



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA**

**ANALISIS DE LAS INTERACCIONES DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCION REST CON
OTRAS PROTEINAS**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTA
FABIOLA GONZALEZ CANO**

MEXICO, D.F. DICIEMBRE 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. CAMPUS

IZT.

Este trabajo se realizó en el laboratorio dos del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del doctor José Tapia Ramírez.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor el doctor José Tapia Ramírez porque es un ejemplo de que cualquier proyecto que se emprenda puede lograrse de manera impecable.

Le doy gracias a mis padres Rosita y Hermenegildo, por su apoyo y ejemplo y también porque este logro indudablemente es en gran parte de ellos.

Les agradezco a mis hermanos Héctor, Rosalba, Laura y Sergio por hacer mi vida tan feliz.

A Jessie y Mayela, mis amigas insustituibles.

Agradezco a mis amigas Adriana, Imelda y Judith por compartir conmigo su tiempo, sus sueños y sus realidades, es un privilegio ser su amiga.

Le doy gracias a Claudia, Susana, Alberto, Ulises y Ernesto; cada uno ocupa un lugar muy especial en mi vida.

Agradezco a Carlos por su paciencia y su ayuda incondicional.

Amis compañeros de la carrera, ya que juntos recorrimos una parte importante del camino.

Agradezco a la vida por permitirme compartir el tiempo y espacio con cada uno de ustedes ya que de todos he aprendido mucho y han enriquecido mi vida.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	VI
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	1
INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS.....	1
EL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN.....	3
EL GEN DEL CANAL DE SODIO TIPO II COMO MODELO DE REGULACIÓN.....	8
LAS INTERACCIONES DE REST CON LOS COMPONENTES DE LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN.....	19
OBJETIVOS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVO PARTICULAR.....	20
METODOLOGIA.....	21
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN REST POR EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA.....	21
SECUENCIACIÓN DE CANDIDATOS.....	24
TAMIZAJE DE UNA BIBLIOTECA DE CDNA.....	24
MARCAJE DE LA "SONDA".....	25
HIBRIDACIÓN CON LA SONDA.....	26
TAMIZAJE SECUNDARIO.....	26
EXCISIÓN DEL PLÁSMIDO.....	27
SUBCLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSION.....	38
APENDICES.....	44
APENDICE I.....	44
<i>Medios y soluciones</i>	44

APENDICE II	48
<i>Cepas de bacteria y levadura</i>	48
APENDICE III	49
<i>Técnicas adicionales</i>	49
Extracción de DNA plasmídico por minipreparación	49
Restricción de DNA	49
Preparación de bacterias competentes	50
Transformación de bacterias con DNA plasmídico	50
Preparación y corrida del gel de secuenciación	50
APENDICE IV	52
<i>Mapas de vectores</i>	52
BIBLIOGRAFIA	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura primaria de REST	13
Figura 2	Dominios de represión de REST.....	14
Figura 3	REST reprime la expresión de genes reporteros CAT.....	15
Figura 4	Sistema del doble híbrido.....	22
Figura 5	Excisión <i>in vivo</i> del fagemido Bluescript del vector Uni-ZAP XR.....	28
Figura 6	Detección de proteínas que interaccionan con el dominio represor TRD1 de REST	31
Figura 7	Tamizaje de los candidatos positivos obtenidos en el 2o "screening"	33
Figura 8	Patrón de restricción de candidatos del tamizaje de la clona 1P.....	34
Figura 9	Secuenciación de la clona 1P2.1	34
Figura 10	Comparación de la secuencia de nucleótidos del candidato 1P2.1 contra el banco de genes GenBank	36
Figura 11	Secuencia primaria de la proteína RACK1	37
Figura 12	Interacción de RACK con PKC.....	40
Figura 13	Posible resultado de la interacción REST-RACK1-PKC	42

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADH1	Alcohol deshidrogenasa
APP	Proteína precursora β -amiloide
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP
dATP	Deoxiadenina trifosfato
dCTP	deoxicitosina trifosfato
ddNTP	Dideoxinucleotido trifosfato
dGTP	Deoxiguanina trifosfato
dNTP	Deoxinucleotido trifosfato
dTTP	Deoxiatimidina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Acido desoxiribonucleico
DO	Densidad optica
GTFs	Factores de transcripción generales
his	Histidina
kDa	KiloDaltons
leu	Leucina
MHC clase II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
nNOS	Oxido nítrico sintetasa neuronal
NRSE	Elemento silenciador restrictivo de neuronas
NRSF	Factor silenciador restrictivo de neuronas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C

RA	Acido retinoico
RE1	Elemento represor 1
REST	Factor de transcripción silenciador de RE1
RNA	Acido ribonucleico
RNApol	RNA polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
SNC	Sistema nervioso central
STATs	Transductores de señales y activadores de la transcripción
TAFIIIs	Factores asociados a TBP para la RNA polimerasa II
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TFIIA	Factor de transcripción A para la RNA polimerasa II
TFIIB	Factor de transcripción B para la RNA polimerasa II
TFIID	Factor de transcripción D para la RNA polimerasa II
TFIIE	Factor de transcripción E para la RNA polimerasa II
TFIIF	Factor de transcripción F para la RNA polimerasa II
TFIIH	Factor de transcripción H para la RNA polimerasa II
TFIISs	Factores generales de elongación de la transcripción para la RNA polimerasa II
TK	Timidina cinasa
TRD1	Dominio represor de la transcripción 1
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
trp	Triptofano
ufp	Unidades formadoras de placa
UV	Ultravioleta
W	Watts
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosida
Zn	Zinc

RESUMEN

La expresión del gen del canal de sodio tipo II es restringida a neuronas por una secuencia en el DNA llamada RE1, activa en células no neuronales, nosotros demostramos que la expresión de un cDNA que codifica para un factor de transcripción silenciador de RE1 (REST) es suficiente para unirse a este elemento silenciador y reprimir la expresión de genes reporteros en los que esta presente el promotor del gen del canal de sodio tipo II. REST contiene dos dominios represores, el primer dominio represor mapea en la región N-terminal abarcando 83 aminoácidos, el segundo dominio represor se localiza en el extremo carboxilo terminal de REST y este incluye el último dedo de zinc. Hay estudios que sugieren que otras proteínas que se unen a REST están involucradas en el mecanismo de represión, la identificación de factores de transcripción u otras proteínas accesorias que interaccionen con REST es importante para conocer el mecanismo implicado en la represión llevada a cabo por este factor de transcripción. Para encontrar los blancos celulares de interacción con REST, usamos el dominio represor N-terminal como anzuelo en un "screening" de una librería de cDNA de células HeLa utilizando el sistema del doble híbrido, encontrando cuatro clonas, la clona 1P2 tiene un 98% de homología a nivel de nucleótidos con RACK1 un receptor para proteína cinasa C activada y un homologo para la subunidad β de la proteína G, la interacción de REST con RACK1 podría funcionar como un punto de encuentro con PKC la cual entonces fosforilaría a REST, estos resultados sugieren un posible modelo de regulación para este represor neuronal, en el cual la fosforilación puede ser importante para su actividad.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Interacción entre proteínas

En la gran mayoría de procesos biológicos es esencial la interacción entre proteínas, dichos procesos incluyen eventos extracelulares así como intracelulares, como ejemplo de los primeros están las interacciones receptor-ligando, adhesión celular, reconocimiento de antígenos y reconocimiento virus-huésped, mientras que en los segundos tenemos la formación de complejos multi-proteína, el ensamble de elementos del citoesqueleto, la transducción de señales, procesos enzimáticos, transporte nuclear y el ensamble de la maquinaria transcripcional (el cual se menciona con detalle mas adelante), solo por mencionar unos pocos ejemplos.

Es de esperar por tanto que la interacción entre proteínas sea el resultado de todo un proceso evolutivo en el que se ha generado una gran variedad de dominios conservados que seguramente todavía no son conocidos y caracterizados en su totalidad, sin embargo entre los que se han identificado se sabe que están presentes en proteínas involucradas en la reparación de DNA (Aravind y cols., 1999), en toxinas, en las que éstos dominios se encuentran flanqueados por residuos de prolina (Kini, 1998), en proteínas que participan en la transducción de señales (Della y cols., 1995) en las que su interacción con otras proteínas mediada por dominios como SH2 y SH3 es necesaria para la transmisión de señales proliferativas (4); dominios WW han sido detectados en proteínas no relacionadas, éstos se unen a secuencias ricas en prolina y recientes estudios sugieren que en proteínas específicas pueden jugar un papel en enfermedades como hipertensión o distrofia muscular (Staub y Rotin, 1996), un ejemplo de una proteína con un dominio WW es Fe56, la cual además posee dos dominios PID/PTB estos tres dominios le permiten interactuar con varias proteínas, una de estas es conocida como APP, dicha proteína esta implicada en el fenotipo de la enfermedad de Alzheimer (Russo y cols., 1998), otros dominios también encontrados en proteínas no relacionadas son los conocidos como "RING" y "B-box", sin embargo se sabe que varias proteínas que contienen el dominio RING son oncoproteínas y datos recientes indican que a través de este dominio pueden ser mediadas actividades proapoptóticas (Borden, 1998); el dominio LIM es un dominio rico en cisteína compuesto

de dos dedos de zinc especiales, las proteínas LIM incluyen factores de transcripción y proteínas de citoesqueleto entre otras, algunas de estas proteínas están involucradas en el control de la determinación del linaje celular, y regulación de la diferenciación así como en el control de proliferación celular (Dawid y cols.; 1995, Sanchez-Garcia y Rabbitts, 1994) mientras que en la regulación de la localización, agrupamiento y función de varios canales iónicos y transportadores se ha demostrado que los dominios PDZ, el homólogo 3 de Src y el ya antes mencionado WW participan de manera importante (Staub y Rotin, 1997, Sheng y Wyszynski, 1997); en cuanto al dominio PDZ, este es parte de la oxido nítrico sintetasa, enzima importante en procesos de neurotransmisión y relajación muscular, dicho dominio es responsable de la localización correcta en las membranas sinápticas de una de las isoformas de nNOS (Brenman y cols., 1997).

No obstante el amplio número de publicaciones que tratan de interacción entre proteínas, en la mayoría de estas no se hace referencia a los dominios participantes, sin embargo los eventos que tienen lugar gracias a estas interacciones son de gran relevancia, como es el caso de la translocación de citoplasma a núcleo del receptor glucocorticoide el cual para lograr dicho transporte se asocia con la inmunofilina hsp56 (Pratt y cols., 1993), así mismo la proteína FMRP cuya falta de expresión es causa del fenotipo del síndrome del X frágil, se une a otras proteínas y lleva a cabo su translocación nuclear (Hoogeveen y Oostra, 1997); otro caso de mucho interés es el de proteínas virales capaces de transactivar genes celulares y virales, como es el caso de la proteína X del virus de la hepatitis B, se sugiere que esta transactivación es resultado de la asociación entre proteínas (Koike y Takada, 1995). Uno de los ejemplos mas recurridos en el tema que nos ocupa es el de proteínas que participan en procesos de señalización y dentro de estas, las proteínas G, que son componentes vitales de un gran número de vías de señalización, para que estas proteínas lleven a cabo su función es indispensable la interacción con los receptores y efectores apropiados, pero como primer paso se requiere la asociación entre sus subunidades (Higgins y Casey, 1996); otro ejemplo de proteínas que participan en la transducción de señales son las pertenecientes a la familia de las STATs las cuales también participan en el control de genes, puesto que son activadores transcripcionales y por lo tanto presentan dominios para la interacción con cinasas, fosfatasas, receptores, otros factores de

transcripción y la misma maquinaria de transcripción (Darnell, 1997); los reguladores transcripcionales es de esperar que ejerzan su control en parte por su interacción con otras proteínas (Hawkins y Lamb, 1995) como es el caso de las proteínas Egr, miembros de una subclase de factores de transcripción inducibles, presentes en el sistema nervioso (Beckmann y Wilce 1997), los receptores de hormonas esteroideas (Klein-Hitpass y cols., 1998), un factor de respuesta a auxina (Guilfoyle y cols., 1998) y otros factores de transcripción de plantas (Takatsuji, 1998) esta manera de regulación no solo se da en el inicio de la transcripción sino también en el procesamiento del mRNA al asociarse la RNA polimerasa II con factores de corte y poliadenilación (Zhao y cols., 1999) y a nivel de cromatina interaccionando esta con diferentes proteínas regulatorias a través del amino terminal del "core" de histonas (Hansen y cols., 1998).

El proceso de transcripción

El control de la expresión genética es un proceso fundamental en el desarrollo y organización de los organismos multicelulares, ya que la adecuada expresión de los genes a través del tiempo y el espacio permite una oportuna diferenciación y especialización de la célula y el tejido, una de las etapas principales de regulación es a nivel de transcripción, la transcripción es el proceso por el cual se sintetiza una molécula de RNA a partir de un molde de DNA, este molde es la parte codificante de un gen; la transcripción es llevada a cabo por la enzima RNA polimerasa, en el caso de organismos eucariontes existen tres tipos de RNA polimerasa las cuales difieren por su localización en el núcleo, su patrón cromatográfico, por su sensibilidad a α -amanitina (compuesto tóxico producido por el hongo *Amanita phalloides*) y por la función de cada una de ellas.

La RNA polimerasa I se encuentra en el nucléolo y transcribe a genes precursores de RNA ribosomal (rRNA), la RNA polimerasa III se localiza en el nucleoplasma y transcribe a los tRNAs, al rRNA 5S y algunos RNAs pequeños, y la RNA polimerasa II que se encuentra en el nucleoplasma se encarga de sintetizar algunos RNAs pequeños y a los RNA mensajeros (mRNA) los cuales posteriormente son traducidos a proteínas.

La región promotora de los genes pol II dependientes se encuentra adelante del punto de inicio de la transcripción, y cada promotor contiene secuencias específicas que le permiten ser reconocido por la RNAPol II y por factores de transcripción, estas secuencias son conocidas como el promotor mínimo y por lo regular se encuentran ubicadas en las primeras 100 pares de bases (pb), un componente importante que se encuentra en la mayoría de los genes es la caja TATA, localizada aproximadamente a 30 pb del sitio de inicio de la transcripción, esta es una secuencia altamente conservada y su función es permitir el inicio de la transcripción en un punto específico, existen otras cajas como es la GC y la CCAAT que son comunes en muchos genes transcritos por la RNAPol II y que también forman parte del promotor mínimo.

Sobre este promotor mínimo es donde actúa la maquinaria de transcripción basal, esta consta de la RNAPol II y de los factores de transcripción generales (GTFs) llamados así porque intervienen a nivel de todos los genes transcritos, el ensamble de esta maquinaria da inicio con la unión de TBP o TFIID a la caja TATA, enseguida se une TFIIA, y posteriormente TFIIB, a esta unión le sigue la de la enzima RNAPol II asociada con TFIIF, y por último TFIIE y TFIIH.

TBP (proteína de unión a la caja TATA) es un solo polipéptido de 38 kDa en el cual está presente una región llamada "core" que consta de una estructura simétrica compuesta por 180 aminoácidos muy conservados en organismos eucariontes, localizada en la porción carboxilo terminal, en cuanto a la región amino terminal esta tiene secuencias características como son una región de glutaminas de más de 30 residuos y un dominio SPT; esta es la única proteína de estos factores que interacciona directamente con el DNA, esta interacción se lleva a cabo entre el surco menor y el "core" de TBP, lo que provoca una deformación en el DNA que permite que se unan los siguientes factores que forman el complejo de preiniciación (Oakoma, 1997; Tamura y cols., 1996).

TFIID es un complejo formado por TBP y factores asociados a TBP para la RNAPol II (TAFIIs), aunque TBP es suficiente para la transcripción basal de promotores que contienen caja TATA, para que se de un aumento en la transcripción en respuesta a

activadores son necesarios los TAFII, por lo que se infiere que a estos, además de asociarse factores de transcripción generales se asocian también factores específicos, así como co-factores. Hay estudios en los que se ha encontrado que algunos TAFII pueden interaccionar entre sí de manera similar a las histonas, por lo que es posible que TFIID tenga una estructura similar al octámero de histonas que le permita remodelar la estructura de la cromatina con la ayuda de alguna maquinaria dependiente de ATP o en respuesta a la acción de factores de transcripción (Oakoma, 1997).

TFIIA está formado por tres subunidades de 35, 19 y 12 kDa, este factor estabiliza la interacción de TBP o TFIID con el DNA y puede eliminar a represores transcripcionales que actúan sobre estos factores, y mediar el efecto de activadores transcripcionales; por estudios de cristalografía de rayos X se encontró que TFIIA reconoce la región amino terminal del core de TBP, sin embargo no es esencial para la transcripción basal únicamente con esta proteína, a diferencia de cuando se encuentra todo el complejo TFIID, en especial cuando el promotor sobre el que actúa es débil; algunos autores consideran a TFIIA no como un GTF sino como un co-activador capaz de unirse al complejo de preiniciación (Oakoma, 1997).

TFIIB es un polipéptido de 35 kDa, su región amino terminal contiene una estructura de "cinta de zinc" similar a la encontrada en los TFIISs (factores generales de elongación de la transcripción) que se une al DNA de cadena sencilla o doble, el carboxilo terminal consiste de dos repetidos que interaccionan con TBP, esta interacción puede ser importante para determinar la direccionalidad de la transcripción, además se ha demostrado que este factor es el que define el sitio de inicio de la transcripción y promueve la unión de la RNAPol II y TFIIF al complejo de preiniciación (Oakoma, 1997).

TFIIF consta de dos subunidades de 74 y 30 kDa las cuales forman un heterotetrámero, este factor se encuentra pre-ensamblado con la RNAPol II, impidiendo la unión inespecífica de esta al DNA, y al interaccionar con TFIIB también está involucrado en la definición del sitio +1; este factor participa además en la elongación, permaneciendo unido a la RNAPol II suprimiendo las pausas de esta, lo que ocasiona un incremento en la velocidad de

elongación, aunque no se sabe el mecanismo por el cual lleva a cabo este proceso, análisis de estructura y función demuestran que los dominios necesarios para la elongación son distintos a los requeridos para el inicio de la transcripción (Oakoma, 1997).

TFIIE esta formado por dos subunidades de 57 y de 34 Kda, que al igual que TFIIF forman un heterotetrámero, la subunidad *a* de TFIIE se une a TBP, TFIIH, TFIIF y a la RNAPol II, los motifs de esta subunidad están bien conservados, lo que es indicativo de su importancia funcional, estos se encuentran en la mitad de su región amino terminal, la cual es indispensable para la transcripción basal, y deleciones en un motif de un dedo de zinc hacen de la molécula una forma dominante negativa, sin embargo esta mitad no es suficiente para que se lleve a cabo la transcripción ya que una región acidica cercana al carboxilo terminal que se une a TFIIH es también necesaria, este último factor tiene actividad de cinasa la cual es estimulada por TFIIE; la otra subunidad, la *b* también tiene una secuencia de aminoácidos bien conservada, se une a la RNAPol II, TFIIB, TFIIF y a TFIIH; al parecer, las dos subunidades de TFIIE se complementan para hacer posible la unión de TFIIH así como para estabilizar y activar al complejo de preiniciación (Oakoma, 1997).

TFIIH esta formado por nueve subunidades que van de 32 a 89 Kda, este es el último factor de transcripción general que se une al complejo de preiniciación, entre las actividades catalíticas dependientes de ATP están su actividad de cinasa-CTD, ATPasa dependiente de DNA, y DNA helicasa, estas actividades son reguladas por TFIIE; algunas subunidades de TFIIH están relacionadas con el sistema de reparación por excisión de nucleótidos y regulación del ciclo celular; ya que este factor por si mismo casi no tiene actividad de unión a la RNAPol II, TFIIE es el que lo posiciona en el complejo de preiniciación, y ya unido fosforila a la RNAPol II (Oakoma, 1997).

La transcripción basal puede ser modulada por otra serie de elementos regulatorios que se encuentran en el DNA y que se pueden localizar antes o después de la unidad de transcripción, a unas cuantas o a cientos de pares de bases distantes del sitio de inicio e incluso dentro de la secuencia codificable del gen, estos elementos pueden ser activadores o silenciadores de la transcripción, y pueden funcionar independientemente de su posición y

orientación (Tamura y cols., 1996), a estas secuencias son a las que se asocian los factores de transcripción específicos, estos son proteínas que se unen al DNA de forma específica, en secuencias específicas y por lo tanto a un grupo específico de genes, y se caracterizan por tener un dominio de unión al DNA, un dominio de activación y un dominio que conecta a los dos anteriores; la clasificación de los factores de transcripción se puede basar en su dominio de unión o en el de activación, aunque es más común encontrarlos agrupados por su dominio de unión, ya que es la región mejor caracterizada de estas proteínas, de este dominio se han descrito los de tipo helix-loop-helix, los homeodominios, los zipper de leucina y los dedos de zinc (Mitchell y Tjian, 1989).

El motif helix-loop-helix consta de dos hélices anfipáticas que presentan una cara de residuos hidrofóbicos y otra cara de residuos cargados, la longitud del "loop" va de 12 a 28 aminoácidos; el homeodominio comprende aproximadamente 60 aminoácidos con residuos básicos e hidrofóbicos que son los más conservados entre esta familia de proteínas de la cual se deriva una subclase que contiene un dominio conservado que consiste de un homeodominio y una caja POU; el zipper de leucina consiste de una región de aminoácidos (aa) que contiene cuatro residuos de leucina posicionados a intervalos de siete aa; en cuanto a los dedos de zinc, este tipo de motif está formado por unos treinta aa con dos residuos de cisteína y dos de histidina que estabilizan el dominio al interactuar con un ion Zn^{2+} , una segunda clase de motif con dedos de zinc es el que tiene un par de cisteínas en vez del par de histidinas; muchos de estos factores pueden formar proteínas diméricas con otros miembros de su misma clase, esto incrementa la variedad de los factores y la especificidad de unión, así como los tipos de dominio de activación o represión que pueden estar presentes en un factor de transcripción (Mitchell y Tjian, 1989).

Estos factores de transcripción son sintetizados o activados en un tiempo y espacio específico del tejido en respuesta a estímulos extracelulares tales como hormonas, factores de crecimiento, metales y otros agentes físico-químicos, activando o reprimiendo la transcripción de genes que tienen un elemento responsivo en su región regulatoria para un factor de transcripción en particular; la expresión diferencial de un gen específico en una célula determinada es controlada por la capacidad de interacción del factor con la secuencia

regulatoria del gen, la cual a su vez depende de la presencia y los niveles del factor regulatorio, bloqueando o favoreciendo la expresión del gen en función de las necesidades de la célula.

En resumen los factores de transcripción son proteínas capaces de fijarse en secuencias específicas del DNA, activando o reprimiendo la expresión de los genes que contienen esta secuencia específica, modulando el funcionamiento de la RNAPol II que por si sola no discriminaría a los genes a transcribir y por último, pueden responder a señales procedentes del exterior o del interior de la célula; debido a estas propiedades la expresión de los diferentes genes puede controlarse en función de la situación fisiológica de las células.

En la regulación de la expresión genética también son importantes las modificaciones postraduccionales que los factores de transcripción puedan adquirir como son la acetilación la metilación y la fosforilación ya que estas pueden de alguna manera regular su actividad, otras proteínas importantes implicadas en este proceso son los co-activadores y co-represores los cuales se asocian a los factores de transcripción actuando conjuntamente con éstos; la presencia de estas proteínas probablemente aumente el número de genes sobre los que actúe un factor de transcripción determinado y tal vez sea el que determine su acción como activador o bien como represor, ya que es posible que un factor de transcripción se asocie con más de un co-factor.

El gen del canal de sodio tipo II como modelo de regulación

Existen secuencias y factores de transcripción que son comunes para una gran cantidad de genes y son usados constitutivamente, sin embargo los hay que son específicos para cierta clase de genes y por lo tanto son importantes para su regulación; estos genes están relacionados frecuentemente con la diferenciación celular, y la expresión o falta de expresión de estos le confiere características particulares a la célula, un ejemplo de este tipo de genes es el del canal de sodio.

La familia del gen del canal de sodio esta integrada por cuatro subunidades que se encuentran codificadas en 4 RNAs mensajeros distintos, estas subunidades son llamadas I, II, IIa y III y son altamente conservadas (Maue y cols., 1990).

Aunque la distribución anatómica precisa de los RNAm es desconocida, los estudios de inmunoquímica sugieren que su distribución es diferente en el sistema nervioso, también se sabe que los miembros de la familia del gen del canal de sodio son regulados diferencialmente; en cerebro de adulto el gene tipo II es el que se expresa en mayor cantidad, siguiéndole el tipo I el cual está presente en aproximadamente 5 a 10% con respecto al primero, sin embargo en espina dorsal es el más abundante, y el tipo III se expresa en niveles moderados en cerebro de embrión y es apenas detectable en adulto; en resumen la expresión exclusiva en neuronas del sistema nervioso central (SNC) del gen del canal de sodio tipo II ha permitido usar a este como un modelo apropiado para estudiar la expresión diferencial de genes tipo-celular específicos así como los genes involucrados en diferenciación celular (Maue y cols., 1990).

Inicialmente el objetivo fue determinar si la secuencia 5' flanqueante del gene tipo II era suficiente para la expresión en células específicas, para responder a esto fusionaron esta región al gen de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y esta fusión la introdujeron a las líneas celulares PC12 (células de feocromocitoma de rata), AtT-20 (células pituitarias de ratón) y NB-5 que son células de neuroblastoma humano, (estos tres tipos celulares se ha demostrado que contienen canales de sodio dependientes de voltaje funcionales) y a los tipos celulares no neuronales 3T3 (fibroblastos de ratón), H4IIE (células de hepatoma de rata), y C6 (células de glioma de rata), observándose que la actividad del gen reportero CAT era mucho más elevada en las líneas neuronales con respecto a las no neuronales; además se probaron dos líneas celulares de músculo esquelético que son de mioblastos de ratón (C2) y de mioblastos de rata (L6E9) las cuales no expresaron al gen reportero (Maue y cols., 1990).

Para determinar si la baja actividad de transcripción de este gen en células no neuronales se debía a la presencia de represores o ausencia de activadores, se hicieron una serie de

deleciones en la región 5' del gene tipo II, introduciéndolas en células PC12 o en L6 encontrando que la actividad del gene reportero iba en aumento en las células L6 a medida que las deleciones eran más extensas, observándose que el cambio mas notorio (un incremento de 9 veces) se daba cuando la región de -1051 a -607 era eliminada, en cambio en las células PC12 la actividad de CAT no se alteraba de manera significativa a través de las distintas deleciones; estos resultados hicieron pensar que la expresión del gen tipo II estaba siendo regulada por la presencia de elementos que actuaban negativamente en células que no son de tipo neuronal (Kraner y cols., 1992).

Para comprobar si estos elementos podían actuar sobre un promotor heterólogo, fusionaron la región de -1051 a -257 al promotor de la timidina cinasa (TK) y al gene reportero CAT, introduciendo esta fusión a células PC12 y L6, observando que en las células L6 la actividad de CAT disminuía a la mitad con respecto al promotor TK solo, confirmando así que la región de -1051 a -257 podía actuar sobre el promotor heterólogo (Kraner y cols., 1992).

Lo siguiente fue definir con precisión al elemento responsable de la represión de la expresión del gene tipo II en células no neuronales; como ya sabían que la región importante se encontraba entre las pb -1051 y -650, hicieron deleciones empezando por esta región, introduciéndolas en un vector reportero y transfectando en células PC12 y L6, encontrando que hay dos sitios de unión para represores que están entre los nucleótidos -1051 y -983 y entre -650 y -134, los estudios posteriores están enfocados al primer elemento, al que llamaron RE1 (elemento represor 1), ya que es el que presentó una actividad mas fuerte; RE1 es suficiente para reprimir la expresión del gene tipo II, ya que al fusionarlo con un promotor mínimo se observó que en células L6 la expresión del gen reportero al que dirige es prácticamente inexistente (Kraner y cols., 1992).

En ensayos de retardamiento para probar si RE1 tiene actividad de unión, usando como sonda al fragmento de -1051 a -937, incubándola con extractos nucleares de células PC12 o L6 se observa que con los extractos de las células L6 hay formación de complejos, no así

con los de PC12, lo que indica que en células que no son de tipo neuronal hay una proteína represora (Kraner y cols., 1992).

El sitio de unión de esta proteína se localizó por medio de un "footprinting" con DNasa I con la sonda de -1051 a -937, usando extractos nucleares de células L6 o 3T3, determinando que el sitio de unión es de 28 pb y abarca de -1023 a -996 pb. Para probar la actividad funcional de este elemento, un oligonucleótido sintético similar fue clonado variando orientación y posición, con el promotor mínimo del gene tipo II fusionado al gene CAT, estas construcciones se introdujeron en células PC12, L6 o B50 (estas últimas son células neuronales que no expresan al gene tipo II), el resultado obtenido fue que el elemento RE1 actuó reprimiendo al gen reportero en células que no expresan al gen tipo II, independientemente de la orientación y sentido en el que se encuentre, lo que lo define como un silenciador (Kraner y cols., 1992).

En un experimento para demostrar la relación entre la actividad de unión de RE1 y la actividad funcional, sintetizaron un oligo mutante de RE1 y lo usaron como competidor de RE1 silvestre en un ensayo de retardamiento con extractos nucleares de células L6, observándose que el oligo mutante no compete con RE1, este mismo oligo mutante fue clonado en un vector reportero CAT y transfectado a células L6, en donde no mostró actividad de represión (Kraner y cols., 1992).

En un ensayo de retardamiento en el que usaron como sonda a RE1 y también al promotor mínimo del gen tipo II, con la sonda RE1 hubo un retardamiento similar cuando usaron extractos nucleares de células L6, B50 y 3T3 que no expresan al gene tipo II; con extractos de PC12 no hubo retardamiento; cuando usaron como sonda al promotor mínimo se formaron complejos con los extractos de las cuatro líneas celulares lo cual resulta de la unión de la maquinaria de transcripción basal; al usar varias líneas celulares este experimento permite afirmar que la regulación en las células que no expresan al gen tipo II, esta mediada por una o varias proteínas represoras que son activas incluso en células neuronales que no expresan al gen tipo II como son las B50 (Kraner y cols., 1992).

Del factor que se une a RE1 se logró aislar el cDNA que codifica para la secuencia de la proteína, esta contiene un dominio de 8 dedos de zinc en la región amino terminal, que por la metodología usada ("screening" en levadura usando el sistema de un híbrido) se puede definir como el sitio de unión a DNA, una región rica en aminoácidos básicos, una región enriquecida en residuos de prolina y un dedo de zinc extra, que se encuentra justo antes del codón de paro de traducción (figura 1) (Chong y cols., 1995), éste junto con una región en la parte amino terminal abarcando del aa 1 al 83 son los sitios importantes para la represión, ya que cuando se hicieron construcciones con estas regiones fusionadas al dominio de unión de Gal4, y las clonaron en un vector de expresión, transfectándolo junto con un plásmido reportero conteniendo el sitio de unión para Gal4, se observó una fuerte represión transcripcional, la cual se pierde si el dedo de zinc está mutado (figura 2) (Tapia-Ramírez y cols., 1997); este factor de transcripción es llamado REST o NRSF (Chong y cols., 1995; Schoenherr y Anderson, 1995).

Por análisis de Western blot se probó que el cDNA clonado de REST codifica para una proteína del mismo tamaño que la proteína REST endógena de células no neuronales, y con análisis de Northern blot de mRNAs de células L6, DRG, y PC12 se comprobó que los tipos no neuronales expresan altos niveles de REST y no expresan al gene tipo II, al contrario de lo que sucede con las PC12; en ensayos de super-retardamiento con extractos nucleares de células HeLa, L6 y cultivos primarios de músculo esquelético, se observa que hay un super-retardamiento en los tres casos cuando se agrega anticuerpo dirigido contra REST; en un experimento para ver si la proteína recombinante tenía actividad represora, co-transfectaron plásmidos de expresión de esta o de la región de los 8 dedos de zinc, que es el dominio de unión a DNA, junto con el plásmido reportero conteniendo a RE1, en células PC12 y L6, observando que REST recombinante sí muestra actividad represora en células PC12 y que el dominio de dedos de zinc se comporta como una forma dominante negativa de REST en células L6, lo que confirma que este es el dominio de unión, ya que al interactuar con RE1 impide que se una el REST endógeno (figura 3); para probar como es la expresión *in vivo* de REST se realizó un experimento de hibridación *in situ* en embriones de ratón detectándose el mRNA de este factor en progenitores de neuronas indiferenciadas pero no en neuronas diferenciadas (Chong y cols., 1995).

MATQVMGQSSGGGLFTSSGNIGMALPNDMYDLHDLSKAELAAPQLIMLA
NVALTGEVNGSCCDYLVGEERQMAELMPVGDNNFSDSEEGLLEESADIKGE
PHGLENMELRSLELSVVEPQPVFEASGAPDIYSSNKDLPPETPGAEDKGKSSKTKP
RCKPCQYEABSEEQFVHHIRVHSAKKFFVEESA EKQAKARESGSSTAEFGDES
KGPIRCDRCGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCIICTYTTVSEYH
WRKHLRNHFPRKVYTCGKCNYSDEKNNYVOHVETHGERPYKCELCPY
SSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYVASNQEBVTRHARQVHNGPKPL
NCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPROFNCPCVCDVAASKKCNLQYHFKS
KHPTCPNKTMDVSKVKLKKTKKREADLPDNITNEKTEIEQTKIKGDVAGKKNEK
SVKAEKRDVSKEKKPSNNVSVIQVTTRTRKSVTEVKEMDVHTGSNSEKFSKTKK
SKRKLEVDSHSLHGPVNDEESSTKKKKKVESKSKNNSQEVPKGDSKVEENKKQ
NTCMKKSTKKKTLKNKSSKSSKPPQKEPVEKGSAQMDPPQMGPAPTEAVQKG
PVQVELPPMEHAQMEGAQIRPAPDEPVQMEVVOEGPAOKELLPVEPAQMVG
AQIVLAHMELPPMETAQTEVAQMGPAPMEPAQMEVAQVESAPMOVVOKEPV
OMELSPMEVVOKEPVQIELSPPMEVVOKEPVKIELSPPIEVVOKEPVOMELSP
MGVVOKEPAOREPPPPPREPPLHMEPISKKPPLRKDKKEKSNMQSERARKEQVLIE
VGLVPVKDSWLLKESVSTEDLSPPSPPLPKENLREEASGDQKLLNTGEGNKEAPL
QKVGAEAADESPLGLAANINESTHISSGQNLNTPEGETLNGKHQTD SIVCEMKM
DTDQNTRENLTGINSTVEEPVSPMLPPSAVEEREA VSKTALASPPATMAANESQE
IDEDEGIHSHEGSDLSDNMSEGSDDSLHGARPVPQESSRKNAKEALAVKAA
KGDFVCFCDRSFRKGGKDYSKHILNRHLVNVYYLEEAAQGQE

FIGURA 1. **Estructura primaria de REST.** Los nueve dedos de zinc se muestran con letras delineadas, en negritas los dominios represores TRD1 y TRD2 que van del aa 1 a 83 y del 1009 al 1097 respectivamente, subrayado con una línea doble el dominio de unión a DNA (aa 159-412), los 6 repetidos ricos en prolina están subrayados con una línea sencilla (aa 654-800).

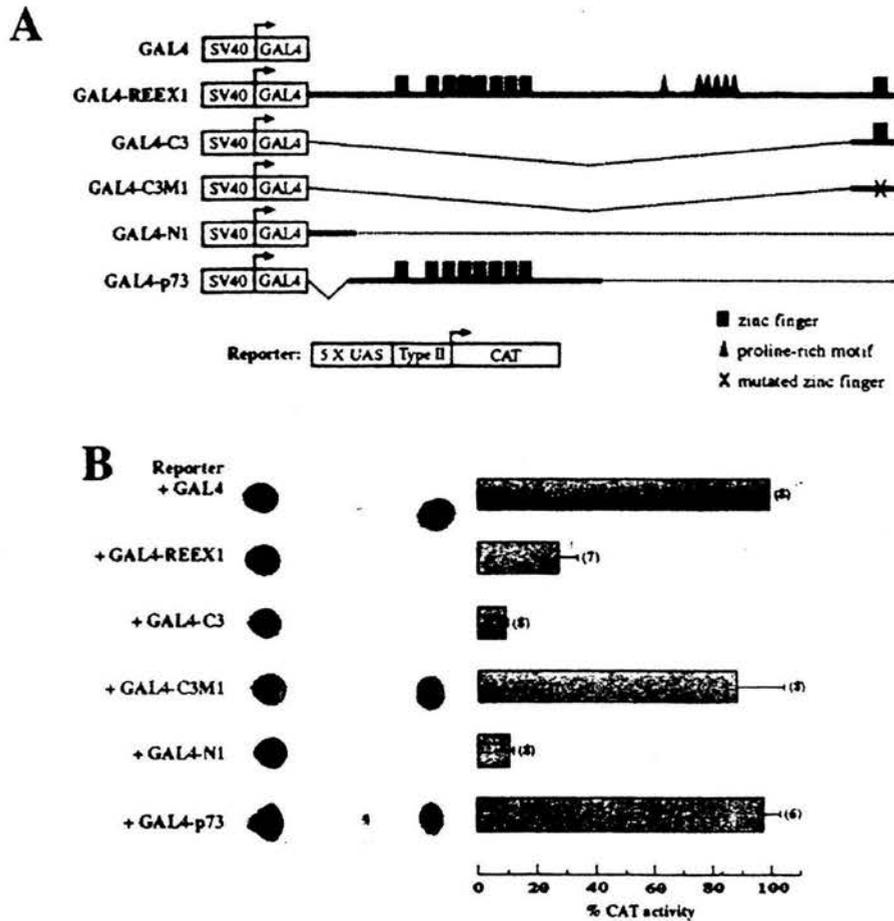


FIGURA 2. **Dominios de represión de REST.** Para la identificación de los sitios importantes para la represión en REST se utilizó una serie de cDNAs quiméricos compuestos del dominio de unión a DNA de GAL4 y diferentes porciones de REST, así como el gen reportero CAT con el sitio de unión para GAL4 (UAS) y el promotor del gen tipo II los cuales están esquematizados en el panel A; en el panel B se muestra el resultado de la expresión del gen reportero al ser transfectado con los diferentes cDNAs quiméricos de GAL4-REST, en donde es evidente que las regiones amino y carboxilo terminal son importantes para la acción represora de REST. (Tomado de Tapia-Ramírez y cols. 1997).

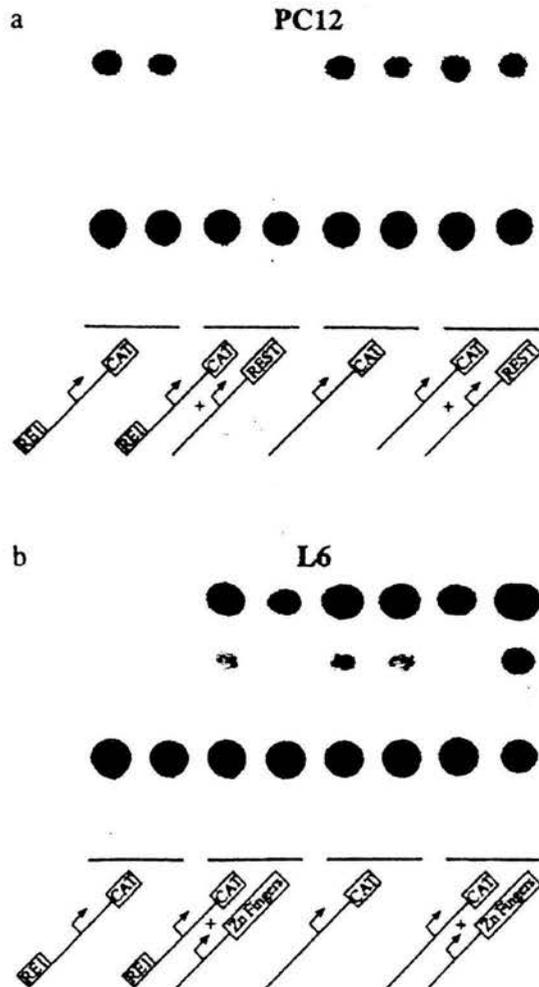


FIGURA 3. **REST** reprime la expresión de genes reporteros CAT. Las líneas celulares PC12 y L6 fueron cotransfectadas con genes reporteros CAT -que están bajo el control del promotor tipo II y en los casos donde es señalado el elemento RE1- y con vectores de expresión de REST o de su dominio de unión a DNA indicado como “Zn Fingers”; como se aprecia en el panel superior, en células PC12 la expresión de REST reprime la del gen reportero a través del elemento RE1 mientras que en células L6 en donde no es expresado el gen tipo II el dominio de dedos de zinc actúa como una forma dominante negativa al impedir la represión del gen reportero, presumiblemente al bloquear la unión de REST endógeno al elemento RE1. (Tomado de Chong y cols. 1995).

Por medio de una búsqueda en el banco de datos, usando una secuencia consenso de NRSE/RE1, con el objetivo de encontrar genes que posiblemente fueran regulados por NRSF/REST los investigadores encuentran 31 genes más que contienen una secuencia similar a este elemento silenciador, 10 de los cuales no son de tipo neuronal, al probar por ensayos de retardamiento si a estas secuencias (que difieren de la consenso en algunas bases) se puede unir la proteína NRSF recombinante, obtienen que 15 de las provenientes de genes neuronales y 5 de genes no neuronales presentan actividad de unión, y al clonar estas secuencias en plásmidos reporteros y transfectar estos en células CH310T1/2 que expresan a NRSF/REST, obtienen que de 13 probadas, 10 muestran actividad represora, 8 de genes neuronales y 2 de genes no neuronales. Otro dato interesante es que en 8 de los genes que contienen a RE1 para los que existe en el banco de datos la secuencia de diferentes especies, esta es bastante conservada (Schoenherr y cols., 1996).

Ya con anterioridad se tenían evidencias de que REST regula la expresión de otros genes además del canal de sodio tipo II ya que trabajando con el gene SCG10 que al igual que el gene tipo II se expresa únicamente en tejido nervioso y que además es considerado un marcador temprano de diferenciación neuronal, al realizar experimentos similares a los hechos con el gene tipo II se obtuvieron prácticamente los mismos resultados, llamándole al elemento similar a RE1, NRSE (elemento silenciador restrictivo de neuronas), que fue detectado al secuenciar la región de aproximadamente -2Kb del gene SCG10 (Mori y cols., 1992; Schoenherr y Anderson, 1995).

Al hacer una comparación con la secuencia del gen de la sinapsina, que es otro gen que se expresa exclusivamente en tejido nervioso se encontró que tiene un elemento con mucha homología al de los genes tipo II y SCG10 (Schoch y cols., 1996).

Evidencias posteriores a lo encontrado en el banco de datos pero mas detalladas refuerzan la idea ya concebida de que REST es un factor de transcripción encargado de la regulación de una gran cantidad de genes, estas se refieren a dos genes que contienen un elemento similar a RE1, uno de estos es el del receptor muscárinico m4 de rata (Wood y cols., 1996) y el otro es el de la colin-acetiltransferasa, en el caso del segundo se ha demostrado que su

expresión únicamente en células de tipo neuronal se debe a REST/NRSF, pero esta expresión se restringe a células neuronales de tipo colinérgico, aunque esta especificidad se da gracias a la presencia de activadores en la región promotora de este gen (Lönnerberg y cols., 1996).

En cuanto a la molécula de adhesión celular L1, la expresión de este gen está restringida a células neuronales y también es regulada por REST, en el estudio de este gen se generaron ratones transgénicos para observar la expresión a través del desarrollo embrionario, demostrando así que REST es importante para controlar la expresión de este gen en el estado embrionario.

También es interesante mencionar al gen DPA el cual forma parte del grupo de genes del MHC clase II, la función de estas proteínas es muy importante en la respuesta inmune debido a la presentación de péptidos a células T, la desregulación de estos genes está asociada a ciertas enfermedades; recientemente se encontró un represor del gen DPA, al que le llamaron XBR, esta proteína se une a la caja X2 de la región reguladora de este gen, al secuenciar y caracterizar el cDNA de XBR encontraron que se trataba de REST (Scholl y cols., 1996), esto sugiere que algunos de los genes del MHC II pudieran ser controlados por REST dada la similitud de las cajas X2 de los genes DPA, DQ y DR.

Por otra parte se ha demostrado que la expresión de REST está ausente no solo en células de tipo neuronal, ya que por análisis de Northern blot se ha observado que REST tampoco se expresa en la línea celular INS-1 que son células beta, ni en otras líneas celulares productoras de insulina, aunque estos resultados son bastante lógicos, ya que se ha detectado por RT-PCR del mRNA producido por INS-1, que hay expresión de por lo menos 6 de los genes neuronales que contienen una secuencia de unión para REST, en base a estos resultados se sugiere que la regulación mediada por este factor de transcripción se da de manera similar en células neuronales y en células beta, ya que además existen reportes previos de la expresión de marcadores neuronales en este tipo celular (Atouf y cols., 1997), de hecho entre el sistema inmune y el sistema neuronal existen muchas interrelaciones, por mencionar algunos ejemplos; en algunas especies, las células de la cresta neuronal

participan en el desarrollo del epitelio del timo (Kuratani y Bockman. 1990), también se ha encontrado la presencia de marcadores de diferenciación compartidos, principalmente en las proteínas de superficie del sistema nervioso central y el timo (Fields K. 1979 y Yoshihara y cols. 1991). Además, la mayor parte de las moléculas de adhesión neuronal pertenecen a la superfamilia de los genes Igs, los cuales también codifican para las moléculas efectoras del sistema inmune. CD56, un antígeno de diferenciación de leucocitos se encuentra en todas las células NK y algunas células T y sirve como molécula de adhesión neuronal (Lanier y cols. 1989). El factor de transcripción Oct-2 se presenta en diferentes isoformas en células B y células neuronales (Dent y cols. 1991), estas isoformas codifican para proteínas que difieren en su especificidad de unión a DNA y efecto sobre la transcripción (Lillycrop y Latchman. 1992).

A REST se le ha catalogado principalmente como un factor de transcripción con actividad represora, pero algunos autores dicen que este factor tiene capacidad de activar la expresión del gen del receptor nicotínico en células de neuroblastoma, dependiendo del lugar en que esté posicionado el elemento al cual se une, ya que cuando transfectaron plásmidos reporteros con la secuencia de NRSE en diferentes posiciones, observaron que en células SK-N-Be (de neuroblastoma) hay represión si la secuencia de unión se encuentra a más de 100 pb del promotor mínimo, pero si está a 50 o menos e incluso después de este, la expresión del gen reportero es activada, y cuando co-transfectaron a uno de los plásmidos reporteros que es activado, con un plásmido que expresa un antisentido de REST la actividad es inhibida (Bessis y cols., 1997). Este trabajo da una idea de como genes que son expresados solo en ciertos tipos neuronales son regulados tal vez sin la necesidad de otros elementos que actúen como activadores para su expresión.

Por todos los antecedentes encontrados de que RE1 se encuentra en muchos genes neuronales así como en otros no neuronales, y de que REST es capaz de reprimir a genes que no contienen a la secuencia RE1, es de suponer que la regulación mediada por este factor de transcripción se da por un mecanismo muy complejo, en el cual además de REST intervienen otras proteínas para formar el complejo de represión, dependiendo del gen del que se trate y de en que momento dicho gen debe dejar de expresarse.

Las interacciones de REST con los componentes de la maquinaria de transcripción

El mecanismo molecular de REST en la inhibición de la transcripción se desconoce, y una parte importante en la determinación del mecanismo lo constituye el estudiar las interacciones que tiene este represor transcripcional con los componentes de la maquinaria de síntesis de RNA, y otros factores de regulación específicos de célula. Al mapear los dominios de represión de REST, hemos identificado también las posibles secuencias blanco de interacción. Nuestro esquema de trabajo consistirá básicamente en identificar el o los genes que interactúan de manera específica con REST. En la medida en que conozcamos los componentes del sistema de represión mediado por REST conoceremos mejor algunos de los mecanismos de regulación negativa tales como: la naturaleza dual de algunos represores, la identificación de factores implicados en la diferenciación y mantenimiento de esta, y la interrelación entre diferentes sistemas como el inmune y el neuronal. La identificación de las interacciones de REST con otras moléculas reguladoras sin duda ayudará a entender mejor los mecanismos que determinan el control genético en ambos sistemas. Obviamente si REST es un regulador maestro negativo su correcta expresión y regulación juegan un papel importante en la homeostasis de los organismos. La alteración de REST en las células sin duda traerá como consecuencia pérdida en la capacidad de regulación de la célula. Cabe mencionar que se han encontrado un gran número de alteraciones en el sistema inmunológico y neuronal cuya causa principal aún se desconoce, algunos de estos ejemplos incluyen alteraciones en la función de canales iónicos y excitabilidad aberrante en casos de parálisis periódica y miotonias, pérdida en la función del canal de sodio disparado por voltaje, enfermedades de autoinmunidad como la diabetes, inmunodeficiencia tipo II, alteraciones en la función de los leucocitos, esclerosis múltiple e inactivación de corrientes de sodio neuronal, etc., solo por mencionar algunos ejemplos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar las interacciones del factor de transcripción REST con otras proteínas.

Objetivo particular

Aislar e identificar al gen que codifica para una de las proteínas que se asocian con la región amino terminal del factor de transcripción REST.

METODOLOGIA

Detección de proteínas que interaccionan con el factor de transcripción REST por el sistema del doble híbrido de levadura

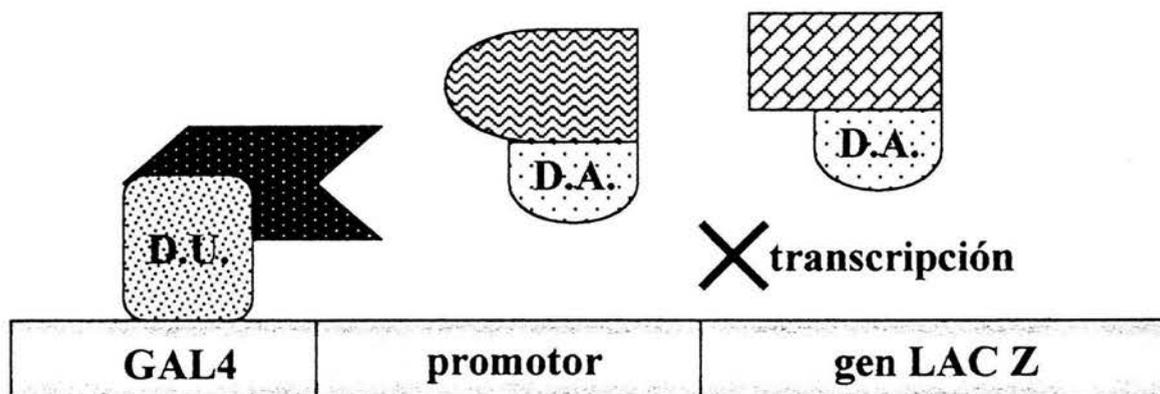
Para identificar que proteínas interaccionan con REST empleamos el sistema del doble híbrido el cual esta basado en las propiedades de la proteína GAL4 de levadura, esta proteína es un activador transcripcional requerido para la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en la utilización de galactosa; la proteína contiene dos dominios funcionales separables, un dominio N-terminal el cual se une a una secuencia específica en el DNA (UASG); y un dominio C-terminal el cual es necesario para activar la transcripción. El principio del sistema es generar dos plásmidos que codifiquen para proteínas híbridas conteniendo partes de GAL4: el dominio de unión a DNA de GAL4 fusionado a la proteína "X" y la región de activación de GAL4 fusionada a la proteína "Y", de tal forma que si X y Y interaccionan y reconstituyen los dominios de GAL4, se dará la transcripción del gen regulado por UASG (figura 4), este debe ser un gen reportero contenido en una cepa de levadura que es transformada con los plásmidos ya mencionados; obviamente la expresión por si sola de cada una de las proteínas híbridas es incapaz de activar la transcripción del gen reportero.

De esta manera se generaron dos proteínas híbridas, una contiene un dominio de unión a DNA junto con la secuencia TRD1 que constituye la parte amino terminal represora de REST, la otra contiene una proteína proveniente de una biblioteca de cDNA de células HeLa fusionada a un dominio de activación.

Se usó el plásmido pBTM116-Ade2 el cual contiene el dominio de unión a DNA del represor bacteriano *lexA*, bajo el control del promotor de levadura *ADH1* y se fusionó a TRD1 en el sitio *Sma I*. Para obtener la región TRD1 se usó el plásmido GAL4-TRD1.

Se digirió el plásmido GAL-4-TRD1 con *Sma I*, el vector pBTM116-Ade2 se cortó con *Sma I*, se purificó el fragmento GAL4-TRD1 ya digerido, en agarosa de bajo punto de

PROTEINAS QUE NO INTERACCIONAN



PROTEINAS QUE INTERACCIONAN

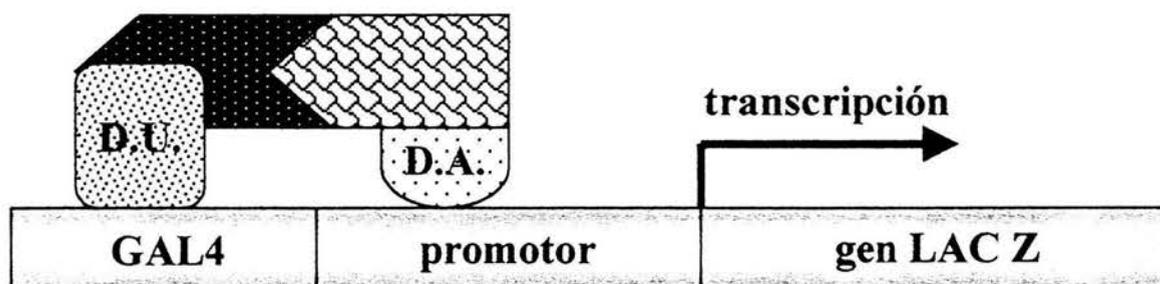


FIGURA 4. Sistema del doble híbrido. En este sistema únicamente las proteínas provenientes de la biblioteca y unidas al dominio de activación de GAL4 (DA) que son capaces de interactuar con la proteína blanco, que a su vez esta fusionada al dominio de unión de GAL4 (DU), son las que hacen posible la expresión del gen reportero (GEN LAC Z).

fusión, se desfosforiló el vector con fosfatasa alcalina bacteriana, se ligó el fragmento a este y con el plásmido resultante se transformaron bacterias DH5 α , se realizó el análisis de candidatos y la obtención de DNA el cual se secuenció por reacción con la "sequenase" (Amersham, Int. plc) para checar que la secuencia correspondiente a TRD1 estuviera en el marco de lectura correcto con respecto a *lexA*.

La biblioteca de cDNA proveniente de células HeLa se encuentra en el plásmido pGAD-GH el cual contiene el dominio de activación de GAL4, se utilizó la cepa L40 (MATa, *trp1*, *leu2*, *his3*, *LYS2::lexA-lacZ*) de levadura para transformar con los plásmidos híbridos. Para transformar las levaduras se usó el método de células tratadas con acetato de litio para lo cual se inocularon 50 ml de medio YEPD con levaduras (cepa L40) y se incubó a 30 °C toda la noche, se diluyeron las células en 300 ml de YEPD a una $DO_{(600nm)}$ de 0.2, se incubó a 30°C por 3-4 hrs, se empastillaron las células por centrifugación a 4000xg por 5 min., se resuspendió la pastilla en 10 ml de buffer 1X TE/ LiOAc volviendo a empastillar las células por centrifugación, y se resuspendieron en 2 ml de buffer 1X TE/LiOAc; a 200 μ l de células competentes se les adicionaron: 5 μ g de DNA blanco (dominio de unión a DNA con TRD1), 5 μ g de biblioteca de cDNA (cDNA fusionado al dominio de activación) y 50 μ g de DNA de espermatozoos de salmón sonificado, se adicionaron 1.2 ml de solución PEG y se incubaron 1 hr. a 30°C con agitación, se adicionaron 100 μ l de DMSO, dando un choque térmico a 42 °C por 15 min., se centrifugaron de 20 a 30" y se removió el sobrenadante, resuspendiendo en 2 ml de YEPD con ampicilina (50 μ g/ml) y se incubaron a 30°C por 1 hr. con agitación, se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de YEPD, se plaquearon 100 μ l de una dilución 1/1000 en cajas -*leu*, -*trp* para titular y medir la eficiencia de transformación y 200 μ l de cada mezcla de transformación en cajas de medio selectivo -*leu*, -*trp* y -*his* para el tamizaje o "screening", permitiendo que las colonias crecieran de 4 a 5 días y se checaron aquellas que crecieron con el segundo gen reportero, que es *LacZ*, las colonias azul-verdosas son las clonas positivas, es decir las que contienen la región de cDNA que codifica para una proteína que interacciona con TRD1, de estas colonias se obtuvieron los plásmidos y con ellos se transformó a la cepa bacteriana DH5 α , se obtuvo el DNA para realizar el análisis de los candidatos por secuenciación.

Secuenciación de candidatos

Los candidatos fueron secuenciados de acuerdo al método de Sanger, el cual consiste en alinear el cDNA (0.5-1.0pmol) con el primer (1µl) con buffer de reacción 1X y H₂O a un volumen total de 10µl incubando en un baño a 65°C de 2 a 5 min., se saca y se espera a que llegue a 37°C, en este momento se le agrega 5.5µl de la mezcla de reacción 1X (sol.DTTR 1µl, labeling mix (1:10) 2µl, (S³⁵)dATP 0.5µl y enzima sequenasa (1:7) 2µl se incuban de 2 a 5 min. a temperatura ambiente; mientras tanto se preparan 4 tubos con 2.5µl de cada dNTP y su ddNTP correspondiente en una proporción de 10 a 1 y se colocan en un baño de 37°C, a esta misma temperatura se les agrega a cada uno 3.5µl del DNA alineado con la mezcla de reacción, después de 7min. se adicionan 4µl de la solución "stop" se mezclan y se calientan a 75-80°C por 5 min., y se colocan en hielo; las muestras se corren en un gel de acrilamida/bisacrilamida 19:1 y urea 1%. a 55°C a 55W., terminada la corrida el gel se seca sobre papel Wattman y se expone a una placa de autoradiografía por 24hrs. para finalmente leer la secuencia del cDNA.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra el banco de genes Genbank y se eligió uno de los candidatos para proseguir con el trabajo; ya que en el sistema del doble híbrido es poco probable encontrar el gen completo, para obtenerlo se realizó un tamizaje en una biblioteca de cDNA.

Tamizaje de una biblioteca de cDNA

El tamizaje se llevó a cabo en una biblioteca de cDNA de células HeLa construida en el vector lambda ZAP (Stratagene, USA), utilizando como sonda la secuencia encontrada en el tamizaje del sistema del doble híbrido; la ventaja de este tipo de biblioteca es que una vez que se ha seleccionado la clona positiva es posible llevar a cabo una excisión de la región de interés, la cual queda incluida dentro del plásmido bluescript II.

Se usó la bacteria XL1-Blue MRF' como hospedera la cual se estrió en placas de agar LB con tetraciclina (12.5µg/ml) y se incubaron a 37°C por una noche, de estas se tomó una colonia y se inoculó en medio LB suplementado con MgSO₄ 10mM y maltosa al 0.2%, se

creció a 37°C por una noche, se recuperaron las células por centrifugación, resuspendiéndolas en MgSO₄ 10mM a una DO_(600nm) de 0.5.

Se tituló el fago Lambda ZAP II (en el cual se encuentra la biblioteca de cDNA proveniente de células HeLa) proveniente de un stock haciendo diluciones en buffer SM, se agregaron 10µl de cada dilución a 200µl de bacteria, se incubaron a 37°C en agitación por 15 min, posteriormente se adicionaron 3ml de top agar para espatular en placas de medio NZY incubando a 37°C por una noche, se realizó el conteo de placas.

Una vez obtenido el título de la librería, se plaqueó en 20 cajas con medio NZY para lo cual se usaron 200µl de bacteria XL1-Blue MRF⁺ mas la cantidad del fago necesaria para que resultara en una concentración de este de 20,000 ufp por caja, una vez obtenidas las placas de fago las cajas se almacenaron a 4°C por un mínimo de 2hrs.

Las placas formadas en cada caja se transfirieron por duplicado a membranas de nitrocelulosa por 2 y 4 minutos, estas se desnaturalizaron en una solución de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M por 2min, inmediatamente se pasaron a una solución de NaCl 1.5 M Y Tris-HCl 0.5 M pH 8 por 5min. para neutralizarlos, finalmente se colocaron por 30 seg en una solución de Tris-HCl 0.2 M y buffer SSC 2X para terminar de neutralizar, enseguida se fijó el DNA a las membranas usando un crosslinker stratagene de UV dando 2 ciclos de 120µJ a cada filtro. Las placas usadas para la transferencia se guardaron a 4°C para usarlas en el tamizaje secundario.

Marcaje de la "sonda"

La sonda empleada para hibridar se generó por restricción con las enzimas EcoR I y Xho I a partir de la secuencia de DNA obtenida en el ensayo del doble híbrido y es de un tamaño de 213 bases, esta sonda se marcó por la técnica de "Random primer" (Gibco. BRL) con (α -³²P)dCTP de la siguiente manera, se corrió en un gel de agarosa al 1% 10 µl de una reacción de restricción del candidato 1P con las enzimas EcoR I y Xho I para obtener la secuencia para utilizar como sonda, la banda correspondiente fue cortada y corrida

nuevamente pero esta vez en agarosa de bajo punto de fusión, recuperando y fundiendo la agarosa a 70°C por 10 min., a esta se le agregó agua para evitar su solidificación, en este paso fue desnaturalizado el DNA colocandolo inmediatamente en hielo, por otra parte se preparó la siguiente mezcla en hielo: 2 µl de solución de dATP, dGTP y dTTP, 15 µl de buffer de mezcla de "random primers" y 5 µl de (α -³²P)dCTP (aproximadamente 50 µCi), agregando el equivalente a 25 ng de DNA correspondiente a la sonda y llevando con agua a un volumen final de 49 µl, adicionando 1 µl de fragmento klenow y mezclando suavemente, esta reacción fue incubada a temperatura ambiente por 90 min., una vez transcurrido este tiempo la reacción fue hervida por 3 min.

Hibridación con la sonda

Los filtros se colocaron en una solución de prehibridización con DNA de esperma de salmón para bloquear los sitios que no tienen DNA a una temperatura de 42°C por un mínimo de 2 hrs.

Una vez marcada la sonda, se agregó a la solución para hibridar y se colocaron los filtros en esta, incubándolos a una temperatura de 42°C en agitación por una noche; se lavaron los filtros con una solución de SSC 2X y SDS al 0.1% y después con una solución de SSC 0.1X y SDS al 0.1% y se expusieron a una placa de autoradiografía de 24 a 72 hrs. a -20°C; una vez revelada la radiografía, las placas que dieron señal positiva se aislaron de las cajas y se colocaron en un ml de buffer SM con 20µl de cloroformo, agitando con un vortex.

Tamizaje secundario

Los fagos positivos se usaron para el "screening" secundario el cual se realizó de la misma manera que el primero, plaqueando una caja por cada placa positiva. Nuevamente, las placas que dieron marca positiva se usaron para un tercer screening, esto se hizo con la finalidad de obtener placas puras (clonas). Con estas clonas se infectó a la bacteria XL1-Blue MRF' para de esta manera enriquecerlas y luego de esto se realizó la excisión del plásmido Bluescript.

Excisión del plásmido

La excisión *in vivo* del fagemido pBluescript del vector Uni-ZAP XR depende de algunas secuencias introducidas en el genoma del fago lambda así como de la presencia de varias proteínas derivadas del bacteriofago fl, las cuales reconocen una región de DNA que normalmente sirve como el "origen de replicación" para la síntesis de la cadena positiva del bacteriofago fl, este origen de replicación puede dividirse en dos partes que son el sitio de inicio y el de terminación para la síntesis de DNA, estas dos regiones han sido subclonadas separadamente dentro del vector Uni-ZAP XR. El fago lambda es accesible a proteínas derivadas de fl por la infección simultánea de una cepa de *E. coli* con el vector lambda y el bacteriofago fl; el fago auxiliar ExAssist y la cepa SOLR de *E. coli* son utilizados en este sistema, en el caso del fago, este contiene una mutación ambar que impide la replicación de su genoma en una cepa no supresora tal como SOLR, esto permite que solo el fagemido liberado se replique en el huésped eliminando la posibilidad de co-infección con el fago auxiliar, las células SOLR resisten también la infección del fago lambda excluyendo la contaminación por este después de la excisión (figura 5).

Para realizar la excisión las placas obtenidas se transfirieron a 500µl de buffer SM y 20µl de cloroformo, se agitaron y se incubaron de 1 a 2hrs a temperatura ambiente. Se creció un cultivo de bacterias de la cepa XL1-Blue MRF' y otro de la cepa SOLR en medio LB, se hicieron diluciones 1/100 y se crecieron estos cultivos a 37°C hasta que alcanzaron la fase logarítmica, luego el cultivo de XL1-Blue MRF' se centrifugó y se resuspendieron las células a una DO₆₀₀ de 1.0 en MgSO₄ 10mM, de estas se tomaron 200µl y se les agregaron 250µl del stock del fago (conteniendo > 1X10¹⁰ partículas de fago) y 1µl del fago auxiliar ExAssist (> 1X10¹⁰ ufp/µl) esta mezcla se incubó a 37°C por 15min, se agregaron 3ml de medio LB y se volvió a incubar a igual temperatura de 2 a 2.5hrs. en agitación, enseguida se calentó a 70°C por 15min. y se centrifugó a 400xg por 15min., decantándose el sobrenadante, este stock contiene el fagemido pBluescript empaquetado como partículas de fago filamentoso, de este se tomaron 100 y 10µl y se les agregó a cada uno 200µl de células SOLR a DO₆₀₀ =1.0 se incubaron a 37°C por 15min. y se plaquearon de 10 a 50µl de cada tubo en cajas de agar LB con ampicilina (50µg/ml) incubándolas por una noche a 37°C. Las colonias así obtenidas contienen el fagemido de doble cadena pBluescript con el inserto de

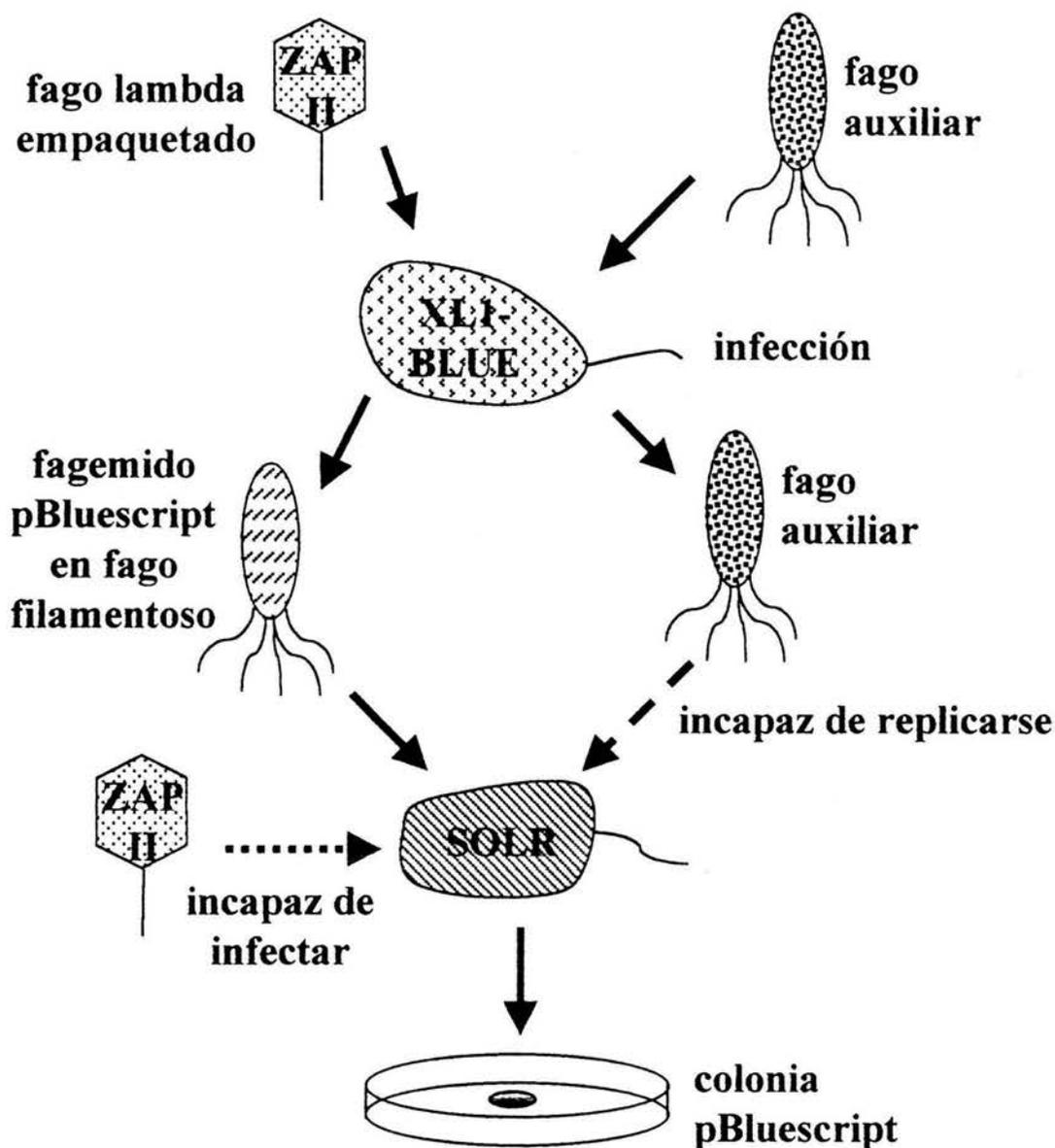


FIGURA 5. Excisión *in vivo* del fagemido Bluescript del vector Uni ZAP XR. La cepa de *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ es infectada de manera simultanea con el fago Lambda ZAP obtenido del tamizaje y con el fago auxiliar ExAssist; el fago Lambda ZAP contiene al plásmido Bluescript que a su vez contiene en su secuencia el origen de replicación *f1*, el fago auxiliar proporciona las proteínas necesarias para la replicación del plásmido, así como para el empaquetamiento de DNA dentro de cubiertas de fago y la exportación de éstas al sobrenadante, el cual es puesto en contacto con la cepa de *E. coli* SOLR en la cual unicamente Bluescript es capaz de replicarse, ya que el fago auxiliar contiene una mutación ambar que impide su replicación en cepas no supresoras como SOLR la cual además es resistente a la infección de Lambda, obteniendo exclusivamente colonias que llevan al plásmido conteniendo el inserto de interés.

DNA clonado.

Subclonación y secuenciación del gen

Una vez obtenido el plásmido Bluescript con el cDNA que nos interesa se procedió a la expansión de este para lo cual se transformaron bacterias de la cepa DH5 α con el plásmido Bluescript conteniendo el inserto, el cual fue extraído de la cepa bacteriana SOLR por minipreparación; una vez realizado esto los candidatos obtenidos fueron analizados por restricción con las enzimas Kpn I y Sac I para seleccionar aquellos que tuvieran un inserto del tamaño esperado de acuerdo a lo reportado en el banco de genes, uno de los candidatos positivos para este análisis fue secuenciado, para lo cual se usó el método de Sanger, ya descrito con anterioridad.

La secuencia obtenida fue comparada contra el banco de genes Genbank con el propósito de saber si se trataba de un gen ya reportado o tenía cierta similitud con alguno.

RESULTADOS

El estudio de la interacción de REST con otras proteínas se llevó a cabo por el sistema del doble híbrido, para lo cual se fusionó el dominio de represión TRD1 que se localiza en el extremo amino terminal de REST con el dominio de unión a DNA del represor bacteriano *lexA*, y por otra parte se utilizó una biblioteca de cDNA proveniente de células HeLa conteniendo el dominio de activación de GAL4, ambas construcciones se encuentran en plásmidos con los cuales se transformó una cepa de levadura en la que el gen reportero *lacZ* y el gen marcador de auxotrofia *his* tienen el sitio de unión para *lexA*, de tal manera que únicamente cuando se expresan proteínas híbridas que interactúan es cuando se activan ambos genes y es posible seleccionar las clonas positivas por su crecimiento en placas de medio de cultivo que carecen de histidina, así como por la expresión del gen reportero *lacZ* la que da como consecuencia que en presencia de X-Gal las colonias crezcan con un color azul verdoso.

Por medio de este sistema logramos aislar cuatro clonas denominadas 1P, 13, 17 y 20 (figura 6), la secuencia de estas se determinó por el método de Sanger y al realizar la comparación en el banco de genes Genebank se encontraron las siguientes similitudes: para la clona 1P un 98% de homología con un gen relacionado a la proteína de unión de nucleótido guanina, para la 13 homología con una proteína cinasa, para la 17 homología con la proteína "heat shock" 86 y para la clona 20 no se encontró homología con ningún gen reportado en el Genebank.

Decidimos proseguir este proyecto con la clona 1P por varias razones, en 1994 fue reportada por Imai y cols. la clonación de un gen asociado a diferenciación neuronal, esta clonación se logró gracias a un "screening" de una librería de cDNA obtenida de células P19 tratadas con ácido retinoico (RA), estas células son de carcinoma embrionario de ratón y pueden ser diferenciadas a neuronas y células gliales al ser tratadas con RA, en este trabajo se observó que el mRNA de esta clona llamada p205, es expresado en altos niveles en el cerebro de ratón embrionario y disminuye a medida que el desarrollo avanza, por lo cual se piensa que la proteína para la que codifica tiene un papel importante en el desarrollo

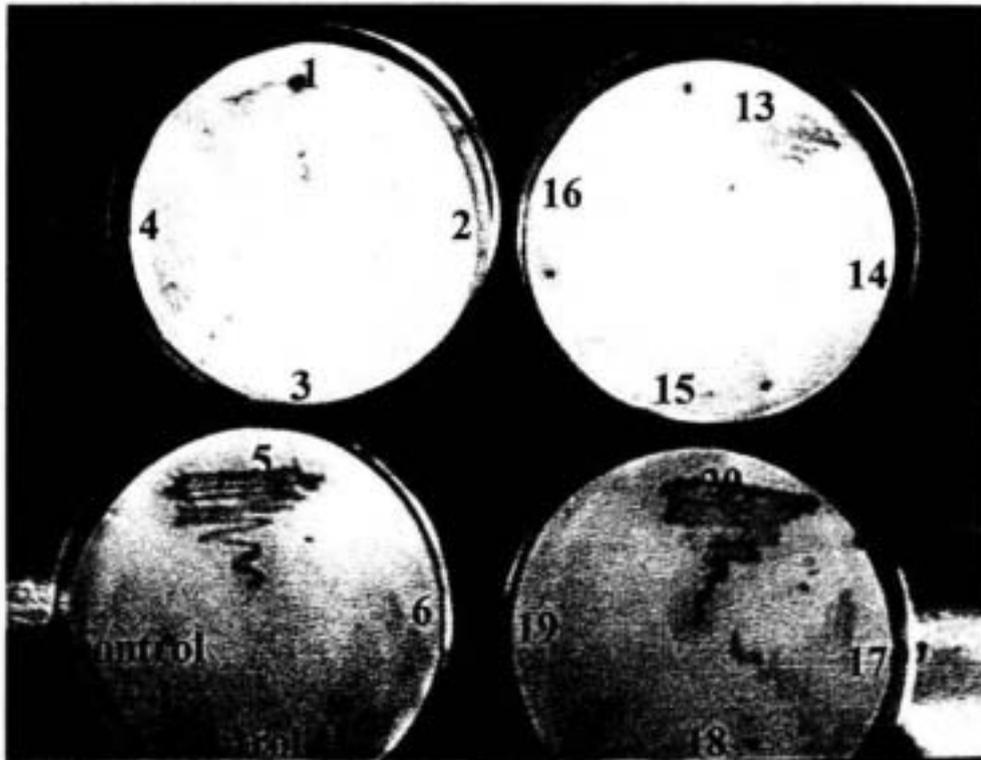


FIGURA 6. Detección de proteínas que interaccionan con el dominio represor TRD1 de REST (aa 1-83). Las clonas obtenidas mediante el sistema del doble híbrido fueron estriadas y transferidas a papel Watman 1M y reveladas con una solución de X-Gal para probar la expresión del gen reportero lacZ, las clonas positivas dan un color azul verdoso.

del cerebro así como en la diferenciación neuronal (Imai y cols. 1994); REST presenta un patrón de expresión similar al de esta clona ya que en células indiferenciadas su expresión es elevada pero cuando las células se diferencian a neuronas su expresión va decayendo mientras que en células no neuronales se mantiene; la clona p205 es idéntica al gen relacionado a la proteína de unión a nucleótido guanina previamente identificado y la conservación total de su secuencia de aminoácidos entre las diferentes especies reportadas hace suponer que su función es muy importante; la similitud de la clona 1P encontrada, con este gen es también muy elevada la cual es otra razón por la que se eligió para continuar el proyecto.

La clona 1P contiene un inserto de alrededor de 800 pares de bases por lo que se realizó un tamizaje de una biblioteca de cDNA de células HeLa utilizando como sonda un fragmento de 200 pb proveniente de la clona 1P para obtener el gen completo, ya que el tamaño reportado para este es de 1093 pb; de este tamizaje obtuvimos 8 clonas (figura 7) de las cuales fueron analizadas por restricción la 1, 2 y 3 con la finalidad de detectar aquellas que contuvieran un inserto de alrededor de 1093 pb, las clonas 1 y 2 dieron el tamaño esperado (figura 8); se procedió a la secuenciación completa de la clona 1P2.1 de manera manual empleando los oligonucleótidos T7, 242, 407, 544, 622 y KS mismos que hibridan con la cadena sentido y los oligonucleótidos T3, 260, 398, 561, 678, 1047 y SK que hibridan con la cadena antisentido (figura9), una vez obtenida la secuencia completa se hizo la comparación de esta en el Genbank y se encontró una similitud del 99% con la secuencia del gen relacionado a la proteína de unión al nucleótido guanina observándose únicamente dos diferencias, una de estas es la presencia de una adenina extra en la región 5' no traducida y la otra corresponde a un cambio de una timidina por una citosina (figura 10), sin embargo esta diferencia a nivel de nucleótidos no cambia la secuencia de la proteína codificada; este gen codifica para una proteína llamada RACK1 (receptor of activated protein kinase C) (figura 11).

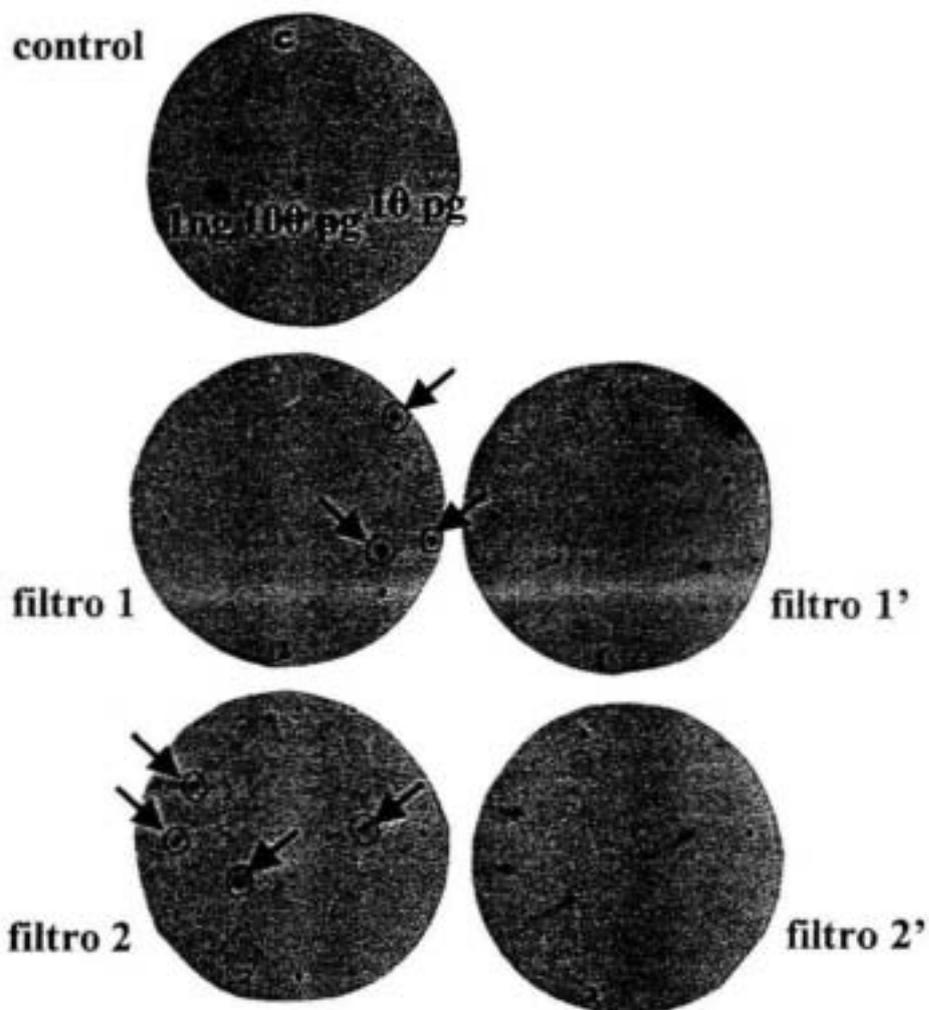


FIGURA 7. Tamizaje de los candidatos positivos obtenidos en el 2o "screening". Se muestran los filtros 1 y 2 así como sus duplicados (1' y 2'). Con flechas se indican los candidatos seleccionados y analizados para su secuenciación.

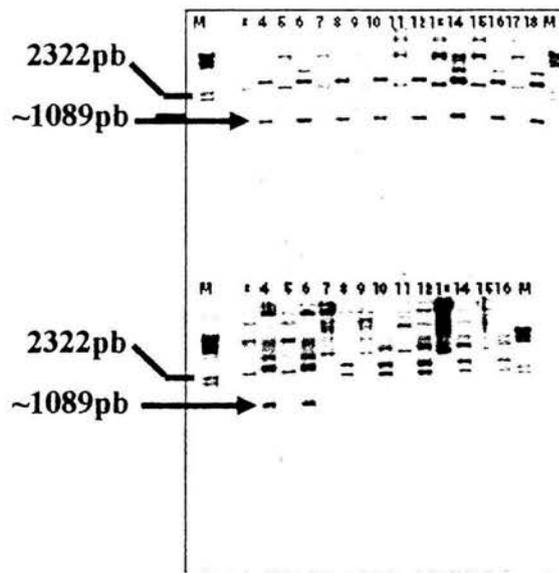


FIGURA 8. Patrón de restricción de candidatos del tamizaje de la clona 1P. Electroforesis de los candidatos positivos 1, 2 y 3 luego de tres tamizajes. Los carriles nones corresponden a los diferentes candidatos y los carriles pares corresponden al candidato cortado con las enzimas *kpnI* y *sacI* para liberar el inserto del vector pBluescript, el tamaño esperado del inserto es de 1089pb. Los carriles marcados con “M” corresponden a los marcadores de peso molecular.

primer 678ant 622sen

a c g t a c g t

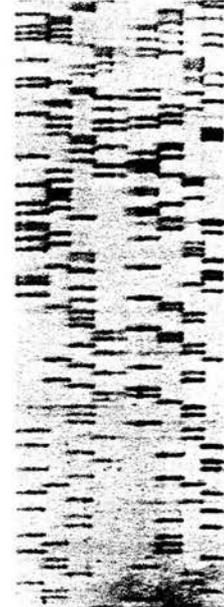


FIGURA 9. Secuenciación de la clona 1P2.1. La secuenciación fue realizada por el método de Sanger, en el gel fueron analizadas dos reacciones con diferentes primers, las letras indican los terminadores de cada muestra.

1 aggagaggttggtgctagtttctctaagccatccagtgccatcctcgtcgtcagcg 60
|||||
16 aggagaggttggtgctagtttctctaagccatccagtgccatcctcgtcgtcagcg 75

61 acacacgctctcgcgcggccactgagcagatgacccttcgtggcaccctcaagggc 120
|||||
76 acac-cgctctcgcgcggccactgagcagatgacccttcgtggcaccctcaagggc 134

121 cacaacggctgggtaaccagatcgctactaccccgagttcccggacatgatcctctcc 180
|||||
135 cacaacggctgggtaaccagatcgctactaccccgagttcccggacatgatcctctcc 194

181 gcctctcgagataagaccatcatcatgtggaactgaccagggatgagaccaactatgga 240
|||||
195 gcctctcgagataagaccatcatcatgtggaactgaccagggatgagaccaactatgga 254

241 attccacagcgtgctctgcggggtcactcccactttgttagtgatgtggttatctcctca 300
|||||
255 attccacagcgtgctctgcggggtcactcccactttgttagtgatgtggttatctcctca 314

301 gatggccagtttgccctctcaggctcctgggatggaaccctgcgcctctgggatctcaca 360
|||||
315 gatggccagtttgccctctcaggctcctgggatggaaccctgcgcctctgggatctcaca 374

361 acgggcaccaccacgagggcgatttggtggccataccaaggatgtgctgagtgtggccttc 420
|||||
375 acgggcaccaccacgagggcgatttggtggccataccaaggatgtgctgagtgtggccttc 434

421 tcctctgacaaccggcagattgtctctggatctcgagataaaaccatcaagctatggaat 480
|||||
435 tcctctgacaaccggcagattgtctctggatctcgagataaaaccatcaagctatggaat 494

481 accctgggtgtgtgcaaatacactgtccaggatgagagccactcagagtgggtgtcttgt 540
|||||
495 accctgggtgtgtgcaaatacactgtccaggatgagagccactcagagtgggtgtcttgt 554

541 gtccgcttctcgcgccaacagcagcaaccctatcatcgtctcctgtggctgggacaagctg 600
|||||
555 gtccgcttctcgcgccaacagcagcaaccctatcatcgtctcctgtggctgggacaagctg 614

601 gtcaaggatggaacctggctaactgcaagctgaagaccaaccacattggccacacaggc 660
|||||
615 gtcaaggatggaacctggctaactgcaagctgaagaccaaccacattggccacacaggc 674

661 tatctgaacacgggtgactgtctctccagatggatccctctgtgcttctggaggcaaggat 720
|||||
675 tatctgaacacgggtgactgtctctccagatggatccctctgtgcttctggaggcaaggat 734

```

721  ggccaggccatggttatgggatctcaacgaaggcaaacacctttacacgctagatggtggg 780
      |||
735  ggccaggccatggttatgggatctcaacgaaggcaaacacctttacacgctagatggtggg 794

781  gacatcatcaacgccctgtgcttcagccctaaccgctactggctgtgtgctgccacaggc 840
      |||
795  gacatcatcaacgccctgtgcttcagccctaaccgctactggctgtgtgctgccacaggc 854

841  cccagcatcaagatctgggatcttagagggaaagatcattgtagatgaactgaagcaagaa 900
      |||
855  cccagcatcaagatctgggatcttagagggaaagatcattgtagatgaactgaagcaagaa 914

901  gttatcagtaccagcagcaaggcagaaccaccccagtgacactccctggcctggtctgct 960
      |||
915  gttatcagtaccagcagcaaggcagaaccaccccagtgacactccctggcctggtctgct 974

961  gatggccagactctggttctgctggttacacggacaacctggtgagagtggtgaggtgacc 1020
      |||
975  gatggccagactctggttctgctggttacacggacaacctggtgagagtggtgaggtgacc 1034

1021 attggcacacgc aagtttatggcagagctttacaaat 1060
      |||
1035 attggcacacgc aagtttatggcagagctttacaaat 1074

```

FIGURA 10. Comparación de la secuencia de nucleótidos del candidato 1P2.1 (secuencia superior) contra el banco de genes Genbank. En esta comparación se obtiene una similitud de un 99% con el gen que codifica para la proteína RACK1 (secuencia inferior); la secuencia de 1P2.1 presenta una adenina adicional en la región no codificante 5' y la base 942 es una citosina en vez de timidina, ambas diferencias son mostradas en color azul, el codón de inicio de traducción se muestra con letras verdes y el codón de paro con letras rojas.

MTEQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQFPDMILSASRDKTIIMWKLTRDET
NYGIPQRALRGHSHFVSDVVISSDGQFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRR
FVGHTKDVLSVAFSSDNRQIVSGSRDKTIKLWNTLGVCKYTVQDESHSEW
VSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVNLANCKLKTNHIGHTGYLNTVTV
SPDGSLCASGGKDGQAMLWDLNEGKHL YTL DGGDIINALCFSPNRYWLCA
ATGPSIKIWDLEGKIIVDELKQEVISTSSKAEPQCTSLAWSADGQTLFA
GYTDNLVRVWQVTIGTR

FIGURA 11. **Secuencia primaria de la proteína RACK1.** La secuencia de la clona 1P2.1 es idéntica a nivel de aminoácidos con la proteína RACK1 reportada, esta es una proteína de 317 aminoácidos con un peso molecular de 36 kD.

DISCUSION

Las interacciones proteína-proteína juegan un papel crítico en muchos procesos biológicos y existen múltiples reportes en los que se pone de manifiesto el papel de dichas interacciones: la identificación de interacciones entre oncoproteínas virales y proteínas supresoras de tumor; entre represores y co-represores; proteínas del ciclo celular etc. Tradicionalmente estas interacciones habían sido detectadas usando métodos bioquímicos como la co-inmunoprecipitación en la cual un anticuerpo dirigido contra una proteína conocida es usado para precipitar las proteínas asociadas a esta. Sin embargo tales métodos bioquímicos resultan únicamente en la identificación de la aparente masa molecular de las proteínas asociadas; obtener y clonar los genes para estas proteínas es frecuentemente mas difícil.

Una alternativa para detectar las interacciones proteína-proteína lo constituye el sistema del doble híbrido. El sistema es un ensayo genético basado en levadura que nos permite detectar las interacciones proteína-proteína "in vivo" (Fields y Song 1989; Chien y cols 1991). Este puede ser usado para establecer interacciones entre proteínas conocidas o para investigar interacciones de proteínas codificadas por bibliotecas de cDNA con una proteína blanco. De tal forma que el gen codificante de la proteína que interacciona con una proteína blanco esta inmediatamente disponible como un plásmido de levadura.

Para identificar las interacciones entre nuestro represor transcripcional REST con algún componente de la maquinaria celular utilizamos precisamente el sistema del doble híbrido en levadura, por las características mencionadas anteriormente.

En un primer tamizaje utilizando el dominio TRD1 como secuencia blanco o anzuelo encontramos después de dos selecciones con histidina y X-gal, cuatro clonas positivas a las que denominamos 1P, 13, 17 y 20 (figura 6). Una de ellas, la clona 1P, fue seleccionada para continuar con el tamizaje sobre una biblioteca de expresión construida en el vector lambda ZAP. La selección de la clona 1P fue decidida en base a que mostraba una similitud muy elevada con un gen implicado en diferenciación neuronal. De los tamizajes realizados

en lambda ZAP se obtuvieron varias clonas que contenían el inserto completo del gen. A partir de la clona IP2.1 (figuras 7-9) fue posible secuenciar y obtener la estructura primaria completa del gen (figura 10)

IZT.

Los resultados de la comparación en el banco de genes (GENE-BANK) nos mostraron que el gen que encontramos corresponde al gen RACK1 (Receptor of Activated C Kinase), el cual muestra un 99 % de similitud a nivel de nucleótidos y 100 % de similitud a nivel de aminoácidos (figura 10 y 11).

Las RACKs son proteínas que se encuentran en la fracción particulada de la célula y se unen a la proteína cinasa C (PKC) únicamente en su forma activa, esta unión es saturable y es específica para esta cinasa, la PKC no se une a las RACKs por su sitio catalítico y la actividad de esta enzima no es inhibida por dicha unión, más aun, hay un incremento en la fosforilación del sustrato en la presencia de concentraciones limitantes de activadores de PKC como diacilglicerol, fosfatidilserina y calcio; Mochly-Rosen y su grupo sugieren que la unión de PKC a las RACKs es necesaria para que la enzima se transloque y lleve a cabo sus funciones celulares (Mochly-Rosen y cols. 1991, 1995) (figura 12).

PKC es una familia de enzimas que fosforilan en serina-treonina, por estudios bioquímicos, inmunológicos y citoquímicos se ha encontrado que la expresión de algunas isoformas de PKC se da de manera específica de tejido, y también que la distribución intracelular de PKC es distinta dependiendo de la isoforma (Tanaka y Nishizuka 1994), situación que hace fácil suponer que esta enzima está implicada en una gran cantidad y diversidad de procesos celulares.

La proteína RACK1 como ya se mencionó en los resultados al referirnos a la clona p205, está implicada en procesos de desarrollo y diferenciación neuronal, hecho que apoya la idea de que tiene algo que ver con REST, que es un factor de transcripción implicado en los mismos procesos; RACK1 es una proteína de 36 kD que pertenece a una superfamilia de proteínas que contienen de 5 a 8 elementos repetidos internamente que han sido llamados el

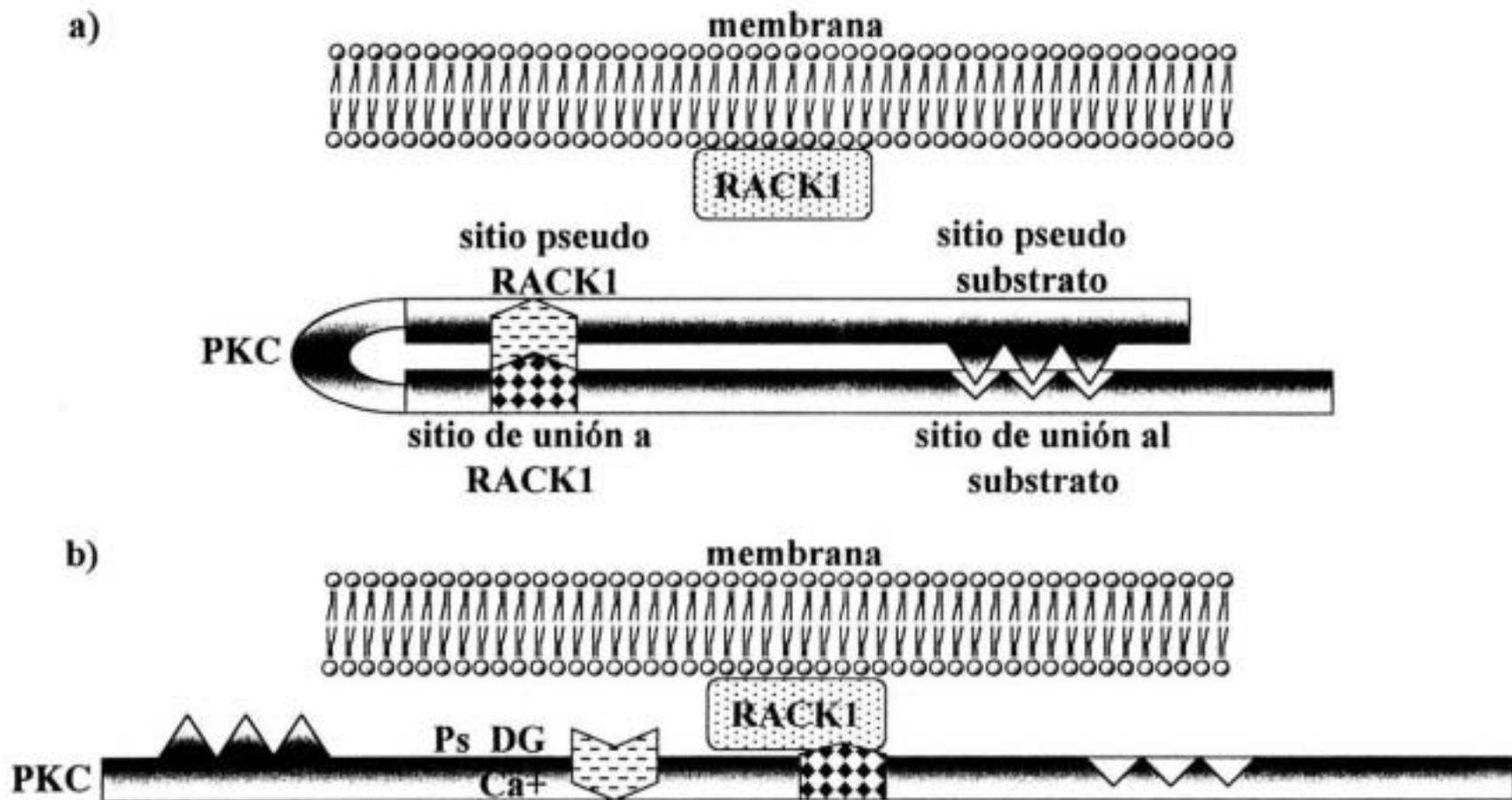


FIGURA 12. **Interacción de RACK con PKC.** a) Cuando PKC se encuentra en forma inactiva su conformación dada por interacciones intramoleculares le impide asociarse con RACK, b) pero en presencia de activadores como calcio (Ca^+), fosfatidilserina (Ps) y diacilglicerol (DG) su conformación cambia dejando expuesta la región de interacción con RACK, la cual a su vez se ancla a la fracción particulada de la célula como es la membrana plasmática y nuclear así como citoesqueleto.

“motif WD40”, en RACK1 están presentes 7 repetidos WD40 (Ron D. y cols. 1994), se ha observado que este motif esta involucrado en interacciones proteína-proteína de manera que no es de extrañar el hecho de que pueda interactuar con REST, y que esta interacción se de a la par con PKC, la consecuencia de esta interacción simultanea como es lógico sería la fosforilación de REST por PKC (figura 13), en este punto es importante señalar que REST cuenta con varios sitios consenso de fosforilación por PKC según el análisis hecho por computadora.

La fosforilación de un factor de transcripción no es algo poco frecuente, de hecho hay un sin fin de ejemplos de este tipo de evento; en general la fosforilación es la modificación postraduccional mas prominente en la regulación de muchos procesos como son la salida de quiescencia de las células, actividades enzimáticas, replicación de DNA, arranque de mitosis y también en la expresión de genes específicos al regular a factores de transcripción, tanto positiva como negativamente o bien a través de su importe nuclear; como ejemplos de factores de transcripción que son regulados por fosforilación tenemos la proteína dorsal, para el importe nuclear de esta se requiere del gen pelle, el producto de este fosforila a dorsal llevando a su importe nuclear y a una cascada de activación de genes que determina la polaridad dorsoventral del embrión en *Drosophila*, de igual manera la regulación de NF- κ B depende de su importe nuclear, en células donde este factor de transcripción esta inactivo el inhibidor I κ B se une a este en el citoplasma, después de la activación por una variedad de citocinas y mitógenos el complejo NF- κ B/ I κ B se rompe y NF- κ B se transloca al núcleo, esta liberación parece ser mediada por la fosforilación de I κ B; Oct-1 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes housekeeping esenciales, la hiperfosforilación de Oct-1 por p34^{cdc2} o PKA ocurre cuando la célula entra en mitosis causando una reducción en la actividad de unión al DNA, correlacionando esto con una inhibición general de la transcripción durante la mitosis; un ejemplo de regulación positiva es CREB, este es activado al ser fosforilado por PKA dando como resultado la expresión de c-Fos al unirse a su promotor; por otra parte la fosforilación de CREB también incrementa su capacidad para estimular la transcripción del gen de la somatostatina, en este caso la fosforilación de CREB induce su dimerización (Boulikas, T. 1995).

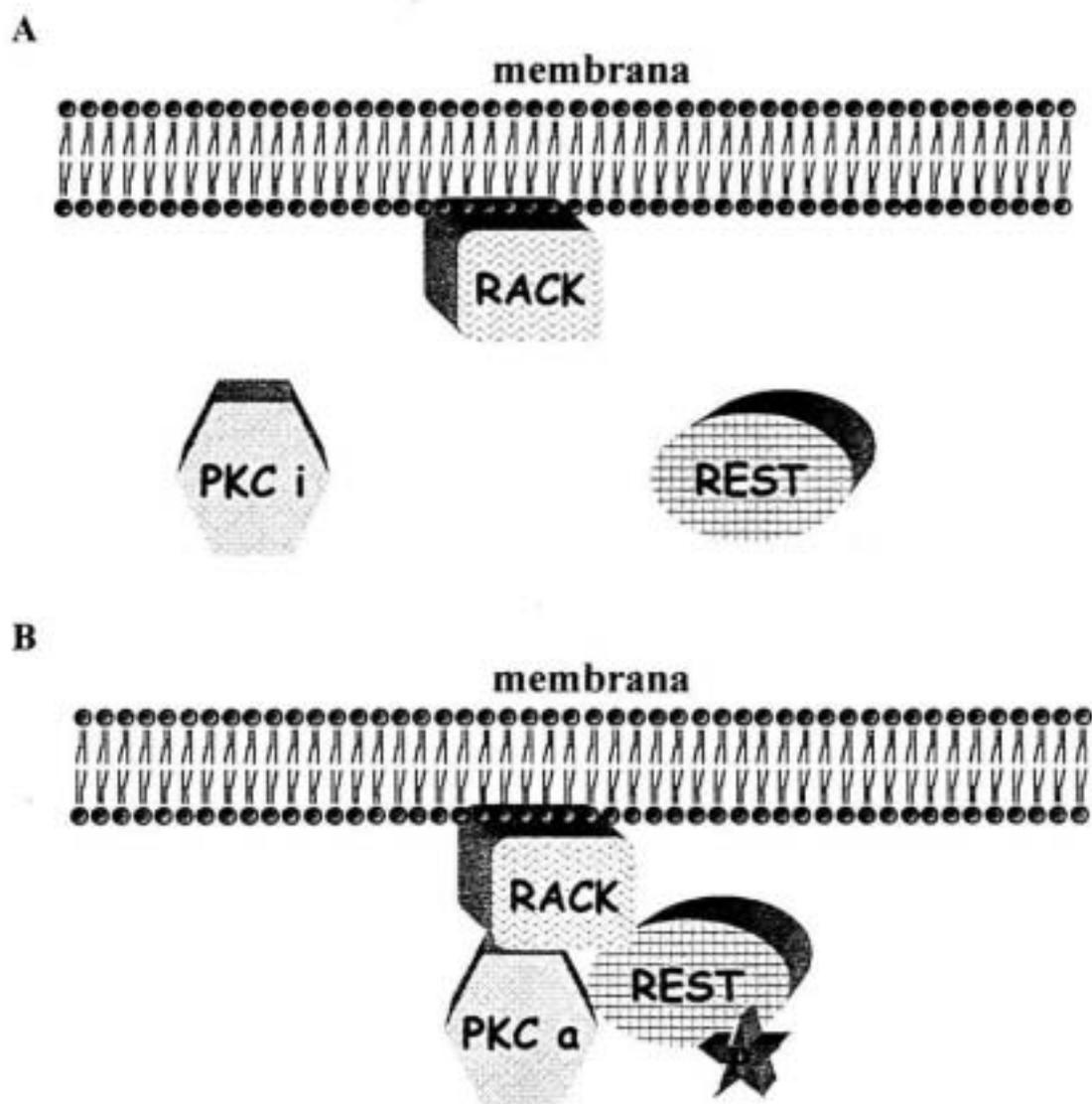


FIGURA 13. **Posible función de la interacción de REST con RACK1.** A) PKC se encuentra en su forma inactiva (PKC β), pero en presencia de sus activadores interacciona con RACK1, B) y se transloca a la fracción particulada de la célula; al interaccionar con RACK1 esta cinasa se encuentra en forma activa (PKC α), si esta interacción se da de manera simultanea con REST el posible resultado es la fosforilación de este factor de transcripción.

Como se mencionó anteriormente, REST presenta sitios consenso de fosforilación para PKC, varios de estos sitios consenso caen en la misma zona en la que se localizan los dedos de zinc que conforman el dominio de unión a DNA, así como en el dominio represor de la parte carboxilo terminal de REST en la región próxima al dedo de zinc presente en este y otro grupo de estos sitios consenso se encuentra flanqueando la señal de localización nuclear.

El resultado de la fosforilación de REST por consiguiente presenta varias alternativas, puede ser que afecte a su unión al DNA de manera positiva o negativa, que este relacionada con eventos de dimerización o interacción con otros factores involucrados en su actividad represora o que le permita su entrada al núcleo, ya que aunque REST presenta una señal de localización nuclear (NLS) se sabe que la fosforilación es un mecanismo para desenmascarar estas señales o para incrementar su potencia.

Para cualquiera que sea el punto en donde intervenga la fosforilación de REST evidentemente debe ser una parte muy importante en su regulación y por consiguiente su interacción con RACK1 ya que esta se presenta como una pieza relevante en la ruta para que llegue a cumplir su función.

APENDICES

Apendice I

Medios y soluciones

Buffer TCM

1.0 ml de Tris 1M (pH7.4)

1.0 ml de CaCl₂ 1M

1.0 ml de MgCl₂ 1M

Aforar a 100 ml.

Buffer de corrida TBE 10X

108.0 g de Trizma-base

55.0 g de Acido bórico.

9.3 g de EDTA

Aforar a 1L, esterilizar por autoclave.

Buffer SM

5.8 g de NaCl

2.0 g de MgSO₄ H₂O

50.0 ml de Tris-HCl 1M (pH 7.5)

5.0 ml de gelatina al 2%

Aforar a 1 L.

Buffer SSC 20X

175.3 g de NaCl

88.2 g de citrato de sodio

800.0 ml de agua

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10.0 N.

Aforar a 1 L.

Medio YEPD

10 g de extracto de levadura

20 g de peptona

20 g de dextrosa

Disolver en agua y aforar a 1L, esterilizar por autoclave.

Medio LB

10.0 g de NaCl

10.0 g de triptona

5.0 g de extracto de levadura

Aforar a 1L y esterilizar por autoclave.

Medio NZY

5.0 g de NaCl

2.0 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

5.0 g de extracto de levadura

10.0 g de hidrolizado de caseína

Aforar a 1L y esterilizar por autoclave.

Solución de acetato de litio 10X

Acetato de litio 1M, pH 7.5

Ajustar pH con ácido acético diluido.

Solución PEG al 50%

25 g de PEG 4000

Disolverlo en H_2O y aforar a 50 ml.

Esterilizar por autoclave.

Solución TE 10X

Tris-HCl 0.1M, pH 7.5

EDTA 0.01M, pH 7.5

Esterilizar por autoclave.

Solución 1X TE/LiOAc

1.0 ml de TE 10X

1.0 ml de LiAc 10X

8.0 ml de H₂O estéril

Solución stock de ampicilina

Disolver la ampicilina en agua a una concentración final de 5mg/ml.

Esterilizar por filtración, almacenar a -20°C protegida de la luz.

Solución stock de tetraciclina

Disolver la tetraciclina en una mezcla de agua/ethanol (1:1) a una concentración final de 12.5 mg/ml.

Agar NZY

5.0 g de NaCl

2.0 g de MgSO₄ · 7H₂O

5.0 g de extracto de levadura

10.0 g de hidrolizado de caseína

15.0 g de agar

Aforar a 1L y esterilizar por autoclave, vaciar a cajas petri.

Agar LB

10.0 g de NaCl

10.0 g de triptona

5.0 g de extracto de levadura

20.0 g de agar

Aforar a 1L y esterilizar por autoclave, vaciar a cajas petri.

Top agar NZY

5.0 g de NaCl

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

5.0 g de extracto de levadura

10.0 g de hidrolizado de caseína

0.7 % de agarosa

Aforar a 1L y esterilizar por autoclave.

Apendice II

Cepas de bacteria y levadura

DH5 α supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

SOLR e14⁻(mcrA) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcc recB recJ umuC::Tn5(Kan^r) uvrC lac
gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R [F' proAB lacI^qZ Δ M15] Su⁻

XL1-Blue MRF' Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1
gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

L40 MATa, trp1, leu2, his3, LYS2::lexA-lacZ

Apendice III

Técnicas adicionales

Extracción de DNA plasmidico por minipreparación

Se inocula la bacteria en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se deja crecer en agitación a 37°C hasta que alcance una $\text{DO}_{(600\text{nm})}$ de 0.5 y entonces se empastillan las bacterias en 2 tubos eppendorf de 1.5 ml centrifugándolas a 12000 rpm/30 seg, enseguida se lavan con 350 μl de STET y se resuspenden en 350 μl (no vortex) agregándose 25 μl de lisozima (10 mg/ml) y se ponen al vortex por 3 seg, se dejan incubando 4 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se hierven las muestras por 50 seg y luego se esto se centrifugan a 12 rpm/10 min, la pastilla se desecha con un palillo y se adiciona 1 μl de RNAsa A (2 mg/ml) dejando las muestras a temperatura ambiente por 15 min, luego de este lapso se agregan 75 μl de NaOAc 3M pH 5 y 250 μl de isopropanol y se dejan 5 min a temperatura ambiente, enseguida se centrifugan a 12000/10 min desechando el sobrenadante y lavando la pastilla con 200 μl de etanol al 70% frio y se dejan secar, la pastilla se resuspende en 100-150 μl de buffer TE o agua por cada tubo.

Restricción de DNA

Se prepara la siguiente reacción:

10 μl DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1 μl Enzima (10 u/ μl)
1 μl Buffer (10X)
____ H_2O
20 μl volumen final

La reacción se incuba a 37°C por una hora a menos que la enzima corte a una temperatura distinta. Una unidad de enzima es suficiente para cortar 1 μg de DNA en 1 hora a la temperatura adecuada.

Preparación de bacterias competentes

Se pica una colonia de una placa fresca y se transfiere a 500 ml de medio LB en un frasco de 1 l, se incuba a 37°C con agitación vigorosa hasta que alcance una $DO_{(600nm)}$ de 0.375-0.400, se transfiere el cultivo a tubos de polipropileno de 50 ml estériles y fríos, se enfría el cultivo a 0° C manteniendo los tubos en hielo por 10 min, se recuperan las células centrifugando a 4000 rpm/10 min a 4°C, se decanta el medio de las pastillas y se deja escurriendo por 1 min posteriormente se resuspende cada pastilla en $CaCl_2$ 0.1 M enfriada previamente y se almacena en hielo por 10 min, se recuperan las células por centrifugación a 4000 rpm/10 min a 4°C, nuevamente se decanta el fluido de las pastillas y se dejan escurriendo por 1 min, enseguida se resuspende cada pastilla en 2 ml de una solución de $CaCl_2$ 0.1 M y glicerol al 15 % fría por cada 50 ml de cultivo original, esta suspensión se distribuye en tubos eppendorf en alícuotas de 200 μ l y se almacenan a -70°C. Todos los pasos deben ser realizados en condiciones de esterilidad.

Transformación de bacterias con DNA plasmidico

Bacterias competentes son descongeladas en hielo, se mezclan 50 μ l de bacterias con 1 μ l de DNA (son suficientes 25 ng de DNA) se deja la mezcla 5 min en hielo y luego se pone en baño maría a 42°C por 50 seg y enseguida se pasa a hielo dejándola por 2 min, se le agrega 1 ml de medio LB dejando por 5 min a temperatura ambiente, se toman de 100 a 150 μ l y se espatulan en una caja con el antibiótico de selección.

Preparación y corrida del gel de secuenciación

Los vidrios se limpian con liquido limpia vidrios, con cloroformo y por último con etanol, los separadores se limpian con etanol, una de las placas de vidrio se debe de siliconizar para que el gel quede adherido únicamente a la otro placa, se arma la cámara y se prepara una mezcla de 40 g de urea, 9 ml de acrilamida/bisacrilamida 19:1 (acrilamida al 40 %), 6 ml de buffer TBE 10X y 26 ml de H_2O , la mezcla se disuelve calentándola en agitación, se espera a que se enfríe un poco para que no gelifique muy rápido y de tiempo de vaciarla,

finalmente se agregan a la mezcla 350 μ l de persulfato de amonio al 10 % y 60 μ l de TEMED y de inmediato se vacía en la cámara con una jeringa de 50 ml sin aguja a la que se le adapta una punta de micropipeta recortada en la proporción adecuada y se coloca el peine, es importante que no se formen burbujas en el gel.

El buffer de corrida es TBE 0.5 X, con este se llena el contenedor de la cámara, la parte donde se van a cargar las muestras se lava con el mismo buffer y luego se coloca el peine, se hace una precorrida a 55 W por aproximadamente 1 h, hasta que la temperatura del gel alcance los 55°C, enseguida se cargan las muestras y se corren a 55 W, la temperatura no debe de pasar de 55°C; una vez concluida la corrida se separan las placas de vidrio y se cubre el gel con papel Wattman previamente humedecido con agua, y de esta manera se levanta el gel y se le coloca plástico "megapack" por el lado contrario al cubierto con el papel, en esta forma es secado en el secador de geles a 80°C por 1 h. El gel ya seco se expone a una placa de radiografía por el tiempo adecuado, se revela la placa y finalmente se lee la secuencia.

Apendice IV

Mapas de vectores

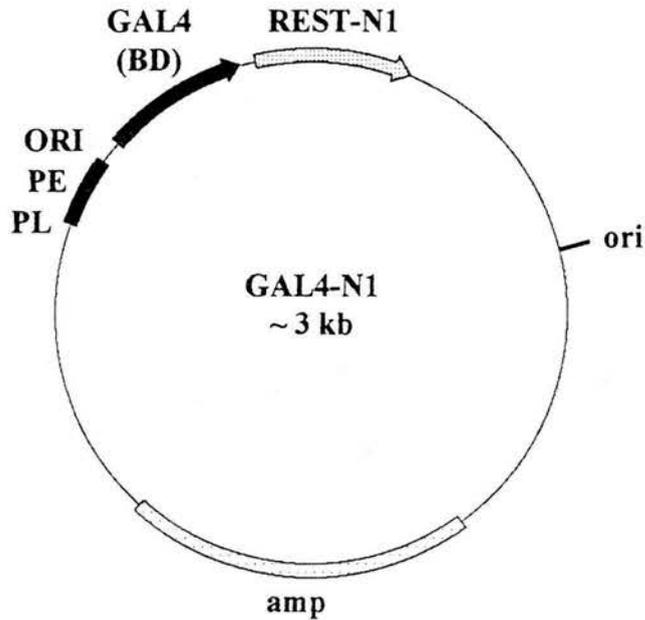


FIGURA 14. Mapa del plásmido GAL4-N1. Este plásmido es un derivado del plásmido PECE en el cual se encuentran la secuencia del promotor temprano de SV40 (PE), un origen de replicación para la propagación en bacteria (ori) y el gen de la β -lactamasa (amp) que lo hace resistente a ampicilina, en este plásmido se clonó la región correspondiente al dominio de unión a DNA del gen GAL4 de levadura (GAL4 BD) (plásmido pSG424) y posteriormente se clonó la región de REST correspondiente al dominio represor TRD1 (REST-N1) que abarca del aa 1 al 83. De este plásmido se obtuvo el fragmento del dominio represor TRD1 para clonarlo en el plásmido pBTM 116.

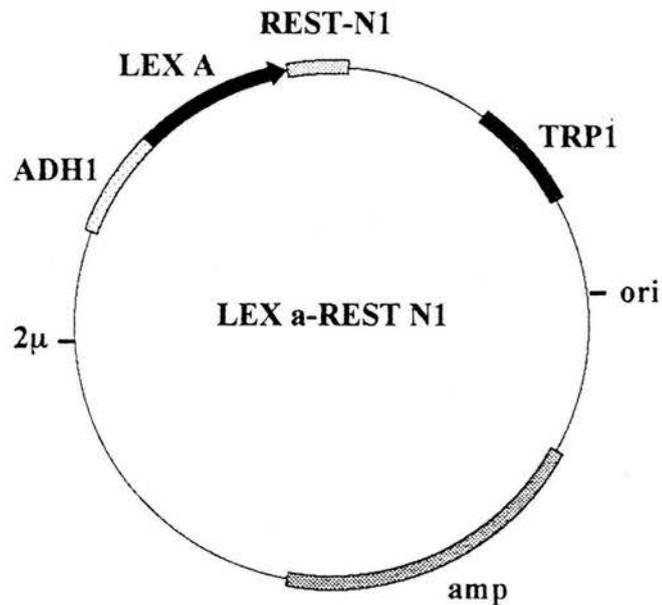


FIGURA 15. **Mapa del plásmido LEX A-REST N1.** Para obtener este plásmido se clonó en pBTM 116 la secuencia de REST correspondiente al dominio represor TRD1 (REST-N1) inmediatamente después de LEX A; este plásmido cuenta con el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH1) para la expresión en levadura, el dominio de unión a DNA del represor bacteriano LEX A (LEX A), el marcador de auxotrofia triptofano (TRP1) para la selección en levadura y el de resistencia a ampicilina (amp) para la selección en bacteria, también cuenta con un origen de replicación para bacteria (ori) y otro para su replicación en levadura (2 μ).

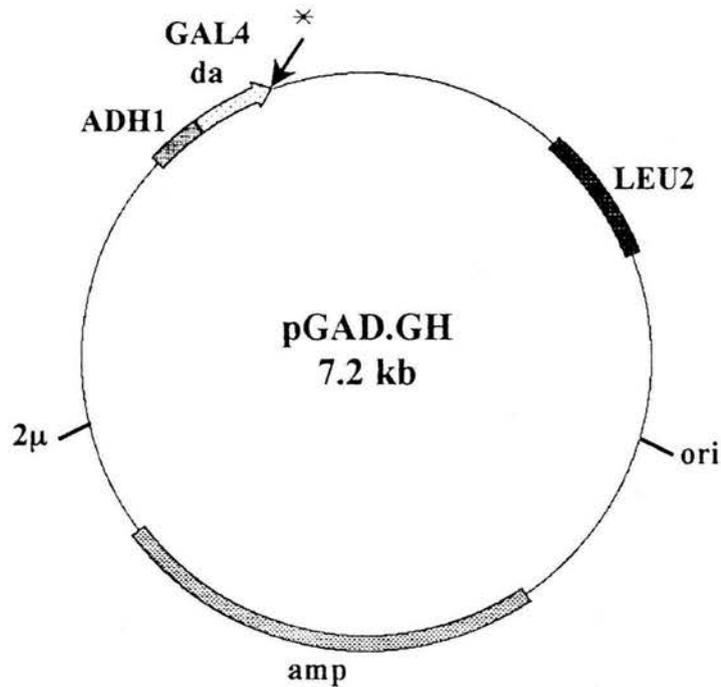


FIGURA 16. **Mapa del plásmido pGAD.GH.** Este plásmido contiene el dominio de activación del gen GAL 4 (GAL4da) dirigido por el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1) para su expresión en levadura, el gen de resistencia a ampicilina (amp) y el del marcador de auxotrofia (LEU2) para su selección en bacteria y en levadura respectivamente, así como un origen de replicación funcional en bacteria (ori) y otro en levadura (2 μ); en este plásmido fue clonada una biblioteca de cDNA de células HeLa enseguida del dominio de activación de GAL4 (*). Esta construcción fue donada por la doctora Gail Mandel.

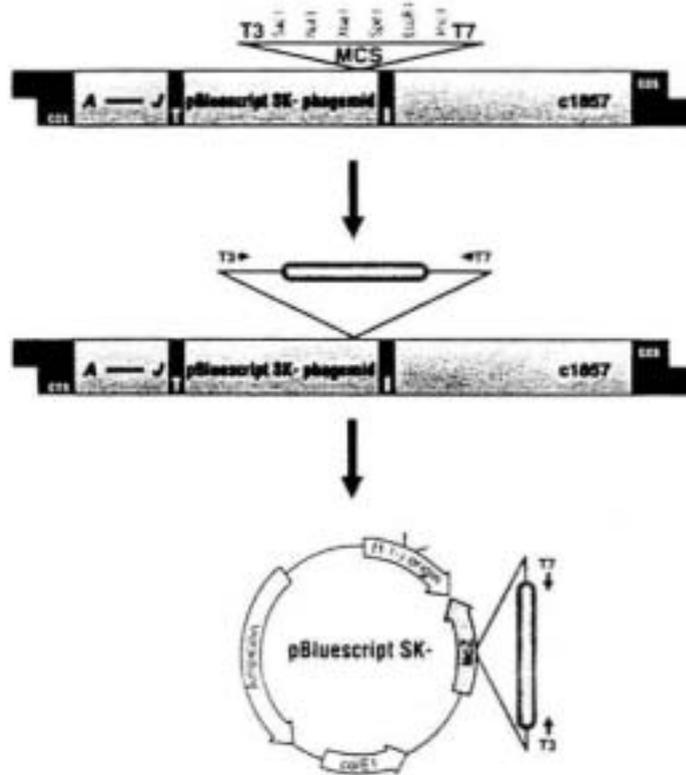


FIGURA 17. **Vector Lambda-ZAP.** En la parte superior (a) se esquematiza el vector Lambda-ZAP conteniendo al fagemido Bluescript el cual esta flanqueado por los dominios iniciador y terminador que hacen posible la excisión del plásmido, A–J indica y cos ; en b se muestra el mismo vector con el inserto clonado en el sitio de clonación múltiple de Bluescript (MCS) en este caso el fragmento proviene de una biblioteca de cDNA de células HeLa; en el panel c se muestra el mapa de bluescript que contiene el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación fl necesario para la excisión y un origen de replicación del plásmido funcional en bacteria (ColE1), el sitio de clonación múltiple flanqueado por las secuencias para los primers T3 y T7, este MCS se encuentra dentro del marco de lectura del gen lacZ el cual es interrumpido con la inserción de algun fragmento, este plásmido tiene un tamaño de 2.96 kb.

BIBLIOGRAFIA

Aravind, L; Walker, D. R; Koonin, E. V. (1999) Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.* 27, 1223-1242.

Atouf, F; Czernichow, P; Scharfmann, R. J. (1997) Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. *Biol. Chem.* 272, 1929-1934.

Beckmann, A. M; Wilce, P. A. (1997) Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem. Int.* 31, 477-510.

Bessis, A; Champiaux, N; Chateli, L; Changeux, J-P. (1997) The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/lencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain. *PNAS.* 94, 5906-5911.

Brenman, J. E; Xia, H; Chao, D. S; Black, S. M; Bredt, D. S. (1997) Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev. Neurosci.* 19, 224-231.

Borden, K. L. (1998) RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem. Cell. Biol.* 76, 351-358.

Chien, C. T; Bartel, P. L; Sternglanz, R; Fields, S. (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *PNAS.* 88, 9578-9582.

Chong, J. A; Tapia-Ramírez, J; Kim, S; Toledo-Aral, J. J; Zheng, Y; Boutros, M. C; Altshuler, Y. M; Frohman, M. A; Kraner, S. D; Mandel, G. (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell.* 80, 949-957.

Darnell J. E. Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science.* 277, 1630-1635.

Dawid, I. B; Toyama, R; Taira, M. (1995) LIM domain proteins. *C R Acad. Sci. III.* 318, 295-306.

Della, N. G; Hu, Y; Holloway, A. J. Wang, D; Bowtell, D. D. (1995) A combined genetic and biochemical approach to mammalian signal transduction. *Aust. N Z J Med.* 25, 845-851.

Dent, C. L; Lillycrop, K. A; Bybee, A; Latchman, D. S; Thomas, N. S. (1991) Interferon-alpha treatment of Daudi cells down-regulates the octamer binding transcription/DNA replication factors Oct-1 and Oct-2. *J. Biol. Chem.* 266, 20888-20892.

Fields, K. L. (1979) Cell type-specific antigens of cells of the central and peripheral nervous system. *Curr. Top. Dev. Biol.* 1, 237-257.

Fields, S; Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340, 245-246.

Guilfoyle, T. J; Ulmasov, T; Hagen, G. (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell. Mol. Life, Sci.* 54, 619-627.

Hansen, J. C; Tse, C; Wolffe, A. P. (1998) Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry.* 37, 17637-17641.

Hawkins, A. R; Lamb, H. K. (1995) The molecular biology of multidomains proteins. Selected examples. *Eur. J. Biochem.* 232, 7-18.

Higgins, J. B; Casey, P. J. (1996) The role of prenylation in G-protein assembly and function. *Cell. Signal.* 8, 433-437.

Hoogeveen, A. T; Oostra, B. A. (1997) The fragile X syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20, 139-151.

Imai, Y; Suzuki, Y; Tohyama, M; Wanaka, A; Takagi, T. (1994). Cloning and expression of a neural differentiation-associated gene, p205, in the embryonal carcinoma cell line P19 and in the developing mouse. *Brain Research*. 24, 313-319.

Kini, R. M. (1998) Proline brackets and identification of potential functional sites in proteins: toxins to therapeutics. *Toxicon*. 36, 1659-1670.

Klein-Hitpass, L; Scwerk, C; Kahmann, S; Vassen, L. (1998) Targets of activated steroid hormone receptors: basal transcription factors and receptor interacting proteins. *J. Mol. Med*. 76, 490-496.

Koike, K; Takada, S. (1995) Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein. *Intervirology*. 38, 89-99.

Kraner, S.D; Chong, J.A; Tsay, H-J; Mandel, G. (1992). Silencing the type II channel gene: a model for neural-specific gene regulation. *Neuron*. 9, 37-44.

Kuratani, S; Bockman, D. E. (1990) The participation of neural crest derived mesenchymal cells in development of the epithelial primordium of the thymus. *Arch. Histol. Cytol*. 53, 267-273.

Lanier, L. L; Testi, R; Bindl, J; Phillips, J. H. (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med*. 169, 2233-2238.

Lillycrop, K. A; Latchman, D. S. (1992) Alternative splicing of the Oct-2 transcription factor RNA is differentially regulated in neuronal cells and B cells and results in protein isoforms with opposite effects on the activity of octamer/TAATGARAT-containing promoters. *J. Biol. Chem*. 267, 24960-24965.

Lönnerberg, P; Schoenherr, C.J; Anderson, D.J; Ibañez, C.F. (1996) Cell type-specific regulation of choline acetyltransferase gene expression. *J. Biol. Chem*. 271, 33358-33365.

Maue, R. A; Kraner, S. D; Goodman, R. H; Mandel, G. (1990). Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron*. 4, 223-231.

Mitchell, P. J; Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*. 245, 371-378.

Mori, N; Schoenherr, C; Vandenberg, D. J; Anderson, D. J. (1992). A common silencer element in the SCG10 and type II Na channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron*, 9, 45-54.

Oakoma, Y. (1997) Multiple functions of general transcription factors TFIIE and TFIIH in transcription: possible points of regulation by *trans*-acting factors *J. Biochem.* 122, 481-489.

Pratt, W. B; Czar, M. J; Stancato, L, F; Owens, J. K. (1993) The hsp56 immunophilin component of steroid receptor heterocomplexes: could this be the elusive nuclear localization signal-binding protein? *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 46, 269-279.

Russo, T; Faraonio, R; Minopoli, G; De Candia, P; De Renzis, S; Zambrano, N. (1998) Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett.* 434, 1-7.

Sanchez-Garcia, I; Rabbitts, T, H. (1994) The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends. Genet.* 10, 315-320.

Schoch, S; Cibelli, G; Thiel, G. (1996) Neuron-specific gene expression of synapsin I *J. Biol. chem.* 271, 3317-3323.

Scholl, T; Stevens, M; Mahanta, S; Strominger, J. (1996) A zinc finger protein that represses transcription of the human MHC class II gene, DPA. *J. Immunol.* 156, 1448-1457.

Schoenherr, C. J; Anderson, D. J. (1995) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science.* 267, 1360-1363.

Schoenherr, C. J; Paquette, A. J; Anderson, D. J. (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *PNAS.* 93, 9881-9886.

Sheng, M; Wyszynski, M. (1997) Ion channel targeting in neurons. *Bioessays.* 19, 847-853.

Staub, O; Rotin, D. (1996) WW domains. *Structure.* 4, 495-499.

Staub, O; Rotin, D. (1997) Regulation of ion transport by protein-protein interaction domains. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 6, 447-454.

Takatsuji, H. (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life. Sci.* 54, 582-596.

Tamura, T-A; Konishi, Y; Makino, Y; Mikoshiba, K. (1996) Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression. *Neurochem. Int.* 29, 573-581.

Tapia-Ramírez, J; Eggen, B. J. L; Peral-Rubio, M. J; Toledo-Aral, J. J; Mandel, G. (1997) A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. *PNAS.* 94, 1117-1182.

Wood, I. C; Roopra, A; Buckley, N. J. (1996) Neural specific expression of the m4 muscarinic acetylcholine receptor gene is mediated by a RE1/NRSE-type silencing element. *J. Biol. Chem.* 271, 14221-14225.

Yoshihara, Y; Oka, S; Ikeda, J; Mori, K. (1991) Immunoglobulin superfamily molecules in the nervous system. *Neurosci. Res.* 10, 83-105.

Zhao, J; Hyman, L; Moore, C. (1999) Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 405-445.

IZT.



U.N.A.M. CAMPUS