

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES
ASOCIADOS AL PROMOTOR PROXIMAL DE LA DISTROFINA DP71 EN
CÉLULAS HEPÁTICAS, Y SU ALTERACIÓN POR EFECTO DE
 β -NAFTOFLAVONA**

Por

Q.B.P. CAROLINA BECERRIL ESQUIVEL

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Inmunobiología**

Noviembre, 2011

**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES
ASOCIADOS AL PROMOTOR PROXIMAL DE LA DISTROFINA DP71 EN
CÉLULAS HEPÁTICAS, Y SU ALTERACIÓN POR EFECTO DE
 β -NAFTOFLAVONA**

Comité de Tesis

Dr. Pablo Zapata Benavides
Director de Tesis

Dr. Moisés Franco Molina
Secretario

Dra. Adriana Sampayo Reyes
Primer Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Segundo Vocal

Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León
Tercer Vocal

**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES
ASOCIADOS AL PROMOTOR PROXIMAL DE LA DISTROFINA DP71 EN
CÉLULAS HEPÁTICAS, Y SU ALTERACIÓN POR EFECTO DE
 β -NAFTOFLAVONA**

por

Q.B.P. CAROLINA BECERRIL ESQUIVEL

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección del Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León, y en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología del Dr. Pablo Zapata Benavides del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Dr. Pablo Zapata Benavides

Director Interno

Dr. Mario A. Bermúdez de León

Director Externo

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
NOMENCLATURA	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
3.1. Objetivo General	4
3.2. Objetivos Particulares	4
4. ANTECEDENTES	5
4.1. Gen DMD	5
4.1.1. Regulación transcripcional del gen DMD	6
4.2. Dp71	7
4.2.1. Promotor de Dp71	10
4.2.2. Efecto de xenobióticos sobre la expresión de Dp71	11
5. MÉTODOS	14
5.1. Cultivo de la línea celular	14
5.1.1. Tratamiento	14
5.2. Obtención de extractos nucleares	14
5.2.1. Cuantificación y evaluación de la integridad de los extractos nucleares.....	15
5.3. Diseño y generación de DNA de doble cadena	16
5.4. Marcaje radioactivo de DNA de doble cadena	18
5.5. Ensayos de retardamiento en gel de poliacrilamida (EMSA) ...	19
5.5.1. EMSA con competidores	21
5.5.2. EMSA con anticuerpos específicos	22

Sección	Página
6. RESULTADOS	23
6.1. Análisis in silico de la secuencia del promotor proximal de Dp71	23
6.2. Estandarización del ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida	24
6.3. Identificación de complejos específicos en el promotor proximal de Dp71	28
6.4. Efecto de la β NF sobre la formación de complejos transcripcionales en el promotor de Dp71	37
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
8.1. Conclusiones	48
8.2. Recomendaciones	48
 APÉNDICES	
A. BUFFER Y SOLUCIONES	50
B. ANÁLISIS IN SILICO DE LA SECUENCIA DEL PROMOTOR PROXIMAL DE Dp71 (-224 A +65) USANDO LOS SOFTWARE ALIBABA 2.1 Y TESS	53
LITERATURA CITADA	57
RESUMEN BIOGRÁFICO	65

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por ser la luz de mi camino y permitirme alcanzar una meta más en la vida.

A mi director de tesis Dr. Mario Bermúdez de León, por su generosidad al brindarme la oportunidad de aprender de su experiencia y gran capacidad, por su paciencia (mucho), confianza y sobre todo la amistad y afecto que siempre caracterizó el ambiente en el laboratorio.

Gracias a mis compañeros de laboratorio M. en C. Laura González, L.B.G. Erik Blancas, P.L.B.G. Ever y al Laboratorio de Citogenética por aguantar todos los días mi voz y mis locuras y seguir siendo mis amigos. Y a todos los que en algún momento compartieron un espacio en el laboratorio conmigo.

A la M. en C. Katia Peñuelas por su apoyo siempre que lo necesité, fuera y dentro del laboratorio, y por todas las enseñanzas y consejos que me permitieron lograr llegar hasta aquí.

Agradezco al Dr. Pablo Zapata Benavides, Dr. Moisés Franco Molina, Dra. Adriana Sampayo Reyes y Dr. Edgar Mendoza Gamboa por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por ser la piedra angular de mi educación y mi desarrollo profesional.

Agradezco a todo el personal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por hacerme sentir como en casa desde la primera vez que llegué a hacer mi servicio social.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme brindado el apoyo económico para la realización de estos estudios.

Gracias a mis padres, Esther y Benito, por ser ejemplo en mi vida y enseñarme que la actitud logra lo imposible. Los amo y los llevo siempre en el corazón.

A mis hermanos Tete, Kiki y Bicho, mis cuñados Juan y Noé, mis sobrinos Jojo, Cata e Inech y demás familiares por su amor y apoyo incondicional. Son el motor en mi vida.

Gracias a todos mis amigos por su apoyo y afecto, especialmente a Brenda, Perla, Selene y Angie por que las palabras sobran donde habla el corazón.

A Rogelio por recorrer este camino de la mano conmigo. Seguimos contando...

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera me han acompañado en este camino y han marcado mi vida. Gracias.

DEDICATORIA

A mis Padres

*“Cada trecho recorrido enriquece al peregrino
y lo acerca un poco más a hacer realidad sus sueños”*
Paulo Coelho

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Oligonucleótidos sintéticos análogos a secuencias del promotor proximal de Dp71	17
II.	Oligonucleótidos competidores para ensayos de retardamiento	21
III.	Anticuerpos específicos para ensayos de super-retardamiento	22

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Organización del gen DMD y sus productos	7
2. Expresión de Dp71 en tejidos humanos y líneas celulares	8
3. Expresión de Dp71 tejido-específica	9
4. Secuencia del promotor proximal de Dp71	10
5. Representación esquemática de elementos de respuesta a xenobióticos dentro del promotor murino de Dp71	12
6. Expresión de Dp71 en células Hepa-1 tratadas con β NF y BaP	13
7. Efecto de β -NF en la vida media del RNAm de Dp71	13
8. Esquema general del ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida o EMSA	20
9. Estructura del promotor proximal de Dp71	24
10. Integridad de extractos nucleares de células Hepa-1	25
11. Integridad de oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla ..	25
12. Formación de oligonucleótidos sintéticos de doble cadena	26
13. Eficiencia de marcaje de DNA de doble cadena	27
14. Titulación de extractos nucleares	28
15. Caracterización de complejos de la sonda 2B con extractos nucleares de células Hepa-1	29

Figura	Página
16. Identificación de los factores de transcripción asociados a la sonda 2B	31
17. Caracterización de complejos de la sonda 5E con extractos nucleares de células Hepa-1	33
18. Identificación de los factores de transcripción asociados a la sonda 5E	34
19. Caracterización de complejos de la sonda 3C con extractos nucleares de células Hepa-1	36
20. Caracterización de complejos de la sonda 2B con extractos nucleares de células Hepa-1 tratados con el xenobiótico β -naftoflavona	38
21. Caracterización de complejos de la sonda 5E con extractos nucleares de células Hepa-1 tratados con el xenobiótico β -naftoflavona	39
22. Caracterización de complejos de la sonda 6F con extractos nucleares de células Hepa-1	41
23. Caracterización de complejos de la sonda 9I con extractos nucleares de células Hepa-1 tratados con el xenobiótico β -naftoflavona	42

NOMENCLATURA

μg	microgramo o microgramos
μL	microlitro o microlitros
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
βNF	beta-naftoflavona
BSA	Albúmina bovina sérica
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés Deoxyribonucleic Acid).
Dp71	Isoforma de la proteína distrofina de 70 kDa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de retardamiento (por sus siglas en inglés Electrophoretic Mobility Shift Assay)
h	hora u horas
L	litro o litros
mA	miliamperio o miliamperios

min	minuto o minutos
mL	mililitro o mililitros
nm	nanómetro o nanómetros
nt	nucleótido o nucleótidos
PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida (por sus siglas en inglés PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
pb	pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoruro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
s	segundo o segundos
TBE	Amortiguador Tris - Ácido bórico - EDTA
TESS	“Transcription Element Search Software”.
UI	unidad internacional o unidades internacionales
V	voltio o voltios

RESUMEN

El gen de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es el gen humano más grande conocido hasta el momento, y se ha reportado que mutaciones en este gen conllevan al desarrollo de la Distrofia Muscular de Duchenne, la distrofia más severa y frecuente en niños (1/3,500 varones) a nivel mundial. El gen DMD posee al menos siete diferentes promotores con regulación independiente y específica de tejido. El producto más pequeño codificado por el gen DMD es una proteína de 71 kDa denominada Dp71, la cual se expresa en todos los tejidos no musculares. La función específica de Dp71 es desconocida; sin embargo existe evidencia de su participación en procesos de desarrollo neuronal. Diversos modelos celulares han sido estudiados para evaluar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de Dp71, por ejemplo, en células musculares la expresión de Dp71 se ve disminuida durante la miogénesis, debido a la ausencia de los factores activadores Sp1 y Sp3; por el contrario, la inducción de la expresión de Dp71 durante la diferenciación neuronal es causada por la liberación de la represión por AP2 α y la activación del promotor por el factor transcripcional Sp1. Previamente se ha reportado que el xenobiótico β -naftoflavona (β NF) reprime la expresión de Dp71 en células hepáticas a nivel de mRNA y proteína. Debido a que el hígado es el principal organismo involucrado en el metabolismo de xenobióticos se considera que el conocimiento de la regulación de la expresión de Dp71 en células hepáticas es necesario para el entendimiento y definición de su función en éste órgano. El objetivo de este trabajo fue identificar los complejos transcripcionales asociados al promotor proximal de la distrofina Dp71 en células hepáticas y su alteración por efecto de β NF. Con la finalidad de elucidar el mecanismo regulatorio a nivel transcripcional de Dp71 en el sistema hepático, se llevó a cabo el análisis de la secuencia del promotor proximal de Dp71 utilizando los software en línea AliBaba y TESS, los cuales revelaron que la región de -224 a +65 posee elementos de unión a factores de transcripción de la familia Sp, AP2 α , E2F-1, YY1 y un elemento de respuesta a xenobióticos o XRE. Mediante ensayos de retardamiento en gel de poliacrilamida (EMSA), usando sondas de DNA marcadas con [γ -³²P]ATP que abarcan el promotor basal de Dp71, se reveló la interacción de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y YY1 a sus respectivos sitios de unión. La participación de estos factores fue demostrada mediante ensayos de super-retardamiento utilizando anticuerpos específicos contra Sp1, Sp3 y YY1. Para evaluar el efecto de β NF sobre la formación de los complejos transcripcionales observados, se realizaron ensayos EMSA con extractos nucleares de células tratadas con β NF, los cuales mostraron una disminución en la formación de los complejos previamente mencionados. Como conclusión, los factores transcripcionales Sp1, Sp3 y YY1 interactúan específicamente con el promotor proximal de Dp71, y esta asociación es alterada por efecto de β NF.

ABSTRACT

DMD gene is currently the largest known gene in humans, and mutations along this gene lead to the development of Duchenne Muscular Dystrophy, the most severe and frequently dystrophy in male children (1/3,500) worldwide. The DMD gene has at least seven promoters that encode seven different proteins with independent regulation and tissue-specific. The smallest product is a protein of 71 kDa, named Dp71, which is expressed in all non-muscular tissues. The specific function of Dp71 is not yet defined; however, there is evidence that support its participation in neuronal differentiation process. In order to evaluate the molecular mechanism that underlined the Dp71 expression several cell models have been studied, e.g. in muscular cells, Dp71 expression is down-regulated during myogenesis by the lack of activating factors Sp1 and Sp3; otherwise, the induction of Dp71 expression in neuronal differentiated cells is caused by activation of the promoter by Sp1 factor and the relief of repression by AP2 α binding. Previously, it has been reported that xenobiotic β - naphthoflavone (β NF) downregulates the Dp71 mRNA and protein expression in hepatic cells. Hence liver is the key organ involved in xenobiotic metabolism, it is considered that knowledge on Dp71 expression in liver cells is necessary for understand and define its function in this organ. The aim of this work was to identify the transcriptional complex associated with the proximal promoter of the dystrophin Dp71 in liver cells and its alteration by the effect of β NF. In order to elucidate the regulatory mechanism of Dp71 in the hepatic cells, a sequence analysis of the proximal Dp71 promoter was performed using Alibaba and TESS software. This analysis revealed that -224 to +65 region of Dp71 promoter sequence contains several Sp-, AP2 α -, E2F-1-, YY1-binding sites and a Xenobiotic Response Element or XRE. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using eleven double strand DNA probes labeled with [γ -³²P]ATP spanning basal promoter region, revealed the interaction of the Sp-family factor, Sp1 and Sp3, and YY1 transcription factor to their respective DNA elements. This specific interaction was confirmed through supershift assays using anti-Sp1, anti-Sp3 and anti-YY1 antibodies. To evaluate the effect of β NF on transcriptional complexes, EMSA assays were performed with nuclear extracts from β NF-treated cells, which showed a decrease in complexes formation. As conclusion, Sp1, Sp3 and YY1 transcriptional factors are able to interact on proximal Dp71 promoter sequence, and this interaction is affected by β NF.

1. INTRODUCCIÓN

El gen DMD, relacionado a la Distrofia Muscular de Duchenne, es el gen humano con mayor extensión identificado hasta el momento. Dp71 es el producto más pequeño codificado por el gen DMD y el más abundante durante la embriogénesis (Lederfein et al., 1993). Dp71 está presente en todos los tejidos conocidos excepto en músculo esquelético adulto, sin embargo, aún se desconoce su función.

Previamente se han reportado los factores involucrados en la regulación de la expresión de Dp71 en el sistema muscular y nervioso. En el sistema muscular la regulación negativa de Dp71 durante la miogénesis está mediada por los factores Sp1 y Sp3 (de Leon et al., 2005); mientras que en el sistema nervioso el aumento de la expresión durante la diferenciación neuronal es regulado por los factores Sp1, Sp3 y AP-2 α (Morales-Lazaro et al., 2010).

En el sistema hepático, trabajos previos reportaron la disminución en la expresión de Dp71 por efecto del xenobiótico β -naftoflavona a nivel de RNA mensajero (mRNA) y proteína. Se demostró que la estabilidad del mRNA no se ve alterada por este xenobiótico, lo cual sugiere que la regulación negativa de la expresión de Dp71 podría ser a nivel de promotor.

El conocimiento del mecanismo de regulación en la expresión de genes y de los factores involucrados es de suma importancia cuando se pretende definir la función de una proteína en un tejido específico. El presente trabajo pretende abordar los factores y elementos asociados a los mecanismos regulatorios a nivel transcripcional de la distrofina Dp71 en células hepáticas murinas por medio de ensayos de interacción DNA-

proteína (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) con la finalidad de identificar los complejos transcripcionales que se asocian al promotor y que regulan la expresión de la Dp71 en este tejido, así como el efecto de β -naftoflavona sobre éstos complejos.

2. HIPÓTESIS

Los complejos transcripcionales que interactúan con elementos del promotor de Dp71 se ven alterados por efecto de la β -naftoflavona en células hepáticas, disminuyendo la actividad transcripcional de este gen.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar los complejos transcripcionales asociados al promotor proximal de la distrofina Dp71 en células hepáticas y su alteración por efecto del xenobiótico β -naftoflavona.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar los elementos potenciales en el promotor proximal de la Dp71 para el sistema hepático.
- 2) Revelar la identidad de los complejos transcripcionales asociados al promotor proximal de Dp71 en células hepáticas.
- 3) Determinar las alteraciones de los complejos transcripcionales por efecto de β -naftoflavona.

4. ANTECEDENTES

4.1 El gen DMD

El gen de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es el gen humano más largo estudiado hasta el momento, ubicado en la banda 21 del brazo corto del cromosoma X, abarca cerca del 0.01% del genoma total humano (Koenig et al., 1987). El gen DMD posee una extensión total de 2.5 millones de pares de bases (pb) conteniendo 79 exones que conforman solamente el 0.6% del gen (Figura 1), el resto corresponde a intrones muy extensos de hasta 400 kb. El tamaño extenso del gen DMD lo predispone a mutaciones en su región codificante (Ahn and Kunkel, 1993).

El producto principal del gen DMD deriva de un RNA mensajero (mRNA) de 14 kb que da origen a una proteína de 427 kDa denominada distrofina. Se ha demostrado que mutaciones en este gen provocan la ausencia o falta de función de la distrofina en tejido muscular llevando al desarrollo de la Distrofia Muscular de Duchenne, una enfermedad letal con un patrón de herencia de tipo recesivo ligado al cromosoma X que afecta a uno de cada 3,500 varones nacidos vivos (Monckton et al., 1982; Koenig et al., 1987). La DMD provoca la degeneración progresiva y severa de los tejidos musculares y en el 30% de los casos se presenta retraso mental no progresivo (Blake et al., 2002). El desarrollo de esta enfermedad culmina en una afectación mortal del sistema muscular y respiratorio a temprana edad (Yiu and Kornberg, 2008).

La distrofina consta de 3685 aminoácidos y se puede dividir en cuatro dominios con distintas afinidades: el dominio N-terminal que une a la distrofina con el citoesqueleto mediante su asociación con la proteína actina. Un dominio central de aproximadamente 25 repetidos de 109 residuos de tipo espectrina abarcando cerca del

75% de la proteína total y que le confiere la estructura helicoidal (Koenig et al., 1988). Un tercer dominio rico en cisteínas que permite la interacción de la distrofina con la membrana (Suzuki et al., 1992). Finalmente un dominio carboxilo terminal el cual se encarga de la asociación de la distrofina con el Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (Ahn and Kunkel, 1993) (Figura 1B).

La distrofina ha sido ampliamente estudiada en tejido muscular, en donde forma un complejo con proteínas asociadas a la matriz extracelular y el citoesqueleto, actuando como amortiguador en los procesos de contracción muscular. Su ausencia provoca la desestabilización del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina y como consecuencia se genera el daño progresivo a los tejidos musculares (Sunada and Campbell, 1995).

4.1.1 Regulación transcripcional del gen DMD

El gen DMD posee una regulación transcripcional compleja debido a que contiene siete promotores independientes que controlan la síntesis de por lo menos siete proteínas distintas. Los promotores que se localizan en la región del extremo 5' codifican para la expresión de las distrofinas de 427 kDa específicas de tejido muscular, neuronal y células de Purkinje (Nudel et al., 1988; Nudel et al., 1989; Gorecki et al., 1992). Los promotores internos restantes regulan la expresión de cuatro proteínas más pequeñas truncadas en su extremo N-terminal denominadas de acuerdo a su peso molecular como Dp260, Dp140, Dp116, y Dp71 (Bar et al., 1990; Barnea et al., 1990; Byers et al., 1993; Lederfein et al., 1993; D'Souza et al., 1995; Lidov et al., 1995) (Figura 1A). Los mRNA se originan de manera regulada durante las etapas del desarrollo por la selección de promotores alternativos o bien por procesamiento alternativo del mRNA (Dickson et al., 1988).

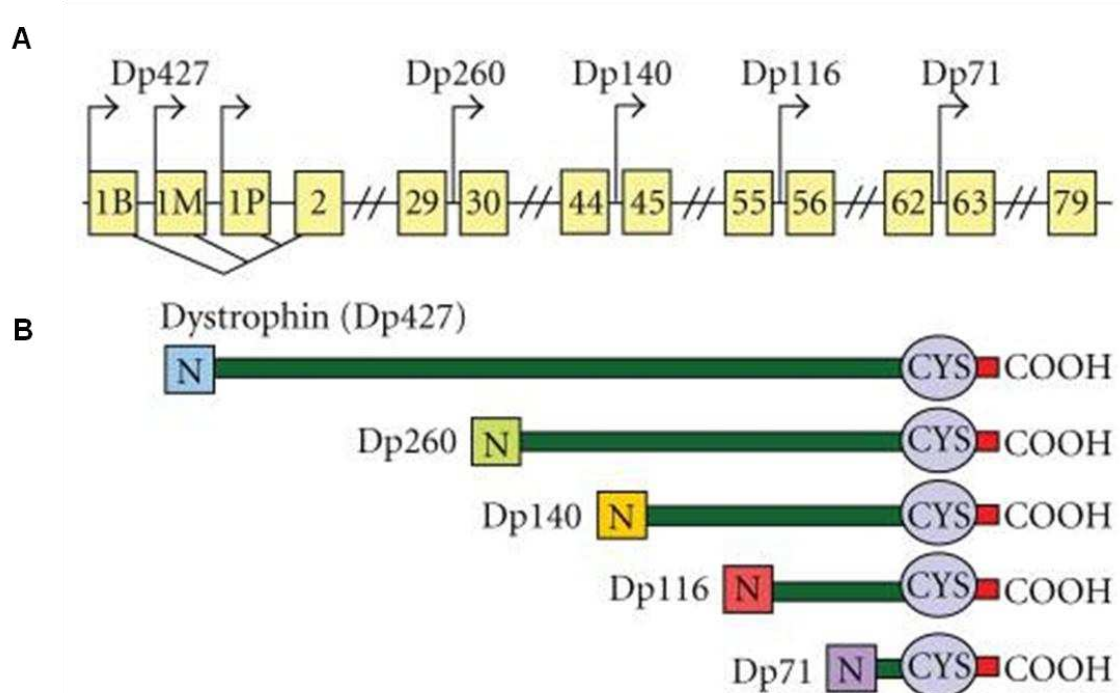


Figura 1. Organización del gen DMD y sus productos. Panel A, se muestra la estructura genómica del gen, los exones (cajas amarillas con números) y las regiones intrónicas, donde la flechas indican los sitios de inicio de la transcripción de los promotores internos. Un procesamiento alternativo en el primer exón da lugar las distrofinas de mayor longitud (1B: cerebro, 1M: músculo, 1P: células de Purkinje). Panel B, se muestran las diferentes proteínas de distrofina derivadas de distintos promotores internos (Dp427, Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71). Los dominios estructurales principales están representados, incluyendo el dominio NH₂-terminal único de cada isoforma (N, en diferentes colores), el dominio central parecido a la proteína espectrina (barra verde), el dominio rico en cisteínas (CYS, violeta) y el dominio COOH-terminal (rojo). En la figura, todas las regiones génicas y los dominios proteicos no se encuentran a escala (Perronet and Vaillend, 2010).

4.2 Dp71

La distrofina Dp71 es la proteína más pequeña codificada por el gen DMD. Su promotor se localiza entre los exones 62 y 63, en el extremo 3' del gen DMD, y produce un mRNA de 4.5 kb que codifica para un producto de 70.8 kDa (Lederfein et al., 1992). Un procesamiento alternativo del mRNA de Dp71 en los exones 71 y/o 78 provoca la formación de las isoformas Dp71d y Dp71f, las cuales tienen distinta localización subcelular, ya sea nuclear o citoplasmática (Gonzalez et al., 2000; Marquez et al., 2003). Dp71 consiste de 622 aminoácidos y conserva las regiones carboxilo terminal y el

dominio rico en cisteínas de la distrofina de 427 kDa; sin embargo, posee una región amino-terminal única de 7 aminoácidos (Lederfein et al., 1992) (Figura 1B).

Dp71 es el primer producto del gen DMD detectado durante la embriogénesis (Rapaport et al., 1992) y se expresa de manera ubicua en tejidos diferenciados no musculares como cerebro, retina, hígado, pulmón, vasos sanguíneos, entre otros (Hugnot et al., 1992)(Figura 2).

Se destaca su abundancia en cerebro en donde se ha reportado que la expresión normal de Dp71 es esencial para el crecimiento neuronal participando en la adhesión celular y en la estabilización del complejo de proteínas asociadas a distrofina en este órgano (Bar et al., 1990; Greenberg et al., 1996; Acosta et al., 2004; Enriquez-Aragon et al., 2005). Se ha demostrado que mutaciones que afectan la expresión de Dp71 contribuyen a la severidad del retraso mental en pacientes con DMD, debido a que juega un papel regulatorio importante en la organización y funcionamiento de la sinapsis neurotransmisora (Daoud et al., 2009a; Daoud et al., 2009b).

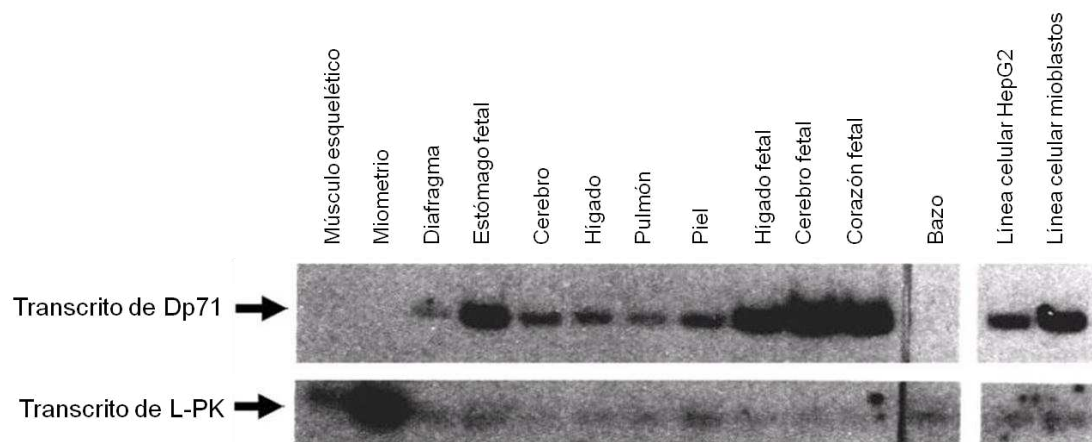


Figura 2. Expresión de Dp71 en tejidos humanos y líneas celulares. Autorradiografía de un ensayo Southern blot donde se muestra la presencia del transcrito de Dp71 en diferentes tejidos y líneas celulares. El transcrito para la L-piruvatocinasa (L-PK) se señala como control interno (Hugnot et al., 1992).

Además, la expresión de Dp71 en células gliales de Müller es crítica para el agrupamiento y estabilización del canal de potasio Kir4.1 y la acuaporina AQP4, indicando un rol crucial en la función retinal (Claudepierre et al., 2000; Connors and Kofuji, 2002; Dalloz et al., 2003).

Se ha demostrado que la expresión ectópica de Dp71 en ratones knockout para distrofina es capaz de restaurar los niveles de las proteínas asociadas a la distrofina a sus valores normales. Sin embargo, esta sobreexpresión no contribuye a la regeneración del tejido muscular, indicando que su función es diferente a la distrofina (Cox et al., 1994; Rafael et al., 2000). A pesar de su relativa abundancia y prevalencia en tejidos no musculares su función exacta sigue siendo desconocida.

La expresión de Dp71 difiere durante el desarrollo murino en distintos tejidos. En el sistema muscular se detecta el transcrito de Dp71 en la etapa fetal y decae en su expresión a medida que se diferencian las células musculares. Lo contrario sucede en el sistema nervioso en donde se observa un incremento del transcrito en las etapas de diferenciación neuronal. En tejido hepático, los niveles de Dp71 parecen permanecer constantes (Lambert et al., 1993; de Leon et al., 2005; Morales-Lazaro et al., 2010).

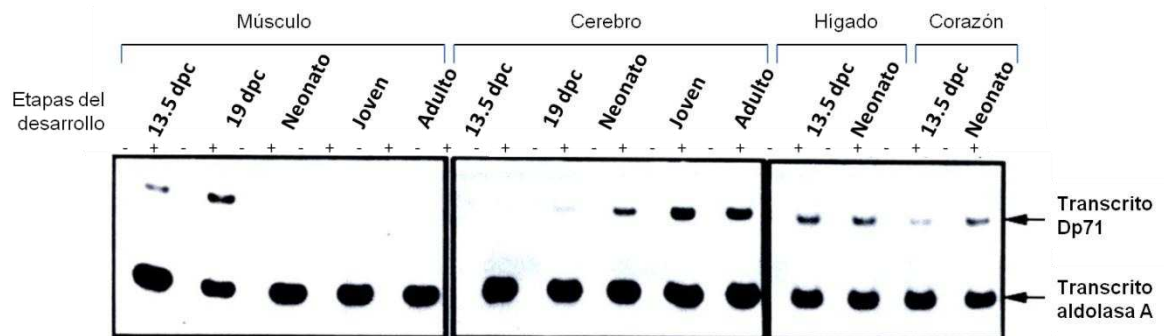


Figura 3. Expresión de Dp71 tejido-específica. Ensayo de RT-PCR que muestra la regulación de la expresión de Dp71 durante las diferentes etapas del desarrollo murino en músculo, cerebro, hígado y corazón. Los signos – y + indican la omisión o realización, respectivamente, del paso de transcripción reversa. El transcrito de la aldolasa humana A se muestra como control interno. La abreviatura “dpc” indica días post-coito (Lambert et al., 1993).

4.2.1 Promotor de la Dp71

La expresión de la distrofina Dp71 está regulada por un promotor constitutivo o housekeeping independiente de la distrofina muscular, la cual se localiza a más de 2000 kb al extremo 5' (Hugnot et al., 1992; Lederfein et al., 1992; Rapaport et al., 1993).

Un secuenciación parcial del promotor de la Dp71 reveló que éste no posee cajas TATA o CAAT (secuencias regulatorias promotoras rica en residuos timidina y adenina), pero sí posee una región rica en GC (guanina y citosina) con elementos potenciales para la unión de elementos transcripcionales de la familia Sp (Lambert et al., 1993). Posteriormente, De León et al. (2005) reportó la secuencia completa del promotor

Mus musculus dystrophin Dp71 gene, promoter, exon 1 and partial cds

GenBank: AY321586.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>gi|32527634|gb|AY321586.1| Mus musculus dystrophin Dp71 gene, promoter, exon 1 and partial cds

```
GATCCTTACTCAATTGATTTCTAATAGTTACAAGTGTCCACGCTGTGAGGGCTGTACCTTCTCCTTGAAG
TAAACAATATTTAAGTGTATGTCAGCATCGGTGCGATGATTACTCTAACTGATTTACTTTAGAAGCACTG
CTTTTTCATCAAAGGCCACTAATGCCTGCACTCTAGAGAGAGGCAGACTTGGAACTACTTTTAGGCCTA
CGGACATCCTCGCCCAAAAATAAGTCTGAGTGTGTCCTCCTTAGACCGCACTAGCAGCTGCCTCTTCAGC
TCACTAGCTCAGAAGTCTAAAGCATTACAAGCACCAGACTGAGTCGCTGAAGAGAAATGCCAAAAATG
ACATCTTTGCTTTAAAAATAGCAACGCTAGGCTTACCTACAGGCACATATCTTTAGTGGTAACGTTTGCAT
TTTTATTGGTTTGTCAAAGTAATGAAGAAAGCCGCAAGTCCCTTTTACTTTCTCCATTTCTGCCTCT
TTGTTGTGCCGTACCATAACCAATAAATGGAAATTTGATGTTTGCAGGTCCTTTAGGCTTAAACAATCTAAG
CAATAAATGTAGAGGGGAGAAAAGATGATATTTAAAAACATAAAAGGAAAACACGTAAAACGTAGACTTA
AGGGGATGAACCCCTCCAGAAGAGATTGAAAGATAAAAAAGAAAAGACTAGCTCCTTGGATTCTAATCTA
TGAAGTAGAGAGTGTGGGCAATTCTTGTGCTAATAGAGTTTTCCCTTCAACGGGAATATCTCCAAGTTCA
AAACAGTTGCATTTAGTAGAATTCTACCTTCTATGACAGCTTCTGATATGAGTCACGCTAGGCCCTCAA
GGCCTACTTACTTTTCAAATCCAGTGTCTATACTGGAAAAGAGAGATCCTTCCAGATTTTTTCTAACACTTC
AAGATAAAAAACACAGTGTCTGCTAGGCTCTGAGTCTTTATCTGCGCCTCTCCAACCTTAAATGTGTTCAAG
TTTTGATTTGGTACATTCAAGTTTGGGCTCTTGGGGGAGCGTGGGGTGGACTTTCTAAGAAGTCTTCTGG
TGATGTTGAACTGTAGTTCTAGAAGGACATTTAAGAATCAGTGTATAATATCAAAGTTGTTTCTT
AAGAATCCAGGGTAGCCGGGTATTGTGGTGTACACCTTTAATCCTAGCAATGGGGAGGAAGAAACAGGTG
GATATCTGTGAGTTCAAGACCAGCCTGGTCTGATCTACTTAGTGTGTTCTAGGACAGTCAGAATATGTG
AGAGACCCTGTCTCAAAAATAAATAAATAAAGATTCTAGACTCAGGATAAGTTTGGATTTTTTTCCTG
TCCTACTTCTTTAATTTTCAGTTGAGGAAGACAAGGGGTGTAGAAGGGAGGTGAATACTTCTCATGTGATT
ATTTTTCTTTTCATTTTCTAAAAAGAAAACGCCAAGCCACACACTAATTATCTACGATGAGGTCATTT
GCACCTAGGTCATTTATTTAGGCAACAAGTAGCCTTGCCAGAAGATTTTAAAGGGGATGTTGGCAAGAGG
GGATGTGGCTTCCAGGTTCTTGGGTCTAGCTTCAACTCCTTTCGATCTTTCTTTATGTCAACCCACCACC
CCCATTTCTGTTCTGCTTTGAAAGGGCTCACTGCCCTGTCCCTGGCTATCCAGGTTCCAGGTCCTTAGG
TGGGGAGGAGCCCTTCCAGCCCGCCCGCTCTGCACGCAGTCCCCCTCCCTGTCCCGCCCGCCCGCC
AGCCCGCCAGCCAGCGGGGCTCCTCCGAGTGTCTTCCGCTGCGAGCCTGGGCGGGCGGCTTGACTTT
CGGGAGCCCGTGGCTTGGGCAAGCTTACTCCTCCGCTCTAAGCGCTCCGCCCTCACTGCCTGTGAAAC
CCTTACAACCATGAGGGAACCTCAAAGG
```

Figura 4. Secuencia del promotor de Dp71 murino. Información obtenida del banco de genes con número de acceso AY321586.1, donde también se incluye la región del primer exón y la secuencia 5' no traducida.

de Dp71 en ratón (GenBank: AY321586.1), la cual mostró la presencia de diversos elementos de unión para factores de transcripción de la familia Sp, así como elementos AP2 y cuatro elementos de respuesta a xenobióticos (XRE), entre otros (Figura 4).

El promotor de Dp71 muestra una actividad tejido-específica durante el desarrollo y diferenciación de varios tejidos (Sarig et al., 1999). Hasta la fecha solo se han reportado los mecanismos moleculares de la regulación transcripcional de Dp71 en el sistema muscular y neuronal. Por ejemplo, en el tejido muscular el promotor basal de la Dp71 se encuentra en la posición -224 a +65, y es activado por los factores de transcripción Sp1 y Sp3. Durante el proceso de diferenciación muscular, los factores Sp1 y Sp3 decaen en su expresión y provocan la disminución de la actividad promotora de la Dp71 y por tanto la ausencia de esta proteína en tejido muscular adulto (de Leon et al., 2005). Por otro lado, en el sistema nervioso la inducción de la expresión de Dp71 en células neuronales diferenciadas es el resultado de la activación o represión del promotor basal de la Dp71 por los factores transcripcionales Sp1 y AP2 α , respectivamente, resultando en altos niveles de proteína en células neuronales maduras (Morales-Lazaro et al., 2010).

4.2.2 Efecto de xenobióticos sobre la expresión de la Dp71

La secuencia del promotor de Dp71 permitió la identificación de cuatro elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) en las posiciones -1165, -952, -757 y -6 (Bermudez de Leon et al., 2006) (Figura 5). Los elementos XRE son sitios de interacción del dímero receptor a hidrocarburos arilo (AhR) y translocador nuclear de hidrocarburos arilo (ARNT) (Denison et al., 1988).

El AhR forma parte del mecanismo de inducción génica para la detoxificación celular o en procesos metabólicos adaptativos. Al ser activado por un ligando como la dioxina 2,3,7,8-TCDD se ha demostrado una interacción con los XRE, y una inducción en la transcripción de genes (Fujisawa-Sehara et al., 1988). El gen del citocromo CYP1A1 ha sido el más estudiado como modelo inducible por dioxinas. La inducción

dependiente de AhR/ARNT se lleva a cabo mediante el reconocimiento de las secuencias XRE en la región reguladora de ese gen, así como de muchos otros genes involucrados en los procesos de metabolismo de xenobióticos.

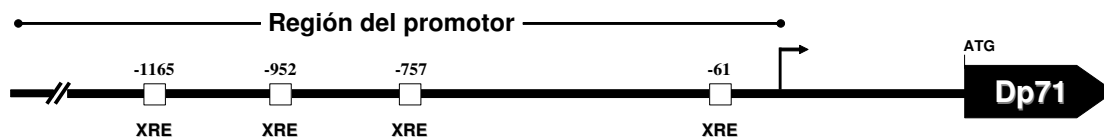


Figura 5. Representación esquemática de elementos de respuesta a xenobióticos dentro del promotor murino de Dp71. Las cajas indican la posición de los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) potenciales con respecto al sitio de inicio de la transcripción (indicado por una flecha). El sitio de inicio de la traducción está indicado por ATG. Los XRE fueron identificados usando el programa Transfac 4.0 y el acceso No. AL645848 del GenBank (Bermudez de Leon et al., 2006).

En análisis previos, se demostró la inhibición de la expresión de Dp71 a nivel de mRNA y proteína por el efecto del xenobiótico poli-aromático β -naftoflavona (β NF), pero no con otros compuestos ampliamente usados en ensayos de metabolismo de xenobióticos como dioxina 2,3,7,8-TCDD o benzo[a]pireno en una línea celular hepática murina (Bermudez de Leon et al., 2006) (Figura 6).

En la línea celular humana HepG2, también se demostró la represión del mRNA de Dp71 en presencia de β NF, lo cual sugiere un mecanismo inhibitorio de la expresión de Dp71 conservado en células hepáticas humanas y murinas (Blancas-Sánchez, 2010). Además, ensayos de decaimiento del mRNA de Dp71 en células tratadas y sin tratar con β NF demostraron que la estabilidad del transcrito no se ve afectada por la presencia del xenobiótico (Blancas-Sánchez, 2010) (Figura 7).

Por esta razón se sugiere que el mecanismo de regulación de la Dp71 por β -naftoflavona en células hepáticas puede estar ocurriendo a nivel de la región promotora.

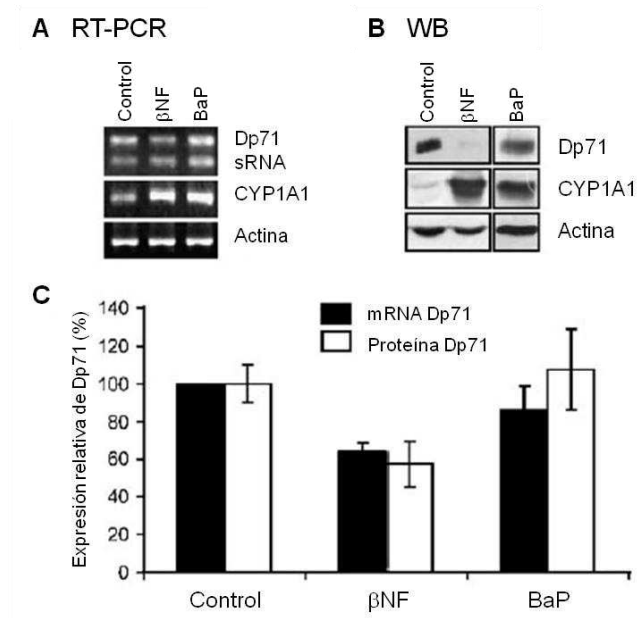


Figura 6. Expresión de Dp71 en células Hepa-1 tratadas con β NF y Benzo[a]Pireno. Panel A, ensayo RT-PCR que muestra la presencia de mRNA de Dp71. Panel B, expresión de proteína de Dp71 por medio de Western Blot. Panel C, expresión relativa de mRNA y proteína de Dp71. CYP1A1 y Actina fueron usados como control endógeno y control de carga, respectivamente (Bermudez de Leon et al., 2006).

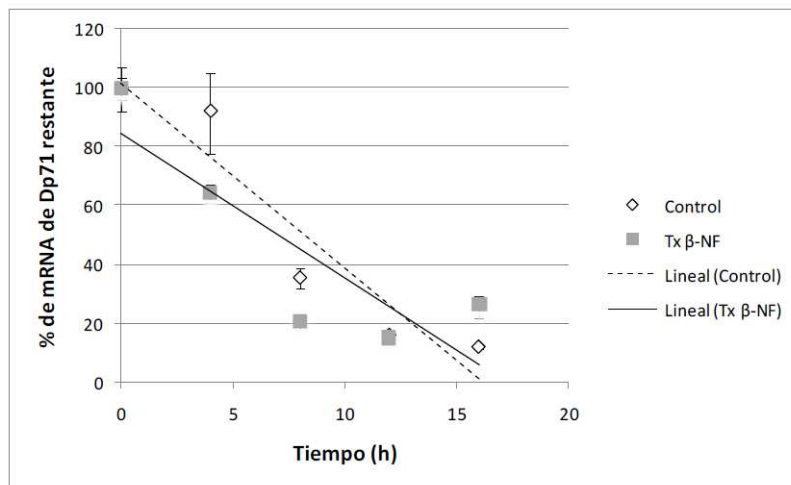


Figura 7. Efecto de β NF en la vida media del mRNA de Dp71. Se muestra el decaimiento gradual de los niveles del mRNA en células sin tratamiento y con tratamiento de β NF (Blancas-Sánchez, 2010).

5. MÉTODOS

5.1 Cultivo de la línea celular

Las células Hepa-1 (ATCC, CRL-1830), derivadas de hepatoma murino, fueron cultivadas en medio DMEM High Glucose 1X suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células fueron mantenidas, en una incubadora NuairTM, a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂.

5.1.1 Tratamiento con β-naftoflavona

Un día previo a los tratamientos con β-naftoflavona (βNF, Sigma-Aldrich N3633), 1X10⁶ células Hepa-1 fueron sembradas en placas de 100 mm. La dosis utilizada de βNF fue de 50 µM, disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich 5879). Las células tratadas con βNF o DMSO, como control, se incubaron por 24 h en las condiciones arriba descritas. Posteriormente del periodo de incubación, las células fueron colectadas y almacenadas.

5.2 Obtención de extractos nucleares

Los extractos proteicos nucleares fueron obtenidos a partir de 2X10⁶ células Hepa-1 tratadas con βNF, DMSO ó sin tratamiento. Las proteínas fueron extraídas de acuerdo al protocolo descrito por Schreiber et al. (1989) con sólo la modificación en el número inicial de células (Schreiber et al., 1989). Brevemente, las células fueron lavadas dos veces con solución salina amortiguadora (PBS 1X) y cosechadas mediante un raspado

con gendarme (también llamado cell scraper) en 1 mL de PBS 1X. Posteriormente, las células fueron centrifugadas en microcentrífuga (Eppendorf 5417R) a 5000 rpm por 5 min a 4 C°, y se desechó el sobrenadante. La pastilla celular fue resuspendida en 400 µL del buffer de lisis frío (Apéndice A), el cual es una solución hipotónica. La pastilla celular resuspendida fue incubada por 15 min en hielo para favorecer la citólisis. Después, se adicionó 25 µL de Igepal (Sigma) al 10% y la muestra se agitó en vórtex vigorosamente durante 10 s para posteriormente centrifugarla a 13,000 rpm por 30 s a 4 C°. La pastilla nuclear fue resuspendida en 50 µL de buffer de extracción frío (Apéndice A), el cual es una solución hipertónica, y colocada en una plataforma de agitación constante a 4°C durante 30 min. Después, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm a 4°C durante 5 min para recuperar el sobrenadante, el cual es el extracto proteico nuclear. Las proteínas fueron almacenadas en alícuotas de 20-30 µL a -70°C en microtubos de 0.5 mL hasta su uso.

5.2.1 Cuantificación y evaluación de integridad de los extractos nucleares

La determinación de la concentración de proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976). La curva estándar fue realizada utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (Pierce, USA) a una concentración de 2 µg/mL y el reactivo de Bradford al 1X (Bio-Rad). Se incluyeron ensayos sólo con agua desionizada como blancos. Para la realización de la curva estándar se utilizaron diferentes concentraciones de BSA, las cuales fueron de 0, 2, 4, 6, 12 y 24 µg. El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada muestra en microplaca de 96 pozos, en donde se colocaron tanto 5 µl de las muestras como la curva estándar. Los estándares y las muestras fueron llevadas a un volumen total de 100 µl con agua desionizada, y se añadió 200 µl del reactivo de Bradford al 1X. Después de una incubación por 5 min, se midió la absorbancia a 630nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Los análisis de regresión lineal fueron llevados a cabo por el mismo software del equipo Nanodrop®, donde se extrapolaron los datos de las muestras a los generados por la curva, y determinar la concentración de proteínas nucleares en microgramos por microlitro.

Para evaluar la integridad de los extractos nucleares obtenidos, se realizó una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante usando una cámara de electroforesis vertical (Thermo Scientific). Brevemente, se preparó un gel separador de poliacrilamida desnaturalizante al 10% que permite la separación de las proteínas y un gel concentrador al 4% en la parte superior para que la muestra se concentre y migre posteriormente por el gel separador (Apéndice A). La solución para el gel separador fue vertida en el soporte vertical de la cámara y posterior a su polimerización se agregó la solución para el gel concentrador. Una vez polimerizado el gel, se procedió a la adición de las muestras de los extractos totales y nucleares. Se prepararon las muestras en un volumen 1:1 con buffer de muestra 2X (Apéndice A) y se hirvieron durante 5 minutos antes de ser cargadas en el gel.

Las condiciones de corrimiento electroforético fueron 30mA constantes durante 3 h a temperatura ambiente con Buffer Tris-Glicina (Apéndice A). Una vez terminada la electroforesis, el gel fue teñido en una solución de Metanol al 50%, Ácido Acético al 10% y Azul de Coomassie G al 0.25% (Sigma-Aldrich). El gel fue incubado en agitación constante por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel fue desteñido utilizando una solución decolorante (metanol al 50% y ácido acético al 10%) en agitación constante hasta observar una definición clara de las bandas correspondientes a las proteínas.

5.3 Diseño y generación de DNA de doble cadena

Once pares de oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del promotor proximal de Dp71 (Acceso GenBank No. AY321586.1), y fueron nombrados como 1A, 2B, 3C, 4D, 5E, 6F, 7G, 8H, 9I, 10J y 11K (de la región 5´ a la 3´) (Tabla I). El análisis de la secuencia para el diseño de las sondas fue llevado a cabo con los software en línea AliBaba 2.1 y TESS utilizando parámetros preestablecidos (Apéndice B); las once sondas fueron diseñadas sobre los elementos de reconocimiento para factores de transcripción específicos dentro de la secuencia de -224 a +65 del promotor de Dp71 y se consideró una secuencia flanqueante. Los once pares de oligonucleótidos, cuya longitud varió de 25 a 35 bases, son complementarios y fueron sintetizados por

Sigma-Aldrich México. Los oligonucleótidos fueron cuantificados para ajustarlos a una concentración de 1 µg/µL. La integridad y cantidad de los oligonucleótidos se observó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL), y la separación electroforética se realizó en una cámara de electroforesis horizontal EasyCast B2 (Thermo Scientific) durante 5 min a 100V constantes.

Tabla I

Oligonucleótidos sintéticos análogos a secuencias del promotor proximal de Dp71

Sonda	Coordenadas en el promotor	Secuencia nucleotídica
1A	-201/-178	F 5' -CTTTCGATCTTTCTTTATGTCACC-3' R 3' -GGTGACATAAAGAAAGATCGAAAG-5'
2B	-181/-149	F 5' -CACCACCCACCCCCATTCTGTCTGCTTTGA-3' R 3' -TCAAAGCAGAACAGAAATGGGGGGTGGGTGGTG-5'
3C	-147/-121	F 5' -AGGGCTCACTGCCCTGTCCCTGGCTAT-3' R 3' -ATAGCCAGGGACAGGGCAGTGAGCCCT-5'
4D	-117/-83	F 5' -GGTCCCAGGTCTTAGGTGGGGGAGGAGCCCTTC-3' R 3' -GAAGGGCTCCTCCCCACCTAAGACCTGGGAACC-5'
5E	-87/-63	F 5' -CCTTCCCAGCCCCGCCCGTCTGC-3' R 3' -TGCAGACGGGGCGGGCTGGGAAG-5'
6F	-72/-53	F 5' -CCCGTCTGCACGCAGCTCCC-3' R 3' -GGGAGCTGCGTGCAGACGGG-5'
7G	-67/-40	F 5' -CTGCACGCAGCTCCCCCTCCCTGTCCCG-3' R 3' -CGGGACAGGGAGGGGGAGCTGCGTGCAG-5'
8H	-51/-24	F 5' -CTCCCTGTCCC GCCCGCCGCCAGCCCT-3' R 3' -AGGGCTGGCGGGCGGGCGGGACAGGGAG-5'
9I	-31/+4	F 5' -CCAGCCCGCCAGCCAGCGGCGGCTCCTCCGCAGTG-3' R 3' -CACTGCGGAGGAGCCGCCGCTGGCTGGCGGGCTGG-5'
10J	+5/+37	F 5' -CTTTCGGCTGCGAGCCTGGGCGGCGGCGCTTGA-3' R 3' -TCAAGCGCCGCCGCCAGGCTCGCAGCCGAAAG-5'
11K	+38/+65	F 5' -CTTTCGGGGAGCCCCGTGGCTTGGGCAA-3' R 3' -TTGCCCAAGCCACGGGGCTCCCCGAAAG-5'

F: secuencias sentido (forward)
R: secuencia antisentido (reverse)

Para la formación de DNA de doble cadena, se tomaron 5 μL de cada oligonucleótido complementario (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y se resuspendieron en tubos eppendorf de 0.5 mL. Posteriormente los tubos fueron colocados en un termoblock (Accublock, Labnet) a 94°C , el cual fue apagado inmediatamente para permitir que la temperatura disminuyera gradualmente hasta los $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$ y así favorecer la hibridación. La adecuada formación de DNA de doble cadena fue verificada en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con bromuro de etidio. Como referencia, se utilizaron los oligonucleótidos de cadena sencilla de cada dúplex. Para todos los casos, el registro de imágenes de los geles se llevo a cabo en un fotodocumentador Multi Doc It Imaging System (UVP).

5.4 Marcaje radioactivo de DNA de doble cadena

Los procesos que involucraron el marcaje y manipulación del isotopo radioactivo se realizaron en las instalaciones de bioseguridad en radioactividad del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, bajo la supervisión del Personal Ocupacionalmente Expuesto.

El marcaje radioactivo del DNA doble cadena se realizó utilizando el isótopo [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (TOP Institute of Isotopes, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor de la T4 polinucleótido cinasa (Invitrogen). Brevemente, en un microtubo de 0.2 mL se colocaron: 1 μL de [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP (20 μCi), 1 μL del DNA de doble cadena (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 10 unidades de enzima T4 polinucleótido cinasa, 2.5 μL de buffer 10X para la enzima T4 polinucleótido cinasa y 19.5 μL de agua libre de nucleasas (Invitrogen) para un volumen total de 25 μL . La mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos, y después se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Se agregaron 75 μL de agua libre de nucleasas para un volumen final de 100 μL .

Para evaluar la eficiencia del marcaje radioactivo, las once sondas fueron sometidas a un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida nativo al 6%

(Apéndice A). Para la separación se utilizó una cámara de electroforesis vertical de 20×20 cm (Thermo Scientific) en buffer TBE 0.5X durante 2 h a 100V constantes. Como indicadores de corrimiento electroforético se utilizaron los colorantes xilencianol y azul de bromofenol. Al terminar la electroforesis, el gel se secó sobre papel filtro (Whatman) por 45 min a 80°C en un secador de geles (Labconco) acoplado a una bomba de vacío (Fisher LAV-3). Una vez secado, el gel fue expuesto a una placa radiográfica Kodak[®] durante 72 h a -70 °C. Las placas fueron procesadas con soluciones reveladoras y fijadoras Kodak[®] GBX, y las imágenes fueron capturadas usando un fotodocumentador.

5.5 Ensayos de retardamiento en gel de poliacrilamida nativo (EMSA)

Para los ensayos de retardamiento se utilizaron extractos nucleares de células Hepa-1, sin tratamiento y con tratamiento de β NF o DMSO. Los ensayos de retardamiento en gel se llevaron a cabo usando geles nativos de poliacrilamida al 6% (Figura 8). Brevemente, se utilizó buffer de proteínas 2X (Apéndice A), cuya función es servir como amortiguador en la reacción de unión, buffer de espermidina (Sigma-Aldrich) y magnesio al 4 mM, poly(dI-dC)·poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich) a 1 μ g/ μ L, como competidor no específico, y 7 μ g de extracto nuclear. Después de 10 min de incubación, se agregó 1 μ L de cada sonda de DNA marcada radioactivamente. La interacción DNA-proteína se llevó a cabo a 4°C durante 20 minutos (Ausubel et al., 1994). El corrimiento electroforético se realizó en un gel de poliacrilamida nativo al 6%, usando buffer TBE 0.5X durante 4 h aproximadamente a 100V constantes en una cámara de electroforesis vertical de 20×20 cm. Como indicadores de corrimiento electroforético se utilizaron los colorantes xilencianol y azul de bromofenol, los cuales flanquearon los ensayos de retardamiento.

Al finalizar la electroforesis, como se mencionó previamente, el gel se secó y se expuso a una placa radiográfica, la cual se reveló y la imagen, con la señal de los complejos formados, fue registrada en un fotodocumentador (Figura 8).

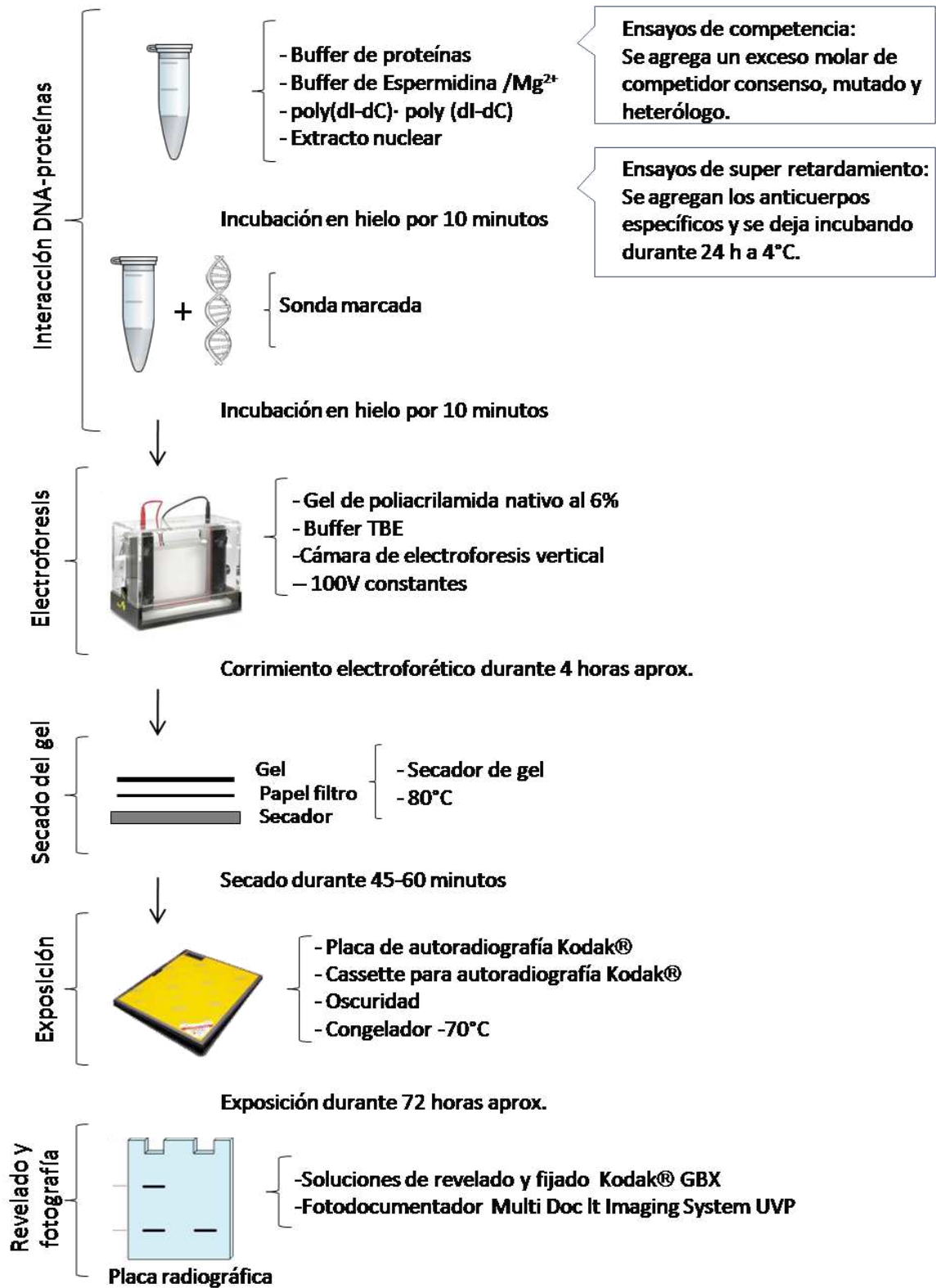


Figura 8. Esquema general del ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida o EMSA. Para detalles ver el texto.

5.5.1 EMSA con competidores específicos

Para los ensayos de competencia se utilizaron oligonucleótidos sintéticos de doble cadena (Santa Cruz Biotechnology Inc.), los cuales poseen la secuencia consenso o mutada para factores de transcripción identificados en la secuencia del promotor de Dp71 (Tabla II). Para la competencia con los complejos observados, los oligonucleótidos se usaron en un exceso de 100 veces, y fueron incorporados a la mezcla de unión previo a la adición de las sondas marcadas radiactivamente, como se describió en el apartado anterior. Como controles heterólogos fueron usados oligonucleótidos con una secuencia no relacionada a los elementos de la sonda.

Tabla II

Oligonucleótidos competidores para ensayos de retardamiento

Competidor	Secuencia nucleotídica
Ap-1	cns 5'-CGC TTG ATG ACT <u>CAG</u> CCG GAA-3'
	mut 5'-CGC TTG ATG ACT <u>TGG</u> CCG GAA-3'
AR	cns 5'-GAA GTC TGG <u>TAC</u> AGG <u>GTG</u> <u>TTC</u> TTT TTG-3'
	mut 5'-GAA GTC TGC <u>TAC</u> AGG <u>GTC</u> <u>ATC</u> TTT TTG-3'
C/EBP	cns 5'-TGC AGA <u>TTG</u> <u>CGC</u> <u>AAT</u> CTG CA-3'
	mut 5'-TGC AGA <u>GAC</u> <u>TAG</u> <u>TCT</u> CTG CA-3'
CTCF	cns 5'-GGC GGC <u>GCC</u> <u>GCT</u> AGG GGT CTC TCT-3'
	mut 5'-GGC GGC <u>TAA</u> <u>TAG</u> AGG GGT CTC TCT-3'
E2F-1	cns 5'-ATT TAA GTT TCG <u>CGC</u> CCT TTC TCA A-3'
	mut 5'-ATT TAA GTT TCG <u>ATC</u> CCT TTC TCA A-3'
IRF-1	cns 5'-GGA AGC GAA <u>AAT</u> GAA <u>ATT</u> GAC T-3'
	mut 5'-GGA AGC GAG <u>GAT</u> GAG <u>GTT</u> GAC T-3'
NF-1	cns 5'-TTT TGG ATT GAA <u>GCC</u> AAT ATG ATA A-3'
	mut 5'-TTT TGG ATT GAA <u>TAA</u> AAT ATG ATA A-3'
PR	cns 5'-GAT CCT <u>GTA</u> CAG GAT <u>GTT</u> CTA GCT ACA-3'
	mut 5'-GAT CCT <u>CAA</u> CAG GAT <u>CAT</u> CTA GCT ACA-3'
Sp1	cns 5'-ATT CGA TCG <u>GGG</u> CGG GGC GAG C-3'
	mut 5'-ATT CGA TCG <u>GTT</u> CGG GGC GAG C-3'
YY1	cns 5'-CGC TCC CCG <u>GCC</u> ATC TTG GCG GCT GGT-3'
	mut 5'-CGC TCC CCG <u>ATT</u> ATC TTG GCG GCT GGT-3'

cns: consenso; mut: mutado. Las secuencias subrayadas corresponden a las bases mutadas

5.5.2 EMSA con anticuerpos específicos

Los ensayos con anticuerpos específicos o también llamados de super-retardamiento fueron realizados utilizando 10 µg de anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology Inc.), los cuales reconocen a factores de transcripción específicos (Tabla III). Los anticuerpos fueron incubados con los extractos nucleares a 4°C durante 24 h, y después se prosiguió con la adición de la sonda marcada de acuerdo al protocolo descrito previamente. Como control heterólogo se utilizó un anticuerpo no relacionado con los factores de transcripción probables asociados a la secuencia de la sonda.

Tabla III

Anticuerpos específicos para ensayos de super-retardamiento

Anticuerpo	Número de catálogo*	Sitio de reconocimiento	Peso molecular
Sp1	Sc-17824	Amino ácidos 121-345 del extremo N-terminal de Sp1 de origen humano, pero reconoce también Sp1 de origen murino.	106 kDa.
Sp3	Sc-644	Péptido del extremo C-terminal de Sp3 de origen humano, pero reconoce también Sp3 de origen murino.	78/100/115 kDa
YY1	Sc-1703	Amino ácidos 1-414 que representa el tamaño total de YY1 de origen humano, pero reconoce también YY1 de origen murino.	60 kDa
CTCF	Sc-15914	Péptido cercano al extremo C-terminal del factor CTCF	150 kDa

*Los anticuerpos fueron adquiridos con la compañía Santa Cruz Biotechnology Inc.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis in silico de la secuencia del promotor proximal de Dp71.

Con la intención de identificar los probables sitios de interacción de factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de Dp71, se llevó a cabo un análisis de la región de -224 a +65 de la secuencia correspondiente al promotor de la Dp71 (Acceso de GenBank AY321586.1). Se utilizaron dos software en línea: AliBaba 2.1 (www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2) y TESS (www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess), los cuales predicen los posibles sitios de unión a factores transcripcionales descritos previamente en la literatura. Con base en los resultados obtenidos del análisis in silico, se realizó una discriminación de los elementos, donde solo fueron considerados para el análisis los elementos con expresión ubicua, y fueron eliminados aquellos que no tuvieran relación con el tejido hepático.

Se identificaron nueve elementos potenciales de interacción con factores de transcripción de la familia Sp, cuatro elementos de interacción con la familia AP-2 α , un elemento para el factor E2F-1, un sitio de unión para el factor YY1, y un elemento XRE (Figura 9, Apéndice). Derivado del análisis de la secuencia del promotor proximal de la Dp71, se diseñaron 11 sondas análogas a dicha región conteniendo los elementos anteriormente mencionados (Figura 9).

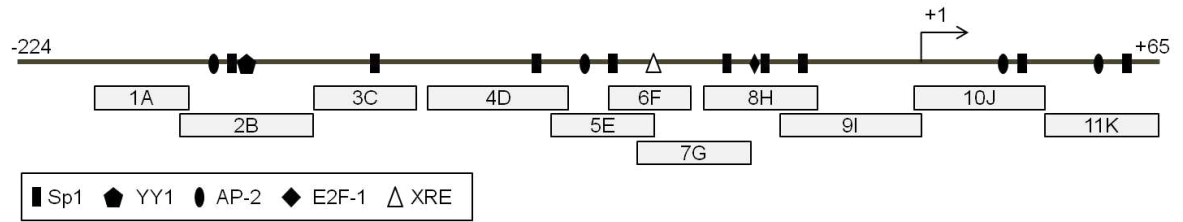


Figura 9. Estructura del promotor proximal de Dp71. La línea continua representa la secuencia de -224 a +65 del promotor de Dp71 de ratón. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (+1). Los símbolos representan los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción mostrados en la caja. Las sondas, de 1A a 11K (cajas grises), fueron diseñadas para albergar los elementos probables de interacción con el promotor de la Dp71.

6.2 Estandarización del ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida.

Con la finalidad de identificar los factores de transcripción asociados a los potenciales elementos en el promotor proximal de la distrofina Dp71, fue necesario establecer las condiciones apropiadas para llevar a cabo los ensayos de interacción DNA-proteína, o de retardamiento, y su separación en geles de poliacrilamida.

De acuerdo al protocolo para la obtención de extractos nucleares descrito en la sección de Métodos, se obtuvieron lotes de proteínas nucleares y totales de células hepáticas Hepa-1. Se evaluó la integridad de las proteínas obtenidas mediante la visualización en un gel de poliacrilamida desnaturalizante teñido con azul de Coomassie, observándose una buena definición de las bandas (Figura 10A). Se utilizó el perfil de proteínas de un extracto celular total como referencia donde se observan bandas diferenciales correspondientes a proteínas citoplasmáticas (Figura 10A, carril Extractos totales). La cuantificación espectrofotométrica reveló la concentración de los lotes de extractos nucleares entre 0.35 y 1.5 mg de proteína por mililitro, y para definir apropiadamente la formación de complejos, se utilizó el lote con mayor concentración de proteína por mililitro.

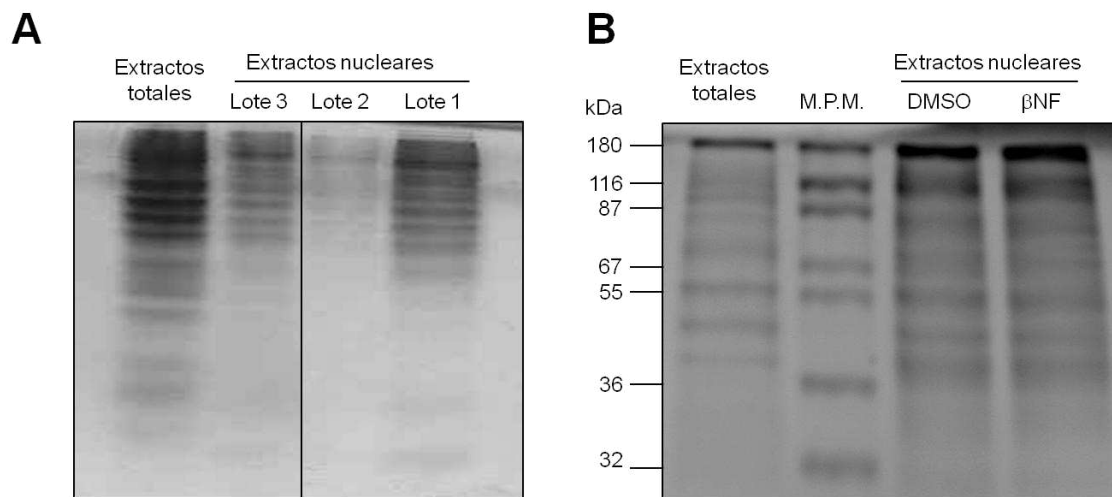


Figura 10. Integridad de extractos nucleares de células Hepa-1. Geles SDS-PAGE al 10% teñidos con azul de Coomassie donde se muestra la integridad de cantidades variables de los extractos nucleares obtenidos de células Hepa-1 sin tratamiento (panel A, lotes 1 a 3), y 11.7 μ g de extractos nucleares de células tratadas con β -naftoflavona (β NF) y dimetil sulfóxido (DMSO) respectivamente (panel B). Como referencia, se muestran extractos totales obtenidos de las mismas células (E. Totales). M.P.M: Marcador de peso molecular en kilodaltones (kDa).

Después del diseño y síntesis de oligonucleótidos con secuencias homólogas a elementos del promotor de la Dp71, se verificó la cantidad e integridad de éstos usando la separación en geles de agarosa (Figura 11).

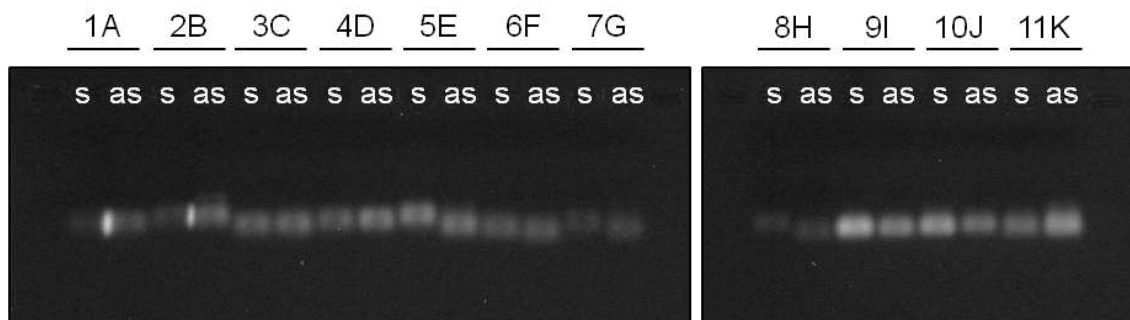


Figura 11. Integridad de oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla. Imagen de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Se señalan los nombres de cada par de oligonucleótido (de 1A a 11K) y sus respectivas cadenas complementarias: (s) sentido y (as) antisentido.

Después de la cuantificación de cada uno de ellos, se realizó la hibridación de cada cadena sentido con su respectiva cadena complementaria o antisentido, y se observó en geles de agarosa la formación del DNA de doble cadena o dúplex (Figura 12). Estos oligonucleótidos de doble cadena fueron marcados radiactivamente con [γ - 32 P]ATP, y la eficiencia de marcaje fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida y su posterior exposición en placa radiográfica (Figura 13). Para todas las sondas hubo una buena eficiencia de marcaje.

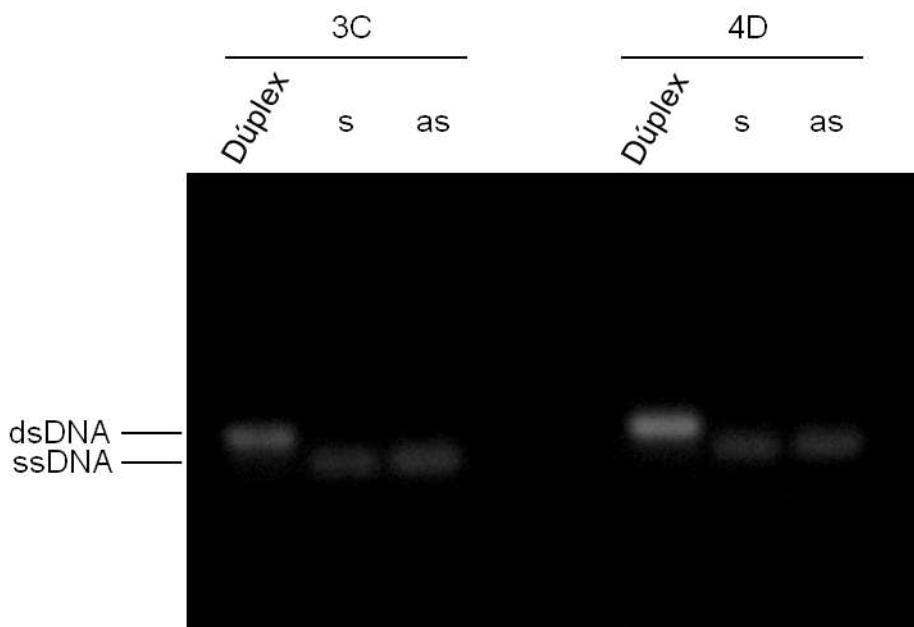


Figura 12. Formación de oligonucleótidos sintéticos de doble cadena. Imagen de gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio. Se muestra la formación de DNA de doble cadena (dsDNA, dúplex) para cada par de oligonucleótidos 3C y 4D. Se incluyen para su comparación las respectivas cadenas sencillas (ssDNA) sentido (s) y antisentido (as).

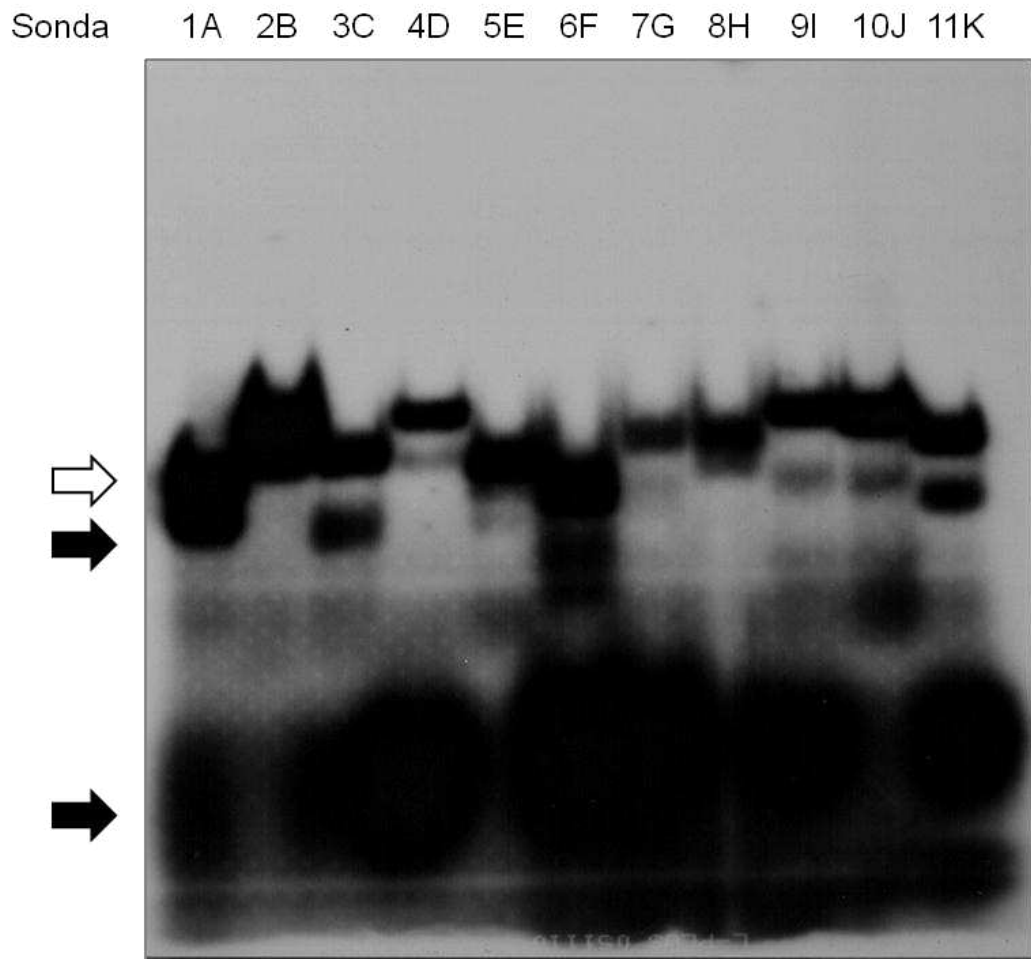


Figura 13. Eficiencia de marcaje de DNA de doble cadena. Imagen radiográfica de las once sondas (1A-11K), las cuales fueron marcadas radiactivamente y separadas por electroforesis un gel de poliacrilamida nativo al 6% como se describe en la sección de Métodos. La flecha blanca indica las sondas de DNA de doble cadena marcadas radiactivamente, y las flechas negras indican las sondas de cadena sencilla marcadas radiactivamente y el exceso del isótopo $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

Con la finalidad de determinar la concentración óptima de extractos nucleares para la formación de complejos con elementos del promotor, se llevó a cabo un ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida nativo con la sonda 9I, donde se utilizaron 0, 3, 6, 12 y 18 μg de extractos nucleares. Después de la electroforesis y la exposición en placa radiográfica se observó un aumento en la formación de complejos proporcionalmente a la cantidad de extractos nucleares utilizados (Figura 14). Con base a lo observado, se decidió utilizar la cantidad de 7 μg de extractos nucleares para los ensayos de retardamiento posteriores.

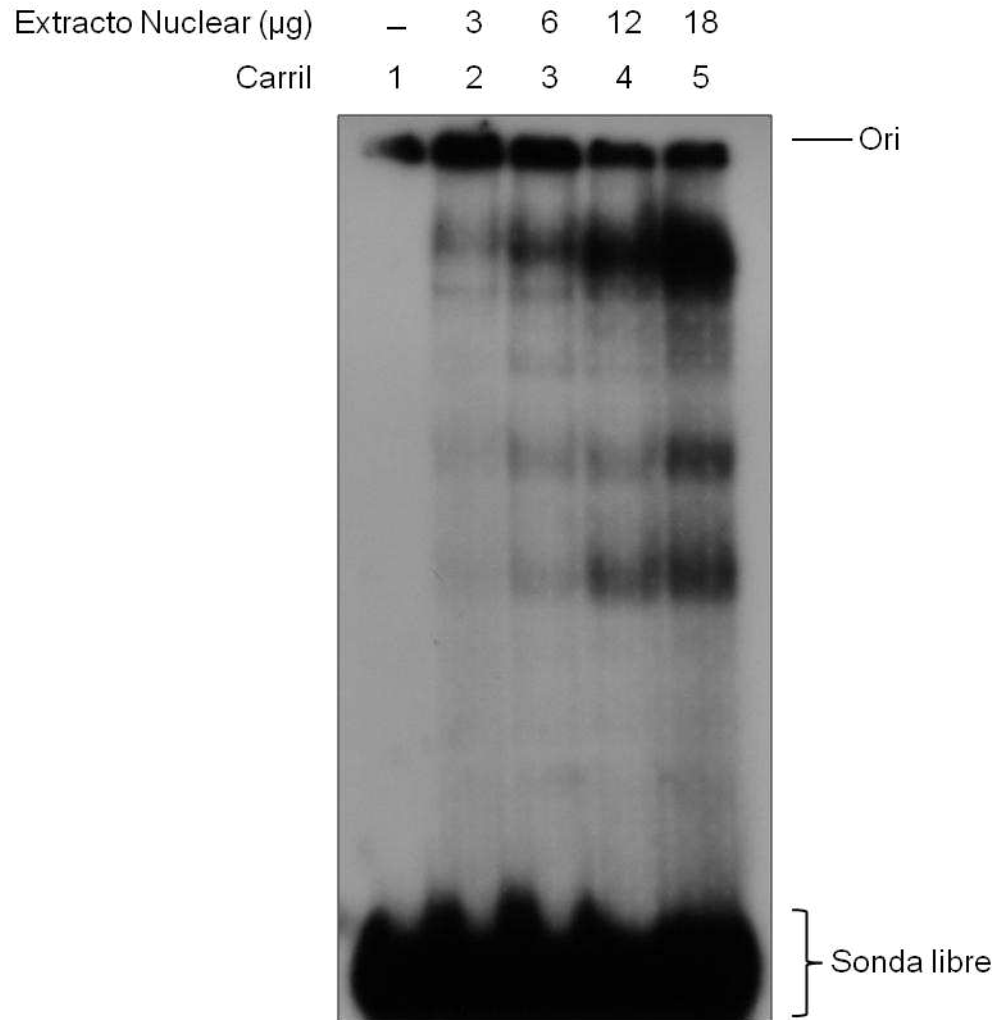


Figura 14. Titulación de extractos nucleares. Imagen radiográfica del ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida nativo al 6%. Se utilizó la sonda 9I para determinar la concentración de extractos nucleares apropiados. Carril 1, sonda 9I, Carril 2 a 5, sonda 9I más 0, 3, 6, 12 y 18 μg de extractos nucleares de células Hepa-1, respectivamente. El origen de la migración (Ori) y la sonda libre están indicados.

6.3 Identificación de complejos específicos en el promotor proximal de Dp71.

Para determinar si los sitios de unión presentes en la región del promotor proximal de Dp71 interactúan con las proteínas nucleares de las células Hepa-1, se llevaron a cabo ensayos de retardamiento en geles de poliacrilamida con las sondas de DNA de doble cadena marcadas radioactivamente, las cuales contienen a los elementos potenciales de

unión para factores de transcripción de la familia Sp, AP2 α , YY1, E2F-1 y AhR/ARNT, éste último capaz de reconocer a elementos XRE.

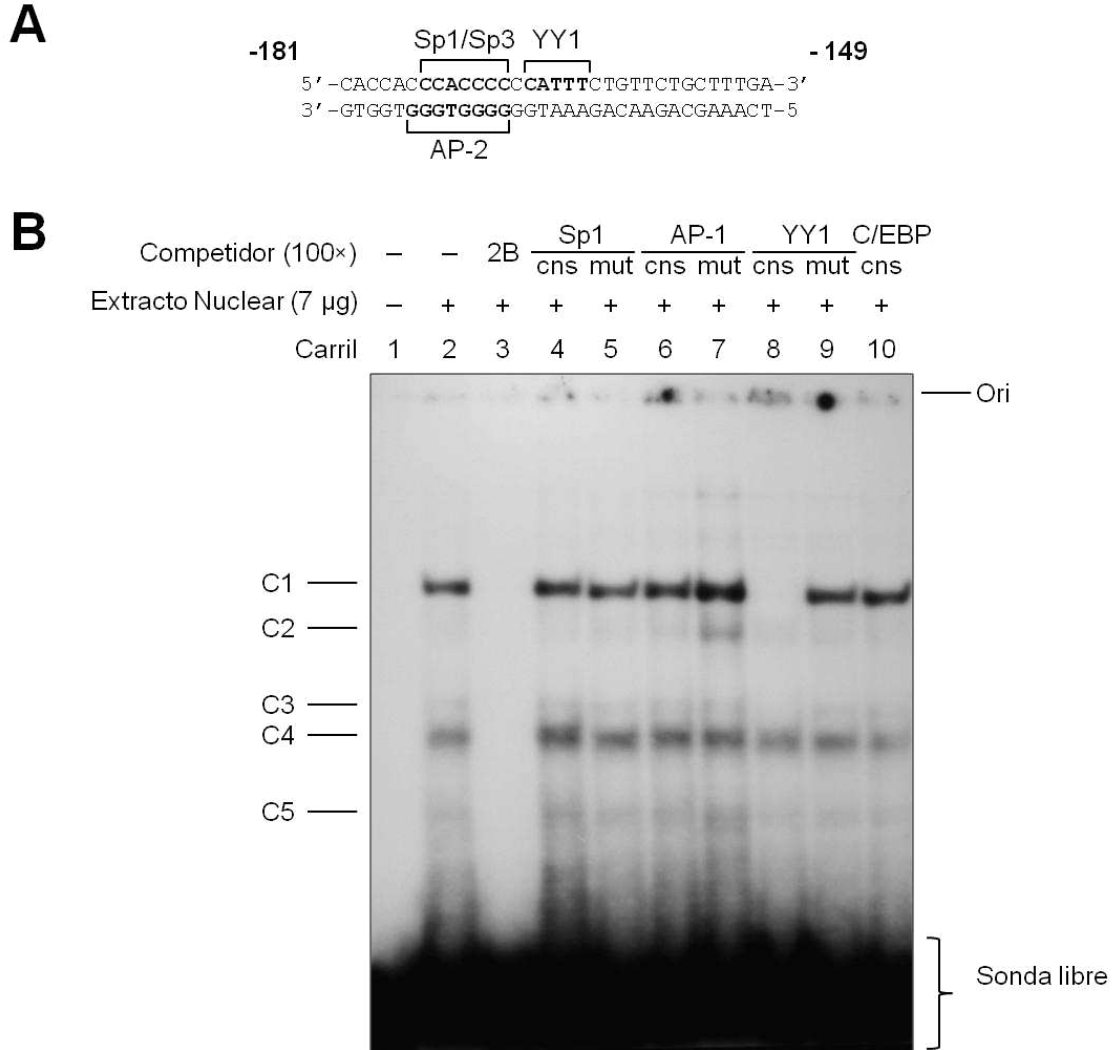


Figura 15. Caracterización de complejos de la sonda 2B con extractos nucleares de células Hepa-1. (A) Secuencia nucleotídica de la sonda 2B, homóloga a elementos del promotor de la Dp71, donde se señalan los elementos de reconocimiento para los factores de transcripción Sp1/Sp3, AP-2 y YY1. Las coordenadas respecto al sitio de inicio de la transcripción están indicadas con la numeración en la parte superior. (B) Se realizó el ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 2B marcada radiactivamente con [γ - 32 P]ATP y 7 μ g de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 (carril 2) y como referencia se utilizó la sonda sin extractos (carril 1). Para la caracterización de los complejos formados (C1 a C5) se añadieron oligonucleótidos competidores en exceso de 100 veces conteniendo la misma secuencia de la sonda 2B sin marca radiactiva (carril 3), las secuencias consenso y mutadas para los factores Sp1 (carriles 4 y 5), AP-1 (carriles 6 y 7), YY1 (carriles 8 y 9) y C/EBP como competidor heterólogo (carril 10). El origen de la migración (Ori) y la sonda libre están indicados.

El ensayo de retardamiento de la sonda 2B (Figura 15A) con los extractos nucleares mostró la formación de complejos DNA-proteína que se visualizan como bandas definidas (Figura 15B, carril 2). Para conocer la naturaleza de los complejos, se realizó un ensayo de competencia con la misma secuencia de la sonda 2B sin marca radiactiva, en un exceso de 100 veces, y se observó un desplazamiento de los complejos previamente formados (Figura 15B, carril 3), y de esta manera se definió la especificidad de cinco complejos principales (C1-C5). Para identificar a los posibles factores dentro de estos complejos se realizaron competencias con elementos potenciales. El complejo C1 fue desplazado por el uso del competidor conteniendo el elemento consenso de unión para la proteína YY1 (Figura 15B, carril 8). El uso del competidor con el elemento mutado para la misma proteína YY1 no mostró cambios (Figura 15B, carril 9). No se observó competencia con elementos consenso y mutados para los factores Sp1 y AP-1 (Figura 15B, carriles 4 a 7) ni con el elemento C/EBP consenso, el cual se utilizó como un competidor heterólogo (Figura 15B, carril 10).

Para identificar si el factor YY1 está interactuando con la secuencia de la sonda 2B, se realizó un ensayo de super-retardamiento con un anticuerpo para YY1 (Figura 16), donde se observó una inhibición en la formación del complejo C1 (Figura 16, carril 3). El uso de un anticuerpo heterólogo o no relacionado, el cual reconoce a la proteína CTCF, no mostró alteración en la formación del complejo observado (Figura 16, carril 4). Estos resultados demuestran la interacción *in vitro* del factor YY1 en la región -181 a -149 del promotor de la distrofina Dp71 en células hepáticas.

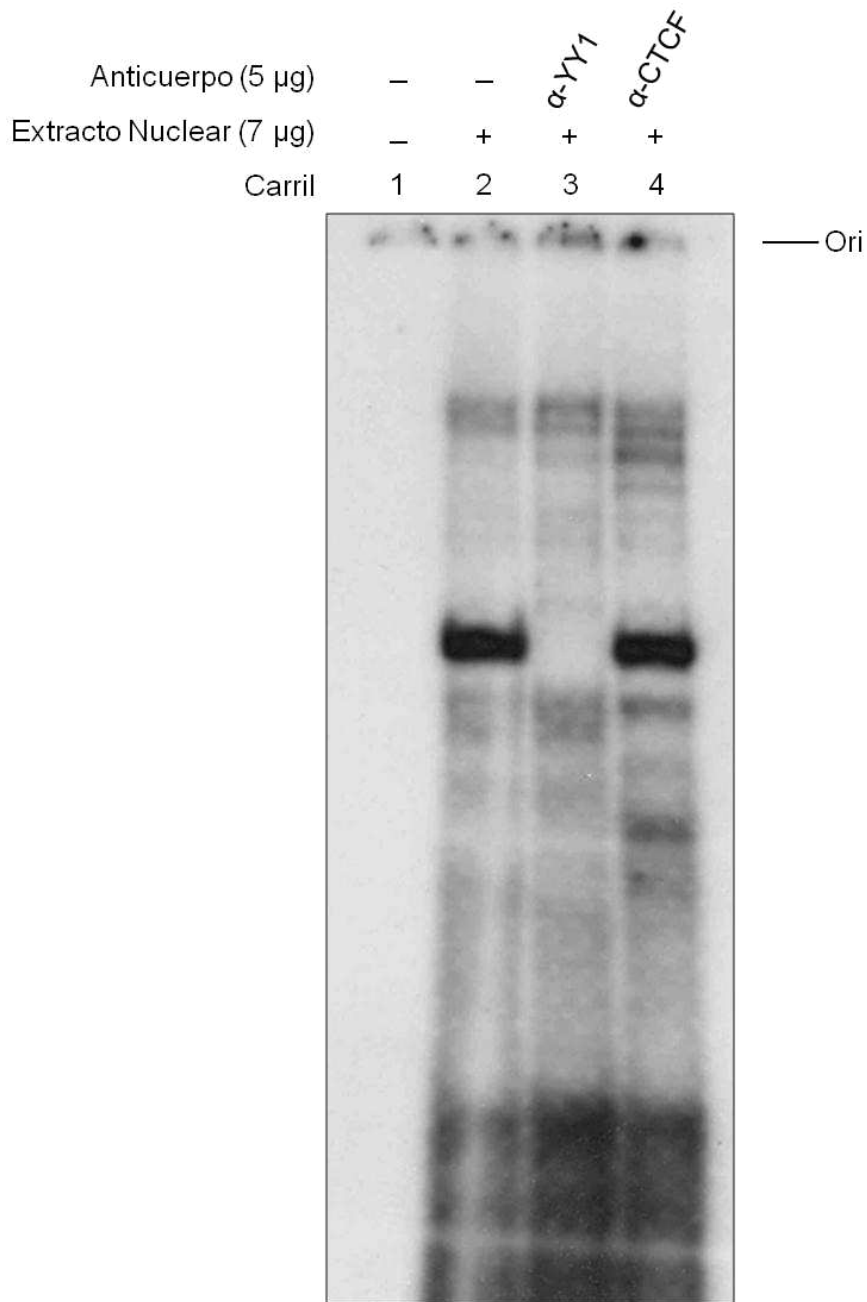
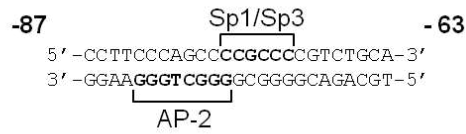


Figura 16. Identificación de los factores de transcripción asociados a la sonda 2B. Se realizó un ensayo de super-retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 2B marcada radiactivamente con [γ - 32 P]ATP y 7 μ g de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 (carril 2), y como referencia se utilizó la sonda sin extractos (carril 1). Para la identificación de los factores asociados se utilizaron anticuerpos específicos para YY1 (carril 3) y CTCF (carril 4). El origen de la migración (Ori) está indicado.

El ensayo de retardamiento de la sonda 5E (Figura 17A) con los extractos nucleares de las células Hepa-1 mostró la formación de complejos DNA-proteína que se visualizan como bandas definidas (Figura 17B, carril 2). Para conocer la naturaleza de los complejos, se realizó un ensayo de competencia con la misma secuencia de la sonda 5E sin marca radiactiva, en un exceso de 100 veces, y se observó un desplazamiento de los complejos previamente formados, de manera particular, de los complejos C2 a C6 (Figura 17B, carril 3). Para identificar a los posibles factores que contribuyen a la formación de estos complejos se realizaron competencias con elementos potenciales de unión para Sp1 y AP-1. Los complejos C3, C4 y C5 fueron desplazados por el uso del competidor conteniendo el elemento consenso de unión para la proteína Sp1 (Figura 17B, carril 4). El uso del competidor con el elemento mutado para la misma proteína Sp1 no mostró cambios (Figura 17B, carril 5). No se observó competencia con elementos consenso y mutados para los factores AP-1 (Figura 17B, carriles 6 y 7) ni con el elemento C/EBP consenso, el cual se utilizó como un competidor heterólogo (Figura 17B, carril 10).

Para identificar si el factor Sp1 y/o Sp3, los cuales reconocen la misma secuencia, están interactuando con la secuencia de la sonda 5E se realizó un ensayo de super-retardamiento con anticuerpos para Sp1 y Sp3. Cuando se adicionó el anticuerpo anti-Sp1 se observó la aparición de una nueva banda (Figura 18, carril 3), indicativo de la presencia del factor Sp1 en el complejo previamente observado. Por otro lado, cuando se adicionó el anticuerpo que reconoce al factor Sp3 se observó una inhibición en la formación del complejo previamente observado (Figura 18, carril 4), también indicativo de la presencia del factor Sp3. El uso de un anticuerpo no relacionado o heterólogo, el cual reconoce a la proteína CTCF, no mostró alteración alguna en la formación de los complejos (Figura 18, carril 5). Estos resultados demuestran la interacción *in vitro* de los factores Sp1 y Sp3 en la región -87 a -63 del promotor de la distrofina Dp71 en células hepáticas.

A**B**

Competidor (100×)	-	-	5E	Sp1		AP-1		C/EBP
				cns	mut	cns	mut	cns
Extracto Nuclear (7 µg)	-	+	+	+	+	+	+	+
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8

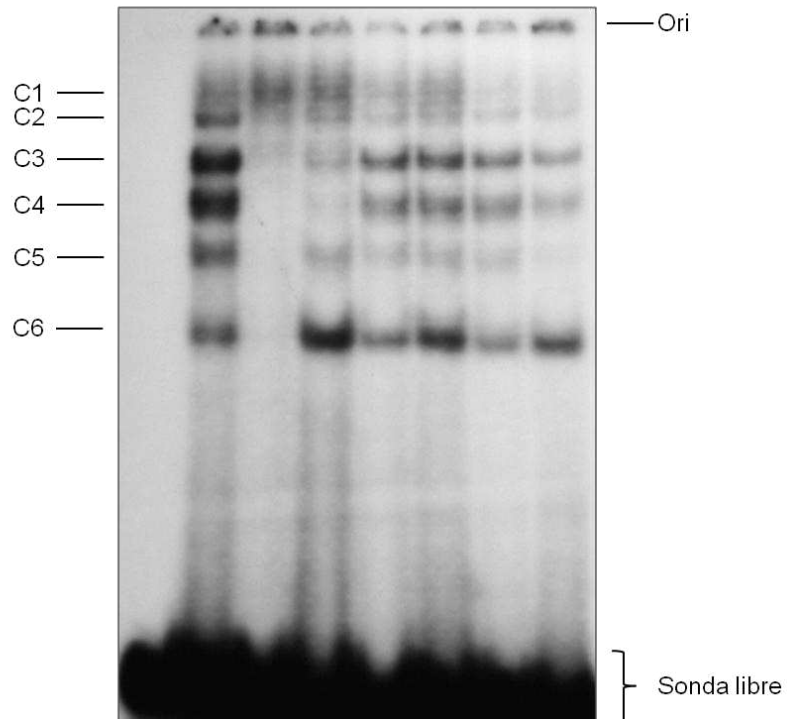


Figura 17. Caracterización de complejos de la sonda 5E con extractos nucleares de células Hepa-1. (A) Secuencia nucleotídica de la sonda 5E, homóloga a elementos del promotor de la Dp71, donde se señalan los elementos de reconocimiento para los factores de transcripción Sp1/Sp3 y AP-2. Las coordenadas respecto al sitio de inicio de la transcripción están indicadas con la numeración en la parte superior. (B) Se realizó el ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 5E marcada radiactivamente con [γ - 32 P]ATP y 7 µg de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 (carril 2) y como referencia se utilizó la sonda sin extractos (carril 1). Para la caracterización de los complejos formados (C1 a C6) se adicionaron oligonucleótidos competidores en exceso de 100 veces conteniendo la misma secuencia de la sonda 5E sin marca radiactiva (carril 3), las secuencias consenso y mutadas para los factores Sp1 (carriles 4 y 5), AP-1 (carriles 6 y 7), y C/EBP como competidor heterólogo (carril 8). El origen de la migración (Ori) y la sonda libre están indicados.

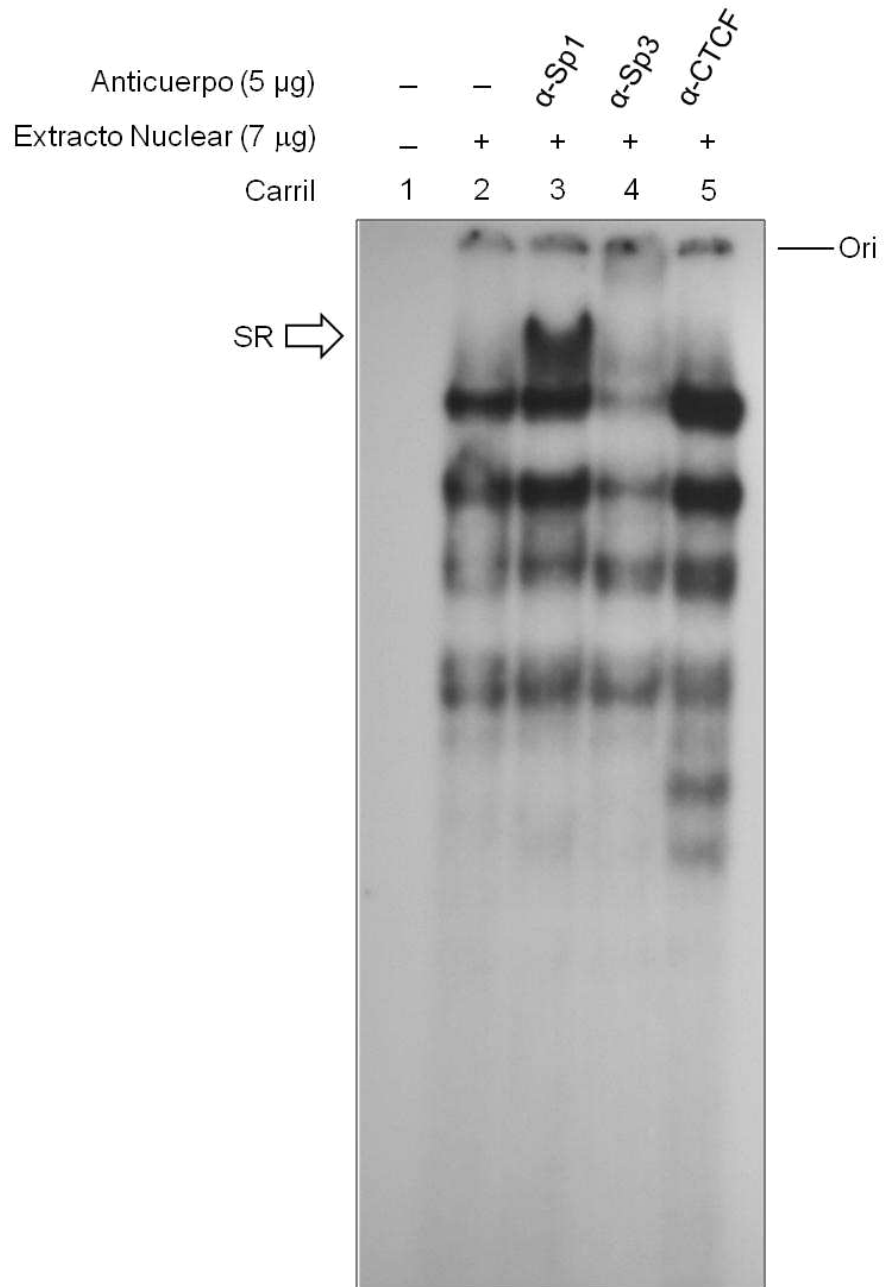


Figura 18. Identificación de los factores de transcripción asociados a la sonda 5E. Se realizó un ensayo de super-retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 5E marcada radiactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 7 μ g de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 (carril 2) y como referencia se utilizó la sonda sin extractos (carril 1). Para la identificación de los factores asociados se utilizaron anticuerpos específicos para Sp1 (carril 3), Sp3 (carril 4) y CTCF (carril 5). El origen de la migración (Ori) está indicado. La flecha abierta señala la formación del complejo DNA-factor Sp1-anticuerpo Sp1.

El ensayo de retardamiento de la sonda 3C (Figura 19A) con los extractos nucleares de las células Hepa-1 mostró la formación de un complejo DNA-proteína no bien definido (Figura 19B, carril 2). Para conocer la naturaleza de los complejos, se realizó un ensayo de competencia con la misma secuencia de la sonda 3C sin marca radiactiva, en un exceso de 100 veces, y no se observó un desplazamiento de los complejos previamente formados (Figura 19B, carril 3). Tampoco se observó competencia en ensayos con elementos consenso y mutados para el factor Sp1 (Figura 19B, carriles 4 y 5) ni con el elemento C/EBP consenso, el cual se utilizó como un competidor heterólogo (Figura 19B, carril 6).

Ensayos de retardamiento con las sondas 1A, 4D, 7G, 8H, 9I, 10J y 11K mostraron patrones similares a los observados para la sonda 3C (resultados no mostrados), lo que significa que no hay formación específica de complejos con extractos nucleares de las células hepáticas.

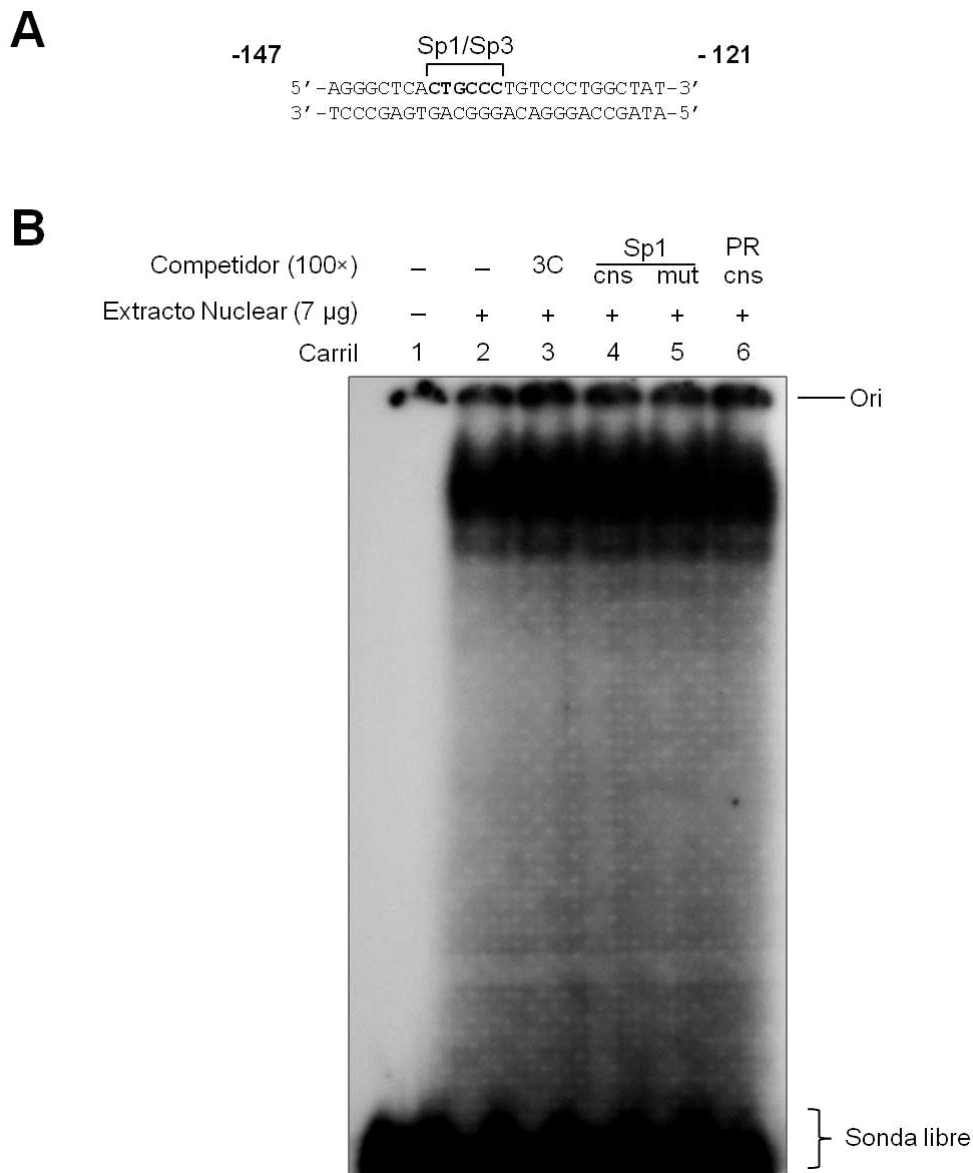


Figura 19. Caracterización de complejos de la sonda 3C con extractos nucleares de células Hepa-1. (A) Secuencia nucleotídica de la sonda 3C, homóloga a elementos del promotor de la Dp71, donde se señalan los elementos de reconocimiento para los factores de transcripción Sp1/Sp3. Las coordenadas respecto al sitio de inicio de la transcripción están indicadas con la numeración en la parte superior. (B) Se realizó el ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 3C marcada radiativamente con [γ -³²P]ATP y 7 µg de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 (carril 2) y como referencia se utilizó la sonda sin extractos (carril 1). Para la caracterización del complejo formado se adicionaron oligonucleótidos competidores en exceso de 100 veces conteniendo la misma secuencia de la sonda 2B sin marca radiactiva (carril 3), las secuencias consenso y mutadas para los factores Sp1 (carriles 4 y 5) y PR como competidor heterólogo (carril 6). El origen de la migración (Ori) y la sonda libre están indicados.

6.4 Efecto de la β NF sobre la formación de complejos transcripcionales en el promotor de la Dp71.

Previamente se ha reportado una disminución en los niveles de mRNA y proteína de la Dp71 por efecto de β NF en células hepáticas (Bermudez de Leon et al., 2006). Con la finalidad de evaluar si la formación de complejos observados con las sondas 2B y 5E son modificados por efecto de β NF, se procedió a cultivar a las células Hepa-1 en presencia de éste xenobiótico [50 μ M] por 24 h. Como control se utilizaron células cultivadas con dimetil sulfóxido (DMSO), el cual es el vehículo de la β NF, por el mismo periodo de tiempo. Se obtuvieron los extractos nucleares de las células hepáticas, los cuales mostraron la integridad apropiada en un gel de poliacrilamida desnaturizante teñido con azul de Coomassie (Figura 10B). La concentración de proteína de los extractos nucleares para células tratados con β NF y DMSO fue de 1.21 y 1.17 mg de proteína por mililitro, respectivamente.

El ensayo de retardamiento de la sonda 2B con extractos nucleares de células hepáticas tratadas con DMSO (Figura 20, carril 2) no mostró cambios con respecto al retardamiento con los extractos nucleares de células sin tratamiento (Figura 20, carril 4). Sin embargo, cuando se utilizaron los extractos nucleares de las células expuestas a β NF se observó una disminución en la formación del complejo C1 (Figura 20, carril 3). Por otro lado, el ensayo de retardamiento de la sonda 5E con extractos nucleares de células hepáticas tratadas con DMSO (Figura 21, carril 2) no mostró cambios con respecto al ensayo de retardamiento con extractos nucleares de células sin tratamiento (Figura 21, carril 4). De la misma manera que la sonda 2B, cuando se utilizaron los extractos nucleares de las células expuestas a β NF se observó una disminución en la formación de todos los complejos (Figura 21, carril 3). Estos resultados demuestran una disminución en la unión de los factores Sp1, Sp3 y YY1 en la secuencia del promotor de la Dp71 por efecto de la β NF.

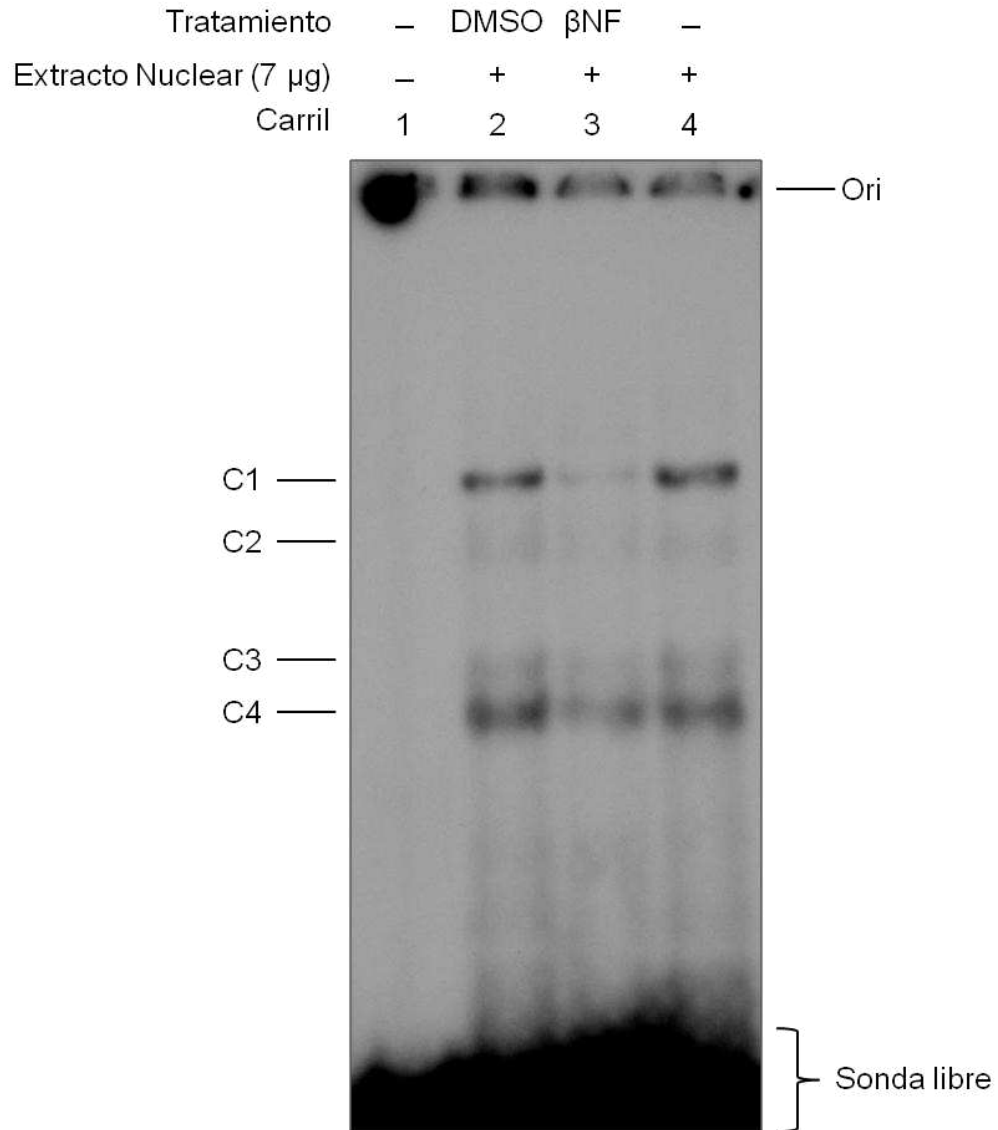


Figura 20. Caracterización de complejos de la sonda 2B con extractos nucleares de células Hepa-1 tratados con el xenobiótico β -naftoflavona. Se realizó el ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 2B marcada radiactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 7 μg de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 sin tratar (carril 4) y tratadas por 24 h con β -naftoflavona (β NF, carril 3) o con dimetil sulfóxido (DMSO, carril 2) como control. Se utilizó la sonda sin extractos (carril 1) como referencia. El origen de la migración (Ori) y la sonda libre están indicados.

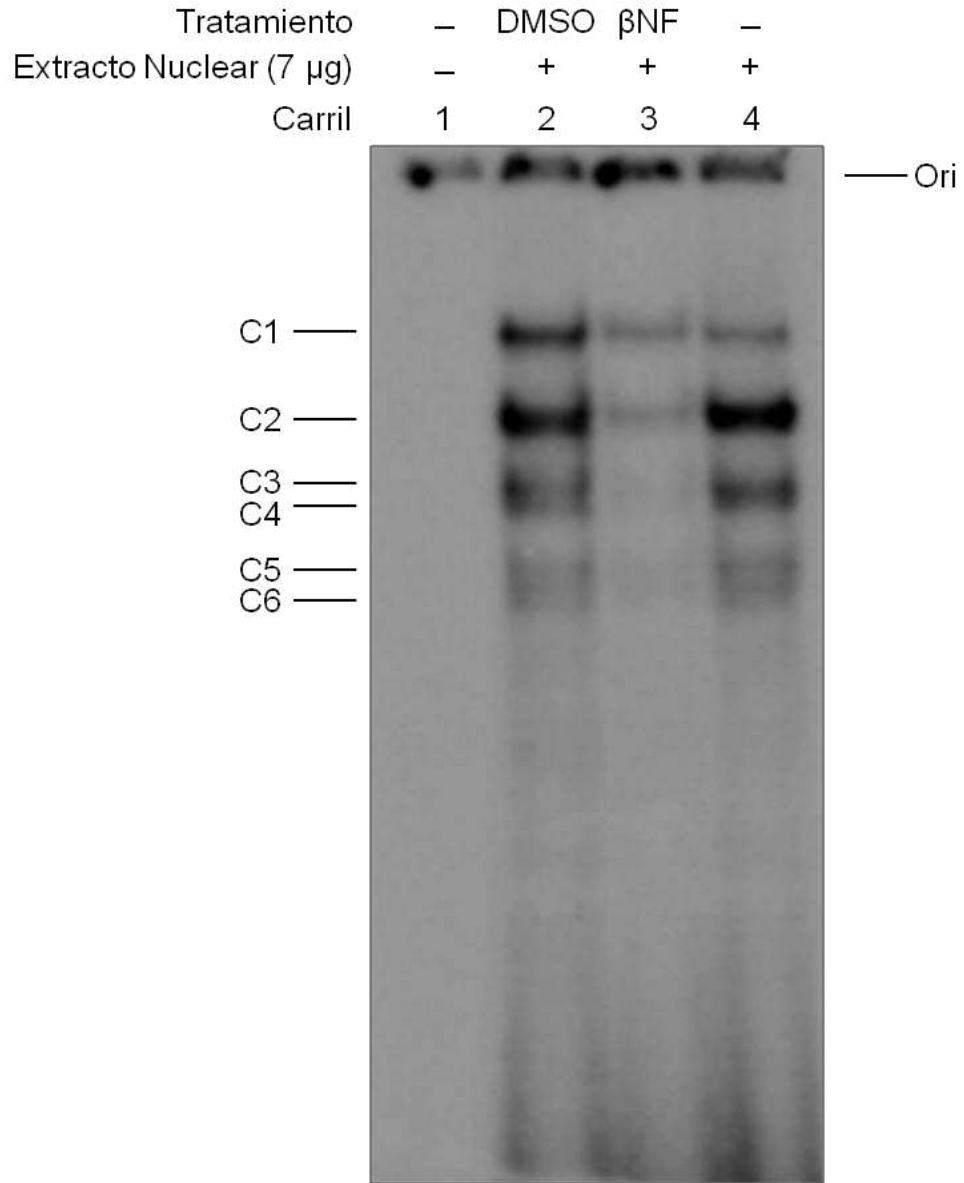


Figura 21. Caracterización de complejos de la sonda 5E con extractos nucleares de células Hepa-1 tratados con el xenobiótico β -naftoflavona. Se realizó el ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 5E marcada radiactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 7 μ g de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 sin tratar (carril 4) y tratadas por 24 h con β -naftoflavona (β NF, carril 3) o con dimetil sulfóxido (DMSO, carril 2) como control. Se utilizó la sonda sin extractos (carril 1) como referencia. El origen de la migración (Ori) está indicado.

Previamente se ha sugerido la participación de los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) en la regulación de distrofina Dp71 por efecto de β NF (Bermudez de Leon et al., 2006), entonces para determinar la participación de uno de estos elementos localizado en la región de -65 a -60 del promotor de la Dp71, se realizó un ensayo de retardamiento de la sonda 6F (Figura 22A) con los extractos nucleares de las células Hepa-1. Se observó la formación de un complejo DNA-proteína no bien definido (Figura 22B, carril 2). Para conocer la naturaleza de este complejo, se realizó un ensayo de competencia con la misma secuencia de la sonda 6F sin marca radiactiva, en un exceso de 100 veces, y no se observó un desplazamiento del complejo previamente formado (Figura 22B, carril 3). Tampoco se observó un desplazamiento del mencionado complejo cuando se realizaron los ensayos de competencia para los elementos consenso y mutado de unión para Sp1 (Figura 22B, carril 4), ni con el elemento C/EBP consenso, el cual se utilizó como un competidor heterólogo (Figura 22B, carril 6). Estos resultados sugieren que no existe formación específica de complejos en la región de -72 a -53 del promotor de la Dp71, el cual contiene a un elemento XRE, con extractos nucleares de células hepáticas.

Para evaluar si el efecto de la β NF también altera la formación de complejos con las sondas 1A, 4D, 6F, 7G, 8H, 9I, 10J y 11K, se realizaron ensayos de retardamiento con cada una de ellas. En la Figura 23 se muestra el ensayo correspondiente a la sonda 9I y los extractos nucleares de células expuestas a DMSO o β NF. No se observaron cambios en la formación de los complejos cuando se usaron extractos nucleares de células tratadas con DMSO y β NF con respecto a los extractos nucleares de células sin tratamiento (Figura 23, carriles 2 y 3 versus carril 4). Estos resultados sugieren que el efecto observado de la β NF sobre la disminución de asociación de los factores YY1, Sp1 y Sp3 es específico.

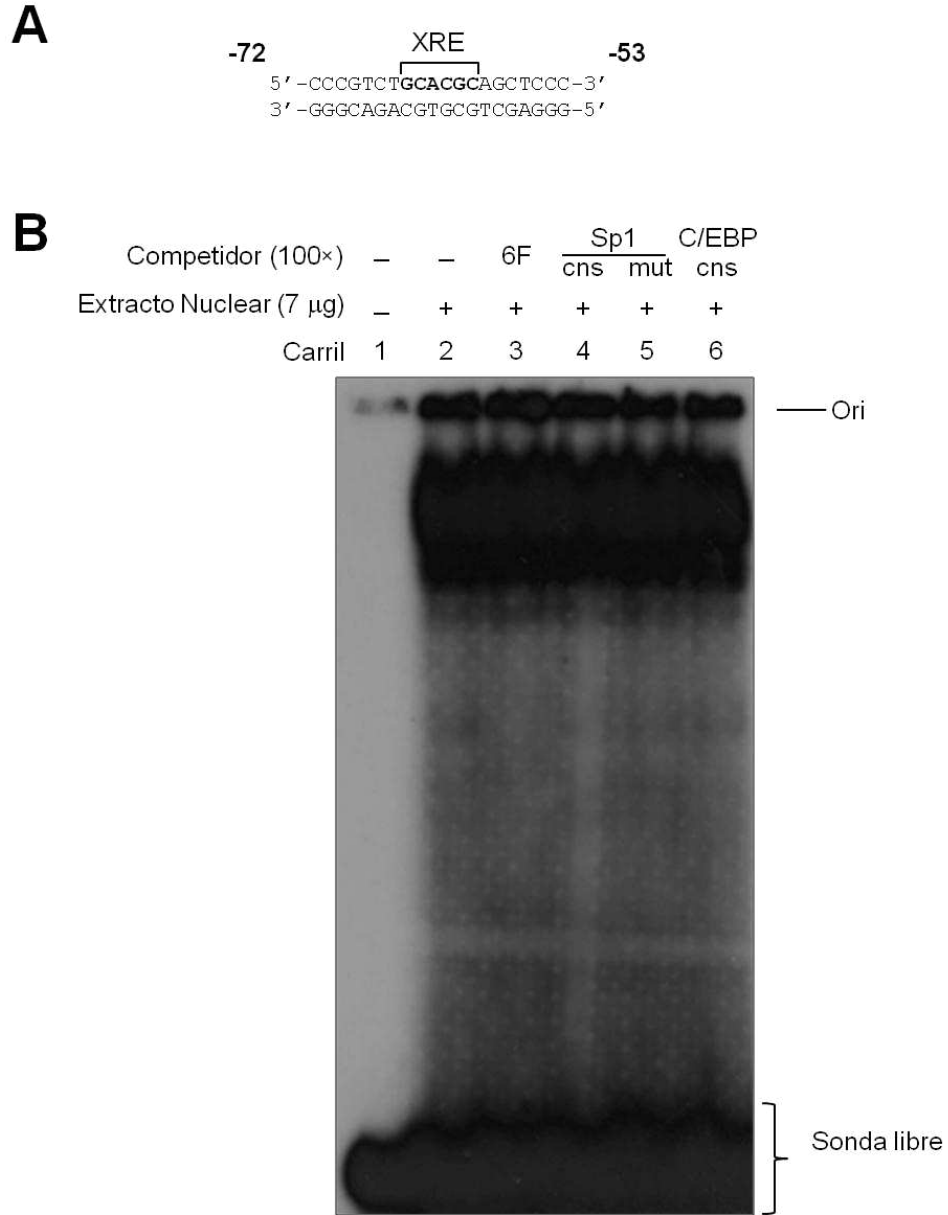


Figura 22. Caracterización de complejos de la sonda 6F con extractos nucleares de células Hepa-1. (A) Secuencia nucleotídica de la sonda 6F, homóloga a elementos del promotor de la Dp71, donde se señalan los elementos de reconocimiento para los factores de transcripción Sp1/Sp3 y el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE). Las coordenadas respecto al sitio de inicio de la transcripción están indicadas con la numeración en la parte superior. (B) Se realizó el ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 6F marcada radiactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 7 µg de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 (carril 2) y como referencia se utilizó la sonda sin extractos (carril 1). Para la caracterización del complejo formado se adicionaron oligonucleótidos competidores en exceso de 100 veces conteniendo la misma secuencia de la sonda 6F sin marca radiactiva (carril 3), las secuencias consenso y mutadas para los factores Sp1 (carriles 4 y 5) y C/EBP como competidor heterólogo (carril 6). El origen de la migración (Ori) y la sonda libre están indicados.

Tratamiento	-	DMSO	β NF	-
Extracto Nuclear (7 μ g)	-	+	+	+
Carril	1	2	3	4

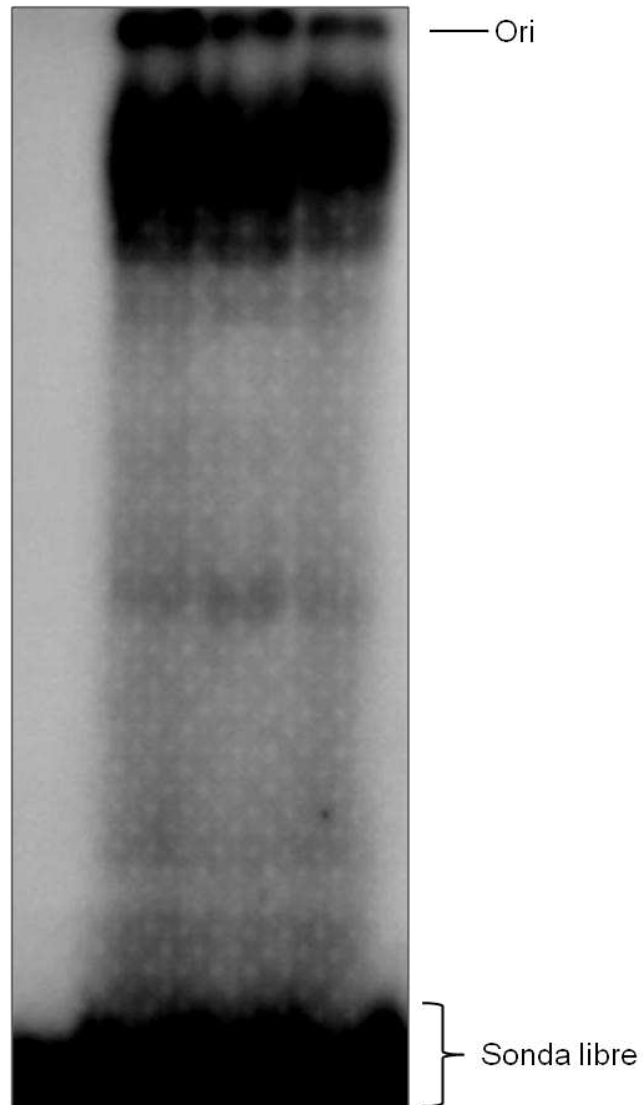


Figura 23. Caracterización de complejos de la sonda 9I con extractos nucleares de células Hepa-1 tratados con el xenobiótico β -naftoflavona. Se realizó el ensayo de retardamiento en gel de poliacrilamida usando la sonda 9I marcada radiactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 7 μ g de extractos nucleares extraídos de células Hepa-1 sin tratar (carril 4) y tratadas por 24 h con β -naftoflavona (β NF, carril 3) o con dimetil sulfóxido (DMSO, carril 2) como control. Se utilizó la sonda sin extractos (carril 1) como referencia. El origen de la migración (Ori) y la sonda libre están indicados.

7. DISCUSIÓN

El conocimiento del mecanismo de regulación en la expresión de genes y de los factores involucrados es de suma importancia cuando se pretende definir la función de una proteína en un tejido específico. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue identificar los elementos y factores relacionados con la actividad transcripcional de la distrofina Dp71 en células hepáticas, y el efecto del xenobiótico β -naftoflavona en la formación de los complejos transcripcionales. La regulación de la expresión de Dp71 ha mostrado diferencias evidentes dependiendo del tejido estudiado; por ejemplo, la expresión de Dp71 se reduce durante la diferenciación muscular, contrario a lo observado en la diferenciación neuronal donde la expresión de esta misma proteína se ve incrementada sustancialmente (de Leon et al., 2005; Morales-Lazaro et al., 2010). De León et al. (2005) caracterizaron la región del promotor basal de Dp71, la cual demostró ser suficiente para activar al gen en el estado no diferenciado. En este trabajo se analizó la misma región proximal para identificar los elementos que participan en la regulación de Dp71 en el sistema hepático.

Análisis in silico de la secuencia del promotor proximal de Dp71 reveló un sitio de reconocimiento para el factor transcripcional YY1 (también denominado Yin Yang 1, δ , NF-E1, UCRBP ó CF1). El factor YY1 es una proteína de 414 aminoácidos y un peso aproximado de 44 kDa (Aikawa, 2007) que reconoce la secuencia core CCAT y ACAT (Yant et al., 1995). Como factor transcripcional de la familia tipo Krüppel (Krüppel-like), los cuales poseen un dominio de unión al DNA consistente de tres dedos de zinc, YY1 es multifuncional y con presencia ubicua; su función se ha relacionado con mecanismos moleculares que influyen en la estabilidad y función celular normal como control transcripcional de genes, remodelamiento de la cromatina, reparación del DNA y tumorigénesis (Gordon et al., 2006). Además, se ha reportado su participación en

procesos biológicos incluyendo el control del ciclo celular, embriogénesis, infección viral, apoptosis, oncogénesis, entre otros (Deng et al., 2010). YY1 fue el primer factor transcripcional conocido que se autoregula a través de sitios de unión al DNA en genomas de mamíferos y se ha estimado que participa en el control transcripcional de aproximadamente el 10% de genes (Kim et al., 2009).

En este trabajo, los ensayos de super-retardamiento en gel de poliacrilamida para la región promotora de Dp71 mostraron la ausencia de una banda correspondiente al complejo con el factor YY1 y el DNA marcado, lo cual indica un reconocimiento específico del anticuerpo anti-YY1 sobre el factor impidiendo la unión de éste a su sitio. Éste tipo de efecto ya ha sido reportado por Yokoyama et al. (2010) en donde YY1 es “secuestrado” por su respectivo anticuerpo anti-YY1 y como resultado se observa la ausencia de la banda (Yokoyama et al., 2010). Kawada et al. (2005) también reportaron la transactivación del promotor del gen ATP2C1 (que codifica para una ATPasa dependiente de Ca⁺) por los factores Sp1 y YY1 (Kawada et al., 2005). La ausencia del complejo por el efecto del anticuerpo anti-YY1 fue similar al observado en este trabajo.

Dependiendo del contexto celular, los mecanismos de acción de YY1 incluyen la activación o represión directa, activación o represión indirecta vía reclutamiento de co-factores, o activación o represión por disrupción en los sitios de unión o por cambios conformacionales de DNA (Meier and Groner, 1994; Hehlhans and Strominger, 1995; Ye et al., 1996; Li et al., 2004; Xi et al., 2007; Yu et al., 2010; Romeo et al., 2011). Aunque no existen reportes previos acerca de la participación de este factor con la expresión de Dp71, Galvagni et al. (1998) reportó la participación de YY1 como un regulador negativo en la expresión de la distrofina de 427 kDa en células musculares no diferenciadas (Galvagni et al., 1998).

Los ensayos funcionales del promotor proximal de Dp71 en los sistemas muscular y neuronal (de Leon et al., 2005; Morales-Lazaro et al., 2010) reportaron una actividad residual cuando se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a los elementos de

reconocimiento para los factores de la familia Sp; una posible causa de ésta actividad podría ser la participación de YY1 en los sistemas celulares mencionados.

Análisis previos de la región mínima promotora de Dp71 revelaron que no posee caja TATA o CAAT, pero contiene islas CpG que son sitios potenciales de metilación y/o unión de factores de la familia de transcripción Sp (Lederfein et al., 1993; de Leon et al., 2005). Los ensayos de retardamiento en este trabajo demostraron la interacción específica de los factores transcripcionales Sp1 y Sp3 con el promotor proximal de Dp71 en células hepáticas. Estos datos son concordantes con los observados por de Leon et al. (2005) y Morales-Lázaro et al. (2010) acerca de la interacción de Sp1 y Sp3 en el promotor de la Dp71 en células musculares y neuronales, respectivamente.

Los factores de transcripción Sp1 y Sp3 tienen una expresión ubicua, y se han relacionado con los mecanismos de regulación de cientos de genes que poseen o no caja TATA y controlan diversos procesos celulares como crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, angiogénesis, de respuesta inmune, entre otros (Guo et al., 2008; Tan and Khachigian, 2009). Al igual que el factor YY1, se ha reportado también que Sp1 y Sp3 participan en mecanismos moleculares de regulación del ciclo celular, remodelación de la cromatina y protección de islas libre de metilación, entre otros (Li et al., 2004).

Sp1 es un factor transcripcional nuclear de 785 aminoácidos y con un peso molecular de 100 a 110 kDa, (Tan and Khachigian, 2009); mientras que Sp3 está compuesta de 781 aminoácidos y posee un peso molecular aproximado de 115 kDa (Li et al., 2004). Ambas proteínas comparten el mismo sitio de reconocimiento por cajas GC lo que les permite la transactivación de genes regulados por estos elementos. (Jeckel et al., 2009; Wu et al., 2010). Estos factores de la familia Sp, al igual que YY1, pertenecen a la familia de factores de transcripción de tipo Krüppel que contienen un dominio de unión al DNA de tres dedos de zinc altamente conservado, propiedad que les otorga versatilidad en su participación en diferentes mecanismos moleculares (Philipsen and Suske, 1999).

La regulación de la actividad transcripcional de Sp1 y Sp3 está sujeta a diferentes variables, incluyendo los niveles relativos de proteína, el nivel y el estado de modificación de las proteínas que interactúan con Sp1 y Sp3 formando complejos, y las modificaciones post-traduccionales que afectan o promueven la actividad de unión y por ende activando o reprimiendo la expresión de genes (Li et al., 2004).

Como se había reportado previamente, dentro de la región promotora de la Dp71 existen cuatro elementos consenso de respuesta a xenobióticos (Bermudez de Leon et al., 2006), uno de los cuales se localiza en la posición -60/-65 del promotor proximal. Bermudez de Leon et al. (2006) y Blancas-Sánchez (2011) reportaron la inhibición de la expresión de Dp71 por efecto de β -naftoflavona en células hepáticas murinas y humanas, respectivamente. Estos datos sugieren una regulación negativa en la expresión de Dp71 por efecto de β -naftoflavona que se conserva entre especies, y cuyo mecanismo permanece aún desconocido. Fujisawa-Sehara et al. (1988) han reportado la participación de los elementos XRE en procesos de activación transcripcional (Fujisawa-Sehara et al., 1988). Con el objetivo de identificar la participación de los elementos XRE en la regulación transcripcional de Dp71 en células hepáticas, se utilizó la secuencia correspondiente a este elemento para realizar ensayos de interacción in vitro. Los resultados no mostraron formación de complejos específicos, lo que sugiere la ausencia de reconocimiento del receptor a hidrocarburos arilo por efecto de la β -naftoflavona.

Sin embargo, los complejos formados por los factores de transcripción YY1, Sp1 y Sp3 se redujeron en los ensayos de interacción in vitro usando extractos nucleares de células tratadas con β -naftoflavona. Con base en estos resultados surgen dos hipótesis del mecanismo de β -naftoflavona sobre los factores de transcripción mencionados. El primero sugiere la inducción de modificaciones post-traduccionales de los factores transcripcionales por efecto de β -naftoflavona o sus metabolitos, que reducen la afinidad por sus elementos en el promotor de Dp71 y disminuyen la expresión. Los factores YY1, Sp1 y Sp3 están sujetos a modificaciones post-traduccionales como la acetilación, glicosilación, fosforilación, ubiquitinación, entre otras, y dichas modificaciones afectan su actividad de unión a los sitios blanco (Tan and Khachigian, 2009; Jokela et al., 2011). La segunda hipótesis sugiere que β -naftoflavona y/o sus metabolitos alteran la expresión

de los factores transcripcionales ocasionando bajos niveles de proteínas y por consecuencia la disminución de la interacción de éstos a sus sitios de unión dentro del promotor de la Dp71. Es necesario llevar a cabo ensayos adicionales para elucidar éstos mecanismos.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Conclusiones

Se identificaron elementos potenciales en la secuencia del promotor proximal de Dp71.

Los factores YY1 y Sp1/Sp3 interaccionan in vitro con las secuencias ubicadas de -181 a -149 y de -87 a 63- respectivamente, del promotor proximal de Dp71 en células hepáticas.

El tratamiento con β -naftoflavona reduce la interacción in vitro de los factores YY1, Sp1 y Sp3 con elementos del promotor proximal de Dp71 en células hepáticas.

8.2 Recomendaciones

Realizar análisis funcionales con la sobreexpresión de los factores Sp1, Sp3 y YY1

Realizar análisis funcionales del promotor con mutagénesis dirigida a los elementos de interacción con los factores de transcripción Sp1, Sp3 y YY1.

Realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para confirmar la interacción in vivo de los factores Sp1, Sp3 y YY1.

Realizar análisis funcionales de la actividad del promotor con ensayos de inhibición de los factores Sp1, Sp3 y YY1.

Determinar la cantidad y/o modificaciones post-traduccionales de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y YY1 en células hepáticas tratadas con β -naftoflavona.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Buffer y soluciones

1. Buffers para la extracción de proteínas nucleares

Buffer de lisis

10 mM HEPES pH 7.9
10 mM KCl
0.1 mM EDTA pH 8.0
0.1 mM EGTA pH 8.0
1 mM DTT
0.5 mM PMSF

Buffer de extracción

20 mM HEPES pH 7.9
0.4 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8.0
1 mM EGTA pH 8.0
1 mM DTT
1 mM PMSF

Buffer de Muestra 2X

24 mM HEPES pH7.8
20% Glicerol
1 mM EDTA pH 8.0
8 mM Cloruro de Magnesio
120 mM Cloruro de Potasio
1 μ l DTT 1M

2. Buffer y soluciones para los gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%

Gel separador de poliacrilamida al 10% (10 mL)

4.680 mL de Agua destilada
3.300 mL de Acrilamida mix al 30% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1)
1.250 mL de Tris·HCl 3.0 M pH 8.8
100 μ L de SDS al 10%
666 μ L de Persulfato de amonio al 1.5%
4 μ l de TEMED

Gel concentrador de poliacrilamida al 4% (3 mL)

1.62 mL de Agua destilada
400 μ L de Acrilamida mix al 30% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1)
750 μ L de Tris·HCl 5.0 M pH 6.8
30 μ L de SDS al 10%
200 μ L de Persulfato de amonio al 1.5%
3 μ l de TEMED

Buffer Tris-Glicina pH 8.3

0.25 M de Tris-HCl

0.192 M Glicina

0.1% SDS

3. Buffer y soluciones para los Ensayos de retardamiento en gel de poliacrilamida

Buffer de proteínas 2X

24 mM HEPES pH 7.8

20% de glicerol

1 mM EDTA pH 8.0

8 mM Cloruro de Magnesio

120 mM Cloruro de Potasio

Buffer de Espermidina/Magnesio

4 mM Cloruro de Magnesio

4 mM espermidina

Buffer TBE10X

45 mM Tris Base

45 mM Acido Bórico

1 mM EDTA

Gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 6% (50mL)

10 mL de poliacrilamida al 30% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1)

2.5 mL de buffer TBE 10X

37.5 mL de agua destilada

80 µL de TEMED (grado ultrapuro)

250 µL de Persulfato de Amonio al 10 %

APÉNDICE B

Análisis in silico de la secuencia del promotor proximal de Dp71 (-224 a +65) usando los software Alibaba 2.1 y TESS

Resultados AliBaba 2.1

```

=====
seq( 0.. 59)      gttcttgggtctagcttcaactcctttcgatctttctttatgtcaccacccacccccat
Segments:
4.6.1.0      30   39           =====SRY=====
2.3.1.0      48   61           =====Sp1=====
3.5.3.0      59   68           =
=====
seq( 60.. 119)   ttctgtctctgctttgaagggtcactgcctgtccctggctatccaggttccagggtcc
Segments:
2.3.1.0      48   61           ==
3.5.3.0      59   68           ==IRF-1==
2.1.1.1      61   70           ==GR alpha
2.3.1.0      84   96           =====Sp1=====
2.2.2.0     112  121           =====Ttx=
4.3.2.0     113  122           =====SRF
=====
seq( 120.. 179)  ttaggtggggaggagcccttccagccccgcccgctctgcacgcagctccccctcctg
Segments:
2.2.2.0     112  121           ==
4.3.2.0     113  122           ===
9.9.77      124  133           =CACCC-bi=
2.3.1.0     124  136           =====Sp1=====
2.3.1.0     144  155           =====Sp1=====
2.3.2.1     145  154           ==Krox-20=
2.3.2.3     145  154           =====GLI3=====
9.9.270     145  154           =====ETF=====
2.3.1.0     162  176           =====Sp1=====
2.3.2.1     167  176           ==Krox-20=
2.3.1.0     168  179           =====Sp1=====
2.3.1.0     178  192           ==
=====
seq( 180.. 239)  tccgccccgccagcccgccagccagcggcgctcctccgcagtgtttcggtgcg
Segments:
2.3.1.0     178  192           =====Sp1=====
2.3.1.0     186  195           =====Sp1=====
2.3.1.0     193  202           =====Sp1=====
9.9.539     198  207           =====NF-1=====
3.5.1.2     206  215           ===Adf-1===
2.3.1.0     213  222           =====Sp1=====
9.9.539     233  242           =====NF-
2.3.1.0     239  253           =
=====
seq( 240.. 299)  agcctggggggcggcgcttgactttcggggagccccgtggcttgggcaa
Segments:
9.9.539     233  242           1==
2.3.1.0     239  253           =====Sp1=====
2.3.1.0     245  255           =====Sp1=====
1.6.1.0     246  255           =AP-2alph=
1.6.1.0     266  275           =AP-2alph=
1.1.5.2     271  280           ==TAF-1==
2.3.1.0     271  280           =====Sp1=====
2.3.1.0     277  286           =====Sp1=====
1.1.3.0     281  290           =C/EBPalp=

```

Resultados TESS.

```

00001 gttcttgggt ctagcttcaa ctcccttcga tctttcttta tgtcaccacc 00050
===== (7.3801) HSF1 M00029
===== (7.8406) RC2 I00329
===== (8.00) Dof2,Dof3,MNB1a,PBF R08443,R08440,R08441,R08442
===== (8.00) Dof2,Dof3,MNB1a,PBF R08443,R08441,R08442,R08440
===== (7.8210) HSTF M00028
===== (8.00) Dof2,Dof3,MNB1a,PBF R08441,R08442,R08440,R08443
===== (8.5507) IHF I00375
===== (9.5098) Cad I00232
===== (10.2467) NF-S I00202
===== (8.00) AP-1 R00368
===== (7.6530) CAC-binding I00019
===== (10.00) CAC-binding protein R04295
===== (10.00) CACCC-binding factor,gammaCAC1,gammaCAC2

R00559,R00559,R01474
===== (14.00) PuF R02239
===== (10.6684) CAC-binding protein Q00018
===== (12.00) Sp1 R08207
===== (10.00) AP-2,AP-2alpha,AP-2alphaA,AP-2alphaB

R02121,R02121,R02121,R02121,R02121,R02121
===== (7.6530) CAC-binding I00019

00051 caccceccat ttctgttctg ctttgaagg gctcactgcc ctgtccctgg 00100
===== (10.00) CACCC-binding factor,gammaCAC1,gammaCAC2 R00559,R00559,R01474
===== (14.00) PuF R02239
===== (10.6684) CAC-binding protein Q00018
===== (12.00) Sp1 R08207
===== (10.00) AP-2,AP-2alpha,AP-2alphaA,AP-2alphaB R02121,R02121,R02121,R02121,R02121,R02121
===== (7.6530) CAC-binding I00019
===== (8.00) GAL4 R00496
===== (10.00) YY1 R02133
===== (14.00) HNF-A R00686
===== (10.00) YY1 R00603
===== (7.8210) HSTF M00028
===== (9.5098) Lva I00193
===== (14.00) GR R01659
===== (8.00) LEF-1,TCF-1(P),TCF-1,TCF-1A,TCF-1B,TCF-1C,TCF-1E,TCF-1F,TCF-1G,TCF-2alpha
R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248
===== (12.00) Lva R01135
===== (12.00) GR alpha,GR beta,PR A,PR R00973,R00973,R00973,R00973
===== (12.00) AR,GR,PR A,PR B R01101,R01120,R01122,R01122,R01312,R01550
===== (10.7194) GR Q00076
===== (10.8302) GR/FR I00104
===== (9.8141) PR I00288
===== (7.3801) HSF1 M00029
===== (16.00) TCF-4 R08647
===== (8.00) LEF-1,TCF-1(P),TCF-1,TCF-1B,TCF-1C,TCF-1E,TCF-1F,TCF-1G,TCF-2alpha
R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248,R02248
===== (14.00) TCF-3 R08594
===== (14.00) SRY,TCF-1A R04297,R04297
===== (8.00) Dof2,Dof3,MNB1a,PBF R08440,R08441,R08442,R08443
===== (12.00) TFIID R02749
===== (8.00) Dof2,Dof3,MNB1a,PBF R08440,R08441,R08442,R08443
===== (11.00) ECR R03328
===== (12.00) Sp1 R01540
===== (10.00) ER-alpha,LF-A1,Sp1 R01171,R04883,R04883
===== (10.00) NF-E R00558
===== (12.00) GR R03539
===== (7.5231) LBP-1 I00191
===== (8.00) NF-1 R01681

00101 ctatccaggt tccaggtcc ttaggtgggg gaggagccct tccagcccc 00150
===== (8.00) NF-1 R01681
===== (12.00) GATA-1 R08167
===== (10.00) NF-E R00554
===== (10.1357) ABF-2 I00389
===== (8.00) NF-1 R01681
===== (7.5231) LBP-1 I00191
===== (11.6548) H-APF-1 I00175
===== (13.00) C/EBPbeta R02170
===== (10.2467) IL-6.RE-BP I00218
===== (7.5231) LBP-1 I00191
===== (7.9248) H4TF2 I00180
===== (10.00) H4TF-2 R00681
===== (12.00) deltaEF1 R08520
===== (12.00) Sp1 R08207
===== (14.00) CAC-binding protein R04290
===== (7.6530) CAC-binding I00019
===== (9.7926) MIG1 I00321
===== (8.00) GAL4 R00496
===== (10.00) GAL4 R00492
===== (12.00) c-Ets-2 R04343
===== (10.2467) IL-6.RE-BP I00218
===== (11.6548) H-APF-1 I00175
===== (13.00) C/EBPbeta R02170
===== (12.00) Sp1

R02245,R02245,R02245,R02245,R02245,R02245,R02245,R02245
===== (10.00) AP-2,AP-2alpha,AP-2alphaA,AP-2alphaB

R02121,R02121,R02121,R02121,R02121,R02121
===== (14.00) GCF R02644
===== (11.1281) GCF I00152
===== (10.00) T-Ag R01372
===== (20.00) TBP,TFIID R01764,R01764
===== (16.9098) Sp1 I00032
===== (8.00) GAL4 R00496
===== (12.00) ER-alpha R04883
===== (8.1888) Sp1 I00295
===== (12.00) CPl,ETF R01375,R03039

00151 gccccgtctg cagcagctc ccctccctg tcccgcgcg ccgcaagccc 00200
===== (14.00) GCF R02644
===== (11.1281) GCF I00152
===== (20.00) TBP,TFIID R01764,R01764
===== (16.9098) Sp1 I00032
===== (12.00) ER-alpha R04883
===== (8.1888) Sp1 I00295
===== (12.00) CPl,ETF R01375,R03039

```

Resultados TESS (Continuación).

```

==== (10.00) T-Ag R01372
==== (8.00) GAL4 R00496
==== (11.00) SIF R02244,R02244
==== (10.6822) SIF I00214
== ==== (11.00) MTF-1 R02204
== == (10.00) Sp1 R01021
== ==== (12.00) MBF-1 R02198
== ===== (14.00) AP-2,AP-2alpha,AP-2alphaA,AP-2alphaB R05065,R05065,R05065,R05065,R05065,R05065
== == (8.00) GAL4 R00496
== ===== (12.00) Yi R03154
==== (14.00) Sp1 R02029
==== (10.00) CTCF R02137
==== (14.00) MAZ R02306
==== (10.00) NF-E R00558
==== (12.00) GR R03539
==== (16.00) E2F-1 R04353
==== (12.00) ER-alpha,Sp1 R01172,R04883
==== (12.00) CPl,ETF,Sp1 R01375,R01545,R03039
==== (14.00) Sp1 R01021
==== (8.1888) Sp1 I00295
==== (12.00) Sp1 R00017,R00447
==== (16.00) Sp1 R00150
==== (8.1888) Sp1 I00295
== ==== (12.00) ER-alpha,Sp1 R01172,R04883
==== (8.00) NF-1 R01681
==== (12.00) ER-alpha,Sp1 R01172,R04883
00201 gccagccagc gccggctcct ccgcagtgc ttcggctgcg agcctggggc 00250
..==== (12.00) ER-alpha,Sp1 R01172,R04883
==== (8.00) NF-1 R01681
==== (8.00) NF-1 R01681
== == (6.4952) T-Ag Q00168
== ==== (10.00) GCF R02159
==== (6.4952) T-Ag Q00168
==== (10.00) GAL4 R00492
== == (8.00) Dof2,Dof3,MNB1a,PBF R08440,R08441,R08442,R08443
==== (8.00) RAF R00256
== = (8.00) E2F+p107 R08845
==== (10.00) GAL4 R00495
==== (7.5231) LBP-1 I00191
==== (10.00) T-Ag R01372
==== (8.1888) Sp1 I00295
==== (12.00) Sp1 R00017,R00447
==== (12.00) CPl,ETF,Sp1 R01375,R01381,R01545,R01704,R03039
==== (6.4952) T-Ag Q00168
==== (10.00) GCF R02159
==== (18.00) WT1 -KTS,WT1 I -KTS R04866,R04866
00251 gccggcgttg accttcgggg agccccgtgg cttgggcaa 00289
..=(8.1888) Sp1 I00295
..=(12.00) Sp1 R00017,R00447
..=(12.00) CPl,ETF,Sp1 R01375,R01381,R01545,R01704,R03039
..=(6.4952) T-Ag Q00168
..==== (10.00) GCF R02159
..==== (18.00) WT1 -KTS,WT1 I -KTS R04866,R04866
==== (6.4952) T-Ag Q00168
==== (11.1281) GCF I00152
== ===== (18.00) Tll R04959
== == (8.00) AP-1 R00368
== ==== (12.00) GCN4 R00831
==== (8.00) Dof2,Dof3,MNB1a,PBF R08440,R08441,R08442,R08443
==== (8.00) RAF R00256
==== (8.00) GAL4 R00496
==== (10.00) T-Ag R01372
==== (8.00) GAL4 R00496
== = (8.00) NF-1 R01681
== ===== (10.00) AP-2,AP-2alpha,AP-2alphaA,AP-2alphaB
R02121,R02121,R02121,R02121,R02121,R02121
==== (10.00) T-Ag R01372
==== (10.00) ER-alpha,LF-A1,Sp1 R01171,R04883,R04883

```

LITERATURA CITADA

- Acosta R, Montanez C, Fuentes-Mera L, Gonzalez E, Gomez P, Quintero-Mora L, Mornet D, Alvarez-Salas LM, Cisneros B. 2004. Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res.* 296:265-275.
- Ahn AH, Kunkel LM. 1993. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet.* 3:283-291.
- Aikawa M. 2007. The balance of power: the law of Yin and Yang in smooth muscle cell fate. Is YY1 a vascular protector? *Circ Res.* 101:111-113.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J. 1994. *Currents Protocols in Molecular Biology.* Green Publishing Associates: New York.
- Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. 1990. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J.* 272:557-560.
- Barnea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D. 1990. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron.* 5:881-888.
- Bermudez de Leon M, Gomez P, Elizondo G, Zatarain-Palacios R, Garcia-Sierra F, Cisneros B. 2006. Beta-naphthoflavone represses dystrophin Dp71 expression in hepatic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1759:152-158.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 82:291-329.

- Blancas-Sánchez E, 2010. Determinación de la vida media del RNA mensajero de la distrofina Dp71 por efecto del xenobiótico beta-naftoflavona en células hepáticas. Tesis (Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. 1993. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet.* 4:77-81.
- Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolanos F, Sahel J, Reichenbach A, Rendon A. 2000. Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:294-304.
- Connors NC, Kofuji P. 2002. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci.* 22:4321-4327.
- Cox GA, Sunada Y, Campbell KP, Chamberlain JS. 1994. Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nat Genet.* 8:333-339.
- D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN. 1995. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet.* 4:837-842.
- Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J, Nudel U, Rendon A. 2003. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet.* 12:1543-1554.
- Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossee M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizberea A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I, Estournet B, Reveillere C, Penisson B, Cuisset JM, Kaplan JC, Heron D, Rivier F, Chelly J. 2009a. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 18:3779-3794.

- Daoud F, Candelario-Martinez A, Billard JM, Avital A, Khelifaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U, Chelly J, Martinez-Rojas D, Laroche S, Yaffe D, Vaillend C. 2009b. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One*. 4:e6574.
- de Leon MB, Montanez C, Gomez P, Morales-Lazaro SL, Tapia-Ramirez V, Valadez-Graham V, Recillas-Targa F, Yaffe D, Nudel U, Cisneros B. 2005. Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. *J Biol Chem*. 280:5290-5299.
- Deng Z, Cao P, Wan M, Sui G. 2010. Yin Yang 1: A multifaceted protein beyond a transcription factor. *Transcr*. 1:81-84.
- Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP, Jr. 1988. The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem*. 263:17221-17224.
- Dickson G, Pizzey JA, Elsom VE, Love D, Davies KE, Walsh FS. 1988. Distinct dystrophin mRNA species are expressed in embryonic and adult mouse skeletal muscle. *FEBS Lett*. 242:47-52.
- Enriquez-Aragon JA, Cerna-Cortes J, Bermudez de Leon M, Garcia-Sierra F, Gonzalez E, Mornet D, Cisneros B. 2005. Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion. *Neuroreport*. 16:235-238.
- Fujisawa-Sehara A, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y. 1988. A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:5859-5863.
- Galvagni F, Cartocci E, Oliviero S. 1998. The dystrophin promoter is negatively regulated by YY1 in undifferentiated muscle cells. *J Biol Chem*. 273:33708-33713.
- Gonzalez E, Montanez C, Ray PN, Howard PL, Garcia-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. 2000. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett*. 482:209-214.

- Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. 2006. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*. 25:1125-1142.
- Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. 1992. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet*. 1:505-510.
- Greenberg DS, Schatz Y, Levy Z, Pizzo P, Yaffe D, Nudel U. 1996. Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Hum Mol Genet*. 5:1299-1303.
- Guo D, Dong LY, Wu Y, Yang L, An W. 2008. Down-regulation of hepatic nuclear factor 4alpha on expression of human hepatic stimulator substance via its action on the proximal promoter in HepG2 cells. *Biochem J*. 415:111-121.
- Hehlgans T, Strominger JL. 1995. Activation of transcription by binding of NF-E1 (YY1) to a newly identified element in the first exon of the human DR alpha gene. *J Immunol*. 154:5181-5187.
- Hugnot JP, Gilgenkrantz H, Vincent N, Chafey P, Morris GE, Monaco AP, Berwald-Netter Y, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, et al. 1992. Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:7506-7510.
- Jeckel KM, Limesand SW, Anthony RV. 2009. Specificity protein-1 and -3 trans-activate the ovine placental lactogen gene promoter. *Mol Cell Endocrinol*. 307:118-124.
- Jokela TA, Makkonen KM, Oikari S, Karna R, Koli E, Hart GW, Tammi RH, Carlberg C, Tammi MI. 2011. Cellular Content of UDP-N-acetylhexosamines Controls Hyaluronan Synthase 2 Expression and Correlates with O-Linked N-Acetylglucosamine Modification of Transcription Factors YY1 and SP1. *J Biol Chem*. 286:33632-33640.
- Kawada H, Nishiyama C, Takagi A, Tokura T, Nakano N, Maeda K, Mayuzumi N, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. 2005. Transcriptional regulation of ATP2C1

gene by Sp1 and YY1 and reduced function of its promoter in Hailey-Hailey disease keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 124:1206-1214.

Kim JD, Yu S, Kim J. 2009. YY1 is autoregulated through its own DNA-binding sites. *BMC Mol Biol.* 10:85.

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.* 50:509-517.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 53:219-228.

Lambert M, Chafey P, Hugnot JP, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Billard C, Morris GE, Kahn A, Kaplan JC, Gilgenkrantz H. 1993. Expression of the transcripts initiated in the 62nd intron of the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord.* 3:519-524.

Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1992. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:5346-5350.

Lederfein D, Yaffe D, Nudel U. 1993. A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum Mol Genet.* 2:1883-1888.

Li L, He S, Sun JM, Davie JR. 2004. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol.* 82:460-471.

Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. 1995. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet.* 4:329-335.

Marquez FG, Cisneros B, Garcia F, Ceja V, Velazquez F, Depardon F, Cervantes L, Rendon A, Mornet D, Rosas-vargas H, Mustre M, Montanez C. 2003. Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience.* 118:957-966.

- Meier VS, Groner B. 1994. The nuclear factor YY1 participates in repression of the beta-casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction. *Mol Cell Biol.* 14:128-137.
- Monckton G, Hoskin V, Warren S. 1982. Prevalence and incidence of muscular dystrophy in Alberta, Canada. *Clin Genet.* 21:19-24.
- Morales-Lazaro SL, Gonzalez-Ramirez R, Gomez P, Tapia-Ramirez V, de Leon MB, Cisneros B. 2010. Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: opposite roles of Sp1 and AP2alpha in Dp71 promoter activity. *J Neurochem.* 112:474-485.
- Nudel U, Robzyk K, Yaffe D. 1988. Expression of the putative Duchenne muscular dystrophy gene in differentiated myogenic cell cultures and in the brain. *Nature.* 331:635-638.
- Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D. 1989. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature.* 337:76-78.
- Perronnet C, Vaillend C. 2010. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol.* 2010:849426.
- Philipsen S, Suske G. 1999. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 27:2991-3000.
- Rafael JA, Townsend ER, Squire SE, Potter AC, Chamberlain JS, Davies KE. 2000. Dystrophin and utrophin influence fiber type composition and post-synaptic membrane structure. *Hum Mol Genet.* 9:1357-1367.
- Rapaport D, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D. 1992. Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *J Biol Chem.* 267:21289-21292.

- Rapaport D, Greenberg DS, Tal M, Yaffe D, Nudel U. 1993. Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. *FEBS Lett.* 328:197-202.
- Romeo F, Falbo L, Di Sanzo M, Misaggi R, Faniello MC, Barni T, Cuda G, Viglietto G, Santoro C, Quaresima B, Costanzo F. 2011. Negative transcriptional regulation of the human periostin gene by YingYang-1 transcription factor. *Gene.* 487:129-134.
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1999. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet.* 8:1-10.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17:6419.
- Sunada Y, Campbell KP. 1995. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Curr Opin Neurol.* 8:379-384.
- Suzuki A, Yoshida M, Yamamoto H, Ozawa E. 1992. Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett.* 308:154-160.
- Tan NY, Khachigian LM. 2009. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol.* 29:2483-2488.
- Wu YF, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H. 2010. The Sp1 and CBF/NF-Y transcription factors cooperatively regulate the mouse pro-alpha3(V) collagen gene (Col5a3) in osteoblastic cells. *Acta Med Okayama.* 64:95-108.
- Xi H, Yu Y, Fu Y, Foley J, Halees A, Weng Z. 2007. Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome Res.* 17:798-806.
- Yant SR, Zhu W, Millinoff D, Slightom JL, Goodman M, Gumucio DL. 1995. High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT)

and distribution of potential binding sites within the human beta globin cluster. *Nucleic Acids Res.* 23:4353-4362.

Ye J, Cippitelli M, Dorman L, Ortaldo JR, Young HA. 1996. The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP1 binding and activation of a silencer element. *Mol Cell Biol.* 16:4744-4753.

Yiu EM, Kornberg AJ. 2008. Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India.* 56:236-247.

Yokoyama NN, Pate KT, Sprowl S, Waterman ML. 2010. A role for YY1 in repression of dominant negative LEF-1 expression in colon cancer. *Nucleic Acids Res.* 38:6375-6388.

Yu H, Mashtalir N, Daou S, Hammond-Martel I, Ross J, Sui G, Hart GW, Rauscher FJ, 3rd, Drobetsky E, Milot E, Shi Y, Affar el B. 2010. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol.* 30:5071-5085.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Carolina Becerril Esquivel

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Inmunobiología

Tesis: IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES ASOCIADOS AL PROMOTOR PROXIMAL DE LA DISTROFINA DP71 EN CÉLULAS HEPÁTICAS, Y SU ALTERACIÓN POR EFECTO DE β -NAFTOFLAVONA.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 20 de agosto de 1987, hija de Benito Becerril Ortega y Esther Esquivel Vázquez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Química Bacterióloga Parasitóloga en 2009.