

**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
EN PLANTAS**

**Actividad del Factor Transcripcional NC2 en
Oryza sativa L.**

**Tesis que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias presenta:**

M. C. Diana Karina Guillén Maldonado

Centro de Investigación Científica de Yucatán

Mérida, Yucatán, México

2007



POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
EN PLANTAS

Actividad del Factor Transcripcional NC2 en
Oryza sativa L.

Tesis que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias presenta:

M. C. Diana Karina Guillén Maldonado

Centro de Investigación Científica de Yucatán

Mérida, Yucatán, México

2007



CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCION	xiii
CAPÍTULO 1 Antecedentes	1
1.1 Proceso de la transcripción de la ARN Polimerasa II	1
1.2 Las regiones promotoras presentan elementos de secuencia específicos	2
1.3 Los promotores básicos reconocidos por la ARN Polimerasa II pueden tener variación en sus secuencias	3
1.3.1 Elemento TATA	3
1.3.2 Elemento Iniciador	3
1.3.3 Elemento BRE	4
1.3.4 Elemento DPE	4
1.4 Factores Transcripcionales	4
1.5 Los factores generales de la transcripción permiten el ensamblaje de la ARN Polimerasa II y el inicio de la transcripción	5
1.5.1 El factor TFIID participa en el reconocimiento de elementos núcleo del promotor	5
1.5.2 El factor TFIIB funciona como plataforma para la ARN Polimerasa II	5
1.5.3 El factor TFIIF escolta a la ARN Polimerasa II	6
1.5.4 El factor TFIIE y TFIIH presentan múltiples actividades	6
1.5.5 La ARN Polimerasa II	6
1.6 El ciclo de la Transcripción	6
1.7 El Mediador	7
1.8 Activadores y co-activadores transcripcionales	8
1.9 Represores y co-represores transcripcionales	9
1.10 Mecanismo de represión	9
1.10.1 Modificación de la subunidad más grande de la ARN Polimerasa II	10
1.10.2 Inhibición de la unión de TBP al ADN	10
1.10.3 Inhibición de las interacciones entre los factores transcripcionales	11
1.10.4 Regulación del encendido del activador o coactivador	12
1.10.5 Regulación de la localización intracelular de un activador	12
1.10.6 Inhibición de las interacciones blanco activador	12

I.10.7	Inhibición de las interacciones ADN-Activador	13
I.10.8	Represión vía reclutamiento de factores de remodelación de la cromatina	13
I.11	Elementos enhancer y silenciadores	14
I.12	Transcripción basal y activada	15
I.13	Transcripción <i>in vitro</i>	15
I.14	El cofactor negativo 2	16
I.15	NC2 es un represor general de la transcripción	17
I.16	Regulación transcripcional positiva de NC2	18
I.17	Interacción de NC2 con otras proteínas	18
I.18	NC2 de plantas	19
	Objetivos	22
I.19	Bibliografía	23
	Diseño experimental	31
CAPÍTULO II Generación de un cultivo de <i>Oryza sativa</i> L		33
II.1	Introducción	33
II.2	Materiales y Métodos	33
II.2.1	Germinación de semillas de arroz <i>ex vitro</i>	33
II.2.2	Inducción de callo <i>in vitro</i> a partir de semillas de arroz	34
II.3	Resultados	34
II.3.1	Germinación de semillas de arroz <i>ex vitro</i>	34
II.3.2	Inducción de callo embriogénico a partir de semillas de arroz	35
II.4	Discusión y Conclusión	35
II.5	Bibliografía	36
CAPÍTULO III Western blot en diferentes tejidos de <i>Oryza sativa</i> L		37
III.1	Introducción	37
III.2	Materiales y Métodos	37
III.2.1	Extracción total de proteínas	37
III.2.2	Detección de las proteínas por medio de western blot	38
III.3	Resultados	38
III.3.1	Extracción de proteínas de diferentes tejidos de arroz	38
III.3.2	Detección de NC2 por western blot en los tejidos de arroz	39
III.3.3	Detección de TFIIB por western blot en los tejidos de arroz	39
III.4	Discusión y Conclusión	40
IV.5	Bibliografía	40
CAPÍTULO IV Clonación y caracterización de los promotores TATA y TATA less		41
IV.1	Introducción	41
IV.2	Materiales y Métodos	41
IV.2.1	Extracción de ADN	41

IV.2.2	Diseño de oligonucleótidos para los promotores TATA y TATA less	42
IV.2.3	Diseño de oligonucleótidos para las variaciones del promotor TATA	42
IV.2.4	Diseño de los oligonucleótidos para la mutación del promotor TATA	43
IV.2.5	Protocolo para la amplificación de las regiones promotoras y sus variantes	45
IV.2.6	Ligación en el vector pGem-Teasy y transformación en bacterias JM109	45
IV.2.7	Obtención de ADN por lisis alcalina	45
IV.2.8	Digestión con la enzima Eco RI	45
IV.3	Resultados	46
IV.3.1	Amplificación de los promotores TATA y TATA less	46
IV.3.1.1	Obtención de ADN plasmídico de los promotores TATA y TATA less	47
IV.3.1.2	Secuencias de los promotores TATA y TATA less	47
IV.3.2	Amplificación de las variaciones del promotor TATA	48
IV.3.2.1	Obtención de ADN plasmídico de las variantes del promotor TATA	49
IV.3.2.2	Secuencias de las variaciones del promotor TATA	50
IV.3.3	Amplificación de la mutación del promotor TATA	51
IV.3.3.1	Obtención de ADN plasmídico de la mutación del promotor TATA	53
IV.3.3.2	Secuencias de la mutación del promotor TATA	53
IV.4	Discusión y Conclusión	54
IV.5	Bibliografía	55

CAPÍTULO V Direct interaction between NC2 and a subunit of the SRBs/Mediator-activator

V.1	Abstract	57
V.2	Introduction	58
V.3	Materials and Methods	59
V.4	Results	60
V.5	Discussion	62
V.6	Bibliography	66

CAPÍTULO VI A simple protocol for the expression and purification of NC2

VI.1	Abstract	71
VI.2	Introduction	72
VI.3	Materials and Methods	73
VI.4	Results	74
VI.5	Discussion	75
VI.6	Bibliography	77

CAPÍTULO VII Discusión General

Conclusión General

Perspectivas

Anexo 1 Artículo: Los factores transcripcionales y las enfermedades

Anexo 2

81

84

87

89

97

CAPÍTULO V Direct interaction between HCS and a subunit of the SRBMediator-activator

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Bibliography

CAPÍTULO VI A simple protocol for the expression and purification of HCS

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Bibliography

57

58

59

60

62

66

68

71

72

73

74

75

77

78

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, a quien agradezco su apoyo, la confianza y la oportunidad que me dio de pertenecer a su grupo.

Se agradece el apoyo económico otorgado por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número de registro 165178) para la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Carlos Rodríguez, Dr. Luis Carbonell Sáenz, Dra. Consuelo García Rodríguez, Dr. Rubén Darío, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Felipe Sánchez, por el tiempo que le dedicaron a la tesis y sus comentarios valiosos que fueron de gran ayuda.

Al Dr. Víctor Suárez, por la donación de los anticuerpos de NC2 y sus comentarios para el mejoramiento de la tesis.

Al Dr. César de los Santos, por permitirme utilizar el equipo de su laboratorio.

A la I. Q. Ángela Ku, por su apoyo técnico en la realización de esta tesis, en la etapa de germinación *ex vitro* e *in vitro* de *Oryza sativa* L.

A la M. C. Ana Ly Arroyo Herrera, por su amistad incondicional.

A la Dra. Nina Valadez, por sus útiles consejos y amistad brindada.

Al grupo del Dr. Enrique Castaño, Julia, Juan, Rocío, Mauricio, Laura.

A mi hermana Haydeé y a mi sobrina Ale por su cariño y apoyo en todo momento.

Y a todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible la elaboración de esta tesis. Muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres,

*Quienes celebran mis éxitos como los suyos propios, por habérmelo
dado todo en la vida, ilusión, amor y felicidad. Mis apellidos son el mejor
de cuantos títulos pueda obtener.*

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		pág
I.1	Sistemas de transcripción <i>in vitro</i> en planta	16
IV.1	Relación de los oligonucleótidos para los promotores TATA y TATA less	42
IV.2	Relación de los oligonucleótidos para las variaciones del promotor TATA	43
IV.3	Relación de los oligonucleótidos para la mutación del promotor TATA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	pág
I.1 Esquema de la posición de los elementos "Enhancer", CAAT, GC, TATA e Inr del promotor tipo II	3
I.2 Elementos del núcleo del promotor BRE, TATA, INR y DPE	4
I.3 Modelo de represión donde un represor modifica a la ARN Polimerasa e inhibe la unión de ésta al promotor	10
I.4 Modelo donde el represor bloquea la unión de TFIID al elemento TATA o por unión con TFIID	11
I.5 Modelo donde el represor bloquea las interacciones entre los factores	12
I.6 El represor degrada a los activadores	13
I.7 Modelo que demuestra como un represor recluta a la proteína de unión a la cromatina	14
I.8 Esquema de los pasos de un sistema de transcripción <i>in vitro</i>	16
I.9 Dominios de Dr1 en diferentes organismos	20
I.10 Dominios de Drap1 en diferentes organismos	21
II.1 Plantas de arroz en medio Hoagland's	34
II.2 Hojas, tallos y raíces después de 2 meses de crecimiento	34
II.3 Callos y células en suspensión de arroz	35
III.1 Extractos proteicos de hoja, tallo y raíz de arroz	38
III.2 Western blot de NC2 en diferentes tejidos de arroz	39
III.3 Western blot de TFIIB en diferentes tejidos de arroz	39
IV.1 Esquema de las variaciones realizadas al promotor TATA	43
IV.2 Esquema de una mutación dirigida	44
IV.3 Amplificación de las secuencias de los promotores TATA y TATA less	46
IV.4 Liberación del inserto del promotor TATA y TATA less	47
IV.5 Regiones regulatorias de los promotores TATA y TATA less	48
IV.6 Amplificación de las variantes del promotor TATA	49
IV.7 Liberación del inserto de las variantes del promotor TATA	50
IV.8 Regiones regulatorias de las variantes del promotor TATA	51
IV.9 Amplificación de la mutación del promotor TATA	52
IV.10 Liberación del inserto de la mutación del promotor TATA	53
V.1 Immunoblot analysis of HeLa NE, NC2 depleted HeLa NE and the eluate from NC2 Immunocolumn	63
V.2 NC2 depletions decrease activated transcription <i>in vitro</i>	64
V.3 Farwestern blot analysis	65
V.4 Direct interaction between hSRB7 and NC2	66
VI.1 12 % Polyacrilamide gel, induction of NC2 α with 1 mM of IPTG at 1, 2 and 4 hours.	76

VI.2 Map of final plasmid construction containing two sequences de both proteins 6His-NC2 β and Flag-NC2 α

76

10	1 mM IPTG at 1, 2 and 4 hours	VI.1
11	Direct interaction between HSRB7 and NC2	VI.4
12	Western blot analysis	VI.3
13	NC2 activation decreases activated transcription in vivo	VI.2
14	NC and the eluate from NC2 immunocolumn	VI.1
15	Inmunoblot analysis of HSRB7, NC2 depleted HSRB7	VI.10
16	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
17	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
18	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
19	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
20	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
21	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
22	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
23	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
24	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
25	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
26	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
27	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
28	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
29	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
30	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
31	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
32	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
33	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
34	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
35	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
36	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
37	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
38	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
39	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
40	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
41	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
42	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
43	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
44	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
45	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
46	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
47	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
48	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
49	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
50	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
51	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
52	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
53	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
54	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
55	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
56	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
57	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
58	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
59	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
60	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
61	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
62	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
63	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
64	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
65	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
66	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
67	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
68	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
69	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
70	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
71	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
72	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
73	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
74	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
75	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
76	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
77	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
78	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
79	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
80	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
81	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
82	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
83	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
84	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
85	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
86	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
87	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
88	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
89	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
90	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.5
91	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.4
92	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.3
93	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.2
94	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.1
95	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.10
96	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.9
97	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.8
98	Régions régulatrices de la mutation du promoteur ATAT	VI.7
99	Libération de l'insert de la mutation du promoteur ATAT	VI.6
100	Amplification de la mutation du promoteur ATAT	VI.5

RESUMEN

El principal punto de regulación para la mayoría de los genes se da al inicio de la transcripción. Para realizar este proceso se requiere que las proteínas reguladoras se unan al ADN tanto en el promotor como cercano a él, lo cual ocasiona un aumento o disminución de la afinidad de la ARN polimerasa al ADN para comenzar la transcripción. Estas proteínas incluyen represores, activadores, y factores generales de transcripción.

Un regulador que modula la iniciación de la transcripción por interacción directa con componentes de la maquinaria general de transcripción es NC2 (cofactor negativo 2). NC2 es un represor de la transcripción de clase II enlazándose a TBP (proteína de unión a TATA) e inhibiendo la asociación de los factores transcripcionales generales TFIIB y TFIIF con el complejo promotor-TBP (complejo de pre-iniciación), consiste de dos subunidades llamadas NC2 α /DRAP1 (22 kDa) y NC2 β (20 kDa) este último identificado como Dr1, ambas conservadas entre eucariotes y esenciales para *Saccharomyces cerevisiae*.

Hasta el momento se ha estudiado el comportamiento de NC2 en levadura, humano y *Drosophila* y se ha observado que existen diferencias en su función represora dependiendo del organismo y del promotor del gen a regular. Por lo cual este trabajo sienta las bases para estudiar la función reguladora de NC2 en plantas (*Oryza sativa*), tanto en promotores denominados TATA como TATA-less.

En este trabajo se identificó la presencia de NC2 en diferentes tejidos (hoja y tallo) de *Oryza sativa*, siendo de un tamaño aproximado de 19 kDa. Se expresó y purificó de forma combinada las subunidades NC2 alfa y NC2 beta, implementando un sistema de doble expresión y purificación simultánea de NC2 como heterodímero, permitiendo obtener un complejo activo. Además se determinó que NC2 tuvo una interacción directa con un Mediador (Med21) que forma parte del complejo SRB/Mediador, lo que permitió observar que NC2 se une a otro tipo de proteínas y no solo a los factores transcripcionales generales. Se ligaron las secuencias de los promotores TATA y TATA-less de *Oryza sativa* en vectores de clonación para su posterior estudio. Perteneciendo la secuencia del promotor TATA a un gen (lip 19) relacionado con el estrés a baja temperatura y el promotor TATA less siendo de un gen respectivo a la fosfolipasa D, implicado en casos de regulación celular, metabolismo de lípidos entre otros.

ABSTRACT

The main process for the regulation of most genes is at the level of transcription. This process requires regulatory proteins to bind the DNA to the promoter, causing an increase or decrease in the affinity of the RNA polymerase to the DNA to begin transcription. These proteins include repressors, activators, and general transcription factors.

A regulator that modulates the transcription initiation with direct interaction with the general transcription machinery is NC2 (cofactor negative 2). NC2 is a repressor of transcription Class II that interacts with TBP (TATA binding protein) and prevents the association of the general transcription factors TFIIB and TIIFA to the promoter (complex pre-initiation), NC2 consists of two subunits, NC2 α / DRAP1 (22 kDa) and NC2 β (20 kDa) latter identified as Dr1, both are conserved between eucariotes and are essential for *Saccharomyces cerevisiae*.

So far NC2 has been studied in yeast, *Drosophila* and human and it has been observed that there are differences in their role depending on the promoter of the gene that is regulated. Therefore this work lays the foundation to study the regulatory role of NC2 plant (*Oryza sativa*) from both types of promoters TATA as TATA-less.

In this study we identified the presence of NC2 in different tissues (leaves and stems) from *Oryza sativa*, with a size of approximately 19 kDa. We express and purified a combination of subunits NC2 alpha and NC2 beta, implementing a system of double expression and purification of NC2 as heterodimer, this system prevents degradation of the NC2alpha that has previously difficult to obtain. In addition, it was determined that NC2 had direct interaction with a Mediator (Med21), which is part of the complex SRB / Mediator, which showed that NC2 binds to other proteins and not just general transcription factors. TATA and TATA-less promotes from *Oryza sativa* were cloned for further study. This promoters belong to (lip 19) a stress at low temperature inducible promoter and TATA promoter for the phospholipasa D which is implicated in cellular lipid metabolism and signaling.

INTRODUCCIÓN

Los organismos eucariotes requieren regular de manera coordinada la información genética durante los procesos de desarrollo, ciclo celular, diferenciación y respuestas al medio. La regulación de la expresión de la mayoría de los genes se lleva a cabo a nivel transcripcional, la transcripción es un proceso por el cual la información codificada en el ADN es copiada a ARN, que posteriormente se traducirá la secuencia de bases nucleotídicas a una secuencia de aminoácidos para generar una proteína proceso conocido como traducción (Recillas y Escamilla, 2004).

El principal punto de regulación para la mayoría de los genes se encuentra al inicio de la transcripción, para esto se requiere que proteínas reguladoras (represores, activadores, corepresores y coactivadores) y factores generales de la transcripción se unan al ADN, tanto al promotor como en regiones cercanas a él. Ocasionando un aumento o reducción de la afinidad de la ARN polimerasa hacia el ADN, regulando así positiva o negativamente la expresión del gen (Näär *et al.*, 2001).

El promotor es una secuencia de ADN que contiene el sitio exacto de inicio de la transcripción, así como también las secuencias regulatorias para un gen determinado. Entre los elementos importantes de un promotor se encuentra la caja TATA, reportándose que del 30 al 50 % de todos los promotores conocidos de un organismo contienen una caja TATA (TATA-box) y los promotores carentes de esta secuencia son referidos como TATA less (Kadonaga, 2002).

Un represor que modula el inicio de la transcripción por interacción directa con componentes de la maquinaria general de transcripción es el cofactor negativo 2 (NC2). NC2 es un represor de la transcripción que interactúa con la proteína de unión a TATA (TBP) y parte esencial del factor TFIID e inhibe la asociación de los factores transcripcionales TFIIB y TIIFA bloqueando el complejo de pre-iniciación de la transcripción. NC2 consiste de dos subunidades denominadas NC2 α (DRAP1) (22 kDa) y NC2 β (Dr1) (20 kDa), ambas subunidades son conservadas entre eucariotes (Kim *et al.*, 1997; Meisterernst y Roeder, 1991). Un complejo multiproteico denominado SRB/Mediator se ha identificado en levadura, basado en su habilidad para aumentar la transcripción basal y facilitar la transcripción activada. Se ha observado que la actividad de los Mediadore auxilian a los activadores en su función (Kim *et al.*, 1994; Myers y Kornberg 2000; Malik y Roedor, 2000) y sirven de puente entre los factores reguladores y los factores generales de la transcripción para facilitar la formación del complejo de preiniciación (Malik y Roedor, 2005).

Hasta el momento la mayoría de los estudios de NC2 se han llevado a cabo en levadura, ratón, células de humanos y *Drosophila*. Los experimentos de transcripción *in vitro* han determinado que existe una actividad funcional diferente de

NC2 cuando se utiliza extractos de células de mamíferos comparadas con las de *Drosophila*. Asentando que NC2 de las células de mamíferos tiene una actividad represora en promotores TATA y TATA less. Mientras que en *Drosophila* dicha proteína es esencial para activar los genes con promotores TATA less y reprime a los genes con promotores TATA. Por lo que deja abierto el mecanismo *in vivo* por el cual reprime o activa dichos genes (Willy *et al.*, 2000; Goppelt y Roeder, 1996).

En la actualidad se conoce muy poco sobre el comportamiento de esta proteína represora en la regulación de los genes en plantas, por lo que este trabajo tiene por objetivo avanzar en el conocimiento de la actividad de NC2 en células de *Oryza sativa* en promotores TATA y TATA less.

Referencias

Goppelt, A. y Meisterernst, M. 1996. Characterization of the basal inhibitor of class II transcription NC2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 24(22):4450-4455.

Kadonaga, J. 2002. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Experimental and molecular medicine*. 34 (4):259-264.

Kim, S., Na, J.G., Hampsey, M. y Reinberg, D. 1997. The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:820-825.

Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayer, M. H. y Kornberg, R. D. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*. 77:599-608.

Malik, S., Gu, Wu., Quin, J. y Roeder, R. G. 2000. The USA- derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol. Cell*. 5:753-760.

Malik, S., y Roeder, R. G. 2005. Structural and functional characterization of PC2 and RNA polymerase II-associated subpopulations of metazoan Mediator. *Trends Biochem. Sci.* 30:256-263.

Meisterernst, M. y Roeder, R. 1991. Family of Proteins That Interact with TFIID and Regulate Promotor Activity. *Cell* 67:557-567.

Myers, L. C. y Kornberg, R. D. 2000. Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69:729-749.

Näär, A., Lemon, B. y Tjian, R. 2001. Transcriptional Coactivator Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70:475-501.

Recillas, T. F. y Escamilla, D. M. 2004. Participación de la Estructura de la Cromatina en la Regulación de la Expresión Génica. Mensaje Bioquímico 28:173-201.

Willy, P. J., Kobayashi, R. y Kadonaga, J. T. 2000. A basal transcription factor that activates or represses transcription. Science. 290: 982-5.

CAPÍTULO I

Antecedentes

Los organismos multicelulares, como es el caso de las plantas, han adquirido evolutivamente la capacidad de modificar eventos específicos como desarrollo, crecimiento y sobrevivencia. Esto lo realizan como respuesta a los cambios por condiciones ambientales, nutricionales, de estrés, etc. Esta plasticidad representa una ventaja significativa ya que el programa de expresión de genes que gobierna el desarrollo puede ser variado de acuerdo a las condiciones que enfrenta la planta (Singh, 1998).

Las plantas perciben las señales físicas y químicas del medio externo, éstos se transmiten a través de moléculas de señalización hasta llegar a la maquinaria transcripcional. La respuesta consiste en cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas de la planta, generando proteínas útiles para las nuevas condiciones. Esto implica la activación o inactivación de los genes a partir de los cuales estas proteínas son sintetizadas, procesos que suelen estar gobernados, por factores de transcripción y por la presencia de elementos reguladores en las regiones promotoras de los genes regulados (Buratowski, 1994; Lemon y Tjian, 2000).

Además de la regulación transcripcional, existen otros puntos de regulación que incluyen las vías de procesamiento de los ARN mensajeros, el transporte de los mismos una vez maduros, su traducibilidad a secuencias de aminoácidos (proteínas) y por último el transporte y procesamiento de las proteínas codificadas (Nogales, 2000).

I.1 Proceso de Transcripción de la ARN Polimerasa II

En los genes su nivel de expresión esta regulado por factores transcripcionales que se unen directamente a secuencias regulatorias del ADN. La interacción de activadores de transcripción con diferentes clases de proteínas co-activadoras promueve la descompactación de la cromatina y el acceso al ADN. Lo cual facilita el reclutamiento de los factores generales de la transcripción (GTFs) al sitio de inicio de la transcripción para empezar el proceso de transcripción (Smale, 2001).

La etapa de inicio de la transcripción se caracteriza por la formación del complejo de preiniciación (PIC), esta formado por la ARN Polimerasa II (RNAPII) y los GTFs unidos al sitio del promotor. La forma mediante la cual se forma el PIC en el sitio del promotor se puede explicar mediante dos modelos: el modelo secuencial y el modelo de la "RNAPII holoenzima". El modelo secuencial describe la unión paso a paso de los diversos GTFs y de la RNAPII de forma cooperativa, es decir, la unión de un factor de transcripción favorece la asociación del siguiente. Por otra parte, el segundo modelo describe que la RNAPII está asociada previamente con distintos GTFs y es capaz de unirse al promotor en un solo paso. Una vez que la Polimerasa

II se fija al promotor se produce un cambio conformacional del ADN que da lugar al denominado complejo abierto. Ocurrido esto se separan las dos cadenas del ADN, lo que da lugar a una burbuja de transcripción. La burbuja se desplaza y se sintetizan unos 25 nucleótidos antes de estabilizar la conformación de la ARN polimerasa II para continuar con el proceso de transcripción. Tan pronto como el ARN es transcrito, el extremo 5' es modificado por la adición de un "cap" que es un nucleótido modificado de guanina, la 7-metilguanosina. Al alcanzar el final del gen, la Pol II detiene el proceso de transcripción (terminación), el ARN sintetizado es separado y una cadena de poliadenosinas son adicionados al extremo 3' del transcrito. El ARNm sintetizado es transportado del núcleo al citoplasma, donde la información es traducida a partir de un ARNm hasta proteína. Para esto se requiere de la exportación de la proteína unida al ARNm la cual es mediada por estructuras o poros asociados a la envoltura nuclear. Una vez en el citoplasma, la traducción del ARNm se lleva a cabo en un largo complejo de ribonucleoproteínas. (Barberis y Petrascheck, 2003; Pedersen, *et al.*, 1999).

1.2 Las regiones promotoras presentan elementos de secuencia específicos

Los promotores se definen de manera general como secuencias en el ADN indispensables para que se lleve a cabo la transcripción en un sistema de prueba *in vivo* o *in vitro* (Acosta, 1996).

La organización de los promotores reconocidos por la ARN polimerasa II consisten de un núcleo del promotor, definido como la secuencia mínima para que la ARN polimerasa II pueda iniciar la transcripción. Antes del núcleo del promotor, a pocas decenas de bases, se encuentran secuencias que varían de acuerdo al promotor, a las cuales se unen proteínas activadoras para aumentar la eficiencia de transcripción. Entre estas secuencias se encuentran las cajas CAAT, GC y TATA. De esta manera, el núcleo del promotor con las secuencias cercanas que unen proteínas activadoras, conforman un promotor más eficiente. (Bucher y Trifonov, 1986). Es necesario hacer una distinción entre las secuencias cercanas que forman parte del promotor y las secuencias más alejadas, a cientos o miles de bases respecto al sitio de inicio de transcripción, que permiten incrementar o potenciar la transcripción. Éste último tipo de secuencias son conocidas como "enhancers" o potenciadores y contienen los mismos elementos de secuencia que son encontrados en los promotores, pero tienen como característica que pueden funcionar de manera bidireccional (figura 1.1).

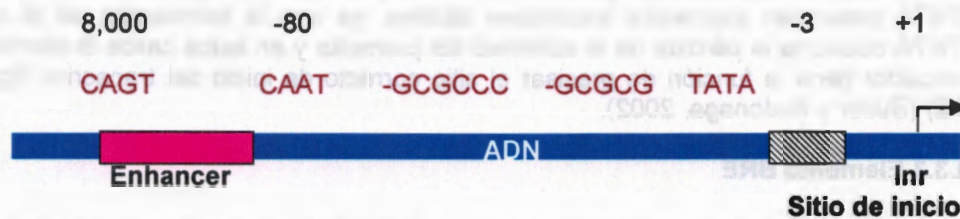


Figura I.1. Esquema de la posición de los elementos: “Enhancer”, CAAT, GC, TATA y Inr del promotor tipo II.

I.3 Los promotores basales reconocidos por la ARN polimerasa II pueden tener variación en sus secuencias

El núcleo del promotor de la clase II, está definido como la secuencia mínima requerida para la correcta posición y ensamble del complejo de pre-iniciación (PIC), el cual está compuesto por la ARN Pol II y los factores generales de la transcripción (GTFs). Los elementos característicos del núcleo del promotor son la caja TATA, el iniciador (Inr), el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), localizado antes de la caja TATA y el elemento del promotor “downstream” (DPE) la cual se encuentra en genes de *Drosophila*. Los elementos del promotor son sitios de unión para subunidades del PIC (Complejo de Pre-iniciación) y sirven para orientar la maquinaria de transcripción de manera unidireccional (figura I.2) (Levine y Tjian, 2003).

I.3.1 Elemento TATA

El elemento o caja TATA, está localizado entre 25 y 30 bases antes del sitio de inicio de la transcripción, con una secuencia consenso TATAa/tA/a/t. La secuencia TATA es el sitio de unión para la proteína TBP, los promotores que carecen del elemento TATA son denominados TATA less, son dependientes de TBP (proteína de unión al elemento TATA) y probablemente, de otros componentes de la maquinaria de transcripción que reconocen la estructura del promotor para ensamblar el PIC, conocidos como elemento Inr o DPE (elemento localizado después del núcleo del promotor) (figura I.2) (Corona *et al.*, 2002).

I.3.2 Elemento iniciador

El elemento iniciador (Inr) es una secuencia de ADN que constituye el sitio de inicio de la transcripción. La posición del Inr no está definida por su distancia con respecto a la caja TATA, ya que la distancia no es constante en todos los organismos. Este sitio es rico en pirimidinas, aunque su secuencia es variable. En la mayoría de los promotores que contienen la caja TATA, ésta puede combinarse con el elemento

iniciador para direccionar la transcripción. En promotores en donde no hay caja TATA el elemento iniciador generalmente esta presente. Los promotores con caja TATA presentan elementos iniciadores débiles, ya que la eliminación de la caja TATA ocasiona la pérdida de la actividad del promotor y en estos casos el elemento iniciador tiene la función de precisar el sitio correcto de inicio del transcrito (figura 1.2) (Butler y Kadonaga, 2002).

1.3.3 Elemento BRE

Se ha descrito como un elemento presente en la región del promotor que es reconocido por TFIIB (BRE), con la secuencia consenso G/C-G/C-G/A-CGCC, el cual probablemente juegue un papel en determinar la fuerza del promotor (figura 1.2) (Butler y Kadonaga, 2002).

1.3.4 Elemento DPE

Otro elemento presente en el núcleo del promotor es el DPE o elemento que se encuentra después del núcleo del promotor y que se ha reportado en algunos promotores de *Drosophila* y humanos, con una secuencia consenso a/gGa/tCGTG ubicada 30 nucleótidos después del sitio de inicio de la transcripción. Este elemento se ha visto que actúa en conjunción con el elemento Inr, como un sitio de unión para TFIID por las TAF6 y TAF9 en promotores TATA less (Kadonaga, 2002) (figura 1.2).

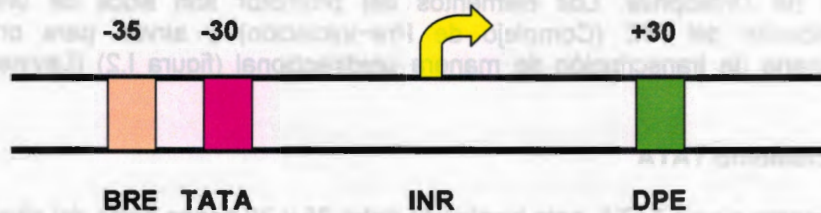


Figura 1.2. Elementos del núcleo del promotor BRE, TATA, INR y DPE.

1.4 Factores transcripcionales

Los factores transcripcionales son proteínas que se unen a secuencias en *cis* localizadas en los promotores de los genes y que modifican la transcripción de los mismos. Existen tres tipos fundamentales de factores transcripcionales: 1) Los generales, forman parte de la maquinaria transcripcional básica (GTFs), 2) Los específicos, éstos actúan sobre determinados genes y en determinadas situaciones, aumentando o disminuyendo los niveles transcripcionales basales generados por los anteriores y 3) Los co-factores, modifican a los factores generales o específicos (Brivanlou y Darnell., 2002).

1.5 Los factores generales de la transcripción permiten el ensamblaje de la ARN polimerasa II y el inicio de la transcripción

No es posible iniciar la transcripción de un gen *in vitro* cuando se utiliza sólo la ARN polimerasa II purificada; en cuyo caso es necesario adicionar componentes proteicos aislados de extractos celulares crudos. Este hecho demuestra que se requieren factores de transcripción, los cuales son definidos como cualquier proteína que es necesaria para la iniciación de la transcripción, pero que no es parte propiamente de la ARN polimerasa II (Martínez *et al.*, 2004).

El estudio de la transcripción *in vitro* ha permitido encontrar los componentes mínimos necesarios para este proceso, que corresponde a la transcripción basal. Los factores necesarios adicionales a la ARN polimerasa se han definido como factores generales de transcripción y se han nombrado de acuerdo al orden en que fueron aislados: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. Los factores y el proceso de iniciación de la transcripción se forma de la siguiente manera (Sims *et al.*, 2004): 1) Reconocimiento de los elementos del núcleo del promotor por el factor TBP (TFIID), 2) Reconocimiento del complejo TFIID-promotor por TFIIB, 3) Reclutamiento de la ARN Polimerasa y el factor TFIIF, 4) Unión de TFIIE y TFIIH para completar el complejo de preiniciación, 5) Formación de un complejo de iniciación abierto, por la separación de cadenas del ADN, 6) Síntesis del primer enlace fosfodiéster en el transcrito nascente de ARNm, 7) Liberación de los contactos de la ARN polimerasa II y aclaramiento del promotor, 8) Alargamiento del transcrito de ARN. TFIIA puede unirse al complejo en cualquier etapa después de la unión de TFIID, estabilizando el complejo de iniciación.

1.5.1 El factor TFIID participa en el reconocimiento de elementos núcleo del promotor

En el inicio de la transcripción el factor transcriptional TFIID que es una proteína de 250 kDa tiene un papel importante en reconocer y unirse al núcleo del promotor, junto con un complejo de proteínas formado por TBP (8 a 12 factores asociados a TBP), conocidos como TAF_{II}S (factores que se asocian a TBP), que han sido estudiados en levadura, *Drosophila* y humanos. El reconocimiento del elemento TATA es a través de la proteína TBP en el surco menor del ADN, lo que ocasiona una distorsión del mismo y al doblarse forma una curvatura a manera de un sable que permite un mejor reclutamiento para otros factores.

Estudios de interacción *in vitro* entre dominios de activación y TAF_{II}S aislados, así como estudios de reconstitución de TFIID, donde se muestran que los TAF_{II}S son los blancos obligatorios de los activadores (Ainbinder *et al.*, 2003).

1.5.2 El factor TFIIB funciona como una plataforma para la ARN Polimerasa II

Este factor es un polipéptido de 35 kDa, el cual presenta sitios de interacción para el complejo TFIID-promotor, TFIIF y para la ARN polimerasa II, proporcionando una

plataforma para el reclutamiento de la polimerasa y el factor TFIIF. Estudios *in vitro* en los que se hicieron intercambios de TFIIF de levadura y mamíferos demostraron que este factor es, junto con la Polimerasa, el único responsable en la determinación del sitio de iniciación de la transcripción (Keaveney *et al.*, 1998).

1.5.3 El factor TFIIF escolta a la ARN Polimerasa II

Este factor está formado por los polipéptidos RAP30 y RAP74, de 30 y 74 kDa respectivamente, se encuentra fuertemente asociado a la Polimerasa II incluso en ausencia de ADN y suprime interacciones inapropiadas entre la Polimerasa II y sitios que no son promotores. Estabiliza el complejo ARN Pol II-TBP y permite el reclutamiento de los factores transcripcionales como TFIIE y TFIIH (Kokubo *et al.*, 1998).

1.5.4 El factor TFIIE y TFIIH presentan múltiples actividades

El tetrámero está compuesto de dos subunidades de 56 kDa y 34 kDa y entra al complejo de iniciación después de la Polimerasa II y TFIIF, aunque es posible que entre simultáneamente. Una vez que TFIIE es incorporado establemente, recluta a TFIIH al promotor complementando el proceso de ensamblaje y haciendo competente a la Polimerasa para iniciar la transcripción. TFIIH es un factor complejo de 9 subunidades y múltiples actividades enzimáticas: 1) Dos subunidades son helicasas dependientes de ATP, que pueden desenrollar el ADN dúplex, una en cada dirección, 2) La ciclina H y la cinasa dependiente de ciclina (cdk7) son otras subunidades, las cuales junto con un polipéptido regulador forman una actividad de cinasa activadora de cdk (CAK) y 3) Cinco subunidades tienen un papel en la reparación de ADN, lo que permite acoplar la transcripción a la reparación (Maldonado y Reinberg, 1995).

1.5.5 La ARN Polimerasa II

La ARN Polimerasa II (Pol II) es un complejo multiproteico compuesto de 12 subunidades con un tamaño total de 500 kDa. Las subunidades de la ARN Pol II, en particular las dos más grandes, Rpb1 y Rpb2, son altamente conservadas entre eucariotes, estas subunidades pueden ser clasificadas en tres categorías: i) subunidades que tienen un dominio central, teniendo homólogos con la ARN Pol I y III (Rpb1, 2, 3, 11), ii) subunidades que comparten las tres polimerasas (Rpb5, 6, 8, 10 y 12) y iii) subunidades específicas de la Pol II, pero no son esenciales para la elongación de la transcripción (Rpb4, 7 y 9) (Meka *et al.*, 2005).

1.6 El ciclo de la transcripción

El complejo de pre-iniciación que está integrado por la Pol II y los factores generales de la transcripción están unidos al promotor, pero no están en una conformación activa para llevar a cabo la transcripción, para esto se requiere que ocurra un

cambio conformacional, entre los 11 a 15 pares de bases de ADN que se encuentran localizados alrededor del sitio de inicio, estas son separadas para formar un complejo abierto. La Pol II es única entre las Pols celulares en requerir la acción de una helicasa de ADN dependiente de ATP para la formación del complejo abierto. En muchos sistemas existen múltiples ARNs cortos (de 3 a 10 bases) que son sintetizados antes de que la Pol II inicie la síntesis productiva de los ARNs de longitud completa. Después de la síntesis de casi 30 bases de ARNs, la Pol II se libera del núcleo del promotor y el resto de la maquinaria de transcripción y finalmente entra al estado de elongación. La transición de la iniciación a la elongación esta acompañada por la fosforilación del CTD de la Pol II, llevada a cabo por cinasas que están involucradas en la fosforilación del CTD. La flexibilidad del tallo del CTD combinado con múltiples modificaciones por fosforilación, hace a la Pol II un jugador central en la regulación, coordinando el inicio de la transcripción y la transcripción en eventos de procesamiento del ARNm (Holland y Yankulov, 2003).

Después del inicio de la transcripción, la Pol II y los factores generales de la transcripción TFIIB y TFIIF, se disocian del promotor, dejando a los restantes factores transcripcionales en el promotor. Este complejo presumiblemente marca genes que se han transcrito, un paso típicamente lento de reclutamiento que servirá para subsecuentes rondas de transcripción. Con el fin de reincorporarlos en un nuevo proceso de transcripción, la fosfatasa Fcp1 recicla la Pol II a su forma no fosforilada, permitiendo a los factores generales de la transcripción y a la Pol II iniciar otra ronda de transcripción (Stargell y Struhl, 1996).

1.7 El Mediador

Un complejo multiproteico denominado SRB/Mediator se ha identificado en levadura, basado en su habilidad para aumentar la transcripción basal y facilitar la transcripción activada. Se ha observado que la actividad de los Mediadores auxilian a los activadores en su función (Kim et al., 1994; Myers y Kornberg 2000; Malik y Roedor, 2000), y sirven de puente entre los factores reguladores y los factores generales de la transcripción para facilitar la formación del complejo de preiniciación (Malik y Roedor, 2005). También se observó que las mutaciones de las subunidades del Mediador redujeron o eliminaron la transcripción basal en extractos crudos nucleares.

La existencia del Mediador se reveló por primera vez al realizar estudios de transcripción in vitro con la ARN polimerasa II de levadura, (Kelleher et al., 1990; Flanagan et al., 1991) esta evidencia fue indirecta, y se baso en la capacidad de un activador para interferir con otro en células in vivo de levadura y humano, (Triezenberg et al., 1988; Gill y Ptashne, 1988) tal interferencia se atribuyó a la retención de un factor presente y que era requerido para la activación de la transcripción. Tal atención se enfoco inicialmente en los factores generales de la transcripción y a la ARN polimerasa II, como blancos directos de activadores, como es el caso de TBP, TFIIB y la ARN polimerasa II donde se ha demostrado que se

unen a proteínas activadoras. Cuando se repitió la interferencia en un sistema reproducido en extractos nucleares de levadura, en el cual los factores transcripcionales y la ARN pol II se habían adicionado de manera individual a la reacción, se demostró que ninguno de estos componentes representaban la limitante del activador. Así que se probaron diferentes extractos nucleares, donde en uno se observó que al adicionarse a la reacción se daba la interferencia al activador, denominándose de esta manera Mediador, pensándose que sirve como un adaptador entre proteínas activadoras y la maquinaria de transcripción basal. Esta inferencia se debió a la fracción proteica previamente identificada fue requerida para la activación transcripcional en un sistema reconstituido de proteínas de la transcripción (Flaherty *et al.*, 1991).

El Mediador se purificó y se observó que consta de 20 subunidades y esta involucrado en la iniciación de la transcripción de casi la mayoría de los promotores eucarióticos. Esto es importante para el control transcripcional, modulando la frecuencia de iniciación en respuesta a factores regulatorios positivos o negativos (Asturias *et al.*, 1999).

1.8 Activadores y coactivadores transcripcionales

Los activadores desde el punto de vista funcional, parecen ser proteínas que interaccionan con el ADN por sus dominios ácidos (ejemplificados por residuos ricos en glutamina o prolina). La complejidad de la regulación genética esta reflejada por el alto número de genes que codifican para factores transcripcionales. Los factores transcripcionales, se unen a regiones (enhancers) que pueden estimular o reprimir la transcripción génica. Usualmente, consisten de dos dominios: (i) uno de unión a ADN (ii) otro de activación (o represión). Típicamente los dominios de unión a ADN en eucariotes son los hélice-vuelta-hélice, cierre de leucina, dedos de zinc, y homeodominio. Presentes en al menos una copia, interactúan con el surco mayor del ADN. La mayoría de los genes están bajo control de múltiples factores de transcripción que se unen a la misma región del sitio del control transcripcional (Barberis y Petrascheck, 2003).

Sin embargo, el efecto real de un factor transcripcional depende de los cofactores que se enlazan a él, la mayoría de los cofactores no se une directamente al ADN pero ayudan al activador para realizar su función. Un grupo de coactivadores son las proteínas TAFs presentes en TFIID (Hampsey, 1998).

Los coactivadores interactúan también con componentes de la maquinaria transcripcional (TFIIA, TAFs, SRB/Mediador), o con nucleosomas, promocionando la modificación de la cromatina (HATs), o remodelación de la cromatina (SW1/SNF) (Lewis y Reinberg, 2003, Näär *et al.*, 2001). Los activadores de la transcripción son definidos como proteínas de unión al ADN con secuencias específicas que estimulan el inicio o elongación de la transcripción.

La mayoría de los activadores y coactivadores actúan estimulando la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción, promoviendo la alteración de la

estructura de la cromatina en la cercanía del promotor. Tres clases de proteínas asociadas con la ARN polimerasa II están involucradas en el remodelamiento de la cromatina: (i) enzimas modificadoras de las histonas, (ii) proteínas de unión a la cromatina, (iii) proteínas de remodelamiento del nucleosoma dependiente de ATP. Activadores y coactivadores pueden reclutar una o más de estas proteínas al promotor y el resultado del remodelamiento de la cromatina puede alterar la interacción ADN-histona, interacción nucleosoma-nucleosoma y reposición del nucleosoma relacionado a los sitios de unión de los factores de la transcripción. Estos cambios en la cromatina regulan la transcripción alterando la accesibilidad del ADN a los factores de la transcripción, ARN polimerasa II y otros componentes del PIC (Recillas y Escamilla, 2004).

1.9 Represores y corepresores transcripcionales

La represión transcripcional es un componente importante de la regulación genética en eucariotes y puede ser llevada a cabo a través de la estructura de la cromatina o por medio de la acción de represores transcripcionales específicos. Existe un grupo de proteínas que actúan junto a TBP y se denomina TAF. Se postula que los activadores se unen secuencialmente en el tiempo para activar la transcripción vía la interacción con el TBP y los factores asociados a TBPs o TAFs (Cowell y Hurst, 1996).

Se pueden dividir los mecanismos de represión en dos categorías: (i) represión general, (ii) represión específica de gen. La represión general ocurre cuando una proteína o complejo represor modifica un componente central del PIC (Complejo de Pre-Iniciación) o un componente de la ARN polimerasa II. La represión general abatirá la expresión de todos los genes transcritos por esta polimerasa. La represión específica de gen ocurre cuando la expresión de un gen particular o un grupo de genes esta controlado por la actividad de un represor o corepresor específico de un gen. Frecuentemente se unen directa o indirectamente al ADN y ellos pueden regular la transcripción de unión de sitios proximales o a distancia del promotor. Estos dos tipos de represión no son mutuamente exclusivos y un represor tiene un importante papel en la regulación de la cromatina y el control de la expresión génica (Smale, 2001).

1.10 Mecanismos de represión

Existen tres rutas a través de las cuales las proteínas represoras pueden regular los genes específicos: inhibición de la maquinaria de transcripción basal, ablación de la función del activador y remodelación o compactación de la cromatina (Gaston y Jayaraman, 2002; Maldonado *et al.*, 1999).

1.10.1 Modificación de la subunidad más grande de la ARN Polimerasa II

La subunidad mas grande de la ARN polimerasa tiene el CTD siendo un blanco para direccionar la represión. El CTD de la ARN polimerasa esta glicosilada y desfosforilada durante la iniciación transcripcional y es desglicosilada y fosforilada durante la elongación. A su vez modificaciones del CTD conducirían a la represión transcripcional, como la hiperglicosilación del CTD que llevaría a la inhibición de la elongación (Kelly *et al.*, 1993) (figura I.3).

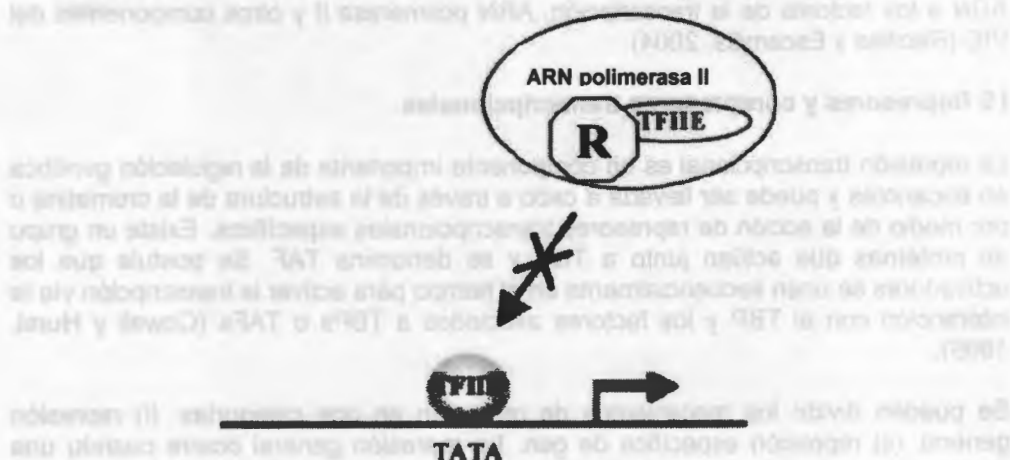


Figura I.3. Modelo de represión donde un represor (R) modifica a la ARN Polimerasa e inhibe la unión de ésta al promotor.

1.10.2 Inhibición de la unión de TBP al ADN

Un mecanismo importante de represión es la interferencia de la unión de TBP (TFIID) a la caja TATA. Mot 1 es un represor que disocia el complejo TBP-ADN de una manera dependiente de ATP, Mot 1 es un miembro de la familia de SW1/SNF proteínas de remodelamiento del nucleosoma dependientes de ATP. Mot 1 compete con TFIID para unirse a TATA (Wieczorek *et al.*, 1998) (figura I.4).

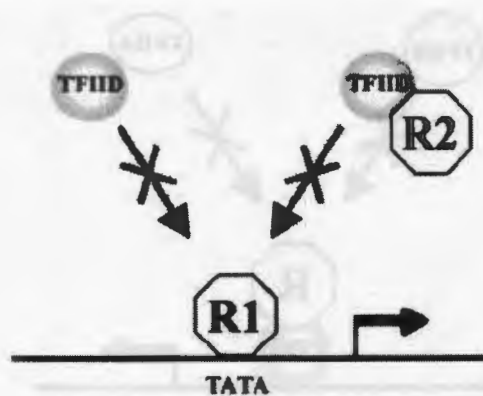


Figura I.4 Modelo donde el represor bloquea la unión de TFIID al elemento TATA (R1) o por unión con TFIID (R2).

I.10.3 Inhibición de las interacciones entre los factores transcripcionales

Numerosos represores inhiben las interacciones entre los factores transcripcionales y reprimen la transcripción basal. Por ejemplo NC2 se une a TBP *in vitro* y bloquea la interacción entre TBP y TFIIB-TFIIA. Muchas proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina también reprimen la transcripción vía contacto directo con GTFs (Maldonado *et al.*, 1999)

El proteína represora RBP/CBF1 es capaz de romper las interacciones de los factores transcripcionales como Sp1 (activador) que interactúa con TAF110 en *Drosophila*, Sp1 se asocia con TFIIA resultando en una transcripción activada. RBP se une a TFIIA y previene la interacción inducida de Sp1 con TFIIA. De esta forma se inhiben las interacciones dependientes de activadores con los GTFs (Olave *et al.*, 1998) (figura I.5).

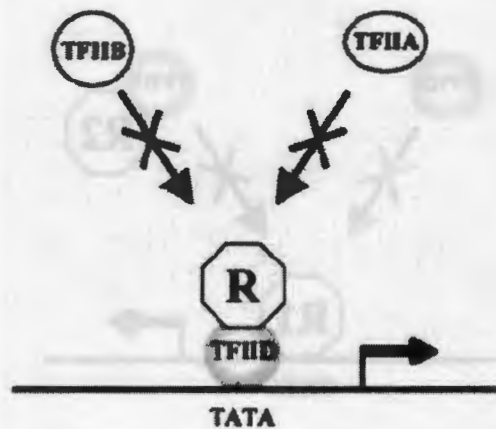


Figura 1.5 Modelo donde el represor (R) bloquea las interacciones entre los factores transcripcionales.

I.10.4 Regulación del encendido del activador o coactivador

Las proteínas que regulan la estabilidad y el encendido de un activador pueden indirectamente regular la transcripción. La oncoproteína MDM2 es un ejemplo de un represor que ubiquitina un activador y promueve su degradación por el proteosoma (Fuchs *et al.*, 1998) (R1) (figura 1.6).

I.10.5 Regulación de la localización intracelular de un activador

Un factor de transcripción bien conocido que funciona previniendo la localización nuclear del activador es el represor I κ B, bloquea el importe nuclear de NF κ B, que es un heterodímero que comprende p50 y p65 dos miembros de la familia Rel que son activadores de la transcripción (R2) (Baeuerle y Baltimore, 1988) (figura 1.6).

I.10.6 Inhibición de las interacciones blanco-activador

Cuando el represor se une a un dominio de activación, existe este tipo de represión que se da como un enmascaramiento. La proteína represora Gal80 se une directamente al sitio de activación de Gal4. El dominio de activación de Gal4 interactúa con la subunidad de Srb4 de la ARN polimerasa II. La interacción de Gal80 con Gal4 puede inhibir las interacciones de Gal4 con la maquinaria de transcripción (R3) (Salmeron *et al.*, 1990) (figura 1.6).

I.10.7 Inhibición de las interacciones ADN-Activador

Este tipo de represión es análoga a lo observado cuando las proteínas compiten con TBP para unirse a la caja TATA. AP1 es un activador que al unírsele un represor impide que AP1 pueda enlazarse al ADN (R5), otra forma de inhibición se da cuando el represor interactúa con el activador bloqueando la entrada de éste al complejo de preiniciación (R4) (Schule *et al.*, 1990) (figura I.6).

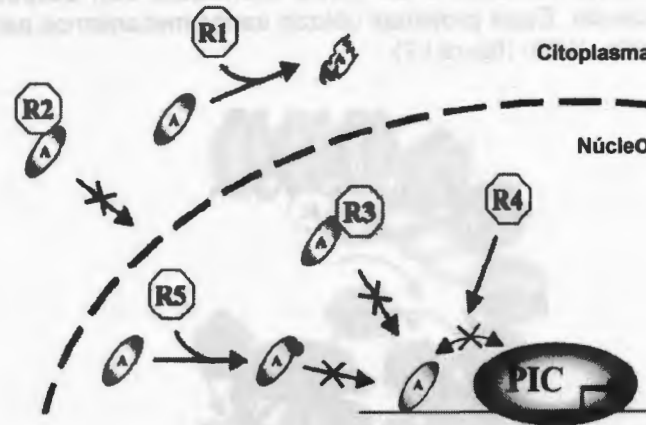


Figura I.6. El represor (R1) degrada a los activadores, inhibe el importe nuclear del activado (R2), inhibe la interacción blanco-activador (R3), inhibe la interacción ADN-activador (R5) y activador- complejo PIC (R4).

I.10.8 Represión vía reclutamiento de factores de remodelación de la cromatina

El genoma eucariótico está empaquetado dentro de un complejo ADN-proteína. La compactación del ADN que ocurre a través del empaquetamiento es necesaria para permanecer en los límites del núcleo. El ADN está empaquetado dentro de un complejo de nucleoproteínas conocido como cromatina. La unidad fundamental repetida es el nucleosoma, la cuál incluye un centro de histona (formado por dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3, H4), una molécula de H1 y el ADN espaciador, usualmente abarca una longitud de 200 pares de bases. Las histonas están altamente conservadas entre eucariotes y consisten de un dominio globular y de un extremo amino no estructurado (Wolffe, 2000).

Existen dos tipos de cromatina la eucromatina y la heterocromatina. La eucromatina contienen la mayoría de los genes que están expresados en la célula, la heterocromatina consiste de regiones de tinción oscura, altamente compactada que contiene muy pocos genes activos. La represión de la transcripción por la

heterocromatina es conocida como silenciamiento genético. La activación transcripcional esta generalmente asociada con la acetilación de las histonas, donde la represión transcripcional esta asociada con la desacetilación (Berger, 2002).

Las bases de las citocinas dentro de las secuencias de dinucleótidos CpG están frecuentemente metilados contribuyendo así el establecimiento y mantenimiento de la heterocromatina (Jones *et al.*, 2000).

Las proteínas PcG se han encontrado como homo o hetero-oligomeros que están asociados con el mantenimiento de un complejo genético transcripcionalmente inactivo. Este complejo mantiene a los genes silenciados aun después de varios ciclos de división celular. Estas proteínas utilizan varios mecanismos para reprimir la transcripción (Pirrotta, 1998) (figura I.7).

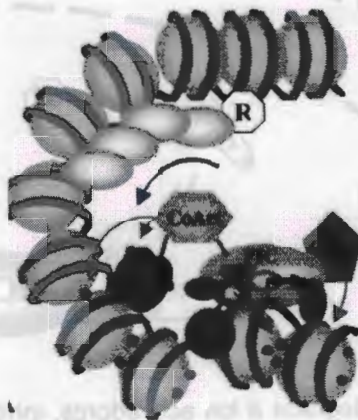


Figura I.7 Modelo que demuestra como un represor (R) podría reclutar a las proteínas de unión a la cromatina y expandirse a lo largo de la cromatina.

I.11 Elementos enhancer y silenciadores

Los elementos "enhancer" y silenciadores son secuencias de ADN que funcionan como sitios de unión para activadores y represores transcripcionales respectivamente.

Los potenciadores o "enhancers" son elementos de regulación en cuya secuencia interaccionan proteínas que transmitirán señales a distancia de activación específica. Los "enhancers" fueron originalmente identificados como secuencias en *cis*, que pueden incrementar la transcripción de un gen, independientemente de la orientación y de la distancia a la que se encuentren en relación con el sitio de inicio de la transcripción (Mannervik, 1999).

Los silenciadores se han definido como elementos a los cuales se les unen factores nucleares que tienen un efecto negativo sobre la transcripción de manera independiente de su posición y orientación en relación con el sitio de inicio de la

transcripción. Estos elementos poseen una organización modular al igual que los potenciadores, pero con una función negativa sobre la expresión génica (Courey y Jia, 2001).

I.12 Transcripción basal y activada

Se han descrito varios genes en muchos organismos que tienen niveles de transcripción basal y activada. La transcripción basal de un gen se refiere a su transcripción constitutiva, principalmente un nivel bajo el cual puede ser activado para alcanzar un nivel conocido como transcripción activada. Ambos niveles de transcripción se puede llevar a cabo en un promotor determinado. Los términos transcripción basal y activada son ampliamente usados para describir la actividad transcripcional de un gen en un sistema *in vitro* o *in vivo* (Yang *et al.*, 2007).

En células eucariotes el ADN esta empaquetado dentro de nucleosomas (forma superenrollada), como consecuencia la accesibilidad al ADN por la ARN polimerasa y los factores generales de la transcripción es reducida significativamente comparada a la situación *in vitro*, en donde los factores transcripcionales no se ven impedidos por la estructura del ADN que se encuentra en forma desenrollada (Barberis y Petrascheck, 2003).

I.13 Transcripción *in vitro*

La regulación de la expresión génica puede ocurrir durante varios procesos en la célula, uno de los cuales es la transcripción, en un sistema de transcripción *in vitro*, se requiere de los siguientes elementos: de un ADN que funciona como plantilla, de nucleótidos trifosfato (NTPs) y de extractos proteínicos nucleares. Primeramente el ADN debe contener el promotor y la secuencia que se va a transcribir, se adicionan los extractos nucleares donde van a estar contenidas todas las proteínas necesarias para llevar a cabo la transcripción entre ellas están los factores generales de la transcripción, activadores, etc. En este punto se realiza el ensamblaje del complejo de pre-iniciación y al momento de adicionar los NTPs es cuando se inicia la transcripción, posteriormente se da la elongación del complejo y por último la terminación de la transcripción que va acompañada del desensamblaje del complejo de transcripción (Zhu, 1996) (figura I.8).

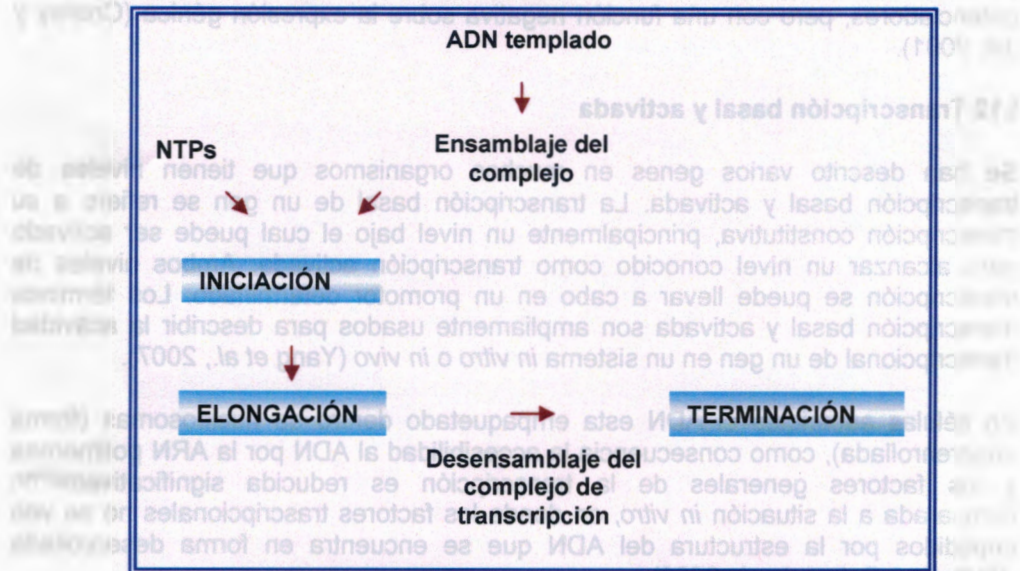


Figura I.8. Esquema de los pasos de un sistema de transcripción *in vitro*: iniciación, elongación y terminación.

En plantas los promotores más utilizados para la realización de la transcripción *in vitro* se describen en el cuadro I.1.

Cuadro I.1. Sistemas de transcripción *in vitro* en planta.

Promotores	Extractos	Referencias
T-ADN TC7	WGCE	Yamazaki and Imamoto, 1987
Ad2MLP	NE	Flynn et al 1987
CaMV 35S	WGCE	Yamazaki et al, 1987
CaMV 19S	WCE	Cooke y Penon 1990
Gliadin, CaMV 35S	NE	Roberts and Okita, 1991

WGC extracto cromatínico del germen de trigo, WCE extracto celular total, NE extracto nuclear.

I.14 El cofactor negativo 2 (NC2)

El cofactor negativo 2 (NC2) inicialmente se purificó de extractos celulares de humanos con una actividad que inhibe el inicio de la transcripción por la ARN Pol II (Meisterernst y Roeder 1991; Inostroza *et al.*, 1992). NC2 es un heterodímero que consiste de dos subunidades, NC2 α y NC2 β , también llamados Drap1 y Dr1, respectivamente (Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996). Ambas

subunidades de NC2 tienen un dominio de unión a histona, necesario para su interacción entre ellas y son altamente conservadas entre eucariotes. Estos dominios son similares a los encontrados en el par de histonas H2A-H2B, el cual esta cercanamente relacionado a los encontrados en los factores de transcripción NF-YB/NF-YC en humanos, en Levadura HAP3/HAP5 y en las proteínas de remodelación de la cromatina CHRAC-15/17 (Corona *et al.*, 2000; Poot *et al.*, 2000).

Las dos subunidades de NC2 tienen un homólogo en levadura y es llamado Bur6/NC2 α y Ydr1p/NC2 β . Ambas subunidades son esenciales para la viabilidad de la levadura y son funcionalmente intercambiables entre levadura y humano (Goppelt and Meisterernst 1996; Gadbois *et al.* 1997; Kim *et al.* 1997; Prelich 1997; Lemaire *et al.* 2000; Xie *et al.* 2000). Los genes que codifican las subunidades fueron identificados por un análisis de secuencia en el genoma de levadura (Goppelt y Meisterernst 1996; Gadbois *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997) y en dos selecciones genéticas para represores generales de la transcripción. Primero, las mutaciones de *bur6* fueron identificadas por su habilidad para incrementar la transcripción de promotores enhancer-less, sugiriendo que NC2 inhibe la transcripción basal *in vivo* (Prelich y Winston 1993; Prelich 1997). Y segundo, se encontraron mutaciones en *bur6* y *ydr1* que suprimen la mutación en *SRB4*, el cual codifica una subunidad del complejo mediador (Gadbois *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998). Además, la expresión de un alto número de copias de *YDR1* disminuyó la acumulación de ARNm y causó una disminución en el crecimiento de levadura, consistente con su papel de represor general de la transcripción. Sin embargo, el lento crecimiento es parcialmente suprimido por la sobre expresión de TBP (Kim *et al.*, 2000).

1.15 NC2 es un represor general de la transcripción

In vitro, NC2 se asocia con TBP unida al promotor, previniendo así, el reclutamiento de TFIIA y TFIIB al promotor. (Meisterernst y Roeder 1991; Inostroza *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1995; Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996). NC2 globalmente reprime la transcripción dirigida por la Pol II y Pol III, pero no la transcripción por la Pol I (White *et al.* 1994).

La estructura cristalográfica de NC2 con ADN-TBP provee un modelo para el mecanismo de represión de NC2. Esta estructura demuestra que el amino terminal de NC2 α y NC2 β , contienen un dominio de unión a histona, que les permiten formar un heterodímero y unirse uno por abajo del complejo ADN-TBP. El carboxilo terminal de NC2 β hace contacto específico con la superficie convexa de TBP y bloquea la entrada de TFIIB dentro del complejo de la transcripción, (Kamada *et al.*, 2001). Esto es consistente con las observaciones previas, en donde las mutaciones de TBP para prevenir la interacción con NC2 se localizan cerca de la superficie de TBP que también se asocia con TFIIB (Cang *et al.*, 1999).

La comparación de las estructuras NC2/TBP/ADN y TFIIA/TBP/ADN sugiere que TFIIA y NC2 podrían unirse a TBP simultáneamente, aunque con una afinidad más baja (Bleichenbacher *et al.* 2003). Si bien, la superposición de la estructura no toma

en cuenta que la estructura de NC2-TBP-ADN no contiene el extremo carboxilo de NC2 alfa, el cual podría hacer contacto adicional con TBP (Klejman *et al.*, 2004). NC2 desplaza eficientemente a TFIIA dentro del complejo promotor-TBP y sus datos bioquímicos están apoyados por los estudios de interacción genética en levadura (Xie *et al.*, 2000). En soporte de la función negativa también esta la que se encontró en condiciones de hipoxia, donde las células de mamíferos pueden inducir selectivamente la represión de la transcripción aumentando la actividad de NC2 (Denko *et al.*, 2003).

1.16 Regulación transcripcional positiva de NC2

En adición a su bien caracterizada función como represor, varios experimentos sugieren que NC2 podría también tener función positiva. En levadura, mutaciones de *bur6* reducen la transcripción de muchos promotores (Prelich, 1997; Geisberg *et al.*, 2001) y un crecimiento lento de la mutante de NC2 beta inhibió la transcripción de promotores que contienen TATA pero estimulo a los promotores TATA less de genes HIS3 y HIS4 (Lemaire *et al.*, 2000).

En *Drosophila*, NC2 estimula *in vitro* la transcripción de promotores TATA less, y reprimió la transcripción en promotores conteniendo el elemento TATA (Willy *et al.*, 2000). Recientemente Cang y Prelich dieron la primera evidencia que NC2 de levadura estimula directamente la transcripción activada en levadura de promotores TATA (Cang y Prelich, 2002).

1.17 Interacción de NC2 con otras proteínas

Geisberg en el 2001, documentó que en Levadura existe una relación 1:1 de NC2/TBP y NC2/TFIIB en promotores independientes como dependientes de TAFs. Así mismo en células de humano se observó que NC2 β y TFIIB están presentes en promotores activos de la ARN polimerasa II y no en promotores inactivos de la polimerasa II, situación que contradice el modelo de represión de NC2, en donde se propone que TFIIB no puede estar presente si se encuentra NC2 (Christova, 2001).

NC2 fue encontrado estar asociado con una forma no fosforilada de la Pol II, pero se desconoce el significado de esta interacción, al igual que interacciona con algunos miembros del Mediador (hMed7, hSur2, hSRB7) (Castaño *et al.*, 2000).

La proteína BTAF1 (formalmente conocida como TAF II 170/ TAF-172) y la proteína NC2 son capaces de unirse a TBP directamente y regular la transcripción de la ARN polimerasa II positiva y negativamente. La subunidad NC2 α interactúa con BTAF1, en contraste con NC2 β que no es capaz de asociarse a BTAF1 y se ha observado que interfiere con la interacción BTAF1/TBP (Klejman, 2004).

Colli en el 2006, reportó que el complejo NC2 interactúa con Med21 (hSRb7), modificando su tamaño de migración. Por medio de cromatografía de exclusión se

observó que Med21 migra con un tamaño de 14 kDa, pero cuando esta presente NC2 ésta migra con un tamaño de 160 kDa.

Utilizando un sistema en el cual se había eliminado NC2 por inmunodepleción (eliminado) se observó un aumento en el nivel de transcripción dependiendo de la cantidad del templado utilizado. Inesperadamente en el extracto no tratado se observó un pequeño aumento de transcripción. Mientras que en extractos nucleares de células HeLa el inicio de la transcripción se da con una guanina, en el extracto depletado el inicio de la transcripción se presentó en sitios alternos (Castaño *et al.*, 2000).

1.18 NC2 de plantas

El genoma del arroz (*Oryza sativa*); AA genoma esta compuesto de 12 cromosomas ($2n=24$) y tiene una longitud de 439 megabases y cuenta con 40 000 a 50 000 genes funcionales (Wang y Chen, 2007).

En la actualidad poco es conocido de NC2 en plantas. Sin embargo, Song en el 2002 reportó los estudios realizados de NC2 en *Oryza sativa* y la comparación de las secuencias de diferentes organismos.

La región codificante de Dr1 de Arroz (OsDr1) es de 891 pb y codifica para un polipéptido de 296 aa (masa molecular de 33.7) que demuestra 34 % de identidad al Dr1 de humano y es mucho más grande comparado con otros sistemas: Trigo (wDr1), *Arabidopsis* (aDr1), Soya (sDr1), Levadura (yDr1), Humano (hDr1) y *Drosophila* (dDr1). Los polipéptidos de Trigo y Arroz son 70% idénticos y son similares en tamaño y estructura, esto podría deberse a que ambos organismos son monocotiledones. OsDr1 y wDr1 tienen un dominio de unión a histona, denominados dominio de glutamato y glutamina y dominio de prolina. OsDr1 en su extremo amino es 68% idéntico a *Arabidopsis* y Soya. Dr1 se ha comparado en sistemas que no son plantas, con un 50% de identidad en el extremo amino con respecto al que es encontrado en Levadura, Humano y *Drosophila* (figura 1.9).

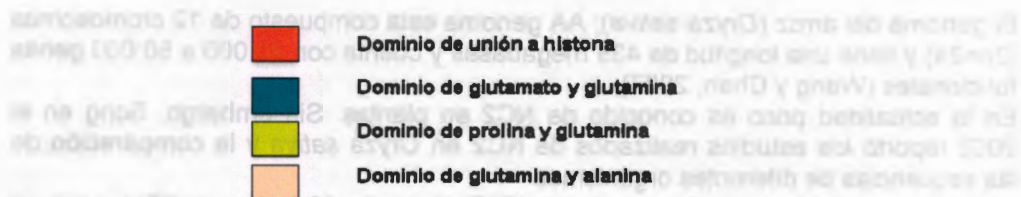
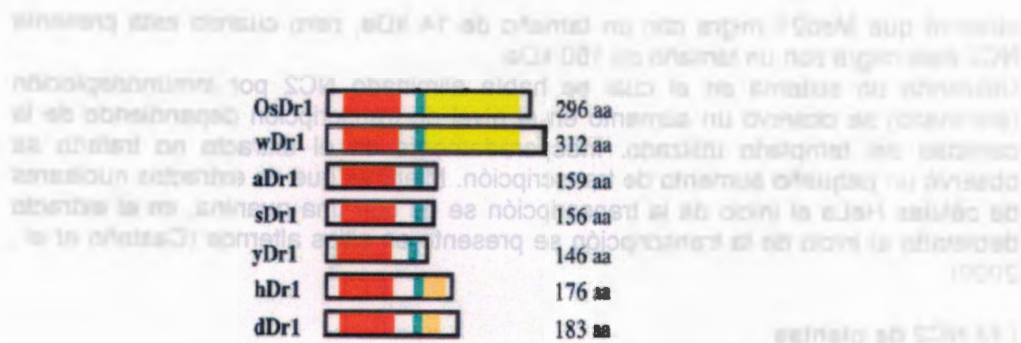


Figura I.9. Dominios de Dr1 (NC2 beta) en diferentes organismos.

La región de Drap1 de Arroz (OsDrap1) es de 777 pb y codifica para un polipéptido de 258 aa (masa molecular de 28 kDa), la estructura consta de un dominio de unión a histona, y una región con una gran cantidad de aminoácidos básicos, una región de arginina y glicina, aminoácidos ácidos y dominio de regiones de prolina. Con un 33% de identidad al Drap1 de Humano (hDrap1) y 82% de homología con Drap1 de Maíz (mDrap1). OsDrap1 tiene su extremo amino que es homólogo en un 40% con Levadura (yDrap1) (figura I.10).

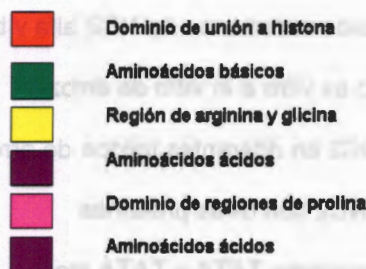


Figura I.10. Dominios de Drap1 (NC2 alfa) en diferentes organismos.

Se realizaron ensayos de western blot y se estimó el número de genes de OsDr1 y OsDrap1 en el genoma de arroz, sugiriendo que hay una familia de no más de tres genes en el genoma y que hay un gen de OsDrap1 (Song *et al.*, 2002). Además se analizó la expresión de dichos genes, demostrando que OsDr1 y OsDrap1 se expresan constitutivamente y abundantemente en raíz, tallo, hoja y células en suspensión de arroz. Además, se determinó la localización celular de las proteínas de OsDrap1 y OsDr1, resultando que éstas se encuentran localizadas exclusivamente en el núcleo. Utilizando ADN de arroz como sonda y por medio de ensayos de movilidad se demostró que la proteína recombinante OsDr1 no tuvo afinidad por el ADN, comparado con los resultados obtenidos en donde OsDrap1 tuvo una suficiente interacción con el ADN. Sin embargo, las proteínas como heterodímero demostraron una fuerte interacción hacia el ADN.

Para elucidar la función de OsDrap1 y OsDr1, se realizó un sistema de transcripción *in vitro*, usando el promotor del gen *Pal* fusionado a un gen reportero, se utilizaron extractos proteicos totales de arroz como fuente de la maquinaria transcripcional. Los resultados fueron los siguientes, al adicionar la proteína recombinante OsDrap1 la transcripción se reprimió, tal represión no fue tan fuerte al adicionar OsDr1, la combinación de ambas proteínas reprimieron la transcripción del gen reportero hasta un 74%. Con estos resultados se descubrieron diferencias en el mecanismo de represión del complejo OsDr1/OsDrap1 con sus contrapartes en sistemas de no-plantas, ya que se ha reportado tanto en humano (Yeung, 1997) como en levadura (Goppelt, 1996) que la proteína que lleva la función represora es Dr1 y que Drap1 es considerado un corepresor (Song *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la actividad transcripcional de NC2.

Objetivos particulares:

Diseñar un sistema de expresión simultánea de NC2 alfa y beta

Obtener un sistema de cultivo *ex vitro* e *in vitro* de arroz

Determinar la presencia de NC2 en diferentes tejidos de arroz

Determinar la interacción de NC2 con otras proteínas

Clonar y caracterizar los promotores TATA y TATA less

HIPOTESIS

Si NC2 es un factor requerido para regular el proceso transcripcional entonces este factor deberá interactuar de manera directa con otros factores transcripcionales y expresarse en todos los tejidos vegetales. Aun mas su toxicidad de expresión en sistemas bacterianos podrá compensarse cuando el complejo entero sea expresado por lo que su nivel de expresión será mayor que la expresión individual de sus subunidades.

I.20 Bibliografía

- Acosta V, K. y Zavala, Castro, J.** 1996. Proteínas de unión a DNA. *Rev Biomed.* 7:163-172.
- Ainbinder, E., Amir L., Moshonov S., Revach M. y Wolstein O.** 2003. Characterization of subunits of the general transcription factor TFIID. Department of Biological Chemistry. 12:33-40.
- Asturias, F. J., Jiang, Y. W., Myers, L. C., Gustafsson, C. M. y Kornberg, R. D.** 1999. Conserved Structures of Mediator and RNA Polymerase II Holoenzyme. *Science.* 283: 985-87.
- Baeuerle, P. A. y Baltimore, D.** 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science.* 242:540-546.
- Barberis, A. y Petrascheck, M.** 2003. Transcription Activation in Eukaryotic Cells. *Encyclopedia of life sciences.* 2:15-20.
- Berger, S. L.** 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:142-148.
- Bleichenbacher, M., Tan, S. y Richmond, T. J.** 2003. Novel interactions between the components of human and yeast TFIIA/TBP/DNA complexes. *J Mol Biol.* 2003. 332(4):783-93.
- Bucher, P. y Trifonov, E.** 1986. Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. *Nucleic Acids Research.* 14(24):182-190.
- Buratowski, S.** 1994. The basics of basal transcription by RANA polymerase II. *Cell* 77(1):1-3.
- Butler, J. y Kadonaga, J.** 2002. The RNA polymerase II core promoter a key component in the regulation of genes expresión. *Genes and Development.* 16:2583-2592.
- Brivanlou, A. H. y Darnell, J. E.** 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science.* 295(5556):813-818.
- Cang, Y., Prelich, G.** 2002. Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:12727-32.
- Cang, Y., Auble, D. T. y Prelich, G.** 1999. A new regulatory domain on the TATA-binding protein. *EMBO J.* 18(23):6662-71.

- Castaño, E., Gross, P., Wang, Z., Roeder, R.G., Oelgeschlager, T.** 2000. The C-terminal domain-phosphorylated IIO form of RNA polymerase II is associated with the transcription repressor NC2 (Dr1/DRAP1) and is required for transcription activation in human nuclear extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7184-9.
- Christova, R. y Oelgeschlager, T.** 2002. Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin *in vivo*. *Nat Cell Biol.* 4:79-82.
- Colli, J. G., Guillén, D., Rodríguez, L.C., Mobious, N. y Castaño, E.** 2006. Direct Interaction between NC2 and a subunit of the SRBM/Mediator co-activator. 1:75-83.
- Corona, D. F., A. Eberharter, A. Budde, R. Deuring, S. Ferrari, P. Varga-Weisz, M. Wilm, J. Conte, C., Dastugue, B. y Vaury, C.** 2002. Promoter competition as a mechanism of transcriptional. *EMBO J.* 2002 July 15; 21(14):3908–3916.
- Cowell, I. A y Hurst, H. C.** 1996. Protein- protein interaction between the transcriptional repressor E4BP4 and the TBP-binding protein Dr1. *Nucleic Acids Research* 18:3607-3613.
- Cooke, R. y Penon P.** 1990. *In vitro* transcription from cauliflower mosaic virus promoters by a cell-free extract from tobacco cells. *Plant Mol Biol.* 14:391-405.
- Courey, A. J. y Jia, S.** 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* 15:2786–2796.
- Denko, N., Wernke, D. K., Johnson, A. B., Hammond, E., Chiang, C. M. y Barton, M. C.** 2003. Hypoxia actively represses transcription by inducing negative cofactor 2 (Dr1/DrAP1) and blocking preinitiation complex assembly. *J Biol Chem.* 278:5744-9.
- Flaherty, K. M., McKay, D. B., Kabsch, W. y Holmes, K. C.** 1991. Similarity of the Three-Dimensional Structures of Actin and the ATPase Fragment of a 70-kDa Heat Shock Cognate Protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5041-45.
- Flanagan, P. M., Kelleher, R. J., Sayre, M. H., Tschochner, H. y Kornberg, R. D.** 1991. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. *Nature.* 350:436-38.
- Flynn, P., Davis, E. y Ackerman, S.** 1987. Partial purification of plant transcription factors. *Plant Mol. Biol.* 9:159-164.
- Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. y Ronai Z.** 1998. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene.* 17:2543–2547.

Gadbois, E. L., D. M. Chao, J.C. Reese, M. R. Green, y R.A. Young. 1997. Functional antagonism between RNA polymerase II holoenzyme and global negative regulator NC2 *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:3145-50.

Gaston, K. y Jayaraman, P. 2002. Transcriptional repression in eukaryotes: repressor and repression mechanisms. *Cell Mol. Life Sci*. 60:721-741.

Geisberg, J. V., F.C. Holstege, R.A. Young, y K. Struhl. 2001. Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol* 21:2736-42.

Gill, G. y Ptashne, M. 1988. Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*. 334:721-24.

Goppelt, A, y Meisterernst, M. 1996. Characterization of the basal inhibitor of class II transcription NC2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 24(22):4450-4455.

Hampsey, M. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcription machinery. *Microbiol Mol Biol Re*. 62(2):465-503.

Holland, L. y Yankulov, K. 2003. Two forms of RNA polymerase II holoenzyme display inherent abundance during the cell cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 302:484-488.

Inostroza, J. A., Mermelstein, F. H., Ha, I., Lane, W. S. y Reinberg, D. 1992. Dr1, A TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell*. 70: 477-89.

Jones, D. O., Cowell, I. G. y Singh, P. B. 2000. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organization and expression. *Bioessays*. 22:124-137.

Kamada, K., F. Shu, H. Chen, S. Malik, G. Stelzer, R. G. Roeder, M. Meisterernst, S. K. Burley, 2001. Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell*. 106(1):71-81.

Kadonaga, J. 2002. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Experimental and molecular medicine*, 34(4):259-264.

Keaveney, M. y Struhl, K. 1998. Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol Cell*. 1(6):917-924.

- Kelly, W. G., Dahmus, M. E. y Hart, G. W.** 1993. RNA polymerase II is a glycoprotein: modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 268:10416-10424.
- Kelleher, R. J., Flanagan, P. M. y Kornberg, R. D.** 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell.* 61:1209-15.
- Kim, S., J.G. Na, M. Hampsey, y D. Reinberg.** 1997. The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:820-825.
- Kim, T. K., Y. Zhao, H. Ge, R. Bernstein, R. G. Roeder,** 1995. Tata-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J. Biol Chem.* 270:10976-81.
- Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayer, M. H. y Kornberg, R. D.** 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell.* 77:599-608.
- Kim, S., Cabane, K., Hampsey, M. y Reinberg, D.** 2000. Genetic analysis of the YDR1-BUR6 repressor complex reveals an intricate balance among transcriptional regulatory proteins in yeast. *Mol Cell Biol.* 20(7):2455-65.
- Klejman, M. P., Pereira, L. A., van Zeeburg, H. J., Gilfillan, S., Meisterernst, M. y Timmers, H. T.** 2004. NC2alpha interacts with BTAF1 and stimulates its ATP-dependent association with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 24(22):10072-82.
- Kokubo, T., Swanson, M. J., Nishikawa, J. L. Hinnebusch, A. G. y Nakatani, Y.** The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 1998. 18(2):1003-1012.
- Lee, T. I., Wyrick, J. J., Koh, S. S., Jennings, E. G., Gadbois, E. L. Y Young, R. A.** 1998. Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol.* 18(8):4455-4462.
- Lemaire, M., J. Xie, M. Meisterernst, y M.A. Collart.** 2000. The NC2 repressor is dispensable in yeast mutated for the Sin4p component of the holoenzyme and plays roles similar to Mot1p *in vivo*. *Mol Microbiol.* 36:163-73.
- Lemon, B. y Tjian, R.** 2000. Orchestrated response a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14(20):25551-25569.
- Levine, M. y Tjian, R.** 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature.* 424:147-151.

Lewis, B. y Reinberg, D. 2003 The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *Journal of Cell Science*. 116:3667-3675.

Maldonado, E., Hampsey, M; y Reinber, D. 1999. Repression: Targeting the Heart of the Matter. *Cell* 99:455-458.

Maldonado, E. y Reinberg, D. 1995. News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol.* 1995. 7(3):352-361.

Malik, S., Gu, Wu., Quin, J. y Roeder, R. G. 2000. The USA- derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with other PCs. *Mol. Cell.* 5:753-760.

Malik, S., y Roeder, R. G. 2005. Structural and functional characterization of PC2 and RNA polymerase II-associated subpopulations of metazoan Mediator. *Trends Biochem. Sci.* 30:256-263.

Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H. y Levine, M. 1999. Transcriptional coregulators in development. *Science*. 284:606-609.

Martínez, M., Solís, G. y Carreón, Y. 2004. La unidad y la diversidad de los complejos de la iniciación de la transcripción en promotores basales del tipo II. *Facultad de Biología.* 23(4):157-163.

Meka, H., Werner, F., Cordell, S., Onesti, S.y Brick, P. 2005. Crystal structure and RNA binding of the Rpb4/Rpb7 subunits of human RNA polymerase II. *Nucleic Acids Research.* 33(19):6435-6444.

Meisterernst, M. y Roeder, R. 1991. Family of Proteins That Interact with TFIID and Regulate Promotor Activity. *Cell* 67:557-567.

Mermelstein, F., K. Yeung, J. Cao, J.A. Inostroza, H. Erdjument-Bromage, K. Egelson, D. Landsman, P. Levitt, P. Tempst, and D. Reinberg. 1996. Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev.* 10:1033-48.

Muller, F. y Tora, L. 2004. The multicoloured world of promoter recognition. complexes. *The EMBO Journal.* 23:2-8.

Myers, L. C. y Kornberg, R. D. 2000. Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69:729-749.

Näär, A., Lemon, B. y Tjian, R. 2001. Transcriptional Coactivator Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70:475-501.

Nogales, E. 2000. Recent structural insights into transcription preinitiation complexes. *Journal of Cell Science*. 113:4391-4397.

Olave, I., Reinberg, D. y Vales, L. D. 1998. The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) targets TFIID and TFIIA to prevent activated transcription. *Genes Dev*. 12:1621-1637.

Pedersen, A. G., Baldi, P., Chauvin, Y. y Brunak, S. 1999. The biology of eukaryotic promoter prediction – a review. *Computers and Chemistry*. 23:191-207.

Pirrotta, V. 1998. Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell*. 93: 333-336.

Poot, R. A., G. Dellaire, B. B. Hulsmann, M. A. Grimaldi, D. F. Corona, P. B. Becker, W. A. Bickmore, y P. D. Varga-Weisz. 2000. HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *Embo J* 19:3377-87.

Prelich, G. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* BUR6 encodes a DRAP1/NC2alpha homolog that has both positive and negative roles in transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol*. 17:2057-65.

Prelich, G. y Winston, F. 1993. Mutations that suppress the deletion of an upstream activating sequence in yeast: involvement of a protein kinase and histone H3 in repressing transcription *in vivo*. *Genetics*. 135(3):665-76.

Recillas, T. F. y Escamilla, Del Arenal, M. 2004. Participación de la Estructura de la Cromatina en la Regulación de la Expresión Génica. *Mensaje Bioquímico*. 28:173-201.

Roberts, M. W. y Okita, T. W. 1991. Accurate *in vitro* transcription of plant promoters with nuclear extracts prepared from cultured plant cells. *Plant Mol. Biol*. 16:771-786.

Salmeron, J. M. Jr, Leuther, K. K. y Johnston, S. A. 1990. GAL4 mutations that separate the transcriptional activation and GAL80-interactive functions of the yeast GAL4 protein. *Genetics*. 125:21-27.

Schule, R., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., Bolado, J., Pike, J. W. y Evans R. M. 1990. Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*. 61:497-504.

Sims, R., Belotserkovskaya, R. y Reinberg, D. 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes and Development*. 18:2437-2468.

Singh, K. B. 1998. Transcriptional regulation in plants: the importance de combinatorial control. *Plant Physiol.* 118:1111-1120.

Stargell, L. y Struhl, K. 1996. Mechanisms of transcriptional activation *in vivo*: two steps forward. *Trends in Genetics* 12(8):311-315.

Song, W., Solimeo, H., Rupert, R., Yadav, N. y Zhu, Q. 2002. Functional Dissection of a Rice Dr1/DrAp1 Transcriptional Repression Complex. *The Plan Cell* 14:181-195.

Smale, S. T. 2001. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes and Dev.* 15:2503-2508.

Triezenberg, S. J., Kingsbur, R. C. y McKnight, S. L. 1988. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2:718-29.

Wang, L. y Chen, J. T. 2007. Strategies and progresses on cereal comparative genomics. *Yi Chuan.* 29(9):1055-60.

Wieczorek, E., Brand, M., Jacq X. y Tora, L. 1998. Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature.* 393:187-191.

White, R. J., B. C. Khoo, J. A. Inostroza, D. Reinberg, y S. P. Jackson. 1994. Differential regulation of RNA polymerases I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. *Science.* 266: 448-50.

Willy, P. J., R. Kobayashi, y J.T. Kadonaga. 2000. A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science.* 290: 982-5.

Wolffe, A. 2000. *Chromatin: Structure and Function*, 3rd edn, Academic Press, London.

Xie, J., M. Collart, M. Lemaire, G. Stelzer, y M. Meisterernst. 2000. A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement *in vivo*. *Embo J.* 19: 672-82.

Yamazaki, K. e Imamoto F. 1987. Selective and achúrate initiation of transcription at the T-DNA promoter in a soluble chromatin extract from wheat germ. *Mol Gen Genet.* 209:445-452.

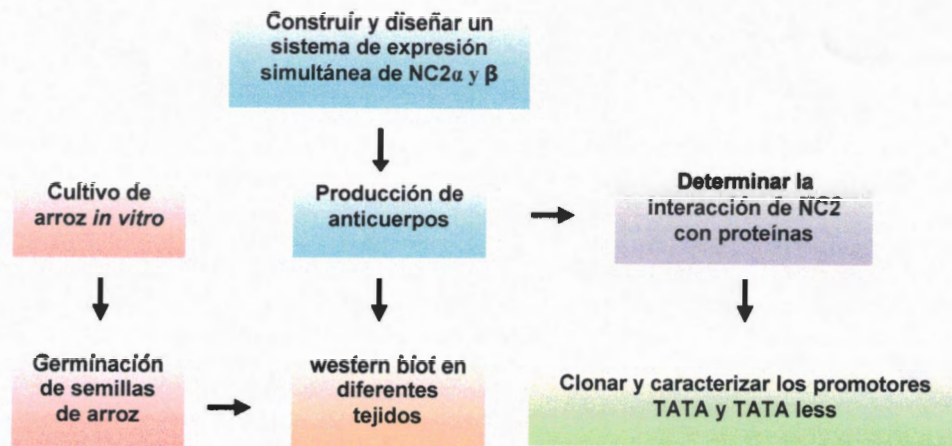
Yamazaki, K. I., Katagari, F., Imaseki, H. y Chua, N. H. 1990. TGA1a, a tabaco DNA-binding protein, increases the rate of preinitiation complex formation in a plant *in vitro* transcription system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7035-7039.

Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M. y Martinez, E. 2007. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. Gene. 389(1):52-65.

Yeung, K., Kim S, Reinberg, D. 1997 Functional dissection of a human Dr1-DRAP1 repressor complex. Mol Cell Biol. 17:36-45.

Zhu, Q. 1996. RNA polymerase II dependent plant *in vitro* transcription systems. The Plant Journal. 10(2):185-188.

Diseño Experimental



CAPÍTULO II

Generación de un cultivo de *Oryza sativa* L

II.1 Introducción

El cultivo de tejido de callos se refiere al mantenimiento *in vitro* de masas celulares no diferenciadas, llamadas callos o tejido calloso. Este tipo de tejido tiene innumerables aplicaciones en estudios de tipo fisiológico, bioquímico, genético, producción de compuestos secundarios, y para la generación de variación genética en los cultivos. Por otro lado, es frecuente el cultivo de segmentos de órganos (hoja, tallo, raíz, etc.) con el fin de inducir la formación de tejido calloso a la generación de plantas completas a partir de los mismos (Nishi *et al.*, 1977; Gourld, 1974; Ammirato, 1984).

Un primer tipo de cultivo de células es el cultivo de células en suspensión. En este caso se cultivan células aisladas o pequeños cúmulos no diferenciados de células, lo cual se realiza en un medio líquido bajo agitación continua. Este cultivo es ideal para estudios fisiológicos a escala celular, para la producción *in vitro* de metabolitos de interés a bien para la selección *in vitro* de variantes deseables (Murashige y Skoog, 1962; Nakano y Maeda, 1979; Abe y Futsuhara, 1985).

Para llevar a cabo un cultivo de tejidos se requiere de un grupo de hormonas que sirven para el crecimiento y desarrollo de los células, entre ellas se encuentran las auxinas que son un grupo de compuestos derivados comúnmente del triptófano, sintetizados por lo general en los ápices, y que están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Se sabe que participan en la regulación de algunos procesos que ocurren en los tejidos vegetales como el crecimiento celular y la formación de tejidos no diferenciados (Chu *et al.*, 1975; Everett *et al.*, 1981).

II.2 Materiales y Métodos

II.2.1 Germinación de semillas de arroz *ex vitro*

Se pusieron a germinar semillas de arroz certificada (variedad Filipina) para la siembra se utilizó una solución nutritiva de Hoagland's (anexo 2), contenida en recipientes, las semillas de arroz se colocaron en una red flotante. Los recipientes se mantuvieron en vivero (Medina *et al.*, 1999). Para la recolecta, la planta se dividió en hoja, tallo y raíz, y se sumergieron a -196°C , almacenándose posteriormente a una temperatura de -80°C .

II.2.2 Inducción de callo *in vitro* a partir de semillas de arroz

Para la inducción de callo las semillas de arroz se colocaron en caja petri que tenían medio sólido de MS + 2,4D mg/L, las cajas se colocaron en cuartos de fotoperíodo. Después se realizó la disgregación de los callos cambiando las concentraciones de 2,4D, hasta obtener las células en suspensión. Se realizó con algunas modificaciones según Medina *et al.*, 1999.

II.3 Resultados

II.3.1 Germinación de semillas de arroz *ex vitro*



Figura II.1. Plantas de arroz en medio Hogland's, después de un mes de haber germinado.



Figura II.2. A) hojas, B) tallos y C) raíces recolectadas después de dos meses de crecimiento de arroz.

II.3.2 Inducción de callo *in vitro* a partir de semillas de arroz

Para la inducción de callo las semillas se colocaron en caja petri que tenían medio sólido de MS + 2,4 D 2 mg/lit (figura II.3a), las cajas se colocaron en cuartos de fotoperíodo y después de 30 días se observó la presencia de callos. Para las células en suspensión el callo se cambió a una solución de MS + 2,4-D 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y los matraces que los contenían se pusieron en agitación, a 80-150 rpm, en oscuridad y a 25° C de temperatura. Mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varias semanas hasta la disgregación del callo y la permanencia de las células en suspensión (figura II.3b), según la metodología de (Medina *et al.*, 1999).

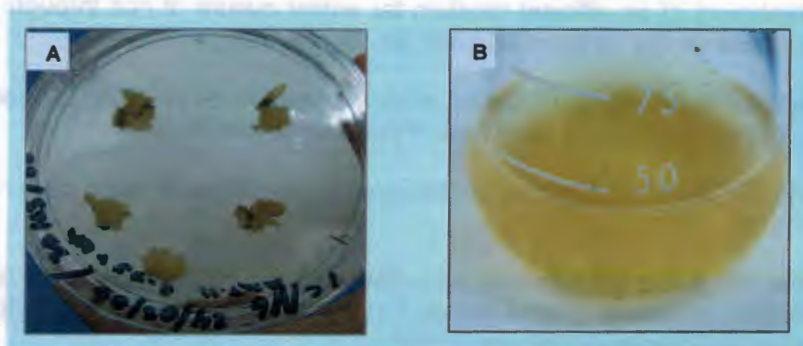


Figura II.3. A) Caja petri con callos de arroz, *in vitro* a partir de semillas después de 40 días de siembra, B), células en suspensión de arroz.

II.4 Discusión y Conclusión

Se estableció un sistema de germinación de semilla de *Oryza sativa* de forma hidropónica en medio Hoagland's en condiciones ambientales, lo que permitió obtener plantas de arroz después de 60 días de germinación de un tamaño aproximado de 30 cm. Así mismo, la producción de un sistema de cultivo *in vitro* modificando las condiciones de reguladores de crecimiento hasta la obtención de células en suspensión con MS líquido + 2-4 D 10 μM . Ambos sistemas son útiles y necesarios para obtener material vegetal de forma permanente y suficiente.

Aunque la metodología ya se ha propuesto por Medina *et al.*, 1999, se realizaron modificaciones a la metodología como cambio de concentración del regulador 2,4-D, para obtener un sistema reproducible. Además las suspensiones celulares constituyen una técnica muy valiosa para estudios fisiológicos y bioquímicos, ciclo celular, formación de metabolitos secundarios.

Estas dos formas *ex vitro* e *in vitro* de producción de material de arroz, ofrece una fuente constante de material vegetal para realizar trabajos de extracción de proteínas, ADN para los experimentos de western blot, amplificaciones de

secuencias de promotores, transcripción *in vitro* y/o cualquier otro metodología requerida.

II.5 Bibliografía

Abe, T. y Y. Futsuhara. 1985. Efficient plant regeneration from root callus tissue in rice. *J. Plant Physiol.* 121:111-118.

Ammirato, P. V. 1984. Induction, maintenance, and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. *Cell culture and somatic cell genetics of plants.* Academic Press, Orlando, E. U. 1:139-151.

Chu, C. C., Wang, C. C., Sung, C. S., Hsu, C., Yin, C. K. y Chu, C. H. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica.* 18: 239-244.

Everett, N. P., Wang, T. L., Gould, A. R. y Street, H. E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in culture plant cells. *Protoplasma.* 106:15-22.

Gourld, A. R. 1974. Studies on the growth in culture of plant cells. *J. Exp. Bot.* 25:772-983.

Medina, R., Faloci, M., Marassi, M. y Mroginski, L. 1999. Variabilidad Isoenzimática de Plantas de Arroz (*Oryza sativa* L.) Regeneradas *in vitro* a Partir de Callos. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.

Murashige, T. y Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nakano, H. y E. Maeda. 1979. Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L. *Z Pflanzenphysiol.* 93:449-458.

Nishi, A., Kato, K., Takahashi, M. y Yoshida, R. 1977. Partial synchronization of carrot cell culture by auxin deprivation. *Physiol. Plant.* 39:9-12.

CAPÍTULO III

Western blot en diferentes tejidos de *Oryza sativa* L.

III.1 Introducción

El ensayo de western blot permite la detección de proteínas previamente separadas por SDS-PAGE mediante un anticuerpo específico. Consiste en la transferencia de las proteínas a una membrana sintética, lo cual facilita la manipulación posterior y el acceso de los reactivos a la muestra, la detección de la proteína de interés con un anticuerpo específico y la detección de los complejos anticuerpo-proteína. A continuación se detalla el protocolo utilizado para la electroforesis de proteínas y para la transferencia y detección de las mismas (Zavala, 2005).

La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida es el método más común de separación de proteínas en función de su tamaño. Consiste en la desnaturalización de las proteínas de muestra con el detergente SDS, que confiere carga negativa al complejo y se separa en una matriz de poliacrilamida-bisacrilamida aplicando un campo eléctrico. Se utilizan dos tipos de gel para realizar el SDS-PAGE: un gel de empaquetamiento y uno de separación. El gel de empaquetamiento tiene menos porcentaje de acrilamida (3.3%) y por tanto tienen un poro mayor. Este gel cumple la función de alinear las proteínas de la muestra antes de ser separadas. El gel de separación tiene un porcentaje de acrilamida mayor (entre 7.5% y 12%, según el rango de resolución que se quiera obtener) y genera una malla con un poro más pequeño que permite la separación de las proteínas por su peso molecular. Para identificar los pesos moleculares de las proteínas a estudiar, se utilizó como referencia un patrón de proteínas conocidas, permitiendo observar la electroforesis o la transferencia a membranas (western blot) (Martín, 1999).

III.2 Materiales y Métodos

III.2.1 Extracción total de proteínas

La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología descrita por Arias *et al.*, 1993, para el caso de hoja, tallo y raíz. Procedimiento (anexo 2):

A 25 g de muestra, se lavaron con agua destilada y con buffer de homogenización, se incubó la muestra con el buffer de homogenización, con agitación por 30 min, se sonicó 10 veces por 1 min., con intervalos de 1 min, se centrifugó a 5000 x g por 5 min, al sobrenadante se le adicionó 0.9 M de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, en agitación por 30 min, se centrifugó por 110,000 x g por una hora, al sobrenadante se le adicionó $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 0.35 g / M en agitación por una hora, se centrifugó 110,000 x g por 30 min., el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió con el buffer de resuspensión, se dializó con el buffer de diálisis por una hora, se alicuotó y guardó a -80°C .

III.2.2 Detección de las proteínas por medio de western blot

Procedimiento (anexo 2):

Se desarrolló la electroforesis, en gel de poliacrilamida al 12%, a 100 Volts por 1 ½ h, la membrana Hybond+ se humedeció con metanol un minuto, el papel filtro y la esponja deben estar previamente humedecidos con el buffer de transferencia, se colocó la cámara de transferencia y se corrió a 90 Volts por dos h, se incubó la membrana con leche al 5% por una hora con agitación lenta, a 28°C, se agregó el anticuerpo primario 1-5000, se incubó toda la noche con agitación a 4°C, se realizaron tres lavados de 15 mL con TBS-T c/ lavado por 15 min, a 28°C, se agregó el anticuerpo secundario 1-5000, con agitación por dos horas a 28°C, se realizaron tres lavados de 15 mL con TBS-T c/ lavado por 15 min, a 28°C, el sistema de detección por quimioluminiscencia se realizó según las condiciones del Kit ECL Western Blotting de Amersham Biosciences.

III.3 Resultados

III.3.1 Extracción de proteínas de diferentes tejidos de arroz

Se realizó la extracción de proteínas de flor, hoja y tallo de arroz, los extractos proteínicos se corrieron en un gel de poliacrilamida con la proteína recombinante de NC2 (figura III.1).

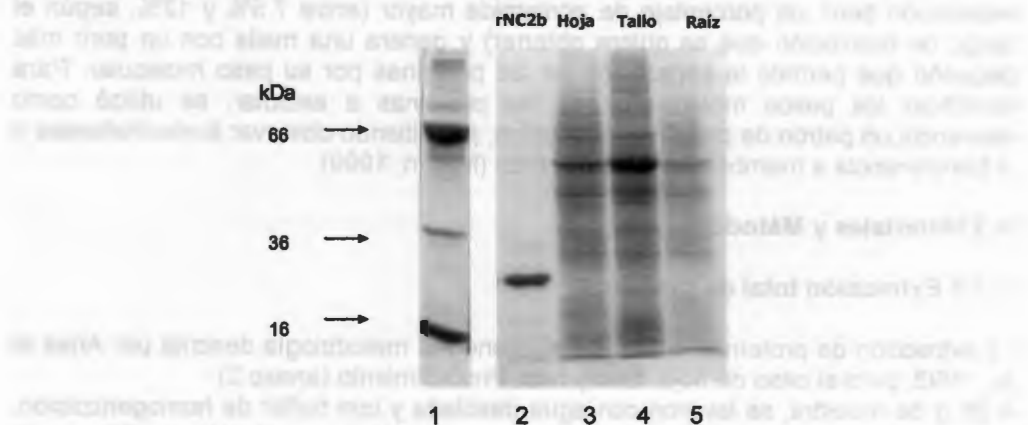


Figura III.1. Gel de poliacrilamida, teñido con azul de coomassie, en el primer carril marcador, carril 2 purificación de NC2 beta, carril 3 extracto proteico de hoja, carril 4 extracto proteico de tallo, carril 5 extracto proteico de raíz de arroz.

III.3.2 Detección de NC2 por western blot en los diferentes tejidos de arroz

Se realizó la técnica de western blot de tejidos de hoja, tallo y raíz, utilizando anticuerpos policlonales contra NC2, los anticuerpos utilizados en este experimento detectaron la presencia de NC2 en hoja y tallo, no así en raíz.

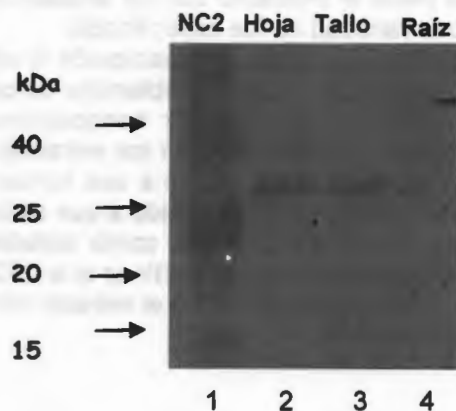


Figura III.2. Foto de una radiografía en el carril 1) proteína recombinante, carril 2) extracto de hoja, carril 3) extracto de tallo, 4) extracto de raíz.

III.3.3 Detección de TFIIB por western blot en los diferentes tejidos de arroz

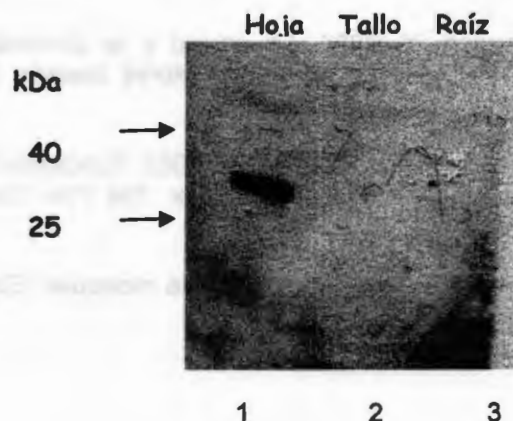


Figura III.3. Foto de una radiografía utilizando los extractos proteicos de hoja, tallo y raíz contra el anticuerpo de TFIIB, detectándose solamente en los extractos de hoja.

III.4 Discusión y Conclusión

Con los anticuerpos sintetizados a partir de la proteína purificada por medio de la expresión simultánea se observó la presencia de NC2 en extractos de hoja y tallo, de un tamaño aproximado de 35 kDa como se ha reportado por Song *et al*, en el 2002. Esto sirvió para corroborar que en la variedad Filipina que se estudia en este trabajo esta presente NC2 ya que hasta el momento solo ha existido un reporte de NC2 en plantas y es de arroz pero la variedad no fue especificada.

Una de las perspectivas de este trabajo es realizar la transcripción *in vitro*, para eso es necesario probar contra TFIIB los extractos proteicos obtenidos de cada tejido de arroz recolectado, utilizando los anticuerpos del factor transcripcional TFIIB se realizaron experimentos de western blot detectándose en los extractos de hoja, no así en los extractos de tallo y raíz probablemente debido a una concentración baja de proteína, se escogió el factor transcripcional TFIIB debido a que es indispensable para la formación del complejo de iniciación sirviendo como plataforma para el ensamblaje de los demás factores de la transcripción (Martínez *et al.*, 2004). Por eso al momento de realizar un ensayo de transcripción *in vitro* el extracto proteico que se utilizará será el proveniente de hoja de arroz.

III.5 Bibliografía

Arias, J. A., Dixon, R. A. y Lamb, C. 1993. Dissection of the functional Architecture of a Plant Defense Gene Promotor Using Homologous *in vitro* Transcription Initiation System. Plant Cell. 5:485-489.

Martin, Robin. 1999. Protein Síntesis Methods and Protocols. Methodos in Molecular Biology. Vol. 77.

Martínez, M., Solís, G. y Carreón, Y. 2004. La unidad y la diversidad de los complejos de la iniciación de la transcripción en promotores basales del tipo II. Facultad de Biología. REB 23(4):157-163.

Song, W., Solimeo, H., Rupert, R., Yadav, N. y Zhu, Q. 2002. Functional Dissection of a Rice Dr1/DrAp1 Transcriptional Repression Complex. The Plan Cell. 14:181-195.

Zavala, C. J. 2005. Manual de técnicas básicas de biología molecular. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.

CAPÍTULO IV

Clonación y caracterización de los promotores TATA y TATA less

IV.1 Introducción

Los promotores necesitan especificar las condiciones bajo las cuales un gen podría ser inducido tanto como la cantidad del ARN transcrito del gen. La inducción es mediada por elementos regulatorios, lo cual típicamente actúan en unión con elementos basales cerca del inicio de la transcripción. Las proteínas que se unen a estos dos grupos de elementos frecuentemente cooperan para facilitar la producción funcional del complejo de preiniciación (Svejstrup, 2004).

Poco es conocido acerca de la regulación de genes inducidos a bajas temperaturas, se ha aislado genes inducibles a bajas temperaturas, nombrados como lip 5, lip9 y lip 19, éste último codifica para una proteína como un motivo de dominio básico y un cierre de leucina (mejor conocido como bZIP), de células en suspensión de arroz (Aguan *et al.*, 1993; Shimizu *et al.*, 2005) Este trabajo se ha enfocado al promotor del gen lip 19 que es un promotor que contiene la caja TATA. El arroz es ampliamente cultivado en un gran número de diferentes ambientes naturales. Comparado con otros cereales como trigo y cebada, el arroz es mucho más sensible a las bajas temperaturas como resultado de su origen tropical.

Las fosfolipasas son enzimas capaces de degradar los fosfolípidos, estas enzimas están involucradas en un amplio grupo de funciones, en la regulación celular, metabolismo de lípidos y remodelamiento de membrana (Wang, 2001). La fosfolipasa D (PLD) hidroliza los enlaces terminales del fosfodiéster en varios diéster glicerofosfolípidos. La PLD se encuentra en plantas, microorganismos y tejidos de mamíferos (Ueki *et al.*, 1995).

La PCR es una técnica que se caracteriza por su versatilidad. Una de sus utilidades puede ser la de introducir mutaciones puntuales, dirigidas o azarosas en el ADN. Una variante conocida como PCR solapante permite hacer mutagénesis dirigida en bases del ADN (Cantor y Smith, 1999).

IV.2 Materiales y Métodos

IV.2.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó con la metodología reportada Lin *et al.*, 2001. (anexo 2)

Se congelaron con N₂ líquido 25 mg de hoja, se adicionó 600 µl del buffer de extracción y se mezcló vigorosamente, se incubó la mezcla a 65° C por 15 min, se centrifugó a 12 000 x g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, se le

adicionaron 2 U de ARN asa e incubó a 37 °C 10 min, se adicionó un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico, se centrifugó 12 000 x g por 3 min, se transfirió la fase superior, se repitió la extracción de fenol:cloroformo: isoamílico, se precipitó el ADN por adición de 0.6 volúmenes de isopropanol frío y se incubó a -20 °C por 10 min, se centrifugó a 12 000 x g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla de ADN con 1 mL de etanol frío (2 veces), se secó y resuspendió en 50 µl de agua destilada.

IV.2.2 Diseño de los oligonucleótidos para amplificar los promotores TATA Y TATA less

Tomando como referencia una base de datos (Genomatix) se escogieron secuencias de promotores TATA y TATA less de *Oryza*, encontrándose un promotor TATA que es de un gen para la lip 19 y en el caso del promotor TATA less es de un gen para la fosfolipasa D. A partir de estas secuencias se escogió una serie de 19 nucleótidos del extremo 5' y una serie de 19 nucleótidos del extremo 3' para ambas secuencias de los promotores (cuadro IV.1).

Cuadro IV.1 Relación de los oligonucleótidos para la amplificación de las secuencias de los promotores TATA y TATA less.

Nombre	Secuencia(5'-3')	Utilidad
Tata F	5'-GGGTAGTACAAAAATACCA-3'	Promotor TATA
Tata R	5'GGGACTCCGGGGGCTCTAA-3'	Promotor TATA
Tata-less F	5'-GGCGCTGGCTCCGCGAGGCC- 3'	Promotor TATA less
Tata-less R	5'-AGCAGATTGGATCGAGCGAGA-3'	Promotor TATA less

IV.2.3 Diseño de los oligonucleótidos para las variaciones del promotorTATA

Se escogieron tres series de bases nucleotídicas internas del promotor TATA para realizar tres tipos de variaciones, en donde cada oligonucleótido amplificará la secuencia del promotor para el caso de TATA 1: secuencia en la que se elimina la región para la unión de bZIP, TATA 2: secuencia en la que se elimina la región de unión de bZIP y GCN4 y TATA 3: secuencia en donde se elimina la región de bZIP, GCN4 y GA (unión para ácido giberélico) (cuadro IV. 2 y figura IV.1).

Cuadro IV.2 Relación de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de las secuencias de las variaciones del promotor TATA.

Nombre	Secuencia(5'-3')	Utilidad
Tata 1	5'-ATAATACACATTGACAGA-3'	Variación del promotor TATA
Tata 2	5'-GCCGTCCAGTCCAACCTC-3'	Variación del promotor TATA
Tata 3	5'-AAAATGCCCTCCTCCCCA-3'	Variación del promotor TATA

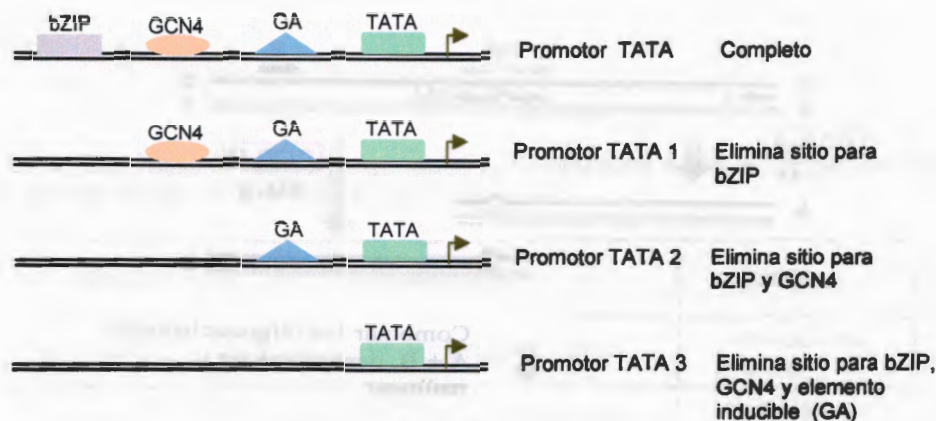


Figura IV.I Esquema de las variaciones realizadas al promotor TATA

IV.2.4 Diseño de los oligonucleótidos para la mutación del promotor TATA

Para la mutación de la secuencia del elemento TATA, perteneciente al promotor TATA se diseñaron un par de oligonucleótidos, en donde cada oligonucleótido tiene la secuencia de TATA eliminada. Con cada oligonucleótido se realizó una reacción de PCR diferente, (PCR A y PCR B), cada secuencia amplificada se utilizó como templado para realizar una tercera reacción de PCR (PCR C), utilizando los oligonucleótidos del promotor completo (cuadro IV.1), la secuencia amplificada contiene la mutación insertada (Sambrook y Russell, 2001) (cuadro IV.III y figura IV.2).

Cuadro IV.3 Relación de los oligonucleótidos para la amplificación de las secuencias de la mutación de TATA

Nombre	Secuencia(5'-3')	Utilidad
Mut tata F	5'-CCCCAGACTCAAGTACACCC-3'	Mutación del promotor TATA
Mut tata R	5'-GGGTGTACTTGAGTCTGGGG-3'	Mutación del promotor TATA

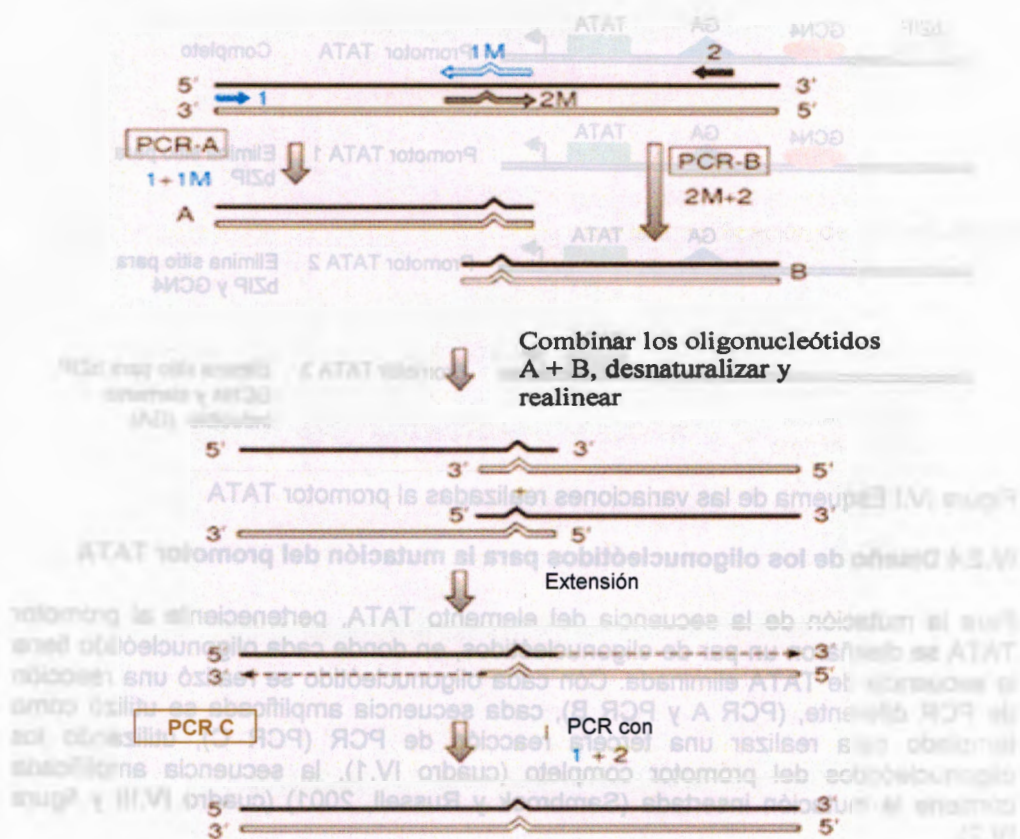


Figura IV.2 Esquema de una mutación dirigida.

IV.2.5 Protocolo para la amplificación de las regiones promotoras y sus variantes

La mezcla de reacción de PCR contenía: ADN 10 ng, oligonucleótidos 10 pmol, buffer de PCR 10x, NTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 2 mM, Taq polimerasa 0.25 U.

Se utilizó el termociclador (Perkin-Elmer 9700) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial: 95° C, 1', desnaturalización: 95° C, 1', hibridación: 52° C, 1', extensión: 72° C, 1', 3. extensión final: 72° C, 10'. 35 ciclos.

IV.2.6 Ligación en el vector pGem-Teasy y transformación en bacterias JM109

Los productos de PCR se ligaron en el vector pGem-Teasy (Promega), la mezcla de ligación fue la siguiente: buffer 2x-5 μ l, vector pGem-1 μ l, ligasa T4 DNA-1 μ l, producto de PCR-3 μ l.

La transformación en bacterias JM109 se realizó incubando la mezcla de ligación por 5 min a 25 °C, se colocaron los tubos en hielo, se mezclaron 2 μ l de la reacción de ligación y las células de *E. coli* en hielo, se incubó en hielo por 30 min, se incubaron las células por 90 s a 42 °C, se adicionó 200 μ l de medio LB, se incubó con agitación a 37° C por 1 h, se plaquearon las células en una caja petri que contenía medio LB y ampicilina 50 mg/mL, se incubaron las cajas a 37 °C por 12 h. Posteriormente se seleccionaron algunas colonias y se cultivaron en medio líquido para la obtención de los plásmidos.

IV.2.7 Obtención de ADN plasmídico por lisis alcalina

La obtención de ADN plasmídico por lisis alcalina, se realizó según la metodología de Sambrook y Russell, 2001.

IV.2.8 Digestión con la enzima Eco RI

Para verificar la presencia del inserto en las clonas de pGem-Teasy, se digirió el ADN plasmídico obtenido por lisis alcalina con la enzima Eco RI.

El procedimiento fue el siguiente: se mezcló 10 ng de ADN, amortiguador 1x, 10 U de enzima Eco RI en un volumen total de 20 μ l y se incubó por 3 horas a 37 °C.

IV.3 Resultados

IV.3.1 Amplificación de los promotores TATA y TATA less

Se amplificaron las regiones correspondientes a los promotores mediante la técnica de PCR, el tamaño esperado fue de aproximadamente 300 pb (figura IV.3).

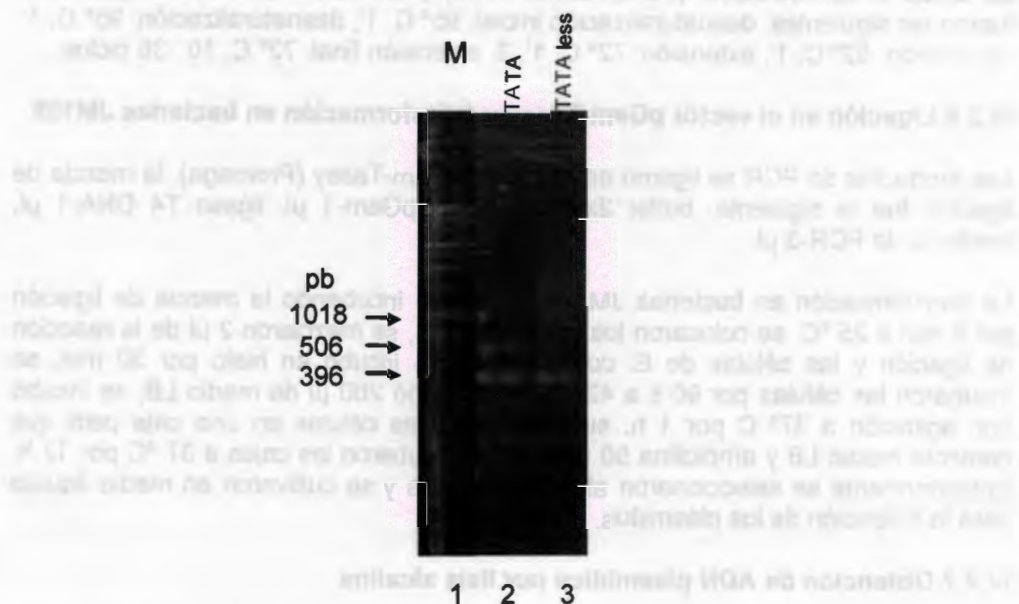


Figura IV.3 Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en luz ultravioleta. Amplificación de las secuencias de TATA y TATA less a partir de ADN genómico de arroz. El carril 1) Marcador, carril 2) amplificación de la secuencia del promotor TATA, con un tamaño aproximado de 300 pb y carril 3), amplificación de la secuencia del promotor TATA less, tamaño aprox. de 300 pb.

Las secuencias amplificadas del promotor TATA y TATA less se purificaron (Kit kiagen) y ligaron en el vector pGem-Teasy, después se introdujeron en bacterias de JM109. Se seleccionaron algunas clonas y se les extrajo el ADN plasmídico, los cuales se digirieron con la enzima Eco RI.

IV.3.1.1 Obtención de ADN plasmídico y digestión con la enzima Eco RI, de la secuencia del promotor TATA y TATA less

Se obtuvo ADN por el método de lisis alcalina y se digirió con la enzima de restricción Eco RI, para verificar si la secuencia se había ligado al vector pGem-Teasy (figura IV.4).

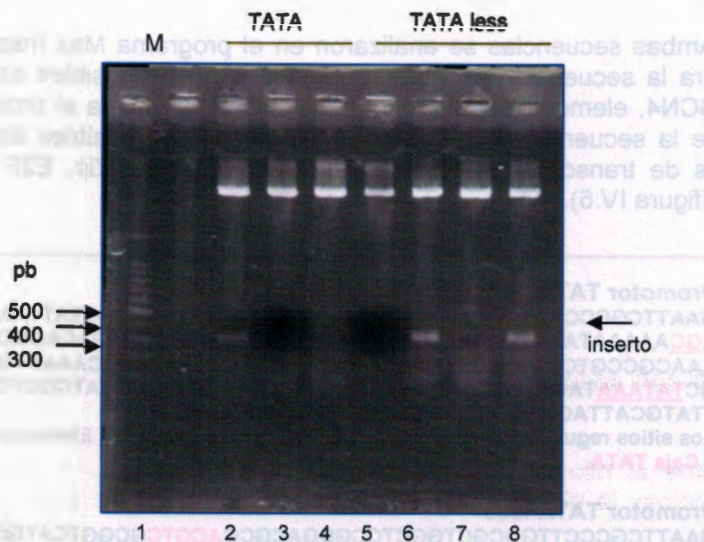


Figura IV.4 ADN plasmídico digerido con Eco RI. En el carril 1, Marcador de peso molecular, carril 2-8 clonas seleccionadas para la digestión con la enzima Eco RI, carril 2, clona que libero un inserto de aprox. 300 pb correspondiente a la secuencia del promotor TATA y carril 6 y 8, clonas que liberaron un fragmento de aprox. 300pb, correspondiente a la secuencia del promotor TATA less.

IV.3.1.2 Secuencias de los promotores TATA y TATA less

La secuencia del Promotor TATA es la siguiente:

```
GAATTCGCCCTTGGCGCTGGCTCCGCGACGCGACGTCGCGGTCATGGAGTAA
CCGCGACGGACAGATACTTCTACCCGTTTTTAACCTCGCCTCCTCCTCCTCCG
GCTCGAGATCCGTGGCCACGACGCGTGGTGGGAAACCGGGAACGACGTGAC
GCACGCACACAGGGCAAGTTTTCAGTAGAAAAATCGCCGGCATCCAGATCGGGA
CAGTCTCTCTTCTCCCGCAATTTTATAATCTCGCTCGATCCAATCTGCTAAGGGC
GAATTC a/gGa/tCGTG
```

La secuencia del promotor TATA less es la siguiente:
 GAATTCGCCCTTGGGTAGTACAAAAATACCAACTTTCCTGGGTATTAAAACAAAA
 GAAAAGCAAAAATAATACACATTGACAGATGAGTTAACGCCCCGTGACAGGCTGG
 CACACGGAAACGCCGTCCAGTCCAACCTCCCATTTTCTCCAAATCCCCAAAA
 TGCCCTCCTCCCCAGCTATAATACACCCTCCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCC
 CATCCGTCTAATTGCGCCCCTTATGCATTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGGGCG
 AATTC

Ambas secuencias se analizaron en el programa Max Inspector y se obtuvo que para la secuencia del promotor TATA, contiene posibles sitios de unión para bZip, GCN4, elemento regulatorio (inducible GA) y la caja el promotor TATA. En el caso de la secuencia del promotor TATA less tiene posibles sitios para unión de factores de transcripción identificados como: ABRE, bZip, E2F clase I y la caja CAAT (figura IV.5).

Promotor TATA
 GAATTCGCCCTTGGGTAGTACAAAAATACCAACTTTCCTGGGTATTAAAACAAAAAGAA
 AGCAAAAATAATACACATTGACAGATGAGTTAACGCCCCGTGACAGGCTGGCACACGGA
 AACGCCGTCCAGTCCAACCTCCCATTCTCCAAATCCCCAAAATGCCCTCCTCCCCA
 GCTATAATACACCCTCCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCCATCCGTCTAATTGCGCCCC
 TTATGCATTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGGGCGAATTC
 Los sitios regulatorios son: Sitio para bZIP, Sitio para GCN4, Elemento regulatorio (GA) y Caja TATA.

Promotor TATA less
 GAATTCGCCCTTGGCGCTGGCTCCGCGACGCGACGTCGCGGTCATGGAGTAACGCGA
 CGGACAGATACTTCTACCCGTTTTTAACCTCGCCTCCTCCTCCTCCCGGCTCGAGATCCG
 TGGCCACGACGCGTGGTGGGAAACCGGGAACGACGTGCACGCACGCACACAGGGCAA
 GTTCAGTAGAAAAATCGCCGGCATCCAGATCGGGACAGTCTCTTCTCCTCCCGCAATTTT
 ATAATCTCGCTCGATCCAATCTGCTAAGGGCGAATTC a/gGa/tCGTG
 Los sitios regulatorios son: Sitio para ABRE, Sitio para bZIP, Sitio E2F clase I y Caja CAAT.

Figura IV.5. Regiones regulatorias de los promotores TATA y TATA less, secuencias de sitios de unión para posibles factores transcripcionales encontradas en las secuencias de los promotores TATA y TATA less.

IV.3.2 Amplificación de las variaciones del promotor TATA

Se amplificaron las secuencias de las variaciones del promotor TATA, los productos amplificados se purificaron y se clonaron en pGem-Teasy, dicho vector se introdujo en bacterias competentes (figura IV.6).

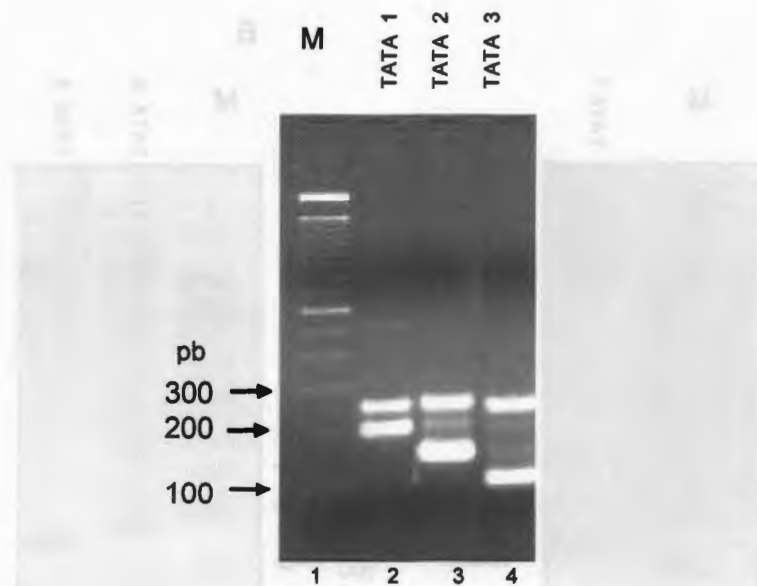


Figura IV.6 Amplificación de las secuencias de las variantes del promotor TATA, carril 1) Marcador, carril 2) variante TATA 1 con un tamaño aproximado de 204 pb, carril 3) variante TATA 2 con un tamaño aprox. de 149 pb y carril 4) variante TATA 3, con un tamaño aprox. de 111 pb.

Las secuencias amplificadas de las variantes del promotor TATA se purificaron (Kit kiagen) y ligaron en el vector pGem-Teasy, después se introdujeron en bacterias de JM109. Se seleccionaron algunas clonas y se les extrajo el ADN plasmídico, los cuales se digirieron con la enzima Eco RI.

IV.3.2.1 Obtención de ADN plasmídico y digestión con la enzima Eco RI, de las variantes del promotor TATA

Se obtuvo ADN por el método de lisis alcalina y se digirió con la enzima de restricción Eco RI, para verificar si la secuencia se había ligado al vector pGem-Teasy (figura IV.7).

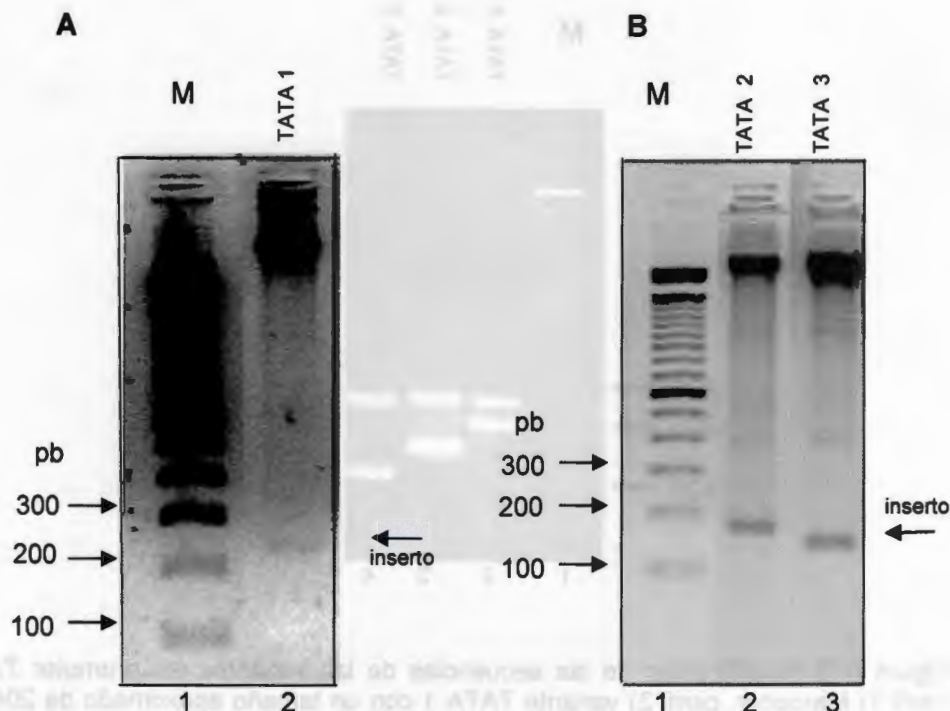


Figura IV.7 Digestión con Eco RI de las clonas seleccionadas de las variantes de TATA. A) carril 1) Marcador, carril 2) variante TATA 1 con un inserto de aprox. 204 pb, B) carril 1) Marcador, carril 2) variante TATA 2 con inserto de aprox. 149 pb, carril 3) variante TATA 3 con un inserto de aprox. de 111 pb.

IV.3.2.2 Secuencias de las variaciones del promotor TATA

La secuencia de la variante TATA 1 es la siguiente:

ATAATACACATTGACAGATGAGTTAACGCCCCGTGACAGGCTGGCACACGGA
CGCCGTCCAGTCCAACCTCCCATTTTTCTCCAAATCCCCAAAATGCCCTCCTCC
CCAGCTATAAATACACCCTCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCCCATCCGTCTAAT
TGCGCCCCTTATGCATTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGGGCGAATTC

La secuencia de la variante TATA 2 es la siguiente:

GCCGTCCAGTCCAACCTCCCATTTTTCTCCAAATCCCCAAAATGCCCTCCTCC
CAGCTATAAATACACCCTCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCCCATCCGTCTAAT
GCGCCCCTTATGCATTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGGGCGAATTC

La secuencia de la variante TATA 3 es la siguiente:

AAAATGCCCTCCTCCCCAGCTATAAATACACCCTCCCAGAGCCCTTCTAAACCT
TCCCCATCCGTCTAATTGCGCCCCTTATGCATTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGG
GCGAATTC

Las secuencias de las variantes del promotor TATA, con los elementos regulatorios se observan en la siguiente figura.

Variante TATA 1

ATAATACACATTGACAGATGAGTTAACGCCCCGTGACAGGCTGGCACACGGAAAAACGCC
GTCCAGTCCAACCTCCCATTCTCTCAAATCCCCAAAATGCCCTCCTCCCCAGCTATAA
ATACACCCTCCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCCCATCCGTCTAATTGCGCCCCTTATGCA
TTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGGGCGAATTC

Los sitios regulatorios son: Sitio para GCN4, Elemento regulatorio (GA) y Caja TATA.

Variante TATA 2

GCCGTCCAGTCCAACCTCCCATTCTCTCAAATCCCCAAAATGCCCTCCTCCCCAGCTA
TAAATACACCCTCCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCCCATCCGTCTAATTGCGCCCCTTAT
GCATTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGGGCGAATTC

Los sitios regulatorios son: Elemento regulatorio (GA) y Caja TATA.

Variante TATA 3

AAAATGCCCTCCTCCCCAGCTATAAATACACCCTCCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCCC
ATCCGTCTAATTGCGCCCCTTATGCATTAGGSCCCCSGRRKTCCCAAGGGCGAATTC

Los sitios regulatorios son: Caja TATA.

Figura IV.8. Regiones regulatorias de las variantes del promotores TATA.

IV.3.3 Amplificación de la mutación del elemento TATA del promotor TATA

Se amplificaron las secuencias de la mutación de la secuencia TATA del promotor TATA, los productos amplificados corresponden a la PCR A donde el tamaño es de aprox. 192 pb, la PCR B es de 98 pb aprox. Ambas amplificaciones sirvieron para realizar una tercera PCR (PCR C) de aprox. un tamaño de 300 pb (figura IV.9).

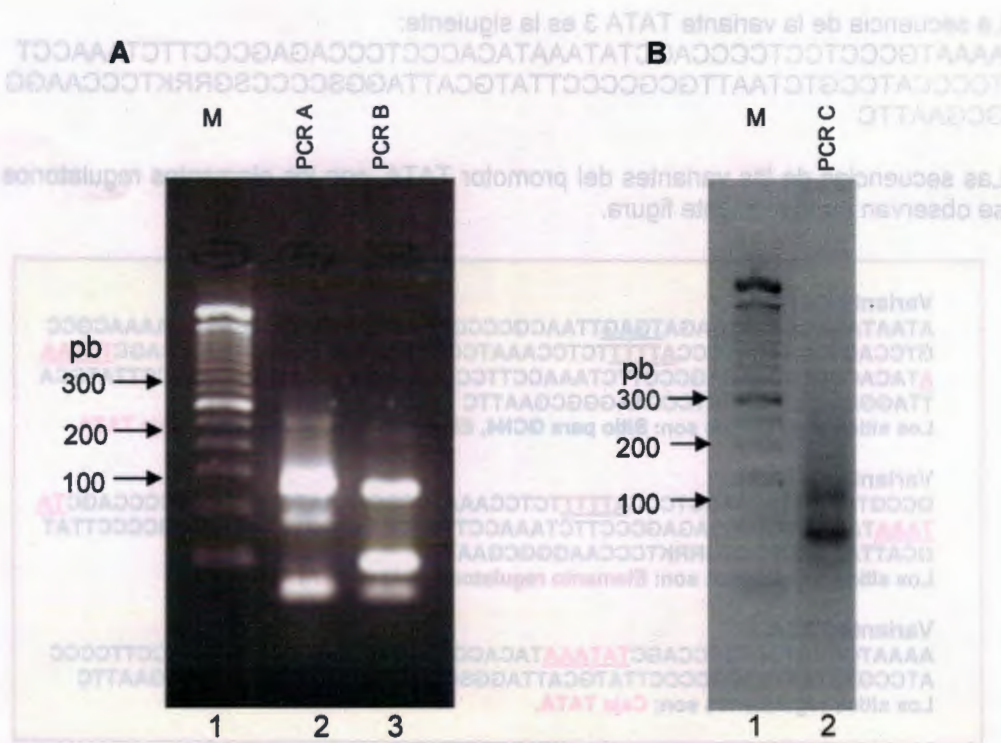


Figura IV.9 A) Amplificación de las partes del promotor TATA con los oligonucleótidos que contienen la mutación para el elemento TATA. Carril 1) Marcador, carril 2) amplificación de una parte de la secuencia del promotor TATA de un tamaño aprox. de 192 pb (PCR A) y carril 3) la amplificación de la parte complementaria del promotor TATA (PCR B) con un tamaño aprox. de 98 pb. B) Amplificación del promotor TATA, utilizando las secuencias mutadas como templado. Carril 1) Marcador y carril 2) amplificación del promotor completo (PCR C) de un tamaño aprox. de 300 pb.

El ADN obtenido de la PCR C de 300 pb aproximadamente se purificó (Kit kiagen) y se ligó en el vector pGem-Teasy, después se transformo en bacterias de JM109. De las clonas seleccionadas se extrajo el ADN plasmídico y se digirieron con la enzima Eco RI.

IV.3.3.1 Obtención de ADN plasmídico y digestión con la enzima Eco RI, de la mutación del elemento TATA

Se obtuvo ADN por el método de lisis alcalina y se digirió con la enzima de restricción Eco RI, para verificar si la secuencia se había ligado al vector pGem-Teasy (figura IV.10).

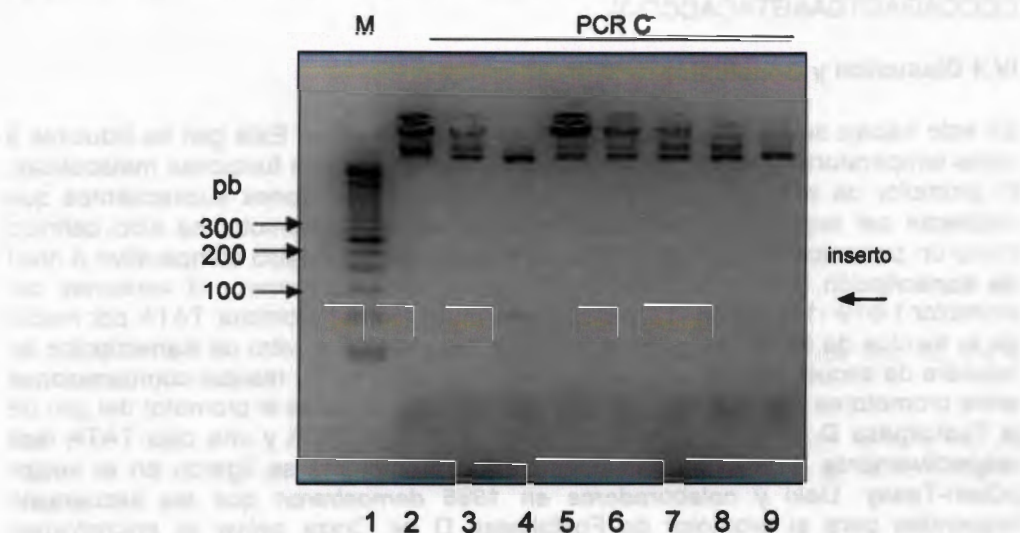


Figura IV.10 Digestión del ADN plasmídico con Eco RI. Carril 1) Marcador y carril 2-9) clonas seleccionadas y digeridas con Eco RI y carril 4) clona con el inserto de aprox. 300 pb.

IV.3.3.2 Secuencia de la mutación del elemento TATA del promotor TATA

La secuencia completa del promotor TATA con la caja TATA subrayada es la siguiente:

```
GAATTCGCCCTTGGGTAGTACAAAAATACCAACTTTCCTGGGTATTAACAAAA
GAAAAGCAAAAATAATACACATTGACAGATGAGTTAACGCCCGTGACAGGCTGG
CACACGGAAACGCCGTCCAGTCCAACCTCCCATTTTTCTCCAAATCCCCAAA
TGCCCTCCTCCCCAGCTATAAAATACACCTCCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCC
CATCCGTCTAATTGCGCCCTTATGCATTAGGSCCCCSGRRKTCCAAGGGCG
AATTC
```

La secuencia del promotor TATA con el elemento TATA mutado subrayado es la siguiente:

GGGTAGTACAAAAATACCAACTTTCTGGGTATTAACAAAAGAAAAGCAAAAT
AATACACATTGACAGATGAGTTAACGCCCGTGACAGGCTGGCACACGAAAACG
CCGTCCAGTCCAACCTCCCATTTTTCTCCAAATCCCCAAAATGCCTCCCCAGAC
TCAAGTACACCCCAGAGCCCTTCTAAACCTTCCCCATCCGTCTAATTGCGCCCC
TTATGCATTAGAGCCCCCGGAGTCCC

El oligonucleótido utilizado para llevar a cabo la mutación del elemento TATA fue 5'-CCCCAGACTCAAGTACACCC-3'.

IV.4 Discusión y Conclusión

En este trabajo se clonó el promotor del gen Lip19 de arroz. Este gen es inducible a bajas temperaturas, se localiza en el núcleo y tiene diversas funciones metabólicas. El promotor de este gen será de utilidad para controlar genes subsecuentes que requieran ser expresados en condiciones de frío. Este promotor ha sido definido como un promotor TATA y es de utilidad para el estudio básico comparativo a nivel de transcripción. Mediante amplificación por PCR se generaron 3 versiones del promotor Lip19 -147 hasta -17, así como la mutación del promotor TATA por medio de la técnica de PCR solapante. Para tener un sistema *in vitro* de transcripción se requiere de secuencias de promotores definidas. Para poder realizar comparaciones entre promotores TATA y TATA less se clonó adicionalmente el promotor del gen de la Fosfolipasa D. Los promotores contienen una caja TATA y una caja TATA less respectivamente. Todas las versiones de los promotores se ligaron en el vector pGem-Teasy. Ueki y colaboradores en 1995 demostraron que las secuencias requeridas para el promotor de Fosfolipasa D de *Oryza sativa* se encontraban contenidas en una región carente de caja TATA. A la fecha este ha sido uno de los pocos estudios realizados para definir claramente que se trata de un promotor TATA less. Es de particular interés el estudio comparativo de estos promotores debido a que el mecanismo de acción de reconocimiento de TFIID al promotor depende de las 40 pb anteriores al sitio de inicio de la transcripción es diferente entre promotores TATA y TATA less. Esto se debe a que TBP no es el polipéptido requerido en los promotores TATA less, sin embargo NC2 que interactúa con TBP ha sido encontrado en promotores TATA less en células animales. En particular el caso de *Drosophila* es de gran importancia ya que NC2 es requerido para llevar a cabo el proceso de transcripción en promotores TATA less, mientras que en promotores TATA funciona como un represor transcripcional. Se desconoce a la fecha que papel puede jugar NC2 en promotores TATA less de plantas. Por lo que la obtención de estos promotores será de gran utilidad en el futuro para realizar experimentos *in vitro* que permitan esclarecer el funcionamiento de estos complejos y entender mejor como se regula el proceso de transcripción.

IV.5 Referencias

Aguan K, Sugamara K, Suzuki N y Kusano T. 1993. Low-temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucine-zipper motif. *Mol Gen Genet.* 240:1-8.

Cantor C y Smith C. 1999. Genomics. Center for Advanced Biotechnology Boston University.

Genomatix. <http://www.genomatix.de/products/index.html>.

Lin R. C., Ding, Z. L. Li, L. B., and Kuang, T. Y. 2001. A rapid and efficient DNA miniprep suitable for screening transgenic plants. *Plant Molecular Biology Report.* 19:379a-379e.

Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning (A Laboratory Manual). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA 3, Third Edition.

Shimizu H, Sato K, Berberich T, Miyazaki A, Ozaki R, Imai R y Kusano T. 2005. LIP19, a Basic Region Leucine Zipper Protein, is a Fos-like Molecular Switch in the Cold Signaling of Rice Plants. *Plant Cell Physiol.* 46(10):1623-1634.

Svejstrup, J. Q. 2004. The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochimica et Biophysica.* 1677:64-73.

Ueki J, Morioka S, Komari T y Kumashiro T. 1995. Purification and Characterization of Phospholipase D (PLD) from Rice (*Oryza sativa* L.) and Cloning of cDNA for PLD from Rice and Maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol.* 36(5):903-914.

Wuang Xeuming. Plant Phospholipases. 2001. *Plant Mol. Biol.* 2001. 52:211-31.

- Wang Xiuming. Plant Phospholipases. 2001. *Plant Mol. Biol.* 2001: 523-11-31
- Lee J, Morita S, Komet T, Kumashiro T. 1995. Purification and Characterization of Phospholipase D (PLD) from Rice (*Oryza sativa* L.) and Cloning of cDNA for PLD from Rice and Maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol.* 36(5):903-914
- Stefanopoulou J. Q. 2004. The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1677:64-73.
- Brinkman H, Bala K, Berberich T, Miyazaki A, Ozaki R, Imai R, Kusano T. 2003. LIP19, a Basic Region Leucine Zipper Protein, is a Fos-like Molecular Switch in the Cold Signaling of Rice Plants. *Plant Cell Physiol.* 44(10):1823-1834
- Samuelson L, Russell D. W. 2001. Molecular cloning (A Laboratory Manual). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA 3, Third Edition.
- Liu R, C. Ding, Z. L. Li, B. and Kung, T. Y. 2001. A rapid and efficient DNA transformation suitable for screening transgenic plants. *Plant Molecular Biology Report* 19:279-286
- Genomatix (<http://www.genomatix.de/products/index.html>)
- Canfor C & Smith C. 1999. Genomics. Center for Advanced Biotechnology Boston University.
- Algarin R, Sugumara K, Suzuki H, Kusano T. 1993. Low-temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucine zipper motif. *Mol Gen Evol* 10:1-8

CAPÍTULO V

Direct interaction between NC2 and a subunit of the SRBs/Mediator co-activator

Juan Gualberto Colli¹, Diana Guillén¹, Luis Carlos Rodríguez², Nadine Mobious¹,
Enrique Castaño^{1*}

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación
Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200,
Mérida, Yucatán, México

2 Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43
No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México

*Please Send Correspondence to:

e-mail:enriquec@cicy.mx

Publicado en la revista Asian J Biochemistry 1 (1): 75-83, 2006.

V.1 Abstract

Transcriptional regulation depends on the appropriate set of positive and negative regulating signals in order to provide the correct gene expression. Studies in eukaryotic gene expression over the last few years have shown that SRBs/Mediator complex is involved in the proper activation of a variety of genes, while NC2 has been shown to be a general repressor of transcription. NC2 is a conserved transcriptional regulator that was originally identified as inhibitor of basal transcription. Here our initial results show that the repressor NC2 can interact directly with the Mediator in HeLa cells, this interaction provides a new set of interactions between positive and negative cofactors. Furthermore NC2 depletion from HeLa nuclear extract decrease activated transcription from the HIV-LTR1 promoter in vitro but addition of a complex NC2 fraction restores activated transcription. Further dissection showed that NC2 interacts directly with MED21 a subunit of the Mediator complex. The results shown may provide clues to the controversial role that NC2 has on active promoters.

Key words: Co-activator, repressor, Mediator, MED21, gene regulation

Key words: Co-activator, repressor, mediator, MED21, gene regulation

V.2 Introduction

Transcriptional activation and repression of class II genes has been the subject of intense study since the last three decades. During the early 90's, a repressing activity was found in HeLa nuclear extract that could selectively reduce basal transcription but did not affect the activated transcription. Consequently, this activity was named Negative Cofactor 2 (NC2) (Kim TK *et al.*, 1995). Soon after, protein Dr1 was found to be a general transcription repressor, particularly when it is associated to its partner DRAP1. In addition, NC2 was cloned and found to be the same as Dr1/Drap1 (Goppelt A *et al.*, 1996). The recombinant proteins have been found to repress transcription *in vitro* by interacting with TBP thereby preventing TFIIB from forming a DNA-TBP-TFIIB complex. The result is the inhibition of the preinitiation complex formation while maintaining a DNA-TBP-NC2 complex (Goppelt A *et al.*, 1996). TFIIA competes with NC2 for TBP and allows TFIIB to bind, which promotes binding from the rest of general transcription factors and RNA Pol II to the promoter and for transcription initiation to occur. In the early 90's several positive transcriptional activities were found, one particularly known as the Positive Cofactor 2 (Kretzschmar M *et al.*, 1994). As it is known to stimulate GAL4-AH in an *in vitro* transcription assay, several studies have shown that the polypeptides involved in this activity belong to what has now been called the Mediator complex, depending on the conditions in which it has been purified. It has yielded different complexes such as TRAPS, CRSP, ARC, DRIP, Mediator, etc. For reviews, see several published articles (Kretzschmar M *et al.*, 1995, Ito M *et al.*, 2001, Naar AM *et al.*, 2001, Bikle DD *et al.*, 2003, Bjorklund S and Gustafsson CM., 2004). It is still not known if there are many complexes that share the same subunits or that only one function as a general cofactor for different activators with small differences, depending on the purification protocol involved to obtain them. It is accepted that these sets of polypeptides interact with the basal transcription machinery and the activators, providing the link between them and therefore a higher control and yield of transcription.

In yeast, activators have been shown to bind directly to the Srb-Mediator complex (Davis JA *et al.*, 2002), and genetic and biochemical studies have identified the Srb4 as a target of the well-studied acidic activator Gal4 (Kamada K *et al.*, 2001). Temperature-sensitive mutations Srb4 subunit can produce a rapid, general shutdown of mRNA synthesis, demonstrating that Srb4 is required for expression of most protein-encoding genes (Christova R and Oelgeschlager T, 2002). Because essentially all of the Srb proteins are tightly associated with the holoenzyme in yeast cells, the Srb-containing holoenzyme likely functions in transcription initiation at most class II promoters *in vivo*. The mutant genes that compensated for the absence of SUC2 activator function included genes called BUR genes (Bypass UAS Requirement). The *bur6* mutant allele was found to be identical to *NCB1* (NC2a) indicates that a loss in NC2 function can compensate for the loss of an activator. These results point out to a delicate balance between positive and negative regulators of transcription which operate through the Ydr1-Bur6 (yeast NC2) repressor complex (Davis JA *et al.*, 2002).

Over the years the simple model of repression via NC2 has been challenged, as new data have suggested that NC2 may be found in active promoters. Such has been the case in HeLa cells where it has been found in active promoters (Kim TK *et al.*, 1995) in yeast cell analysis in genetic and biochemical studies (Creton S *et al.*, 2002, Denko N *et al.*, 2003). In *Drosophila*'s TATA less promoters was shown to be required as a general transcription factor [Willy PJ *et al.*, 2000]. We previously found NC2 to interact directly or indirectly with RNA pol IIO (Castaño E *et al.*, 2000).

Recent work has shown DR1 disassociated from DRAP1, depending on the conditions of cell growth and tissue (Ikeda K *et al.*, 1998, Irtatni R *et al.*, 2002). Either could be due to different binding partners yet to be found, currently is known the interaction with AREB6 (Ikeda K *et al.*, 1998) and FoxH1 (Irtatni R *et al.*, 2002). Until now, it has not been shown a clear physical connection between NC2 and the positive cofactors. These previous studies provide a correlation between the presences of both NC2 subunits and other proteins, but do not address the role of NC2 during activation. The question as to how does NC2 stimulates transcription remains unknown.

In this article we have report a direct interaction between NC2 and MED21 (previously known as hSRB7). The interaction was verified by NC2 co-depletions in nuclear extract as well as with pure recombinant proteins. Furthermore we found that upon removal of NC2 from HeLa nuclear extract the level of activated transcription in a cell free system is significantly reduced but addition of chromatographic fractions containing NC2 and the Mediator can restore transcriptional activation. This information together with the novel interaction between NC2 and MED21 suggest a balance of positive and negative transcriptional responses.

V.3 Materials and Methods

Vectors. The vector pNC2 α -6HIS and pNC2 β -6HIS have previously been described (Kim *et al.*, 1995). The vector pNC2 α -M2 was carried out by subcloning NC2 α with NdeI and Bam HI into pET11d-flag. The final co-expressing vector was carried out by subcloning NC2 α -M2 with Bgl II and Hind III in to pNC2 β -6HIS, in order to generate pNC2 β -6HIS/NC2 α -M2. Promoter Constructs. The pHIV-111/80 containing SP1 activation sites and pHIV-34/60 containing the core promoter has been described elsewhere (Castano E *et al.*, 2000).

NC2 Expression the vectors were transformed in LysE bacteria and then allowed to grow to an OD of 0.1. Next, IPTG was added and incubated at 30 degrees (C) for 6 hours. Bacterially expressed M2:NC2 α - 6His:NC2 β and 6His:hSRB7 were purified on Ni²⁺- nitrilotriacetic acid resin under non denaturing conditions. M2:NC2 α - 6His:NC2 β were further purified over an M2 resin column in BC buffer (20 mM

Tris-HCl, pH 7.9 at 4°C/20% glycerol/0.2 mM EDTA, pH 8.0/10 mM β -mercaptoethanol/0.5 mM PMSF) containing 0.1 M KCl.

Protein Extraction. Extracted and purified proteins were stored in BC buffer containing 0.1 M KCl. 15 liters of HeLa cells were used to prepare the nuclear extract (HeLa NE) as described previously (Dignam JD *et al.*, 1983) HeLa NE lacking NC2 was prepared by immunoaffinity chromatography on protein A-Sepharose CL4B (Amersham Pharmacia) covalently crosslinked to polyclonal anti-NC2 β antibody. Immunodepletions were carried out in BC buffer containing 0.5 M KCl and 0.1% NP-40. 10 ml of HeLa Nuclear Extract was equilibrated with BC buffer containing 300 mM KCl. HeLa NE was clarified by centrifugation at 10,000g for 20 min and loaded into a Phosphocellulose P11 (Whatman), previously equilibrated with the BC300. Once the entire volume is loaded, the column is washed with 3–5 column volumes (CVs) of BC 300. Elute the column with 3 CVs of BC buffer with 500 mM KCl. Twice dialyzed the eluted fraction with BC 100 was applied to the DEAEff column previously equilibrated in BC 100. Collect protein fractions. Collected flow through fractions is directly pass over a CM sepharose column (Amersham Pharmacia) previously equilibrated with BC 100. CM sepharose column was washed 5 CVs of BC100. Elution was carried out with 5 CVs of BC 400. Pool fractions based on Abs_{280 nm}, colorimetric protein assay.

Immunoprecipitations. They were conducted as described earlier (Creton S *et al.*, 2002). In brief the protein A beads were crosslink with anti NC2 β , followed by being incubated at 4 degrees for 2 hours with purified NC2. Next, removal of non-bound NC2 was completed by washing three times the pellet with BC buffer containing 0.3 M KCl and 0.1% NP-40, the NC2 beads were then incubated with purified MED21 for 2 hours at 4 degrees. The immunoprecipitations were carried out in BC buffer containing 0.3 M KCl and 0.1% NP-40. Moreover, size exclusion chromatography was carried out on FPLC with Superose 12 from Amersham Pharmacia, in a BC buffer containing 0.3 M KCl.

Western Blot Analysis. Untreated HeLa NE and NC2 β -depleted HeLa NE (NE[Δ NC2 β]). Equal amounts of NE protein (30 μ g) and 10 μ l of anti-NC2 β column eluate were subjected to 10% SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose, and analyzed with antibodies to the proteins indicated.

Farwestern. 100 micrograms of rNC2 were label with ³²P gATP in 20 units of casein Kinase II for 1 hr at 30 degrees. Labelled rNC2 was purified by Ni²⁺- nitrilotriacetic acid resin. The labelled NC2 was used to probe the re-natured blot from the eluted NC2 of the immunoaffinity chromatography. Re-naturation of the blot was carried out by incubating the membrane blot in 8 M urea TBST followed by a 4 M urea TBST and a subsequent 2 M urea TBST before a final wash in TBST, all incubations were carried out for 2 hr at room temperature. After the membrane had been re-natured incubations with the label NC2 were carried out at 4 degrees in TBST for 4 hours

after several washes with TBST and Autoradiography analysis. The same membrane was also used for western blot analysis with anti-MED21.

In Vitro Transcription. Standard 60-min *in vitro* transcription reactions were performed as described previously (Castano E *et al.*, 2000). In brief a reaction mixture containing either nuclear extracts or purified transcription factors were mix with 100 ng of pTOG5ML in the presence of 0.5 mM NTP, 5 mM MgCl₂, 5mM DTT, in 20 mM HEPES KOH pH 8.4 in 20 μ l final volumes. The transcription reactions were incubated at 30°C for one hour. A control label DNA was added to the mixture. Products were extracted in phenol, ethanol-precipitated and used for primer extension reactions utilizing ³²P label primer as previously published (Ikeda K *et al.*, 2002).

V.4 Results

NC2 has been shown to be a general transcriptional repressor of class II genes and its biochemistry has been well-characterized. The structure and interactions with TBP have been formally proven by x-ray crystallography (Kamada K *et al.*, 2001). However, in order to achieve a further understanding of the function of this repressor, an immunodepletion from HeLa, nuclear extract with anti-NC2 β was carried out.

Surprisingly our experiments show that members of the SRB/Mediator complex co-precipitated selectively with NC2 as shown in figure V.1. The lack of precipitation of general transcriptions factors suggested a high specificity of the assay although several nonspecific proteins do bind to the resin. Together with the tied binding of the anti NC2 antibody make the system unsuitable for further protein purification. Nevertheless many possible interacting partners could be analyzed from this system. Four antibodies directed against the SRB/Med complex showed a positive signal in the co-elution with NC2; however only MED21 showed around a 50% co-depletion in the NC2 depleted extract, figure V.1. Moreover as can be observed NC2 does not interact with generals factors of transcription such as TFIIB y TFIIF, etc. Pointing to a specific interaction between the MED21 and NC2, the lack of depletion of other Mediator components can be explain by the great amount MED21 found in the cells that is not bound to the other subunits.

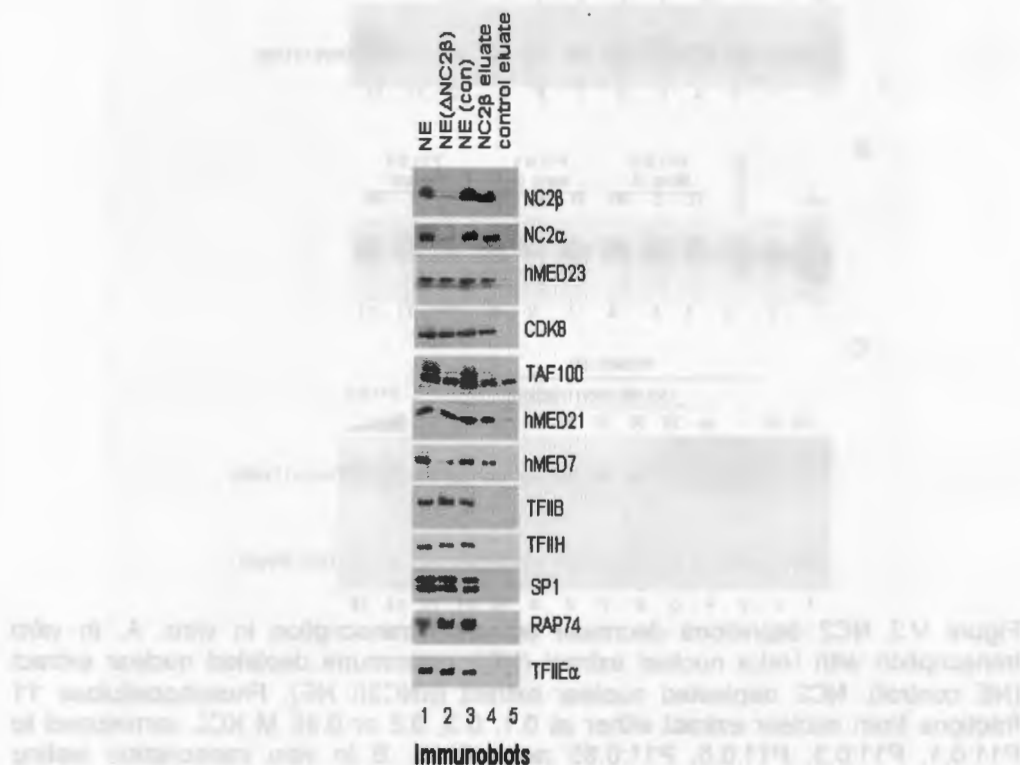


Figure V.1 Immunoblot analysis of HeLa NE, NC2 β depleted HeLa NE and the eluate from NC2 β Immunocolumn. Antibodies against NC2 α , NC2 β , hSUR2, hMED7, TFIIB, CDK8, TFIH, TAF100, MED21 and were used to probe the membranes for their presence. Protein molecular weight markers were used for all cases (pm).

In order to evaluate the functional effect of NC2 depleted from nuclear extract. In vitro transcription reactions were carried out. As can be seen in figure V.2A a 89% decrease in activated transcription is observed when NC2 β is depleted from nuclear extract, however the addition of the chromatographic fraction P11:05 containing NC2 and Mediator complex can completely restore transcriptional activation this is not the case for other chromatographic fractions or recombinant NC2. This suggests that NC2 is insufficient for the increase in transcriptional activation, indicating missing elements that were depleted from the nuclear extract. Different resins have been used in vane to try to further purify the activity as shown in figure V.2B and V.2C.

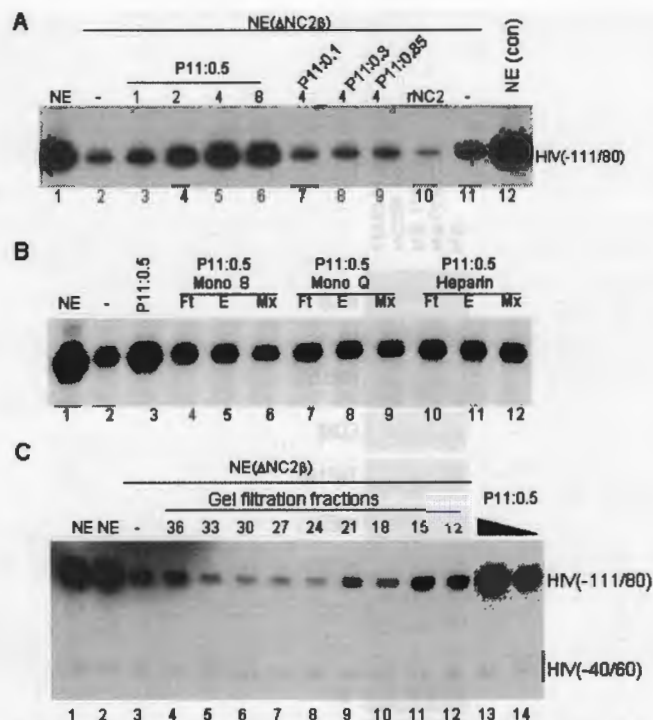


Figure V.2 NC2 depletions decrease activated transcription in vitro. A. *In vitro* transcription with HeLa nuclear extract (NE), preimmune depleted nuclear extract (NE control), NC2 depleted nuclear extract (α NC2 β NE), Phosphocellulose 11 fractions from nuclear extract either at 0.1, 0.3, 0.5 or 0.85 M KCL correspond to P11:0.1, P11:0.3, P11:0.5, P11:0.85 respectively. B In vitro transcription testing eluate fractions, flowthrow or mixing experiments from either Mono S, Mono Q or Heparin chromatographic resins utilizing P11:0.5 as the material source. C. In vitro transcription testing the effect of size exclusion chromatography of the P11:0.5 fraction.

In order to define what other factor may be interacting with NC2, we labeled the NC2 complex with ^{32}P γ ATP and casein kinase II, figure VII.3a shows the autoradiography both labeled rNC2 subunits. A farwestern approach was carried on two different nuclear extracts to identify those proteins that interact with NC2. Several bands appeared but the main bands where found at 70, 50, 35, 30, 25 and 19KDa as displayed in figure V.3b was of particular interest as it showed a consistent decrease of a 19KDa band in depleted NC2 β extracts. Furthermore, a farwestern carried out on the NC2 eluate shows an interacting protein of 19KD as seen in lane 2 of figure V.3C. Many of the bands are not due to nonspecific binding as the overall protein amount found in this region is low as seen in figure 3C lane 1. Lane 3 from figure V.3C show an immunoblot analysis of the farwestern with anti-hMED21 showing that the 19 KDa band match the signal from the farwestern from lane 2. We

thus tested the direct interaction of NC2 with MED21 since it showed a higher yield of co-precipitation from the immuno-depletion assay and had a molecular weight matching the 19 KDa interacting protein from the farwestern. To test for a possible interaction Immunoprecipitations were carried out with the purified proteins which showed a greater than 90% interaction of MED21 with NC2 complex but no binding was observed with NC2 β or the antibody bound to the beads as seen on figure V.4a. Finally, to further prove the interaction and avoid the use of antibodies in the assay, a gel filtration column was used to separate the non interacting proteins. A change was observe in the mobility of all detectable MED21 when it is incubated with NC2 to coincide with the peak of elution of NC2, thereby showing a physical interaction of MED21 with NC2 as shown in figure V.4b.

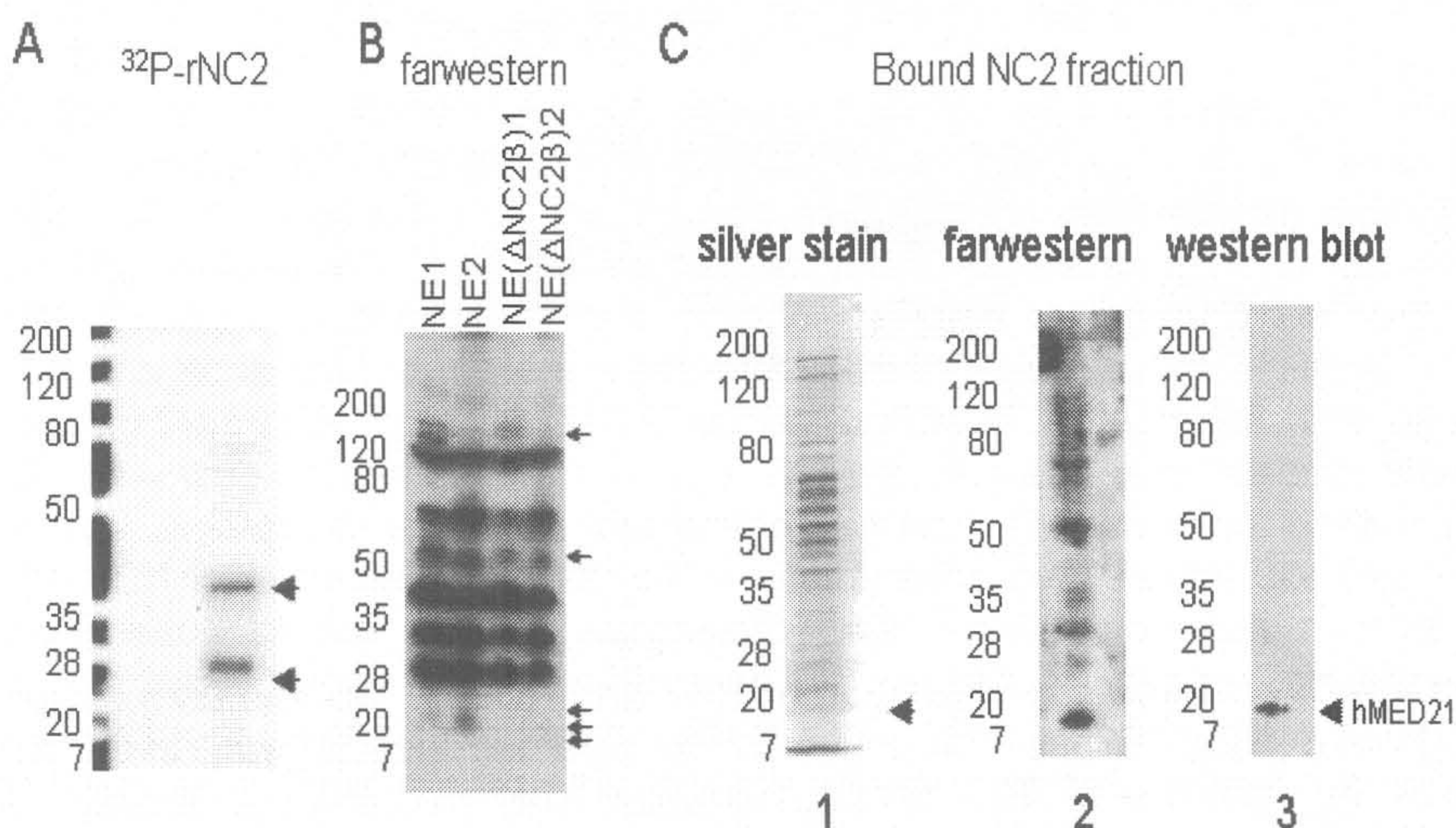


Figure V.3 Farwestern blot analysis. A, Autoradiograph of a 12% PAGE of Casein kinase II labelled and purified rNC2. B, Farwestern blot analysis of NC2 eluate from the immunoprecipitate with anti-NC2 β from HeLa NE, after renaturation. As described in materials and methods C. Immunoblot analysis from the membrane blot was carried out with anti-hSRB7.

Figure V.4 Direct interaction between hSRB7 and NC2. A, Co-Immunoprecipitation of MED21 with NC2. Cross link anti-NC2 to agarose beads was used as in the absence, or presence of NC2 or NC2 complex. After washing the excess nonbound NC2 the MED21 was allowed to interact as described in Materials and Methods. B, Superose 12 gel filtration chromatography was carried out. Purified MED21 showed a low mobility under 14 KDa in the absence of other proteins and high mobility of 160 KDa when incubated in the presence of purified rNC2.

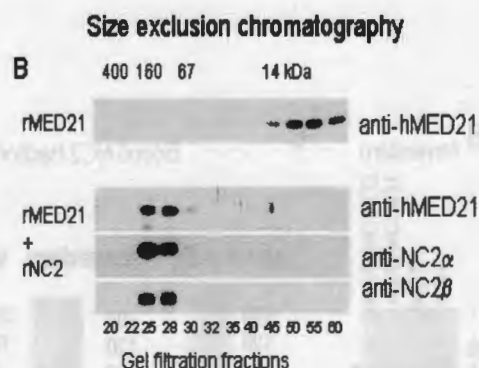
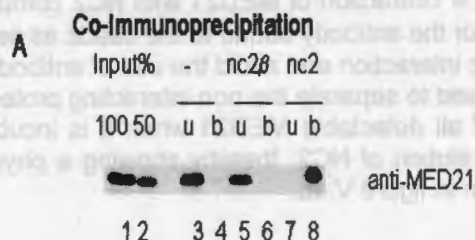


Figure V.4 Direct interaction between hSRB7 and NC2. A, Co-Immunoprecipitation of MED21 with NC2. Cross link anti-NC2 to agarose beads was used as in the absence, or presence of NC2 or NC2 complex. After washing the excess nonbound NC2 the MED21 was allowed to interact as described in Materials and Methods. **B, Superose 12 gel filtration chromatography** was carried out. Purified MED21 showed a low mobility under 14 KDa in the absence of other proteins and high mobility of 160 KDa when incubated in the presence of purified rNC2.

V.5 Discussion

NC2 (Dr1/Drp1) has long been known to be one of the main general transcriptional repressors in eukaryotic cells (Goppelt A *et al.*, 1996, Yeung K *et al* 1997). The interaction between NC2 and TBP has been demonstrated *in vitro*, showing its role as a repressor by preventing TBP interaction with TFIIB thereby blocking the formation of the pre-initiation complex (Geisberg JV *et al.*, 2001). Furthermore, plants

NC2 show an inverted role in the transcriptional repression of the two subunits (Song W *et al.*, 2002). However, at the moment literature has suggested that NC2 can be found dissociated and interacts with other polypeptides like AREB6 and FoxH1 (Ikeda K *et al.*, 1998, Iratni R *et al.*, 2002). One possibility is that the histone fold motive common to a few polypeptides may help them being interchangeable depending on the cellular response which modulates the transcriptional response.

NC2 has been shown in *Drosophila* TATA less promoters as a general transcription factor [Willy PJ *et al.*, 2000] it still remains uncertain what is the effect of NC2 in human TATA less promoters. Moreover it has also been reported a dual activity of NC2 in yeast experiments (Gadbois, E *et al.*, 2003). It has been shown that in yeast cells the loss of NC2 function can compensate for a defect in the SRB4 component of the holoenzyme, together with previous evidence that SRB4 functions positively in activation at a global level in class II promoters it may reflect that NC2 interact with the holoenzyme in a balance activation and repression (Gadbois, E *et al.*, 2003). Furthermore NC2 alpha has been shown to interact with BTAF1 and this may lead to stimulation in its ATP-dependent association with TBP, thereby increasing its affinity to DNA (Klejman MP *et al.*, 2004). Our results show that a different member of the SRB/mediator complex (MED21) physically interacts with NC2 in human extracts and purified proteins as seen in figure V.1 and V.4.

However, there is little conservation on several portions of the sequence between human, yeast and *Drosophila* NC2. The function of NC2 in our in vitro transcription experiments show a positive role for this repressor, since its depletion from HeLa nuclear extract results in a ten fold decrease of activated transcription figure V.2. rNC2 was incapable of rescuing transcription activation and resulted in a further decrease of transcription, consistent with other publish reports (Kim TK *et al.*, 1995) but suggesting that other factors may be lost during the NC2 depletion. The addition of P11:0.5 fractions obtained from HeLa nuclear extract can rescue the lost transcriptional activity of the NC2 depleted extract. This fraction contains the majority of NC2 from nuclear extract, but its purification over resins does not yield further purification of the activity, surprisingly the activity was lost over a size exclusion chromatography, which points out to either to protein modifications (dephosphorylation, methylation, sumorylation, etc) which may occur during the purification procedure that renders the complex inactive or dissociates it from other proteins. Also can be explain if weak binding of the large complex Mediator dissociates some components during the affinity purification rendering the left complexes inactive. Further advances in protein purification techniques as well as the creation of tag cell lines may be need it to answer this problem.

The precipitate from the immunodepletion and the farwestern blot show that NC2 can interact with several proteins (figure V.3). To confirm this finding, further work is necessary to elucidate all of the partners and condition under which this protein may be having a biological response. However the finding by Farwesterns of a 19 KDa protein that correspond by western blot to MED21, and the CO-IP and Gel filtration suggest a strong interaction, current yeast data suggest that *srb4* plays a regulatory role with yeast NC2 (Gadbois, E *et al.*, 2003).

In summary, we found in this research that NC2 and MED21 interact and help modulate the level of transcription by the Srsf/Mediator complex, or it may interact with some of the free portion of cellular MED21, which role is still to be defined.

Acknowledgements

We thank Arnold Berk for the anti-hSUR2 antibody and Yi Wei Jiang for anti-hMED7 antibody. We wish to thank Angela F. Ku for her technical help, T. Oelgeschlager group for their discussions and Luis Joel Figueroa from Accesolab for the contribution of reagents for this study. Dr. Castaño is partially funded by CONACYT grant 39731-Z.

V.6 Bibliography

Bikle, D. D., Tu, C. L., Xie, Z., Oda, Y. 2003. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation: role of coactivators. *J Cell Biochem.* 88:290-5.

Bjorklund, S., Gustafsson, C.M. 2004. The mediator complex. *Adv Protein Chem.* 67:43-65.

Cang, Y. y Prelich, G. 2002. Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:12727-32.

Castano, E., Gross, P., Wang, Z., Roeder, R. G. y Oelgeschlager, T. 2000. The C-terminal domain-phosphorylated II₀ form of RNA polymerase II is associated with the transcription repressor NC2 (Dr1/DRAP1) and is required for transcription activation in human nuclear extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7184-9.

Christova, R. y Oelgeschlager, T. 2002. Association of human TFIIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat Cell Biol.* 4:79-82.

Creton, S., Svejstrup, J. Q, y Collart, M. A. 2002. The NC2 alpha and beta subunits play different roles in vivo. *Genes Dev.* 16:3265-76.

Davis, J. A., Takagi, Y., Kornberg, R. D. y Asturias, F. A. 2002. Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell.* 10:409-15.

Denko, N., Wernke, D. K, Johnson, A. B., Hammond, E., Chiang, C. M. y Barton, M. C. 2003. Hypoxia actively represses transcription by inducing negative cofactor 2 (Dr1/DrAP1) and blocking preinitiation complex assembly. *J Biol Chem.* 278:5744-9.

Dignam, J. D., Martin, P. L., Shastry, B. S. y Roeder, R. G. 1983. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol.* 101:582-98.

Gadbois, E. L., Chao, D. M., Reese, J. C., Green, M. R y Young, R. A. 1997. Functional antagonism between RNA polymerase II holoenzyme and global negative regulator NC2 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3145-3150.

Geisberg, J. V., Holstege, F. C., Young, R. A. y Struhl, K. 2001. Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol.* 21:2736-42.

Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. y Meisterernst, M. 1996. A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J.* 15:3105-16.

Ikeda, K., Halle, J. P., Stelzer, G., Meisterernst, M. y Kawakami, K. 1998. Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor AREB6. *Mol Cell Biol.* 18:10-8.

Iratni, R., Yan, Y. T., Chen, C., Ding, J., Zhang, Y., Price, S. M., Reinberg, D. y Shen, M. M. 2002. Inhibition of excess nodal signaling during mouse gastrulation by the transcriptional corepressor DRAP1. *Science.* 298:1996-9.

Ito, M. y Roeder, R. G. 2001. The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab.* 12:127-34.

Kamada, K., Shu, F., Chen, H., Malik, S., Stelzer, G., Roeder, R. G., Meisterernst, M. y Burley, S. K. 2001. Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell.* 106:71-81.

Kim, T. K., Zhao, Y., Ge, H., Bernstein, R. y Roeder, R. G. 1995. TATA-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J Biol Chem.* 270:10976-81.

Klejman, M. P., Pereira, L. A., van Zeeburg, H. J., Gilfillan, S., Meisterernst, M. y Timmers, H. T. 2004. NC2alpha interacts with BTAF1 and stimulates its ATP-dependent association with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 24(22):10072-82.

Kretzschmar, M., Stelzer, G., Roeder, R. G. y Meisterernst, M. 1994. RNA polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH *in vitro*. *Mol Cell Biol.* 14:3927-37.

Naar, A. M., Lemon, B. D. y Tjian, R. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem.* 70:475-501.

Prelich, G. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* BUR6 encodes a DRAP1/NC2alpha homolog that has both positive and negative roles in transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol.* 17:2057-65.

Song, W., Solimeo, H., Rupert, R. A., Yadav, N. S. y Zhu, Q. 2002. Functional dissection of a Rice Dr1/DrAp1 transcriptional repression complex. Plant Cell. 14:181-95.

Willy, P. J., Kobayashi, R. y Kadonaga, J. T. 2000. A basal transcription factor that activates or represses transcription. Science. 290:982-5.

Yeung, K., Kim, S. y Reinberg, D. 1997. Functional dissection of a human Dr1-DRAP1 repressor complex. Mol Cell Biol. 17:36-45.

CAPÍTULO VI

A simple protocol for the expression and purification of NC2

Diana Karina Guillén¹, Nadine Möbius¹, Luis Carlos Rodríguez², Enrique Castaño^{1*}

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México.

2 Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No.130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México.

*Corresponding author: e-mail:enriquec@cicy.mx

Publicado en la revista Asian J Biochemistry 2 (4): 263-268, 2007.

VI.1 Abstract

Transcriptional regulation depends on the appropriate set of positive and negative regulating signals in order to provide the correct gene expression. Studies in eukaryotic gene expression over the last few years have shown that NC2 acts as a general repressor of transcription. Functional in vitro studies require large amounts of highly purified recombinant protein. The case of rNC2a (Drap1) which up to date has been difficult to express in bacteria is common among many eukaryotic proteins. Moreover, under current protocols both subunits have to be denature in urea after combination and allow a renaturation process which may render many inactive NC2 complexes. Here we provide a simple protocol that includes a new expression vector and the protocol for over expressing and purifying both subunits in a native state.

Key words: Dr1, Drap1, NC2, Repressor, Transcription, Gene regulation

VI.2 Introduction

Gene activation and repression has been under intense study during the last three decades. In the early 90's, a repressing activity was found in HeLa nuclear extract that could selectively reduce basal transcription but did not affect the activated transcription. Consequently, this activity was named Negative Cofactor 2 (NC2) (Inostroza *et al.*, 1992). Soon after, protein Dr1 was found to be a general transcription repressor, particularly when it is associated to its partner Drap1. Once NC2 α / β clones where sequence they were found to be the same as Dr1/Drap1 (Goppelt *et al.*, 1996). NC2 is composed of two subunits NC2 α 22 kDa and NC2 β 20 kDa. The amino acid sequence of NC2 α and β are related to the Histones H2A and H2B, forming the histone motif which allow them to heterodimerize (Tresaugues L *et al.*, 2006; Goppelt *et al.*, 1996). This motif is common to a series of factors involved in gene regulation and chromatin organization.

The recombination NC2 proteins have been found to repress transcription *in vitro* by interacting with TBP thereby preventing TFIIB from forming a DNA-TBP-TFIIB complex. The result is the inhibition of the preinitiation complex formation while maintaining a DNA-TBP-NC2 complex (Goppelt *et al.*, 1996; Kim, T. K *et al.*, 1995; Gilfillan S *et al.*, 2005). TFIIA competes with NC2 for TBP and allows TFIIB to bind, which promotes binding from the rest of general transcription factors and RNA Pol II to the promoter and for transcription initiation to occur (Roeder RG., 2005; Castaño *et al.*, 2006). Furthermore, the crystal structure has been carried on a portion of the NC2 complex interacting with TBP (Kamada *et al.*, 2001). Available data has shown such interacting domains of NC2 with TBP, consistent with the biochemical binding experiments and its activity as a repressor. As NC2 has been shown over the years to be of a general transcriptional repressor of class II genes; however, in order to achieve a thorough understanding of the function of this repressor, *in vitro* experiments require a reliable source of material. Solutions to this problem included the removal of portions of the protein as in the case of the crystallographic study (Kamada *et al.*, 2001) 21 unrelated amino acids where added to increase the protein yield.

Since the current systems for expressing NC2 subunits produce a low yield NC2 α as seen by others and in our present experiments that in the absence of a partner, (Naar *et al.*, 2001; Bikle *et al.*, 2003).

Here we present a simple non-denaturing protocol for obtaining high yield active rNC2 as well as a simple protocol for its purification. This may be applicable for the expression of other complex protein systems.

VI.3 Materials and Methods

Vectors

The vector pNC2 β -6HIS and pNC2 α -6HIS have previously been described (Bikle *et al.*, 2003). The vector pNC2 α -M2 was carried out by subcloning NC2 α with Nde I and BamH I into pET11d-flag. The final co-expressing vector was carried out by subcloning NC2 α -M2 with Bgl II and Hind III in to pNC2 β -6-HIS, in order to generate pNC2 α - M2/NC2 β -6HIS. pECHIV-111/80 has been previously described (Bikle *et al.*, 2003).

Protein Expression and Purification

Protein Expression

Sequences of NC2 α and NC2 β are in vector pET11d for expression both vectors were transformed in *E. coli* BL21(DE3) pLysE. from Invitrogen and then allowed to grow to an OD of 0.5 at 600 nm. Next, IPTG (Isopropylthiogalactoside) 1 mM was added and incubated at 30°C for 3 hours. (30°C reduces the level of protein degradation and increases the overall yield). Followed by 10 min of centrifugation at 4000 x *g*. In the case of NC2 α after collecting the bacterial pellet 5 ml of denaturing buffer (20mM Tris HCl, pH 7.9, 8M Urea, 0.1M NaH₂PO₄, 0.5 M KCl, 20 mM imidazol) was added and cells were sonicated 3 times. The re-suspended lysate was centrifuged at 4000 x *g* for 10 min to remove cell debris and the supernatant allowed binding to 0.1 ml of Ni²⁺- nitrilotric acetic acid resin for one hour, the column was then allowed to flow by gravity and wash with 5 ml of the denaturing buffer. Finally 0.3 ml of elution where recover in a denaturing buffer containing 250 mM Imidazole.

For the expression of NC2 β and the co-expression M2:NC2 α -6His: NC2 β system the bacterial pellets were resuspended in 5 ml of Lysis buffer 20 mM Tris HCl, pH 7.9, 1 μ g/ml Lysozyme, 0.5 M KCl, 20 mM Imidazole, PMSF (Phenylmethyl sulfonyl fluoride) 4 mM, 20% Glycerol)

sonicated 3 times on ice. The lysate was centrifugated 4000 x *g* for 10 min and the supernatant allowed binding in 0.1 ml of Ni²⁺- nitrilotric acetic acid resin for one hour in ice, the column was then allowed to flow by gravity and wash with 5 ml lysis buffer. The elution was carried out by adding 0.3 ml of elution buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.9, 0.4 M KCl, PMSF 4 mM, 250 mM Imidazole).

Second step purification utilizing 0.1 ml M2-resin was used to further purify the NC2 complex in BC100 buffer, 1 hour incubation at 4°C of the resin with the Ni²⁺ purified eluate was followed by 3 wash steps of BC100 and finally eluted after incubation with 0.2 ml of BC100 (20 mM Tris HCl, pH 7.9 at 4°C, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF and 0.1 m KCl) with 0.2 mg/ml flag peptide (DYKDDDDK) from Sigma for 30 min at 4°C.

Transcription *in vitro*

Methodology published in Castaño *et al.*, 2000. Brief explained a reaction mixture containing either nuclear extracts or purified transcription factors were mix with 100 ng of pHIV-33/+68 in the presence of 0.5 mM NTP, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, in 20 mM HEPES KOH pH 8.4, in 20 µl final volume. The transcription reactions were incubated at 30°C for one hour. A control label DNA was added to the mixture. Products were stop with the stop-buffer (20 mM Tris pH 8.0, 0.5% SDS, 150 mM NaCl, 100 ng Glycogen) and extracted in phenol, ethanol-precipitated and used for primer extension reactions utilizing ³²P label primer 5'GCCAAGCTATTTAGGTGACACTAT3' in a primer extension buffer (20u RNAasin, 1.5 mM Actinomycin D, 15 mM DTT, 12 mM MgCl₂, 1 mM dNTP's and 50 mM Tris pH 8.0) for 1 hour at 37°C.

VI.4 Results

NC2 is considered to be a general negative regulator of transcription initiation; it has a unique mechanism of repression of basal transcription through direct binding of TBP therefore blocking the pre-initiation complex formation. However, several more studies have to be carried out to validate the overall complexity of transcription repression and to verify the current model of action. For this recombinant proteins are useful, however it is well known that NC2α yield production is low, our results from figure VI.1a show the same result as obtained by other authors (Kamada *et al.*, 2001). Even after four hours we observed a low level expression as compared with NC2β figure VI.1. NC2β induction resulted in an increase level of expression over time, with a peak of expression between 2-4 hours after the addition of 1 mM IPTG, figure VI.1B. Both polypeptides were purified with Ni-agarose resin as seen in figure VI.1C. These typical results are not new in the field and present a second problem which is to obtain a fully functional complex NC2α/β (Gilfillan S *et al.*, 2005; Kamada *et al.*, 2001; Yeung *et al.*, 1997). The typical solution for this problem is a denaturation-renaturation procedure which may render unknown percentage of active molecules. Other solutions to the problem have been the removal of several amino acids from the C terminus of NC2α to increase stability and increase the yield. This however brings an incomplete protein which may differ in action from the complete molecule. Therefore the strategy was undertaken to express both subunits at the same time and for each to have a different tag as seen in figure VI.2A, 6His to NC2β and Flag to NC2α.

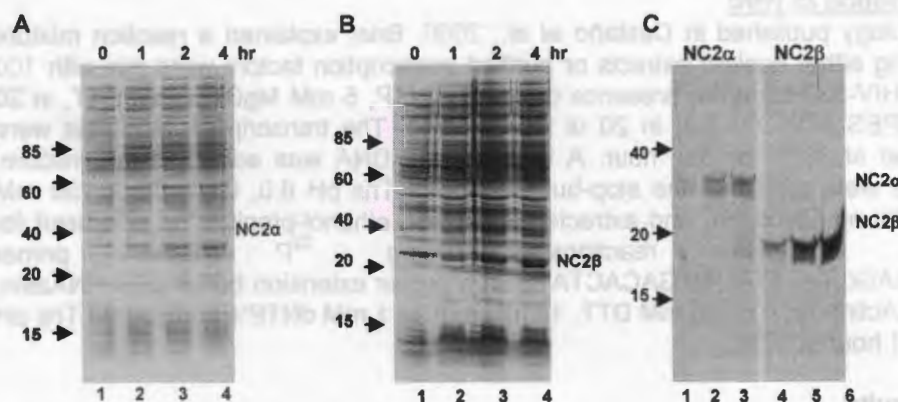


Figure VI.1. A) 12 % Polyacrilamide gel, induction of NC2 α with 1 mM of IPTG at 1, 2 and 4 hours. B) Induction of NC2 β with 1 mM of IPTG at 1, 2 and 4 hours. C) 15 % Polyacrilamide gel Purification de NC2 α (lines 1-3) and NC2 β (lines 4-6) with Ni²⁺ resin eluted with 250 mM of Imidazole.

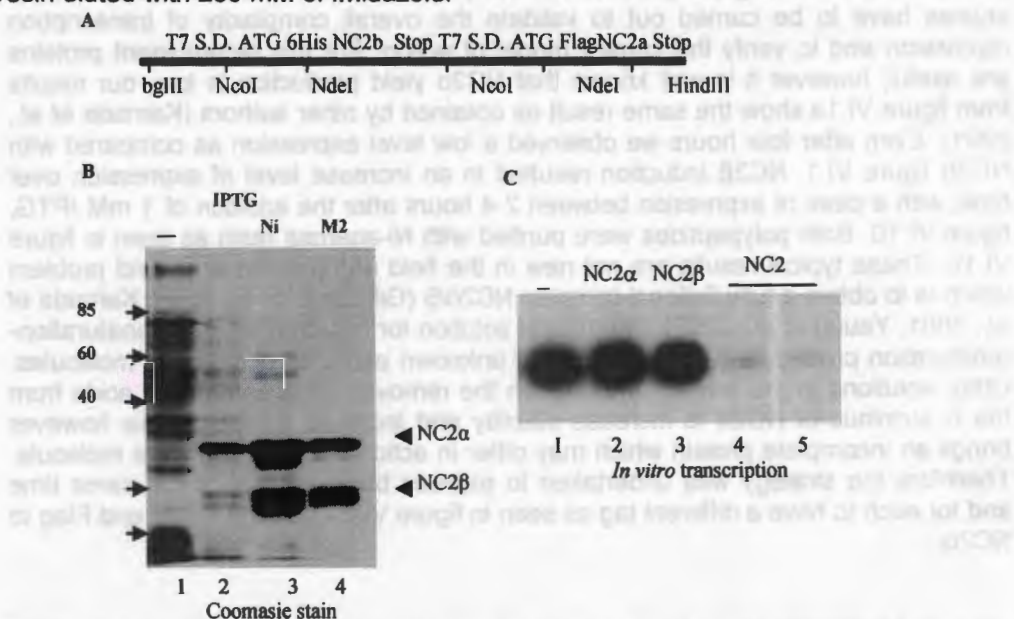


Figure VI.2. A) Map of final plasmid construction containing two sequences de both proteins 6His-NC2 β and Flag-NC2 α . B) Poliacrylamide gel 12 %, cells induced with IPTG 1 mM and wash with imidazole 250 mM by Ni²⁺ resin. Purification of proteins NC2 α and NC2 β with Ni agarose (line 3) and followed of M2 resin (line 4). C) *in vitro* Transcription Assay of transcription 100 ng of NC2B or NC2a were used in lanes 2 and 3 respectively, 30 ng of NC2 complex repressed transcription lines 4-5.

We decided to co-express both subunits in the same vector as seen in figure VI.2B and found that when both subunits are expressed the overall yield of NC2 α recombinant protein is significant greater than when expressed individually, also the addition of a different tag allowed a second step of purification rendering a complete NC2 complex molecule without the need of denaturation steps that were used in other protocols.

Finally, we prove the functionality of the protein on an in vitro transcription system; figure (VI.2C) shows that 20 ng of rNC2 are sufficient to repress transcription as seen in lanes 4 and 5 while 100 ng of either NC2 α or NC2 β have no significant effect on transcription repression in this system. It should be noted that if NC2 is purified solely by Ni²⁺ column the protein co-purifies with a bacterial RNA polymerase which leads to a high level of unrelated transcripts. This is due to a co-purification of a bacterial polymerase which can lead to wrong conclusions. This can be corrected by purifying the NC2 protein over M2 resin as done in these experiments.

VI.5 Discussion

Transcription by RNA polymerase II in the eukaryotic cell is regulated by the complex interplay of positive and negative regulators. One of the most important general repressors of transcription NC2 was found to consist of two subunits named NC2 α (Drap1) y NC2 β (Dr1). NC2 binds to TBP and blocks the binding of both TFIIA y TFIIIB, which depending on the overall concentrations of TFIIA it may cause a release of NC2 and an activation of transcription. Furthermore, NC2 has been shown to enhanced the ability of TBP to bind DNA, thereby showing a path for a positive role in transcription for this molecule. Over the years this simple mechanism of repression has been challenged from data of diverse laboratories which show that NC2 interacts with other molecules and may function to block only activated transcription and repress additional transcription initiation sites (Castaño *et al.*, 2000; Castaño *et al.*, 2006; Colli *et al.*, 2006; Klejman *et al.*, 2004; Willy *et al.*, 2000).

In order to solve for a consistent source of rNC2 material to further test current hypothesis we cloned both subunits of NC2 (α and β), in to pET 11d vector and found that the expression as well as subsequent purification of the complex was easier and more reliable as compared to individual purifications, moreover the expression of both subunits avoid the renaturation steps that were current norm in previous protocols and which may render an unknown amount of active protein. This simple technique of coexpression may allow expression of others proteins like, NF-YB/ NF-YC and YBL1/YCL1 (Bellorini *et al.*, 1997; Bolognese *et al.*, 2000), that utilize a similar denaturation renaturation protocol and that an unknown percentage of active protein as well as an unknown level of denature proteins that may still play some effect on the tested activity, which may mislead the conclusions of the assay tested.

In the summary, we believe that this simple double expression system would be useful for other hetero-dimer proteins where one or both of the polypeptides precipitate during bacterial expression.

Acknowledgements

We thank to Angela F. Ku for her technical help and Luis Joel Figueroa from Accesolab for the contribution of reagents for this study. Dr. Castaño is partially funded by CONACYT grant 39731-z.

VI.6 Bibliography

Bikle, D. D., Tu, C. L., Xie, Z. y Oda, Y. 2003. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation: role of coactivators. *J Cell Biochem.* 88: 290-5.

Bellorini, M., Lee, D. K., Dantonel, J. C., Zemzoumi, K., Roedor, R., Tora, L. y Mantovani, R. 1997. CCAAT binding NF-Y-TBP interacciones: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Research* 25(11): 2174-2181.

Bolognese, F. C., Imbriano, G., Caretti, y Mantovani, R. 2000. Cloning and characterization of the histone-fold proteins YBL1 and YCL1. *Nucleic Acids Research* 28(19): 3830-3838.

Castaño, E., Gross, P., Wang, Z., Roeder, R. G. y Oelgeschlager, T. 2000. The C-terminal domain phosphorylated IIO form of RNA polymerase II is associated with the transcription repressor NC2 (Dr1/Drap1) and is required for transcription activation in human nuclear extracts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 7184-9.

Castaño, E., Rodríguez, L., Rodríguez, H. y Mobius, N. 2006. Native NC2 selectively represses incorrect transcription initiation. *Molecular Biology*, 40: 246-250.

Colli, J. G., Guillén, D., Rodríguez, L. C., Mobious, N. y Castaño, E. 2006. Direct Interaction between NC2 and a subunit of the SRBM/Mediator co-activator. 1:75-83.

Flynn, P., Davis, E. y Ackerman, S. 1987. Partial purification of plant transcription factors II. An *in vitro* transcription system is inefficient. *PlantMol Biol.* 9, 159-164.

Gilfillan, S., Stelzer, G., Piaia, E., Hofmann, M. G., Meisterernst, M. 2005. Efficient binding of NC2-TATA-binding protein to the DNA in the absence of TATA *J. Biol Chem.* 280: 6222-30.

Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. y Meisterernst, M. 1996. A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J.* 15: 3105-16.

Inostroza, T. K., Meisterernst, F. H., Ihlo, H., Lane, W. S. y Reinberg, D. 1992. *Cell*, 70: 477-489.

Kamada, K., Shu, F., Chen, H., Malik, S., Stelzer, G., Roeder, R. G., Meisterernst, M. y Burley, S. K. 2001. Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* 106(1):71-81.

Kim, T. K., Zhao, Y., Ge, H., Bernstein, R. y Roeder, R. G. 1995. Tata-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J. Biol Chem.* 270: 10976-81.

Klejman, M. P., Pereira, L. A., van Zeeburg, H. J., Gilfillan, S., Meisterernst, M., Timmers, H. T. 2004. NC2 α interacts with BTAF1 and stimulates its ATP-dependent association with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 24(22):10072-82.

Naar, A. M., B. D. Lemon, R. Tjian, 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem.* 70: 475-501.

Roberts, M. y Okita T. 1991. Accurate *in vitro* transcription of plant promoters with nuclear extracts prepared from cultured plant cells. *Plant Mol Biol.* 16, 771-786.

Roeder, R. G. 2005. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett.* 579(4):909-15.

Tresaugues, L., Dehe, P. M., Guerois, R., Rodriguez, G. A., Varlet, I., Salah, P., Pamblanco, M., Luciano, P., Quevillon, C. S., Sollier, J., Leulliot, N., Couprie, J., Tordera, V., Zinn, J. S., Chavez, S., van Tilbeurgh, H. y Geli, V. 2006. Structural characterization of Set1 RNA recognition motifs and their role in histone H3 lysine 4 methylation. *J Mol Biol.* 359(5):1170-81.

Willy, P. J., Kobayashi, R. y Kadonaga, J. T. 2000. A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science.* 290: 982-5.

Yeung, K., Kim, S. y Reinberg, D. 1997. Functional dissection of a human Dr1-DRAP1 repressor complex. *Mol Cell Biol.* 17: 36-45.

CAPITULO VII

Discusión general

NC2 se ha descrito como represor transcripcional esencial y conservado, aunque experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren que puede funcionar como efector positivo o negativo de la transcripción. NC2 interacciona con el promotor y los componentes de la maquinaria de transcripción y está compuesto de dos subunidades NC2 alfa y NC2 beta y sus genes se encuentran conservados en todos los organismos eucarióticos (Albert *et al.*, 2007).

Tener un sistema de producción de arroz de forma constante (*ex vitro* e *in vitro*) es indispensable para estudiar y realizar trabajos a nivel molecular y bioquímicos. En este trabajo se utilizó la variedad Filipina ya que es cosechada en el sureste de México, sin embargo no existen reportes de cultivos *in vitro* de dicha variedad. Por lo que se probaron diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 2,4-D para obtener células en suspensión de arroz a partir de callo embriogénico utilizando una concentración dos veces menor a la reportada por Medina *et al.*, 1999.

A pesar de haberse reportado (Song *et al.*, 2002) en arroz la presencia de NC2, en este trabajo se decidió utilizar anticuerpos de NC2 para corroborar la presencia de NC2 y TFIIB en tejidos de hoja, tallo y raíz de arroz var. Filipina (figura III.2).

En este trabajo se purificó NC2 alfa y beta de manera individual como se observó en la figura VI.1, produciendo a la proteína NC2 alfa en menor concentración que NC2 beta, para realizar experimentos de actividad se tuvo que desnaturalizar y renaturalizar para utilizar las proteínas como heterodímero, dicho proceso también se ha utilizado en otras proteínas que son heterodímeros NF-YB/ NF-YC (Bellorini *et al.*, 1997). Al tener varios inconvenientes en la producción y calidad de NC2 se decidió utilizar un sistema en el cual se expresen y purifiquen de forma simultánea NC2 alfa y beta obteniendo el complejo proteico activo y en mayor cantidad (figura VI.2) simplificando la producción de ambas proteínas como complejo.

El sistema de doble expresión sería de gran utilidad para otras proteínas que formen heterodímeros donde uno o ambos de las proteínas precipiten durante la expresión bacteriana.

Aunque las interacciones entre activadores y factores de la transcripción basal podrían contribuir al proceso de activación, otros factores son necesarios para regular el proceso. El mediador es reconocido como una unión crucial entre los activadores y la ARN Pol II. Este traduce la información de los enhancers a los promotores. Los mediadores se encuentran conservados desde levaduras hasta humanos (Ito *et al.*, 1999). En levaduras un gran complejo llamado SRB/mediator se ha identificado basado en su habilidad para aumentar la transcripción basal y facilitar la transcripción activada. Varias actividades del mediator fueron

descubiertas en otros sistemas que ayudan a la función de activadores como son TRAP/SMCC, ARC, DRIP, human Srb/Mediator. (Hampsey y Reinberg, 1999; Lemon y Tjian, 2000; Malik y Roeder, 2000).

Mientras que NC2 se ha estudiado como un represor general de la transcripción, aquí se ha demostrado que NC2 puede interaccionar directamente con el Mediador en células HeLa, ésta interacción provee un nuevo grupo de interacciones entre cofactores positivos y negativos.

En este trabajo se observó que Med23, Med21 y Med7 (complejo SRB/Mediator) co-precipitan selectivamente con NC2 V.1 y no con los factores generales de la transcripción como TFIIB y TFIIF sugiriendo una interacción específica de NC2 con las proteínas del complejo SRB/Mediator.

Como se puede observar en la figura V.2A, la depleción de NC2 del extracto nuclear ocasionó una disminución de la transcripción activada, la cual se vio recuperada cuando se adicionaron las fracciones cromatográficas que contienen a NC2 y al complejo mediador.

Por medio de un ensayo de farwestern blot se identificó que proteínas estarían interactuando con NC2 (figura V.3B) bandas de entre 70, 50, 35, 30, 20 y 19 kDa. Otro farwestern se hizo con la fracción de elusión donde estaba NC2 (figura V.3C), existiendo una interacción de NC2 con una banda de 19 kDa, la cual al ser un Western blot con anticuerpos contra Med21 se puede observar una señal de alrededor de 19 kDa.

Finalmente al realizar una co-inmunoprecipitación de NC2 se observó la presencia de Med21 y además al estar presente NC2 Med21 cambió su migración a un tamaño de 160 kDa lo que comprueba que existe una interacción entre Med21 y NC2.

En otros estudios realizados en levadura se producen resultados corroborando la interacción de NC2 con otras subunidades del mediador. Se realizaron mutaciones en componentes del mediador NUT2, MED7 y SRB2 como supresores de la eliminación de NC2 y se encontró que estas mutaciones pueden desviar la ausencia de Bur6 (NC2 beta en levadura). Estos resultados sugieren que el mediador esta involucrado como un todo en el proceso de la transcripción que contrabalancea la función de NC2, argumentando una relación genética específica entre NC2 y una subunidad del mediador. Sin embargo, cuando se amplían los análisis de todas las subunidades no esenciales del mediador, se encontró que 11 de las 14 subunidades probadas fueron capaces de suprimir en diferentes extensiones, la eliminación de NC2. Aunque, la observación de que Med2/Med3/GallII son requeridos para la supresión causada por una reducción en la actividad de TFIIF o de la ARN Pol II, podría ser indicativo de una interacción específica entre NC2 y estos componentes del Mediador (Peiró y Estruch, 2007).

Hasta el momento la transcripción *in vitro* se realiza con promotores virales como lo ha reportado Flynn *et al* 1987; Roberts y Okita, 1991 y Malecová *et al.*, 2007.

En este estudio se clonaron promotores TATA y TATA less provenientes de células de arroz que son del gen lip 19 y de la fosfolipasa D, respectivamente.

El gen lip19 se expresa a bajas temperaturas, se conoce que a temperatura por debajo de 10° C es una condición común de estrés que afecta adversamente al

crecimiento y producción de una planta. Para que la planta reacciones ante esto se requiere de una vía de señalización, entre los que se encuentra: receptores, cascada de fosfoproteínas, factores de transcripción, genes de respuesta a estrés (Liming *et al.*, 2002). En el caso del gen de la fosfolipasa D (PLD) realiza la hidrólisis de fosfolípidos; esto se ha observado durante la germinación de semillas, senescencia y bajo un amplio espectro de condiciones de estrés incluyendo, infección por patógenos, deficiencia de nutrientes (Chapman, 1998), además de tener un papel crucial en el control de la pérdida de agua regulando el cierre de los estomas inducidos por ABA y un déficit de agua.

Los promotores TATA y TATA less son parte estructural de genes muy importantes en la sobrevivencia de una célula vegetal, este trabajo aporta las bases para realizar estudios bioquímicos y moleculares de dichos promotores con relación a su interacción con factores de transcripción (NC2, activadores, miembros del Mediador) y obtener resultados de las regiones del promotor que aumentan una transcripción basal, así como identificar diferencias que existen con otros promotores de genes diferentes y extrapolar dichos resultados a otras especies de plantas, que hasta el momento es muy poco lo que se sabe al respecto.

La transcripción es el proceso donde un gen sirve como templado para la síntesis de una molécula de ARN que se traduce en una proteína. La iniciación de la transcripción es un evento regulatorio crucial que consiste en elaborar un mecanismo seguro para la expresión génica. Esto involucra el correcto ensamblaje de una maquinaria de transcripción basal y de una región de cromatina abierta. La elucidación de estructuras de proteínas y complejos de proteína-ADN orquesta todos los procesos que puedan aumentar grandemente nuestro entendimiento de los mecanismos de regulación. Sin embargo, la dificultad de producir muestras de factores de transcripción en cantidades y calidad suficiente para la estructura biológica, ofrece en extremo un gran obstáculo. Y este paso es de suma importancia para la ciencia básica y aplicada, ya que el balance correcto entre las actividades de componentes positivos y negativos es esencial para el crecimiento celular.

Conclusiones generales

Se expresó de forma simultánea NC2 alfa y beta, ambas secuencias clonadas en un mismo vector pET11d, lo que permitió obtener la proteína de NC2 en forma estable y activa.

Se detectó la presencia de NC2 en tejidos de hoja y tallo de arroz de la variedad Filipina.

Se determinó en el sistema de células HeLa la interacción de NC2 y MED21 que forma parte del complejo SRBs/Mediador.

Se clonó y caracteriza los promotores TATA y TATA less.

Bibliografía

Albert, T., Grote, K., Boeing, G., Schepers, A. y Meisterernst, M. 2007. Global distribution of negative cofactor 2 subunit-alpha on human promoters. *PNAS*. 104 (24):10000-10005.

Ito, M. 1999. Identity between TRAP and SMCC complex indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3(3):361-70.

Bellorini, M., Lee, D. K., Dantonel, J. C., Zemzoumi, K., Roedor, R., Tora, L. y Mantovani, R. 1997. CCAAT binding NF-Y-TBP interacciones: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Research*. 25(11):2174-2181.

Chapman, K. D. 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci*. 11:419-26.

Flynn, P., Davis, E. y Ackerman, S. 1987. Partial purification of plant transcription factors II. An in vitro transcription system is inefficient. *PlantMol Biol*. 9, 159-164.

Hampsey, J. P. y Reinberg, D. 1999. RNA Polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 9:132-139.

Liming, S., Schumaker, K. y Kang, S. 2002. Cell signaling during Cold, Drought and Salt Stress. *The Plant Cell*. 13:165-183.

Lemon, B. y Tjian, R. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*. 14:2551-2569.

Malecová, B., Gross, P., Boyer, M., Yavuz, S. y Oelgeschlager, T. 2007. The initiator core promoter element antagonizes repression of TATA-directed transcription by negative cofactor NC2. *The Journal of Biological Chemistry*. 56:789-792.

Malik, S. y Roedor, R. 2000. Transcription regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci*. 25:277-283.

Medina, R., Faloci, M., Marassi, M. y Mroginski, L. 1999. Variabilidad Isoenzimática de Plantas de Arroz (*Oryza sativa* L.) Regeneradas *in vitro* a Partir de Callos. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.

Peiró, L. y Estruch, F. 2007. Specific Defects in Different Transcription Complexes Compensate for the Requirement of the NC2 Repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 56:13-21.

Roberts, M. y Okita, T. 1991. Accurate *in vitro* transcription of plant promoters with nuclear extracts prepared from cultured plant cells. Plant Mol Biol. 16:771-786.

- Albert, T., Grise, H., Bost, G., Schreier, A. y Meisner, M. 2007. Global
analysis of the effect of the *Arabidopsis thaliana* on human promoter RNAi. *PLoS*
1(1):10001-10002.
- Bo, M. 1999. Interplay between TRAP and SMCC complex indicates novel pathways
for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell*
3(1):201-210.
- Bohmer, M., Lee, D. K., Dantonel, J. C., Zamboni, K., Roder, R., Torg, J. y
Mansueti, R. 1997. CCAAT binding NF-Y-TBP interaction: NF-YB and NF-YC
regulate such domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP.
Plant Molecular Biology 32(1):217-231.
- Chasman, K. D. 1988. Phospholipase activity during plant growth and development
in response to environmental stress. *Trends Plant Sci.* 1:478-58.
- Flynn, P., Davis, E. y Acherman, S. 1987. Partial purification of plant transcription
factor II. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 248:184-194.
- Hampsey, J. P. y Reinberg, D. 1992. RNA Polymerase II as a control point for
multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 8:132-139.
- Liming, S., Schumaker, K. y Kang, S. 2002. Cell signaling during cold, drought and
salt stress. *The Plant Cell* 13:185-187.
- Lomon, B. y Tian, R. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription
factors for gene control. *Genes Dev.* 14:2581-2589.
- Matsuda, B., Grise, H., Boyer, M., Yavuz, S. y Geiger, J. 2007. The nuclear
receptor element antagonizes repression of TATA-directed transcription by
negative coactivator NC2. *The Journal of Biological Chemistry* 282:789-795.
- Muller, E. y Roder, R. 2000. Transcription regulation through Mediator-like
complexes in yeast and higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* 25:277-283.
- Muller, R., Fink, M., Wenzel, M. y Mordijk, J. 1999. Variational transcriptional
control of the *Arabidopsis thaliana* (L.) *Regeneron* in vitro in *Plant de Calce*
Plant de Calce AgriGenes UNK.
- Priest, L. y Eickbush, F. 2007. Specific defects in different transcription complexes
contribute to the repression of the NC2 repressor in *Saccharomyces*
Yeast 26:13-21.

Perspectivas

Los resultados de este trabajo aportan un avance en la investigación de NC2, sin embargo es necesario seguir estableciendo las bases del comportamiento del factor transcripcional NC2 con respecto a los promotores TATA (su mutación y variaciones) y TATA less obtenidos aquí.

Mediante ensayos de transcripción *in vitro* se establecerá que promotor resulta tener más afinidad o interacción con NC2 y que mecanismos de acción tendría con TFIID. Con respecto a las variaciones de TATA, que parte del promotor es el que conduce la transcripción y si éstos elementos son indispensables para llevar a cabo una represión por NC2 (caracterización del promotor). Además de determinar la interacción con otras proteínas como activadores, miembros del mediador o subunidades de la ARN polimerasa.

En un futuro el entendimiento de los mecanismos de acción de NC2 permitirá esclarecer como se modulan los genes y ayudará a entender mejor el mecanismo de iniciación de la transcripción.

Los resultados de este trabajo aportan un avance en la investigación de NC2, sin embargo es necesario seguir estableciendo las bases del comportamiento del factor transcripcional NC2 con respecto a los promotores TATA (su mutación y variaciones) y TATA-less obtenidos aquí.

Mediante ensayos de transcripción *in vitro* se establecerá que promotor resulta tener más afinidad o interacción con NC2 y que mecanismos de acción tendría con TFIID. Con respecto a las variaciones de TATA, que parte del promotor es el que conduce la transcripción y si estos elementos son indispensables para llevar a cabo una expresión por NC2 (caracterización del promotor). Además de determinar la interacción con otras proteínas como activadores, miembros del mediador o subunidades de la ARN polimerasa.

En un futuro el entendimiento de los mecanismos de acción de NC2 permitirá reconocer como se modulan los genes y ayudará a entender mejor el mecanismo de iniciación de la transcripción.

ANEXO 1

Los factores transcripcionales y las enfermedades

Diana K. Guillén Maldonado¹, Enrique Castaño de la Serna¹

¹Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo., Mérida, Yuc, Méx.

CP 97200. Tel: (52) 999 981 39 14;

diana@cicy.mx.

enriquec@cicy.mx

Aceptado para su publicación en la revista Ciencia (Academia Mexicana de Ciencias).

La síntesis proteica comienza con la separación de la molécula de ADN en sus dos hebras. En un proceso llamado transcripción, una parte de la hebra paralela actúa como plantilla para formar una nueva cadena que se llama ARN mensajero o ARNm, el ARN se diferencia estructuralmente del ADN en el azúcar, que es la ribosa y en una base, el uracilo, que reemplaza a la timina. Además el ARN es una cadena sencilla y el ADN es una cadena doble. El ARNm sale del núcleo celular y se acopla a los ribosomas, unas estructuras celulares especializadas que actúan como centro de síntesis de proteínas. Los aminoácidos son transportados hasta los ribosomas por otro tipo de ARN llamado de transferencia (ARNt). Se inicia un fenómeno llamado traducción que consiste en el enlace de los aminoácidos en una secuencia determinada por el ARNm para formar una molécula de proteína. La transcripción consta de tres pasos iniciación, elongación y terminación, éstos son puntos regulatorios de la formación del ARN.

La transcripción o formación de ARN mensajeros esta muy regulado en las células, para entender este proceso lo podríamos ver como si fuera una fábrica de galletas. En una fábrica en donde se elaboran galletas, se requiere de una receta, ingredientes y los trabajadores éstos tienen que estar coordinados y trabajar eficientemente para producir una galleta bien elaborada. En una célula la receta sería el ADN, los trabajadores son los factores transcripcionales y la ARN polimerasa, los ingredientes son los ribonucleótidos y la galleta es el ARN mensajero éste contiene la información necesaria para ser traducido a una proteína. La información en nuestras células generalmente fluye en el orden de la forma almacenada de la información (ADN) hacia una forma funcional (ARN) y, por último, hacia el producto final la proteína, este orden es usado por todos los organismos. En una célula se requiere de muchos trabajadores o factores transcripcionales y de una ARN polimerasa para producir un ARN mensajero que es el ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del ADN y se utiliza para la síntesis de proteínas, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos, tal y como sucede en la elaboración de las galletas, un equipo de personas están encargadas de seguir al pie de la letra la receta y de preparar la pasta con los ingredientes seleccionados y en las cantidades exactas.

Los trabajadores o factores transcripcionales y la ARN polimerasa son indispensables para llevar a cabo la transcripción, tienen que trabajar de manera coordinada y precisa para que fabriquen un ARN mensajero. Los factores transcripcionales se nombran de acuerdo a la función que ejercen: Los *basales* o generales siempre son requeridos para producir el ARN mensajero y ayudan a la ARN polimerasa a unirse al ADN de manera específica. *Activadores* o *represores* los cuales son capaces de incrementar la afinidad de la ARN polimerasa por el templado específico o disminuir esta interacción. *Coactivadores* reúnen a los factores de transcripción específicos con la ARN polimerasa y otras proteínas asociadas. La ARN polimerasa es una enzima que une monómeros (ribonucleótidos) del entorno y forma el ARN, ella necesita los ingredientes ATP, CTP, GTP y UTP que son nucleósidos trifosfatos (rNTPs).

Como actúan los trabajadores generales de la transcripción

Para elaborar un ARN mensajero en la célula se requiere de la formación de un grupo de trabajadores unidos en sitios específicos al ADN y si esto no se lleva a cabo no se da la transcripción, los trabajadores celulares son: la enzima ARN polimerasa II y siete factores transcripcionales (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH y TFIIJ) el trabajador TFIID consta de muchas subunidades una de ellas es TBP importante porque es la única que se une al ADN de manera específica y esto permite que las otras proteínas antes mencionadas se integran para formar un grupo (complejo de inicio de la transcripción) capaz de iniciar la transcripción, en caso de que el grupo no se forme invariablemente la transcripción no se llevará a cabo (Maldonado y cols. 1999) (figura1).

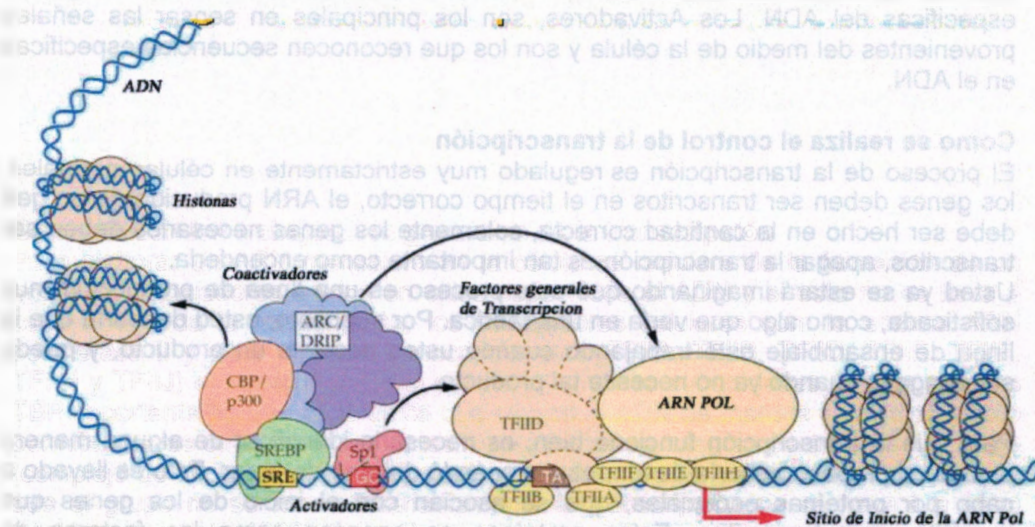


Figura 1. En el proceso de transcripción participan varios complejos proteicos, siendo el principal la enzima ARN Polimerasa II, participan también varias secuencias regulatorias contenidas en el propio ADN, grupos complejos de activadores, factores de transcripción y la propia interacción de las histonas, proteínas que, asociadas en grupos de 8 (octámeros) se asocian al ADN para constituir los nucleosomas.

Como actúan los trabajadores represores de la transcripción

Sin embargo, en la célula existen factores transcripcionales que son capaces de evitar la formación del complejo de inicio de la transcripción, nombradas represoras de la transcripción, en la fábrica de galletas cuando una o varias personas faltan y son las encargadas de realizar la mezcla de los ingredientes esto no podrá llevarse a cabo y por lo consiguiente no habrá pasta para la elaboración de la galleta.

Un ejemplo de una proteína represora de la transcripción es la proteína denominada NC2 (cofactor negativo dos), ésta impide la formación del complejo de inicio de la transcripción uniéndose al grupo formado por TBP y ADN e inhibe la asociación de los ingredientes celulares para la transcripción, TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIF y la polimerasa II (Kim *et al.*, 1995).

Como actúan los trabajadores coactivadores de la transcripción

Los coactivadores funcionan de diversas maneras, algunos de ellos incrementan la estabilidad del complejo de transcripción basal, otros liberan proteínas represoras y proteínas que bloquean o no permiten accesibilidad al ADN como son las histonas. En los últimos años un gran número de coactivadores han salido a la luz, tales como los Mediadores, CRISP, y DRIP, etc, todo este conjunto de proteínas ayudan a transmitir la señal de que los activadores se encuentran unidos en regiones específicas del ADN. Los Activadores, son los principales en sensar las señales provenientes del medio de la célula y son los que reconocen secuencias específicas en el ADN.

Como se realiza el control de la transcripción

El proceso de la transcripción es regulado muy estrictamente en células normales, los genes deben ser transcritos en el tiempo correcto, el ARN producido de un gen debe ser hecho en la cantidad correcta, solamente los genes necesarios deben ser transcritos, apagar la transcripción es tan importante como encenderla.

Usted ya se estará imaginando que este proceso es una línea de producción muy sofisticada, como algo que vería en una fábrica. Por supuesto, usted desearía que la línea de ensamblaje esté trabajando cuando usted necesite un producto, y pueda ser apagado cuando ya no necesite tal producto.

Para que la transcripción funcione bien, es necesario identificar de alguna manera cuándo el proceso debería de empezar y cuándo debería de parar. Esto es llevado a cabo por proteínas especiales, que se asocian con el inicio de los genes que necesitan ser transcritos. Estas proteínas se conocen como los factores de transcripción.

El proceso de la transcripción está dividido en varias etapas:

1. El factor de transcripción reconoce el inicio (el promotor) de un gen que necesita ser transcrito.
2. La enzima que hace el ARN (la ARN polimerasa) se une con el factor de transcripción y reconoce la región del inicio.
3. La enzima procede a lo largo del ADN, haciendo una copia hasta que llega al final del gen.
4. La enzima se cae y el ARN es liberado. Este proceso de copia puede ser repetido varias veces. Si el ARN codifica para una proteína, éste será exportado del núcleo y llevado al citosol.

Porque tiene importancia estudiar los factores de transcripción

La actividad inapropiada de los factores de transcripción ha sido identificada en casi todos los tipos de cánceres que se conocen hasta la fecha. Como estos factores son esenciales para la actividad correcta de las células, un componente errático puede

tener efectos desastrosos para todas las otras partes de la célula. Regresando a la analogía de la línea de la producción, un factor de transcripción errático o que no esté puede causar que la preparación de la pasta sea incorrecta y que se forme muchas galletas de esa pasta, creando demasiado producto no adecuado.

No hay duda alguna que los factores transcripcionales de los genes codificantes de proteínas son de crucial importancia en el control del crecimiento y la diferenciación de las células, muchos de ellos están codificados por protooncogenes. Los protooncogenes son una familia de genes normales que codifican proteínas implicadas en las vías de crecimiento y división de las células que al activarse o mutar se pueden alterar la velocidad transcripcional o la calidad de las proteínas fisiológicas desencadenando un proceso oncológico (cáncer).

Existen enfermedades en las que se ven implicados algunos de estos factores transcripcionales, habiéndose ya identificado la mutación o la falla molecular en el factor transcripcional involucrado, entre las cuales se pueden mencionar la aniridia, el síndrome de Rubinstein-Taybi y enfermedad de Hodgkin.

El conocimiento a nivel molecular del proceso de transcripción ayudará a comprender mejor la relación que tiene éste con el desarrollo y la salud de los individuos, así como a encontrar nuevos tratamientos para las enfermedades.

Pueden tener aplicaciones medicas como el caso del virus del SIDA, si se encontrara un agente inhibidor que reconociese a un factor de transcripción del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), no factores transcripcionales humanos, se podría detener la replicación del virus, además se podría tener aplicaciones oncológicas (cáncer).

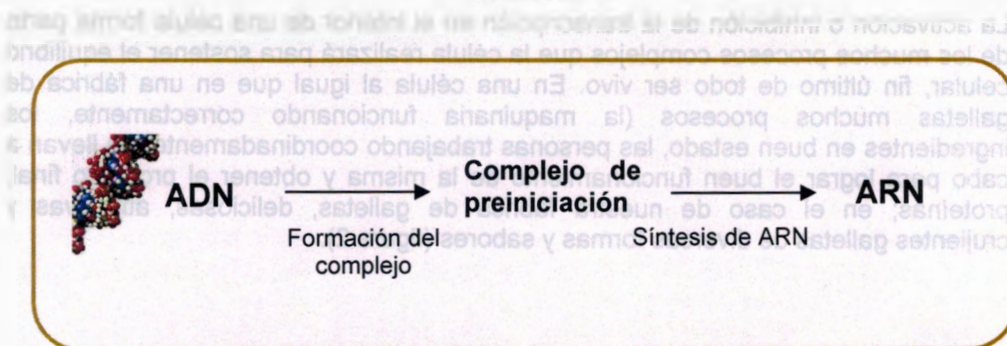
La activación o inhibición de la transcripción en el interior de una célula forma parte de los muchos procesos complejos que la célula realizará para sostener el equilibrio celular, fin último de todo ser vivo. En una célula al igual que en una fábrica de galletas muchos procesos (la maquinaria funcionando correctamente, los ingredientes en buen estado, las personas trabajando coordinadamente) se llevan a cabo para lograr el buen funcionamiento de la misma y obtener el producto final, proteínas; en el caso de nuestra fábrica de galletas, deliciosas, atractivas y crujientes galletas de diversas formas y sabores (figura 2).

FÁBRICA DE GALLETAS



En una fábrica de galletas en donde los pasos necesarios son tener la receta, mezclar los ingredientes para dar lugar a la pasta, ésta colocarla en moldes, para hornear y obtener la galleta.

CÉLULA



En una célula, se requiere del ADN, de varias proteínas que unidas al ADN forman un complejo de preiniciación necesario para la síntesis del ARN.

Figura 2. En la fábrica de galletas así como también en una célula se requieren de una serie de pasos necesarios y ordenados para llevar con éxito la formación de una galleta o del ARN, respectivamente.

Referencias

Kim, T., Zhao, Y., Ge, H., Bernstein, R. y Roeder, R. 1995. Tata-binding Protein Residues Implicated in a Functional Interplay between Negative Cofactor NC2 (DR1) and General Factores TFIIA and TFIIB, The Journal of Biological Chemistry. 270(18):10976-10981.

Maldonado, E., Hampsey, M. y Reinberg, D. 1999, Repression: Targeting the Heart of the Matter, Cell. 99:455-458.

References

- Kim, T., Zhao, Y., Ge, H., Bernstein, R., y Roeder, R. 1995. Tata-binding Protein Residues Implicated in a Functional Interplay between Negative Coactivator NCoR (DR1) and General Factors TFIIA and TFIIB. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(18):10976-10987.
- Mattonado, E., Hampsey, M., y Reinberg, D. 1999. Repression: Targeting the Heart of the Matter. *Cell*. 99:455-458.

ANEXO 2

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Soluciones y reactivos

BC100:

10% de glicerol
20 mM Tris HCl pH 8.3
1 mM de EDTA pH 8.0
100 mM de NaCl
200 µl de beta – mercaptoetanol
4 mM PMSF
Tritón 0.01%

Buffer de elución o BC400:

20 mM de Tris HCl pH 7.9
400 mM de KCl
4 mM de PMSF
250 mM de Imidazol
20 % de glicerol

EXTRACCIÓN DE ADN

Soluciones y reactivos

Buffer de extracción: 100 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM de EDTA (pH 8), 500 mM NaCl, 2% SDS, 2 % beta-mercaptoetanol. Autoclavear y adicionar 10% PVP para una concentración de 1%.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Soluciones y reactivos

Buffer de homogenización:

200 mM de Tris base
390 mM de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
10 mM MgSO_4
20% glicerol
5 mM EGTA
0.15 mM spermina
0.5 mM de spermidina

Buffer de resuspensión:

10 mM PMSF
25 mM de Hepes-KOH
20% de glicerol
mM de EDTA
50 mM KCl
0.5 mM DTT

Buffer de diálisis:

50 mM Hepes-KOH, pH 7.9
20% glicerol
10 mM de EGTA
10 mM MgSO_4
5 mM de DTT
1 mM de PMSF

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Soluciones y reactivos

BC400:

10% de glicerol
20 mM Tris HCl pH 8.3
1 mM de EDTA pH 8.0
100 mM de NaCl
200 μl de beta-mercaptoetanol
4 mM PMSF
1 μM DTT

Buffer de elución o BC400:

20 mM de Tris HCl pH 7.9
400 mM de KCl
4 mM de PMSF
100 mM de imidazol
20% de glicerol

EXTRACCIÓN DE ADN

Soluciones y reactivos

Buffer de extracción: 100 mM Tris HCl (pH 8), 50 mM de EDTA (pH 8)
NaCl 2M 2% beta-mercaptoetanol. Autoclavar y adicionar 10%
una concentración de 1%.

WESTERN BLOT

Soluciones y reactivos

Buffer de transferencia

Tris-HCl 3g
Glicina 14.4 g
Metanol 200 mL
Volumen total de un litro

Buffer TBS-L

NaCl 150 mM
Tris-HCl 50 mM
Tween 20 0.1%
Aforar a un litro con agua
Ajustar pH 7.5 con HCl

PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12%

Soluciones y reactivos

Buffer de electroforesis 10 x (trizma base 250 mM, Glicina 1.91 M, 1% SDS).
Buffer de carga Laemmli 3x (LSB x3) (4 ml Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8, 12 ml de glicerol 100%, 4 ml de SDS 30 %, 1 mg de azul de bromofenol (PBP), se ajusta a 20 ml con agua destilada)
Buffer de LSB x3 con beta-mercaptoetanol al 15%
Gel de separación (acrilamida 7.5-12%, Bis-N, metil-bis-acrilamida al 0.27%, 0.043% APS, TEMED 2.2 mM)
Gel de empaquetamiento (acrilamida 3.3 Bis-N, metilen-bis-acrilamida al 0.088%, 0.1% APS, 0.1% SDS, TEMED 6.6 mM).

Germinación de semillas de arroz

Solución de Hoagland's

Solución A:
280 mg H_3BO_3
340 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$
10 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
22 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
10 mg $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$
Ajustar a 100 mL con agua

Almacenar a 4 °C

Solución B:

0.5 mL H_2SO_4 concentrado

Ajustar a 100 mL

Almacenar a 4 °C

Solución C:

3.36 g Na_2EDTA

2.79 g FeSO_4

Ajustar a 400 mL

Calentar la solución a 70°C

Almacenar a 4 °C

Solución Hoagland's (10x):

4.7 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

2.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.3 g KNO_3

0.6 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

5 mL solución A

0.5 mL solución B

Ajustar a 500 mL

Preparación

Soluciones concentradas:

Solución A: Concentración 1000 X Volumen. 50 mL

Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 22.0 g

Solución B: Concentración 1000X. Vol.: 50 M

Yoduro de Potasio KI 41.50 MG

Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.25 mg

Solución C. 1 50 M

Concen. 400 X Vol.