (29). La activación de PKA bloquea la unión del complejo de 110 kDa a la sonda DRE. Southwestern con extractos nucleares de NB69 y SK-N-MC a diferentes tiempos tras el tratamiento con forskolina.

El tratamiento con forskolina en líneas de neuroblastoma reduce la unión del complejo de 110 kDa a la sonda DRE (Fig 29), en concordancia con los resultados anteriores.

Como conclusiones de todos los resultados anteriores (Carrion y cols., 1998) se puede resumir:

- + La transcripción basal e inducible del gen de prodinorfina humana necesita de una región no traducida en el 5'(DRE).
- + El promotor mínimo inducible de prodinorfina humana contiene un sitio DRE.
- + El sitio DRE actúa como un silenciador transcripcional y media la desrepresión transcripcional dependiente de PKA.
- + Un complejo proteico nuclear de 110 kDa se une específicamente al sitio DRE.

Para aislar ADNc complementarios que codificasen proteínas capaces de unirse a la secuencia DRE se chequeó una librería de expresión de caudado humano, utilizando como sonda un oligonucleótido de doble cadena conteniendo dos elementos DRE. Un clon de ADNc positivo codificaba para una proteína de 284 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 31,8 kDa (Fig 30) (Carrión y cols., 1999).

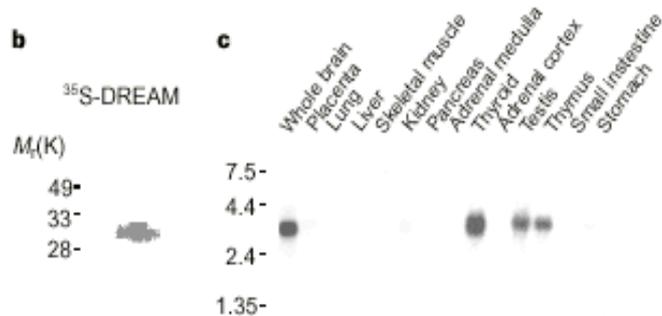
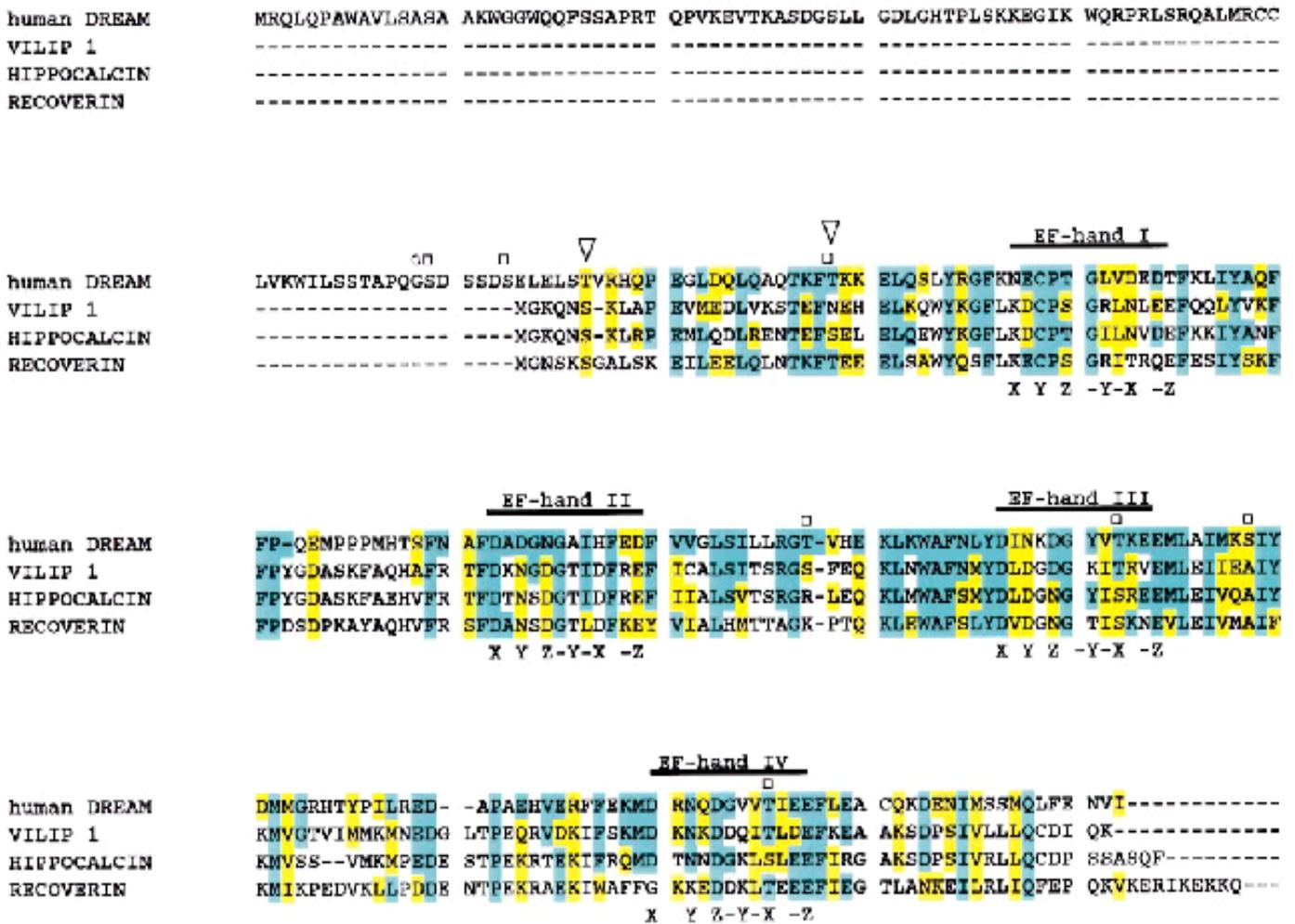


Fig (30) Productos del gen DREAM. (a). Secuencia de aminoácidos de DREAM humano y alineamiento con otras proteínas que unen calcio. Los aminoácidos conservados están coloreados en azul y los cambios conservados en color amarillo. Las posiciones X, Y, Z, -Y, -X y -Z son los residuos que aportan el oxígeno para formar la cadena que une al calcio. Los círculos indican un sitio potencial de miristoilización, los triángulos indican posibles sitios de fosforilación por proteína quinasa C y los cuadrados indican potenciales sitios de fosforilación por casein quinasa II. (b). Transcripción in vitro de proteína DREAM marcada con azufre 35. (c). Northern para el ARNm de DREAM en tejidos humanos. El tamaño del ARN se muestra en kilobases a la izquierda.

Una proteína con el mismo tamaño aproximado (31,8 kDa) se obtiene a partir del cDNA por transcripción in vitro en lisado de reticulocito (Fig 30.b). Como el sitio DRE actúa como un silenciador, a la proteína que se une al DRE se le llamó Antagonista Modulador del sitio DRE (DREAM). El northern de distintos tejidos humanos reveló un transcrito de DREAM de 3.0 Kb, con una alta expresión en cerebro, timo, tiroides y testículos (Fig 30.c) (Carrión y cols., 1999).

Lo siguiente fue comprobar que la proteína DREAM específicamente se une al DRE. Para ello se prepararon extractos totales de *E.coli* transformadas con el ADNc de DREAM y se analizó en gels de retardo usando el DRE como sonda (Fig 31).

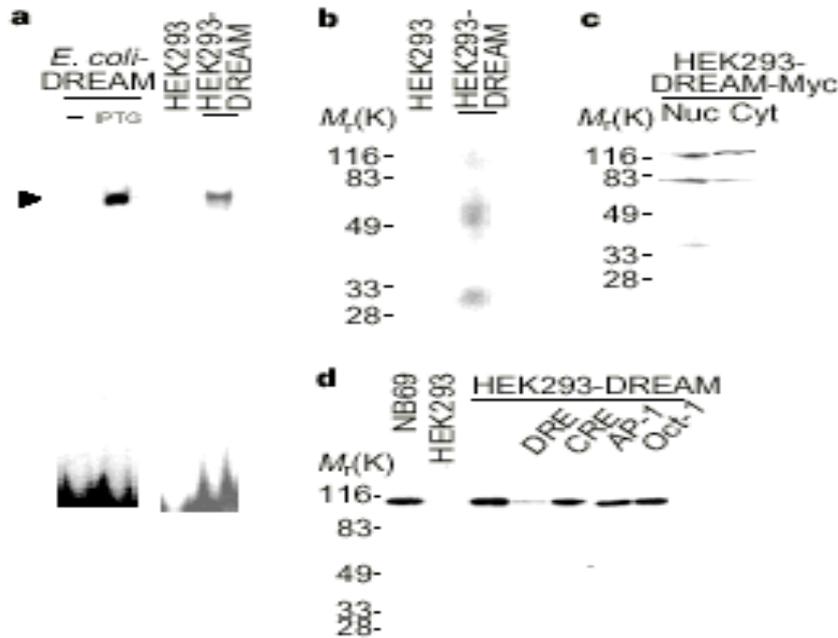


Fig (31). DREAM se une al DRE. (a). Ensayo de retardo que muestra la banda específica de retardo sobre el DRE tras sobreexpresión de DREAM en *E.coli* (*E.coli*-DREAM) y células HEK293 (HEK293-DREAM). (b). Cross-linking de la sonda DRE y extractos nucleares de HEK 293 sobreexpresando DREAM. Se observa el monómero, dímero y tetrámero de DREAM. (c). Western de extractos nucleares y citosólicos de HEK293 sobreexpresando la proteína de fusión DREAM-Myc. (d). Southwestern de extractos nucleares de HEK293 muestra el complejo 110 kDa DREAM-DRE. La banda de 110 kDa obtenida con DREAM endógeno en extractos nucleares de NB69 se muestra como comparación. Competición con oligo frío DRE, CRE, AP-1 u Oct-1.

La banda de retardo también se observa cuando se utilizan extractos nucleares de HEK293 establemente transfectadas con DREAM (HEK293-DREAM). En cross-linking inducido por luz ultravioleta de la sonda DRE sobre extractos nucleares de HEK293-DREAM, aparecen 3 bandas con pesos moleculares aproximados de 30, 60 y 110 kDa (Fig 31.b), estos resultados indican que DREAM puede unirse al DRE como monómero, dímero o tetrámero (Carrión y cols., 1999).

El western de fracciones nucleares y citoplásmicas de células HEK293 expresando la proteína de fusión DREAM-Myc reveló tres bandas en el extracto nuclear correspondientes al monómero, dímero y tetrámero (Fig 31.c) (Carrión y cols., 1999).

Cuando los extractos nucleares de HEK293-DREAM se analizaron por southwestern sólo se detectó, de manera específica, la banda de 110 KDa (Fig 31.d). Esto concuerda con los resultados anteriores (Carrión y cols., 1998).

Todos estos resultados indican que la proteína DREAM se une con alta afinidad a la secuencia DRE como homomultímero pero también es capaz de unirse al DRE como monómero pero con menor afinidad (Carrión y cols., 1999).

En el análisis de la secuencia de DREAM, las regiones de mayor homología con las proteínas de la familia de las recoverinas se corresponden con 4 dominios de unión a calcio del tipo EF-hand.

Se conocen unas 600 proteínas con dominios EF-hand, cuyas funciones pueden ser como tamponadoras de las concentraciones de calcio o bien jugar importantes papeles en la decodificación de la información transportada por el calcio hacia sus dianas. Por lo tanto se definen mucho mejor como proteínas moduladas por calcio o sensores de calcio.

El ejemplo clásico de una proteína con EF-hand es el caso de la calmodulina.

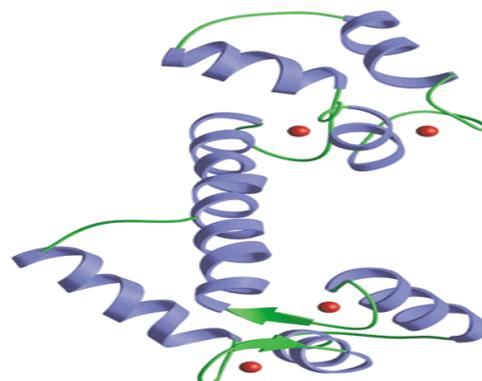
Los dominios EF-hand suelen encontrarse en pares simples o múltiples. Pueden agruparse en dos categorías funcionales:

- *Reguladoras.*- Las proteínas reguladoras que contienen EF-hand inducen cambios conformacionales que son transmitidos a sus proteínas diana, catalizando reacciones enzimáticas. Algunos ejemplos de este grupo son la calmodulina o la recoverina.
- *Estructurales.*- La unión del calcio a las EF-hand de estas proteínas no resulta en cambios conformacionales importantes en otras proteínas sino que parece jugar un papel importante en el tamponamiento de los niveles de calcio intracelular. Algunos ejemplos de este grupo son la calbindina o la parvalbúmina.

(Taylor y cols., 1991).

Estas proteínas unen calcio con alta afinidad al dominio EF-hand formado por una α hélice (E) con 11 residuos, un lazo o loop que rodea al ion calcio y una segunda α hélice (F) de otros 11 aminoácidos; estos dominios EF-hand pueden estar repetidos de 2 a 12 veces, uniendo el calcio a través de una cadena de oxígenos formada por los residuos que ocupan las posiciones 10 (X), 12 (Y), 14 (Z), 18 (-X), 16 (-Y) y 21 (-Z) que normalmente es glutámico. Así se forma una bipirámide pentagonal cuyo eje es 10 (X)-18(-X) (Najayama y Kretsinger., 1994) (Fig 32).

Fig (32). 4 dominios EF-hand en calmodulina de *D. melanogaster*. Átomos de calcio en rojo.



En algunas células en reposo, algunas EF-hand pueden coordinar magnesio. La concentración de magnesio libre en el citosol es constante y cercana a $10^{-2.5}$ M, para muchas proteínas de unión a calcio y entre ellas muchas con EF-hand el ratio de afinidades por calcio y magnesio está alrededor de $10^{4.2}$, de manera que sitios con alta afinidad por calcio ($K_d = 10^{-7.2}$ M) pueden tener afinidad por el magnesio ($K_d = 10^{-3.0}$ M).

Un grupo de proteínas EF-hand que recientemente ha adquirido importancia es el de los sensores de calcio neuronal (NCS) (Burgoyne y cols., 2001), divididos en cinco subfamilias, dos de ellas expresadas en fotorreceptores de la retina (recoverinas y proteínas activadoras de guanilil ciclasas –GCAPs-) y tres familias en neuronas del SNC y células neuroendocrinas (frecuéninas, proteínas similares a visinina y proteínas de interacción con los canales Kv).

Con todos estos resultados se presenta un represor transcripcional, DREAM, que directamente reprime la transcripción a través de su unión específica al sitio DRE, funcionando como un homotetrámero y que presenta cuatro dominios putativos de unión a calcio del tipo EF-hand que pueden estar controlando la actividad de la proteína (Carrión y cols., 1999) y que también presenta sensibilidad a la estimulación por AMPc-PKA.

3.4.2. DREAM = CALSENILINA = KChIP3.

En paralelo al clonaje e identificación de DREAM como represor transcripcional en nuestro laboratorio, Buxbaum y cols., por ensayos de dos híbridos en levadura, utilizando como cebo un fragmento de 103 aminoácidos del extremo C-terminal de presenilina 2 (proteína implicada en la regulación del procesamiento de la proteína precursora amiloide en la enfermedad de Alzheimer) consiguieron aislar una proteína con una secuencia de aminoácidos idéntica a la de DREAM, a la que pusieron el nombre de CALSENILINA (Buxbaum y cols., 1998).

A lo largo de los últimos 4 años, trabajos realizados en otros laboratorios han descrito la interacción de la proteína DREAM / CALSENILINA con la cola C-terminal de las presenilinas 1 y 2 (Zaidin y cols., 2002) y basándose en diferentes resultados, proponen un modelo en el que DREAM / CALSENILINA actúa como un sensor de los niveles de calcio intracelulares y un desajuste en este sistema sensor podría permitir un incremento de los niveles de calcio intracelular y/o activación de caspasas.

A nivel celular, las mutaciones de PS1 y PS2 en Alzheimer familiar están asociadas con apoptosis e incremento del corte de presenilinas por caspasas, así como con las perturbaciones en la homeostasis del calcio y el incremento de la producción de proteína beta-amiloide.

De esta manera, las concentraciones de presenilinas mutadas en el Alzheimer familiar podrían verse afectadas por los niveles de DREAM / CALSENILINA o su compartimentación celular (Fig 33) (Tanzi y cols., 1998).

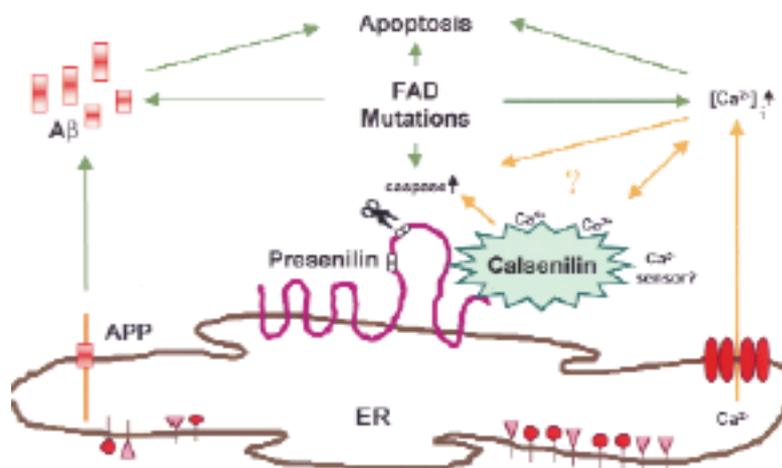


Fig (33). Esquema del funcionamiento de la calsenilina y su interacción con presenilinas.

En el año 2000, An y cols, utilizando un fragmento del extremo N-terminal del canal de potasio Kv4.3, en ensayos de dos híbridos en levadura, sobre una librería de ADNc de cerebro medio de rata consiguieron aislar los tres primeros miembros de la familia

KChIP (Proteínas de interacción con los canales de K⁺). La secuencia de KChIP3 coincide completamente con la de DREAM / CALSENILINA lo que relacionaba de manera directa a la proteína DREAM / CALSENILINA / KChIP3 con los canales de potasio del tipo A, dependientes del voltaje, que en cerebro y corazón operan por debajo de los potenciales de membrana, controlando la excitabilidad de neuronas en cerebro y miocitos en corazón (An y cols., 1998).

Las proteínas de la familia KChIP presentan un 70 % de homología entre sí en el extremo C-terminal, mientras que el N-terminal es muy variable (Fig 34).

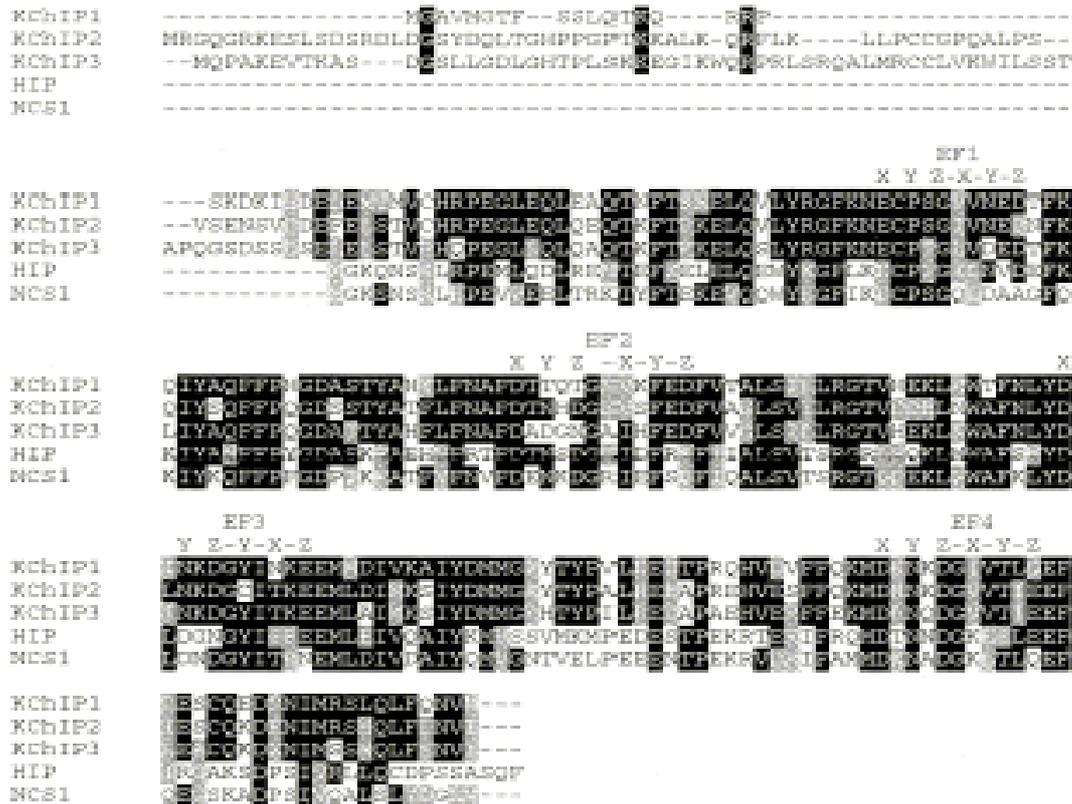


Fig (34). Alineamiento de las secuencias de los KChIPs humanos con miembros de la familia de recoverina.

El estudio de hidrofobicidad indica que DREAM/KCHIP3/CALSENILINA no tiene ningún elemento estructural que pueda actuar como dominio transmembrana, con lo que la asociación a membrana se deberá a la interacción con determinadas proteínas como los canales Kv4 (An y cols., 2002) u otras proteínas sin identificar. Estas interacciones con proteínas son independientes de calcio, por ejemplo KCHIP1 no depende de calcio para su interacción con el canal de potasio (An y cols., 2002), al igual que otros miembros de la familia de recoverinas, como NCS-1 que presenta interacción con la membrana independiente de calcio.

La capacidad de los KChIP para unir calcio muestra que el calcio modula los efectos del canal, si bien la interacción con el canal es independiente de calcio y podría ser constitutiva (los KChIP forman parte natural del canal).

La coexpresión de los KChIPs y subunidades del canal de potasio Kv4 aumenta la corriente, unido a una activación dependiente de voltaje y una rápida reconversión para producir su inactivación.

Los canales de potasio con los que interaccionan los KChIP se activan a niveles inferiores a los del potencial de membrana y se inactivan completamente durante los pulsos despolarizantes, mientras otros canales de potasio dependientes de voltaje comienzan a activarse. Como resultado, influyen en el tiempo que la membrana requiere para la despolarización y la recuperación del potencial.

La inactivación del canal se debe a un dominio intracelular en el extremo N-terminal que físicamente bloquea el poro del canal cuando éste está abierto (Fig 35).

Todos estos resultados sugieren.

- Los KChIPs son parte integral de los canales Kv4, en membrana plasmática y golgi.
- La elevación de los niveles de calcio intracelulares (por ejemplo en el potencial de acción) y su unión a los KChIP provoca un cambio conformacional en estas proteínas que se traduce rápidamente al canal, cambiando su funcionalidad.
- Los KChIP actúan como un sensor de calcio para los canales Kv.

Este modelo también refuerza la hipótesis de que el calcio intracelular puede modular el potencial de membrana.

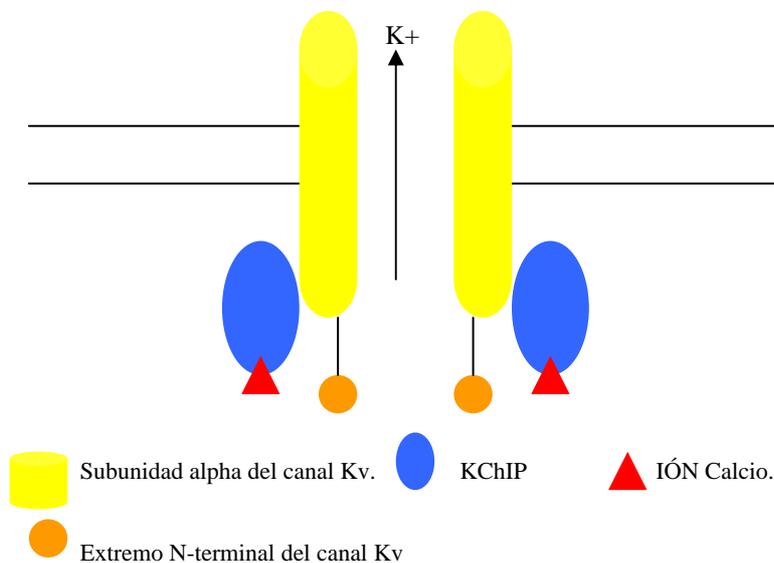


Fig (35). Los KCHIPs son componentes integrales de los canales de potasio tipo A. Los KCHIPs se unen a la subunidad alpha en el extremo N-terminal del canal, junto a la membrana y median el cambio conformacional del canal para cerrar el poro e inactivar el canal. La asociación física entre los KCHIPs y el canal es independiente de calcio,

De el aumento de los resultados que vinculan a DREAM en muy distintas funciones dentro de la célula, desde represor transcripcional (principal objeto de esta memoria) (Carrión y cols., 1999, Ledo y cols.,2000.a, Ledo y cols., 2000.b, Ledo y cols., 2002), a funciones en el citoplasma como calsenilina en relación con el calcio

citoplásmico y presenilinas (Buxbaum y cols., 1998) o KChIP3 a nivel de la interacción con canales de potasio dependientes de voltaje, en localizaciones de membrana (An y cols., 2000), se nos plantea la necesidad de conocer la distribución de la proteína dentro de la célula, de manera que podamos asociar estas funciones con una localización concreta.

Con este objetivo realizamos experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-myc en células PC12 transfectadas con el vector de expresión de la proteína de fusión DREAM-myc y analizamos las imágenes por microscopía confocal (Fig 36).

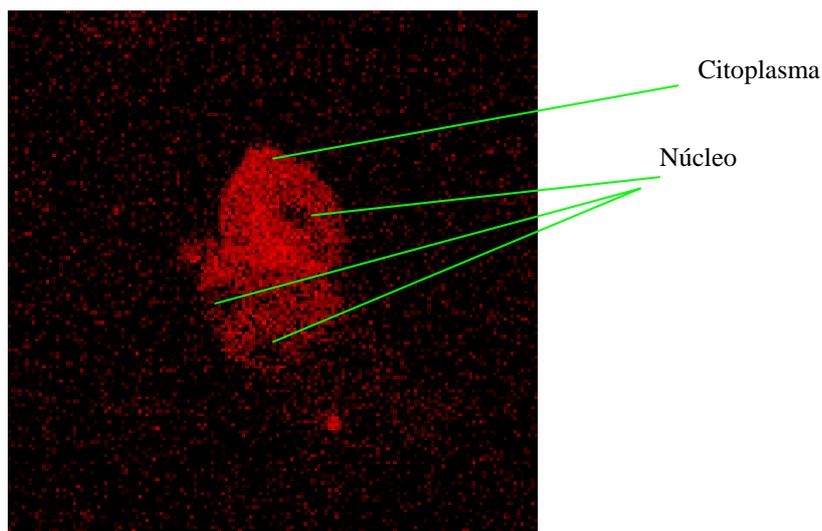


Fig (36). Imagen de microscopía confocal de células PC12 en inmunofluorescencia para detectar la distribución de la proteína de fusión DREAM-myc.

El resultado indica una presencia mayoritaria de DREAM en el citoplasma pero también una destacable localización nuclear (Fig 36). Además este resultado no es producto de la sobreexpresión de la proteína de fusión DREAM-myc puesto que en resultados del laboratorio con la misma técnica para localizar la distribución de la proteína DREAM endógena en células PC12 arrojan resultados similares a la imagen mostrada en la figura 36, y que se confirma con las obtenidas en otros laboratorios para la detección de calsenilina o KChIP3, con lo que podemos concluir que DREAM está presente en el núcleo y esto no se debe a la sobreexpresión.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. LÍNEAS CELULARES

Se han utilizado las siguientes líneas celulares:

HEK 293.

Línea celular procedente de riñón embrionario humano, transformadas con adenovirus tipo 5.

Expresan un inusual receptor de membrana para vitronectina compuesto de la subunidad beta-1 de integrina y la subunidad alpha-v del receptor de vitronectina.

Son especialmente sensibles a adenovirus.

Son hipotriploides, con un número de cromosomas de 64, en el 30% de las células, mientras que un 4,2 % del cultivo presenta mayores rangos de diploidia.

Se han mantenido en crecimiento utilizando DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado, 2 mM de glutamax-1 y 50 µg de gentamicina por mililitro de medio, temperatura constante de 37 grados centígrados y un 5% CO₂.

Expansión del cultivo de 1:2 a 1:4, utilizando PBS+EDTA 5 mM y cambiando el medio cada 72 h.

Congelación con 9% de DMSO en medio de cultivo.

Nº ATCC CRL-1573.

PC12.

Línea celular derivada de feocromocitoma de glándula adrenal de rata (*Rattus norvegicus*).

Responden a NGF induciendo un fenotipo neuronal.

No sintetizan epinefrina.

No presentan buena adherencia al plástico y suelen crecer en acúmulos.

Su cariotipo muestra 40 cromosomas de los que 38 son autosomas más un par XY.

Se mantienen en crecimiento con DMEM suplementado con un 10% de suero de caballo y un 5 % de suero fetal bovino, 2mM de glutamax-1 y 50 µg de gentamicina por ml de medio, cambiando el medio cada 48-72 h y con una temperatura de 37% y un 5% CO₂.

Congelación en medio de cultivo con un 9% de DMSO.

Nº ATCC CRL-1721.

NB69.

Línea de neuroblastoma humano, adherentes y morfología epitelial. Crecen a 37 grados centígrados y 5% de CO₂ en medio mínimo esencial (Eagle) con 2 mM de glutamax-1, 1.5 g/l de bicarbonato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico y un 10% de suero fetal bovino. Además suplementadas con medio F-12 1:1 con el medio anterior.

Cambios de medio entre 3 y 4 veces a la semana. Congelación en medio de cultivo con un 9% de DMSO.

Líneas celulares donadas por la doctora A. Mena (Hospital Ramón y Cajal. Madrid).

SK-N-MC.

Son una línea celular de neuroepitelioma humano de la zona supra-orbital, adherentes y con morfología epitelial. Presentan una actividad moderada dopamina-beta hidroxilasa. Crecen a 37 grados centígrados y 5% de CO₂ en medio mínimo esencial (Eagle) con 2 mM de glutamax-1, 1.5 g/l de bicarbonato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico y un 10% de suero fetal bovino. Además suplementadas con medio F-12 1:1 con el medio anterior.

Cambios de medio entre 2 y 3 veces a la semana con expansión de las células 1:6 ó 1:12.

Congelación en medio de cultivo con un 9% de DMSO.

Nº ATCC HTB-10.

4.2. PLÁSMIDOS.**4.2.1.Reporteros.**

pBLCAT3.- Plásmido con el gen reportero de la cloroanfenicol acetil transferasa (CAT), un intrón y la señal de poliadenilación del antígeno T de SV40 (Luckow y cols., 1987).

pHD3CAT.- Promotor mínimo inducible de dinorfina humana, que presenta como única secuencia reguladora conocida un sitio DRE.

Esta construcción se genera a partir de un fragmento de 1.8 Kb (-1660 a + 150) que contiene la región reguladora del gen de prodinorfina humana que fue obtenido por PCR a partir de ADN genómico humano, con oligos específicos 5'-CAAGCTTACAGATGAGCAATCAGAGGTC-3' y 5'-TTGGATCCCTGGGCAGCTTCTGGCCGAGCAGGTCGGTCCGAGGTG-3'. El resultado fue confirmado por secuenciación de las dos hebras y clonado en el vector reportero sin promotor pBLCAT3 usando las dianas de restricción *HindIII* y *BamHI*, generando de esta manera el vector reportero PHD1CAT. La delección de 644 bp del extremo 5' del fragmento de 1.8 Kb generó el reportero pHD2CAT. La siguiente eliminación hasta la posición -150 utilizando la enzima de restricción *TaqI* produjo el reportero PHD3CAT que contiene sólo 300 bp del promotor de dinorfina humana.

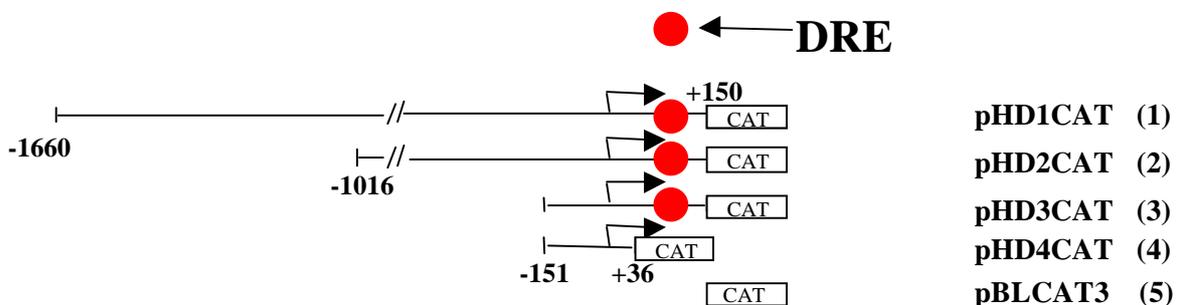


Fig (37). Construcciones generadas en el análisis de delección del promotor de prodinorfina humana.

Utilizando el oligonucleótido 5'-CCAAGCCGGAATCAAGGAGG-3'(mDRE) conseguimos una mutación en una sola base en el DRE, generando el plásmido reportero pHD1mDRECAT, en el que la base mutada se indica en el oligonucleótido subrayado. Todos ellos fueron chequeados por secuenciación.

pTKDRECAT.- Utilizando el oligonucleótido 5'-TCGACCAAGCCCGGAGTCAAGGAGG-3' que contiene una secuencia DRE flanqueado por sitios de restricción, clonado en posición posterior o anterior al promotor mínimo de la timidina quinasa en el vector reportero pBLCAT2 (Luckow y cols., 1987). Los plásmidos reporteros resultantes han sido el pTKDRECAT (DRE en posición downstream), pcDRETKCAT (DRE complementario en posición upstream) y pTKcDRECAT (DRE complementario en posición downstream) que fueron chequeados por secuenciación.

pFC4CAT.- Plásmido reportero generado a partir del subclonaje de un fragmento de unas 400 pb alrededor del punto +1 del promotor de c-fos en un vector que contiene el reportero CAT (Sassone-Corsi et al., 1988). Para mutar el DRE de este promotor se utilizó el oligonucleótido 5'-CTGCAGCGAGCAACAAAGAATCCAAGAC-3' generando el reportero pFC4mDRECAT.

pJCAT.- Plásmido reportero generado a partir del subclonaje del promotor de c-jun, que contiene la secuencia DRE (5'-CTCACGTCAACCGGAGAC-3'), en un vector que contiene el gen reportero CAT.

P2CAT.- Plásmido reportero generado a partir del subclonaje del promotor P2 de CREM que controla la expresión del represor transcripcional ICER, conteniendo un elemento CRE y la secuencia DRE (5'-ATGAGGAAACTGAACTT-3'), en el vector pBLCAT3 que contiene el gen reportero CAT (cedido por el Dr Sassone-corsi).

pSOMCAT.- Este vector lleva acoplado al reportero CAT la secuencia reguladora del promotor de somatostatina humana, en la cual sólo hay presente un CRE como único elemento regulador.

pG5CAT.- Plásmido reportero CAT en el que por delante se han subclonado 5 secuencias de unión a Gal4 de levaduras.

4.2.2. Vectores de expresión.

Vector de expresión de DREAM en eucariotas.- El ADNc de DREAM fue clonado en pcDNA3 en EcoR1 para generar el vector de expresión pcDNA3-DREAM. De manera similar, utilizando el vector pcDNA3.1 generamos el vector de expresión DREAM-Myc.

Se utilizó el oligonucleótido 5'-CTTCGAGAAAATGGCCCGGATCCAGGATGGGGTAG-3' para generar el mutante de DREAM en la cuarta EF-hand, obteniéndose como resultado el vector de expresión pcDNA3-4EFmDREAM.

De manera similar se obtuvieron los distintos mutantes en los LCDs de DREAM para

generar los plásmidos pcDNA3-DREAML47,52V, pcDNA3-DREAML155V, pcDNA3-DREAML47,52,155V, así como la combinación de las diferentes mutaciones en EF-hand combinadas con mutaciones en LCDs.

Vectores de expresión de DREAM y sus mutantes en procariontes.- El ADNc de DREAM y los diferentes mutantes en EF-hand o LCDs fueron clonados en el vector de expresión en bacterias pTrcHis.

Los vectores de expresión en eucariotas de los factores de transcripción de la familia CREM y CREB, presentan el ADNc de cada uno de los miembros de la familia subclonados en el vector de expresión pSV (Foulkes y cols., 1991, y González y cols., 1991).

Los vectores de expresión en procariontes de los factores de transcripción de la familia de CREM y CREB fueron cedidos por el Dr. Sassone-Corsi, sobre los que se realizaron todas las mutaciones necesarias para obtener los mutantes en el LCD del KID. Los mutantes en las serina del KID en CREM y CREB también fueron cedidos por el Dr. Sassone-Corsi.

El vector de expresión del KIX de CBP en procariontes fue cedido el Dr Montminy, y sobre dicho vector se realizó la mutación del LCD para generar el mutante CBP-KIXL603,607V.

El vector de expresión del KIX de CBP acoplado a GST en la construcción KIX-GST está descrita por Parker y cols., 1996.

4.3. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

4.3.1. Transfección con microprecipitados de fosfato cálcico.

Partiendo de un número de células cercano a 5×10^5 puestas en placa de 60 milímetros 6 h antes de realizar la transfección con su medio y cantidad de suero correspondiente (M.M, apartado 4.1), se transfectaron las células con microprecipitados de calcio mezclando una cantidad máxima de ADN (incluyendo vectores de expresión y reporteros) entre 6 y 8 ug con 25 ul de Cl_2Ca y HBS a pH 7.1 (125 mM NaCl, 25 mM HEPES y 0.75 mM Na_2HPO_4) en agitación y manteniéndolo a R.T durante 20 min antes de añadir a las células. La transfección se mantiene durante 12 h a 37 grados centígrados antes de retirarla y poner medio fresco.

4.3.2. Transfección con agentes lipofílicos.

Partiendo de un número de células cercano a 5×10^5 puestas en placa de 60 milímetros 6 h antes de realizar la transfección con su medio y cantidad de suero correspondiente (M.M, apartado 4.1), se transfectaron las células con una cantidad máxima de 4 ug de ADN (incluyendo vectores de expresión y reporteros) en las mismas condiciones que indica el protocolo de la casa comercial (life technologies).

4.4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIA.

4.4.1. Cultivos bacterianos.

Para la expresión y purificación de proteínas bacterianas hemos utilizado la cepa BL21 (en medio 2XYT: 2.5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 8 g de Bacto-trypton y agua hasta 500 ml) y para la producción de los distintos plásmidos reporteros y vectores de expresión de proteínas hemos utilizado la cepa DH5 α (en medio LB: 10 g de Bacto-trypton, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y agua hasta un litro) de *E.coli*, ambas de la casa comercial Life technologies.

4.4.2. Transformación.

En la transformación de las bacterias competentes DH5 α se utilizaron las mismas condiciones especificadas por la casa comercial (Life Technologies), para estas bacterias en transformaciones por choque térmico.

En el caso de la cepa BL21 competentes mezclamos 100 μ l de bacterias con 20 μ l de KCM5X (0.5M KCl, 0.15 M de Cl₂Ca y 0.25 M de Cl₂Mg) y 10 ng de ADN (en 80 μ l de agua), se mantienen 10 min en hielo y otros 10 a R.T. Se añaden 800 μ l de medio LB y se mantienen 30 min a 37 grados centígrados y procedemos a la siembra en placa de la cantidad adecuada del cultivo.

4.4.3. Obtención de plasmidos.

Dependiendo de la cantidad de plásmido que deseamos producir utilizamos dos protocolos principalmente:

-Para preparaciones pequeñas partimos de una colonia aislada transformada con el plásmido de interés crecida en medio LB con antibiótico de selección que se amplifica a un cultivo de 3 ml de medio LB con antibiótico de selección que incubamos durante 12 h a 37 grados centígrados, posteriormente usamos el protocolo de miniprep de Wizard en las mismas condiciones que indica el boletín técnico de la casa comercial.

-Para preparaciones grandes partimos de 500 μ l a 1 ml de cultivo de miniprep o glicerol de la bacteria previamente transformada con el plásmido de interés en 250 ml de medio LB con antibiótico de selección y se deja crecer 12 h a 37 grados centígrados. Para la obtención del plasmido seguimos el protocolo de maxiprep de la casa comercial Qiagen.

4.4.4. Obtención de proteínas sobreexpresadas.

Las bacterias de la cepa BL21 transformadas con el vector de expresión de la proteína de interés se crecen a 37 grados centígrados en 3 ml de medio 2XYT (con antibiótico de selección) hasta que el cultivo alcanza una D.O de 0.6 a 600 nm, momento en el que se amplifica el cultivo pasando a 50 ml del mismo medio y dejándolo a 37 grados centígrados hasta que vuelve a alcanzar la D.O. antes indicada. Llegado a este punto se trata el cultivo con IPTG en las concentraciones óptimas para cada vector de expresión y se incuba el cultivo a 37 grados centígrados el tiempo necesario para la obtención de las cantidades de proteína deseadas (entre 1-4 h). Pasado este tiempo, las células se separan del medio por centrifugación y se resuspenden en PBS pH 7.4 con inhibidores de proteasas y fosfatasa y se lisan (congelación-descongelación en nitrógeno líquido o

hervido, dependiendo de la proteína que estemos sobreexpresando) para obtener la proteína deseada tras centrifugar la muestra y recuperar el sobrenadante.

4.4.5. Purificación de proteínas fusionadas a GST.

El cultivo y sobreexpresión de proteínas fusionadas a GST en bacteria se realiza de manera similar a lo indicado en el punto anterior y para proceder a la purificación de la proteína de fusión del extracto total se utiliza la afinidad de la proteína de fusión para interaccionar con gluatión unido a sefarosa (Pharmacia), en las condiciones indicadas por la casa comercial.

4.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EUCARIOTAS.

4.5.1.Extracción de proteínas nucleares.

A lo largo del desarrollo de esta memoria, la mayoría de los experimentos que han necesitado de la obtención de proteínas procedentes de líneas celulares se han referido siempre a extractos nucleares (Nancy C. Andrews y Douglas V. Faller .1991). Para un número alrededor de 5×10^6 células, se resuspenden en 400 μ l de solución A (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM de Cl_2Ca , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT y 0.2 mM PMSF) y se mantienen en hielo durante 10 min. Centrifugamos a 14000 rpm 30 segundos y el precipitado se resuspende en 50 μ l de solución C (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% de glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM Cl_2Mg , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) y se incuba durante 20 min en hielo. Se centrifuga a 14000 rpm durante 2 min y se recoge el sobrenadante donde están las proteínas de la fracción nuclear.

4.5.2. Western blot.

Todos los ensayos de western incluidos a lo largo de la memoria fueron realizados en SDS-PAGE, con un porcentaje del 10% (gel de resolución: 8.02 ml agua, 5 ml de Tris 1,5M pH 8.8, 6.67 ml de a acrilamida/bisacrilamida 37.5:1 2.6% C de Biorad , 200 μ l sds 10%, 150 μ l APS 10%, 15 μ l TEMED; gel de compactación al 4.5 %: 5.79 ml agua, 2.5 ml TRIS 0.5M pH 6.8, 1.5 ml acrilamida:bisacrilamida, 200 μ l de SDS al 10%, 150 μ l de APS 10% y 15 μ l TEMED), partiendo de 50 μ g de extractos nucleares resuspendidos en solución de carga 2X (2.5 ml TRIS 0.5 M pH 6.8, 2 ml SDS al 20%, 2 ml de glicerol, 1 mg BPB, 0,31 gramos de DTT y agua hasta 10 ml) y calentados a 100 grados centígrados durante 5 min. La electroforesis se realiza a 150 voltios durante 45 min, utilizando como solución para realizar la electroforesis: TRIS 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%, todo con pH 8.3. Para la transferencia se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Schleicher&Schuell) en condiciones semilíquidas en solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1 %, metanol 20% y agua hasta un litro). La transferencia se realiza durante un tiempo aproximado de 1 h, dependiendo de la proteína que nos interese, y con un amperaje de 1 miliamperio por centímetro cuadrado de la membrana. Tras el bloqueo de la membrana con un 5% de leche desnatada en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6 y agua hasta un litro, con tween 20 al 10 %), misma solución que se utiliza para diluir el anticuerpo primario con el que se incubaba la membrana durante 12 h a 4 grados centígrados, se lava abundantemente con TBS-T y se hibrida con el anticuerpo secundario diluido en

solución de bloqueo, se incubó la membrana durante 1 h a R.T. se lava abundantemente con TBS-T y se revela con sistema ECL+(Amersham).

Los anticuerpos utilizados en los diferentes western se indican en el punto 4.8 de M.M.

4.5.3. Ensayos de retardo en gel.

Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de retardo como sonda o como competidores se indican en el apartado 4.9 de M.M.

El marcaje de los oligonucleótidos se realizó partiendo de 100 ng de cada una de las hebras complementarias, 25 uCi (gamma -p32) dATP (Amersham) y enzima T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), incubando esta mezcla durante 1 h a 37 grados centígrados. Posteriormente se purifican las hebras marcadas y se anillan calentando a 100 grados centígrados durante 2 min, se dejan enfriar lentamente y se cuantifica la actividad en un contador de centelleo, para poder diluir la sonda hasta los niveles de uso.

Para la reacción partimos de 10 a 15 ug de extracto de proteína que se mantiene 5 min a R.T. en la solución de la reacción (10 mM de HEPES pH 7.9, 10% de glicerol, 1 mM de EDTA, 8 mM Cl₂Mg, 10 mM DTT y una cantidad variable de dI/dC entre 0.2 ug para sonda DRE y 0.8 para sonda CRE), pasados los 5 min se añade la sonda (100000 cpm) y se incubó a R.T. durante 20 min y se realiza la electroforesis en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 6% (8 ml de acrilamida/bisacrilamida 30% 19:1, 5 ml de TBE 10X (1 M de Tris/HCl pH 8.0), 1 M de ácido bórico y 25 mM EDTA). La duración de la electroforesis es de 3 h a 150 voltios, pasado este tiempo se seca el gel y se expone en película X-OMAT (Kodak) para obtener el resultado final.

4.5.4. Coimmunoprecipitación en cerebro de rata.

Los extractos nucleares de cerebro e hígado de rata se prepararon según describe Gorski y cols., 1986. Los núcleos fueron lisados en agua con 6 ciclos de congelación-descongelación y centrifugados a 15000 g durante 15 min. El sobrenadante fue diluido 1:1 en solución 2X de inmunoprecipitación (20 mM HEPES pH 7.9, 16 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 20% glicerol, suplementado con inhibidor de fosfatasa (Calbiochem). Para las coimmunoprecipitaciones en presencia de calcio, se eliminó el EGTA y se incluyó una concentración de 2 mM de CaCl₂. Los extractos fueron lavados con una incubación de 1 h con sefarosa- proteína A (Pharmacia) e incubado con anti-DREAM (FI-214, Santa Cruz) o anti-CREB (9192, New England Biolabs) durante 12 h para inmunoprecipitar CREB y DREAM respectivamente, los inmunocomplejos se capturaron con proteína A-sefarosa en una incubación de 1 h y lavados 4 veces con la solución de inmunoprecipitación y se chequearon en western- blot como se indica en el punto 4.5.2.

4.5.5. Interacción de proteínas in vitro (pull down).

Las proteínas CREB y DREAM marcadas con azufre-35 fueron transcritas y traducidas utilizando el sistema T7-TNT (Promega). Dos ug de proteína recombinante CBP-KIX-GST purificada (apartado 4.4.5 de M.M) se incubaron con las proteínas CREB

marcadas con azufre-35, en presencia o ausencia de DREAM recombinante en solución de interacción (20 mM HEPES, pH 7.9, 10% glicerol, 150 mM KCL, 2 mM de MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.2 % NP40, 0.5% Blotto (Biorad) e inhibidores de proteasas (Calbiochem)). Tras 5 lavados con la misma solución, las proteínas unidas se revelaron en un western blot como se indica en el punto 4.5.2.

4.5.6. South-western.

Partiendo de 50 ug de extractos nucleares realizamos un western-blot como se indica en el apartado 4.5.2, hasta tener la muestra transferida a la membrana de nitrocelulosa, que renaturalizamos durante 5 min a R.T con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7.4 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄), y bloqueamos con un 3% de leche desnatada en solución TNED (40 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) durante 1 h. El marcaje de la sonda se realizó por el protocolo de relleno utilizando fosforo 32 α-dCTP y como enzima para realizar el marcaje el fragmento Klenow (Gibco BRL). La hibridación con la sonda se realiza en solución TNED con 1 millón de cpm de la sonda (indicada en el apartado de oligonucleótidos de M.M) marcada con 32-p, 10 ug de ADN de esperma de salmón, durante 2 h a R.T. Posteriormente se lava la membrana 3 veces durante 10 min con 20 ml de la misma solución de hibridación y finalmente se realiza una autorradiografía en película X-OMAT (Kodak).

4.6. INMUNOFLUORESCENCIA.

Partiendo de cubres con unas 50000 células, se lavan dos veces con PBS+ 5 mM de Cl₂Mg y se fijan las células con la misma solución pero suplementada con 3.7% de paraformaldehído, durante 10 min a R.T. que posteriormente se lava con PBS, glicina 0.1 M y Cl₂Mg 5 mM durante 15 min a R.T, se retira y se añade PBS, 0.5% Triton x-100 y Cl₂Mg durante 15 min a R.T. Se lava 3 veces 5 min con PBS + Cl₂Mg 5 mM, y una vez con PBS+ Cl₂Mg 5mM + Tween 20 0.05% durante 5 min. Después de todo este proceso se hibridan las células con el anticuerpo primario diluido 1/400 en PBS, tween 20 0.05 %, Cl₂Mg 5 mM y BSA 1% durante 12 h a 4 grados centígrados.

Se retira el anticuerpo primario y se dan 3 lavados de 5 min con PBS+ Cl₂Mg 5 mM + Tween 20 0.05%.

Se hibrida con el anticuerpo secundario (acoplado a señal de fluorescencia) diluido 1/400 en PBS, tween 20 0.05 %, Cl₂Mg 5 mM, durante 1 h a R.T.

Se lava 3 veces con en PBS, Cl₂Mg 5 mM, durante 5 min y posteriormente se fija el cubre al porta y se observa a microscopía de fluorescencia.

4.7. ENSAYOS CON REPORTEROS CAT.

Después de la transfección y los tratamientos adecuados en cada ensayo, se recogen las células en Tris 0.25 M pH 7.4 y se lisan con 4 ciclos de congelación-descongelación, posteriormente se valora la cantidad de proteína por el método de Bradford y se realiza el ensayo de acetilación con 100 ug de proteína de cada muestra, 0.1 uCi de 14C-cloroanfenicol(Amersham) y acetil CoA 4 mM (SIGMA), durante 2 h a 37 grados centígrados, y el resultado de la reacción se separa en una cromatografía sobre silicagel (MERCK) por capilaridad en solución de cloroformo con un 5% de metanol. El resultado final se escanea e integra por ordenador.

4.8. ANTICUERPOS.

Para la detección de las isoformas de CREM en western blot hemos utilizado el anticuerpo policlonal de la casa comercial Santa Cruz, de la que también obtuvimos los anticuerpos policlonales de CREB (X-12) y DREAM (FL-214), utilizados en las coimmunoprecipitaciones.

El anticuerpo monoclonal de DREAM (1b1) fue purificado en nuestro laboratorio.

En los experimentos de inmunofluorescencia para microscopia confocal utilizamos el anticuerpo monoclonal anti-myc de la casa comercial Invitrogen.

4.9. OLIGONUCLEÓTIDOS.

Para los ensayos de retardo, los oligonucleótidos utilizados tras su anillamiento fueron:

DREdyn	5'GAAGCCGGAGTCAAGGAGGCCCTG 3' 3'CT T CGGCCTCAGT TCCTCCGGGGAC 5'	Ensayo de retardo
DREc-fos	5'CTGCAGCGAGCAACTGAGAATCCAAGAC3' 3'GACGTCGCTCGTTGACTCTTAGGTTCTG 5'	Ensayo de retardo
DREc-jun	5'GATCCTGGCAAACAACACTGAGGAAAAAG 3' 3'CTAGGACCGTTTGTGACTCCTTTTTTC 5'	Ensayo de retardo
DREicer	5'GATCCGATGAGGAAACTGAACTTGCCG3' 3'CTAGGCTACTCCTTTGACTTGAACGGC5'	Ensayo de retardo
CREsom	5'CTTGGCTGACGTCAGAGA3' 3'GAACCGACTGCAGTCTCT5'	Ensayo de retardo

Para los ensayos de south-western, utilizamos como sonda los siguientes oligonucleótidos:

DREFILL1	5'GAAGCCGGAGTCAAGGAGGCCCTG3' 3'CTTCGGCCTCAGTTCCTCCGGGGA5'	South-western
DREFILL2	5'CAGGGGCCTCCTTGACTCCGGCTTC3' 3'GTCCCCGGAGGAACTGAGGCCGAAG5'	South-western

5. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar funcional y estructuralmente los dominios de la proteína DREAM, implicados en su regulación por calcio y AMPc. Para ello hemos centrado nuestro trabajo en los siguientes puntos específicos:

1.- Caracterización de la interacción entre DREAM y el sitio DRE. Estudio de la secuencia DRE y localización del posible dominio de unión al ADN en DREAM.

2.- Estudio de la regulación por calcio de la actividad transcripcional de DREAM, caracterización funcional de los dominios de unión a calcio del tipo EF-hand y efectos transcripcionales de los mutantes en dicho dominios.

3.- Regulación por AMPc de la actividad transcripcional de DREAM. Determinación del mecanismo molecular que controla la sensibilidad de DREAM a la estimulación de la vía de AMPc y PKA en la regulación de la transcripción DRE-dependiente.

4.- Efecto de DREAM sobre la actividad transcripcional de otros elementos reguladores distintos al DRE.

En este apartado nos centraremos en el posible efecto regulador de DREAM sobre la transcripción controlada por el sitio CRE.

5.- Identificación de posibles promotores diana de la regulación transcripcional por DREAM.

6. RESULTADOS.

6.1. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE DREAM Y EL SITIO DRE.

La secuencia DRE se identificó en el curso de estudios en nuestro laboratorio sobre los mecanismos de control de la expresión del promotor de prodinorfina humana (Carrión y cols., 1998).

El análisis de delección del promotor del gen de prodinorfina permitió definir un elemento regulador localizado en la región 5' no traducida del primer exón, que parecía ser crítica para la expresión basal y dependiente de PKA de este gen en líneas celulares de neuroblastomas humanos (Carrión y cols., 1998).

Además se observó que la función del elemento DRE es dependiente de posición, independiente de orientación, reprime la transcripción incluso cuando se inserta en promotores heterólogos y sólo funciona como elemento represor cuando se localiza por detrás de la caja TATA (Carrión y cols., 1998).

6.1.a Análisis mutacional del DRE del promotor de dinorfina.

Para establecer los residuos clave de la secuencia DRE y poder definir un consenso se realizaron distintas sustituciones en el DRE de prodinorfina humana (hDynDRE). En primer lugar, se diseñó una serie de mutantes con dos nucleótidos mutados a adenosinas y se analizó la capacidad de estos mutantes de competir la banda de retardación obtenida con la sonda hDynDRE y extractos nucleares de la línea celular de neuroblastoma humano NB69. Como resultado se propuso un core central formado por la secuencia GTCA (Carrión y cols., 1998). Además estos estudios señalaban la importancia del residuo G en el core del DRE.

Para analizar más en detalle la secuencia DRE consenso, utilizamos proteína DREAM recombinante en ensayos de retardo utilizando como sonda tanto los mutantes anteriores (Carrión y cols., 1998) como nuevos oligonucleótidos mutados, y comparamos la intensidad de las diferentes bandas de retardo que se obtenían con los distintos hDynDRE (Tabla 7).

Oligonucleótido	Secuencia	Afinidad
hDynDRE	5'-CCGGAGTCAAGGAGGCC-3'	100%
Mut1 hDynDRE	5'-CCGGATCAAGGAGGCC-3'	34%
Mut2 hDynDRE	5'-CCGGAGACAAGGAGGCC-3'	27%
Mut3 hDynDRE	5'-CCGGAGTGAAGGAGGCC-3'	36%
Mut4 hDynDRE	5'-CCGGAGTCCAGGAGGCC-3'	28%
Mut5 hDynDRE	5'-CCGGAGTCTAGGAGGCC-3'	14%
Mut6 hDynDRE	5'-CCGGATAAAGGAGGCC-3'	16%
Mut7 hDynDRE	5'-CCGGAGCTAAGGAGGCC-3'	15%
Mut8 hDynDRE	5'-CCGGATGCAAGGAGGCC-3'	10%
ratDynDRE	5'-CTAGCGTCAGGGCTCCT-3'	130%

Tabla 7. Capacidad relativa de los distintos oligonucleótidos DRE para generar banda de retardo con DREAM recombinante.

Las mutaciones simples dentro del core GTCA, mutantes hDynDRE 1-5, perdían en gran medida la unión de la proteína DREAM recombinante, como se predecía en resultados anteriores (Carión y cols.,1998). La pérdida de interacción más importante (más del 85%) se daba en el mutante 5 con una sustitución de A a T mientras que la sustitución de A a C (mutante 4) todavía mantenía una retención de banda relativa al oligo salvaje del 28%. Las mutaciones dobles dentro del core GTCA (mutantes del 6 al 8) presentaban una muy pobre capacidad para unir DREAM.

Comparando la sonda DRE de prodinorfina humana con la correspondiente en el gen de rata, aparecen numerosas diferencias fuera del core GTCA, pero en cambio es esta última la que tiene mayor afinidad por DREAM, lo que confirma que la flexibilidad de la secuencia DRE en las regiones flanqueantes, puede ser muy importante como previamente se sugería (Carión y cols.,1998).

Para confirmar que las mutaciones estudiadas suponían una merma *in vivo* en cuanto a la capacidad transrepositora de DREAM, realizamos experimentos de transfección con el promotor de prodinorfina (plásmido reportero pHD1CAT) o un promotor heterólogo (construcción pTKDRECAT), junto con el vector de expresión de DREAM. La cotransfección con DREAM reprimía significativamente la expresión basal de ambas construcciones en células HEK293 (Fig 38).

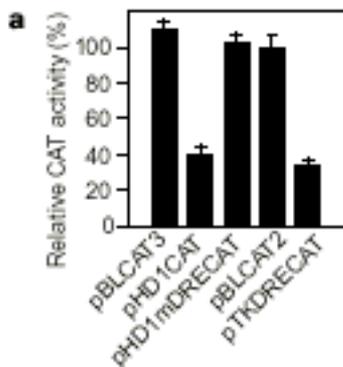


Fig (38). Represión por DREAM de los reporteros pHD1CAT y pTKDRECAT que contienen un sitio DRE. Transfección transitoria de estos reporteros con DREAM en células HEK293. También se muestra como DREAM no es capaz de reprimir la construcción reportera pHD1mDRECAT. pBLCAT3 y pBLCAT2 son plásmidos reporteros vacíos. Cada barra representa la relación entre la actividad CAT de cada construcción cotransfectada con DREAM y la que se genera por la cotransfección con pcDNA3.

La misma cotransfección con DREAM no pudo reprimir la transcripción basal de los reporteros vacíos pBLCAT3 y pBLCAT2 (Fig 38). Además DREAM no pudo reprimir la transcripción del plásmido reportero pHD1mDRECAT en el que el sitio DRE está mutado, con lo que no puede unirse DREAM.

Estos resultados indican que DREAM funciona como un represor transcripcional a través de la unión al sitio DRE.

6.1.b. Ensayos de identificación del dominio de unión al ADN en DREAM.

Una vez caracterizado el sitio DRE a través de ensayos de retardo, mutación de nucleótidos clave de la secuencia DRE y experimentos de transfección, y conociendo la dinámica de la unión de DREAM a dicha secuencia, nos planteamos tratar de identificar los aminoácidos en DREAM que pudieran estar implicados en la interacción con el DRE.

Para ello, analizando la secuencia de aminoácidos de DREAM, y en ausencia de motivos estructurales claramente responsables de la unión de DREAM al ADN.

definimos dominios en DREAM ricos en aminoácidos cargados positivamente. De esta manera identificamos dos regiones a las que denominamos DBD1 y 2. La primera está localizada entre los aminoácidos lisina 116 y lisina 130, por delante de la primera EF-hand:

116 **Lys** Phe Thr **Lys Lys** Glu Leu **Gln** Ser Leu Tyr **Arg** Gly Phe **Lys** 130

La segunda región se localiza entre los aminoácidos 150 y 165, por delante de la segunda EF-hand:

150 Phe Pro Arg Gln Pro Pro Pro Met His Tre Ser Phe 164

Los aminoácidos cargados positivamente se indican en negrita.

Con el objetivo de eliminar estas regiones en DREAM, en el caso de DBD1 optamos por hacer una delección de zona de la proteína y para DBD2, además de hacer delección, realizamos un cambio en el marco de lectura que afectase exclusivamente a esta región, para obtener los mutantes DREAM Δ DBD1, DREAM Δ DBD2 y DREAMFS2, respectivamente.

Partiendo de la premisa de que la unión al DRE es el punto inicial del efecto represor de la proteína, mutantes que no fuesen capaces de unirse al ADN, en principio, no deberían ser tampoco capaces de ejercer un efecto represor sobre un promotor con un elemento DRE colocado en posición downstream de la caja TATA.

Para chequear esta posibilidad, las construcciones mutantes de DREAM antes comentadas, fueron cotransfectadas junto con el reportero pHD3CAT (Carrión y cols., 1998) en células HEK293.

Mientras la proteína DREAM salvaje reprimía la actividad basal de la construcción reportera pHD3CAT en un 50 %, el mutante DREAM Δ DBD1 no era capaz de reprimir dicha basal, efecto que sí se obtiene en mayor o menor medida con cualquiera de los dos mutantes para la región DBD2 (Fig 39).

Los resultados de estas transfecciones con respecto a la región DBD2 nos hicieron pensar que posiblemente, este dominio no estaría implicado en el mecanismo de unión al DRE, con lo que descartamos su utilización en posteriores ensayos para la identificación del dominio de unión al ADN.

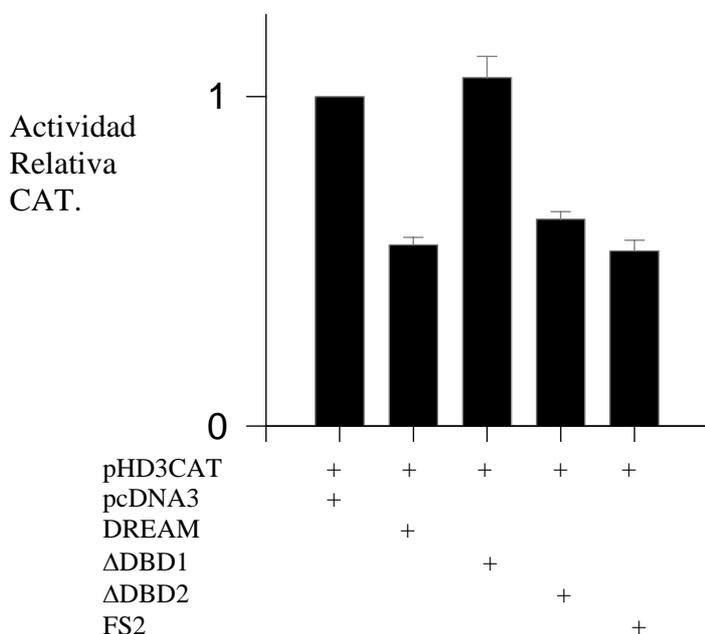


Fig (39).Cotransfección del reportero pHD3CAT, promotor mínimo inducible de prodinorfina (Carrión et al.,1998) en células HEK293, junto con los vectores de expresión de DREAM wt y los mutantes en los posibles dominios de unión al ADN. Unidades de actividad CAT referidas a la cotransfección del reportero con el vector de expresión pcDNA3 vacío. DREAM wt provoca una represión de la actividad basal del reportero cercana al 50%. Valores de represión similares se observan con los mutantes en la región DBD2 mientras que el mutante DBD1 no es capaz de reprimir dicha construcción reportera.

A la vista de estos resultados, habíamos encontrado un mutante que no era capaz de reprimir un reportero con un sitio DRE, lo que encajaba con nuestra hipótesis de que la deleción en el mutante Δ DBD1 podría haber eliminado la posibilidad de unión al sitio DRE, por lo que no obteníamos represión. Para chequear esta posibilidad, subclonamos el mutante Δ DBD en un vector de expresión en bacteria y la proteína recombinante que se obtuvo se utilizó en ensayos de retardo sobre una sonda DRE. La proteína recombinante DREAM- Δ DBD1 produjo una banda de retardación sobre la sonda DRE similar a la producida por la proteína recombinante DREAM wt (datos no mostrados), por lo tanto, la deleción de la secuencia de aminoácidos antes indicada en el mutante DREAM Δ DBD1 no bloquea la capacidad de DREAM de unirse al sitio DRE, que era lo que estábamos buscando, aunque sí afecta drásticamente a la capacidad de la proteína para reprimir la transcripción, condición que se chequeará en futuros estudios.

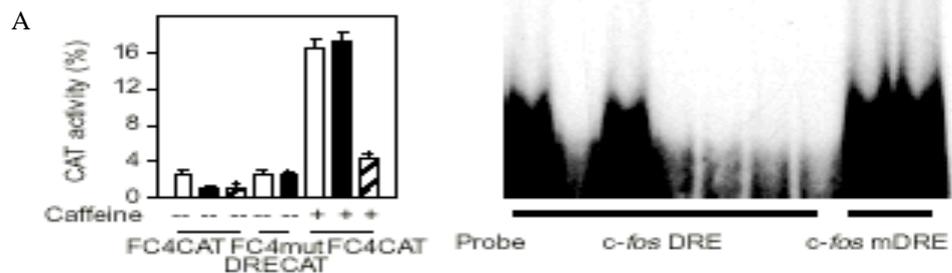
6.1.c Promotores diana de la regulación transcripcional por DREAM.

Hasta ahora hemos demostrado la capacidad de DREAM para reprimir la transcripción basal del promotor de prodinorfina y de construcciones reporteras con promotores heterólogos en los que incluimos DREs, pero llegados a este punto nos planteamos saber si DREAM podría reprimir la transcripción de otros genes activados por calcio.

El primer promotor en el que nos fijamos fue c-fos, del que se conoce su regulación por calcio (Hardingham y cols., 1997). Tras cotransfección transitoria en células HEK293, la expresión basal de FC4CAT, un reportero que contiene el promotor de c-fos, fue reprimido por DREAM (Fig 40.A).

Fig (40). (A) DREAM reprime la expresión basal del promotor de c-fos. Experimentos de transfección transitoria en células HEK293 muestran una represión por DREAM (barras negras) de la transcripción basal del reportero FC4CAT pero no del reportero FC4mDRECAT. La transactivación del reportero FC4CAT por cafeína en células HEK293 se bloquea por la expresión de 4EFmDREAM (barras rayadas) pero no por DREAM (barras negras). Las barras blancas indican la cotransfección con el vector de expresión vacío pcDNA3.

(B) Ensayo de retardo utilizando como sonda el DRE de c-fos y proteína DREAM expresada en bacteria. Las bandas de retardo específicas se compiten con DRE frío de dinorfina pero no por el DRE mutado de c-fos, AP-1, CRE, u Oct-1. Además el DRE mutado de c-fos no pudo originar ninguna banda de retardo cuando se utilizó como sonda.



El análisis de la secuencia del promotor de c-fos reveló la presencia de una secuencia DRE putativa, GNARYYRAG, en posición posterior a la caja TATA. Para determinar si esta secuencia era responsable de la represión mediada por DREAM mutamos el DRE en el reportero FC4CAT, generando la construcción FC4mDRECAT que no era reprimida por DREAM (Fig 40.B).

Realizamos ensayos de retardo utilizando extractos de bacteria o de células HEK293 sobreexpresando DREAM, con el DRE de c-fos como sonda (Fig 40.B), sólo un oligo con el DRE de dinorfina era capaz de competir la banda de retardo de DREAM sobre el

DRE de c-fos, mientras otros oligos con secuencias CRE, AP-1, Oct-1 o el DRE mutado de c-fos, no fueron capaces de desplazar dicha banda de retardo.

Estos resultados indican que DREAM reprime de manera constitutiva a c-fos, actuando sobre el sitio DRE del promotor. La activación de la transcripción del reportero c-fos por liberación de calcio intracelular fue bloqueada por 4EFmDREAM pero no por DREAM (Fig 40.A).

Pudimos localizar otra secuencia DRE en el promotor P2 del gen CREM. El promotor P2 controla expresión inducible por AMPc y calcio de la isoforma ICER, un represor transcripcional (Molina y cols., 1993).

Ensayos de retardo con proteína DREAM recombinante sobre la sonda DRE del promotor P2 de CREM (Tabla 8) y experimentos de transfección transitoria en células HEK293 cotransfectando la construcción reportera P2CAT en presencia o ausencia del vector de expresión de DREAM (Fig 41), muestran que el sitio DRE del promotor de ICER es funcional para la interacción con DREAM y esta interacción provoca la represión de la construcción reportera P2CAT en células HEK293.

Oligonucleótido	Secuencia	Afinidad relativa
hDynDRE	5'-CCGGAGTCAAGGAGGCC-3'	100%
	←	
c-fosDRE	5'-AGCGAGCAACTGAGAG-3'	157%
ICERDRE	5'-TATTTTGGACTGTGGA-3'	166%
Reverse hDynDRE	5'-CCGGAGGAACTGAGGCC-3'	97%

Tabla (8). Resumen de los resultados de los ensayos de retardo con DREAM bacteriano sobre las sondas que se indican y su afinidad relativizada con la unión del mismo DREAM bacteriano a la sonda DRE del promotor de dinorfina humana.

Obtuvimos mayor afinidad de la proteína DREAM recombinante, tanto para la secuencia DRE de c-fos como para la de ICER, que para la secuencia DRE del promotor de dinorfina (Tabla 8).

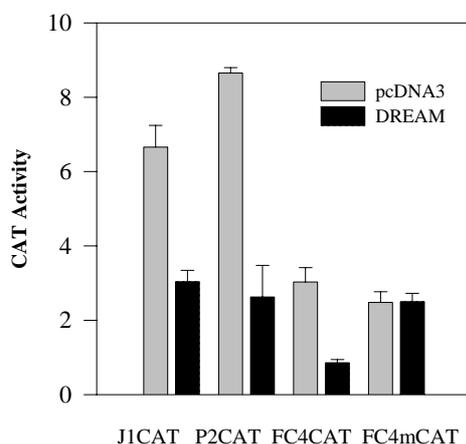


Fig (41). Transfección transitoria en células HEK293 de construcciones reporteras con los promotores de algunos genes tempranos como: c-jun (J1), icer (P2) ; acoplados al reportero CAT. En ausencia o presencia de DREAM en la cotransfección. Se muestra el efecto de DREAM sobre FC4CAT como control de represión.

DREAM no sólo era capaz de reprimir la expresión basal de promotores como c-fos o icer sino también sobre otros como c-jun que también presenta una secuencia DRE, y que a la vista de los resultados de la transfección transitoria resultó ser funcional (Fig 41).

Además de promotores de genes tempranos, hemos podido identificar secuencias DRE en otros muchos promotores de genes muy diferentes como el propio DREAM, BDNFI, II, III y IV, sinaptotagmina IV y X, calbidina, junB, NCAM, calmodulina quinasa II α , PKC-gamma, ligando de Fas, etc.

6.2. REGULACIÓN POR CALCIO DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE DREAM.

La secuencia de la proteína DREAM reveló la presencia de 4 dominios de unión a calcio conocidos como EF-hand. La unión de calcio a cada EF-hand es directa, a través de 6 residuos (X, Y, Z, -X, -Y y -Z; Fig 30) localizados en posición 1, 3, 5, 7, 9 y 12 en un lazo de 12 aa flanqueados por dos α hélices que forman un ángulo de 90 grados entre ambas y unidas por el lazo (el lazo de 12 aa y las dos α hélices constituyen el dominio EF-hand). La 2^a, 3^a y 4^a EF-hand de DREAM se ajustan perfectamente al consenso del EF-hand, mientras que la 1^a está menos conservada (esta descrito, para las proteínas con estos dominios de unión a calcio, la falta de funcionalidad de alguna de ellas). La búsqueda en la base de datos reveló una alta similitud entre DREAM y las proteínas de unión a calcio de la familia de las recoverinas, vilip1, hipocalcicina. El alineamiento del DREAM humano con estas proteínas muestra que la similitud es especialmente alta en la región que contiene las EF-hand (Fig 30).

6.2.1. Unión directa del calcio a DREAM.

Para determinar el significado funcional de las EF-hands presentes en DREAM analizamos el espectro de emisión de fluorescencia del triptófano en DREAM, en presencia o ausencia de calcio. La adición de 5 μ M de cloruro cálcico disminuye la intensidad de fluorescencia (Fig 42), indicando que DREAM se une específicamente a calcio en soluciones acuosas a concentraciones micromolares de calcio.

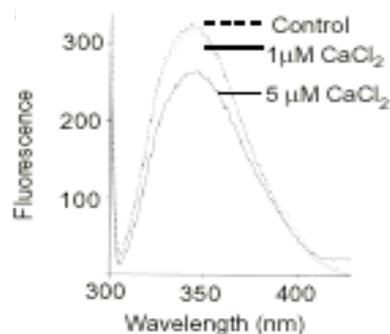


Fig (42). DREAM es una proteína de unión a calcio. Espectro de emisión de fluorescencia de 0.5 μ M de DREAM en ausencia de calcio (línea discontinua) y en presencia de 1 μ M o 5 μ M de calcio. (Fluorescencia medida en unidades arbitrarias).

La unión del calcio a las EF-hand de DREAM, provoca un cambio conformacional en cada uno de los dominios de unión a calcio que se puede transmitir al resto de la proteína. Este cambio conformacional provoca que los residuos de triptófano, en este caso, queden menos expuestos y por lo tanto el espectro de emisión de fluorescencia de este aminoácido a una longitud de onda de 350 nm cambia con respecto a la situación en ausencia de calcio.

6.2.2. Mutantes en las EF-hand de DREAM.

6.2.2.a. Efecto de la mutación de una EF-hand sobre la unión de DREAM al ADN.

Una vez que disponíamos de la evidencia experimental de la interacción directa del calcio a DREAM, nos planteamos conocer como la mutación de una sólo EF-hand podría afectar a la funcionalidad de la proteína y su unión al DRE (Fig 43).

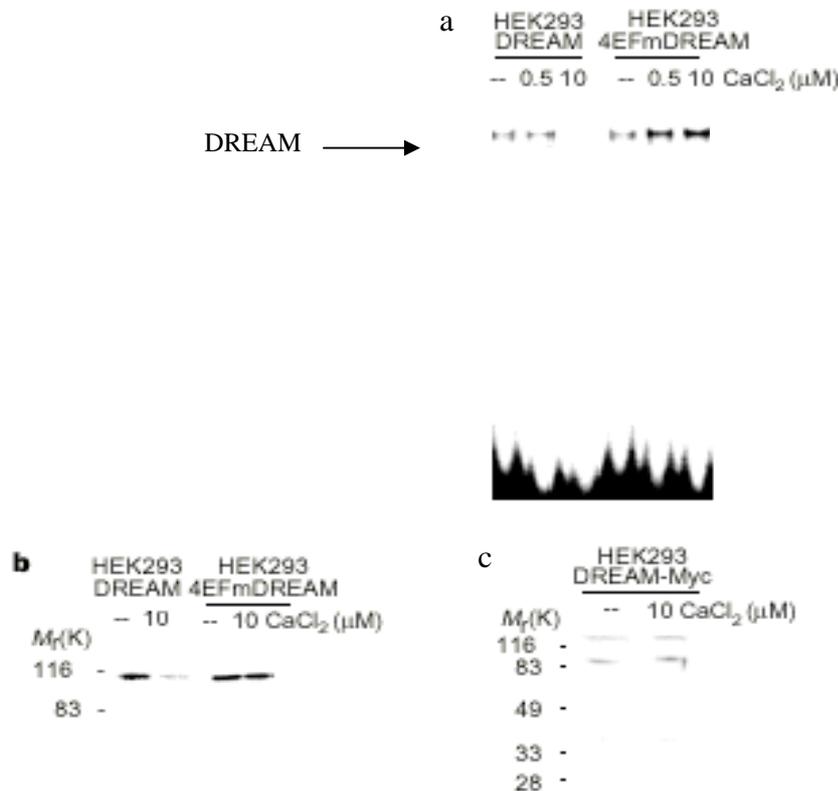


Fig (43). Mutante 4EFmDREAM.(a) Ensayo de retardo que muestra el efecto clave del calcio sobre la banda de ratardación sobre la sonda DRE. El bloqueo por calcio de la banda de retardo obtenida con proteína DREAM salvaje no se da en el caso del mutante. (b) Southwestern de extractos nucleares de células HEK293 tras sobreexpresión estable de DREAM o de 4EFmutDREAM. Efecto diferencial del calcio sobre la banda de 110 KDa de DREAM y del mutante 4EFmutDREAM.. (c) Western de extractos nucleares de células HEK293 DREAM-Myc en ausencia y presencia de calcio.

Utilizando extractos nucleares de células HEK293 sobreexpresando DREAM o 4EFmutDREAM, en el que se han mutado los residuos en posiciones X e Y de la cuarta mano de unión a calcio, a alaninas, eliminando así la capacidad de estas dos posiciones de aportar los enlaces químicos de oxígeno necesarios para quelar al ion calcio, realizamos un ensayo de retardo utilizando como sonda el DRE de prodinorfina humana, en el que pudimos observar que en presencia de concentraciones de calcio de 10 micromolar conseguimos eliminar la unión de DREAM al DRE, lo que apoyaría que la unión del calcio a los EF-hand provoca un cambio conformacional que tiene como resultado la pérdida de la capacidad de unión al ADN. Por otro lado y en el mismo experimento, observamos como el mutante en la cuarta EF-hand se une al DRE con la

misma afinidad que el DREAM salvaje pero es insensible a la presencia de calcio y no pierde su interacción con el DRE (Fig 43 a).

Intentando profundizar más sobre el efecto del calcio en la unión al DRE y su bloqueo por el mutante en la cuarta EF-hand, planteamos experimentos de south-western usando los mismo extractos nucleares de HEK293 sobreexpresando DREAM salvaje o el mutante 4EFmDREAM. Los resultados muestran, en la misma dirección que el ensayo de retardo, que tanto DREAM como 4EFmDREAM son capaces de formar tetrámero y unirse al DRE, pero mientras dicha unión se elimina en presencia de 10 micromolar de calcio sobre DREAM salvaje, el mutante se mantiene unido a la sonda, demostrando una vez más la insensibilidad del mutante a la presencia de calcio (Fig 43 b).

El análisis por western de los extractos nucleares de células HEK293-DREAM-Myc en ausencia o presencia de calcio resultó en un patrón idéntico de bandas con el monómero, dímero y tetrámero (Fig 43.c), lo que demuestra que la unión del calcio a la EF-hand induce un cambio conformacional en DREAM que impide su unión al DRE pero que no afecta a la estabilidad del tetrámero de DREAM (Carrión y cols., 1999).

Para determinar el efecto del calcio sobre la represión transcripcional mediada por DREAM, comparamos el efecto transcripcional de DREAM y del 4EFmDREAM a la liberación de calcio desde depósitos intracelulares tras el tratamiento con cafeína. La cotransfección con DREAM o con el mutante 4EFmDREAM provocó niveles de represión similares sobre la expresión basal del reportero en condiciones basales (Fig 44), de acuerdo con que dicho mutante conserva su capacidad para unirse al DRE (Fig 43.a y b)

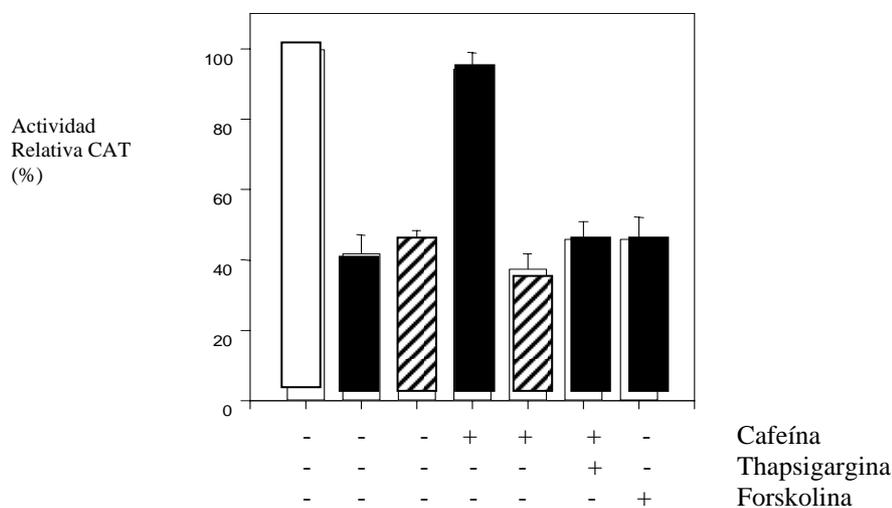


Fig (44). Represión por DREAM (barras negras) o del mutante 4EFmDREAM (barras rayadas) sobre la transcripción basal del reportero pTKDRECAT tras cotransfección transitoria en células HEK293. La actividad represora de DREAM es bloqueada por estimulación con calcio (cafeína 10 mM), mientras que el mismo estímulo no bloquea la represión ejercida por 4EFmDREAM. El tratamiento con Fsk (25uM) no bloquea la represión mediada por DREAM del reportero pTKDRECAT mientras que el tratamiento con thapsigargina (1uM) completamente bloquea la desrepresión de DREAM por cafeína. Las barras representan la cantidad de actividad CAT producida por el reportero pTKDRECAT transfectado junto con DREAM o 4EFmDREAM, comparado con la actividad del reportero transfectado junto a pcDNA3 (barra blanca).

Mientras el incremento de calcio intracelular elimina completamente el efecto represor de DREAM (Fig 44), la cafeína no modifica la represión ejercida por 4EFmDREAM ya que este mutante es insensible a los aumentos de calcio.

La desrepresión de DREAM por cafeína está relacionada con la liberación de calcio: bloqueada por thapsigargina y rianodina, drogas que bloquean la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares (Fig 44). La desrepresión por cafeína no está relacionada con inhibición de fosfodiesterasas y posterior incremento en los niveles de AMPc y activación de PKA, ya que la Fsk no afecta a la represión del reportero pTKDRECAT por DREAM en células HEK293 (Fig 44).

6.2.2.b. Efectos de las mutaciones simples, dobles y triples en las EF-hand de DREAM.

Utilizando mutagénesis dirigida, preparamos proteínas DREAM con mutaciones en 1, 2 ó 3 EF-hands a las que llamamos 2, 3, 4, 2-3, 2-4, 3-4 y 2-3-4EFmutDREAM en las que los residuos X e Y (Fig 30) responsables de la unión a calcio en la 2ª, 3ª y/o 4ª EF-hand fueron sustituidos por alanina.

El análisis de estos mutantes de DREAM insensible a la estimulación por calcio, mostró que mutando una sola EF-hand funcional era suficiente para evitar la desunión del DRE y la desrepresión inducidas por calcio (Ledo y cols., 2000.a) (Fig 45).

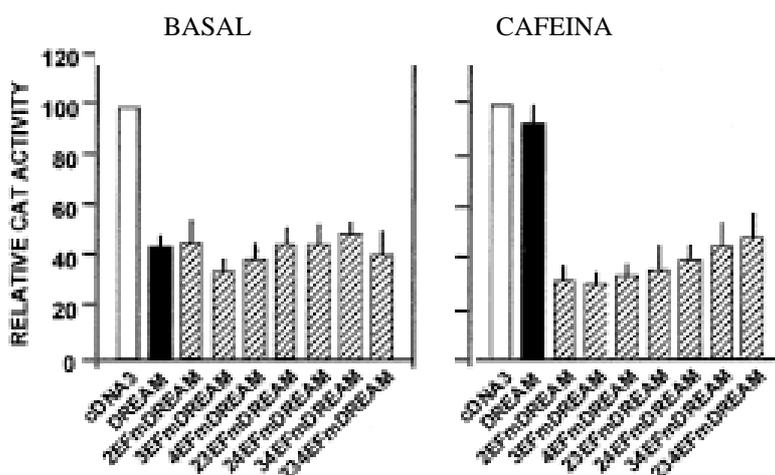


Fig (45). La desrepresión de la transcripción dependiente del sitio DRE estimulada por calcio está bloqueada en presencia de mutantes en EF-hands de DREAM. DREAM (en barra negra) y los mutantes simples, dobles y triples insensibles a calcio (EFmDREAM, barras rayadas) reprimen la actividad basal del reportero pTKDRECAT que contiene un sitio DRE, en células de carcinoma humano HEK293. La exposición a 10 mM de cafeína bloquea la represión de pTKDRECAT por DREAM (barra negra) pero no afecta a la represión por los mutantes EFmDRE (barras rayadas).

Además, el efecto de la mutación de una sola EF-hand es máximo ya que no se consigue mayor bloqueo cuando se compara con mutantes de DREAM con 2 o incluso 3 EF-hand mutadas.

Estos resultados sugieren que el cambio conformacional de la proteína DREAM que evita la unión al DRE tras la unión a calcio requiere el cambio coordinado en cada EF-hand individual (Ledo y cols.,2000.a), pero dentro de un mecanismo coordinado.

6.2.2.c. Los mutantes en las EF-hand de DREAM pueden actuar como dominantes negativos.

A continuación chequeamos si los mutantes de DREAM insensibles a calcio podrían comportarse como mutantes dominantes negativos para la estimulación por calcio en un fondo de proteína DREAM endógena (Ledo y cols., 2000.a)

Para comprobar esta hipótesis analizamos la desrepresión dependiente del sitio DRE tras la estimulación con cafeína, en presencia de diferentes combinaciones de DREAM wt y 234EFmDREAM. Los experimentos se realizaron en células HEK293, utilizando como plásmido reportero el promotor mínimo inducible del gen de prodinorfina humana que incluye el sitio DRE (pHD3CAT) (Carrión y cols.,1998). La exposición a cafeína durante 6 h inducía 6 veces la expresión basal del reportero, tanto DREAM como el mutante EFmDREAM reprimieron la expresión basal en un 50%, si bien, la estimulación con cafeína no se produce en presencia del mutante (Fig 46), de acuerdo con los resultados previos utilizando otros reporteros con sitio DRE (Carrión y cols.,1999). La cotransfección con 234EFmutDREAM y DREAM wt en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 no cambian el bloqueo de la inducción por cafeína observado con 234EFmutDREAM sólo. El efecto de la cafeína se recuperaba parcialmente en la cotransfección con 234EFmutDREAM y DREAM wt en proporciones 1:6 y el efecto del mutante era eliminado en proporciones iguales o superiores a 1:9 con DREAM wt (Fig 46).

Estos resultados soportan la hipótesis de que DREAM se une al DRE como un multímero apuntando hacia una regulación muy fina de la interacción DREAM-DRE por iones calcio. Además los mutantes de DREAM insensibles a la estimulación por calcio son mutantes dominantes negativos para las funciones de DREAM reguladas por calcio (Ledo y cols., 2000.a) (Fig 46).

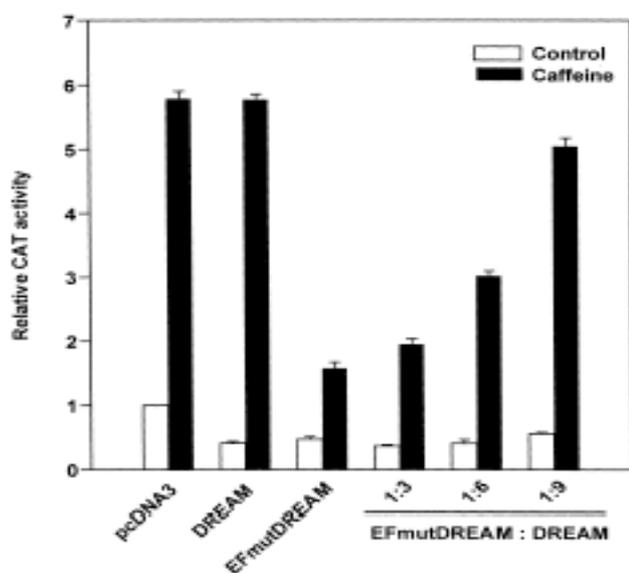


Fig (46). Los mutantes de DREAM en las EF-hand actúan como dominantes negativos para el DREAM endógeno. La transfección transitoria se realizó con dos ug del vector reproterero pHD3CAT y 8 ug de los vectores de expresión indicados en cada caso. La actividad CAT fue medida 24 H.P.T. El tratamiento con cafeína comenzo 6 h antes de recoger las células.

El descubrimiento de DREAM supone una nueva vía en el funcionamiento de los sensores de calcio que de manera directa son capaces de establecer una relación directa entre la concentración nuclear de calcio y profundos efectos en la expresión génica (Ledo y cols., 2000.a)

6.3. REGULACIÓN POR AMPc DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE DREAM

Se conocía que la regulación del promotor de prodinorfina era dependiente de los niveles intracelulares de AMPc (Cole y cols., 1995). Además trabajos en nuestro laboratorio sobre este promotor definieron una región mínima inducible por forskilina (aumenta los niveles de AMPc y activación de PKA) en la que está incluida la secuencia DRE, con lo que se podía inferir que la actividad transcripcional de unión al DRE estaría regulada por AMPc y PKA (Carrión y cols., 1998).

Además, la activación de PKA provoca una pérdida de unión de la banda de 110 kDa al sitio DRE y desrepresión del gen diana prodinorfina en células de neuroblastoma humano y además es un proceso con especificidad celular, lo que apoya la idea de que el mecanismo más elaborado que podría necesitar de proteínas o mecanismos específicos de determinados tipos celulares (Carrión y cols.1998).

En esta parte del proyecto pretendimos determinar si las proteínas CREM o CREB funcionalmente interaccionan con DREAM y están implicadas en la desrepresión del sitio DRE observada tras el tratamiento con Fsk en células de neuroblastomas humanos NB69 y SK-N-MC (Carrión y cols., 1998).

6.3.a. La sobreexpresión de α CREM desreprime la transcripción dependiente del sitio DRE.

Utilizamos como primera aproximación la cotransfección en células NB69 del promotor mínimo inducible de prodinorfina humana que contiene un único sitio DRE y no presenta sitios CRE, junto con los vectores de expresión de CREB y las distintas isoformas de CREM e ICER (Fig 47).

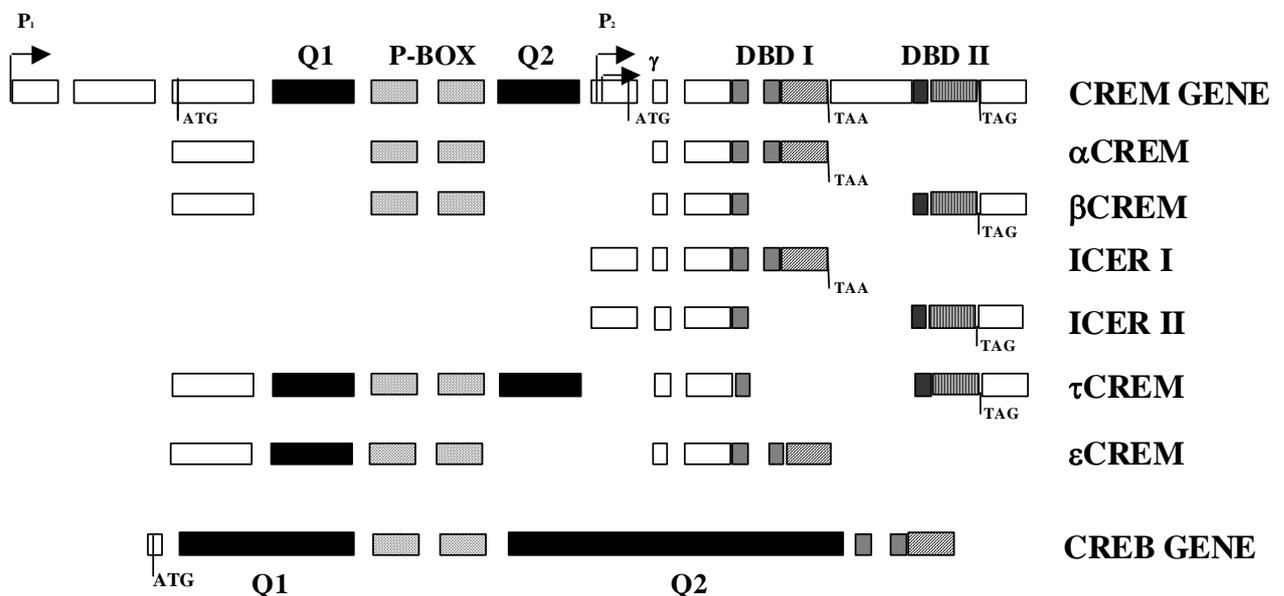


Fig (47). Esquema de la estructura de las isoformas de CREM y CREB.

La sobreexpresión de α CREM mimetizaba el efecto de Fsk e inducía la expresión del reportero pHD3CAT (Fig 48). El efecto era específico ya que ninguna otra isoforma de CREM probada o CREB fueron capaces de desreprimir el reportero (Fig 48). Se obtuvieron resultados similares en células SK-N-MC (datos no mostrados).

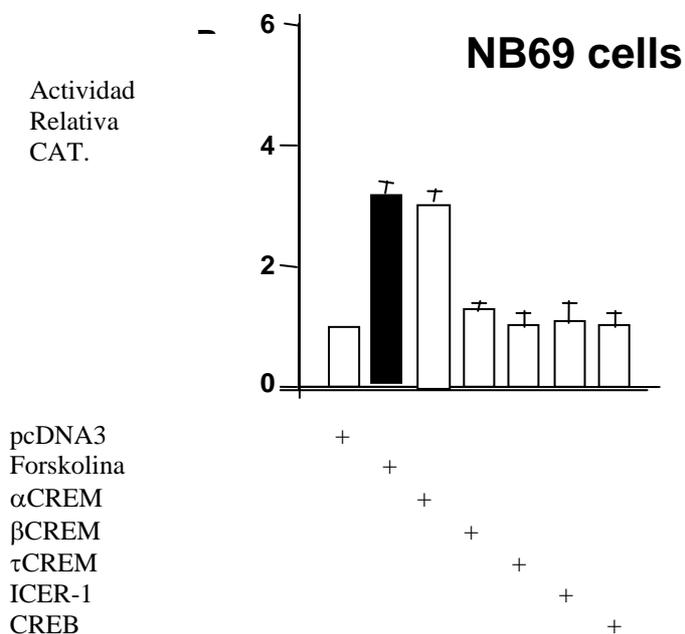


Fig (48) Transactivación por α CREM del reportero pHD3CAT en transfección transitoria en células NB69, efecto comparativo del tratamiento con Fsk (barra rayada) así como el papel de las isoformas de CREM, ICER o CREB.

Para excluir el efecto directo de una posible unión de α CREM al reportero pHD3CAT se diseñaron experimentos similares en células HEK293, que no expresan DREAM (Carrión y cols., 1999) y no presentan niveles de proteínas CREM detectables (datos no mostrados). La sobreexpresión de DREAM en células HEK293 reprime la expresión basal del reportero pHD3CAT (Carrión y cols., 1999), mientras que la sobreexpresión de las isoformas de CREM o CREB no alteran la expresión basal del mismo reportero (Fig 49).

Cuando cotransfectamos DREAM con α CREM se elimina completamente la represión por DREAM (Fig 49). ϵ CREM, una isoforma represora similar a α CREM pero en la que sí está presente el dominio Q1 rico en glutaminas (Brindle, 1993), también bloquea el efecto represor de DREAM (Fig 47 y 49).

La delección del dominio de dimerización y unión al ADN en el C-terminal de α CREM (α CREMALZ) o la sustitución por el dominio II (β CREM) no bloquearon la represión mediada por DREAM (Fig 47 y 49).

Además no observamos desrepresión del reportero tras cotransfección de DREAM con la isoforma 1 de ICER (Fig 49y datos no mostrados).

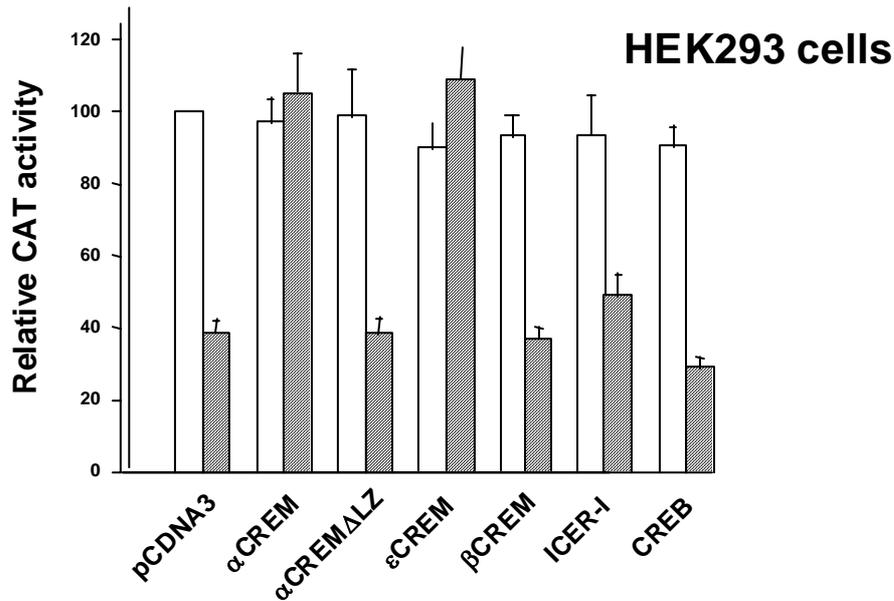


Fig (49). La represión por DREAM (barras negras) del reportero pHD3CAT en células HEK293 se elimina con la cotransfección de α CREM o ϵ CREM pero no por los otros miembros de la familia o el mutante de α CREM con la delección de la cremallera de leucinas. Las barras blancas representan las transfecciones controles en ausencia de DREAM.

6.3.b α CREM recombinante bloquea la unión de DREAM al sitio DRE.

Para confirmar la especificidad de la interacción entre DREAM y α CREM partimos de proteínas recombinantes que analizamos en ensayos de retardo, utilizando como sonda el DRE. Los resultados muestran que α CREM no se une a la sonda DRE pero la formación de los heterómeros DREAM- α CREM desplaza a DREAM del sitio DRE de manera dependiente de la cantidad de proteína (Fig 50.a y c).

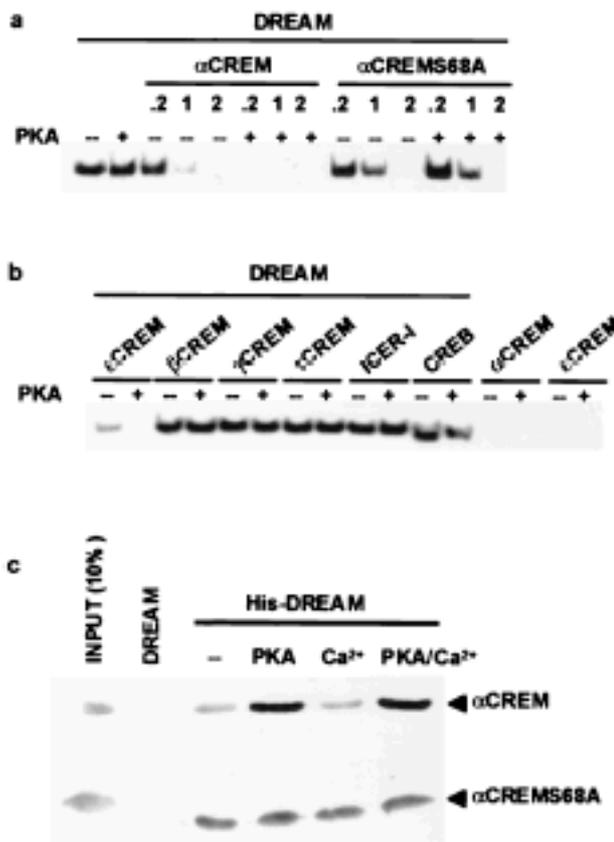


Fig (50). Análisis in vitro de la interacción DREAM- α CREM. (a) Ensayos de retardo con sonda DRE muestran la interacción de DREAM y α CREM recombinantes en diferentes proporciones y su modulación por fosforilación dependiente de PKA. (b) Ensayo de retardo mostrando que el efecto de la interacción de DREAM con α CREM no se reproduce con ninguno de los otros miembros de la familia CREB/CREM. Se utilizó la proporción 1:1 entre DREAM y los miembros de la familia de CREB/CREM. (c) Experimentos de “pull down” muestran que la interacción se potencia por fosforilación dependiente de PKA y no se ve afectada por la presencia de calcio. El efecto de la fosforilación dependiente de PKA se elimina con la utilización del mutante en la S68 de α CREM.

Proporciones de α CREM a DREAM de 0.2:1 o inferiores no modifican la banda de retardo de DREAM-DRE, pero proporciones de 1:1 y superiores eliminan por completo la banda DRE (Fig 50.a).

La fosforilación de S68 en el N-terminal de α CREM es un punto fundamental en la actividad de la proteína (Groot y cols., 1993), así que nos planteamos saber si este proceso podía afectar a la interacción con DREAM.

La fosforilación *in vitro* de α CREM por PKA purificada incrementa su capacidad para bloquear la banda de retardación DREAM-DRE (Fig 50.a). Este efecto de PKA es específico ya que no se observa cuando se utiliza el mutante de α CREM en S68 (α CREMS68A) (Fig 50.a) y es bloqueado por el inhibidor selectivo de PKA H89 (datos no mostrados). Al no haber sitios de fosforilación por PKA en DREAM (Carrión y cols., 1999), la incubación de DREAM con PKA no modifica su unión al DRE (Fig 50.a).

De acuerdo con los resultados de transfección (Fig 50.b y c), ϵ CREM también es capaz de desplazar la banda de retardación DREAM-DRE, mientras que otras isoformas de CREM o CREB no pudieron hacerlo, en ausencia o presencia de fosforilación (Fig 50.b). Se obtuvieron resultados similares con extractos nucleares de células NB69 que presentan expresión endógena de DREAM y extractos nucleares de células COS sobreexpresando las distintas isoformas de CREM.

Llegados a este punto, y puesto que el calcio es un factor importante en la regulación de DREAM, nos planteamos saber si podría afectar a la interacción con α CREM. En experimentos de “pull down” utilizando proteína DREAM recombinante fusionada con una cola de histidinas (His-DREAM), pudimos observar que la interacción con α CREM no se ve modificada por la presencia de calcio, incluso en concentraciones que bloquean la unión de DREAM al sitio DRE. (Fig 50.c). Además, estos resultados confirmaban que la interacción está potenciada en presencia de fosforilación por PKA pero que dicha interacción también se produce en ausencia de fosforilación como demuestra el mutante α CREMS68A (Fig 50.c).

Todos estos resultados sostentan una interacción específica entre DREAM y α CREM para provocar una pérdida de unión de DREAM a los sitios DRE. Además, la interacción no se ve modificada por calcio, con lo que la pérdida de unión de DREAM a los sitios DRE por calcio y α CREM son mecanismos independientes y podrían funcionar de manera sinérgica.

6.3.c. Dos dominios LCD en α CREM median la interacción con DREAM.

A la vista de todos los resultados anteriores queríamos averiguar que dominios en α CREM eran responsables de la interacción con DREAM. Basándonos en los resultados con las distintas isoformas de CREM, podíamos plantear la hipótesis de que habría dos dominios en α CREM que podrían estar implicados en la interacción, uno localizado en el dominio 1 de la cremallera de leucinas y el otro en la mitad N-terminal de α/ϵ CREM incluyendo el KID pero no el dominio Q1 (Fig 51). De la comparación directa entre los dominios I (α CREM) y II (β CREM) de la cremallera de leucina, encontramos 13 aa diferentes, de ellos, 6 se localizan en el extremo C-terminal (Fig 51).

Utilizando una proteína α CREM truncada por la inserción de un codón STOP en posición 224 (α CREM Δ 223) que elimina los últimos 6 aminoácidos del extremo C-terminal no conservados, se mantenía la capacidad para interactuar con DREAM en experimentos de transfección (Fig 52) y ensayos de retardo (Fig 53), con lo que la diferencia en los 6 últimos aa entre α CREM y β CREM no es responsable de la interacción con DREAM.

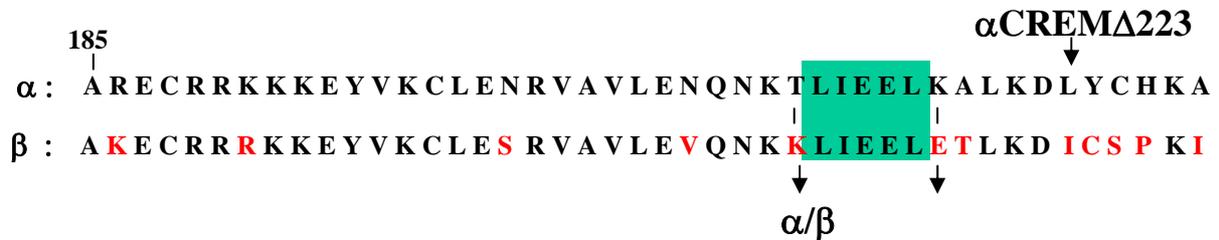


Fig (51). Alineamiento del dominio I y II del LZ de α CREM y β CREM, respectivamente, mostrando los 13 aminoácidos diferentes y las diferentes posiciones de los mutantes y la truncación de α CREM. El LCD putativo está dentro de la caja.

Otros dos aa no conservados entre ambas proteínas se localizan en posiciones 212 y 218, claramente flanqueando la secuencia LIEEL, que podrían corresponderse con un dominio cargado rico en leucianas (LCD) (Heery y cols., 1997). La sustitución de los aminoácidos flanqueantes T212 y K218 en α CREM por los correspondientes en β CREM, K y E respectivamente, originaron un mutante α CREM (α CREM β 212,218) que no era capaz de bloquear la represión de DREAM en transfección (Fig 52) y no interactúa con DREAM recombinante en ensayos de retardo (Fig 53). Por otro lado, la sustitución de los aminoácidos flanqueantes K212 y E218 de β CREM por T y K respectivamente de α CREM, genera el mutante β CREM α 212,218 que es capaz de interactuar con DREAM y bloquear su actividad represora y su banda de retardo sobre la sonda DRE (Fig 52 y 53).

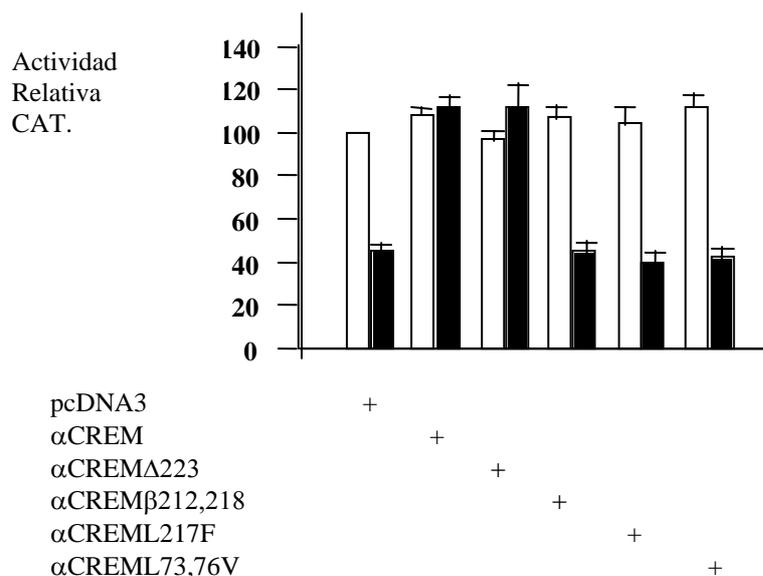


Fig (52). Dos LCDs en α CREM son necesarios para la interacción con DREAM. Transfección transitoria en células. Valores de actividad CAT tras transfección con CREM y sus mutantes en ausencia (barra

blanca) o presencia (barra negra) de DREAM, relativizada a los niveles basales de acetilación del reportero pHD3CAT cotransfectado con el vector de expresión vacío.

La mutación de un residuo putativo dentro del core del LCD para generar el mutante α CREML217F, evita la interacción con DREAM (Fig 52 y 53). Estos resultados indican que el LCD con secuencia TLIEELK en el LZ de α CREM es necesario para la interacción con DREAM e impide la unión de este al sitio DRE.

La ausencia de interacción con ICER-1, que presenta el LCD del LZ, y DREAM, indica que este dominio LCD es necesario pero no suficiente. Analizando la secuencia de aminoácidos de la mitad N-terminal de α CREM, no presentes en ICER-1, que pudieran ser necesarios para la interacción con DREAM, nos centramos en la región del KID ya que la interacción está potenciada por la fosforilación de S68 en α CREM, lo que nos permitió identificar la presencia de otro LCD putativo localizado en posición 72 de α CREM. La mutación de los dos residuos L en posiciones 73 y 76 a V originó el mutante α CREM73,76V, que no fue capaz de bloquear la represión mediada por DREAM y no mostró la capacidad de interaccionar con DREAM in vitro (Fig 52 y 53). Con estos resultados identificamos la secuencia ILNEL localizada en el KID de α CREM, como segunda región necesaria para la interacción con DREAM.

Una vez identificados los dos LCDs en α CREM necesarios para la interacción con DREAM, pudimos comprobar que estaban conservados en τ CREM-1 y CREB (Hoeffler y cols., 1990), pero ninguno de ellos bloquea la unión de DREAM al sitio DRE (Fig 51, 52 y 53 y datos no mostrados).

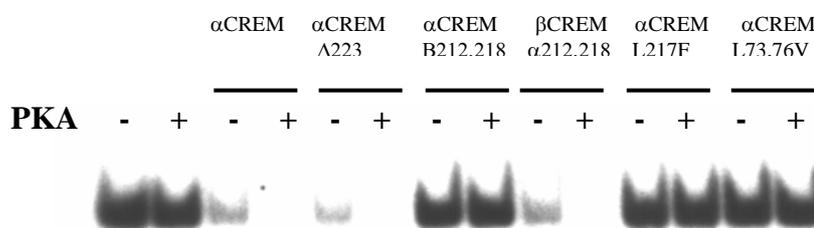


Fig (53). Utilizando cantidades equivalentes de DREAM y los distintos CREM recombinantes se realizaron ensayos de retardo sobre la sonda DRE de dinorfina para analizar como los diferentes mutantes de CREM afectan a la actividad de unión de DREAM al DRE, en presencia y ausencia de fosforilación in vitro con PKA. Aquellos mutantes que tienen alterado el LCD o los aminoácidos flanqueantes no son capaces de desplazar a DREAM del DRE.

Esto sugiere que el espaciamiento entre los dos LCDs en α CREM es crucial y la existencia del dominio Q2 rico en glutaminas de CREB o τ CREM-1 impide la interacción con DREAM, hipótesis que se ve avalada por los resultados de ϵ CREM. Esto abre la posibilidad para que isoformas de CREB que no presentasen el dominio Q2 pudieran interaccionar con DREAM y mediar en la desrepresión dependiente del sitio DRE.

El conjunto de todos estos resultados revela la presencia de un nuevo tipo de LCD (L/IL/IxxL) en proteínas de unión al CRE, que en el caso de α CREM es responsable de las dos regiones para la interacción con DREAM.

6.3.d. Dos LCDs en DREAM median la interacción con α CREM.

Una vez identificados los dominios de α CREM responsables para la interacción con DREAM, el siguiente paso lógico era identificar los dominios en DREAM responsables de la interacción con α CREM. Para ello buscamos LCDs en DREAM, ya que en la bibliografía está descrita la interacción mutua entre CBP (Proteína de Unión a CREB) y p/CIP depende de LCDs presentes en ambas proteínas (Torchia y cols., 1998).

En una primera búsqueda identificamos tres LCDs putativos en la secuencia de DREAM, en posiciones 15, 47 y 155. Partiendo de una construcción de DREAM que comienza en la M43 (DREAM43-256) eliminábamos el primer LCD en posición 15. Este DREAM truncado mantiene su actividad represora y su interacción con α CREM en experimentos de transfección (Fig 54.a) o in vitro (Fig 54.b).

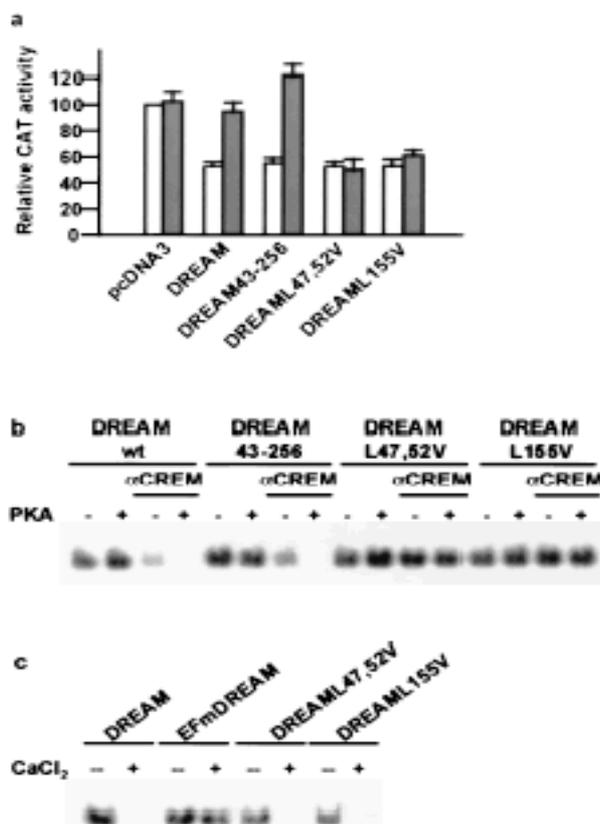


Fig (54). Dos LCDs en DREAM son necesarios para la interacción con α CREM. (a) Transfección transitoria en células HEK293 y (b) ensayos de retardo con proteínas recombinantes, muestran que los mutantes de DREAM en los LCDs, DREAM L47-52V y DREAM 155V no son capaces de interactuar con α CREM. La proteína truncada DREAM43-256 pierde un LCD putativo en posición 15 y todavía interacciona con α CREM. Valores de actividad CAT tras la transfección con DREAM salvaje o mutado, en ausencia (barras blancas) o presencia (barras sombreadas) de α CREM, relativizados a la acetilación basal del reportero pHD3CAT en cotransfección con el vector de expresión vacío pcDNA3. Se utilizaron cantidades de DREAM y α CREM equivalentes para los ensayos de retardo. (c) Ensayo de retardo con sonda DRE que muestra que la sensibilidad por calcio de DREAM no se ve afectada por la presencia de las mutaciones en los LCDs. De forma comparativa se muestra el efecto del calcio sobre el mutante dominante negativo EFmDREAM.

Una doble mutación en el LCD en posición 47, CLVKWIL, nos permitió generar el mutante DREAML47,52V que tenía capacidad para reprimir la transcripción del reportero DRE pero no interactuaba con α CREM en experimentos de transfección (Fig 54.a) o in vitro (Fig 54.b). Por otro lado la mutación del LCD de DREAM situado en posición 155, LSILL, nos permitió generar el mutante DREAML155V, que se une al sitio DRE pero no se veía afectado por la presencia de α CREM en experimentos de transfección (Fig 54.a) o in vitro (Fig 54.b).

De estos resultados cabe destacar la importancia de que los mutantes en los LCDs en DREAM, incapaces de interactuar con α CREM, aún mantienen la capacidad de unión al sitio DRE de manera calcio dependiente (Fig 54.c), al igual que en resultados anteriores se había mostrado para el DREAM salvaje (Carrión y cols., 1999).

Todos estos ensayos nos permitieron identificar dos secuencias LCDs en DREAM que son necesarias para la interacción con α CREM, reforzando la especificidad de la interacción entre ambas proteínas.

6.3.e. La desrepresión del gen de prodinorfina está mediada por la interacción DREAM- α CREM.

Los resultados descritos anteriormente soportan un mecanismo de desrepresión de los sitios DRE basado en un incremento de α CREM, específico de célula, y/o su fosforilación tras activación de PKA y la interacción con DREAM. Para saber si este mecanismo media la desrepresión in vivo del gen de prodinorfina en células de neuroblastoma humano, analizamos los cambios en las proteínas CREM tras administración de Forskolina y analizando los extractos nucleares de estas células en ensayos de western, teniendo en cuenta que ya conocíamos que el tratamiento con Fsk de células SK-N-MC provoca una robusta y sustancial pérdida de la interacción DREAM-DRE en paralelo a un aumento de la acumulación del ARNm de prodinorfina, el efecto máximo se alcanzaba a los 2 a 3 días de haber comenzado el tratamiento (Carrión y cols., 1998). El western con anticuerpo capaz de reconocer todas las isoformas de CREM e ICER, mostró un aumento de isoformas represoras de CREM en el rango de 30 kDa (incluyendo α CREM), así como en isoformas de ICER (Fig 55.a). La acumulación de proteínas represoras CREM también era máximo a los 2 a 3 días del tratamiento.

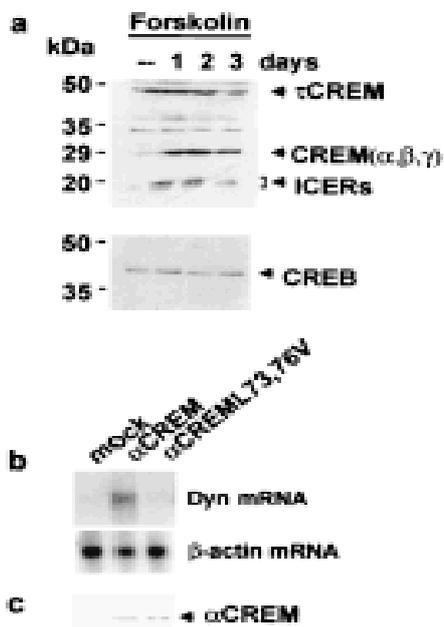


Fig (55). La interacción DREAM- α CREM dirige la expresión del gen de prodinorfina en células de neuroblastoma tras el tratamiento con Fsk. (a) Western de acumulación de proteínas represoras CREM en células SK-N-MC a diferentes tiempos del tratamiento con Fsk. También se muestran los efectos del tratamiento sobre la acumulación de las proteínas τ CREM y CREB. (b) Northern mostrando la inducción del ARNm de prodinorfina en células SK-N-MC tras la sobreexpresión de α CREM y pérdida del efecto con la sobreexpresión del mutante α CREML73,76V. Los niveles de β -actina se muestran como control de la carga en cada línea. (c) Western para mostrar niveles de sobreexpresión similares entre α CREM y el mutante α CREML73,76V en células SK-N-MC.

El efecto de la Fsk sobre la acumulación de represores CREM es específica ya que los niveles de τ CREM y CREB no se modifican a ningún tiempo de tratamiento con Fsk (Fig 55.a).

Así se podía observar una correlación temporal entre la pérdida de unión de DREAM al DRE con la inducción del gen diana prodinorfina a través de desrepresión y una acumulación sostenida (SK-N-MC) o transitoria (NB69), específica de tipo celular, de proteínas represoras CREM en células de neuroblastoma humano tras exposición a Fsk.

Estos resultados sugieren de manera contundente que la interacción específica entre DREAM y α CREM in vivo desreprime la expresión del gen de prodinorfina.

Para fortalecer esta conexión analizamos el ARNm de prodinorfina en células SK-N-MC tras sobreexpresión de α CREM o un mutante (α CREML73,76V) incapaz de interactuar con DREAM. Confirmando nuestro modelo de desrepresión, la sobreexpresión de α CREM provocó un fuerte incremento en los niveles de ARNm de prodinorfina, mientras que el mutante no modificó los niveles basales de transcripción (Fig 55.b). El Western tras la sobreexpresión de CREM mostró niveles similares de proteína α CREM salvaje y mutante (Fig 55.c).

6.3.f. El mutante DREAML47,52V actúa como dominante negativo de la desrepresión por α CREM.

Con el objetivo de averiguar si la mutación en los LCDs de DREAM pudiera comportarse como un dominante negativo para la desrepresión mediada por la interacción con α CREM, diseñamos experimentos de transfección transitoria en células HEK 293 con el reportero pHD3CAT sobre el que ya sabíamos que la cotransfección con α CREM no provoca ningún efecto y sobre el que tanto DREAM como DREAML47,52V generan una represión del reportero a niveles aproximados del 50%, sobre los que α CREM sólo es capaz de interactuar con DREAM salvaje y eliminar la represión mientras que la represión ejercida por DREAML47,52V no se ve afectada por α CREM.

Cotransfectando distintas relaciones de DREAM y DREAML47,52V, en presencia y ausencia de α CREM, conseguimos únicamente valores de desrepresión significativos con α CREM para la relación 9:1 de DREAM y DREAML47,52V respectivamente (Fig 56).

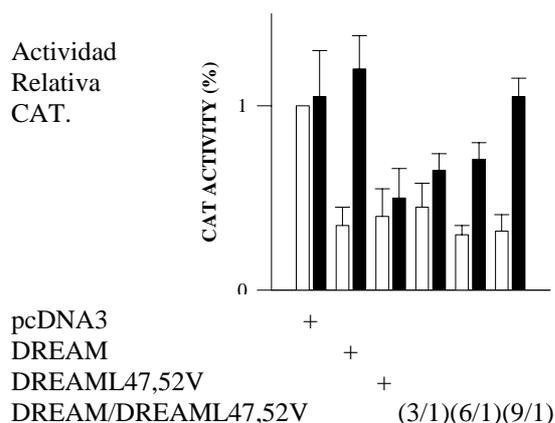


Fig (56). El mutante de DREAML47,52V se comporta como un dominante negativo para la desrepresión de la transcripción dependiente del DRE activada por α CREM. Transfección en células HEK293 del reportero pHD3CAT cotransfectado en cada caso como se indica en la figura. Las relaciones DREAM / DREAMLEU cotransfectadas se indican en la figura como 3:1, 6:1 y 9:1. En barras negras se muestra la cotransfección con α CREM.

6.3.g. Regulación de la unión de DREAM al DRE.

Una vez caracterizada la unión de DREAM al DRE y conocido el efecto de la activación de PKA y calcio sobre la banda de retardo y sus consecuencias transcripcionales (Carrión y cols., 1998), nos planteamos conocer otros estímulos que pudieran afectar a la interacción entre DREAM y el DRE, y que a su vez pudieran tener un efecto sobre la actividad transcripcional de DREAM.

Para ello realizamos experimentos de retardo con extractos nucleares de células PC12 con sonda DRE del promotor de dinorfina y experimentos de transfección transitoria con el reportero pHD3CAT (Carrión y cols., 1998), en condiciones basales o estimuladas con diferentes tratamientos, en células PC12 (Fig 57 y 58).

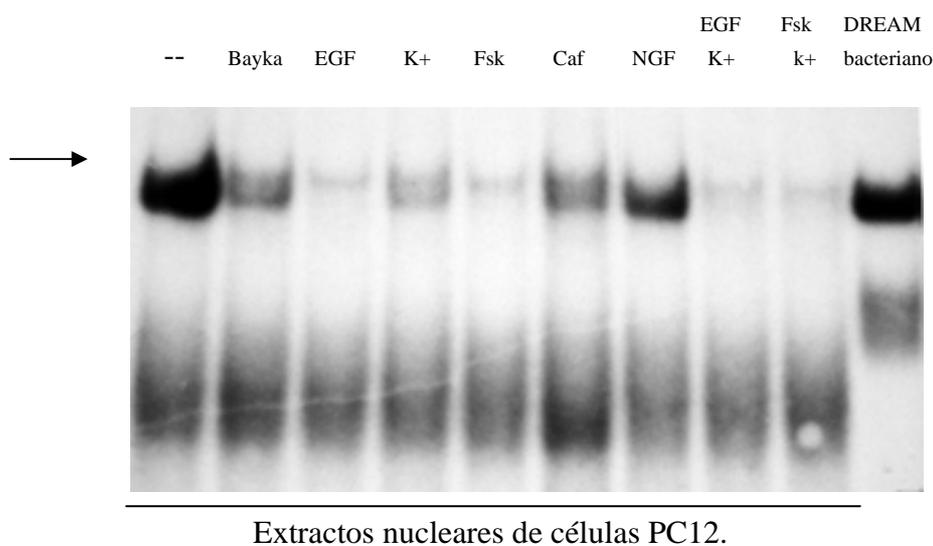


Fig (57). Ensayo de retardo con extractos nucleares de células PC12 tratadas con los tratamientos que se indican (Bayk 1uM, EGF 25ng/ml, K+ 65mM, FsK 25 uM, Cafeína 10 mM, NGF 25 ng/ml) durante 6 h antes de la preparación de los extractos. Se muestra la banda de retardo generada por la proteína DREAM bacteriana

Los tratamientos realizados sobre células PC12 representan un abanico de estímulos de los que se conocen diferentes vías de transducción de señales en estas células, y en todos los casos se produjo una disminución de la banda de retardo de DREAM sobre el DRE, generada por extractos nucleares, que coincide con la banda de retardo producida por extractos totales de bacteria sobreexpresando DREAM (Fig 57). Este resultado pone de manifiesto que la regulación de la unión de DREAM al DRE puede estar controlada por muy distintas vías de señalización.

Para confirmar que el efecto de los tratamientos sobre la unión entre DREAM y el DRE tenían una confirmación funcional a nivel de la actividad transcripcional de DREAM, se realizaron transfecciones transitorias en células PC12, transfectando el reportero pHD3CAT y analizamos la capacidad de los tratamientos para inducir la actividad CAT (Fig 58).

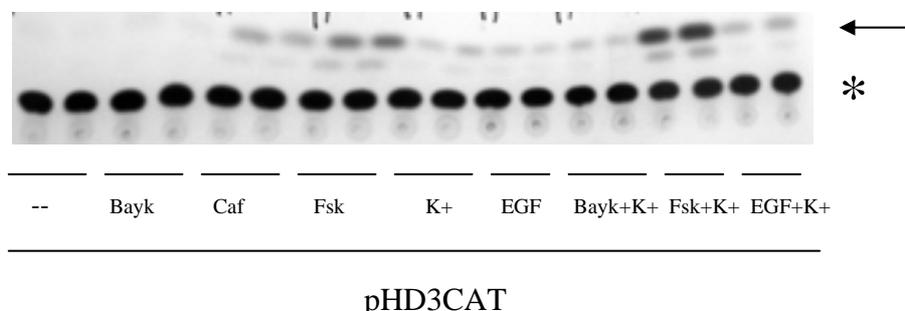


Fig (58). Transfección transitoria del reportero pHD3CAT en células PC12. Se prepararon las células para el ensayo de CAT 12 horas después de aplicar los tratamientos que se indican, en las concentraciones indicadas en el pie de la figura 38. La flecha indica las muestras acetiladas y el asterisco indica la migración de las muestras no acetiladas.

Todos los tratamientos, con excepción del Bayk (provoca una entrada de calcio en las células), provocan un incremento de la actividad CAT del reportero (Fig 58), en mayor o menor grado, confirmando que la pérdida de unión de DREAM al DRE que provocan estos estímulos, conlleva también un efecto en la actividad transcripcional y modifica los niveles de expresión de reporteros DRE (Fig 58). La integración de los resultados de acetilación nos ofrecen un valor numérico de las veces que el reportero se induce con cada uno de los tratamientos (datos no mostrados).

A su vez, estos resultados confirman que existe un amplio abanico de vías de transducción de señales que pudieran actuar de manera concreta sobre DREAM para regular su actividad transcripcional.

6.4. REGULACIÓN POR DREAM DE LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE AMPc.

La expresión génica dependiente de AMPc está controlada a nivel transcripcional por factores de transcripción bZIP, que incluyen a las proteínas CREB, CREM y ATF (Sassone-Corsi., 1995) que se unen a los sitios CRE de los genes diana como homo-heterodímeros. La dimerización está localizada en el dominio LZ, a continuación del DBD en el C-terminal de la proteína. La activación transcripcional de estos dímeros se produce tras la fosforilación en el KID de estos factores de transcripción y el reclutamiento del cofactor transcripcional CBP (Goodman, 2001). El LCD presente en el KID de α CREM, común en todas las isoformas de CREM es idéntico al que aparece en CREB, donde está localizado en una región importante para la interacción con el dominio de unión a CREB de CBP, conocido como dominio KIX. (Shih y cols., 1996).

En esta parte del proyecto nos planteamos averiguar si la interacción entre DREAM y los miembros de la familia de CREM tendría algún efecto sobre la actividad de esta familia de factores de transcripción sobre la transcripción dependiente de sitios CRE.

6.4.a. DREAM bloquea la unión de CREM o CREB al CRE.

Para chequear si la interacción DREAM- α CREM afecta a la transcripción dependiente del sitio CRE, analizamos si DREAM podría modificar la unión a los sitios CRE. Con ensayos de retardo utilizando proteínas recombinantes de la familia CREB/CREM y el propio CRE como sonda, partiendo de que no aparece banda de retardo con DREAM sobre la sonda CRE (Fig 59.A).

DREAM bloquea la aparición de la banda de retardo α CREM-CRE (Fig 59.A, línea 3). Como control, analizamos la migración de las bandas de retardo formadas por otras isoformas de CREM, ICER o CREB, que sabíamos que no eran capaces de desplazar la unión DREAM-DRE (Ledo et al., 2000.b). Inesperadamente, la presencia de DREAM también bloqueó estas bandas de retardo sobre el CRE (Fig 59.A, líneas 5 y 9) con excepción de la banda de retardo sobre el CRE generada por la proteína ICER que no presenta el extremo N-terminal que incluye el KID con sus LCD (Fig 59.A, línea 7). El bloqueo de la banda CRE en presencia de DREAM era específicamente competida con exceso de sonda DRE fría (Fig 59.B).

La incubación con anticuerpo contra DREAM no afecta a la banda de retardo de CREM o CREB sobre el CRE pero sí reduce el bloqueo de DREAM sobre las bandas de retardo CRE (Fig 59.B).

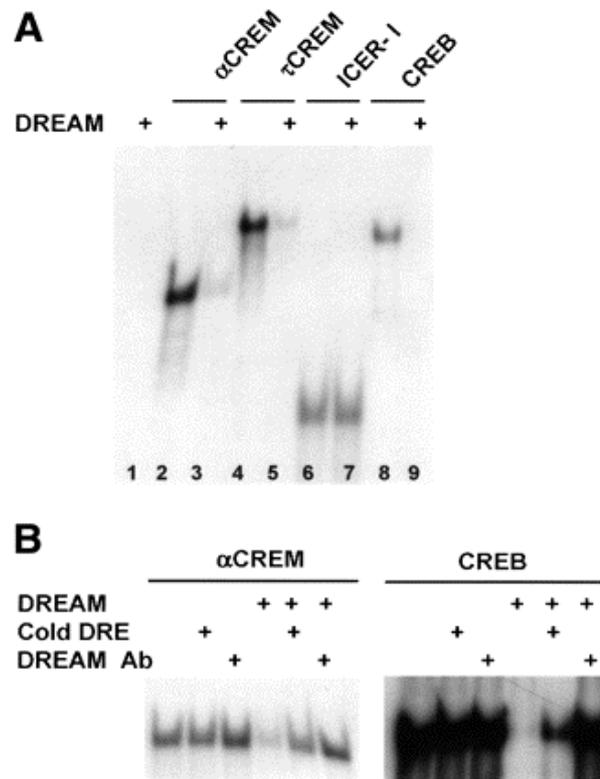


Fig (59). DREAM bloquea las bandas de retardo sobre la sonda CRE de proteínas recombinantes CREM y CREB.

(A) Ensayo de retardo mostrando que DREAM no se une a la sonda CRE (línea 1) y el bloqueo mediado por DREAM de las bandas de retardo CRE (líneas 3, 5 y 9). Sólo la migración de la banda de retardo generada por ICER-1 sobre la sonda CRE no está modificada por DREAM (línea 7). Las diferentes proteínas recombinantes generan distintas bandas de retardo CRE con movilidad específica. (B) Exceso de oligonucleótido DRE frío o preincubación con anticuerpo de DREAM no modifica las bandas de retardo CRE pero bloquea el efecto de DREAM sobre las bandas de retardo de CREB y α CREM. El anticuerpo anti-DREAM recupera las bandas de retardo sobre el CRE por α CREM y CREB.

Estos resultados proponen un nuevo tipo de interacción específica entre DREAM y las proteínas de unión al CRE que previene su unión a la sonda CRE.

6.4.b. El efecto de DREAM sobre las bandas de retardo CRE es dependiente de calcio.

La fosforilación de la serina en posición 68 de α CREM incrementa la capacidad de esta proteína para interactuar con DREAM y eliminar la interacción DREAM-DRE. (Ledo y cols.,2000.b), así que quisimos chequear si la fosforilación de las proteínas CREM o CREB modifica el efecto de DREAM sobre las bandas de retardo sobre la sonda CRE.

La fosforilación in vitro de proteínas recombinantes CREB o α CREM con PKA no previene el bloqueo por DREAM (Fig 60). En experimentos de titulación utilizando distintas cantidades de proteína DREAM recombinante, la fosforilación in vitro de CREM o CREB no incrementa la capacidad de DREAM para desplazar la banda CRE (datos no mostrados). Estos resultados indican que la interacción DREAM-CREM o DREAM-CREB que evita la unión a los sitios CRE no es dependiente o no se ve afectada por la fosforilación en el KID de las proteínas de unión al CRE.

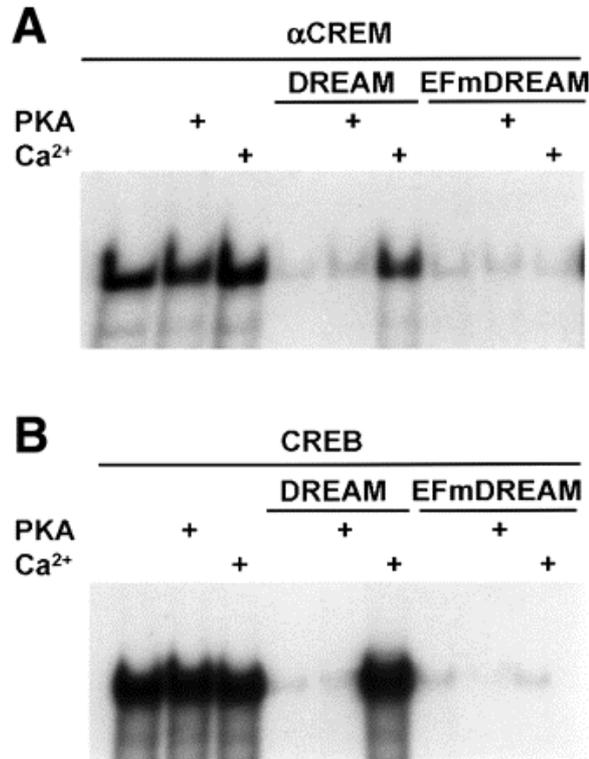


Fig (60). Efecto del calcio y la fosforilación por PKA sobre la interacción entre DREAM y proteínas de unión al CRE. Fosforilación de α CREM (A) o CREB (B) no afectan al bloqueo por DREAM de la banda de retardo CRE. La presencia de 10 μ M de calcio en la incubación elimina completamente el bloqueo de DREAM sobre las bandas de retardo CRE formadas por α CREM (A) o CREB (B). El mutante EFmDREAM, insensible a calcio, bloquea la banda de retardo CRE incluso en presencia de 10 μ M de calcio.

La unión de calcio a los EF-hand de DREAM modifica su conformación, bloqueando su capacidad de unirse a la secuencia DRE (Carrión y cols., 1999). Nosotros estábamos interesados en saber si el calcio tenía efecto sobre la interacción entre DREAM y CREB, o sobre la proteína CREM para modificar su banda de retardo sobre la secuencia CRE. La presencia de calcio en la reacción no alteró la banda de retardo CRE generada por CREM o CREB pero neutralizó la capacidad de DREAM de bloquear estas bandas (Fig 60). El efecto del calcio era específico ya que no se producía cuando se utilizaba EFmDREAM, un mutante dominante negativo de DREAM que interacciona con CREM y CREB pero que no responde a calcio (Carrión y cols., 1999) (Fig 60).

Estos resultados sugieren que tras estimulación, el incremento de los niveles de calcio pero no la fosforilación en el KID de CREM o CREB, impide la interacción entre el represor DREAM y estas proteínas de unión al CRE.

6.4.c. Un único sitio LCD en α CREM y CREB, centrado en el KID, es responsable del bloqueo de la banda de retardo CRE por DREAM.

La secuencia del LCD, ILNDL, localizada en el KID de α CREM participa en la interacción con DREAM pero no es suficiente para eliminar la banda de retardo DREAM-DRE ya que la interacción DREAM- α CREM depende de dos sitios LCDs (Ledo y cols., 2000.a). Esta secuencia está presente en todas las isoformas de CREM y muy conservada en el KID de CREB, ILNEL, pero ausente en la proteína ICER cuya unión al CRE no se modifica por la presencia de DREAM.

Analizamos si este dominio es responsable de la interacción entre DREAM y α CREM o CREB, para ello utilizamos el mutante α CREML73,76V que presenta el LCD del KID mutado (Ledo y cols., 2000.b). Este mutante genera una banda de retardo sobre la secuencia CRE indiferenciable de la que produce la proteína salvaje (Fig 61, A y B, comparando las líneas 9 y 13).

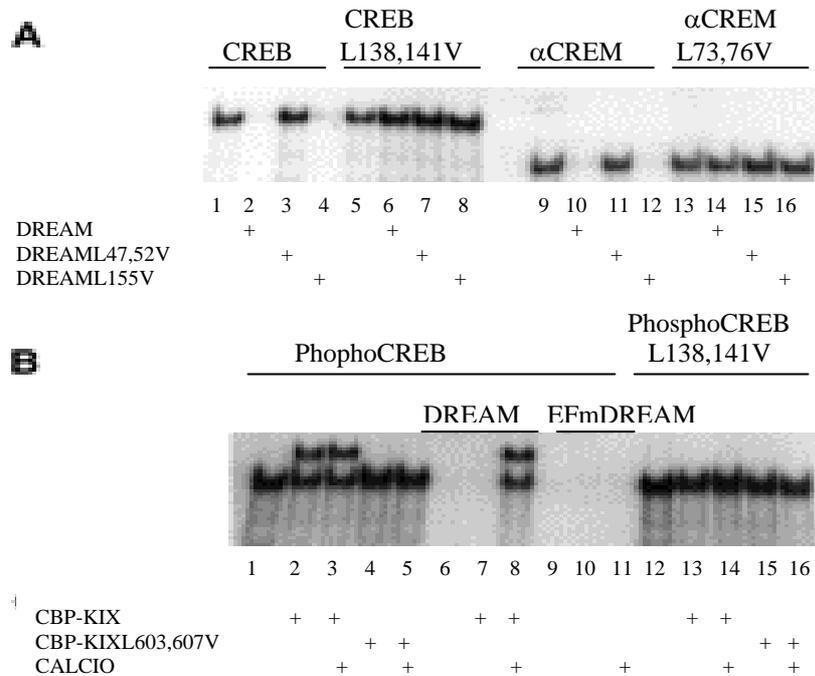


Fig (61). Un LCD en el KID de CREB media la interacción con DREAM o con el KIX de CBP. (A) La interacción entre DREAM y las proteínas de unión al CRE implica LCDs específicos en ambas proteínas. La mutación en el LCD del KID de CREB (CREBL138,141V) o α CREM (α CREML73,76V) previene el bloqueo por DREAM (comparando líneas 2 y 6 ó 10 y 14, respectivamente). La mutación en el LCD del N-terminal de DREAM (DREAML47,52V) específicamente cancela la interacción con CREB o CREM (líneas 2 y 3 o 10 y 11, respectivamente), mientras que la mutación del LCD en el C-terminal de DREAM (DREAML155V) se comporta como la proteína DREAM salvaje (líneas 2 y 4 o 10 y 12, respectivamente). (B) La interacción KID-KIX está mediada por LCDs en ambas proteínas. La banda sobrerretardada de unión al CRE que se obtiene con CREB fosforilado y el KIX de CBP (líneas 2

y 3) no se observa con el KIX de CBP mutado (CBP-KIXL603,607V) (líneas 4 y 5). El KIX-CBP no produce banda de sobrerretardo sobre el CRE cuando se utiliza el mutante CREBL138,141V fosforilado (líneas 13 y 14). La presencia de DREAM bloquea el sobrerretardo del CRE de manera dependiente de calcio. El mutante EFmDREAM, insensible a calcio, bloquea la banda de sobrerretardo en presencia de 10 μ M de calcio.

En presencia de DREAM, la banda de retardo generada por el mutante α CREML73,76V sobre el CRE no se bloqueaba (Fig 61.A comparando líneas 10 y 14). De manera similar, la mutación equivalente en el LCD de CREB, CREBL138,141V, no modifica su unión al CRE pero es insensible a la presencia de DREAM (Fig 61.A.línea 6).

Estos resultados confirman que el LCD en el KID de las proteínas de unión al CRE participa en la interacción con DREAM para el bloqueo de la formación de la banda de retardo sobre la secuencia CRE.

Para analizar el correspondiente dominio(s) en DREAM se realizaron experimentos similares utilizando los mutantes de DREAM en los LCDs (DREAML47,52V y DREAML155V) que bloquean la doble interacción con α CREM (Ledo et al.,2000.b), pero sólo el mutante DREAML47,52V falló en el bloqueo de la banda de retardo obtenida sobre el CRE por α CREM o CREB (Fig 61.A. Líneas 3 y 11).

Estos resultados soportan un modelo en el cual un solo sitio de interacción entre DREAM y las proteínas de unión a la secuencia CRE, localizado en el LCD en posición 47 de DREAM y el LCD en el KID de las proteínas CREB o CREM, es responsable del contacto entre las proteínas.

Además, está descrito que la mutación de los residuos L138 y L141 en el KID de CREB previene la unión con el KIX de CBP (Parker y cols., 1996).

El KIX de CBP interacciona con CREB fosforilado y provoca un sobrerretardo de la banda de unión a la secuencia CRE, mientras que la mutación del LCD en el KIX, KIXL603,607V, provoca la pérdida del sobrerretardo (Fig 61.B comparando líneas 2 y 4). De manera similar, el mutante CREBL138,141V fosforilado no pudo generar banda de sobrerretardo sobre el CRE en presencia del KIX de CBP (Fig 61. B, línea 13).

Estos resultados sugieren que hay dos LCDs que median la interacción entre el KID y el KIX, y permiten el reclutamiento de CBP al CREB fosforilado. La inclusión de DREAM en la reacción también desplaza la aparición de banda de sobrerretardo sobre el CRE, y lo hace de manera dependiente de calcio (Fig 61.B comparando líneas 7 y 8). Estos resultados sugieren que DREAM y CBP podrían competir por la unión al mismo LCD en el KID de CREB. Si fuese así, nos permite hipotetizar que DREAM puede afectar al reclutamiento de CBP por parte de CREB fosforilado y a la transcripción mediada por CREB/CBP.

6.4.d. DREAM recombinante evita la unión de CBP a CREB fosforilado.

Para obtener la primera evidencia de la interacción entre DREAM y el KID de CREB pudiera afectar al reclutamiento de CBP, diseñamos experimentos de “pull down” utilizando proteínas recombinantes (Fig 62).

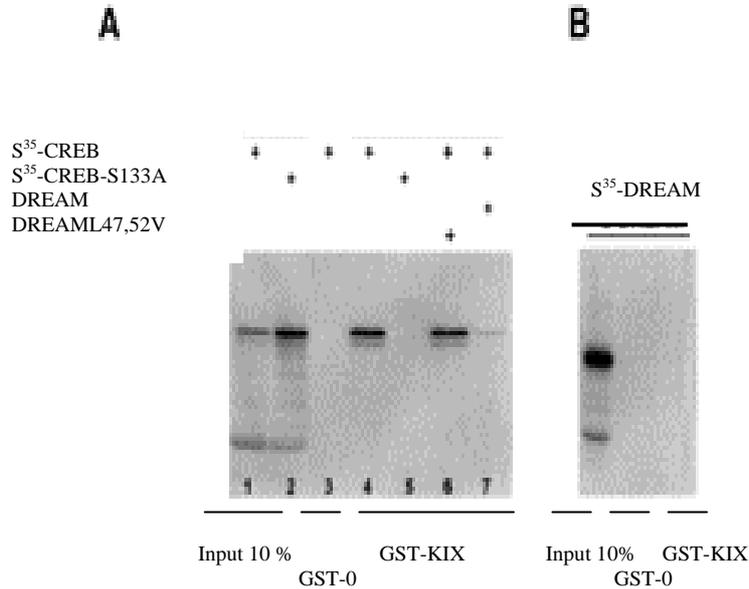


Fig (62). DREAM bloquea la interacción CREB-CBP sin interaccionar con CBP. (A). Experimentos de “pull down” muestran la interacción entre CREB fosforilado in vitro y GST-KIX (línea 4) y el bloqueo de la interacción por DREAM recombinante (línea 7). El mutante de DREAM mutado en el LCD DREAML47,51V no bloquea la caída de CREB fosforilado con GST-KIX (línea 6), mientras que el vector GST vacío (GST-0) o el mutante CREBS133 (mutante en el sitio de fosforilación por PKA en el KID de CREB) no bajan con GST-KIX (líneas 3 y 5, respectivamente). (B). GST-KIX no interacciona con DREAM.

En primer lugar analizamos la interacción entre KID y KIX. La incubación de la proteína de fusión a GST-KIX (Parker y cols.,1996), de manera eficiente, bajaba la banda de CREB fosforilado (Fig 62.A,línea 4). Para controlar la especificidad de la interacción comprobamos que GST sólo (GST-0) no bajaba CREB fosforilado (Fig 62.B,línea 3), además GST-KIX no podía bajar CREBS133A (mutante del sitio de fosforilación por PKA) (Fig 57.A,línea 5), como estaba descrito en la bibliografía (Radhakrishnan y cols., 1997).

Una vez establecidos todos los controles anteriores satisfactoriamente, probamos el efecto de DREAM sobre la interacción KID-KIX. La presencia de DREAM recombinante bloqueaba completamente la capacidad de GST-KIX para bajar CREB fosforilado, mientras que el mutante DREAML47,51V no pudo inhibir la interacción GST-KIX/CREB fosforilado (Fig 62.A. Comparando líneas 7 y 6).

Estos datos confirman los resultados obtenidos en ensayos de retardo y además indican que la interacción entre DREAM y CREB no es dependiente de la unión de CREB al ADN. La unión de DREAM al LCD en el KID de CREB impide la interacción con el LCD del KIX de CBP y esta interacción podría bloquear la transactivación de los sitios CRE dependiente de CBP.

De manera directa, con estos resultados se descarta una posible interacción entre DREAM y el KIX de CBP ya que chequeamos esta posibilidad en experimentos de “pull down” pero no observamos interacción directa entre DREAM y GST-KIX (Fig 62.B), además en experimentos de retardo utilizando proteína recombinante CBP-KIX no se afecta a la unión de DREAM a la secuencia DRE, utilizada como sonda (datos no mostrados).

6.4.e. Mutantes de DREAM impiden la coactivación de Gal4-CREB dependiente de CBP.

La actividad transcripcional de CREB fosforilado depende de su capacidad de reclutar coactivador CBP (Kwok y cols.,1994).

Partiendo de los resultados in vitro que sugieren que DREAM se une al LCD en el KID de CREB donde se une CBP, deseábamos saber si esto se reflejaba en una menor capacidad de CBP para activar la transcripción dependiente del CRE cuando CREB fosforilado está formando complejos con DREAM. Para investigar esta posibilidad cotransfectamos el reportero pG5CAT, que contiene 5 sitios de unión a Gal4, junto con la proteína de fusión GAL4-CREBALZ y el coactivador CBP en células HEK293, comparando el efecto de un incremento de calcio intracelular y AMPc tras un tratamiento con cafeína (Carrión y cols.,1999) y en presencia de DREAM, el dominante negativo EFmDREAM o el doble dominante negativo EFmDREAML47,52V (Fig 63).

La necesidad de utilizar la proteína de fusión Gal4-CREBALZ en la que se ha eliminado el dominio bZip de dimerización y unión al ADN es para evitar la posibilidad de dimerización con proteína CREB endógena para transactivar el reportero pG5CAT.

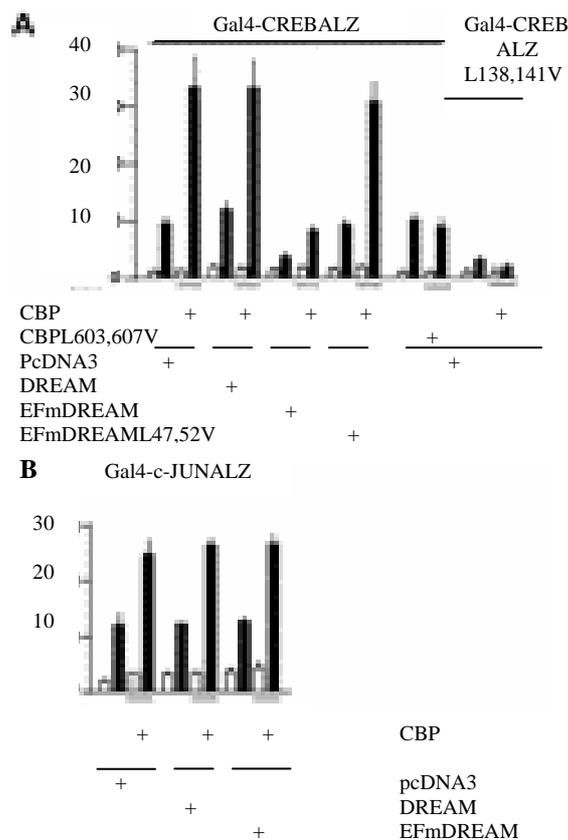


Fig (63). Bloqueo por DREAM dependiente de calcio del reclutamiento de CBP por GAL4-CREB. (A) Transactivación del reportero pG5CAT por GAL4-CREBALZ y el coactivador CBP en condiciones basales (barras blancas) o tras estimulación con cafeína (barras negras) está bloqueada en presencia de EFmDREAM, pero no por EFmDREAML47,52V. Mutantes en el LCD de CREB o CBP (GAL4-CREBALZ L138,141V O CBPL603,607V) fallan en la transactivación del reportero pG5CAT. (B) El mutante EFmDREAM no bloquea la transactivación dependiente de CBP por GAL4-cJunALZ del reportero pG5CAT en condiciones basales (barras blancas) o tras estimulación con cafeína (barras negras). En cada figura, los valores están normalizados con respecto a los cultivos transfectados con pcDNA3 en ausencia de CBP y sin tratamiento con cafeína. Datos de cuatro experimentos independientes repetidos por triplicado.

La cotransfección de GAL4-CREBALZ y CBP provoca una transactivación de 35 veces la actividad del reportero pG5CAT tras el tratamiento con cafeína (Fig 63.A). Una inducción similar con cafeína se obtiene en la cotransfección de GAL4-CREBALZ, CBP y DREAM (Fig 63.A). En células cotransfectadas con el dominante negativo EFmDREAM, la transactivación del reportero pG5CAT por GAL4-CREBALZ y CBP tras el tratamiento con cafeína estaba dramáticamente reducido (Fig 63.A). Este bloqueo no se observaba tras la cotransfección con el doble mutante EFmDREAML47,52V, que es incapaz de unirse a CREB y bloquear la interacción de CREB fosforilado con el KIX de CBP in vitro (Fig 63.A). La activación por cafeína del CBP endógeno o su homólogo p300, en células HEK293, sufría unos niveles de represión por EFmDREAM similares y no estaba reprimido por la expresión de EFmDREAML47,52V, aunque los niveles de inducción eran bajos.

Por otro lado, la mutación en el LCD en el KID de CREB en la construcción pGAL4-CREBALZL138,141V eliminaban completamente la transactivación del reportero pG5CAT tras el tratamiento con cafeína, incluso en cotransfección con CBP, confirmando una vez más los resultados de los experimentos in vitro (Fig 63.A). De manera similar, la mutación en el LCD de el KIX de CBP en la construcción CBPL603,607V bloquea su efecto transactivador sobre el reportero pG5CAT (Fig 63.A).

Como experimentos control se utilizó el vector vacío pGAL4 que no transactivo de manera significativa la expresión del vector pG5CAT tras tratamiento con cafeína y/o cotransfección con los diferentes vectores de expresión (datos no mostrados). Además, estos experimentos control tuvieron la utilidad de permitirnos optimizar las condiciones de transfección para estudiar el bloqueo por los mutantes de DREAM tras la estimulación con calcio, ya que la baja cantidad de reportero y los cortos espacios de tiempo entre la transfección y los tratamientos de las células, provocan que la actividad de acetilación basal fuese muy baja y no permitiese observar ningún efecto significativo sobre la actividad basal tras la sobreexpresión de DREAM o EFmDREAM (Fig 63.A).

Todos estos resultados confirmaban una interacción DREAM-CREB dependiente de calcio que bloquea la capacidad de CREB fosforilado para reclutar CBP, frenando de esta manera la transactivación de la transcripción dependiente de CREB-CBP.

Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó la construcción GAL4-CREB completo, confirmando que el LCD en el dominio de dimerización, en el C-terminal de CREB, no juega un papel importante en la interacción entre DREAM y CREB, y de igual manera ocurre cuando se utilizan los mutantes GAL4-CREBS142,143 (resultados no mostrados) indicando que la capacidad de DREAM de interactuar con CREB es exclusivamente dependiente de calcio y no de la fosforilación de CREB en las serinas 142 y 143.

La interacción entre el dominio N-terminal de c-jun y el dominio KIX de CBP participa en la transactivación de sitios AP-1 por CBP (Kwok y cols., 1994). Como control de la especificidad del bloqueo de DREAM sobre la interacción KID-KIX, realizamos experimentos utilizando el reportero pG5CAT y el vector de expresión para la proteína de fusión GAL4-cJunALZ. El tratamiento con cafeína incrementó la transactivación del reportero pG5CAT por GAL4-cJun entre 5 y 12 veces en ausencia y en presencia de CBP sobreexpresado, respectivamente (Fig 63.B). La cotransfección del mutante EFmDREAM no afectaba la transactivación. Además, el uso del mutante en el LCD en el KIX de CBP, CBPL603,607V, tenía esencialmente la misma actividad transactivadora que CBP sobre el sistema GAL4-cJunALZ-pG5CAT (datos no mostrados).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la represión dependiente de calcio por DREAM de la transcripción mediada por CBP es específica y exclusivamente depende de la capacidad de DREAM para interactuar con CREB.

6.4.f. DREAM interfiere con la transcripción dependiente del CRE.

Para investigar si la interacción entre DREAM y CREB podría afectar a la transcripción dependiente del sitio CRE se realizaron experimentos de transfección con el plásmido reportero pSomCAT que contiene el CRE canónico del promotor de somatostatina (Montminy y cols., 1986), en células PC12, una línea celular con expresión endógena de DREAM (Fig 59.A).

El incremento de los niveles de calcio intracelular y AMPc tras el tratamiento con cafeína (Hernandez-Cruz y cols., 1990) provoca una transactivación de 12 veces del reportero pSomCAT, en células PC12 (Fig 64.B).

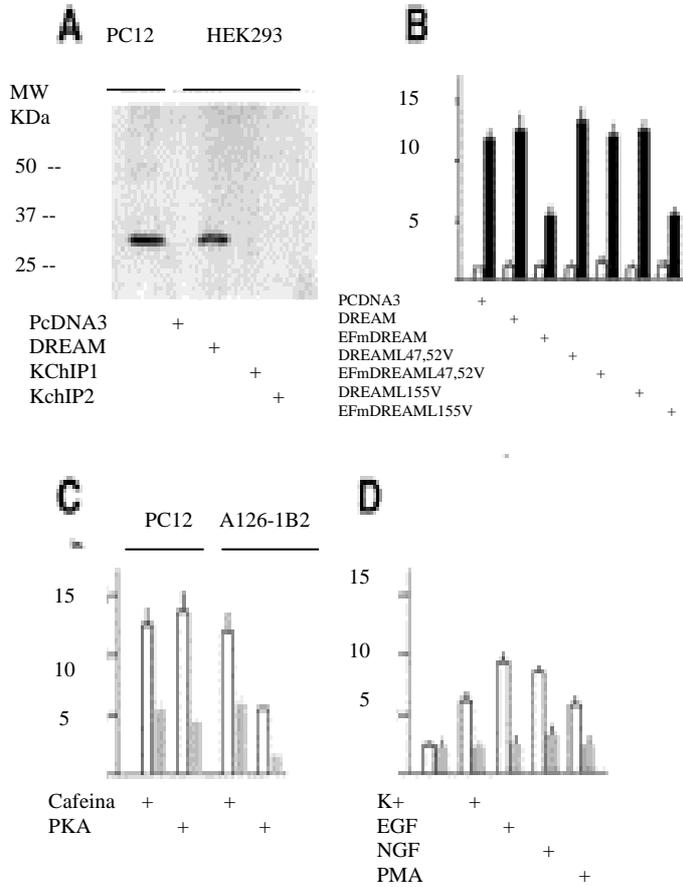


Fig (64).Regulación dependiente de calcio por DREAM de la transcripción CRE-dependiente. (A) Western de la expresión de DREAM en células PC12, utilizando el anticuerpo 1B1 monoclonal anti-DREAM. No se produce reactividad cruzada del monoclonal 1B1 frente a proteínas relacionadas con DREAM como KChIP1 y 2, tras sobreexpresión en células HEK293. (B) Represión específica de la transactivación del reportero pSomCAT tras tratamiento con cafeína por el mutante EFmDREAM, tras cotransfección transitoria en células PC12. (C y D) Efectos del mutante EFmDREAM sobre la transcripción de pSomCAT tras la activación de diferentes vías de señalización, en células PC12 salvajes y deficientes en PKA (línea A-126-1B2). Valores expresados en veces de inducción de la actividad CAT con respecto a los cultivos cotransfectados con el vector de expresión vacío pcDNA3. Barras blancas representan valores de estimulación con las distintas drogas y barras sombreadas los mismos valores en presencia de EFmDREAM. Las barras de error muestran la desviación estandar. Datos procedentes de 4 experimentos independientes repetidos por triplicado.

La cotransfección con DREAM no modifica la inducción de pSomCAT por cafeína (Fig 64.B). Además la coexpresión con EFmDREAM, insensible a calcio, significativamente reducía la transactivación del reportero CRE por cafeína (Fig 64.B).

La coexpresión del doble mutante EFmDREAML47,52V, incapaz de responder a calcio y de interactuar con CREB, no modificó la transactivación del reportero pSomCAT tras el tratamiento con cafeína (Fig 64.B). Por su parte, el doble mutante EFmDREAML155V que es capaz de interactuar con CREB, se comportaba como el mutante EFmDREAM (Fig 64.B).

Puesto que el efecto de la cafeína afecta a dos vías principales de señalización celular, el calcio y el AMPc, intentamos dissociar estas dos vías para entender mejor la regulación de la interacción DREAM-CREB. La sobreexpresión de la subunidad catalítica de PKA nos permitió obtener valores de transactivación del reportero pSomCAT de unas 14 veces, en células PC12 (Fig 64.C) que se reducían con la coexpresión de EFmDREAM (Fig 64.C). De manera alternativa, la movilización de calcio en células A126-1b2, un clon de células PC12 deficientes en la subunidad catalítica de PKA (Van Buskirk y cols., 1985) incrementó la transactivación del reportero pSomCAT en 12.5 veces y este efecto era bloqueado por EFmDREAM (Fig 64.C).

Otros muchos estímulos son capaces de fosforilar CREB de manera selectiva, en diferentes residuos de serina en la región del KID, para regular la transcripción dependiente del sitio CRE en células PC12: entrada de calcio extracelular a través de canales dependientes de voltaje tras la incubación con concentraciones despolarizantes de cloruro potásico, activación de PKC por esteres de forbol o estimulación de las vías de Erk/MAP quinasas por exposición de las células a EGF o NGF (Mayr y cols., 2001), así que nos planteamos estudiar el efecto de DREAM sobre la transcripción dependiente del sitio CRE, activada por estos diversos estímulos. El tratamiento de PC12 con estos estímulos produjo un incremento de la actividad del reportero pSomCAT de 2 a 4 veces (Fig 64.D) y lo más importante es que la cotransfección de EFmDREAM bloquea la transactivación del reportero en todos los casos (Fig 64.D), mientras que la cotransfección con DREAM salvaje o el doble mutante EFmDREAMI47,52V no afectaban al incremento de la activación del reportero por los diferentes estímulos (datos no mostrados). La baja actividad transactivadora de estos estímulos está en concordancia con su baja capacidad para inducir la interacción entre CREB fosforilado y CBP en el núcleo (Mayr y cols., 2001).

En los experimentos control utilizamos el reportero pTRETkCAT que contiene un sitio AP-1 del promotor de la colagenasa; ni DREAM ni EFmDREAM modificaron su transactivación basal o inducida por cafeína (datos no mostrados), incluso cuando se cotransfectaba a concentraciones de ADN cuatro veces mayores a las que se usaron en los experimentos con pSomCAT, demostrando una vez más la especificidad de la represión de la transcripción dependiente del sitio CRE por DREAM.

Todos estos resultados confirman los datos obtenidos con los experimentos in vitro y proponen un papel central para la regulación por calcio de la desunión de DREAM y CREB en la transcripción dependiente del sitio CRE, activada por diferentes vías de señalización.

6.4.g. DREAM endógeno regula la transcripción basal dependiente del sitio CRE.

La transfección de un vector de expresión con el antisentido de DREAM en células PC12 elimina de manera transitoria la proteína DREAM endógena (Fig 65.A), sin modificar los niveles de la proteína CREB.

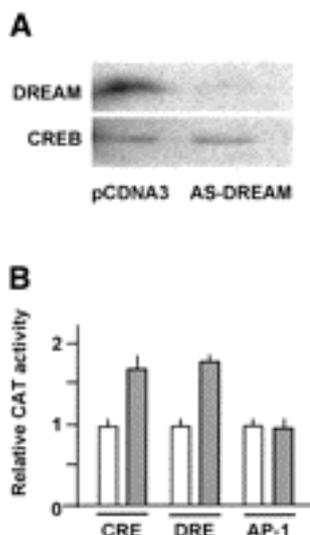


Fig (65).DREAM endógeno regula la transcripción basal dependiente del elemento CRE. (A) Reducción de los niveles de proteína represora DREAM en células PC12 tras 48h de transfección transitoria con el plásmido de expresión del antisentido de DREAM (pAS-DREAM). No hay cambios en la expresión de la proteína CREB.

(B)Incremento de la actividad basal de los plásmidos reporteros pSomCAT(CRE) y pHD3CAT(DRE) tras eliminación transitoria de la proteína DREAM (barras sombreadas). No hay cambios en la expresión basal del reportero pTKTRECAT (AP-1) por la expresión del antisentido de DREAM. Las barras de error muestran la desviación estandar. Datos de 4 experimentos independientes repetidos por triplicado.

La reducción en los niveles de proteína DREAM provoca una significativa inducción de la expresión basal de pSomCAT (Fig 65.B). La expresión basal de un reportero con un sitio DRE también está incrementada tras la reducción de los niveles de proteína DREAM, mientras que la actividad de una construcción reportera con un sitio AP-1 no estaba afectada (Fig 65.B).

El incremento en la transcripción dependiente del sitio CRE es un reflejo de la desrepresión de CREB como consecuencia de la reducción de los niveles de DREAM en las células.

6.4.h. DREAM interacta con CREB in vivo.

Para analizar si la interacción entre DREAM y CREB ocurre in vivo, realizamos experimentos de coimmunoprecipitación con extractos nucleares de cerebro de ratón. De acuerdo con los experimentos de retardo, “pull down” y transfecciones, CREB inmunoprecipitó al utilizar un anticuerpo contra DREAM (Fig 66, línea 3).

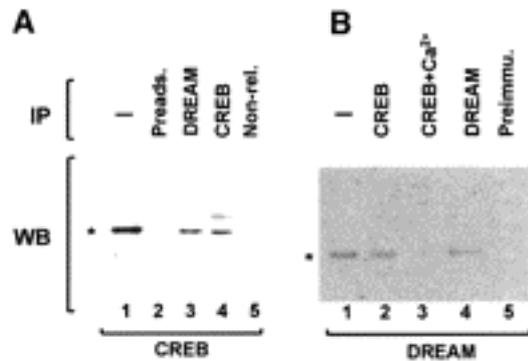


Fig (66). Coimmunoprecipitación de DREAM y CREB en extractos nucleares de cerebro.(A) Detección de proteína CREB por western (WB) tras inmunoprecipitación (IP) con los anticuerpos policlonales indicados.(B)Detección de proteína DREAM utilizando el anticuerpo monoclonal anti-DREAM tras IP con los anticuerpos policlonales indicados. El asterisco marca la migración de las bandas de CREB (A) y DREAM (B).

De igual manera, DREAM fue inmunoprecipitado de extractos nucleares de cerebro utilizando un anticuerpo anti-CREB (Fig 66.B, línea 2). Esta banda se reducía drásticamente en presencia de calcio, lo que demuestra una vez más la regulación de la interacción entre DREAM y CREB por calcio (Fig 66.B,línea 3).

DREAM o CREB fueron inmunoprecipitados de extractos nucleares de cerebro utilizando anticuerpos anti-DREAM o anti-CREB (Figura 66.A y B, línea 4). Además, suero preinmune o anticuerpos contra diferentes nucleoproteínas como p53, C/EBP o subunidad α del receptor de hormona tiroidea no pudieron inmunoprecipitar DREAM o CREB (Fig 66.A y B, línea 5 y datos no mostrados).

La inmunoprecipitación de CREB con anticuerpo anti-DREAM no se produce en extractos nucleares de hígado, un tejido con muy poca expresión de DREAM endógeno (Carrión y cols.,1999; datos no mostrados).

Todos estos resultados indican que en condiciones basales, DREAM modula la actividad de promotores que contienen sitios CRE de una manera dependiente de calcio, por la formación de complejos con CREB e isoformas de CREM. Así, la interacción entre DREAM y los factores de transcripción de unión al CRE representan un nuevo punto de regulación en las cascadas de señalización dependiente de calcio y AMPc a nivel de la expresión génica.

7. DISCUSIÓN.

7.1.DREAM interacciona con el sitio DRE y actúa como represor transcripcional.

Desde la identificación del sitio DRE en el promotor de prodinorfina humana por estudios de la regulación basal e inducida por AMPc-PKA (Carrión y cols., 1998), nuestros resultados sugieren nuevos mecanismos que involucran también al calcio (Carrión y cols., 1999) en la desrepresión por unión diferencial de la proteína DREAM al sitio DRE.

El DRE de prodinorfina humana está relacionado con la secuencia DynCRE4, una secuencia similar a un CRE asimétrico (CGTCA) descrito por primera vez en el promotor de prodinorfina de rata donde participa en la activación transcripcional por AMPc (Douglass y cols., 1994). Al igual que el DynCRE4, el DRE humano es intragénico y está localizado en las proximidades del sitio de iniciación de la transcripción; contiene la secuencia GGAG*TCA que se parece mucho a la secuencia de un sitio AP-1 (TGAGTCA) en el que la T inicial está reemplazada por una G (subrayada), aunque en ningún caso, los experimentos de competición con oligonucleótidos fríos AP-1 o CRE en geles de retardo o ensayo de south-western modifican la unión de DREAM al DRE (Carrión y cols., 1998, 1999). La G central en la secuencia del DRE (marcada con asterisco) es esencial para la unión de DREAM al elemento regulador en experimentos in vitro y transfecciones transitorias (Carrión y cols., 1998,1999) lo que ratifica la especificidad de la interacción entre DREAM y el DRE.

De manera inicial se propuso un consenso para la secuencia DRE (PuNGTCAPuPuG) basada en el alineamiento de secuencias de los genes de prodinorfina de diferentes especies (Carrión y cols., 1998) que más tarde hemos podido confirmar tras identificar la presencia de otras secuencias DRE en otros genes como c-fos (Carrión y cols., 1999), c-jun, icer y los análisis de mutación de las distintas secuencias DRE nos han permitido cerrar el core central de la secuencia DRE y la importancia de las bases flanqueantes de core en la flexibilidad del DRE (Ledo y cols., 2000.a).

-2	-1	+1	+2	+3	+4
Pu	N	G	T/G	C	A

Ensayos de protección del ADN, en presencia y ausencia de DREAM, nos ayudarían a conocer cual es la región del promtor, incluyendo al DRE que está siendo ocupada por el represor, lo que posiblemente nos ayudaría a establecer con mayor fiabilidad la importancia de las bases flanqueantes del DRE que son importantes para la interacción con DREAM.

La mutación de los nucleótidos claves en la secuencia del core del DRE provoca una reducción significativa de la interacción DREAM-DRE que se relaciona directamente con un aumento de la transcripción del promotor de prodinorfina (Carrión y cols., 1998,1999) y un aumento de la expresión de prodinorfina (Carrión y cols., 1998).

Todo lo cual indica que el complejo formado por DREAM y el DRE actúa como un silenciador transcripcional.

De acuerdo con esta hipótesis, el DRE puede reprimir la transcripción de una manera independiente de orientación, siempre que se localice en posiciones downstream del sitio de iniciación de la transcripción en promotores heterólogos, ya que es totalmente ineficaz cuando está colocado por delante del sitio de iniciación (Carrión y cols., 1998). Además, ensayos de retardo utilizando como sonda un DRE invertido, comparándolo con el DRE en la orientación que presenta dentro del promotor de prodinorfina, ofrecen similares valores relativos de unión de la proteína DREAM recombinante.

Un efecto similar está descrito para el sitio SNOG, un elemento regulador negativo que confiere expresión específica de neuronas al gen GAP-43, presente también en otros promotores de genes específicos de neuronas como los que codifican para SNAP-25 y óxido nítrico sintasa neuronal (Weber y cols., 1997). Otro ejemplo es el elemento silenciador específico de neuronas (NRS) (Kraner y cols., 1992) en la regulación del gen del receptor nicotínico para acetilcolina (Bessis y cols., 1997), en tejido nervioso el NRS activa la transcripción si se localiza en las proximidades o downstream de la caja TATA, pero reprime la expresión de los genes en neuronas, cuando se localiza en posiciones upstream alejadas del sitio de iniciación; en tejidos no neuronales, el NRS se comporta siempre como un silenciador transcripcional (Bessis, y cols., 1997).

Las dos primeras evidencias de la interacción de DREAM con el sitio DRE fueron la fijación con UV y experimentos de south-western, que permitieron la caracterización inicial de un complejo nuclear de 110 kDa que se unía al DRE de manera específica. Además se podía observar un complejo proteico de 55 kDa, tras fijación con UV, lo que permitía especular que el complejo de 110 kDa estaría formado por dos complejos de 55 kDa. Ambos tipos de complejos aparecían en células y núcleos cerebrales que expresan prodinorfina como en muestras de caudado de cerebro humano (Carrión y cols., 1998). Sin embargo, el complejo de 110 kDa se observaba también en cerebelo de rata, donde los niveles de prodinorfina son muy bajos (Alvarez, G., y cols., 1990), lo que sugería que el complejo de unión al DRE podría estar involucrado en la represión transcripcional.

Una vez identificado el ADNc de DREAM, la primera sorpresa fue que no codificaba para una proteína de 55 kDa y mucho menos de 110 kDa sino que presentaba un marco abierto de lectura con 256 aminoácidos y una masa molecular prevista alrededor de 30 kDa (Carrión y cols., 1999).

El análisis funcional de la proteína clonada tras sobreexpresión en bacteria y en células de mamífero reveló que la proteína DREAM seguía uniéndose al DRE como un complejo de 110 kDa (Carrión y cols., 1999).

Estos resultados sugieren que DREAM se une con gran afinidad al DRE como tetrámero, mientras que como dímero y especialmente como monómero lo hace con muy baja afinidad, observándose sólo tras fijación con UV.

Los intentos por definir el posible dominio responsable de la unión al ADN en la secuencia de aminoácidos de DREAM, parten de que en no pudimos identificar ninguna región consenso previamente descrita de unión al ADN, como los ya mencionados en la introducción (apartado de dominios funcionales en factores de transcripción), con lo

que nos fijamos en regiones de la proteína con una alta concentración de cargas positivas que podrían estar indicando una zona de la proteína con capacidad electrostática para unirse al ADN. De las dos regiones denominadas por nosotros DBD1 y DBD2, por técnicas de delección en el caso del 1 y cambio del marco de lectura en el caso del 2, con ninguno de ellos hemos podido confirmar su relación con el dominio de unión al ADN, aunque nos han permitido identificar una región importante para el mecanismo represor de la proteína.

Quizás el dominio de unión al ADN se forma tras la oligomerización y si bien el monómero y el dímero presentan cierta capacidad de unirse al DRE, ésta se potencia cuando la proteína está formando tetrámeros.

Hasta el momento no disponemos de ninguna evidencia experimental que nos indique si primero se produce la tetramerización y posteriormente la unión al ADN (Fig 67.A) o bien el proceso comienza con la unión del monómero al ADN y sobre él se ensambla, en un proceso de cooperación positiva, el tetrámero estabilizando en un grado mucho mayor la unión al ADN (Fig 67.B).

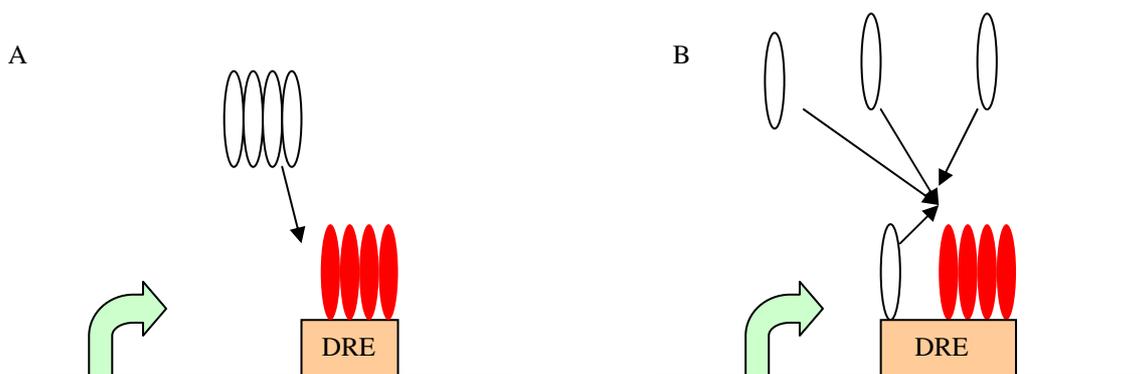


Fig (67). Dos posibles modelos para la formación del tetrámero y la unión al sitio DRE.

Hasta la fecha existe un único trabajo publicado que aborda el estudio de la localización del dominio de unión al ADN en DREAM (Osawa y cols., 2001) en el que utilizando dos fragmentos de la proteína, N-terminal (1-70) y C-terminal (65-256), observan que ambos fragmentos son capaces de unirse al DRE, de manera independiente y dependiente de calcio respectivamente. En dicho trabajo no se hace referencia a la contribución de los aminoácidos 65-70 que se solapan en ambas construcciones y que para nosotros, sobre el papel, tampoco parecen ser cruciales. A la vista de estos resultados Osawa y cols., proponen dos regiones o dominios de unión al ADN, uno en el extremo N-terminal de baja afinidad y otro en el C-terminal de alta afinidad, sin llegar a determinar la secuencia de aminoácidos que los definen.

Posibles experimentos para tratar de identificar el dominio de unión al ADN en DREAM, podrían partir de una batería de mutantes puntuales en la proteína recombinante DREAM que serían probados en ensayo de retardo en gel sobre la sonda DRE de prodinorfina humana, con el objeto de identificar aquellos mutantes que no

fuesen capaces de unirse a dicha sonda, lo que aportaría un primer indicio, que podría confirmarse con la realización de sobreexpresión de estos mutantes en células HEK293 y preparación de extractos para south-western que nos demostrasen la falta de unión al DRE pero no afectasen de manera drástica a la formación de los diferentes multímeros de DREAM (analizando los mismos extractos por western), teniendo muy en cuenta las posibles limitaciones que para estos experimentos podría representar el hecho de que tal vez, oligomerización y unión al ADN no son, técnicamente, fáciles de analizar por separado.

En el trabajo publicado por Osawa y cols., se muestra la capacidad del fragmento C-terminal para formar tetrámeros en ausencia del DRE lo que apoyaría el modelo de formación del tetrámero independientemente de la unión al ADN, al igual que la obtención de tetrámeros y dímeros en western y southwestern está demostrando la existencia de estos complejos en solución y de manera independiente de la unión al DRE. En cualquier caso no podemos descartar por completo el segundo modelo ya que aún hay aspectos de la oligomerización de la proteína y de la unión al ADN que desconocemos.

Los estudios sobre oligomerización de DREAM y las posibles modificaciones postraduccionales (fosforilaciones/desfosforilaciones, regulación oxidación/reducción, etc) podrían ayudarnos a comprender un proceso tan finamente regulado como el de la unión al DRE y las diferentes afinidades que los complejos monómero, dímero y tetrámero presentan por la secuencia reguladora.

Muy posiblemente, sólo cuando podamos separar experimentalmente las funciones de oligomerización y unión al ADN, mediante mutación puntual de cada uno de estos dominios por separado, podremos enfrentarnos, en condiciones óptimas, al estudio de estas dos funciones de la proteína.

Posibles estudios para encontrar el dominio de oligomerización en DREAM podrían partir del modelo experimental del dos híbridos en células de mamífero. Obteniendo construcciones con el dominio de unión al ADN Gal4 fusionado a la proteína DREAM y por otro lado fragmentos de DREAM fusionados al dominio de activación PVP16, en experimentos de cotransfección en células HEK293 donde el DREAM endógeno no sería un problema. Bajo esta situación, el fragmento de DREAM fusionado al VP16 que provoque activación del sistema nos daría la primera indicación de la región necesaria en la oligomerización.

La unión de DREAM al DRE y el efecto represor son dos características funcionales que desde un primer momentos hemos considerado unidas. La ocupación específica del sitio DRE por DREAM provoca un bloqueo, silenciamiento o represión de la actividad transcripcional a través de diferentes mecanismos posibles como la interferencia en la formación del complejo de iniciación de la transcripción realizada por los factores NC2 y NOT (Pugh., 2000) o afectar el proceso de elongación, mecanismos que se ha demostrado que operan en la represión del gen de histona H5 (Gomez-Cuadrado y cols., 1992), aunque como hipótesis más sólida para explicar el mecanismo represor de DREAM sobre el DRE no podemos dejar de proponer la posible interacción de DREAM con complejos correpresores cuya actividad HDAC está bloqueando estructuralmente el promotor, impidiendo la activación transcripcional.

Contemplando esta última posibilidad como posible modelo de la represión mediada por DREAM, son muy diversas las posibilidades técnicas que nos ayudarían a validar o descartar esta posibilidad. Algunos de los experimentos que arrojarían luz sobre el modelo de represión por DREAM, mediado por histona deacetilasas, se podrían centrar en la utilización de inhibidores específicos de histona deacetilasas como la tricostatina A; este tratamiento debería ser capaz de inhibir a las histona deacetilasas que pudieran estar siendo reclutadas por DREAM, con lo que el mecanismo represor quedaría inhibido y la actividad basal de los genes diana o reporteros con sitios DRE presentarían un aumento.

La especificidad de este tipo de experimentos debería enfocarse desde experimentos en paralelo con construcciones de reporteros en los que el DRE estuviera mutado (situación en la que no hay represión por DREAM), en los que la utilización del inhibidor de histona deacetilasa quedaría sin efecto.

Estos experimentos deberían completarse con la identificación de correpresores como NCoR y otros que pudieran estar interaccionando con DREAM sobre el DRE de los promotores y propiciando la acción de las histona deacetilasas.

Con este objetivo podríamos plantear experimentos de coinmunoprecipitación o “pull down” DREAM-correpresores, si bien tenemos que tener en cuenta el alto número de correpresores y las diferentes histona deacetilasas que ya se conocen, lo que a priori nos presenta casi infinitas posibilidades a nivel de formación de complejos e interacciones con DREAM, de las que al día de hoy, no tenemos ninguna evidencia que nos dirija de manera más evidente en un determinado sentido.

Otro punto técnico que a priori podría obstaculizar este tipo de ensayos es que la formación de los complejos DREAM-correpresores-HDACs, en sus diferentes combinaciones, fueran dependientes de la unión al sitio DRE, lo que nos obligaría a intentar plantear experimentos de retardo en gel en condiciones menos específicas de las que hemos utilizado en los ensayos de retardo mostrados en esta memoria, como reducción del ADN de esperma de salmón con el objetivo de obtener complejos de unión al DRE en los que pudieran estar presentes estos correpresores o histonas deacetilasas, y analizar el comportamiento de dichos complejos en presencia y ausencia de los inhibidores de histona acetilasas, tratamientos como forskolina, cafeína, etc, que sabemos que tienen un efecto activador y que por lo tanto deben modificar el complejo represor que se forme a partir de DREAM unido al DRE.

Quizás una prueba definitiva de la participación de histona deacetilasas en la represión por DREAM, podrían ser estudios de acetilación de histonas en los promotores de genes diana de la represión por DREAM.

Con todo lo mencionado anteriormente, se plantea una situación en la que ensayos dirigidos hacia el estudio del mecanismo represor de DREAM, la formación de oligómeros y la unión al ADN, posiblemente deban considerar estas tres funciones de manera coordinada y dependientes unos de otros, lo que complica su estudio pero a la vez nos muestra la gran importancia que estos procesos y su regulación tienen en la actividad de la proteína.

7.2. DREAM es un represor transcripcional regulado por calcio.

Las variaciones en las concentraciones de iones calcio a nivel intracelular actúan como un segundo mensajero crucial en la transducción bioquímica en procesos como la actividad sináptica y la expresión génica.

El aumento de los niveles de calcio intracelular regula la expresión génica a muy diferentes niveles como la traducción (Krichevsky y cols., 2001) y el procesamiento del ARNm (Xie y col., 2001), pero el punto más conocido y estudiado es la iniciación de la transcripción (West y cols., 2001). En los últimos años se han identificado un número creciente de reguladores transcripcionales que median entre la señalización del calcio y la transcripción génica y se han conseguido avances significativos en el conocimiento de cómo las cascadas de señalización dependientes de calcio, activadas por señales extracelulares, están acopladas a la regulación de la transcripción.

Muchas quinasas y fosfatasa reguladas por calcio están implicadas en los cambios del estado de fosforilación de factores de transcripción, modulando su función (Dolmetsch y cols., 1997), además se ha sugerido la existencia de efectores directos nucleares en la inducción de la expresión génica (Ghosh y cols., 1995), si bien no se había identificado ninguno hasta la aparición de DREAM (Carrión y cols., 1999).

Tras demostrarse la interacción directa del calcio a DREAM por experimentos de emisión de fluorescencia, south-western y ensayos de retardo, todos ellos en presencia y ausencia de calcio (Carrión y cols., 1999), pudimos observar un claro efecto transcripcional de dicha interacción, ya que la estimulación con calcio en células provoca que DREAM pierda su capacidad de unirse al DRE y ejercer su actividad represora (Carrión y cols., 1999). Esta situación convierte a DREAM en el primer sensor de calcio nuclear que directamente reprime la transcripción por unión directa al ADN.

La sensibilidad de DREAM al calcio reside en la presencia de 4 dominios de unión a calcio del tipo EF-hand, de los que sólo el primero no ajusta su secuencia perfectamente al consenso de estos dominios. Esto se había observado en otras proteínas con múltiples EF-hand en las que una de estas manos de calcio no es funcional, a pesar de ello, un trabajo de Craig y cols a principios del 2002 demuestran que la primera mano de calcio es funcional, a pesar de no ceñirse al consenso.

La sustitución de aminoácidos claves en la quelación del calcio en una sola EF-hand es suficiente para hacer a la proteína insensible a la estimulación por calcio, bloqueando de esta manera la desunión del sitio DRE y la desrepresión transcripcional por este ion (Carrión y cols., 1999). Además el efecto de la mutación de una sola EF-hand tiene el efecto de bloqueo máximo ya que las mutaciones de 2 ó 3 EF-hand no provoca un bloqueo mayor de la sensibilidad a calcio (Ledo y cols., 2000.a), lo que nos indica que el cambio conformacional que sufre la proteína en presencia de calcio y que provoca la pérdida de unión al DRE y la desrepresión, necesita de cambios coordinados en cada una de las EF-hand (Ledo y cols., 2000.a). Esto nos permite hipotetizar que la unión de los iones calcio a cada uno de los EF-hand para producir la desrepresión necesita de un cambio conformacional que debe propagarse a lo largo de toda la proteína y que basta que un solo dominio EF-hand no sea sensible al calcio para que todo el proceso quede bloqueado, con lo que sólo la ocupación por calcio de todas las EF-hand funcionales desencadena el cambio de actividad de la proteína.

Resultados sobre las propiedades de unión a iones de DREAM (Craig y cols., 2002) demuestran que un mol de la proteína une un mol de calcio con una afinidad relativa alta y otros tres moles más de calcio por mol de proteína se unen con una afinidad relativa menor, describiendo la presencia de 4 dominios de unión a calcio, uno con alta afinidad, otro con menor afinidad y otros dos dominios más con una afinidad relativa similar entre ellos pero mucho menor a los dos anteriores y proponen a la 3ª o 4ª mano de calcio como el dominio de alta afinidad, lo que coincide con nuestra previsión de que la 1ª EF-hand pudiera tener una muy baja afinidad al no mantener estrictamente la secuencia consenso. Estos resultados de la afinidad de las distintas EF-hand por el calcio apoyan un modelo de cooperación positiva para la unión de los 4 moles de calcio por un mol de la proteína.

El modelo que podemos proponer es que la 3ª ó 4ª EF-hand, una de ellas es la primera en unir el primer ion calcio (alta afinidad) y esto provoca un cambio conformacional en la proteína que facilita la entrada del calcio en el resto de manos, de manera progresiva y continuada con un orden específico (orden de afinidad por el calcio), que a su vez está generando en la proteína un cambio conformacional generalizado, en una determinada dirección. Escalando esta posibilidad al tetrámero, nos presenta un mecanismo que no sólo se esté potenciando en cada monómero sino que de manera simultánea estará ocurriendo en cada unidad del tetrámero. Todo esto podría estar generando el cambio conformacional necesario para que el tetrámero se rompiera en dímeros o monómeros, posibilidad que proponen los resultados con proteína recombinante de Osawa y cols., si bien, en nuestro caso, partiendo de células HEK293 sobreexpresando DREAM-myc no observamos modificación de los complejos debida a la presencia de calcio.

Lo que si es seguro que provoca la unión del calcio a DREAM es la pérdida de unión al DRE y la consiguiente desrepresión de la transcripción del promotor diana.

La presencia de un mol de calcio junto con un mol de DREAM apenas afecta a la estructura de la proteína, mientras que la presencia de 3 o 4 moles de calcio por mol de DREAM provoca fuertes cambios estructurales a nivel secundario y terciario (Craig y cols., 2002). Esto confirma los resultados de nuestros análisis de emisión de fluorescencia con DREAM recombinante (Carrión y cols., 1999).

El calcio provoca un aumento en el tamaño de las alpha-hélices de cada dominio EF-hand en un aminoácido por hélice, lo que puede propagarse en un cambio conformacional de toda la proteína (Craig y cols., 2002) y apoyándonos en ellos proponemos el siguiente modelo (Fig 68).

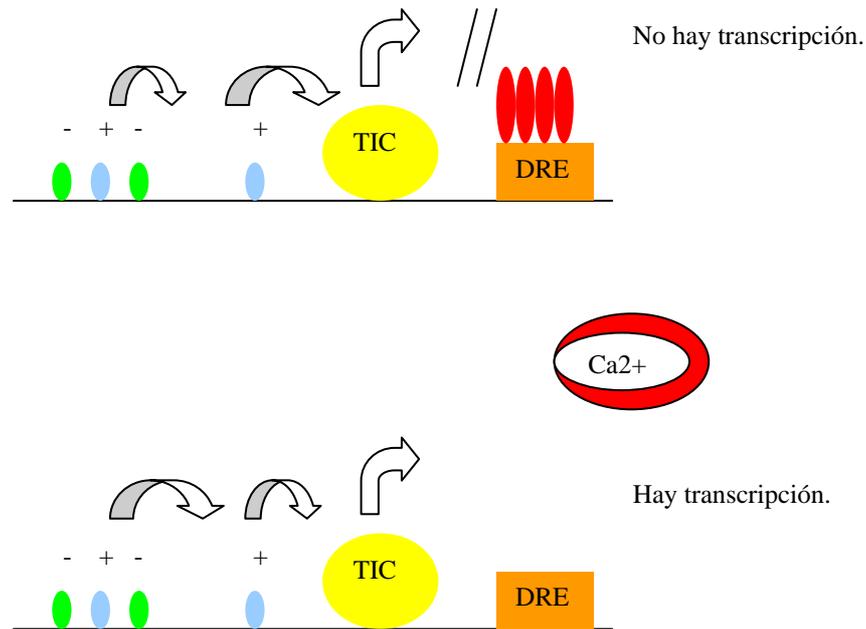


Fig (68). DREAM unido al DRE está bloqueando la transcripción. Con la unión del calcio a DREAM se produce un cambio conformacional que provoca que DREAM se suelte del DRE permitiendo que se lleve a cabo la transcripción.

Todos estos resultados e hipótesis representan un mecanismo directo para la inducción de la expresión génica dependiente de calcio e independiente de cambios en la actividad de otros efectores transcripcionales a través de fosforilación o interacciones proteína-proteína (Carrión y cols., 1999, Ledo y cols., 2000.a).

Partiendo de la premisa de que DREAM se une al DRE como tetrámero y conociendo la insensibilidad al calcio de los mutantes en EF-hand planteamos la posibilidad de que dichos mutantes pudieran comportarse como dominantes negativos, de manera que la presencia de una sola molécula de DREAM mutado en EF-hand dentro del tetrámero fuera suficiente para bloquear la respuesta a la estimulación con calcio.

Para ello y siguiendo el modelo planteado anteriormente, la mutación en una sólo EF-hand de uno de los monómeros del tetrámero estaría bloqueando todo el proceso de cambio conformacional del tetrámero y esto sería mucho más claro cuando la mutación se realiza sobre la 3ª o la 4ª EF-hand, como punto de alta afinidad por el calcio.

Experimentos de transfección transitoria en células HEK293 confirmaron esta hipótesis (Ledo y cols., 2000.a) así como la idea de que DREAM se une al ADN como un multímero en el que la regulación por calcio alcanza un grado superior de control de la interacción entre DREAM y el DRE (Ledo y cols., 2000.a), para el que presentamos el siguiente modelo (Fig 69).

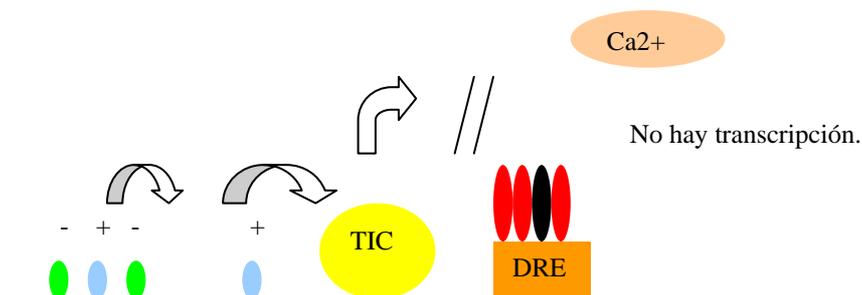


Fig (69). La presencia de una molécula de DREAM mutada en EF-hand dentro del tetrámero es suficiente para bloquear la sensibilidad del complejo al calcio y bloquear la transcripción dependiente de calcio. A la vista de este resultado podemos concluir que el mutante en las manos de calcio puede comportarse como un mutante dominante negativo en un fondo de DREAM salvaje, para la estimulación por calcio. En el esquema se representa la presencia del mutante en color negro.

Experimentos utilizando el fragmento C-terminal de DREAM (aminoácidos del 65 al 256) muestran que es capaz de formar tetrámeros en ausencia de calcio, que pasan a ser dímeros en presencia de calcio (Osawa y cols., 2001), lo que supone una muestra más de la importancia de la oligomerización de DREAM como respuesta a la ausencia o presencia de calcio y las implicaciones estructurales y funcionales de la proteína, y aporta un dato experimental de la rotura del tetrámero en presencia de calcio.

A parte de la unión del calcio a DREAM, la proteína también puede unir magnesio, aunque con una menor afinidad que por el calcio (1 mol de magnesio/ 1 mol de DREAM, frente a los 4 moles de calcio /1 mol de DREAM). El sitio de unión para el magnesio no parece ser el mismo que el de alta afinidad para el calcio (3^a ó 4^a EF hand) y además la unión del magnesio a DREAM no parece afectar significativamente a la estructura de la proteína (Craig y cols.2002), aunque al igual que en factores como CREB, podría contribuir a la estabilidad de la unión al ADN.

Para chequear esta posibilidad podrían plantearse experimentos de retardo en ausencia de magnesio y en cantidades crecientes de este ion para analizar la formación de bandas de retardo y la unión de los complejos al DRE en south-western.

7.3. La interacción DREAM- α CREM a través de LCDs desreprime la transcripción dependiente del DRE.

La eliminación de la interacción entre DREAM y el DRE provoca una desrepresión regulada no sólo por calcio sino también por activación de PKA, mediante una interacción específica proteína-proteína entre DREAM y α CREM mediada por motivos LCDs presentes en ambas proteínas. Además, hemos demostrado que la expresión del gen diana prodinorfina está aumentada en células de neuroblastoma humano como consecuencia de la interacción DREAM- α CREM (Ledo y cols., 2000.b).

La expresión del gen de CREM está controlada por una región reguladora en posición upstream (P1) que marca los niveles de represión y activación de la transcripción y una región reguladora intragénica (P2) que produce la proteína represora ICER (Molina y cols., 1993). El gen de CREM contiene varios exones, y las diferentes isoformas de CREM o ICER se generan por procesamiento alternativo de los transcritos primarios (Laoide y cols., 1993). La interacción con DREAM es específica de las isoformas α y ϵ del represor CREM, mientras que otras isoformas represoras (β y γ) y ICER o activadores como las isoformas I y II de τ CREM o CREB no bloquean la unión de DREAM a los sitios DRE. Estos resultados revelan, en un primer momento, diferencias funcionales entre las isoformas represoras de CREM en la capacidad para desacoplar la unión entre DREAM y el DRE. Partiendo de que no se han observado diferencias funcionales o de distribución de las diferentes isoformas represoras de CREM, el significado funcional de su interacción diferencial con DREAM queda actualmente sin respuesta.

El análisis de los dominios y la mutagénesis dirigida de la proteína CREM ha permitido identificar dos motivos LCDs localizados en el KID y el dominio LZ de α CREM, que son responsables de la interacción con DREAM. La ausencia del LCD del extremo N-terminal en ICER o la delección del LCD en el extremo C-terminal en α CREMALZ, elimina completamente la interacción con DREAM. Además, el espaciamiento entre los dos LCDs parece ser crucial, ya que el activador τ CREM-I y CREB, que presentan el dominio de transactivación Q2 entre los dos LCDs, no bloquean la interacción de DREAM con el DRE. Eliminando el dominio Q2 en la proteína ϵ CREM se recupera la interacción con DREAM.

El motivo LCD se encontró en coactivadores (NcoA-1 y p/CIP) y correpresores (N-CoR y SMRT) implicado en las interacciones proteína-proteína con receptores de hormonas nucleares o CBP (Heery y cols.1997, Hu y cols., 1999). Los LCDs en los extremos N y C terminal de CBP median la interacción con los receptores nucleares y p/CIP, respectivamente (Tochia y cols., 1997).

Hasta la fecha se han descrito dos tipos de LCDs: la caja NR (receptores nucleares) y la caja CoRNR, cuyas secuencias consenso son LxxLL y L/IxxV/II, respectivamente, donde x indica un aminoácido cualquiera (Hu y cols., 1999). Ambos tipos de LCDs aparecen en α CREM pero con orientaciones inversas (ILNEL y LIEEL) comparadas con la caja NR consenso, lo que podría definir un tercer tipo de LCD, ya que el significado funcional de una orientación inversa de los LCDs no se conoce. Se sabía que la estructura α -hélice del LCD se une a una región hidrofóbica localizada en el dominio

de unión al ligando del receptor nuclear (Shiau y cols., 1998) y la interacción suele estar regulada por los aminoácidos flanqueantes al LCD (Torchia y cols., 1998). Esto tiene una importancia particular en el caso del LCD en el extremo C-terminal de α CREM, donde los residuos flanqueantes, diferentes de los de un LCD similar en el C-terminal de β CREM, confieren la capacidad diferencial para interactuar con DREAM (Ledo y cols., 2000.b).

En paralelo a los LCDs en α CREM, hay dos LCDs en DREAM, en los extremos N y C terminales, necesarios para la interacción con α CREM que se ajustan a la secuencia consenso de las cajas CoRNR y NR respectivamente, con la orientación directa. No se conoce que LCD de α CREM interactúa con uno u otro LCD de DREAM, futuros estudios utilizando resonancia magnética nuclear para resolver la estructura en solución de DREAM unido a α CREM puede clarificar este punto, aunque lo realmente importante para nosotros, a nivel funcional, era la primera descripción de LCDs funcionales en proteínas distintas a receptores nucleares y los activadores y correpresores con los que interactúan. De esta manera, nuestros resultados aumentan la importancia funcional de los motivos LCDs en el contexto de la expresión génica y de cómo están orquestadas las interacciones entre proteínas nucleares (Ledo y cols., 2000.b).

La interacción entre α CREM y DREAM no requiere de la fosforilación de α CREM dependiente de PKA, si bien la interacción se potencia tras la fosforilación de α CREM. Así, una fosforilación rápida de bajos niveles de α CREM preexistentes o bien la acumulación de α CREM podrían iniciar la desrepresión del gen de prodinorfina tras el tratamiento con forskolina en células de neuroblastoma humano. El corto tiempo de respuesta en el que DREAM se separa del DRE en células NB69 tratadas con forskolina (Carrión y cols., 1998) puede sugerir una modificación postraduccional rápida y reversible, como por ejemplo la fosforilación de α CREM. Por otro lado, la respuesta mucho más lenta pero más estable de la inducción de prodinorfina en células SK-N-MC, donde el incremento del mensajero de prodinorfina se hace significativo a partir de las 12 horas y es máximo a los dos días del tratamiento con forskolina (Carrión y cols., 1998), está indicando un aumento de los niveles de proteína α CREM.

La activación transcripcional del gen de CREM dependiente de PKA, está restringida al promotor P2, mientras que la transcripción de CREM dependiente del promotor P1 no responde a la estimulación por AMPc (Molina y cols., 1993). Un incremento en la acumulación de los transcritos derivados del promotor P1 es poco probable que ocurra a nivel transcripcional. Ahora se conocen efectos específicos a nivel postraduccional en testículos durante el desarrollo (Foulkes y cols., 1993). En el caso de neuronas supraópticas tras estimulación osmótica (Mellström y cols., 1993), se producen modificaciones postranscripcionales provocando una acumulación específica de isoformas de CREM activadoras o represoras, respectivamente. Los mecanismos para explicar esto podrían involucrar a una alteración selectiva de los mecanismos de procesamiento alternativo o a cambios diferenciales en la estabilidad de los transcritos derivados del promotor P1. La acumulación selectiva de la proteína represora α CREM en células SK-N-MC y NB69 tras el tratamiento con forskolina no provoca un cambio en los niveles de la isoforma activadora τ CREM, lo que sustenta la hipótesis de un cambio selectivo a nivel postraduccional tras la activación por PKA.

Los mecanismos que controlan el procesamiento diferencial de los transcritos de CREM y su regulación tras activación por PKA, aún son desconocidos.

El mecanismo por el cual α CREM elimina la interacción de DREAM con el DRE, aparentemente, no implica una competición directa por el ADN, ya que α CREM no muestra ninguna afinidad por el DRE y los mutantes de DREAM incapaces de interactuar con α CREM se mantienen unidos al DRE (Ledo y cols., 2000.b) (Fig 70).

De manera alternativa, α CREM podría afectar a la estabilidad de los tetrámeros de DREAM, necesarios para una interacción efectiva con el sitio DRE (Carrión y cols., 1999). Utilizando un sistema de dos híbridos en células de mamífero igual al que planteamos para el estudio del efecto del calcio en la oligomerización de DREAM, podríamos intentar definir como α CREM podría afectar al proceso de oligomerización.

Lo que si sabemos en este sentido es la capacidad de los mutantes de DREAM en los LCDs de comportarse como dominantes negativos para la desrepresión por α CREM, poniendo de manifiesto que la presencia de una sola molécula de DREAM mutado en un LCD dentro del tetrámero es suficiente para prevenir la interacción con α CREM y mantener el tetrámero unido al DRE. Estos resultados apoyan una vez más al tetrámero como complejo funcional de unión y represión transcripcional del DRE, y como los diferentes estados de oligomerización pueden estar controlando la represión, interacción con α CREM, etc.

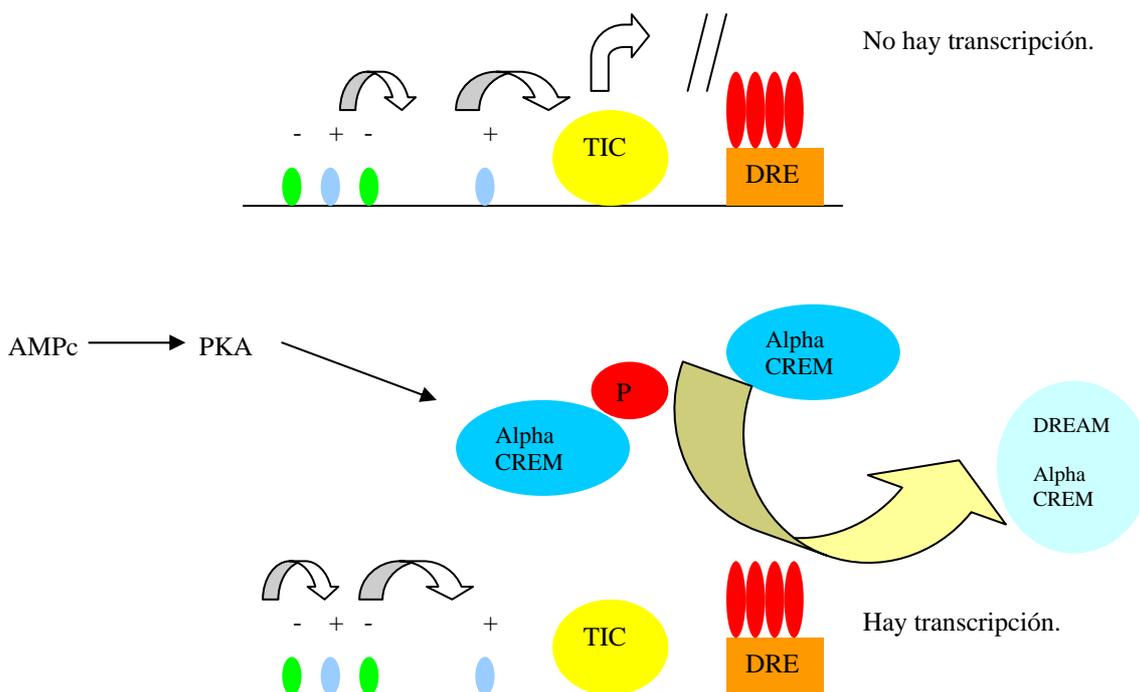


Fig (70). Modelo propuesto para la desrepresión del sitio DRE mediada por activación de PKA y α CREM. Tanto el α CREM preexistente como el fosforilado por la activación de la vía de AMPc y PKA pueden eliminar la unión DREAM-DRE y desreprimir el gen de prodinorfina.

Una posibilidad que podemos considerar en el mecanismo de actuación de α CREM sobre DREAM es que no sólo, la interacción entre las dos proteínas provoca una pérdida de unión de DREAM al DRE, si no también α CREM podría dirigir a DREAM a rutas de degradación o proteólisis, ya que en algunos western revelados con anticuerpo monoclonal de DREAM sobre extractos totales de células tratadas con forskolina o en las que se sobreexpresa α CREM, podemos observar la aparición de bandas de menor tamaño que el monómero de DREAM que podrían estar indicando una degradación de la proteína, de manera selectiva, bajo estas condiciones experimentales.

Nuestros resultados muestran que DREAM interacciona con α/ε CREM en ausencia de calcio unido a DREAM, lo que indica que la desrepresión transcripcional de los sitios DRE puede ser activada independientemente a través de dos vías principales, calcio y activación por PKA. Estimulos como hormonas o estimulación de receptores de membrana suelen provocar elevación en los niveles de calcio y AMPc intracelulares, y estos dos mecanismos podrían desreprimir la transcripción dependiente del DRE de manera cooperativa y a su vez, que la unión de DREAM al DRE esté controlada por dos de las vías principales de la señalización celular, sugiere que la desrepresión dependiente del DRE es un paso necesario en la activación transcripcional de muchos genes.

Un experimento que podría arrojar información muy útil sería la coimmunoprecipitación de DREAM con α CREM, en presencia y ausencia de calcio en el ensayo o de forskolina sobre el cultivo, para conocer que complejos de DREAM (monómero, dímero o tetramero) interaccionan con α CREM y como los tratamientos pueden modificar este resultado.

7.4. DREAM bloquea la transcripción dependiente del CRE a través de la interacción con CREB y el bloqueo del reclutamiento de CBP.

Hemos identificado un nuevo mecanismo de interacción proteína-proteína entre el represor transcripcional DREAM y CREB a través de dominios α -hélice del tipo LCD, presentes en ambas proteínas y que es independiente del estado de fosforilación de CREB. La unión de DREAM evita el reclutamiento de CBP por parte de CREB fosforilado y de esta manera afecta a la transcripción dependiente del CRE.

La interacción DREAM- α CREM sobre el DRE es doble y mediada por dos LCDs en cada proteína, mientras que en el caso de la interacción DREAM-CREB sobre el CRE, la interacción se lleva a cabo a través de un solo punto, controlada por un LCD en cada proteína.

Nuestros resultados proponen la existencia de un paso intermedio entre la fosforilación de CREB y el reclutamiento de CBP que implica una desunión de DREAM del KID de CREB. La existencia de pasos reguladores intermedios era algo planteado en diferentes trabajos de otros laboratorios que muestran que la fosforilación de CREB es necesaria pero no suficiente para el reclutamiento de CBP y la transactivación dependiente del CRE (Shaywitz y cols., 2000). Recientemente se ha propuesto la existencia de un factor inhibidor para la interacción KID-KIX que podría acometer estos efectos diferenciales en el reclutamiento de CBP por vías de AMPc y mitógenos (Mayr y cols., 2001), si ese papel inhibidor corresponde exclusivamente a DREAM o hay otros factores que actúen a ese nivel es algo que al día de hoy no conocemos.

Es algo completamente aceptado que la interacción proteína-proteína estabiliza el complejo KID-KIX e incrementa la transcripción dependiente del CRE. Una regulación positiva de la interacción del KID de CREB con el KIX de CBP se refleja en la estabilización que aporta la interacción del C-terminal de c-Jun con el dominio C/H2 de CBP (Hu y cols., 1999). Además los factores que controlan la regulación de CBP, también controlan la transcripción dependiente de CBP (Soutoglou y cols., 2001). Son varios los factores de transcripción, incluyendo al factor 1 nuclear de hepatocitos (HNF-1 a), HNF-4 y Sp1, que incrementan la actividad HDAC de CBP y de los factores asociados a CBP (P/CAF) (Soutoglou y cols., 2001) y podrían afectar a la transcripción dependiente de CREB sobre promotores específicos.

Las modificaciones sobre CBP, derivadas de vías de señalización, pueden representar otro punto regulador prioritario para el reclutamiento de CBP al complejo de transcripción. La sobreexpresión del coactivador asociado a arginina metil transferasa 1 (CARM1) capaz de metilar CBP en el residuo arginina 600 del KIX, un residuo clave para el correcto plegamiento del KIX en la interacción con el KID de CREB provoca que KID y KIX no interaccionen y como resultado la transcripción dependiente de CREB, está bloqueada (Xu y cols., 2001).

La fosforilación de CBP, por diferentes quinasas, incluyendo las que participan en las vías de señalización de calcio y AMPc, podría afectar a la transactivación de CBP (Vo y Goodman., 2001). La validación de estos mecanismos está amparada por la identificación de los residuos que están fosforilados en cada caso. También se ha descrito recientemente que la fosforilación de CBP dependiente de activación de

CaMKIV en serina 301 contribuye a la transcripción dependiente de CREB/CBP (Impey y cols., 2002). Otro ejemplo es la fosforilación de CBP en serina 436 por PI3K, tras el tratamiento con factores de crecimiento, necesaria para el reclutamiento de CBP a los complejos transcripcionales sobre elementos de respuesta AP-1 y Pit-1 (Zanger y cols., 2001).

La unión del calcio a los dominios EF-hand en proteínas de unión a calcio, provoca un cambio conformacional que controla la actividad de la proteína dependiente de calcio. En el caso de DREAM esto sólo ocurre cuando los 4 dominios EF-hand están ocupados por calcio (Craig y cols., 2002), lo que confirma que se necesitan todos los EF-hand de DREAM con calcio para que se produzca la desunión del ADN. Estudios futuros podrían indicar si también es necesario que todos los EF-hand estén unidos a calcio para que se produzca la pérdida de interacción de DREAM con CREB o CREM. En cualquier caso, lo más interesante es que el mutante dominante negativo EFmDREAM bloquea la transactivación del reportero pSomCAT inducida por diferentes estímulos, incluyendo la sobreexpresión de la subunidad catalítica de PKA. Estos resultados sugieren un papel central de las movilizaciones de calcio en la transcripción basal dependiente del CRE.

La fuerza de la interacción KID-KIX determina la magnitud de la respuesta transcripcional dependiente del CRE. La fosforilación de la serina 133 en el KID provoca un cambio conformacional que permite la interacción con el KIX. Se han descrito diferentes mutaciones en el KID o en el KIX que facilitan la interacción entre ambos sin la necesidad de fosforilación (Cardinaux y cols., 2000). En nuestro trabajo mostramos la capacidad de DREAM para interactuar con CREM y CREB y bloquear su unión a los sitios CRE, independiente de la fosforilación en los dominios KID. Estos resultados van en paralelo con los resultados que muestran que la fosforilación de la serina 68 no es necesaria para la doble interacción entre α CREM y DREAM (Ledo y cols., 2000.b). De igual manera, el mutante EFmDREAM es capaz de bloquear la interacción KID-KIX, incluso con la fosforilación in vitro por PKA de la serina 133 de CREB.

Futuros estudios de resonancia magnética nuclear nos ayudarán a conocer la estructura de DREAM, unido y no unido a CREM/CREB, resultados necesarios para entender el efecto diferencial de la fosforilación y la estequiometría de la interacción.

La interacción entre los LCDs de DREAM y los LCDs de las proteínas CREM y CREB está en concordancia con una función cada vez más importante y polivalente de estos pequeños dominios en las proteínas a nivel de la regulación transcripcional. Los LCDs localizados en el N- y C-terminal de CBP median la interacción con los receptores nucleares y P/CIP, respectivamente (Torchia y cols., 1997), pero además, en nuestro trabajo mostramos que los LCDs son responsables del reclutamiento de CBP por parte de CREB fosforilado y también del bloqueo por parte de DREAM (Ledo y cols., 2002), como se representa en el siguiente modelo (Fig 71).

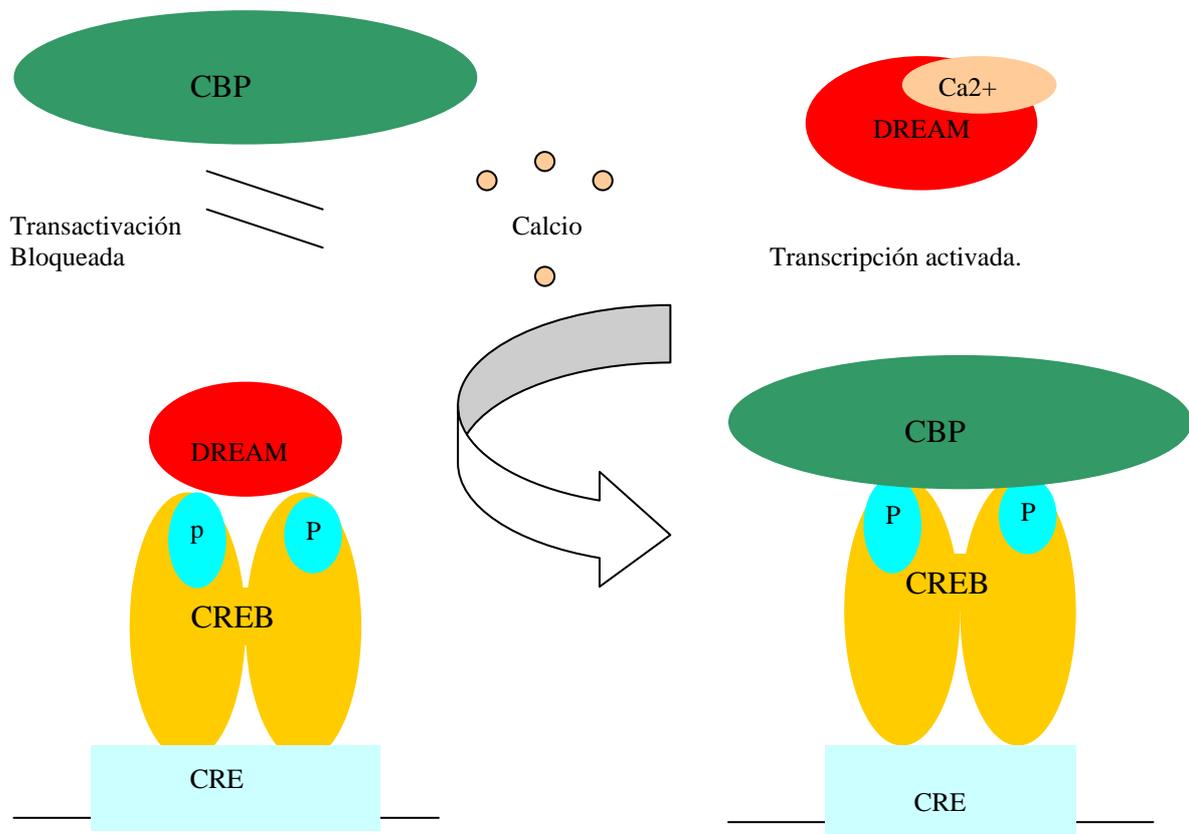


Fig (71). Modelo de actuación de DREAM en el bloqueo de la interacción CREB-CBP. Represión y activación de la transcripción CRE-dependiente.

CREB fosforilado y como dímero se une a la secuencia CRE, dentro de determinados promotores diana, con niveles de actividad transcripcional baja en situación basal. En esta situación basal, DREAM puede estar interaccionando con CREB a través de los LCDs, de manera que CREB no puede interaccionar con CBP y por lo tanto la transactivación basal está reprimida. Esto se comprueba con la utilización de la transfección del antisentido de DREAM que provoca un aumento en la transcripción basal de promotores controlados transcripcionalmente por un CRE, como el promotor de somatostatina.

Estímulos que aumentan los niveles de calcio intracelulares van a activar vías de quinasas que actúan sobre CREB y a la vez, el mismo calcio provoca un cambio conformacional en DREAM, al unirse a sus EF-hand, que hace que éste deje de interaccionar con CREB, de manera que CREB queda libre y fosforilado, condiciones necesarias para la interacción con CBP y que se lleve a cabo la transactivación transcripcional.

Este modelo pone de manifiesto que las vías de fosforilación de CREB, no aseguran la transactivación sólo por la fosforilación de CREB, si no que posiblemente también sea necesario que modifiquen a DREAM (a nivel de calcio o bien por fosforilaciones aún desconocidas) que provoquen la pérdida de interacción entre DREAM y CREB, para que se pueda dar el contacto con CBP y la transactivación.

La presencia del mutante en las EF-hand de DREAM, pone de manifiesto este modelo al permanecer unido a CREB en presencia de calcio, impidiendo que pueda interactuar con CBP, a pesar de estar fosforilado, y bloqueando de esta manera la transcripción.

7.5. Genes diana de la transcripción dependiente de DREAM.

La identificación de la secuencia DRE en el promotor de prodinorfina humana, que se utilizó para el aislamiento y clonaje de DREAM, supuso la primera diana del efecto transcripcional de DREAM. La identificación de la zona central del DRE de prodinorfina por comparación con otros promotores de prodinorfina de diferentes especies nos permitió acotar el consenso de la secuencia DRE (Carrión et al., 1998).

Una vez llegados a este punto, el número de potenciales secuencias DRE en promotores de otros genes se ha disparado. Algunos de los casos en los que hemos podido comprobar un efecto represor de DREAM son genes tempranos como c-fos, c-jun o ICER (Ledo y cols., 2000.a) para los que hemos demostrado un efecto de DREAM en transfección transitoria y en algunos casos también disponemos de evidencias in vitro con ensayos de retardo (Carrión y cols 1999, Ledo y cols., 2000.a).

La represión de la activación de estos genes tempranos utilizando mutantes dominantes negativos de DREAM nos permitiría bloquear cascadas de activación de segundos genes, controlando la respuesta transcripcional no sólo a corto plazo sino extendiéndose a procesos más duraderos.

Fuera de esta memoria, en resultados del laboratorio comenzamos a tener pruebas de la regulación de otros promotores como el del ligando de Fas, BDNF, Fra2 y otros de los que aún quedan muchos experimentos futuros antes de poder concluir un efecto de DREAM sobre estos promotores.

Además, nuestros resultados apoyan dos modelos de represión de la transcripción por DREAM, uno por el efecto directo de la unión de DREAM al sitio DRE; y otro a través de la interacción proteína-proteína de DREAM con otros factores de transcripción, como los de la familia de CREB y CREM. Todo esto propone un modelo en el que la represión ejercida por DREAM se hace más fuerte al utilizar más de una estrategia para conseguir el bloqueo de la transcripción.

Un buen ejemplo de estos dos mecanismos actuando conjuntamente podría ser el promotor de c-fos que presenta dos sitios DRE en posición downstream de la caja TATA pero también un elemento CRE.

Bajo esta situación, podríamos intentar discernir si los dos mecanismos pueden cooperar para conseguir niveles de represión mayores que si sólo estuviera presente uno de ellos. Partiendo del promotor de c-fos acoplado al gen reportero CAT, realizando mutaciones puntuales en los elementos reguladores para anularlos y la combinación de estas mutaciones, por ejemplo, comparando la construcción salvaje con la mutada en uno o los dos sitios DRE podríamos saber si la presencia de más de un sitio DRE en el mismo promotor contribuye a una represión de mayor grado; la eliminación de estos DRE eliminaría el efecto represor directo de la unión de DREAM a los DRE pero no la posible represión sobre el elemento CRE por la interacción con CREB.

A su vez, de manera reciproca, la mutación sólo del sitio CRE eliminaría la posible represión por la interacción CREB-DREAM, aunque también la contribución de CREB-CRE a la expresión basal del reportero (Fig 72).

Si sobre todo este sistema añadimos los posibles tratamientos descritos para la activación del promotor de c-fos, así como la amplia batería de mutantes de DREAM y CREB y sus capacidades para bloquear ciertos estímulos, no sólo nos permitirían conocer una aproximación del funcionamiento de estas proteínas y sus interacciones sobre un promotor determinado sino también nos permitirían discernir con más detalle la contribución de cada una de las vías sobre cada uno de los elementos reguladores del promotor .

Los resultados de este tipo de experimentos nos ayudarán a entender mejor posibles resultados in vivo, sobre la expresión de este promotor o cualquier otro en el que estos elementos reguladores estén controlado la expresión génica, así como la participación de los mutantes de DREAM en ratones transgenicos.

En definitiva, podrían aportar una primera aproximación a los complejos mecanismos que controlan la transcripción en promotores complejos como el de c-fos.

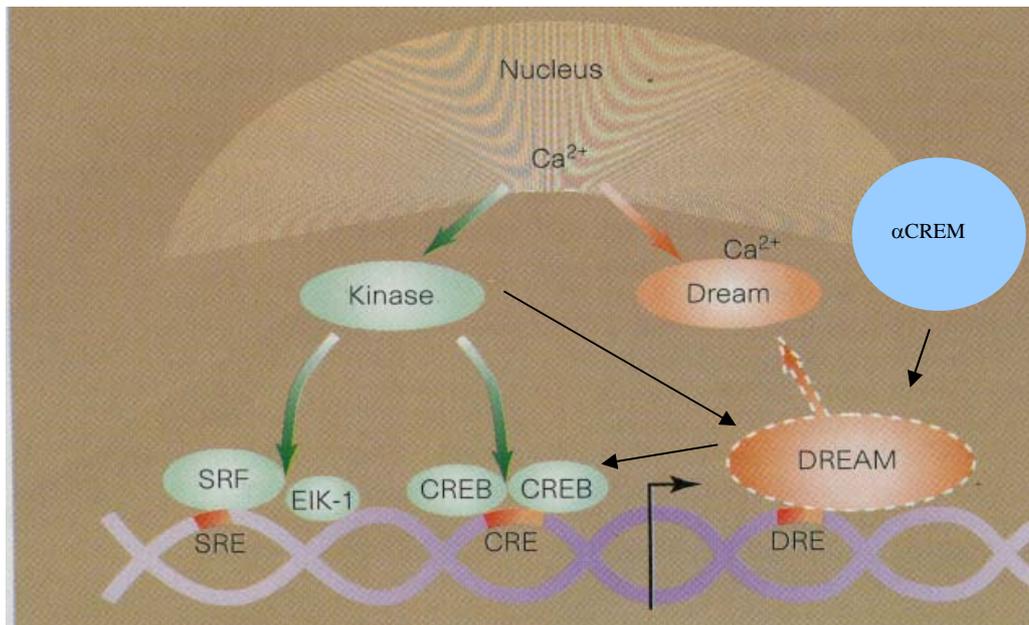


Fig (72). Situación sobre el promotor de c-fos como modelo de las distintas posibilidades de regulación transcripcional mediadas por DREAM. Figura adaptada de Nature 398:29-30,1999.

La preparación de ratones transgénicos con los diferentes mutantes de DREAM en EF-hand, LCDs y las combinaciones de ambos, para sistema nervioso, timo, testículos, tiroides (tejidos en los que hay una gran expresión de DREAM) (Carrión y cols., 1999),

utilizando promotores específicos de tejido nos permitirán arrojar luz sobre la función de DREAM in vivo en el control específico de la expresión génica, así como de otras muchas funciones en otros niveles celulares y fisiológicos.

A inicios del año 2002 se publicó el ratón Knock-out de DREAM (Hai-Ying y cols., 2002) en el que de manera muy marcada está reducida la respuesta del animal en modelos de dolor visceral, mecánico, y térmico agudo, así como una reducción del comportamiento de dolor en modelos de inflamación. La falta de DREAM no parece afectar a funciones motoras ni memoria. El mecanismo molecular que explica en parte estos resultados es la presencia de niveles altos de ARNm de prodinorfina y péptidos de dinorfina A en médula espinal, que de manera constante pueden estar disparando la vía de señalización a partir del receptor kappa opioide.

Todos estos resultados confirman nuestros resultados sobre el control que ejerce DREAM sobre la expresión de prodinorfina, a la vez que presentan a DREAM como un punto crítico como represor transcripcional en el procesamiento del dolor.

Con estos resultados del ratón knock-out de DREAM como molde podemos hipotetizar que los resultados de un transgénico de DREAM con un dominante negativo para la vía de calcio, AMPc o ambas utilizando los mutantes 234EFmDREAM, DREAML47,52V o 234EFmDREAML47,52V, respectivamente, podrían ser contrarios a estos, con una disminución de los niveles de expresión de prodinorfina y péptidos de dinorfina, con lo que las respuestas de comportamiento podrían ser, a priori, opuestos a los obtenidos con el ratón knock-out.

Desde un punto de vista de localización de posibles dianas de DREAM, la utilización de transgénicos podría ser más ventajoso que el knock-out, ya que a nivel de transcripción basal, los efectos de DREAM podrían no ser destacables para algunas dianas, con lo que la falta de DREAM tampoco podría provocar un efecto claro, en cambio, la presencia de un mutante dominante negativo de DREAM podría bloquear de manera más o menos eficaz determinadas vías de activación, de esta manera se pondrían de manifiesto dianas transcripcionales de DREAM que estuvieran bloqueadas por alguno de los mutantes.

La utilización de microarrays, ya no sólo sobre la unión de DREAM endógeno a dianas transcripcionales, sino utilizando la comparación entre ratones normales y el transgénico con mutantes dominantes negativos, podrían ser muy informativos.

Una de las posibilidades experimentales con mayor potencial para la identificación de posibles promotores controlados por DREAM consiste en ensayos de coimmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo anti-DREAM y la hibridación con estos productos de un “chip” en el que se encuentren fijados un amplísimo número de promotores. De esta manera podríamos obtener de una manera casi directa una lista de promotores en los que DREAM podría estar ejecutando algún tipo de regulación.

Además de la localización estricta de dianas de transcripción reguladas por DREAM, ensayos de dos híbridos de levaduras con DREAM como cebo nos permitirían conocer interacciones proteína-proteína de este factor de transcripción y la posibilidad de otras funciones de DREAM en otros procesos o mecanismo celulares.

Nuestros resultados muestran que DREAM interacciona con miembros de la familia de CREM y CREB e indican un amplio papel funcional de la proteína DREAM/KchIP3/Calsenilina, capaz de participar en diferentes funciones celulares a través de la interacción con el ADN o con distintas proteínas, incluyendo α/ϵ CREM, canales de potasio Kv4 y presenilinas (An y cols.2000, Buxbaum y cols.,1999). La multifuncionalidad de DREAM así como su localización nuclear y citoplásmica, con funciones específicas en cada compartimento, habían sido descritas previamente para la calmodulina, otra proteína de unión a calcio que interacciona con canales de potasio dependientes de voltaje para la desensibilización lenta en la membrana celular y participa en la permeabilidad celular (Sah., 1996), control de la actividad de muchas enzimas citosólicas (revisadas por Ikura., 1996) y regulación de la transcripción tras unión a nucleoproteínas HLH (Corneliussen y cols., 1994) y quinasas dependiente de calmodulina en el núcleo (Santella y cols., 1997), si bien calmodulina no se ha demostrado su unión directa al ADN. DREAM al igual que calmodulina, es un buen ejemplo de la multifuncionalidad que puede llegar a ejercer una misma proteína.

8. CONCLUSIONES.

1.- DREAM es un represor transcripcional que se une específicamente a la secuencia DRE (PuNGT/GCA), para bloquear la transcripción de genes diana (prodinorfina, c-fos, c-jun, icer, etc).

2.- El aumento de los niveles intracelulares de calcio y la unión de este a los dominios EF-hand de DREAM, provoca un cambio conformacional en la proteína que fuerza la desunión entre DREAM y el sitio DRE, eliminando el efecto represor y activando la transcripción.

Mutantes en los EF-hand de DREAM, insensibles a los aumentos de calcio, bloquean la activación transcripcional por esta vía actuando como mutantes dominantes negativos.

3.- La vía de señalización de AMPc-PKA provoca una desunión entre DREAM y el DRE que se traduce en un aumento de la transcripción de genes diana de DREAM.

El mecanismo molecular que controla este proceso es una interacción entre DREAM y α CREM a través de dos dominios LCD presentes en ambas proteínas, lo que describe una nueva funcionalidad para dichos dominios.

La fosforilación de α CREM dependiente de PKA no es necesaria para la interacción DREAM- α CREM aunque sí la potencia.

Mutantes de DREAM en LCD, insensibles a la interacción con α CREM, bloquean la activación transcripcional por esta vía actuando como mutantes dominantes negativos.

4.- La interacción de DREAM con los factores de transcripción de la familia CREB/CREM, a través de dominios LCD amino terminales de ambas proteínas, evita el reclutamiento de CBP y de esta manera bloquea la transcripción dependiente del sitio CRE.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Alvarez-Bolado G, Fairen A, Douglass J, Naranjo JR. Expression of the prodynorphin gene in the developing and adult cerebral cortex of the rat: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 1990 Oct 15;300(3):287-300.

An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature.* 2000 Feb 3;403(6769):553-6.

Ball LJ, Murzina NV, Broadhurst RW, Raine AR, Archer SJ, Stott FJ, Murzin AG, Singh PB, Domaille PJ, Laue ED. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J.* 1997 May 1;16(9):2473-81

Baudier J, Bergeret E, Bertacchi N, Weintraub H, Gagnon J, Garin J. Interactions of myogenic bHLH transcription factors with calcium-binding calmodulin and S100a (alpha alpha) proteins. *Biochemistry.* 1995 Jun 20;34(24):7834-46.

Beato M. Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J.* 1991 Apr;5(7):2044-51.

Bessis A, Champiaux N, Chatelin L, Changeux JP. The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5906-11.

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell.* 1996 Dec 27;87(7):1203-14.

Breathnach R, Chambon. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:349-83.

Brindle P, Linke S, Montminy M. Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature.* 1993 Aug 26;364(6440):821-4.

Brivanlou AH, Darnell JE Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science.* 2002 Feb 1;295(5556):813-8.

Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11041-8.

Burke LJ, Baniahmad A. Co-repressors 2000. *FASEB J.* 2000 Oct;14(13):1876-88.7

Burley SK, Roeder RG. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem.* 1996;65:769-99.

Buxbaum JD, Choi EK, Luo Y, Lilliehook C, Crowley AC, Merriam DE, Wasco W. Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med.* 1998 Oct;4(10):1177-81.

Carcamo J, Buckbinder L, Reinberg D. The initiator directs the assembly of a transcription factor IID-dependent transcription complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 15;88(18):8052-6.

Carcamo J, Maldonado E, Cortes P, Ahn MH, Ha I, Kasai Y, Flint J, Reinberg D. A TATA-like sequence located downstream of the transcription initiation site is required for expression of an RNA polymerase II transcribed gene. *Genes Dev*. 1990 Sep;4(9):1611-22

Cardinaux JR, Notis JC, Zhang Q, Vo N, Craig JC, Fass DM, Brennan RG, Goodman RH. Recruitment of CREB binding protein is sufficient for CREB-mediated gene activation. *Mol Cell Biol*. 2000 Mar;20(5):1546-52.

Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature*. 1999 Mar 4;398(6722):80-4.

Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J*. 1995 Dec 1;14(23):5957-64.

Chadee DN, Hendzel MJ, Tylicski CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, Davie JR. Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem*. 1999 Aug 27;274(35):24914-20.

Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science*. 1998 Sep 4;281(5382):1505-9.

Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):454-7.

Cheng SW, Davies KP, Yung E, Beltran RJ, Yu J, Kalpana GV. c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet*. 1999 May;22(1):102-5.

Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE. Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron*. 1995 Apr;14(4):813-23.

Coleman RA, Taggart AK, Burma S, Chicca JJ 2nd, Pugh BF. TFIIA regulates TBP and TFIID dimers. *Mol Cell*. 1999 Sep;4(3):451-7.

Comb M, Birnberg NC, Seasholtz A, Herbert E, Goodman HM. A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*. 1986 Sep 25-Oct 1;323(6086):353-6.

Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE. EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem*. 1999 Nov 19;274(47):33709-13.

Corneliusson B, Holm M, Waltersson Y, Onions J, Hallberg B, Thornell A, Grundstrom T. Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature*. 1994 Apr 21;368(6473):760-4.

Corneliusson B, Holm M, Waltersson Y, Onions J, Hallberg B, Thornell A, Grundstrom T. Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature*. 1994 Apr 21;368(6473):760-4.

Cosma MP, Tanaka T, Nasmyth K. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*. 1999 Apr 30;97(3):299-311.

Craig TA, Benson LM, Venyaminov SY, Klimtchuk ES, Bajzer Z, Prendergast FG, Naylor S, Kumar R. The metal-binding properties of DREAM: evidence for calcium-mediated changes in DREAM structure. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):10955-66.

Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo.

De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*. 1999 Jul;24(7):281-5.

Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):233-9.

Doenecke D, Albig W, Bode C, Drabent B, Franke K, Gavenis K, Witt O. Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem Cell Biol*. 1997 Jan;107(1):1-10.

Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JJ. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):855-8.

Douglass J, McKinzie AA, Pollock KM. Identification of multiple DNA elements regulating basal and protein kinase A-induced transcriptional expression of the rat prodynorphin gene. *Mol Endocrinol*. 1994 Mar;8(3):333-44.

Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*. 1983 Nov;35(1):79-87.

Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM. Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev*. 1996 Oct 1;10(19):2478-90.

Fletcher C, Heintz N, Roeder RG. Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2b gene. *Cell*. 1987 Dec 4;51(5):773-81.

Foulkes NS, Schlotter F, Pevet P, Sassone-Corsi P. Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature*. 1993 Mar 18;362(6417):264-7.

Fu M, Wang C, Wang J, Zhang X, Sakamaki T, Yeung YG, Chang C, Hopp T, Fuqua SA, Jaffray E, Hay RT, Palvimo JJ, Janne OA, Pestell RG. Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function. *Mol Cell Biol*. 2002 May;22(10):3373-88.

Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*. 1995 Apr 14;268(5208):239-47.

Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000 Jan 15;14(2):121-41.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991 Feb 21;349(6311):704-6.

Gomez-Cuadrado A, Rousseau S, Renaud J, Ruiz-Carrillo A. Repression of the H5 histone gene by a factor from erythrocytes that binds to the region of transcription initiation. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1857-66.

Goodrich JA, Tjian R. TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Jun;6(3):403-9.

Grewal SS, Fass DM, Yao H, Ellig CL, Goodman RH, Stork PJ. Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34433-41.

Groot RP, Derua R, Goris J, Sassone-Corsi P. Phosphorylation and negative regulation of the transcriptional activator CREM by p34cdc2. *Mol Endocrinol*. 1993 Nov;7(11):1495-50.

Gu J, Ren K, Dubner R, Iadarola MJ. Cloning of a DNA binding protein that is a tyrosine kinase substrate and recognizes an upstream initiator-like sequence in the promoter of the prodynorphin gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994 Jul;24(1-4):77-88.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999 Sep 17;98(6):859-69.

Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*. 1997 Jan 16;385(6613):260-5

Hassan AH, Neely KE, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell*. 2001 Mar 23;104(6):817-27.

Heery DM, Hoare S, Hussain S, Parker MG, Sheppard H. Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6695-702.

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 1997 Jun 12;387(6634):733-6.

Hernandez-Cruz A, Sala F, Adams PR. Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science*. 1990 Feb 16;247(4944):858-62.

Hoeffler JP, Meyer TE, Waeber G, Habener JF. Multiple adenosine 3',5'-cyclic [corrected] monophosphate response element DNA-binding proteins generated by gene diversification and alternative exon splicing. *Mol Endocrinol*. 1990 Jun;4(6):920-30.

Hu PP, Harvat BL, Hook SS, Shen X, Wang XF, Means AR. c-Jun enhancement of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-dependent transcription induced by transforming growth factor-beta is independent of c-Jun binding to DNA. *Mol Endocrinol*. 1999 Dec;13(12):2039-48.

Hu SC, Chrivia J, Ghosh A. Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling. *Neuron*. 1999 Apr;22(4):799-808.

Hu X, Lazar MA. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*. 1999 Nov 4;402(6757):93-6.

Hu X, Li Y, Lazar MA. Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(5):1747-58.

Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci*. 1996 Jan;21(1):14-7

Imbalzano AN, Kwon H, Green MR, Kingston RE. Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature*. 1994 Aug 11;370(6489):481-5.

Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H. Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol*. 1997 Sep 1;7(9):689-92.

Impey S, Fong AL, Wang Y, Cardinaux JR, Fass DM, Obrietan K, Wayman GA, Storm DR, Soderling TR, Goodman RH. Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. *Neuron*. 2002 Apr 11;34(2):235-44.

Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B, Smale ST. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1994 Jan;14(1):116-27.

Kadam S, McAlpine GS, Phelan ML, Kingston RE, Jones KA, Emerson BM. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* 2000 Oct 1;14(19):2441-51.

Kalkhoven E, Valentine JE, Heery DM, Parker MG. Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J.* 1998 Jan 2;17(1):232-43.

Keaveney M, Struhl K. Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol Cell.* 1998 May;1(6):917-24.

Kirsh O, Seeler JS, Pichler A, Gast A, Muller S, Miska E, Mathieu M, Harel-Bellan A, Kouzarides T, Melchior F, Dejean A. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* 2002 Jun 3;21(11):2682-91.

Kokubo T, Swanson MJ, Nishikawa JI, Hinnebusch AG, Nakatani Y. The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):1003-12.

Kouzarides T, Ziff E. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature.* 1988 Dec 15;336(6200):646-51.

Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Feb;9(1):40-8.

Kowenz-Leutz E, Leutz A. A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol Cell.* 1999 Nov;4(5):735-43.

Kraner SD, Chong JA, Tsay HJ, Mandel G. Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation. *Neuron.* 1992 Jul;9(1):37-44.

Krichevsky AM, Kosik KS. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron.* 2001 Nov 20;32(4):683-96.

Kurokawa R, Soderstrom M, Horlein A, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld MG, Glass CK. Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature.* 1995 Oct 5;377(6548):451-4.

Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P. The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J.* 1993 Mar;12(3):1179-91.

Latchman DS. POU family transcription factors in the nervous system. *J Cell Physiol.* 1999 May;179(2):126-33.

Ledo F, Carrion AM, Link WA, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM-alphaCREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(24):9120-6.

Ledo F, Link WA, Carrion AM, Echeverria V, Mellstrom B, Naranjo JR. The DREAM-DRE interaction: key nucleotides and dominant negative mutants. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Dec 20;1498(2-3):162-8.

Lee TI, Wyrick JJ, Koh SS, Jennings EG, Gadbois EL, Young RA. Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol*. 1998 Aug;18(8):4455-62.

Lenormand JL, Benayoun B, Guillier M, Vandromme M, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Mos activates myogenic differentiation by promoting heterodimerization of MyoD and E12 proteins. *Mol Cell Biol*. 1997 Feb;17(2):584-93.

Luckow B, Schutz G. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res*. 1987 Jul 10;15(13):5490]

Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol*. 1997 Sep 26;272(3):301-11.

Mackem S, Baumann CT, Hager GL. A glucocorticoid/retinoic acid receptor chimera that displays cytoplasmic/nuclear translocation in response to retinoic acid. A real time sensing assay for nuclear receptor ligands. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):45501-4.

Maldonado E, Reinberg D. News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Jun;7(3):352-61.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):835-9

Massari ME, Grant PA, Pray-Grant MG, Berger SL, Workman JL, Murre C. A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell*. 1999 Jul;4(1):63-73.

Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*. 2000 Jan;20(2):429-40.

Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Aug;2(8):599-609.

Mayr BM, Canettieri G, Montminy MR. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10936-41.

Mellstrom B, Naranjo JR, Foulkes NS, Lafarga M, Sassone-Corsi P. Transcriptional response to cAMP in brain: specific distribution and induction of CREM antagonists. *Neuron*. 1993 Apr;10(4):655-65.

Mellstrom B, Naranjo JR. Ca²⁺-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Feb;12(1):59-63.

Mellstrom B, Naranjo JR. Mechanisms of Ca(2+)-dependent transcription. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Jun;11(3):312-9.

Meloni AR, Smith EJ, Nevins JR. A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 17;96(17):9574-9

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):875-86.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):875-86.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):875-86.

Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(18):6682-6.

Morohashi Y, Hatano N, Ohya S, Takikawa R, Watabiki T, Takasugi N, Imaizumi Y, Tomita T, Iwatsubo T. Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4. *J Biol Chem*. 2002 Apr 26;277(17):14965-75

Muller MM, Gerster T, Schaffner W. Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur J Biochem*. 1988 Oct 1;176(3):485-95.

Nakayama S, Kretsinger RH. Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1994;23:473-507.

Nichols M, Weih F, Schmid W, DeVack C, Kowenz-Leutz E, Luckow B, Boshart M, Schutz G. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J*. 1992 Sep;11(9):3337-46.

Nikolov DB, Hu SH, Lin J, Gasch A, Hoffmann A, Horikoshi M, Chua NH, Roeder RG, Burley SK. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature*. 1992 Nov 5;360(6399):40-6.

Ondek B, Shepard A, Herr W. Discrete elements within the SV40 enhancer region display different cell-specific enhancer activities. *EMBO J.* 1987 Apr;6(4):1017-25.

Osawa M, Tong KI, Lilliehook C, Wasco W, Buxbaum JD, Cheng HY, Penninger JM, Ikura M, Ames JB. Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3. *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):41005-13.

Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science.* 1997 Dec 19;278(5346):2075-80.

Perez-Martin J, Johnson AD. Mutations in chromatin components suppress a defect of Gcn5 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):1049-54.

Perry CA, Annunziato AT. Influence of histone acetylation on the solubility, H1 content and DNase I sensitivity of newly assembled chromatin. *Nucleic Acids Res.* 1989 Jun 12;17(11):4275-91

Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14145-50.

Pugh BF. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene.* 2000 Sep 5;255(1):1-14.

Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature.* 1993 Mar 18;362(6417):219-23.

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707-47.

Sah P. Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 1996 Apr;19(4):150-4.

Santella L, Carafoli E. Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J.* 1997 Nov;11(13):1091-109.

Sasaki S, Lesoon-Wood LA, Dey A, Kuwata T, Weintraub BD, Humphrey G, Yang WM, Seto E, Yen PM, Howard BH, Ozato K. Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *EMBO J.* 1999 Oct 1;18(19):5389-98.

Sassone-Corsi P, Ransone LJ, Verma IM. Cross-talk in signal transduction: TPA-inducible factor jun/AP-1 activates cAMP-responsive enhancer elements. *Oncogene.* 1990 Mar;5(3):427-31.

Sassone-Corsi P. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:355-77.

Seeler JS, Dejean A. SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene*. 2001 Oct 29;20(49):7243-9.

Shaywitz AJ, Dove SL, Kornhauser JM, Hochschild A, Greenberg ME. Magnitude of the CREB-dependent transcriptional response is determined by the strength of the interaction between the kinase-inducible domain of CREB and the KIX domain of CREB-binding protein. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(24):9409-22.

Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*. 1990 Apr;4(4):571-82.

Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*. 1991 Jun 7;252(5011):1427-30.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):754-60.

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*. 1998 Dec 23;95(7):927-37.

Smale ST, Baltimore D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell*. 1989 Apr 7;57(1):103-13.

Soutoglou E, Viollet B, Vaxillaire M, Yaniv M, Pontoglio M, Talianidis I. Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *EMBO J*. 2001 Apr 17;20(8):1984-92.

Spreafico F, Barski JJ, Farina C, Meyer M. Mouse DREAM/calsenilin/KChIP3: gene structure, coding potential, and expression. *Mol Cell Neurosci*. 2001 Jan;17(1):1-16.

Stein A, Bina M. A model chromatin assembly system. Factors affecting nucleosome spacing. *J Mol Biol*. 1984 Sep 15;178(2):341-63.

Strom A, Castella P, Rockwood J, Wagner J, Caudy M. Mediation of NGF signaling by post-translational inhibition of HES-1, a basic helix-loop-helix repressor of neuronal differentiation. *Genes Dev*. 1997 Dec 1;11(23):3168-81.

Struhl K. Mechanisms for diversity in gene expression patterns. *Neuron*. 1991 Aug;7(2):177-81.

Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12442-7.

Tanzi RE. Of calcium, caspases, and cognitive decline. *Nat Med*. 1998 Oct;4(10):1127-8

Taylor DA, Sack JS, Maune JF, Beckingham K, Quioco FA. Structure of a recombinant calmodulin from *Drosophila melanogaster* refined at 2.2-Å resolution. *J Biol Chem*. 1991 Nov 15;266(32):21375-80.

Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Jun;10(3):373-83.

Treisman R. The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin Cancer Biol*. 1990 Feb;1(1):47-58.

Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol*. 1998 Aug;18(8):4629-38.

Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):13505-8.

Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):13505-8.

Weber JR, Skene JH. Identification of a novel repressive element that contributes to neuron-specific gene expression. *J Neurosci*. 1997 Oct 15;17(20):7583-93.

Weiss JL, Burgoyne RD. Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca²⁺ sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):44804-11.

West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11024-31.

Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*. 1999 Feb 1;27(3):711-20.

Wolffe AP. Transcription factor TFIIC can regulate differential *Xenopus* 5S RNA gene transcription in vitro. *EMBO J*. 1988 Apr;7(4):1071-9.

Wong CW, Privalsky ML. Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol Cell Biol*. 1998 Sep;18(9):5500-10.

Wong J, Patterson D, Imhof A, Guschin D, Shi YB, Wolffe AP. Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *EMBO J*. 1998 Jan 15;17(2):520-34.

Xie J, Black DL. A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature*. 2001 Apr 19;410(6831):936-9.

Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Apr;9(2):140-7.

Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science.* 2001 Dec 21;294(5551):2507-11.

Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet.* 1985;19:209-52.

Youn HD, Grozinger CM, Liu JO Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22563-7.

Youn HD, Sun L, Prywes R, Liu JO. Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science.* 1999 Oct 22;286(5440):790-3.

Yudkovsky N, Logie C, Hahn S, Peterson CL. Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* 1999 Sep 15;13(18):2369-74.

Zaidi N, Berezovska O, Choi E, Miller J, Chan H, Lilliehook C, Hyman B, Buxbaum J, Wasco W. Biochemical and immunocytochemical characterization of calsenilin in mouse brain. *Neuroscience.* 2002;114(1):247.

Zanger K, Radovick S, Wondisford FE. CREB binding protein recruitment to the transcription complex requires growth factor-dependent phosphorylation of its GF box. *Mol Cell.* 2001 Mar;7(3):551-8.

Zhang D, Nelson DA. Histone acetylation in chicken erythrocytes. Estimation of the percentage of sites actively modified. *Biochem J.* 1986 Dec 15;240(3):857-62.

Zhang DE, Nelson DA. Histone acetylation in chicken erythrocytes. Rates of deacetylation in immature and mature red blood cells. *Biochem J.* 1988 Feb 15;250(1):241-5.

Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 2001 Sep 15;15(18):2343-60.

10. INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Secuencia y estructura secundaria de la cola y core de histonas (página 8).

Figura 2.- Esquema del nucleosoma (página 9).

Figura 3.- Posiciones relativas de elementos reguladores en genes tempranos (página 13).

Figura 4.- Localización del enhancer (página 14).

Figura 5.- Proceso de ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción (página 18).

Figura 6.- Clasificación de los factores de transcripción activadores (página 20).

Figura 7.- LCD presente en CBP necesario para mediar la interacción con los receptores nucleares para hormonas (página 27).

Figura 8.- Dedos de zinc (página 28).

Figura 9.- Homeodominio (página 29).

Figura 10.- Residuos conservados en los dominios HLH (página 30).

Figura 11.- Cremallera de leucinas (página 31).

Figura 12.- Dominio Chromo (página 32).

Figura 13.- Dominio CSD (página 32).

Figura 14.- Dominio Bromo (página 32).

Figura 15.- Acetilación y deacetilación de histonas en la activación e inhibición de la transcripción (página 37).

Figura 16.- Vía de la señalización del AMPc y transcripción (página 46).

Figura 17.- Esquema general de la vía de señalización de AMPc en la transducción de señales (página 47).

Figura 18.- Esquema de los dominios funcionales en los distintos miembros de la familia CREB (página 47).

Figura 19.- Dominio bZIP de CREB unido al ADN (página 48).

Figura 20.- Estructura de la interacción KID-KIX (página 50).

- Figura 21.- Ampliación de la señal de calcio en neuronas (página 51).
- Figura 22.- Calcio como segundo mensajero en vías de señalización y control de la transcripción (página 52).
- Figura 23.- Deleción del promtor de prodinorfina humano (página 56).
- Figura 24.- Ensayo de retardo utilizando el DRE del gen de prodinorfina humana (página 57).
- Figura 25.- Mutagénesis dirigida sobre el DRE del promotor de prodinorfina humana (página 58).
- Figura 26.- Represión de promotores heterólogos del gen de timidina quinasa mediada por el DRE (página 59).
- Figura 27.- Bloqueo de la unión al sitio DRE y transactivación por PKA están relacionadas con un incremento de la expresión de prodinorfina en células de neuroblastoma (página 60).
- Figura 28.- Caracterización de la actividad nuclear que se une al DRE (página 61).
- Figura 29.- La activación de PKA bloquea la unión del complejo de 110 kDa a la sonda DRE (página 62).
- Figura 30.- Productos del gen DREAM (página 63).
- Figura 31.- DREAM se une al DRE (página 64).
- Figura 32.- Dominios EF-hand en calmodulina (página 65).
- Figura 33.- Esquema del funcionamiento de la calsenilina y su interacción con presenilinas (página 67).
- Figura 34.- Alineamiento de las secuencias de los KChIP humanos (página 68).
- Figura 35.- Los KChIPs son componentes integrales de los canales de potasio tipo A (página 69).
- Figura 36.- Imagen de microscopia confocal de células PC12 en inmunofluorescencia para detectar la distribución de la proteína de fusión DREAM-Myc (página 70).
- Figura 37.- Construcciones generadas en el análisis de deleción del promotor de prodinorfina humano (página 72).
- Figura 38.- Represión por DREAM de reporteros que contienen un DRE (página 82).
- Figura 39.- Capacidad represora de los mutantes en los posibles dominios de unión a ADN (página 84).

- Figura 40.- DREAM reprime la expresión basal del promotor c-fos (página 85).
- Figura 41.- Represión de los promotores de genes tempranos en transfección transitoria (página 87).
- Figura 42.- DREAM es una proteína de unión a calcio (página 88).
- Figura 43.- Mutante 4EFmDREAM (página 89).
- Figura 44.- Represión por DREAM o del mutante 4EFmDREAM sobre la transcripción basal del reportero pTKDRECAT (página 90).
- Figura 45.- Efecto de las mutaciones simples, dobles y triple (página 91).
- Figura 46.- El mutante 234EFmDREAM actúa como dominante negativo (página 92).
- Figura 47.- Esquema de la estructura de CREM y CREB (página 93).
- Figura 48.- Transactivación por α CREM del reportero pHD3CAT en células NB69 (página 94).
- Figura 49.- La represión de DREAM es eliminada por α CREM en células HEK293 (página 95).
- Figura 50.- Análisis in vitro de la interacción DREAM- α CREM (página 95).
- Figura 51.- Alineamiento del dominio I y II del LZ de α CREM y β CREM (página 97).
- Figura 52.- Dos LCDs en α CREM son necesarios para la interacción con DREAM (página 97).
- Figura 53.- Ensayos de retardo sobre el DRE de prodinorfina humana con proteínas recombinantes DREAM y α CREM en cantidades equivalentes (página 98).
- Figura 54.- Dos LCDs en DREAM son necesarios para la interacción con α CREM (página 99).
- Figura 55.- La interacción DREAM- α CREM dirige la expresión del gen de prodinorfina en células de neuroblastoma humano tras el tratamiento con forskolina (página 100).
- Figura 56.- El mutante DREAML47,52V se comporta como un dominante negativo para la desrepresión de la transcripción dependiente del DRE, activada por α CREM (página 102).
- Figura 57.- Ensayo de retardo con extractos nucleares de células PC12 tratadas con distintos estímulos (página 103).

Figura 58.- Transfección transitoria del reportero pHD3CAT en células PC12. Tratamiento con distintos estímulos y ensayo CAT (página 103).

Figura 59.- DREAM bloquea las bandas de retardo, sobre la sonda CRE, de proteínas recombinantes CREM y CREB (página 106).

Figura 60.- Efecto del calcio y la fosforilación por PKA sobre la interacción entre DREAM y proteínas de unión al CRE (página 107).

Figura 61.- Un LCD en el KID de CREB media la interacción con DREAM o con el KIX de CBP (página 108).

Figura 62.- DREAM bloquea la interacción CREB- CBP sin interactuar con CBP (página 110).

Figura 63.- Bloqueo por DREAM, dependiente de calcio, del reclutamiento de CBP por Gal4-CREB (página 112).

Figura 64.- Regulación por DREAM, dependiente de calcio, de la transcripción CRE dependiente (página 114).

Figura 65.- DREAM endógeno regula la transcripción basal dependiente del elemento CRE (página 116).

Figura 66.- Coimmunoprecipitación de DREAM y CREB en extractos nucleares de cerebro (página 117).

Figura 67.- Dos posibles modelos para la formación del tetrámero y la unión al sitio DRE (página 120).

Figura 68.- Modelo de desrepresión del DRE por calcio (página 125).

Figura 69.- Modelo de bloqueo de la activación por calcio por mutantes EFmDREAM (página 126).

Figura 70.- Modelo para la desrepresión del sitio DRE mediada por activación de PKA y α CREM (página 129).

Figura 71.- Modelo de la actuación de DREAM en el bloqueo de la interacción CREB-CBP (página 133).

Figura 72.- Modelo de regulación del promotor c-fos por DREAM (página 136).

11. INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Segundos mensajeros y secuencias consenso de distintos elementos reguladores de la transcripción (página 12).

Tabla 2.- Componentes del complejo humano de iniciación de la transcripción (página 18).

Tabla 3.- Resumen de algunos factores de transcripción activadores y los distintos sitios de unión dentro de los promotores diana (página 20).

Tabla 4.- Correpresores y represores transcripcionales (página 23).

Tabla 5.- Secuencia del motivo LxxLL derivado de RIP140 (página 27).

Tabla 6.- Resumen de algunos complejos HAT en levaduras y humanos (página 35).

Tabla 7.- Capacidad relativa de los distintos oligonucleótidos DRE para generar banda de retardo con DREAM recombinante (página 81).

Tabla 8.- Afinidad relativa de unión de DREAM recombinante a los DRE de genes tempranos (página 86).