



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA
PROTEÍNA DE SECRECIÓN DE LAS CÉLULAS CLARA DE
HÁMSTER (*Mesocricetus auratus*), MEDIANTE LOS
ELEMENTOS GENÉTICOS EN CIS GATA Y ETS

T E S I S

Q U E P R E S E N T A :

B. E. MARCO ALLÁN PÉREZ SOLIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TUTOR: DR. RUBÉN GUTIERREZ SAGAL

TUTOR: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

ASESORA: DRA. ANA MARÍA PASAPERA LIMÓN

ASESOR: M. BE. JOAQUÍN FERNANDO HERRERA MUÑOZ

MEXICO, D. F.

JUNIO 2004

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de Postgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0; y actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACYT con número 169561.

AGRADECIMIENTOS

Todo mi agradecimiento a mi tutor, Dr. Rubén Gutiérrez Sagal, por haberme dado la oportunidad de incorporarme como alumno en su línea de investigación y por haber invertido su tiempo, paciencia y esfuerzo en mi preparación tanto teórica como practica para lograr concluir mi tesis de maestría.

También agradezco al Dr. Edmundo Bonilla González, la Dra. Ana M. Pasapera Limón y el M. en BE. Joaquín F. Herrera Muñoz por el apoyo y las sugerencias tan oportunas que me brindaron durante cada fase de mi proyecto de investigación.

Muchas gracias a mi Papá por haberme comprendido y apoyado sin titubear durante toda mi carrera. A Marisol y Lilliane por haberme animado siempre que me sentí cansado y deprimido. Gracias a Adriana por comprender y soportar mis malos ratos; así como por la ayuda incondicional que siempre me brindaste.

Mil gracias a mis compañeros y amigos de la UIMMR: Tere, Aleida, Héctor, Pilar, David, Pablo, Laura y Sandra, por el apoyo técnico y la sincera amistad que me extendieron desde que llegue a la unidad.

Y gracias a Dios por todo lo que me ha dado.

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE
LA PROTEÍNA DE SECRECIÓN DE LAS CÉLULAS
CLARA DE HÁMSTER (*Mesocricetus auratus*),
MEDIANTE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS EN CIS
GATA Y ETS.

TESIS QUE PRESENTA EL

BIOL. EXP. MARCO ALLÁN PÉREZ SOLIS

Para optar por el grado de

Maestro en Biología Experimental

Tutor

Dr. Rubén Gutiérrez Sagal

Tutor

Dr. Edmundo Bonilla González

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

COMITÉ TUTORAL

Tutor

Dr. Rubén Gutiérrez Sagal

Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva

Hospital de Ginecobstetricia No. 4 IMSS

sagalrub@hotmail.com

Tutor

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud

UAM-I

munido@xanum.uam.mx

Asesora

Dra. Ana María Pasapera Limón

Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva

Hospital de Ginecobstetricia No. 4 IMSS

apasaper@chem.ucsd.edu

Asesor

M. BE. Joaquín Fernando Herrera Muñoz

Departamento de Ciencias de la Salud

UAM-I

johe@xanum.uam.mx

INDICE

	pag.
1. Introducción. _____	1
1.1. La proteína de secreción de las células Clara (PSCC) actúa como una molécula anti-inflamatoria en el pulmón de mamíferos. _____	2
1.2. La regulación transcripcional del gen de la PSCC en el pulmón. _____	5
1.3. Los factores de transcripción de la familia GATA desempeñan un papel importante en el desarrollo y diferenciación del pulmón de mamíferos. _____	6
1.4. Factores de transcripción de la familia de Ets involucrados en el desarrollo y diferenciación del pulmón de mamíferos. _____	7
1.5. El promotor de la PSCC de hámster (PSCCh) contiene elementos genéticos en <i>cis</i> para los factores de transcripción de las familias GATA y Ets. _____	8
2. Justificación. _____	10
3. Hipótesis. _____	13
4. Objetivos. _____	14
5. Materiales y Métodos. _____	15
5.1. Preparación de las construcciones génicas. _____	16
5.2. Mutación sitio dirigida. _____	17
5.3. Cultivo celular y análisis de la expresión transitoria. _____	25
5.4. Extracción de ARN total. _____	25
5.5. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante y transferencia a papel. _____	26
5.6. Detección del ARN mensajero (ARNm) del factor GATA-2. _____	26
5.7. Clonación del factor de transcripción humano GATA-2. _____	26

5.8. Inmunodetección del factor hGATA-2 en células COS-7. _____	27
5.9. Ensayos de expresión transitoria con pTarget-hGATA-2 en células NCI-h441. ____	29
5.10. Preparación de los extractos nucleares. _____	29
5.11. Análisis de retardo en la movilidad electroforética (EMSA). _____	30
5.12. Inmunodetección del factor hGATA-2 en NCI-H441 silvestre y transfectadas con pTarget-hGATA-2. _____	31
5.13. Análisis estadístico. _____	31
6. Resultados. _____	32
6.1. Los elementos genéticos GATA y Ets regulan la transcripción del gen de la PSCCh. _____	33
6.2. Detección del ARNm del factor GATA-2 en diferentes líneas celulares mediante <i>Northern Blot</i> . _____	35
6.3. Clonación del factor de transcripción humano GATA-2. _____	37
6.4. GATA-2 regula la transcripción del gen de la PSCCh en células NCI-H441. _____	42
6.5. Análisis del elemento genético GATAp del promotor de la PSCCh. _____	44
6.6. Interacción del factor de transcripción GATA-2 con los elementos GATA distal y proximal. _____	47
6.7. Inmunodetección del factor de transcripción humano GATA-2 en células NCI-H441. _____	50
7. Discusión. _____	52
8. Conclusiones. _____	57
9. Bibliografía. _____	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La proteína de secreción de las células Clara (PSCC) actúa como una molécula anti-inflamatoria en el pulmón de mamíferos.

El pulmón se comunica con el medio ambiente a través de un epitelio continuo y heterogéneo. Los conductos proximales de las vías respiratorias están cubiertos con un epitelio estratificado que se reemplaza progresivamente por una capa sencilla de células cuboidales en las vías aéreas distales y por un recubrimiento epitelial muy delgado que recubre una área de más del 95% de la superficie del pulmón en los alvéolos. A lo largo de las vías respiratorias existen numerosos tipos celulares, entre las que destacan células ciliadas, basales, cálices y de Clara, sin embargo únicamente las células alveolares tipo I (escamosas) y las alveolares tipo II (cuboidales), recubren la extensa superficie de los alvéolos pulmonares (Breeze y Wheeldon, 1977).

La función principal del pulmón, a través de su epitelio alveolar, es la de proveer una delgada y enorme superficie para el intercambio de gases. Sin embargo el epitelio alveolar también desempeña otras funciones que sirven, básicamente, para preservar la capacidad de intercambio gaseoso. Además provee de una barrera de protección contra el medio ambiente al rechazar los agentes extraños inhalados y también controlando el movimiento de solutos y agua lo que contribuye al mantenimiento del balance de fluidos en el pulmón. El epitelio pulmonar también desempeña un papel importante en el metabolismo de mediadores endógenos y agentes xenobióticos y es capaz de regenerarse, permitiendo de esta manera el recambio celular y la restauración de las funciones de las vías aéreas y alveolares después de alguna agresión patológica (Lund *et al.*, 1988). El epitelio pulmonar produce secreciones complejas entre las que se encuentran un recubrimiento mucoso, un agente de superficie activo (surfactante), así como también varias proteínas importantes para la defensa del organismo (Hermans y Bernard, 1999).

El epitelio pulmonar secreta diferentes proteínas a la superficie del tracto respiratorio, entre las que destacan la proteína de secreción de las células Clara (PSCC), las proteínas del surfactante pulmonar A, B, C y D y diversas mucinas (Weaver y Whitsett, 1988; Weaver y Whitsett, 1991). La síntesis y secreción de algunas de estas proteínas se modifica considerablemente en algunas patologías del pulmón o en personas que se exponen a productos tóxicos para el pulmón. La mayoría de estas proteínas son productos específicos del tracto respiratorio y pueden utilizarse como marcadores de las diferentes enfermedades del pulmón o del daño ocasionado por un gran número de productos tóxicos que se inhalan durante el proceso respiratorio (Pescetti *et al.*, 1980; Jeffery, 1987; Boggaram, 2003).

La PSCC, también conocida como uteroglobina, es una proteína de secreción, globular, homodimérica, de bajo peso molecular (16 kD), que fue detectada por primera vez en el fluido uterino de las conejas preñadas (Krishnan y Daniel, 1967; Beier, 1968). Posteriormente, también se detectó en el pulmón de varias especies de mamíferos. La PSCC está compuesta de dos subunidades idénticas de 70 aminoácidos, unidas por dos puentes disulfuro de forma antiparalela y por otros enlaces no covalentes (Miele *et al.*, 1994), se sintetiza como un precursor que lleva un péptido señal de 21 aminoácidos en el extremo amino terminal, el cual se corta durante su procesamiento intracelular (Miele *et al.*, 1987). Los estudios de difracción de rayos X de la PSCC de conejo (Morize *et al.*, 1987), de rata (Umland *et al.*, 1992; Hard *et al.*, 1995) y de humano (Umland *et al.*, 1994) han demostrado que estas proteínas son muy similares en su estructura tridimensional. Cada monómero está compuesto por cuatro hélices- α que interaccionan entre sí formando una cavidad hidrofóbica en el interior de la proteína. Los residuos involucrados en la formación de esta cavidad están muy conservados entre las PSCCs de las diferentes especies y los pocos cambios que se observan han sido sustituciones conservativas. El ADNc de la PSCC de conejo (Chandra *et al.*, 1981), liebre (Lopez de Haro y Nieto, 1986), humano (Singh *et al.*, 1988), rata (Nordlund-Moller *et al.*, 1990), ratón (Margraf *et al.*, 1993), hámster (Gutierrez Sagal y Nieto, 1998) y cerdo (Gutierrez-Sagal y Nieto, 1998) han sido clonados y secuenciados. El gen de la PSCC existe en copia única y está formado por tres exones y dos intrones (Suske *et al.*, 1983; Hagen *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1992; Ray *et al.*, 1993).

Diversos estudios inmunocitoquímicos (Aumuller *et al.*, 1985) y de hibridación *in situ* (Warembourg *et al.*, 1986) en el pulmón de mamíferos, han demostrado que la PSCC y su ARNm sólo se detectan en las células Clara de los alvéolos pulmonares, una estirpe celular no ciliada que desempeña un papel importante en el metabolismo de ciertas toxinas químicas y carcinogénicas (Boyd, 1977). En este órgano los glucocorticoides estimulan la síntesis y secreción de la PSCC (Torkkeli *et al.*, 1978) y existen datos que indican que esta regulación puede ser a nivel transcripcional (Fernandez-Renau *et al.*, 1984). Además, se ha demostrado que existen sitios de unión para el receptor de glucocorticoides en el promotor del gen de la PSCC, situados a 2.6 kb del sitio de inicio de la transcripción (Cato *et al.*, 1984). La extirpación de las glándulas suprarrenales provoca una reducción de aproximadamente el 50% en la concentración de ARNm de la PSCC de pulmón de rata y hámster, mientras que la administración de glucocorticoides exógenos reestablece la concentración normal de este mensajero (Hagen *et al.*, 1990; Gutierrez Sagal y Nieto, 1998). La síntesis y secreción de la PSCC también es inducida por citocinas pro-inflamatorias entre las que se incluye el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina-13 y el interferón γ (Mukherjee *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Esta proteína desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios del pulmón de mamíferos inhibiendo la actividad de la fosfolipasa A₂, una enzima clave en el proceso pro-inflamatorio (Andersson *et al.*, 1994; Chowdhury *et al.*, 2000). La actividad anti-inflamatoria de la PSCC es más evidente en ratones deficientes de esta proteína, generados por recombinación homóloga (ratones *knockout*), en ellos se incrementa la susceptibilidad a la inflamación de las vías respiratorias causada por virus, bacterias, alérgenos (Wang *et al.*, 2003) y productos químicos como el ozono y se registran respuestas inflamatorias exacerbadas (Stripp *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2001). Siendo la PSCC una molécula anti-inflamatoria potente, su uso potencial como un agente terapéutico podría tener gran importancia en el tratamiento de algunas de las enfermedades inflamatorias del pulmón.

1.2. La regulación transcripcional del gen de la PSCC en el pulmón

La abundante expresión del gen de la PSCC en el pulmón de mamíferos y su participación en los procesos inflamatorios como molécula anti-inflamatoria, han despertado un profundo interés, por lo cual se han dedicado considerables esfuerzos para dilucidar los elementos genéticos y los factores de transcripción específicos de tejido involucrados en la regulación de su expresión. A este respecto, se ha logrado avanzar en la elucidación de algunos de sus elementos en *cis* y de su interacción con factores de regulación transcripcional ubicuos, así como específicos de tejido (Miele *et al.*, 1994; Hackett *et al.*, 1996; Scholz *et al.*, 1999). Se han identificado varias regiones del promotor de la PSCC protegidas de la digestión con ADNasa I por extractos nucleares de células pulmonares (Stripp *et al.*, 1992; Bingle y Gitlin, 1993; Stripp *et al.*, 1994). El análisis de una de estas regiones que se extiende desde -76 hasta -175 pb en el promotor de la PSCC de rata, ha revelado varias secuencias específicas que interaccionan con el factor nuclear de hepatocitos-3 (HNF-3), con la proteína de unión de octámeros (Oct-1), con proteínas de la familia AP-1 (Jun B y Fra I) (Bingle y Gitlin, 1993; Sawaya *et al.*, 1993); con el factor de transcripción tiroideo I (TTF-1) (Cassel *et al.*, 2002) y con el factor CCAAT/*Enhancer Binding Protein* (C/EBP) (Cassel *et al.*, 2000). En los promotores de las PSCCs de ratón, humano, conejo y hámster también existe una región equivalente a la región I del promotor de la rata muy conservada. La eliminación de esta región disminuye la actividad del promotor de la PSCC de rata en análisis de expresión transitoria y en ratones transgénicos (Sawaya y Luse, 1994; Bingle *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 1995). Otra de las regiones protegidas en el promotor de la PSCC de rata está centrada alrededor de -200 pb (región II) (Stripp *et al.*, 1992; Stripp *et al.*, 1994). Esta región, a diferencia de la anterior, tiene poca homología con las regiones equivalentes de los promotores de las otras especies, es rica en G/C y su eliminación también disminuye la actividad del promotor en las células NCI-H441 (Suske *et al.*, 1982; Sawaya *et al.*, 1993; Sawaya y Luse, 1994). Las proteínas que interactúan con esta región aún no han sido identificadas (Stripp *et al.*, 1992).

También han surgido evidencias que demuestran una baja expresión de la PSCC, cuando se producen las primeras distinciones entre las porciones conductoras y respiratorias del pulmón fetal (Ten Have-Opbroek, 1981; Otto-Verberne y Ten Have-Opbroek, 1987; Nord *et al.*, 1992; Strum *et al.*, 1992). Sin embargo, después del día 18 *postcoitum* se aprecia un aumento progresivo en la expresión de la PSCC, que coincide con el proceso de diferenciación de las células Clara (Massaro *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1986; Nord *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 1993) y con la expresión de factores de transcripción importantes para su transcripción tales como TTF-1, HNF-3 y C/EBP (Cao *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995; Cassel *et al.*, 2000; Nord *et al.*, 2000). Estos factores son capaces de inducir positiva y cooperativamente la transcripción de la PSCC durante el desarrollo embrionario del pulmón (Singh *et al.*, 1986; Van Winkle *et al.*, 1996; Cassel *et al.*, 2000). Sin embargo, aún quedan espacios temporales que anteceden la expresión embrionaria de TTF-1, HNF-3 y C/EBP que aún no han sido explicados; lo cual sugiere que la expresión de la PSCC es gobernada por otros factores de transcripción aún sin determinar, que comparten la tarea de regulación con TTF-1, HNF-3 y C/EBP.

1.3. Los factores de transcripción de la familia GATA desempeñan un papel importante en el desarrollo y diferenciación del pulmón de mamíferos.

La familia GATA de factores de transcripción es un grupo de reguladores de la transcripción muy conservados desde el punto de vista evolutivo, desempeña un papel importante en el desarrollo y la diferenciación celular de una amplia variedad de organismos que van desde los hongos hasta los humanos y es crucial en la expresión de genes célula-específicos en varios tejidos. Seis factores de transcripción GATA han sido identificados en vertebrados, cada uno de los cuales contiene un dominio de unión al ADN muy conservado, que consiste de dos dedos de zinc con la estructura Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys (Evans y Felsenfeld, 1989; Tsai *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1990; Arceci *et al.*, 1993; Laverriere *et al.*, 1994; Morrissey *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Morrissey *et al.*, 1997) que se unen a la secuencia de nucleótidos (A/T)GATA(A/G) (Ko y Engel, 1993; Merika y Orkin, 1993). Esta familia ha sido dividida en dos subfamilias, en base a sus patrones de expresión. En la primera subfamilia se encuentra GATA-1, 2 y 3 que son expresados principalmente en las células hematopoyéticas, donde desempeñan funciones involucradas en la diferenciación

celular. La segunda subfamilia esta integrada por los genes GATA-4, 5 y 6, que son expresados en varios tejidos derivados de endodermo y mesodermo tales como corazón, hígado, pulmón, gónada e intestino; donde desempeñan funciones importantes en la regulación de la expresión genética tejido-específica (Molkentin, 2000).

El factor de transcripción humano GATA-1 interactúa con 8 pb cuando se une al ADN. Las porciones central y amino terminal del dominio de unión al ADN de GATA-1 hace contactos específicos con el surco mayor, mientras la porción carboxilo terminal hace interacciones específicas con el surco menor (Omichinski *et al.*, 1993). Mientras que el dedo de zinc carboxilo terminal de GATA-1 es requerido para la unión específica al ADN, el dedo amino terminal puede interactuar tanto con secuencias específicas del ADN adyacentes al núcleo del sitio GATA, como con proteínas coreguladoras (Trainor *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997). Este factor de transcripción posee una señal de localización nuclear que está presente en el dominio básico adyacente al dedo carboxilo terminal, y además dos dominios de activación transcripcional en el extremo amino terminal de la proteína (Morrisey *et al.*, 1997). Interesantemente, estos dominios de activación transcripcional están parcialmente conservados en los factores GATA 5 y 6, sugiriendo un mecanismo similar de activación transcripcional en la segunda subfamilia (Morrisey *et al.*, 1997).

1.4. Factores de transcripción de la familia de Ets involucrados en el desarrollo y diferenciación del pulmón.

Actualmente se han identificado más de 30 genes Ets; lo cual hace de esta familia uno de los grupos más amplios y diversos de factores de transcripción. Los factores Ets pueden funcionar como activadores o como represores transcripcionales de genes diana; dependiendo del contexto celular en el que se encuentren, de la geometría precisa de su sitio de unión en relación a otros elementos regulatorios y de su habilidad para formar complejos con otros reguladores transcripcionales (Silverman *et al.*, 2002). La familia esta definida por un dominio Ets muy conservado (Ko *et al.*, 1999), que codifica un motivo de unión al ADN de estructura hélice-giro-hélice que interactúa específicamente con la secuencia de nucleótidos GGAA (Donaldson *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 1999). Durante el desarrollo embrionario del pulmón los factores de transcripción Ets-1 y 2 se expresan abundantemente; sin embargo, cuando el

pulmón está completamente diferenciado, la expresión de estos dos factores decae súbitamente; lo cual sugiere que Ets-1 y 2 pueden estar involucrados en la expresión de productos génicos importantes para la diferenciación y morfogénesis temprana del pulmón (Bhat *et al.*, 1987).

Interesantemente, se ha descrito que los genes del receptor transmembranal de plaquetas Ib-XI-V y de la glicoproteína específica de megacariocitos y plaquetas GPIIB son regulados por el factor GATA-2 mediante un mecanismo de activación cooperativa con el factor Ets-1. Esta cooperación resulta de la coexistencia de elementos genéticos en *cis* para estos factores en el promotor de los genes mencionados con anterioridad.

1.5. El promotor de la PSCC de hámster (PSCCh) contiene elementos genéticos en cis para los factores de transcripción de las familias GATA y Ets.

A pesar de que algunos de los factores de transcripción de la familia GATA se expresan abundantemente en el pulmón de mamíferos, su función en la regulación de la expresión de genes específicos del pulmón aún no ha sido estudiada ampliamente. El promotor de la PSCCh contiene dos elementos genéticos GATA localizados a -603/-591 pb (5'-GTC**AGATA**AACAC-3') y -117/-97 (5'-AGA**AAGATA**ACCAA-3') con respecto al sitio de inicio de la transcripción, que se han conservado en los promotores del gen de la PSCC de todas las especies descritas hasta ahora. También contiene varios elementos genéticos muy similares a la secuencia consenso para el sitio de unión de factores Ets; estos factores pueden modular la transcripción inducida por los factores de transcripción GATA interaccionando con las secuencias adyacentes al elemento genético GATA (Lemarchandel *et al.*, 1993; Tymms y Kola, 1994; Hashimoto y Ware, 1995). Estos elementos fueron detectados con el programa de computación Mat-Inspector y son por lo tanto, elementos genéticos putativos cuya relevancia y funcionalidad deben ser demostrados experimentalmente.

En este estudio, nosotros examinaremos el papel de los elementos en *cis* GATA y Ets en la regulación de la expresión del gen de la PSCCh, utilizando células epiteliales de pulmón humano en cultivo (NCI-H441), transfectadas con el promotor de la PSCCh fusionado al gen de la luciferasa, para comprender mejor la regulación de su expresión y la importancia de sus interacciones con factores de transcripción determinantes en el desarrollo del pulmón. Estos estudios, junto con los que se realizan en varios promotores específicos del pulmón, tales como los de las proteínas del surfactante pulmonar, proveerán información valiosa sobre los mecanismos de regulación que gobiernan la expresión específica de tejido en el pulmón de mamíferos.

2. JUSTIFICACIÓN

El significativo desarrollo de la Biología Molecular en los últimos veinte años no sólo ha provocado una revolución en todas las áreas de la biología, si no que también ha llevado a plantear posibles aplicaciones en el desarrollo de nuevos tratamientos para un grupo importante de patologías humanas, específicamente aquellas de origen genético.

En muchas de estas patologías la alteración producida en el organismo, ya sea por la ausencia de una proteína determinada o por la presencia de una proteína que, como producto de una mutación, no funciona adecuadamente, podría ser subsanada con la restitución de la información necesaria para que ese organismo produzca esa proteína funcional. Esta restitución de información genética a un organismo con fines terapéuticos es señalada comúnmente como terapia génica.

Las distintas alternativas de terapia génica propuestas descansan fundamentalmente en el conocimiento generado en campos específicos de la investigación básica en biología, como aquellos que estudian los mecanismos que regulan la replicación de los virus que infectan las células de los mamíferos superiores, o los que buscan conocer los mecanismos que regulan la expresión de la información genética en las células que componen los distintos tejidos que constituyen a un organismo superior.

El cómo se regula la expresión de proteínas en forma específica en un tejido o tipo celular de un organismo, está determinado en gran parte por la presencia de secuencias regulatorias en la región promotora de los genes y por su interacción con factores específicos que promueven su expresión en ese y no en otro tejido o tipo celular. La identificación y estudio de esas secuencias regulatorias y de los factores que interaccionan con estas, constituyen por lo tanto, elementos esenciales para la caracterización de un promotor determinado y su posible uso en terapia génica. Esto porque al existir regiones promotoras que determinan la expresión de una proteína, cualquiera sea ésta, en un tejido o tipo celular específico, podrían permitir, con fines terapéuticos, la expresión regulada y restringida en ese tejido o tipo celular de alguna proteína que no esté o no sea funcional en ese organismo.

En lo que respecta al presente proyecto, es de nuestro interés trabajar con los aspectos básicos de la caracterización de secuencias regulatorias en la región promotora de un gen tejido específico y en los mecanismos moleculares responsables de la expresión específica de este gen. Especial atención ha requerido el promotor que controla la expresión del gen de la PSCC, que codifica para una proteína que esta estructuralmente conservada en la filogenia de los mamíferos, expresándose en forma célula-específica en las células Clara del pulmón de mamíferos.

Los resultados de estos estudios sobre la regulación de la expresión del gen de la PSCC pueden ser útiles en el diseño de estrategias para el tratamiento de algunas de las enfermedades respiratorias y pueden usarse junto con la tecnología de animales transgénicos para diseñar nuevos modelos animales que nos permitan estudiar los procesos de daño y reparación pulmonar. La identificación de elementos regulatorios también puede facilitar la terapia génica de algunas de las enfermedades del pulmón, ya que dichos elementos podrían dirigir, con especificidad celular, la expresión *in vivo* de la proteína seleccionada.

3. HIPÓTESIS

Si se registran cambios significativos entre la regulación del promotor de la PSCCh silvestre y el carente de elementos en cis GATA y Ets; entonces estos elementos son funcionales e interaccionan con factores de transcripción que son importantes para la regulación tejido específica en pulmón.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los elementos genéticos en *cis* GATA y Ets del promotor de la PSCCh, son funcionales y si desempeñan un papel importante en su regulación transcripcional, a partir de sus interacciones con elementos en *trans* tejido específicos en pulmón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la actividad de los elementos genéticos en *cis* GATAd, GATAp y Ets del promotor de la PSCCh, mediante ensayos de expresión transitoria en líneas celulares en cultivo (NCI-H441 y HeLa).

Comprobar la interacción de factores en *trans* con los elementos genéticos en *cis* GATA del promotor de la PSCC, mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA) y super-retardo (*super-shift*) con anticuerpos específicos.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Preparación de las construcciones génicas (ver Fig.5.1)

pGL3E-PSCCh0.7 y pGL3B-PSCCh0.7

A partir del promotor de la PSCCh (Gutiérrez Sagal y Nieto, 1998), se amplificó por PCR (Sambrook *et al.*, 1989) un fragmento de 766 pb (PSCCh0.7), usando como cebadores de polimerización, el oligonucleótido 5'-GAGAACTGTCAAGATCTAGAAAG-3' (PSCChpr-5) (Fig. 5.2, 673/695) que contiene un sitio de restricción para *Bgl* II y el oligonucleótido 3'-GGTGTAGGTCTCTTTTCGAATCCGGAGG-5' (PSCChpr-2) (Fig. 5.2, 1413/1438), el cual tiene un sitio de restricción para *Hind* III. El fragmento obtenido se digirió con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Hind* III (Roche Molecular Biochemicals) y se insertó en los plásmidos reporteros pGL3-Enhancer y pGL3-Básico (Promega, Madison WI) digeridos previamente con las mismas enzimas (Fig. 5.3 y 5.4.).

pGL3B-PSCCh0.7 antisentido (as).

El fragmento PSCCh0.7 que se obtuvo por PCR fue insertado en los sitios de restricción del plásmido pGL3-Básico-INV. Este plásmido se construyó con anticipación invirtiendo sus dianas de restricción (*Bg* II y *Hind* III) por mutación sitio-dirigida (ver el apartado de mutagénesis). En este plásmido el fragmento del promotor (PSCCh0.7) se clonó en antisentido al silvestre, con el fin de obtener un control negativo en los experimentos de transfección (Fig 5.5.).

5.2. Mutagénesis Sitio-Dirigida

Mutación del elemento GATA distal (GATAd) (pGL3E-PSCCh0.7/GATAdmut y pGL3B-PSCCh0.7/GATAdmut).

La secuencia 5'-GTCAGGATAAACAC- 3' (Fig 5.2., 790/802) del promotor de la PSCCh tiene una alta homología con la secuencia consenso a la que se unen los factores de transcripción GATA: NNCWGATARNNNN. Esta secuencia fue mutada en las construcciones pGL3E-PSCCh0.7 y pGL3B-PSCCh0.7, usando el oligonucleótido específico 5'-GGTCAAGTCAGGAGCAACACTGAAGTGC-3' (PSCCh-mut/GATAd) (Fig.5.2, 784/810) y su secuencia complementaria y el sistema comercial de mutagénesis sitio-dirigida *QuickChange* (Stratagene). De esta manera se obtuvieron las construcciones mutantes pGL3E-PSCCh0.7GATAdmut y pGL3B-PSCCh0.7GATAdmut.

Mutación del elemento Ets (pGL3E-PSCCh0.7/Etsmut)

La secuencia 5'-AACAGGGAAAATGC-3' (Fig. 5.2., 713/725) del promotor de la PSCCh tiene una alta homología con la secuencia consenso a la que se une el factor de transcripción Ets-1: 5'-RCCGGAAWGY-3'. Esta secuencia se mutó en la construcción pGL3E-PSCCh0.7, utilizando el oligonucleótido 5'-GGAAGGGAAACACCAAAATGCAGAGTG-3' (PSCCh-mut/Ets) (Fig. 5.2., 705/731) y su secuencia complementaria, y el sistema *QuickChange*. De esta manera se obtuvo la construcción mutante pGL3E-PSCCh0.7Ets/mut.

Mutación de los elementos GATAd y Ets (pGL3E-PSCCh0.7-GATAd/Etsmut).

Se diseñó una construcción que contiene las dos mutaciones descritas anteriormente usando como molde la construcción mutante pGL3E-PSCCh0.7/Ets-mut y como cebadores a los oligonucleótidos PSCCh-mut/GATAd y su secuencia complementaria previamente descritos; así como el sistema *QuickChange*.

Mutación del elemento GATA proximal (GATAp) (pGL3E-PSCCh0.7/GATAp-mut).

La secuencia 5'-AGAAGGATAACCAA-3' (Fig. 5.2., 1282/1294) del promotor de la PSCCh también tiene una alta homología con el elemento consenso reconocido por los factores GATA: NNCWGATARNNNN. El núcleo de este elemento fue mutada a través de mutación sitio dirigida con el oligonucleótido 5'-CCACAGAGAAGGAGCACCAAGTAAATA-3' (PSCChmut-GATAp) (Fig. 5.2., 1276/1301) y su secuencia complementaria como cebadores y el sistema *QuickChange*.

Mutación de los elementos GATAd y GATAp (pGL3E-PSCCh0.7-GATAdpmut).

Se diseñó una construcción que contiene las dos mutaciones descritas anteriormente usando como molde la construcción mutante pGL3E-PSCCh0.7-GATAdmut y como cebadores al oligonucleótido PSCCh-mut/GATAp y su secuencia complementaria; así como el sistema *QuickChange*.

Construcción del plásmido pGL3-Básico-INV

Se usó el plásmido pGL3-Básico (Promega) como molde, el oligonucleótido 5'-CTAGCCCGGGCTCGAAGCTTGCGATCTAAGTAGATCTGGCATTCCGTAC-3' (pGL3B-Hind/Bgl) y su secuencia complementaria como cebadores y el sistema *QuickChange* para intercambiar los sitios de restricción *Bgl* II y *Hind* III. La construcción de este plásmido nos permitió clonar el promotor en orientación inversa.

La orientación y fidelidad de todas las construcciones mencionadas anteriormente se corroboraron mediante secuencia de ADN automática, utilizando el sistema *BigDye Terminator* (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700.

Cada una de las construcciones se propagó en la cepa JM109 de *Escherichia coli* (Promega) de las que se purificó el ADN plásmido mediante un sistema comercial (*Endofree Plasmid Maxi Kit*, Qiagen). Se determinó la concentración de ADN por espectrofotometría a 260nm y se evaluó su calidad utilizando la electroforesis de ADN en geles de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989).

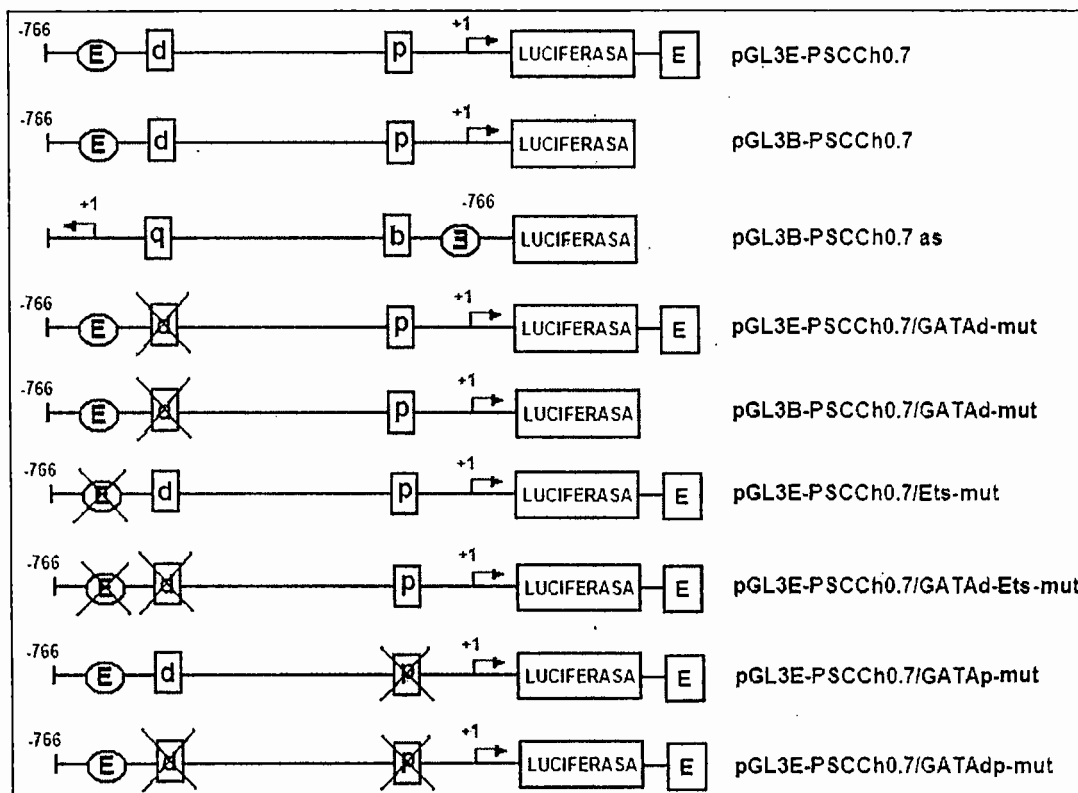


Figura 5.1. Representación esquemática de las construcciones génicas. (E), elemento Ets; d, elemento GATA distal; p, elemento GATA proximal; LUCIFERASA, ADNc de la enzima luciferasa de luciérnaga; E, enhancer del virus SV40. Las mutaciones de los elementos están indicados con una cruz.

LOCUS MAUGCC10 1491 bp DNA ROD 23-MAY-1998
 DEFINITION **Mesocricetus auratus ug/cc10 gene.**
 ACCESSION Y13765
 SOURCE golden hamster.
 ORGANISM *Mesocricetus auratus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
 Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; *Mesocricetus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1491)
 AUTHORS Sagal, R.G. and Nieto, A.
 TITLE Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster
 uteroglobin/Clara cell 10-kDa gene (ug/cc10): tissue-specific and
 hormonal regulation
 JOURNAL Arch. Biochem. Biophys. 350 (2), 214-222 (1998)
 COMMENT Related entry: L37041.
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1491
 /organism="Mesocricetus auratus"
 /db_xref="taxon:10036"
 /dev_stage="adult"
 gene 1363..1491
 /gene="ug/cc10"
 TATA_signal 1363..1366
 /gene="ug/cc10"
 mRNA 1393..>1491
 /gene="ug/cc10"
 prim_transcript 1393..>1491
 /gene="ug/cc10"
 CDS 1450..>1491
 /gene="ug/cc10"
 /codon_start=1
 /product="uteroglobin/clara cell 10kDa protein"
 /protein_id="CAA74098.1"
 /db_xref="PID:e1294040"
 /db_xref="PID:g3157404"
 /db_xref="GI:3157404"
 /db_xref="SPTREMBL:O70544"
 /translation="MKIAITMAVVLVS"

 1 ctggaaatgc tctttacaag gctactctgt ggaggaaacag ctaaagaact ctctctacag
 61 tgatggctac atccatctct gtgctggggt caggccagag acacagaagt gagccaagtc
 121 tacagttaga actgagctaa tggacaggac agttcaagaa caacaaaaaa gcatcctcat
 181 ggcccaccac tgggaagcag gcaaacaggaa atgctcacag cttaaatccc tcctatttga
 241 tccttagatg caaacagctc tggggaaggt agaaccttaa gcaaggcaac ctctgtagca
 301 ggggcagacc ctgcagttac tggaaagtga aggctctcag atgaccacat cctctcacgc
 361 cactagacag aaagatcatg agcggggccct ttaaactcct ctccaggtct tccccaatc
 421 ccagccccac cactccatag taggtaccag gcatctattg actgggtgga tggatgaaca
 481 tttgagatga tctggaagtc tgaataggat ttgtggaaat gggaaatggc tgggagggat
 541 gcaagctggg aagctgagac agaaggtggt ggttgcaacc aaagtgaagt tacatgctaa
 601 gacacaagag cactagagag taaacacaga gcatgggaag ctaaagttag agcctgggaa
 661 ctactaacac ttgagaactg tcaacatcta gaaagaatag ccaagggaagg gaaacaggaa
 721 aatgcagagt gtgggaaaga atggagcagg agagaggagg ctatagcata aaggctaggg
 781 agaggtcaag tcagataaac actgaagtgc ccctcaactg gccattagaa ggacaggact
 841 gggtaagaac agaccaagcc tgacctgggc ctgggtctct gatataact atggagaagt
 901 cttcatttgt tcatgtctaa tgcagaatct aacctgacca atgacaccca agaataagt
 961 gacctagcca ctttccttgg aggggggcag tagaaggagc tcagtgcatt tttagagtcc
 1021 ttggtctttg tctaccttgt attcctgagg agccaccacc ctctggtttg ccaaatgttg
 1081 caagtctaca gttgcttctt ggaacctgga gtacccagtg cttgacttca aaaagaggac
 1141 acagatgtcc agattcccac aacctctgac ttgggtccc ccccaactgc tggacacccc
 1201 aaaagtggcc tgggtgtgag ctgagtttca atgggaacag aaactgggtt taaggaaaga
 1261 gattatttac ttattccaca gagaagataa ccaagtaaat agtgcaatat cctaagtggt
 1321 acccaagccc tgcgtactac ctcttgtggg cttcctagaa caTATAaaaa gccacctgat
 1381 gcccccacac ttatacacac tactatacca ccccaatccc agagacagcc aagcctccca
 1441 gactccacca tgaagattgc catcacaatg gctgtgtgca tgctgtcggt c

Figura 5.2 Secuencia de nucleótidos de la región promotora 5' del gen de la PSCC de hámster. El sitio de inicio de la transcripción está marcado con una flecha. La caja TATA está indicada con mayúsculas y el codón de inicio de la traducción está en cursivas. La secuencia de los oligonucleótidos que se utilizaron en la reacción de PCR y en la mutagénesis sitio dirigida están marcados en negrita.

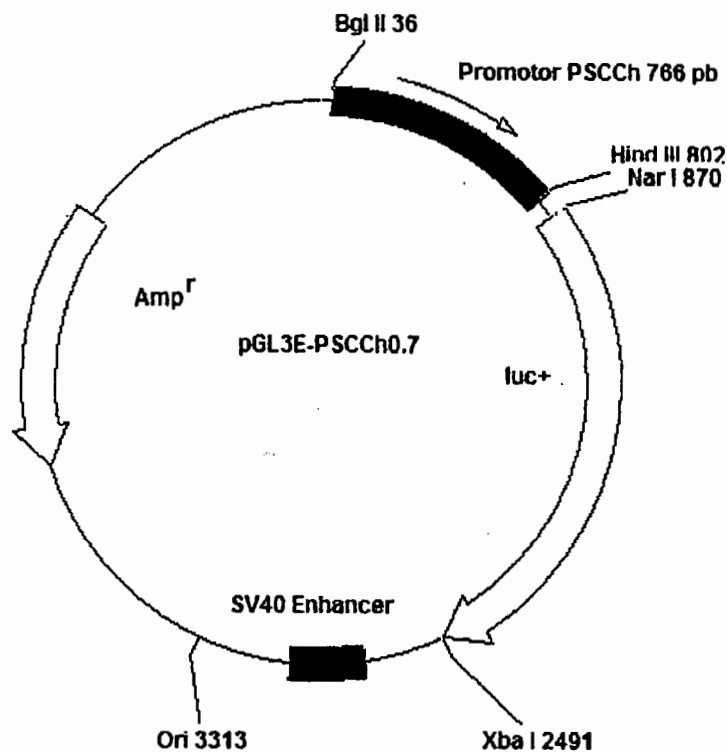


Figura 5.3. Mapa de la construcción pGL3E-PSCCh0.7. *Promotor PSCCh*, fragmento de 766 pb del promotor de la PSCCh; *luc+*, secuencia del ADNc de la luciferasa de luciérnaga; *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina; *ori*, origen de replicación del plásmido; *SV40 Enhancer*, amplificador de la transcripción derivado del virus SV40.

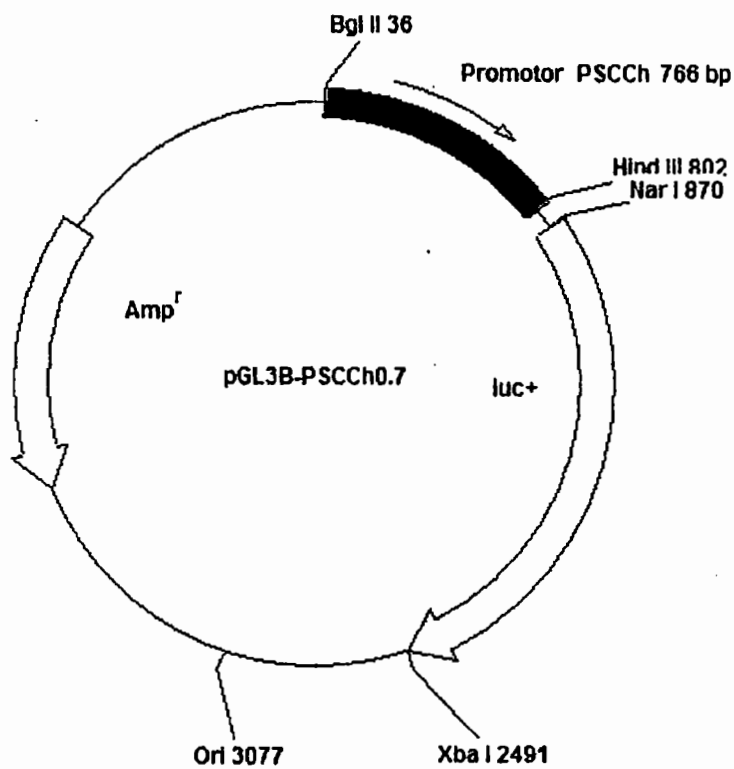


Figura 5.4. Mapa de la construcción pGL3B-PSCCh0.7. *Promotor PSCCh*, fragmento de 766 pb del promotor de la PSCCh; *luc+*, secuencia del ADNc de la luciferasa de luciérnaga; *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina; *ori*, origen de replicación del plásmido.

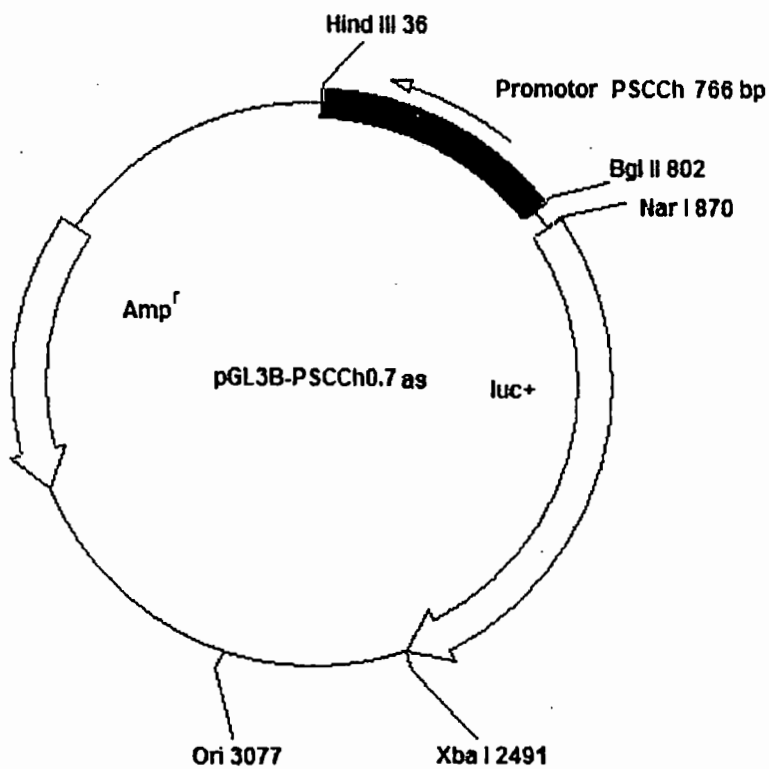


Figura 5.5. Mapa de la construcción pGL3B-PSCCh0.7as. *Promotor PSCCh*, fragmento de 766 pb del promotor de la PSCCh; *luc+*, secuencia del ADNc de la luciferasa de luciérnaga; *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina; *ori*, origen de replicación del plásmido.

5.3. Cultivo celular y análisis de expresión transitoria.

La línea celular NCI-H441, establecida de un adenocarcinoma de pulmón humano y con características similares a las células Clara de pulmón (German *et al.*, 2000), se cultivó en RPMI-1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 5%, sin antibióticos, las células HeLa (cáncer cervico-uterino), COS-7 y HEK-293 se cultivaron en DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10%, sin antibióticos. Las células se mantuvieron a 37 °C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Para los análisis de expresión transitoria se sembraron, en placas de 24 pozos, 15,000 células HeLa o 50,000 células NCI-H441 por pozo, 16 h antes de la transfección. Cada pozo se cotransfectó con 400 ng de cada una de las construcciones reporteras y 80 ng del plásmido pRL-TK (Promega) como control interno de eficiencia de transfección, usando Effecteno (Qiagen), según las instrucciones de la casa comercial. Después de 48 h de transfección se lavaron las células con PBS y se lisaron con solución de lisis pasiva (Promega). Las actividades de las enzimas luciferasas (luciferasa de luciérnaga y luciferasa de Renilla) se determinaron con el sistema de luciferasa dual (Promega) en un luminómetro (Fentomaster FB15 de Zylux).

5.4. Extracción del ARN total

El ARN total se extrajo con el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Brevemente, las células se homogeneizaron en solución desnaturante 4M de isotiocianato de guanidina y β-mercaptoetanol y se incubaron 1 h, a 4°C. El homogeneizado se centrifugó 20 min, a 4°C (10,000g). El ARN total se precipitó con isopropanol, se centrifugó 20 min a 4°C (10,000g) y se resuspendió en un volumen de solución desnaturante, al que se agregaron 3 volúmenes de LiCl 4 M. La concentración de ARN total se determinó mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm.

5.5. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante y transferencia a papel.

El ARN total de cada línea celular se separó en una electroforesis en gel de agarosa al 1%/HEPES-EDTA 1X/formaldehído al 6% (Sambrook *et al.*, 1989), y se transfirió a una membrana de nylon (HyBond-N, Amersham Pharmacia Biotech) con amortiguador SSC 10X (citrato de sodio 150 mM, NaCl 1.5 M, pH 7) durante 16 h. La membrana se secó y el ARN se fijó con luz ultravioleta por 5 min.

5.6. Detección del ARN mensajero (ARNm) del factor GATA-2.

Se sintetizó una sonda específica para el factor de transcripción humano GATA-2 de 787 pb por RT-PCR, utilizando a los oligonucleótidos hGATA2-SQ2 (5'-GGAAAGTGGCAGTCCCCTGC-3') y hGATA2-rev (5'-GTCCATCTGTTCCCTAGCCC ATGGCG-3') como cebadores. El ARN que se usó como molde, se extrajo de células HeLa utilizando el método previamente descrito. Estas células expresan abundantemente el factor GATA-2 (Dorfman *et al.*, 1992). Los oligonucleótidos que se utilizaron se dedujeron de la secuencia del ADNc del factor de transcripción humano GATA-2 reportado en el *Gene Bank* con número de acceso GI: 20149534. El producto de PCR fue secuenciado para confirmar que la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado es idéntica a la del factor de transcripción humano GATA-2. La sonda se marcó con [α - 32 P]-dATP y random primers (*RadPrime DNA Labeling System*, Gibco) y se hibridó con los ARNs de las líneas celulares inmovilizados en la membrana. El filtro se lavó y se expuso a una película radiosensible. La normalización del experimento se realizó mediante la comparación del ARN ribosomal 18S de cada muestra.

5.7. Clonación del factor de transcripción humano GATA-2

Se extrajo ARN total de la línea celular HEK-293 y se usó como molde para la síntesis del ADNc de primera cadena a partir de oligo-dT y la transcriptasa inversa (*FirstStrand cDNA Síntesis Kit*, Pharmacia, Biotech). El ADNc específico para hGATA-2 fue amplificado por PCR empleando los oligonucleótidos: 5'-CCCGCGCCGGCC ATGGAGGTGGCG-3' (hGATA2-fw) y 3'-CGCCATGGGCTAGGGAACAGATGGAC-5'

(hGATA2-rev). El fragmento de PCR (1,468 pb) que contiene la región codante del gen humano de GATA-2, fue purificado mediante el sistema comercial *Gene Clean II* (Bio101) y clonado en el vector de expresión pTargetT (Promega, Fig. 5.6). De los plásmidos recombinantes que se obtuvieron se escogieron dos: i) pTargetT-hGATA-2 sentido que expresa al factor de transcripción GATA-2 y ii) pTargetT-hGATA-2 antisentido que contiene el ADNc del factor hGATA-2 en antisentido por lo que no es capaz de expresar GATA-2. Este último plásmido se empleó como control negativo en los experimentos de expresión transitoria en los que se cotransfecto el factor hGATA-2.

5.8. Inmunodetección del factor hGATA-2 en células COS-7.

Para verificar la funcionalidad de los plásmidos pTargetT-hGATA-2 sentido y antisentido se cultivaron células COS-7 en tres cajas de Petri de 100 mm de diámetro. Se hizo la transfección de cada vector de expresión (pTargetT-hGATA-2 sentido y antisentido) con lipofectamina (Gibco) según las instrucciones de la casa comercial, en dos de las cajas con COS-7 al 70% de confluencia, mientras la tercera caja permaneció sin transfectar como control negativo del experimento. Después de 24 h de expresión, se extrajeron las proteínas nucleares (ver apartado de extractos nucleares) y se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (EGPA-SDS) (Sambrook *et al.*, 1989). Las proteínas fueron transferidas a una membrana inmobilon-P (Millipore) semihúmeda en una transferidora (Biorad), a 20 mA durante 40 min. Después de bloquear la membrana, se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo específico para hGATA-2 (Gordon *et al.*, 1997). Posteriormente se empleo un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con la peroxidasa de rábano (Amersham) y se reveló la presencia del factor mediante el uso de luminol e inmediatamente se expuso la membrana a una placa fotosensible (Kodak).

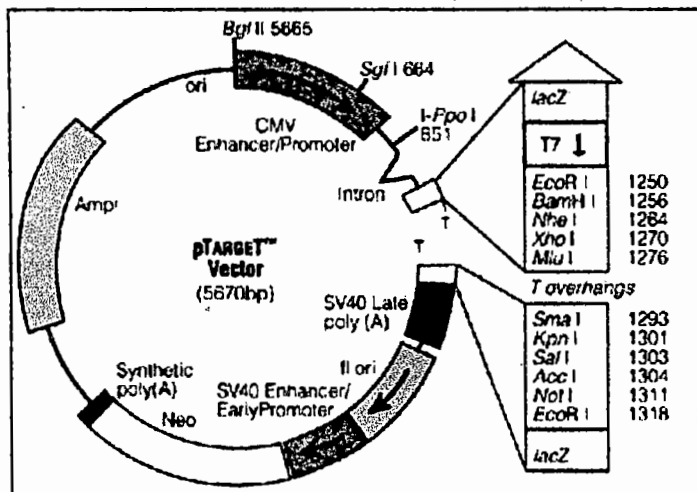


Figura 5.6. Mapa del vector de expresión pTargetT. *CMV Enhancer/Promotor*, Amplificador/promotor de la transcripción de citomegalovirus, *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina; *f1-ori*, origen de replicación derivado del fago filamentosos f1; *SV40 Enhancer/Early Promoter*, amplificador/promotor de la transcripción derivado del virus SV40; *ori*, origen de replicación del plásmido; (T), timinas para la clonación de productos de PCR.

5.9. Ensayos de expresión transitoria con pTarget-hGATA-2 en células NCI-H441.

Se cultivaron 50,000 células por pozo de células NCI-H441, para cotransfectarles 400 ng de cada una de las construcciones reporteras, con 80 ng del plásmido pRL-TK (Promega) como control interno de eficiencia de transfección y con 50 ng de pTarget-hGATA-2 sentido. Se hizo una cotransfección paralela a la anterior, que sirvió como control negativo, ya que las construcciones reporteras fueron transfectadas junto con 50 ng de pTarget-hGATA-2 antisentido. Las transfecciones se llevaron a cabo usando Effecteno (Qiagen) como método de transfección. Después de 48 h se lavaron las células con PBS y se lisaron con solución de lisis pasiva (Promega). La actividad de las enzimas luciferasa (luciferasa de luciérnaga y luciferasa de Renilla) se determinó en un luminómetro (Fentomaster FB15 de Zylux).

5.10. Preparación de los extractos nucleares.

Los extractos nucleares de las células NCI-H441, HeLa y COS-7 se prepararon según el método descrito por Schreiber *et al.* (1989). La concentración de proteínas en cada uno de los extractos nucleares se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

5.11. Análisis de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).

Se utilizó la técnica descrita por (Ausubel *et al.*, 2000). En esta técnica se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos de doble cadena (Invitrogen):

GATAd-silvestre (Fig. 5.2, 786/805)	5' -TCAAGTCAG GATA AACACTGA-3' 3' -AGTTCAGT CTAT TTGTGACT-5'
GATAd-mutado	5' -TCAAGTCAG GAGC AAGTGACT-3' 3' -AGTTCAGT CTCG TTCACTGA-5'
GATAp-silvestre (Fig. 5.2, 1278/1297)	5' -ACAGAGA GATA ACCAAGTA-3' 3' -TGTCTCTT CTAT TGGTTCAT-5'
GATAp-mutado	5' -ACAGAGA GAGC ACCAAGTA-3' 3' -TGTCTCTT CTCG TGGTTCAT-5'

Los oligonucleótidos silvestres de doble cadena se radiomarcaron en el extremo 5' con [γ - 32 P]ATP, mediante la polinucleótido cinasa de T4 (Sambrook *et al.*, 1989). En cada reacción de unión se uso 1 ng de sonda (actividad específica > 10^7 cpm/ μ g). Las reacciones de unión se realizaron a 4°C durante 30 min en un amortiguador que contiene poly (dl-dC) y 10 μ g de proteínas nucleares. Las reacciones de unión se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas. El gel se secó con calor al vacío para posteriormente exponerla a una película radiosensible.

En algunas de las reacciones se utilizaron oligonucleótidos no marcados como competidores y en otras se empleó un anticuerpo policlonal de conejo específico contra el factor de transcripción humano GATA-2, que fue donado por el Dr. Stuart H. Orkin de la División de Hematología/Oncología del *Dana Farber Cancer Institute* y el anticuerpo policlonal de conejo contra JunB (pAb-JunB, Santa Cruz) como control. Cuando se usaron anticuerpos, se agregaron a la reacción de unión y se incubaron 15 min, a 20 °C antes de incorporar la sonda marcada.

5.12. Inmunodetección del factor hGATA-2 en NCI-H441 silvestres y transfectadas con pTarget-hGATA-2.

Con el fin de corroborar la ausencia del factor GATA-2 en las células NCI-H441 y de su expresión inducida por el vector de expresión pTarget-hGATA-2 en las mismas células; se cultivaron tres cajas de cultivo celular de 100 mm de diámetro con células NCI-H441, una caja con células HEK-293 y una de células HeLa como controles positivos. Se transfectaron los vectores de expresión para GATA-2 (sentido y antisentido) en dos de las cajas de NCI-H441 al 70% de confluencia mediante lipofectamina. La tercera caja de NCI-H441 permaneció sin transfectar como control negativo del experimento. Después de 24 h de expresión, se extrajeron las proteínas nucleares de cada grupo celular y se resolvieron en una EGPA-SDS. Las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P (Millipore) semihúmeda con amortiguador para cátodo (Tris 25 mM, Metanol 10%) en una transferidora (Biorad) a 20 mA por 40 min. Después de bloquear la membrana, ésta se incubó con una dilución 1: 2500 del anticuerpo policlonal específico para GATA-2 en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0.1%). Posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo anti-conejo-*HRP* (Amersham) también diluido en TBS-T (1:10,000). Se reveló la presencia del factor mediante el uso de luminol y la membrana se expuso a una película fotosensible (Kodak).

5.13. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos del análisis de expresión transitoria para las diferentes construcciones del promotor del gen de la PSCCh, fueron analizados mediante t-Student y ANOVA, para comparar la expresión del control (construcción silvestre) con la expresión de las construcciones mutadas, considerando diferencias significativas con $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Los elementos genéticos GATA y Ets regulan la transcripción del gen de la PSCCh.

El análisis de la región de flanco 5' del gen de la proteína de secreción de las células Clara de hámster (PSCCh) (Gutierrez Sagal y Nieto, 1998) hecho a través del programa de computación Mat-Inspector, localizó dos elementos en *cis*, el primero es 97% homólogo a la secuencia consenso reconocida por los factores de transcripción GATA y el segundo es 89% homólogo a la secuencia consenso para los factores de transcripción Ets. Estos elementos se han conservado en el promotor del gen de la PSCC de varias especies de mamíferos, sugiriendo que su conservación durante la evolución molecular de la PSCC obedece a que deben desempeñar un papel importante en la expresión de esta proteína. Estos factores suelen actuar de manera cooperativa en los promotores de varios genes específicos (Lemarchandel *et al.*, 1993; Tymms y Kola, 1994; Hashimoto y Ware, 1995). Para evaluar el efecto de los elementos GATA y Ets en la transcripción del gen PSCCh se clonó un fragmento del promotor de 766 pb, que contiene estos elementos, en un vector reportero; a partir del cual se mutaron cada uno de los elementos y se analizó su actividad utilizando ensayos de expresión transitoria en las líneas celulares NCI-H441 y HeLa, esta última expresa abundantemente el factor de transcripción humano GATA-2 (Dorfman *et al.*, 1992).

Los resultados (Fig. 6.1) indican que las mutaciones realizadas en los elementos genéticos no modificaron significativamente la actividad del promotor en las células NCI-H441, sin embargo en las células HeLa, la actividad de las construcciones mutantes disminuyó hasta en un 40%. Estos resultados indican que los dos factores de transcripción (GATA y Ets) regulan la actividad del promotor de la PSCCh y sugieren que no trabajan cooperativamente como en otros genes (Lemarchandel *et al.*, 1993; Tymms y Kola, 1994; Hashimoto y Ware, 1995); ya que la construcción en la que los dos elementos se han mutado, la disminución de la actividad es similar a la de cada elemento individual. Estos resultados también sugieren que las construcciones mutantes podrían ser inactivas en las células NCI-H441 porque no expresan el factor GATA-2 o lo expresan en baja concentración, contrastando fuertemente con la abundante expresión de este factor en las células HeLa.

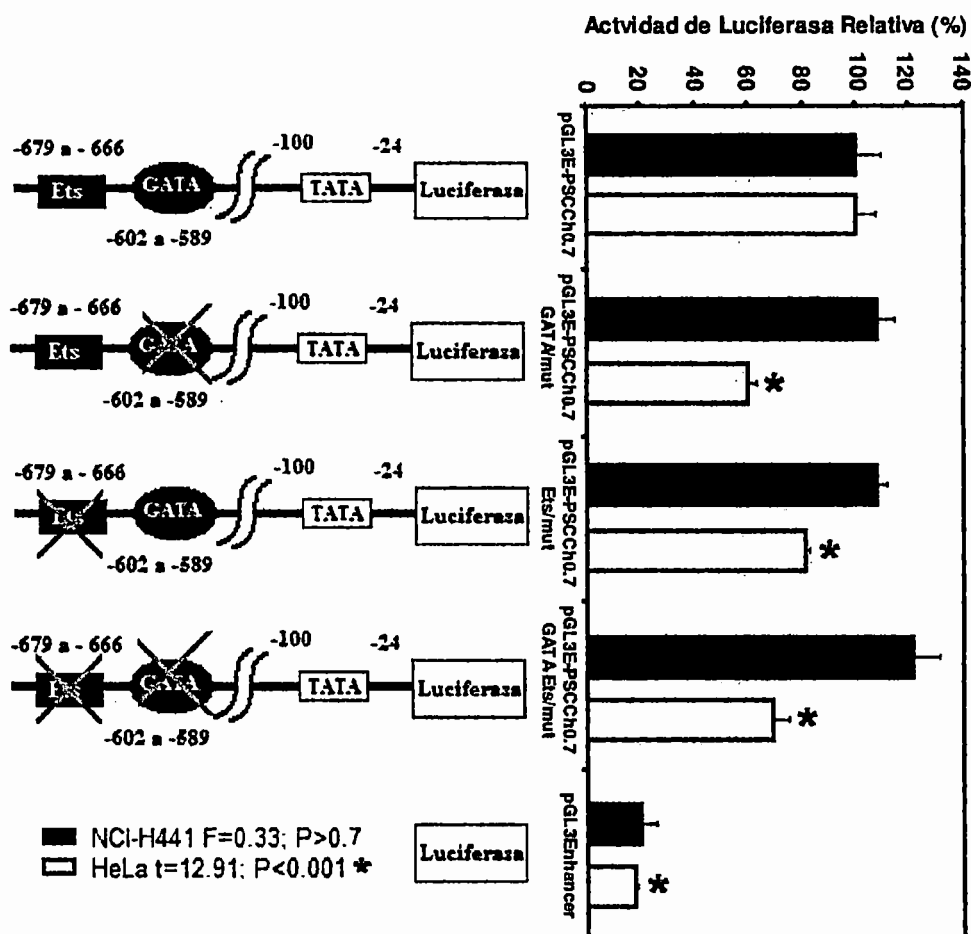


Figura 6.1. Efecto de las mutaciones de los elementos GATAd y Ets del promotor de la PSCCh en su actividad transcripcional. Se transfectaron células NCI-H441 o HeLa con las construcciones esquematizadas a la izquierda. El plásmido pRL-TK se cotransfectó como control de eficiencia de transfección. Los valores representan la media $\pm$ DS (n=3) y son representativos de tres experimentos independientes. A la media obtenida con el pGL3E-PSCCh0.7 se le asignó el 100% y se calculó el porcentaje de actividad relativa de cada construcción. Los valores *p* se calcularon contra la actividad de pGL3E-PSCCh0.7. El (*) marca la diferencia significativa (*p*<0.001) con respecto al control.

6.2. Detección del ARNm del factor GATA-2 en diferentes líneas celulares mediante Northern Blot.

Con el fin de investigar la expresión del factor de transcripción GATA-2 en las células NCI-H441, se extrajo ARN total de diferentes líneas celulares y se analizó por *northen blot*. La electroforesis de ARN total en gel de agarosa, muestra que los ARNs ribosomales de 28S y 18S se resuelven en forma definida, indicando que los ARNs se obtuvieron sin degradación ni contaminación de ADN (Fig. 6.2).

Un fragmento del ADNc (787 pb) del factor de transcripción humano GATA-2 marcado con ^{32}P , hibridó con el ARNm de las líneas celulares HeLa, MCF-7, HEK-293, T47-D y HTR-8, siendo las líneas celulares HEK-293 y HTR-8 las que expresan más abundantemente el factor de transcripción GATA-2. Sin embargo, en otras de las líneas celulares que se analizaron, incluyendo las células NCI-H441, no se detectó la expresión del factor de transcripción (Fig. 6.2). Estos resultados indican que las células NCI-H441, no expresan el factor de transcripción GATA-2 o que podrían expresarlo en niveles por debajo de los límites de detección de esta técnica; lo cual explicaría parcialmente que no exista diferencia entre la actividad del promotor silvestre y mutado en el elemento GATA en estas células.

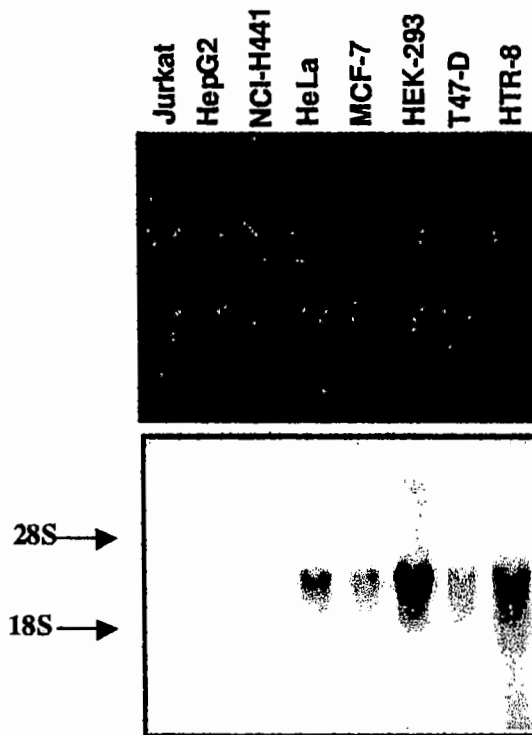


Figura 6.2. Detección del factor humano GATA-2 en diferentes líneas celulares mediante *Northern Blot*. El ARN total (10 µg) se fraccionó en electroforesis en gel de agarosa-formaldehído y se tiñó con bromuro de etidio (parte superior). El ARN se transfirió a Hybon-N y se hibridó con una sonda específica para el factor humano GATA-2 marcada con ^{32}P (parte inferior). Las flechas indican la posición del ARN ribosomal es 28S y 18S.

6.3. Clonación del factor de transcripción humano GATA-2.

Los resultados obtenidos por *Northern blot* indican que la línea celular NCI-H441 no expresa el factor humano GATA-2 o lo expresa poco, por esta razón decidimos clonar este factor, para poder expresarlo en las células NCI-H441. El ADNc del factor GATA-2 se clonó en el vector de expresión pTargetT a partir del ARN de las células HEK-293, estas células expresan abundantemente esta proteína (Fig. 6.2). El ADNc obtenido fue de 1468 pb y codifica para una proteína de 480 aminoácidos (Fig. 6.3). La secuencia de aminoácidos fue comparada con la secuencia reportada para el factor de transcripción GATA-2 de placenta humana; revelando que de los 480 aminoácidos deducidos del ADNc, solo un aminoácido es diferente (Fig. 6.4, Ala164/Thr164). El factor de transcripción contiene los dominios característicos del factor GATA-2, como son el dedo de zinc amino terminal que se encuentra entre los aminoácidos 295-319 y el dedo de zinc carboxilo terminal, que se encuentra localizado entre los aminoácidos 349-373 (Fig. 6.3).

1 21 41 61 81
 CCCGCGCCGCGCCATGGAGGIGGCGCCGGAGCAGCCGCGCTGGATGGCGCACCCGCGCTGCTGAATGCGCAGCACCCCGACTCACACCAC
 M E V A P E Q P R W M A H P A V L N A Q H P D S H H
 101 121 141 161
 CCGGGCCTGGCGCACAACACTACATGGAACCCGCGCAGCTGCTGCCTCCAGACGAGGTGGACGTCTTCTTCAATCACCTCGACTCGCAGGGG
 P G L A H N Y M E P A Q L L P P D E V D V F F N H L D S Q G
 181 201 221 241 261
 AACCCCTACTATGCCAACCCCGCTACGCGCGGGCGCGCGTCTCTACAGCCCCGCGCACGCCCGCTGACCGGAGGCCAGATGTGCCGC
 N P Y Y A N P A H A R A R V S Y S P A H A R L T G G Q M C R
 281 301 321 341
 CCACACTTGTTCACAGCCCGGGTTTGGCCTGGCTGGACGGGGGCAAAGCAGCCCTCTCTGCCGCTGCGGCCACCACCACAACCCCTGG
 P H L L H S P G L P W L D G G K A A L S A A A A H H H N P W
 361 381 401 421 441
 ACCGTGAGCCCTTCTCCAAGACGCCACTGCACCCCTCAGCTGTGGAGGCCCTGGAGGCCACTCTCTGTGTACCCAGGGGCTGGGGGT
 T V S P F S K T P L H P S A A G G P G G P L S V Y P G A G G
 461 481 501 521
 GGGAGCGGGGAGGCGAGCGGGAGCTCAGTGGCCCCCTCACCCCTACAGCAGCCCACTCTGGCTCCACCTTTTCGGCTTCCACCCACG
 G S G G G S G S S V A P L T P T A A H S G S H L F G F P P T
 541 561 581 601 621
 CCACCCAAAGAAGTGTCTCTGACCCTAGCACCCACGGGGCTGCGTCTCCAGCCTCATCTTCCGCGGGGGTAGTGACGCCGAGGAGAG
 P P K E V S P D P S T T G A A S P A S S S A G G S A A R G E
 641 661 681 701
 GACAAGGACGGCGTCAAGTACCAGGTGTCTGACGGAGAGCATGAGGATGGAAGTGGCAGTCCCTGCGCCAGGCCCTAGCTACTATG
 D K D G V K Y Q V S L T E S M R M E S G S P L R P G L A T M
 721 741 761 781 801
 GGCACCCAGCCTGTACACACCACCCCACTCCACCTACCCCTCTATGTGCCGGGCTGCCACGACTACAGCAGCGGGCTCTTCCAC
 G T Q P A T H H P I P T Y P S Y V P A A A H D Y S S G L F H
 821 841 861 881
 CCGGAGGCTTCTGGGGGACCGGCTCCAGCTTACCCCTAAGCAGCGCAGCAAGGCTCGTTCTCTGTTTCAAGGCCGGGAGTGTGTC
 P G G F L G G P A S S F T P K Q R S K A R S C S E G R E C V
 901 921 941 961 981
 AACTGTGGGGCCACAGCCACCCCTCTCTGGCGGGGAGCGGCACCGGCCACTACCTGTGCAATGCCTGTGGCCTTACCACAAGATGAAT
 N C G A T A T P L W R R D G T G H Y L C N A C G L Y H K M N
 1001 1021 1041 1061
 GGGCAGAACCGACCACTCATCAAGCCCAAGCGAAGACTGTGCGGCCCGCAGAAGAGCGGCACCTGTTGTGCAAAATGTCAGACGACAACC
 G Q N R P L I K P K R R L S A A R R A G T C C A N C Q T T T
 1081 1101 1121 1141 1161
 ACCACCTTATGGCGCCGAACGCGCAACGGGGACCCTGTCTGCAACGCCTGTGGCCTCTACTACAAGCTGCACAATGTTAACAGGCCACTG
 T T L W R R N A N G D P V C N A C G L Y Y K L H N V N R P L
 1181 1201 1221 1241
 ACCATGAAGAAGGAAGGATCCAGACTCGGAACCGGAAGATGTCCAACAAGTCCAAGAAGAGCAAGAAAGGGCGGAGTGCTTCGAGGAG
 T M K K E G I Q T R N R K M S N K S K K S K K G A E C F E E
 1261 1281 1301 1321 1341
 CTGTCAAAGTGCATGCAGGAGAAGTCATCCCCCTTCAGTGCAGCTGCCCTGGCTGGACACATGGCACCTGTGGGCCACCTCCCGCCCTTC
 L S K C M Q E K S S P F S A A A L A G H M A P V G H L P P F
 1361 1381 1401 1421
 AGCCACTCCGGACACATCTGCCCACTCCGACGCCCATCCACCCCTCCTCCAGCCTCTCTTCGGCCACCCCAACCGTCCAGCATGGTG
 S H S G H I L P T P T P I H P S S S L S F G H P H P S S M V
 1441 1461
 ACCGCCATGGGCTAGGGAACAGATGGAC
 T A M G

Figura 6.3. ADNc y secuencia de aminoácidos del factor de transcripción humano GATA-2.
 El codón de inicio y de terminación están indicadas con líneas negras. La secuencia de aminoácidos que conforman los dominios de unión al ADN (*zinc finger*), están subrayadas.

Para comprobar si nuestro vector de expresión (pTarget-hGATA-2), codifica la proteína GATA-2, el plásmido se transfectó en células COS-7, estas células no expresan este factor de transcripción (Dorfman *et al.*, 1992). Los extractos nucleares de estas células fueron usados para llevar a cabo el inmunoblot que se presenta en la Figura 6.5. El anticuerpo específico para GATA-2 solamente detectó al factor de transcripción en las células transfectadas con el plásmido pTarget-hGATA-2 sense; indicando que el vector de expresión funciona apropiadamente.

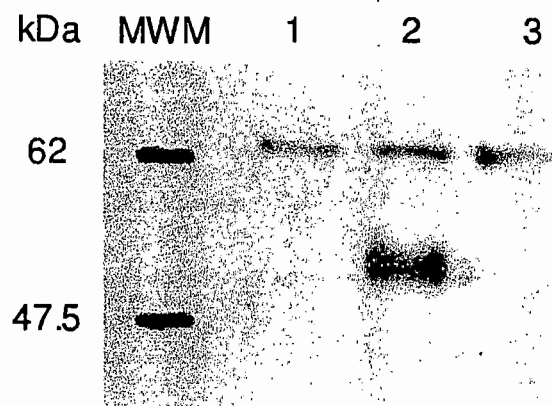


Figura 6.5. Inmunodetección del factor de transcripción GATA-2 en células COS-7. A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular en kDa. (1) Células COS-7 transfectadas con el vector pTargetT, (2) células COS-7 transfectadas con pTargetT-hGATA-2 sentido y (3) células COS-7 transfectadas con pTargetT-hGATA-2 antisentido.

6.4. GATA-2 regula la transcripción del gen de la PSCCh en células NCI-H441.

Para determinar si el factor de transcripción GATA-2 regula la actividad del promotor de la PSCCh, se cotransfectó el factor de transcripción GATA-2, con las construcciones silvestre y mutantes del promotor de la PSCCh en la línea celular NCI-H441. Los resultados indican que el factor GATA-2 incrementa la expresión del reportero en un 20% (Fig. 6.6). Este efecto en la actividad del promotor parece estar mediada por el elemento en *cis* GATAd del promotor ya que cuando se muta dicho elemento, la actividad del promotor disminuye a niveles similares a los de la misma construcción sin el factor GATA-2. Este resultado es similar al que obtuvimos en las células HeLa (Fig. 6.1) y en conjunto sugieren que el factor tiene importancia en la actividad del promotor de la PSCCh.

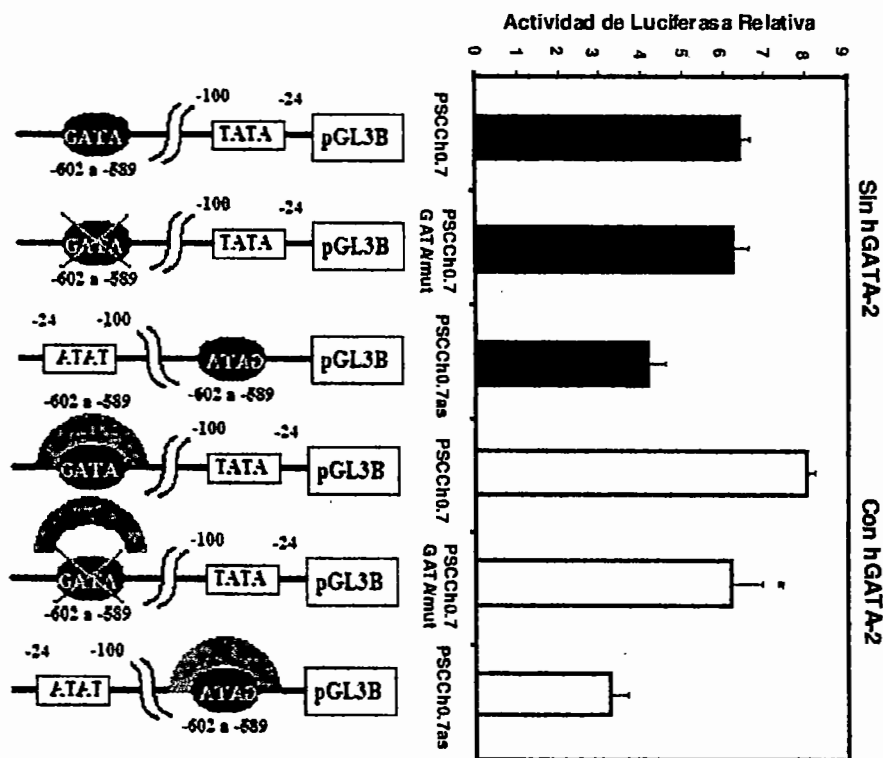


Figura 6.6. Regulación del promotor de la PSCC de hámster por GATA-2 en células NCI-H441. Las células NCI-H441 fueron cotransfectadas con las construcciones esquematizadas en la parte izquierda de la figura en combinación con el plásmido de expresión pTargetT-hGATA-2 antisentido como control negativo (sin hGATA-2) o con el plásmido pTargetT-hGATA-2 sentido (con hGATA-2). Los niveles de expresión se muestran como actividad relativa de las luciferasas. El resultado es representativo de tres experimentos independientes, cada uno realizado en triplicado. Cada barra representa la media ($n=3$) $\pm$ la DS. * $p < 0.008$ versus el valor de la construcción silvestre con hGATA-2.

6.5. Análisis del elemento genético GATAp del promotor de la PSCCh.

El promotor de la PSCCh tiene un segundo elemento putativo para los factores de transcripción de la familia GATA localizado a 1282/1294 (5'-AGAAGATAACCA-3'). Este elemento fue designado con el nombre GATA proximal (GATAp) y fue mutado mediante mutagénesis sitio-dirigida. El efecto de esta mutación se analizó en ensayos de expresión transitoria en células HeLa y NCI-H441. Los resultados en las células HeLa (Fig. 6.7) indican que el elemento GATAp es importante para la actividad del promotor, ya que la mutación en el núcleo del elemento disminuye significativamente la actividad del promotor (25%, $p < 0.001$, Fig. 6.7). Estos resultados junto con los obtenidos en el análisis del elemento GATAd indican que los factores de transcripción de la familia GATA regulan la actividad del promotor de la PSCCh. Cuando los elementos genéticos GATAd y GATAp se mutaron en el mismo plásmido reportero la actividad del promotor fue similar a cada una de las mutaciones individuales. Interesantemente, cuando se transfectaron las mismas construcciones en células NCI-H441 (Fig. 6.8), la mutación del elemento GATAp incrementa 3.5 veces la actividad del promotor. El mismo resultado se observó cuando los elementos GATAd y GATAp fueron mutados en la misma construcción, sugiriendo que predomina el efecto de la mutación del elemento proximal. Estos resultados sugieren que estas células de origen pulmonar expresan un factor de transcripción que reprime la expresión del gen de la PSCCh a través de su interacción con el elemento GATAp. Este factor debe ser diferente a los factores GATA ya que estos son factores estimuladores y no inhibidores como se observa en estos resultados.

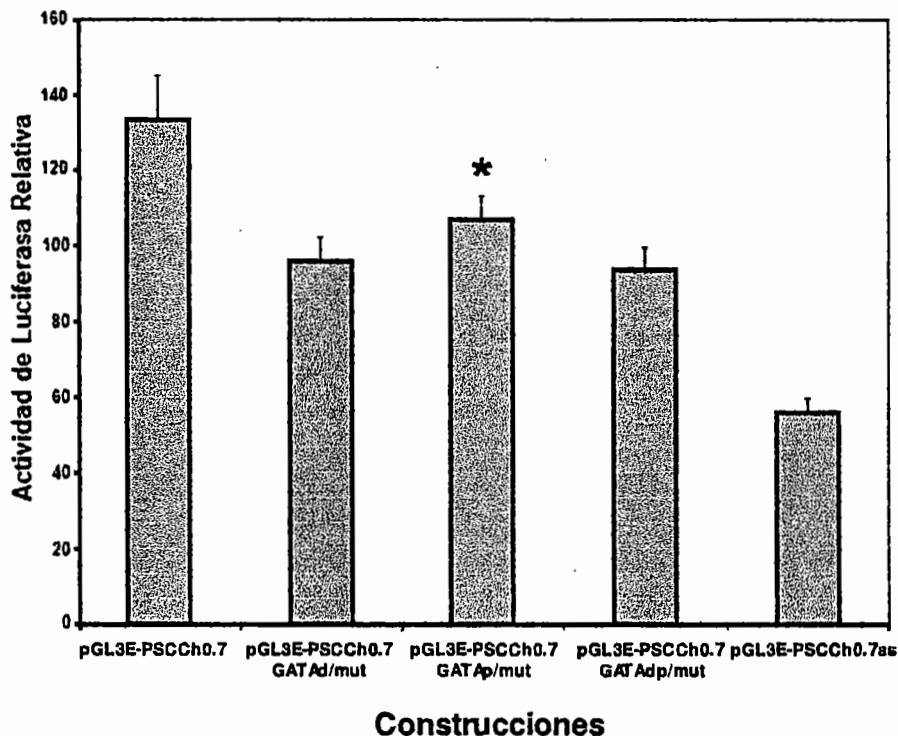


Figura 6.7. Efecto de la mutación en el elemento GATAp en la actividad del promotor de la PSCCh en células HeLa. Las células fueron cotransfectadas con las construcciones indicadas y el plásmido pRL-TK como control interno de eficiencia de la transfección. Cada barra representa la media ($n=3$) $\pm$ la DE de un experimento representativo. La construcción pGL3E-PSCCh antisentido (as) se utilizó para determinar la actividad de fondo de las construcciones. (*) $p < 0.01$ versus el valor de la construcción silvestre (pGL3E-PSCCh0.7).

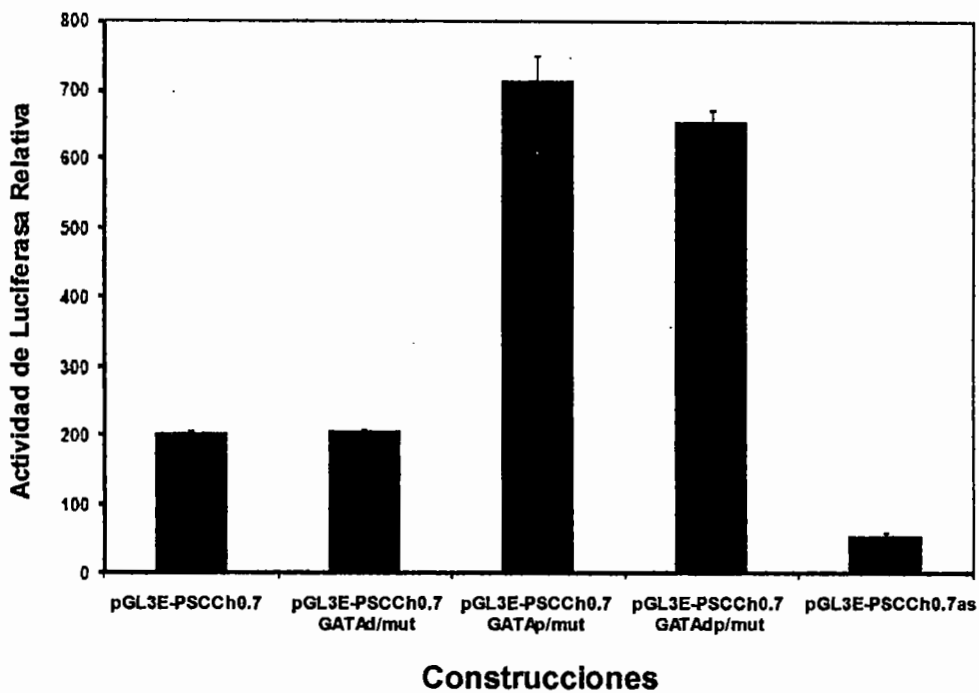


Figura 6.8. Efecto de la mutación del elemento GATAp del promotor de la PSCCh en células NCI-H441. Las células NCI-H441 fueron cotransfectadas con las construcciones indicadas y el plásmido pRL-TK como control de la eficiencia de transfección. Los resultados representan la media ($n=3$) $\pm$ la DE de un experimento representativo realizado en triplicado. El plásmido pGL3E-PSCCh0.7 antisentido (as) se utilizó para determinar la actividad basal de las construcciones.

6.6. Interacción del factor de transcripción GATA-2 con los elementos GATA distal y proximal.

Como los resultados del análisis de expresión transitoria indicaron que los elementos genéticos en *cis* GATAd y GATAp son importantes en la actividad del promotor de la PSCCh, decidimos estudiar la interacción de estos elementos con los extractos nucleares obtenidos de células HeLa, mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA) y determinar el factor de transcripción específico mediante super-retardos con anticuerpos específicos. El resultado se muestra en la Figura 6.9. En esta figura se observa que los elementos (GATAd y GATAp) se unen específicamente a las proteínas nucleares (carriles 1 y 5); la unión es específica porque un exceso de sonda no marcada (fría) desplaza la sonda marcada (carriles 2 y 6) mientras que un exceso de sonda no marcada pero con una mutación en el núcleo del elemento es incapaz de desplazar la sonda (carriles 3 y 7). El análisis del super-retardo (carriles 4 y 8) indica que la proteína que se une a estos elementos es el factor de transcripción GATA-2; ya que un anticuerpo específico contra este factor es capaz de super retardar el complejo núcleo proteico formado.

Este mismo experimento se realizó con extractos nucleares obtenidos de las células NCI-H441 (Fig. 6.10); sin embargo en este análisis de retardo no se observa la formación del complejo específico (*cis*-elemento/nucleoproteína) tan claramente como en los extractos nucleares de células HeLa, posiblemente porque las células NCI-H441 expresan el factor de transcripción en muy baja concentración. No obstante, la obtención del super-retardo con el anticuerpo específico indica que también en estas células el factor de transcripción GATA-2 interacciona con estos elementos (carriles 4 y 8).

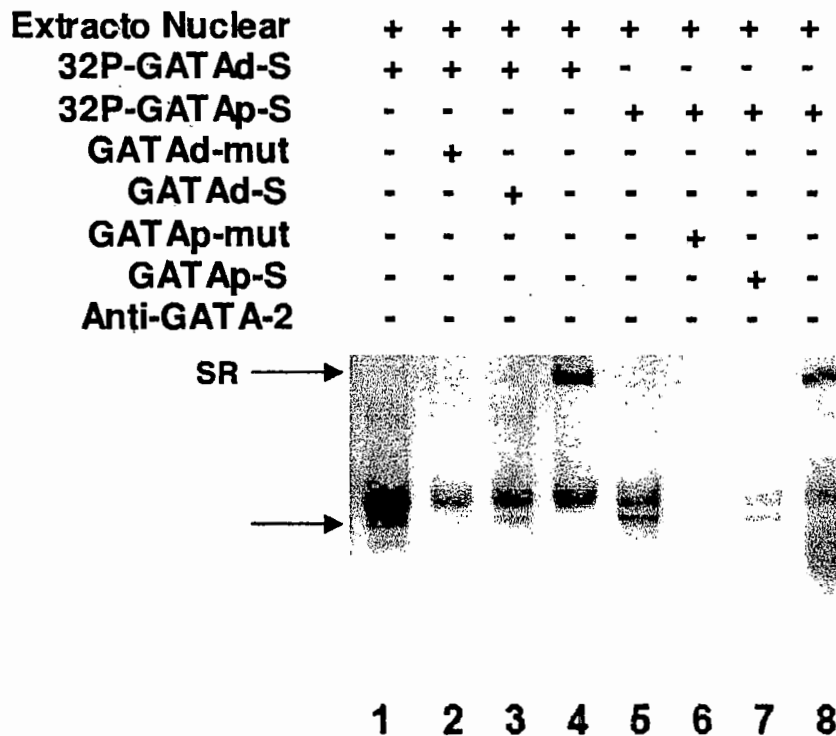


Figura 6.9. Análisis de retardo y super-retardo de los elementos GATAp y GATAd del gen de la PSCCh. Las sondas GATAp y GATAd marcadas con ^{32}P se incubaron con 10 μg de proteínas de los extractos nucleares de células HeLa. En las reacciones de competencia se utilizaron oligonucleótidos no marcados en 100 veces de exceso molar (carriles 2-3 y 6-7). La banda específica que se detecta en este experimento está indicada con una flecha. En el análisis de super-retardo se utilizó un anticuerpo policlonal específico contra GATA-2. Este anticuerpo super-retarda la banda específica designada como SR. S, silvestre; mut, mutado.

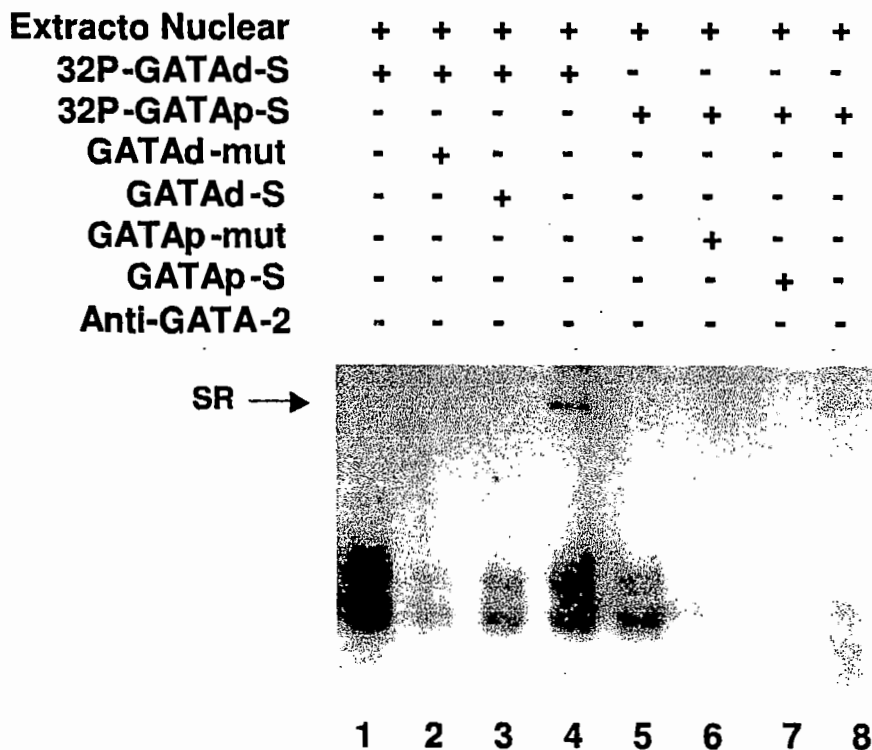


Figura 6.10. Análisis de retardo y super-retardo de los elementos GATAp y GATAd del gen de la PSCCh. Las sondas GATAp y GATAd marcadas con ³²P se incubaron con 10 µg de proteínas de extractos nucleares de células NCI-H441. En las reacciones de competencia se utilizaron oligonucleótidos no marcados en 100 veces de exceso molar (carriles 2-3 y 6-7). En el análisis de super-retardo se utilizó un anticuerpo policlonal específico contra GATA-2. Este anticuerpo super-retarda la banda específica designada como SR. S, silvestre; mut, mutado.

6.7. Inmunodetección del factor de transcripción humano GATA-2 en células NCI-H441.

Debido a que los ensayos de movilidad electroforética revelaron la presencia del factor GATA-2 en las proteínas de los extractos nucleares de las células NCI-H441, se realizó la detección de este factor en esta línea celular mediante inmunoblot. La figura 6.11 muestra que el anticuerpo contra GATA-2 humano, puede detectar la presencia del factor en las células NCI-H441 silvestres o transfectadas con el factor hGATA-2. Las líneas celulares que se usaron como controles positivos, HEK-293 y HeLa, son las que expresan más abundantemente GATA-2. Las células NCI-H441 silvestres y transfectadas con pTarget-hGATA-2 antisentido, también expresan GATA-2 pero en una cantidad más baja, en comparación con los controles positivos; mientras que estas mismas células transfectadas con pTarget-hGATA-2 sentido muestra un incremento en la expresión del factor de transcripción humano GATA-2 (Fig.6.11).

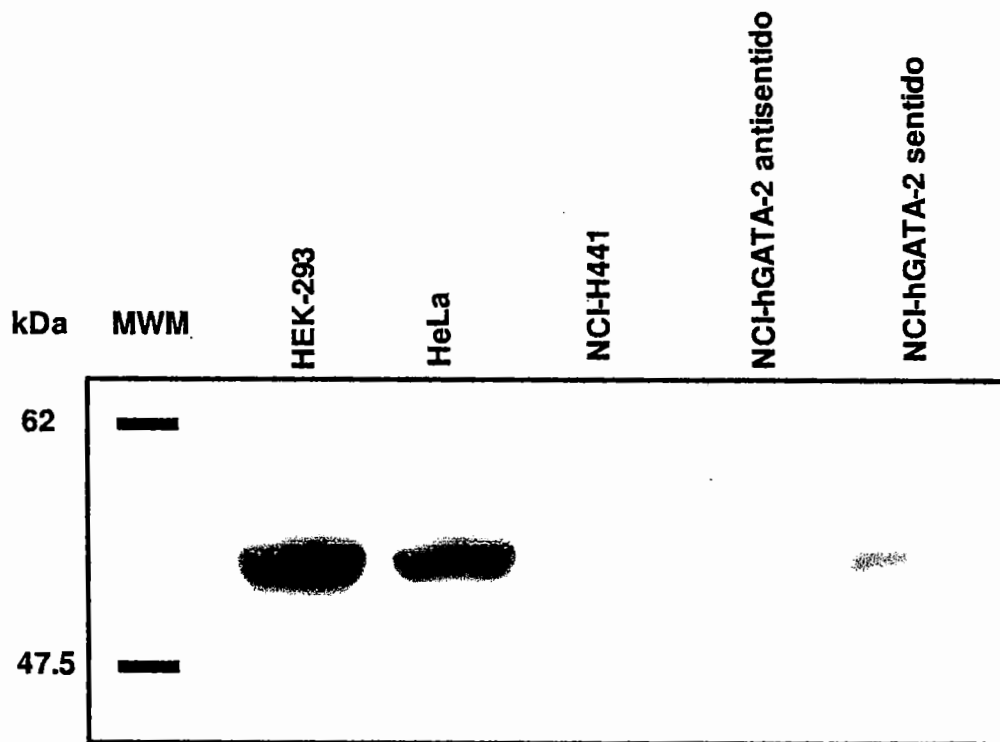


Figura 6.11. Inmunoblot del factor de transcripción humano GATA-2 en diferentes líneas celulares. 10 μ g de proteínas totales obtenidas de los extractos nucleares de las líneas celulares indicadas, se analizaron mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo específico contra GATA-2. Las células NCI-H441 fueron transfectadas con los plásmidos de expresión pTarget-hGATA-2 antisense y pTarget-hGATA-2 sentido como se describe en Materiales y Métodos. Las células HEK-293 se utilizaron como control positivo.

7. DISCUSIÓN

El análisis que se efectuó con el programa de computación Mat-Inspector en los primeros 766 pb de la secuencia de flaqueo 5' del gen de PSCCh, identificó varios elementos GATA y Ets que podrían participar en la regulación de la actividad de este promotor. Para demostrar la importancia de estos sitios, se transfectaron las células NCI-H441 y HeLa con el promotor de la PSCCh mutado en los elementos GATAd (790/802 pb) y Ets (713/725), los cuales fueron seleccionados por su alta homología con los sitios consenso para GATA y Ets. Los ensayos de transfección realizados en las células NCI-H441 no revelaron diferencias significativas en la actividad de las construcciones mutantes y silvestre. Por otra parte, los resultados obtenidos en las células HeLa contrastan significativamente con los observados en NCI-H441; ya que en estas células las construcciones mutantes en GATAd y Ets, pierden alrededor de un 40% y 20% respectivamente en la actividad del promotor, en relación con el promotor silvestre (Fig. 6.1). Estos resultados sugieren que estos elementos son importantes en la regulación del promotor de la PSCCh e indican que los *trans*-factores que interaccionan con estas secuencias se encuentran en las células HeLa, pero no en las NCI-H441. Una de las razones por las que se decidió estudiar el elemento Ets fue principalmente por que este factor suele actuar de manera cooperativa con los factores de transcripción GATA, sin embargo los resultados indican que al menos en el contexto del promotor de la PSCCh estas secuencias funcionan de manera independiente. No obstante, aunque el elemento genético Ets parece tener importancia en la regulación transcripcional del gen de la PSCCh, aún queda por demostrar cual de los 30 factores que conforman la familia Ets (Bhat *et al.*, 1987) es el que interacciona con esta secuencia.

De los factores de transcripción de la familia GATA que se han descrito hasta ahora, solo el factor GATA-2 se expresa abundantemente en la línea celular HeLa (Dorfman *et al.*, 1992), mientras que en la línea celular NCI-H441 la presencia de GATA-2 o algún otro miembro de la familia GATA, no ha sido claramente demostrado. Los resultados del *Northern blot* en diferentes líneas celulares (Fig. 6.2) indican que las células HeLa efectivamente expresan abundantemente el factor GATA-2, mientras que las células NCI-H441 no expresan este factor, al menos no en la concentración suficiente para su detección por esta técnica. Estos resultados sugieren que la mutación en el elemento GATAd no tiene efecto en las células NCI-H441 porque no expresan el factor o bien porque lo expresan en muy baja concentración.

Para definir si el factor GATA-2 es el responsable de la regulación observada en las células HeLa decidimos clonar el factor de transcripción humano GATA-2 a partir del ARN total de las células HEK-293 en un vector de expresión que nos permitiera expresar esta proteína en las células NCI-H441. La expresión del factor hGATA-2 en las células NCI-H441 ejerce un efecto estimulador en la actividad del promotor de la PSCCh (18%, $p < 0.008$) y este efecto parece estar mediado por el elemento genético GATAd, ya que una mutación en el núcleo de este elemento elimina por completo la actividad inducida por este factor (Fig. 6.6). Estos datos indican que el promotor de la PSCCh es regulado por el factor de transcripción GATA-2, a través de su interacción con el elemento genético GATAd del promotor de la PSCCh.

La confirmación de que los factores de transcripción GATA regulan la transcripción del gen de la PSCCh, nos motivó a realizar un análisis minucioso por computadora para detectar otros elementos putativos para estos factores de transcripción en el promotor de la PSCCh. Este análisis detectó un segundo elemento, más proximal al sitio de inicio de la transcripción (1282/1294) (GATAp), el cual también tiene una alta homología con la secuencia consenso para los factores de transcripción GATA. Este elemento (GATAp) también es importante para la actividad del promotor de la PSCCh puesto que la alteración de la secuencia de este elemento mediante mutagénesis sitio-dirigida disminuye la actividad del promotor en un 40% ($p < 0.01$) en células HeLa (Fig. 6.7). Sin embargo, los ensayos de expresión transitoria realizados en la línea celular NCI-H441, sugieren que la mutación del elemento GATAp en el promotor de la PSCCh incrementa la actividad del promotor 3.5 veces en comparación con la obtenida con la construcción silvestre (Fig. 6.8). Los factores de transcripción GATA activan la transcripción, por lo que es difícil pensar que estos factores sean los responsables del incremento en la transcripción del gen de la PSCCh. Estos datos sugieren que las células NCI-H441 poseen un factor que inhibe poderosamente la transcripción del gen a través de su interacción con el elemento GATAp (AGATAA). Cuando estudiamos con más detenimiento las vecindades de este elemento encontramos una repetición directa casi perfecta del elemento (AGAGAAGATA).

Esta secuencia es muy semejante a la secuencia consenso para el factor de transcripción Evi-1 (AGATAAGATA). Este factor se caracteriza por su poder inhibitorio en genes involucrados en la diferenciación celular de riñón y ovario (Perkins *et al.*, 1991; Brooks *et al.*, 1996) y además se expresa abundantemente en las células de adenocarcinoma pulmonar (Brooks *et al.*, 1996). Este hallazgo abre nuevas perspectivas en el estudio del gen de la PSCCh, donde Evi-1 es un candidato potencial para la regulación negativa del gen de la PSCCh en las células NCI-H441 y muy probablemente en el pulmón.

Los ensayos de expresión transitoria sugieren que el factor de transcripción GATA-2 regula la transcripción del promotor de la PSCCh; sin embargo, para comprobar fehacientemente que este factor transactiva al promotor a través de los elementos GATA distal y proximal. Se llevaron a cabo ensayos de retardo en la movilidad electroforética utilizando proteínas nucleares de las líneas celulares HeLa y NCI-H441. Los resultados indican que el factor se une específicamente a las secuencias del promotor de la PSCCh denominados GATAp y GATAd, demostrando que estas secuencias específicas son elementos genéticos en *cis* funcionales en el promotor de la PSCCh (Figs. 6.9 y 6.10). Esto confirma que el factor de transcripción implicado en la regulación positiva observada en estas células (HeLa y NCI-H441) es GATA-2, pero de ninguna manera indican que la transcripción *in vivo* del promotor de la PSCCh mediante estos elementos es por GATA-2; ya que el pulmón expresa también los factores GATA-4, GATA-5 y GATA-6 (Bruno *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2001; Keijzer *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002).

Las células NCI-H441 expresan el factor de transcripción GATA-2, en baja concentración; ya que si se toma en cuenta que las cantidades de extracto y marca son la mismas para todos los ensayos, los super-retardos obtenidos con extractos de células NCI-H441 son menos intensos que los que se obtuvieron con extractos de células HeLa. Esta baja expresión de GATA-2 explica, en parte, porque no observamos diferencia entre el promotor silvestre y los mutantes en GATAd y GATAp en las células NCI-H441. Por otra parte, el hecho de que los retardos obtenidos con los extractos de células NCI-H441 no se conserven por completo en presencia del oligonucleótido mutado, ni desaparezcan totalmente con el anticuerpo, nos sugiere la posibilidad que tanto GATAd como GATAp son

reconocidos por otro factor de transcripción, que probablemente este en mayor concentración y por lo tanto compite exitosamente por los sitios de unión con GATA-2.

Tomando en cuenta que varias estirpes celulares del pulmón expresan algunos de los factores de transcripción de la familia GATA, ya sea durante el desarrollo, constitutivamente en el adulto o de forma inducida por determinados estímulos; los resultados obtenidos en el presente estudio indican fuertemente que los elementos en *cis* (GATAd, GATAp) podrían desempeñar un papel importante en la transcripción del gen de la PSCCh en el tejido pulmonar (*in vivo*), a través de su interacción con factores de transcripción de la familia GATA.

8. CONCLUSIONES

El promotor de la PSCCh posee dos elementos genéticos en *cis* (GATAd y GATAp) para los factores de transcripción de la familia GATA.

En las líneas celulares HeLa y NCI-H441 el trans-factor que interacciona con los elementos GATA del promotor de la PSCCh es GATA-2.

El elemento genético GATA proximal puede interaccionar con un *trans*-factor diferente a GATA-2 en las células NCI-H441; el cual ejerce un efecto inhibitorio en la transcripción del gen de la PSCCh. Este fenómeno subraya la importancia de la expresión célula-específica de este promotor.

El elemento genético Ets analizado en este estudio estimula la transcripción del gen de la PSCCh, pero no actúa en cooperación con el elemento GATAd de este mismo promotor.

9.-BIBLIOGRAFIA

- Andersson O, Nordlund-Moller L, Barnes HJ, Lund J** 1994 Heterologous expression of human uteroglobin/polychlorinated biphenyl-binding protein. Determination of ligand binding parameters and mechanism of phospholipase A2 inhibition in vitro. *J Biol Chem* 269:19081-7
- Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB** 1993 Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13:2235-46
- Aumuller G, Seitz J, Heyns W, Kirchner C** 1985 Ultrastructural localization of uteroglobin immunoreactivity in rabbit lung and endometrium, and rat ventral prostate. *Histochemistry* 83:413-7
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, k. S** 2000 Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.* Massachusetts, USA
- Beier HM** 1968 Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta* 160:289-91
- Bhat NK, Fisher RJ, Fujiwara S, Ascione R, Papas TS** 1987 Temporal and tissue-specific expression of mouse ets genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3161-5
- Bingle CD, Gitlin JD** 1993 Identification of hepatocyte nuclear factor-3 binding sites in the Clara cell secretory protein gene. *Biochem J* 295 (Pt 1):227-32
- Bingle CD, Hackett BP, Moxley M, Longmore W, Gitlin JD** 1995 Role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha and hepatocyte nuclear factor- 3 beta in Clara cell secretory protein gene expression in the bronchiolar epithelium. *Biochem J* 308:197-202.
- Boggaram V** 2003 Regulation of lung surfactant protein gene expression. *Front Biosci* 8:d751-64
- Boyd MR** 1977 Evidence for the Clara cell as a site of cytochrome P450-dependent mixed-function oxidase activity in lung. *Nature* 269:713-5
- Breeze RG, Wheeldon EB** 1977 The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* 116:705-77.
- Brooks DJ, Woodward S, Thompson FH, Dos Santos B, Russell M, Yang JM, Guan XY, Trent J, Alberts DS, Taetle R** 1996 Expression of the zinc finger gene EVI-1 in ovarian and other cancers. *Br J Cancer* 74:1518-25
- Bruno MD, Korfhagen TR, Liu C, Morrissey EE, Whitsett JA** 2000 GATA-6 activates transcription of surfactant protein A. *J Biol Chem* 275:1043-9
- Cao Z, Umek RM, McNight SL** 1991 Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552
- Cardoso WV, Stewart LG, Pinkerton KE** 1993 Secretory product expression during Clara Cell differentiation in the rabbit and the rat. *Am J Physiol* 264:L543-L552
- Cassel TN, Nordlund L, Andersson O** 2000 C/EBP alpha and C/EBP delta activate the Clara cell secretory protein gene through activation with two adjacent C/EBP-binding sites. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:469-480
- Cassel TN, Berg T, Suske G, Nord M** 2002 Synergistic transactivation of the differentiation-dependent lung gene Clara cell secretory protein (secretoglobin 1a1) by the basic region leucine zipper factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and the homeodomain factor Nkx2.1/thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem* 277:36970-7

- Cato AC, Geisse S, Wenz M, Westphal HM, Beato M** 1984 The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription. *Embo J* 3:2771-8
- Chandra T, Bullock DW, Woo SL** 1981 Hormonally regulated mammalian gene expression: steady-state level and nucleotide sequence of rabbit uteroglobin mRNA. *DNA* 1:19-26
- Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- Chowdhury B, Mantile-Selvaggi G, Kundu GC, Miele L, Cordella-Miele E, Zhang Z, Mukherjee AB** 2000 Amino acid residues in alpha-helix-3 of human uteroglobin are critical for its phospholipase A2 inhibitory activity. *Ann N Y Acad Sci* 923:307-11
- Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L** 2001 Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L823-38
- Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, McIntosh LP** 1996 Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *Embo J* 15:125-34
- Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH** 1992 Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 267:1279-85
- Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH** 1992 Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 267:1279-85.
- Evans T, Felsenfeld G** 1989 The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell* 58:877-85
- Fernandez-Renau D, Lombardero M, Nieto A** 1984 Glucocorticoid-dependent uteroglobin synthesis and uteroglobulin mRNA levels in rabbit lung explants cultured in vitro. *Eur J Biochem* 144:523-7
- German Z, Chambliss KL, Pace MC, Arnet UA, Lowenstein CJ, Shaul PW** 2000 Molecular basis of cell-specific endothelial nitric-oxide synthase expression in airway epithelium. *J Biol Chem* 275:8183-9
- Gordon DF, Lewis SR, Haugen BR, James RA, McDermott MT, Wood WM, Ridgway EC** 1997 Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. *J Biol Chem* 272:24339-47
- Graham RM, Friedman M, Hoyle GW** 2001 Sensory nerves promote ozone-induced lung inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164:307-13
- Gutierrez Sagal R, Nieto A** 1998 Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster uteroglobin/Clara Cell 10-kDa gene (ug/cc10): tissue-specific and hormonal regulation. *Arch Biochem Biophys* 350:214-222
- Gutierrez-Sagal R, Nieto A** 1998 Cloning and sequencing of the cDNA coding for pig pre-uteroglobin/Clara cell 10 kDa protein. *Biochem Mol Biol Int* 45:205-13.
- Hackett BP, Bingle CD, Gitlin JD** 1996 Mechanisms of gene expression and cell fate determination in the developing pulmonary epithelium. *Annu Rev Physiol* 58:51-71
- Hagen G, Wolf M, Katyal SL, Singh G, Beato M, Suske G** 1990 Tissue-specific expression, hormonal regulation and 5'-flanking gene region of the rat Clara cell 10 kDa protein: comparison to rabbit uteroglobin. *Nucleic Acids Res* 18:2939-46
- Hard T, Barnes HJ, Larsson C, Gustafsson JA, Lund J** 1995 Solution structure of a mammalian PCB-binding protein in complex with a PCB. *Nat Struct Biol* 2:983-9

- Hashimoto Y, Ware J** 1995 Identification of essential GATA and Ets binding motifs within the promoter of the platelet glycoprotein Ib alpha gene. *J Biol Chem* 270:24532-9
- Hermans C, Bernard A** 1999 Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 159:646-78.
- Jeffery PK** 1987 The origins of secretions in the lower respiratory tract. *Eur J Respir Dis Suppl* 153:34-42
- Keijzer R, van Tuyl M, Meijers C, Post M, Tibboel D, Grosveld F, Koutsourakis M** 2001 The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development. *Development* 128:503-11
- Ko JH, Miyoshi E, Noda K, Ekuni A, Kang R, Ikeda Y, Taniguchi N** 1999 Regulation of the GnT-V promoter by transcription factor Ets-1 in various cancer cell lines. *J Biol Chem* 274:22941-8
- Ko LJ, Engel JD** 1993 DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13:4011-22
- Krishnan RS, Daniel JC, Jr.** 1967 "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science* 158:490-2.
- Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T** 1994 GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177-84
- Lemarchandel V, Ghysdael J, Mignotte V, Rahuel C, Romeo PH** 1993 GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol Cell Biol* 13:668-76
- Li F, Rosenberger E, Smith CI** 1995 Correlation of the expression of transcription factor C/EBP alpha and surfactant protein genes in lung cell. *Am J Physiol* 269:L241-L247
- Lopez de Haro MS, Nieto A** 1986 Nucleotide and derived amino acid sequences of a cDNA coding for pre-uteroglobin from the lung of the hare (*Lepus capensis*). *Biochem J* 235:895-8
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ** 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lund J, Nordlund L, Gustafsson JA** 1988 Partial purification of a binding protein for polychlorinated biphenyls from rat lung cytosol: physicochemical and immunochemical characterization. *Biochemistry* 27:7895-901
- Margraf LR, Finegold MJ, Stanley LA, Major A, Hawkins HK, DeMayo FJ** 1993 Cloning and tissue-specific expression of the cDNA for the mouse Clara cell 10 kD protein: comparison of endogenous expression to rabbit uteroglobin promoter-driven transgene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:231-8
- Massaro GD, David L, Massaro D** 1984 Postnatal development of the bronchiolar Clara cell in rats. *Am J Physiol* 247:C197-C203
- Merika M, Orkin SH** 1993 DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13:3999-4010
- Miele L, Cordella-Miele E, Mukherjee AB** 1987 Uteroglobin: structure, molecular biology, and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. *Endocr Rev* 8:474-90
- Miele L, Cordella-Miele E, Mantile G, Peri A, Mukherjee AB** 1994 Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: the uteroglobin family of proteins. *J Endocrinol Invest* 17:679-92

- Molkentin JD** 2000 The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275:38949-52
- Morize I, Surcouf E, Vaney MC, Epelboin Y, Buehner M, Fridlansky F, Milgrom E, Mornon JP** 1987 Refinement of the C222(1) crystal form of oxidized uteroglobin at 1.34 Å resolution. *J Mol Biol* 194:725-39
- Morrissey EE, Ip HS, Lu MM, Parmacek MS** 1996 GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol* 177:309-22
- Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS** 1997 GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol* 183:21-36
- Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, Yuan CJ, Mandal AK, Chattopadhyay S, Zheng F, Pattabiraman N, Zhang Z** 1999 Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol Life Sci* 55:771-87
- Nord M, Andersson O, Brönnengard M, Lund J** 1992 Rat lung polychlorinated biphenyl-binding protein: effect of the glucocorticoids on the expression of the Clara cell-specific protein during fetal development. *Arch Biochem Biophys* 296:302-307
- Nord M, Cassel TN, Braun H, Suske G** 2000 Regulation of the Clara cell secretory protein/uteroglobin promoter in lung. *Ann N Y Acad Sci* 923:154-65
- Nordlund-Moller L, Andersson O, Ahlgren R, Schilling J, Gillner M, Gustafsson JA, Lund J** 1990 Cloning, structure, and expression of a rat binding protein for polychlorinated biphenyls. Homology to the hormonally regulated progesterone-binding protein uteroglobin. *J Biol Chem* 265:12690-3
- Omichinski JG, Trainor C, Evans T, Gronenborn AM, Clore GM, Felsenfeld G** 1993 A small single-"finger" peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1676-80
- Otto-Verberne CJ, Ten Have-Opbroek AA** 1987 Development of the pulmonary acinus in fetal rat lung: a study based on an antiserum recognizing surfactant-associated proteins. *Anat Embryol (Berl)* 175:365-373
- Perkins AS, Mercer JA, Jenkins NA, Copeland NG** 1991 Patterns of Evi-1 expression in embryonic and adult tissues suggest that Evi-1 plays an important regulatory role in mouse development. *Development* 111:479-87
- Pescetti G, Gozzelino F, Osella D, Scagliotti G** 1980 [Ultrastructure of the pulmonary alveolus. Correlations with the endoalveolar tensioactive system]. *Minerva Med* 71:73-82
- Ray MK, Magdaleno S, O'Malley BW, DeMayo FJ** 1993 Cloning and characterization of the mouse Clara cell specific 10 kDa protein gene: comparison of the 5'-flanking region with the human rat and rabbit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 197:163-71
- Ray MK, Magdaleno SW, Finegold MJ, DeMayo FJ** 1995 cis-acting elements involved in the regulation of mouse Clara cell-specific 10-kDa protein gene. In vitro and in vivo analysis. *J Biol Chem* 270:2689-94.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** 1989 Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sawaya PL, Luse DS** 1994 Two members of the HNF-3 family have opposite effects on a lung transcriptional element; HNF-3 alpha stimulates and HNF-3 beta inhibits

- activity of region I from the Clara cell secretory protein (CCSP) promoter. *J Biol Chem* 269:22211-6
- Sawaya PL, Stripp BR, Whitsett JA, Luse DS** 1993 The lung-specific CC10 gene is regulated by transcription factors from the AP-1, octamer, and hepatocyte nuclear factor 3 families. *Mol Cell Biol* 13:3860-71
- Scholz A, Truss M, Beato M** 1999 Hormone-dependent recruitment of NF-Y to the uteroglobin gene enhancer associated with chromatin remodeling in rabbit endometrial epithelium. *J Biol Chem* 274:4017-26
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W** 1989 Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419.
- Silverman ES, Baron RM, Palmer LJ, Le L, Hallock A, Subramaniam V, Riese RJ, McKenna MD, Gu X, Libermann TA, Tugores A, Haley KJ, Shore S, Drazen JM, Weiss ST** 2002 Constitutive and cytokine-induced expression of the ETS transcription factor ESE-3 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:697-704
- Singh G, Katyal SL, Wong-Chong ML** 1986 A quantitative assay for a Clara cell-specific protein and its application in the study in the development of pulmonary airways in the rat. *Pediatr Res* 20:802-805
- Singh G, Katyal SL, Brown WE, Phillips S, Kennedy AL, Anthony J, Squeglia N** 1988 Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 950:329-37
- Stripp BR, Huffman JA, Bohinski RJ** 1994 Structure and regulation of the murine Clara cell secretory protein gene. *Genomics* 20:27-35
- Stripp BR, Reynolds SD, Plopper CG, Boe IM, Lund J** 2000 Pulmonary phenotype of CCSP/UG deficient mice: a consequence of CCSP deficiency or altered Clara cell function? *Ann N Y Acad Sci* 923:202-9
- Stripp BR, Sawaya PL, Luse DS, Wikenheiser KA, Wert SE, Huffman JA, Lattier DL, Singh G, Katyal SL, Whitsett JA** 1992 cis-acting elements that confer lung epithelial cell expression of the CC10 gene. *J Biol Chem* 267:14703-12
- Strum JM, Compton RS, Katyal SL, Singh G** 1992 The regulated expression of mRNA for Clara cells protein in the developing airways of the rat, as revealed by tissue *in situ* hybridization. *Tissue Cell* 24:461-471
- Suske G, Wenz M, Cato AC, Beato M** 1983 The uteroglobin gene region: hormonal regulation, repetitive elements and complete nucleotide sequence of the gene. *Nucleic Acids Res* 11:2257-71
- Suske G, Menne C, Cato A, Wenz M, Beato M** 1982 Structure and regulated expression of the uteroglobin gene. *Prog Clin Biol Res* 102 pt A:139-46
- Suzuki E, Evans T, Lowry J, Truong L, Bell DW, Testa JR, Walsh K** 1996 The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics* 38:283-90
- Ten Have-Opbroek AA** 1981 The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and findings. *Am J Anat* 162:201-219
- Torkkeli T, Krusius T, Janne O** 1978 Uterine and lung uteroglobins in the rabbit. Two similar proteins with differential hormonal regulation. *Biochim Biophys Acta* 544:578-92
- Trainor CD, Omichinski JG, Vandergon TL, Gronenborn AM, Clore GM, Felsenfeld G** 1996 A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires

- both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Mol Cell Biol* 16:2238-47
- Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH** 1989 Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339:446-51
- Tymms MJ, Kola I** 1994 Regulation of gene expression by transcription factors Ets-1 and Ets-2. *Mol Reprod Dev* 39:208-14
- Umland TC, Swaminathan S, Furey W, Singh G, Pletcher J, Sax M** 1992 Refined structure of rat Clara cell 17 kDa protein at 3.0 Å resolution. *J Mol Biol* 224:441-8
- Umland TC, Swaminathan S, Singh G, Warty V, Furey W, Pletcher J, Sax M** 1994 Structure of a human Clara cell phospholipid-binding protein-ligand complex at 1.9 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1:538-45
- Van Winkle LS, Isaac JM, Plopper CG** 1996 Repair of naphthalene-injured microdissected airways in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:1-8
- Wang J, Homer RJ, Chen Q, Elias JA** 2000 Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol* 165:4051-61
- Wang J, Homer RJ, Hong L, Cohn L, Lee CG, Jung S, Elias JA** 2000 IL-11 selectively inhibits aeroallergen-induced pulmonary eosinophilia and Th2 cytokine production. *J Immunol* 165:2222-31
- Wang SZ, Rosenberger CL, Bao YX, Stark JM, Harrod KS** 2003 Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 171:1051-60
- Warembourg M, Tranchant O, Atger M, Milgrom E** 1986 Uteroglobin messenger ribonucleic acid: localization in rabbit uterus and lung by in situ hybridization. *Endocrinology* 119:1632-40
- Weaver TE, Whitsett JA** 1988 Structure and function of pulmonary surfactant proteins. *Semin Perinatol* 12:213-20
- Weaver TE, Whitsett JA** 1991 Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem J* 273(Pt 2):249-64
- Weiss MJ, Yu C, Orkin SH** 1997 Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol* 17:1642-51
- Wolf M, Klug J, Hackenberg R, Gessler M, Grzeschik KH, Beato M, Suske G** 1992 Human CC10, the homologue of rabbit uteroglobin: genomic cloning, chromosomal localization and expression in endometrial cell lines. *Hum Mol Genet* 1:371-8
- Yamamoto M, Ko LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, Engel JD** 1990 Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev* 4:1650-62
- Yang H, Lu MM, Zhang L, Whitsett JA, Morrissey EE** 2002 GATA6 regulates differentiation of distal lung epithelium. *Development* 129:2233-46

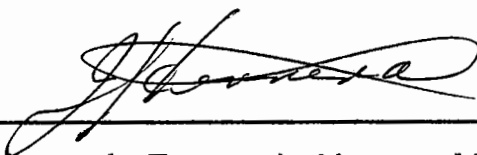
Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 9 de Junio del 2004.



Dr. Rubén Gutiérrez Sagal
Presidente



Dr. Edmundo Bonilla González
Secretario



M. en BE. Joaquín Fernando Herrera Muñoz
Vocal