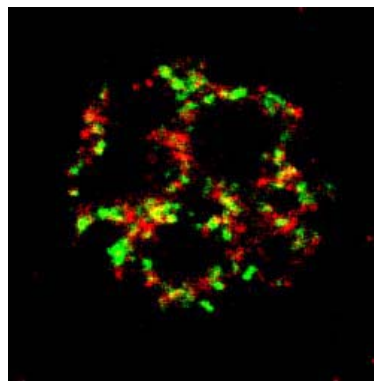


Universitat de Barcelona  
Facultat de Biologia  
Dpt de Bioquímica i Biologia Molecular

**Funciones *in vivo*  
del regulador transcripcional  
HNF1 $\alpha$  (MODY3)**



Reina Fdez de Luco, 2007



Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Dpt de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Biomedicina 2003/2004

**Funciones in vivo del regulador transcripcional  
HNF1 $\alpha$  (MODY3)**

Memoria presentada por Reina Fernández de Luco para optar al  
título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Director de la tesis

Dr. Jorge FERRER

Tutor de la tesis

Dr. Antonio ZORZANO

Doctoranda

Reina Fdez de LUCO



A mis abuelos y padres por enseñarme los valores de la vida,  
A mis amigos por enseñarme a disfrutar de la vida,  
A mi Pendragón por enseñarme a vivir.





*Medizin, Gustav KLIMT*

*"La ciencia no nos ha enseñado aún  
si la locura es o no lo más sublime de la inteligencia."*

Edgar Allan POE







## ÍNDICE

---



<b>Índice</b>	<b>ix</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>15</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>21</b>
<b>Introducción</b>	<b>25</b>
1. <b>Diabetes mellitus, la epidemia del siglo XXI.</b>	<b>28</b>
<b>1.1. Diabetes tipo 1 y tipo 2</b>	<b>29</b>
<b>1.2. Diabetes tipo MODY</b>	<b>30</b>
a) MODY, una enfermedad monogénica autosómica dominante	<b>30</b>
b) Fenotipo y etiología de la diabetes tipo MODY	<b>30</b>
2. <b>Hepatocyte nuclear factor 1<math>\alpha</math> (HNF1<math>\alpha</math>).</b>	<b>33</b>
<b>2.1. HNF1<math>\alpha</math> es un factor de transcripción de la familia homeodominio atípico</b>	<b>33</b>
<b>2.2. HNF1<math>\alpha</math> es el gen responsable de MODY3</b>	<b>35</b>
<b>2.3. Patrón espacial y temporal de expresión de HNF1<math>\alpha</math>.</b>	<b>36</b>
<b>2.4. HNF1<math>\alpha</math> regula genes importantes para la función de la célula hepática y beta-pancreática.</b>	<b>38</b>
a) Fenotipo de los modelos murinos deficientes para <i>HNF1<math>\alpha</math></i>	<b>38</b>
b) HNF1 $\alpha$ regula la expresión de genes pancreáticos que explica la disfunción de célula beta	<b>39</b>
c) Modelos de sobreexpresión de mutantes de HNF1 $\alpha$ dominantes negativos	<b>41</b>
<b>2.5. HNF1<math>\alpha</math> forma parte de una red transcripcional específica de célula beta</b>	<b>42</b>
<b>2.6. Posible rol epigenético de HNF1<math>\alpha</math> durante la diferenciación final de la célula beta</b>	<b>43</b>
3. <b>La regulación de la transcripción génica</b>	<b>45</b>
<b>3.1. Regulación de la transcripción a nivel de la secuencia primaria de DNA</b>	<b>45</b>
a) Las secuencias reguladoras de DNA	<b>46</b>

b) Los factores de transcripción secuencia-específicos	47
c) La combinación de factores de transcripción secuencia-específicos otorgan especificidad a la expresión génica	48
d) Los genes están distribuidos en el genoma de manera no aleatoria	48
<b>3.2. Regulación de la transcripción a nivel de la cromatina</b>	<b>49</b>
a) La cromatina, la configuración secundaria del DNA	49
b) La cromatina está organizada en diferentes grados de compactación altamente dinámicos	51
c) El código de las histonas	52
d) Heterocromatina vs. Eucromatina	54
<b>3.3. Regulación de la transcripción a nivel del Espacio nuclear.</b>	<b>60</b>
a) El núcleo está altamente organizado en dominios funcionales.	60
b) Reposicionamiento de los loci en el núcleo según el estado transcripcional	65
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>75</b>
<b>Resultados</b>	<b>81</b>
<b>1. A conditional model reveals that induction of Hepatocyte Nuclear Factor-1<math>\alpha</math> in <i>Hnf1<math>\alpha</math></i>-null mutant <math>\beta</math>-cells can activate silenced genes postnatally, whereas overexpression is deleterious.</b>	
RF Luco, MA Maestro, N del Pozo, WM Philbrick, P Perez de la Ossa and J Ferrer, <i>Diabetes</i> , vol.55 p2202-2209 2006	83
<b>2. <i>Hnf1<math>\alpha</math></i> repositions its genomic targets to subnuclear histone code domains</b>	
RF Luco, MA Maestro and J Ferrer, en revisión en <i>Journal of Cell Biology</i>	97

---

<b>Discusión</b>	<b>157</b>
La función de HNF1 $\alpha$ en la célula beta tiene autonomía celular.	<b>159</b>
La función de HNF1 $\alpha$ en la célula beta no parece restringida a las fases iniciales del desarrollo de las células beta.	<b>159</b>
HNF1 $\alpha$ impide la metilación de H3-Lys27 de sus genes diana.	<b>161</b>
La función de HNF1 $\alpha$ en la célula beta es dependiente de los niveles de expresión.	<b>161</b>
Implicaciones del análisis de la sobreexpresión de un factor de transcripción para la interpretación de estudios basados en la sobreexpresión de factores salvajes y mutantes dominante negativos.	<b>163</b>
El modelo deficiente para HNF1 $\alpha$ nos permite estudiar genéticamente en células diferenciadas la función de un activador en el reposicionamiento génico.	<b>164</b>
Existe un código de histona en el espacio nuclear?	<b>165</b>
La resolución de la microscopía óptica y el uso de BACs limita el estudio del reposicionamiento dependiente de activador.	<b>166</b>
Modelo para integrar la existencia de cambios locales en la cromatina y reposicionamiento inducible por HNF1 $\alpha$ .	<b>167</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>169</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>173</b>
<b>Anexos</b>	<b>201</b>
Material y Métodos	<b>203</b>
Otras publicaciones	<b>243</b>
Currículum Vitae	<b>257</b>



## **AGRADECIMIENTOS**

---



Primero de todo, agradecer a los miembros del tribunal por su valioso tiempo e inteligente discusión de este trabajo de tesis.

Pero sobretodo, agradecer a mi inconsciencia por no hacer caso a mi consciente y decidir quedarme en el laboratorio de la 3-6.

Ese "laboratorio" cambió mi vida, cambio mi manera de ser y sobretodo cambio mi manera de ver las cosas. Ese "laboratorio" me enseñó a compartir, a respetar, a ser crítica conmigo misma, a tener mayor amplitud de miras y sobretodo a querer...a querer la ciencia como se merece, sin ingenuidades, y a querer a la gente, a esa maravillosa gente que ha ido entrando y saliendo por la 3-6 y anexos (que son unos cuantos...hormonal, bioquímica, farmacia, lab 411...). Realmente hacer la tesis con Jorge amplía tus horizontes! Lo sé, queréis que vaya a lo personal...en fin...allà voy.

Gracias Jorge por enseñarme a hacer ciencia, entré arrogante, tozuda, temperamental y con poca visión...salgo arrogante, tozuda y temperamental pero ahora sé ver más allá, sé no restringirme a lo evidente, sé que siempre hay algo más. Gracias por enseñarme a pensar y saber donde buscar para pensar (es el jefe, por si no se había notado). Bueno, y aunque no creo que fuera tu intención, gracias por desarrollar mi capacidad de supervivencia en condiciones extremas en un laboratorio.

Gracias Dr. Climent y toda la gente del Departament de Bioquímica de la Facultat de Medicina por hacerme sentir como en casa, cuando era una pobre exiliada, y hacerme un huequecillo entre vosotros.

Al triunvirato Mari, Elisenda y Ada por las risas y momentos de desahogo. A Jordi, Marc y Churri por ayudarme a liberar tensiones con sus bromas y ocurrencias. A Pablo por enseñarme a ser más tolerante (¡pero la Pamela, ni verla!). Y a mi Feliu por todo, por nuestras charlas de compañeros de poyata, por estar siempre a mi lado, cariñoso y comprensivo, por culturizarme, por enseñarme ese mundo alternativo que hay ahí fuera y recordarme que aún soy capaz de soñar.

Gracias a la gente de mi lab, presente y pasada, por apoyarme, ayudarme, enseñarme a ser mejor persona y sobretodo por soportarme. ¿Judith, te acuerdas cuándo empezamos? Madre mía, cuánta incertidumbre, cuánto proceso de adaptación...sin ti no hubiese sido lo mismo, me alegro mucho que empezáramos juntas este camino y que supieras encontrar el tuyo. Marce, descubrí la ciencia a tu lado, siempre te consideraré en parte mi mentora. Alicia, me enseñastes a afrontar las penas con decisión y una sonrisa. Meri, eres la bondad personificada, espero que se me pegue algo de ti. Myriam eres la vitalidad personificada, tienes mucho que dar y



más que recibir. Joris, a ver que tal ese español, eres despierto e inquieto, ha sido un placer compartir contigo el tramo final de este viaje. Carine, simplemente, olé tus huevos! Marta, me hubiese encantado conocerte antes porque me sabe a poco el tiempo que hemos pasado juntas, hay feeling y espero que no se acabe. A las chicas, Carina, Melina, Natalia y Sylvia, un millón de gracias. Sin vosotras no lo hubiese conseguido. Gracias por tirarme de la oreja cuando lo necesitaba, por sacarme una sonrisa cuando asomaban lágrimas, por sacarme del agujero cuando no podía levantarme, por escucharme y demostrarme que nunca estaré sola. Gracias Cari por tu apoyo y por estar siempre al pie del cañón. Gracias Mel por escucharme y ayudarme con tus consejos cuando más perdida estaba, aún nos queda mucho arte por descubrir! Gracias Nat por ser mi caballero andante y salvarme en más de una ocasión del peligro y sobretodo de mi misma. Y como no gracias a mi hermana de lab y casi de vida, Syl la ferrecita mutante... al final lo conseguimos, conseguimos sobrevivir a la tesis! Y sé que sin ti hubiese sido imposible, gracias por todos esos momentos inolvidables a las 21h de la noche en la 3-6, por nuestras charlas sobre la vida, por cantar a pleno pulmón conmigo en Bioquímica, por estar siempre a mi lado, incondicional, por mimarme y cuidarme, por no abandonarme nunca y hacerme sentir especial y creer que podíamos con todo y todos...siempre juntas, hermana. Y por último, los chicos del lab. Gracias a vosotros ahora soy más tolerante, paciente, hablo mejor el español, soy menos ingenua, controlo mejor mi mala leche y he aprendido mucho sobre los hombres. Gracias Joan Marc por tu ironía y sabios consejos sobre el mundo de la ciencia y la vida, simplemente cantarte por última vez ¡¡y tu miraaaa!! ¡¡Se me clava en los ojos como una espaaaaa!!!. Gracias MAM, por enseñarme a tomarme las cosas con más calma y filosofía, por no derrumbarme cuando la vida quería echarme abajo, por enseñarme a tener más mano "derecha" con la gente y sobretodo el jefe... gracias por esas borracheras de confocal, por esos momentos de locura transitoria en el lab, por esas conversaciones sobre ciencia y otras cosas...¡Dios no existe! Gracias por ser mi coautor en algo más que el trabajo, gracias por ser mi a-mi-ggo (pronunciación a lo Irini).

¡No os olvidaré chic@s!

Gracias a mis amigos del instituto y Universidad por hacerme olvidar el laboratorio, por darme fuerzas para continuar cuando quería enviarlo todo a la mierda. Alécsia y Eva por esos desayunos de domingo. A Jas por su dulzura y amor, consigues iluminar un día nublado. A Ariane por enseñarme que hay mucho por descubrir. A mi Isa, que aunque lejos, siempre te noto cerca. A Marivi por nuestras charlas delante de un café humeante, por esa química inexplicable que nos mantiene unidas a pesar de todo.

Gracias a mi familia por estar junto a mi, apoyarme en todo momento e intentar comprender lo que hago. Gracias abuelos por todo el cariño y por hacerme sentir el ser más especial del universo... siempre seré tu Princesita, abuela. Gracias Papá por ofrecerme siempre lo mejor, abrir mis horizontes y enseñarme a no conformarme. Gracias Mamá por no abandonarme nunca, por creer siempre en mi y quererme tal como soy, gracias por ser mi amiga.

Gracias a Cálculo e internet por amenizarnos el día-día.

Y sobretodo, gracias a ti. Soy lo que soy por ti. Cambiaste mi vida y aunque no creamos en el determinismo, creo que el destino hizo una excepción con nosotros y existió sólo para hacer que nos encontráramos en esta mañana de mundo.

Te quiero.

¡Os quiero!





## **ABREVIATURAS**

---



---

<b>aa</b>	<i><u>a</u>mino<u>á</u>cidos</i>
<b>ATP</b>	<i><u>a</u>denosin <u>t</u>ri-<u>p</u>hosphate</i>
<b>BAC</b>	<i><u>b</u>acterial <u>a</u>rtificial <u>c</u>hromosome</i>
<b>BrUTP</b>	<i><u>b</u>romo <u>u</u>ridine <u>t</u>ri-<u>p</u>hosphate</i>
<b>ChIP</b>	<i><u>c</u>hromatin <u>i</u>mmuno<u>p</u>recipitation</i>
<b>CFTR</b>	<i><u>c</u>ystic <u>f</u>ibrosis <u>t</u>ransmembrane <u>c</u>onductance <u>r</u>egulator gene</i>
<b>CT</b>	<i><u>c</u>hromosome <u>t</u>erritory</i>
<b>C-terminal</b>	<i><u>c</u>arboxi-terminal</i>
<b>Cyp2j5</b>	<i>cytochrome <u>P</u>450, family <u>2</u>, subfamily <u>1</u>, polypeptide <u>5</u></i>
<b>dsRNA</b>	<i><u>d</u>ouble-<u>s</u>trand <u>R</u>NA</i>
<b>E9</b>	<i>edad <u>e</u>mbrionaria <u>9</u> días</i>
<b>Eed</b>	<i><u>e</u>mbryonic <u>e</u>ctoderm <u>d</u>evelopment</i>
<b>Ezh2</b>	<i><u>e</u>nhancer of <u>z</u>este <u>h</u>omolog <u>2</u></i>
<b>FISH</b>	<i><u>f</u>luorescent <u>i</u>n <u>s</u>itu <u>h</u>ybridation</i>
<b>Fxr</b>	<i><u>f</u>arnesoid-<u>x</u>-<u>r</u>eceptor</i>
<b>GFP</b>	<i><u>g</u>reen <u>f</u>luorescent <u>p</u>rotein</i>
<b>GIP</b>	<i><u>g</u>lucose-dependent <u>i</u>nsulinotropic <u>p</u>eptide</i>
<b>GLP1</b>	<i><u>g</u>lucagon-<u>l</u>ike <u>p</u>eptide <u>1</u></i>
<b>Glut2 (Slc2a2)</b>	<i><u>g</u>lucose <u>t</u>ransporter, isosyme <u>2</u></i>
<b>H3</b>	<i><u>H</u>istona <u>3</u></i>
<b>Hao3</b>	<i><u>h</u>ydroxyacid <u>o</u>xidase, isozyme <u>3</u></i>
<b>HAT</b>	<i><u>h</u>istone <u>a</u>cetyl<u>t</u>ransferase</i>
<b>HDAC</b>	<i><u>h</u>istone <u>d</u>eacetylase</i>
<b>HMTase</b>	<i><u>h</u>istone <u>m</u>ethyl<u>t</u>ransferase</i>
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	<i><u>h</u>epatocyte <u>n</u>uclear <u>f</u>actor <u>4</u><math>\alpha</math></i>
<b>Hox genes</b>	<i><u>h</u>omeobox <u>g</u>enes</i>
<b>IC</b>	<i><u>i</u>nterchromatin <u>c</u>ompartment</i>
<b>IDDM</b>	<i><u>i</u>nsulin-<u>d</u>ependent <u>d</u>iabetes <u>m</u>ellitus</i>
<b>IPF1</b>	<i><u>i</u>nsulin <u>p</u>romoter <u>f</u>actor <u>1</u></i>
<b>Kif12</b>	<i><u>k</u>inesin <u>f</u>actor <u>12</u></i>
<b>LCR</b>	<i><u>l</u>ocus <u>c</u>ontrol <u>r</u>egion</i>
<b>Mb</b>	<i><u>m</u>egabase</i>
<b>MEL</b>	<i><u>m</u>urine <u>e</u>rythro<u>l</u>eukemia</i>
<b>MHC</b>	<i><u>m</u>ajor <u>h</u>istocompatibility <u>c</u>omplex</i>
<b>MLL</b>	<i><u>m</u>ixed-<u>l</u>ineage <u>l</u>eukemia</i>
<b>MODY</b>	<i><u>m</u>aturity <u>o</u>nset <u>d</u>iabetes of the <u>y</u>oung</i>
<b>mRNA</b>	<i><u>R</u>NA <u>m</u>ensajero</i>
<b>NeuroD1</b>	<i><u>n</u>eurogenic <u>d</u>ifferentiation <u>1</u></i>

---

<b>NIDDM</b>	<i>non insulin-dependent diabetes mellitus</i>
<b>nm</b>	<i>nanómetro</i>
<b>N-terminal</b>	<i>amino-terminal</i>
<b>Pah</b>	<i>phenylalanin hydroxilase</i>
<b>pb</b>	<i>pares de bases</i>
<b>P/CAF</b>	<i>P300/CBP-associated factor</i>
<b>PcG</b>	<i>polycomb group complex</i>
<b>Pdx1</b>	<i>pancreatic and duodenal homeobox gene 1</i>
<b>Pdk1</b>	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
<b>PEV</b>	<i>position effect variegation</i>
<b>Pfk</b>	<i>phosphofructo kinase</i>
<b>Pgk1</b>	<i>phosphoglycerate kinase, , isozyme 1</i>
<b>Pklr</b>	<i>L-piruvate kinase</i>
<b>Pol II</b>	<i>RNA polymerase II</i>
<b>PRC</b>	<i>polycomb response complex</i>
<b>PRE</b>	<i>polycomb response element</i>
<b>RIP</b>	<i>rat insulin promoter</i>
<b>rRNA</b>	<i>RNA ribosomal</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
<b>Suv39h1</b>	<i>suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>
<b>TCF1</b>	<i>transcription factor 1</i>
<b>Tet</b>	<i>tetracyclin</i>
<b>Tg</b>	<i>Transgénico</i>
<b>TrxG</b>	<i>trithorax group complex</i>
<b>tTA</b>	<i>tetracyclin-dependent transactivator</i>
<b>UV</b>	<i>ultra-violeta</i>
<b>Xist</b>	<i>X-inactive specific transcript</i>



## **INTRODUCCIÓN**

---





Cambios en el nivel de vida y costumbres de las sociedades desarrolladas y en desarrollo, debidos a fenómenos como la globalización y la "coca-colonización", son responsables del aumento en la prevalencia de la diabetes no insulino-dependiente (o tipo 2), convirtiéndose en un grave problema económico-social. La diabetes tipo 2 es el resultado de un defecto en las células beta generalmente unida a la resistencia a la acción de la insulina. El descubrimiento de las bases moleculares de un subtipo de diabetes monogénica (MODY), ha facilitado el estudio y comprensión de la función de la célula beta-pancreática en la homeóstasis de la glucosa y por extensión de la diabetes.

Esta tesis doctoral pretende centrarse en el estudio del gen responsable de la forma más frecuente de diabetes tipo MODY, el factor de transcripción HNF1 $\alpha$ . Mediante el uso de modelos murinos, hemos intentado responder a aspectos importantes de la función de HNF1 $\alpha$  en células beta. Saber dónde, cuándo, y cómo regula HNF1 $\alpha$  sus genes dianas no sólo permite comprender mejor la regulación de la función de la célula beta, sino que también es importante para el desarrollo de terapias génicas y la diferenciación *in vitro* de células beta.

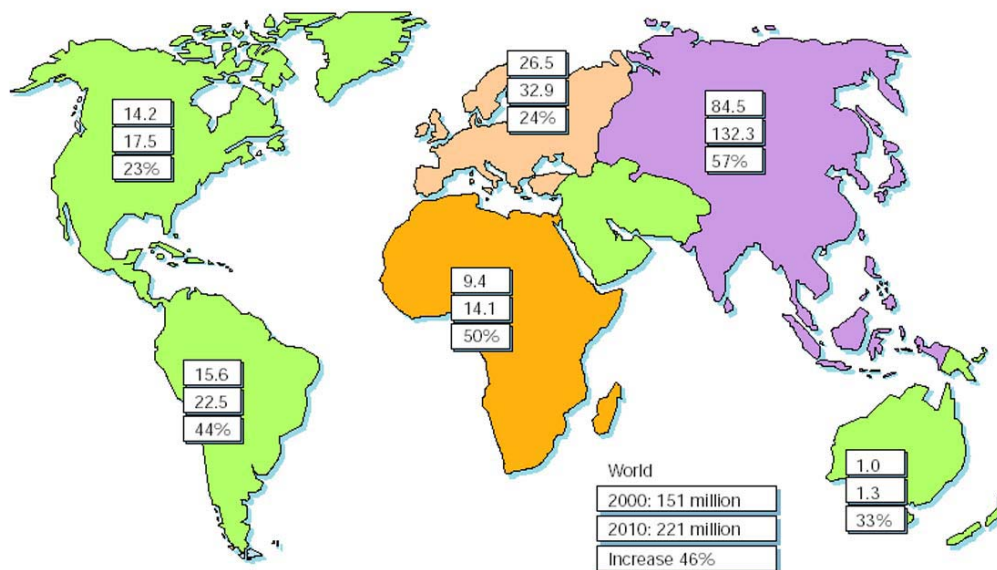
Así mismo, modelos deficientes para este factor de transcripción han resultado ser útiles para el estudio del rol de un activador en la regulación transcripcional tanto a nivel de la cromatina como del espacio nuclear, abriendo nuevas perspectivas sobre la importancia potencial de la organización nuclear en enfermedades humanas.

## 1. Diabetes mellitus, la epidemia del siglo XXI.

La diabetes es un desorden del metabolismo de la glucosa. Se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre (hiperglicemia) de manera crónica. Proviene del griego (διαβήτης, *diabetes*) que significa "sifón", "lugar por donde pasa mucho líquido". Este término empezó a usarse en el siglo I y hace referencia a la poliuria y polidipsia características de la diabetes. (Enciclopedia libre Wikipedia).

La diabetes es una enfermedad crónica multifactorial, con un alto componente ambiental. Los cambios socio-económicos vividos a nivel mundial en los últimos 20 años han disparado el número de casos de diabetes. Se prevén 220 millones de diabéticos en el 2010, con un incremento de la prevalencia del orden del 25-50% en los próximos 10 años (**Fig.1**). El sedentarismo y la dieta rica en grasas, aspectos característicos de las sociedades modernas, han disparado la incidencia de obesidad y diabetes hasta tal punto que se está empezando a hablar de "diabesity". La diabetes amenaza con ser uno de los mayores problemas económico-sociales del siglo XXI (Zimmet et al., 2001; Zimmet 2001).

La diabetes mellitus se puede clasificar en dos grandes formas: la tipo 1 o insulina-dependiente (IDDM) y la tipo 2 o no insulina-dependiente (NIDDM) (Alberti and Zimmet 1998).



**Figura 1.** Mapa de previsión del número de pacientes con diabetes (en millones) en el 2000 y 2010 (valores superiores y medios, respectivamente), y porcentaje del incremento por país. A partir de Zimmet et al., 2001

### **1.1. Diabetes tipo 1 y tipo 2.**

La diabetes mellitus tipo 1 (IDDM) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la destrucción selectiva y total de las células beta pancreáticas productoras de insulina, la hormona responsable de la regulación de la homeostasis de la glucosa. (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2000). Los diabéticos tipo 1 dependen de la inyección de insulina exógena para sobrevivir y evitar la cetoacidosis. Existen factores de riesgo genéticos, como el locus de HLA, que interaccionan con factores ambientales (infecciones virales, infecciones perinatales, un destete prematuro) aumentando la probabilidad de aparición de la diabetes auto-inmune (Atkinson and Maclaren 1994). Constituye el 10% de los casos totales de diabetes y es de aparición temprana, generalmente antes de los 20-25 años (Diabetes Epidemiology Research International Group 1990). Es la enfermedad crónica infantil más frecuente, aunque con el aumento de la obesidad infantil, pronto será desplazada por la diabetes tipo 2 (NIDDM) (Fagot-Campagna et al., 2000).

La diabetes tipo 2 es el tipo de diabetes más frecuente (90% de los casos) y es de aparición tardía (a partir de los 50 años). Un tratamiento preventivo con dieta equilibrada y mucho ejercicio puede ser suficiente para controlar la hiperglicemia, aunque generalmente se acaba tratando con hipoglucemiantes orales e incluso, con el tiempo, con insulina exógena (Alberti and Zimmet 1998; Zimmet et al., 2001). La diabetes tipo 2 es una compleja enfermedad del metabolismo de los carbohidratos que se caracteriza por resistencia a la insulina y/o secreción de insulina anormal (Cerasi and Luft 1967; DeFronzo 1988; Becknielsen and Groop 1994). El grado de contribución y orden de aparición de cada uno de estos dos defectos es tema de debate, y parece variar según las poblaciones (Groop et al., 1993). La diabetes tipo 2 es una enfermedad multifactorial, con un elevado componente ambiental. El ejercicio y la dieta son determinantes en la penetrancia de esta enfermedad, típica de las sociedades occidentales. Así mismo, se han empezado a descubrir factores genéticos que confieren susceptibilidad a diabetes tipo 2, tales como mutaciones en TCF7L2, calpain-10, PPAR $\gamma$  y mutaciones en el promotor P2 de HNF4 $\alpha$  (Barroso et al., 1999; Horikawa 2000; Weedon et al., 2003; Weedon et al., 2004; Grant et al., 2006).

## 1.2. Diabetes tipo MODY.

En el pasado, se habían descrito casos atípicos de diabetes no insulina-dependiente familiar en niños y jóvenes. En 1974, se definió clínicamente por primera vez esta forma atípica de diabetes como una diabetes autosómica dominante, y se denominó diabetes tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) (Tattersal 1974). La diabetes tipo MODY no es dependiente de insulina, es de aparición temprana (generalmente antes de los 25 años) y tiene un componente hereditario (al menos dos generaciones con diabetes) (Orahilly et al., 1987). Al igual que la diabetes tipo 2, está causada por la disfunción de las células beta, aunque debido a la mutación de un solo gen.

La diabetes tipo MODY es una enfermedad autosómica dominante poco frecuente (2-5% de la diabetes tipo 2, Ledermann 1995). Los genes cuya mutación causan MODY han resultado ser esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento de la célula beta. Por lo tanto, el estudio de MODY permite una aproximación más sencilla al estudio de la disfunción de la célula beta en diabetes tipo 2, a la vez que revela posibles genes candidato de susceptibilidad a diabetes.

### **a) MODY, una enfermedad monogénica autosómica dominante.**

En la actualidad, MODY se define como una enfermedad monogénica autosómica dominante y se conocen hasta el momento seis genes responsables de este tipo de diabetes (**Tabla 1**). Algún factor ambiental (pubertad, embarazo, infección, obesidad) puede influir en la edad de aparición y severidad del fenotipo diabético tipo MODY, pero el verdadero desencadenante y único responsable es la mutación en heterocigosidad de uno de los genes MODY (Fajans et al., 2001). La existencia de mutaciones en regiones promotoras de genes MODY y mutaciones que desestabilizan el RNA induciendo su degradación, por un fenómeno de *nonsense mediated decay*, sugieren que la aparición de MODY es por un fenómeno de haploinsuficiencia (Gagnoli et al., 1997; Vaxillaire, et al., 1999; Harries et al., 2004). Es decir, que el fenotipo es consecuencia de la pérdida de función de uno de los alelos, y no de un efecto dominante negativo, en el cual la mutación en un alelo inhibe la función del alelo sano.

### **b) Fenotipo y etiología de la diabetes tipo MODY.**

La diabetes tipo MODY, a diferencia de la diabetes tipo 2, no presenta ni resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos, ni ningún tipo de síndrome metabólico, como obesidad. MODY es una disfunción de la célula beta que no es capaz de sensor correctamente los niveles de glucosa en sangre, y por lo

tanto de secretar adecuadamente la insulina al torrente sanguíneo en respuesta a altos niveles de glucosa (Fajans et al., 2001; Owen and Hattersley 2001).

Tabla 1. Características de los diferentes subtipos de diabetes MODY

	MODY 1	MODY 2	MODY 3	MODY 4	MODY 5	MODY 6	MODY X
<b>Locus genético</b>	20q	7p	12q	13q	17cen-q21.3	2q32	Desconocido
<b>Gen</b>	<i>HNF-4a</i>	<i>Glucoquinasa</i>	<i>HNF-1<math>\alpha</math>/TCF-1</i>	<i>IPF-1/IDX1</i>	<i>HNF-1<math>\beta</math>/TCF-2</i>	<i>Neuro-D1 /<math>\beta</math>2</i>	Desconocido
<b>Función</b>	Factor de Transcripción Receptor Nuclear	Enzima glucolítico	Factor de Transcripción Homeodominio	Factor de Transcripción Homeodominio	Factor de Transcripción Homeodominio	Factor de Transcripción Hélice-asa-hélice	
<b>Frecuencia</b>	Rara	8-63%	21-64%	Rara	Rara	Rara	16-45%
<b>Edad de diagnóstico</b>	Postpuberal	Nacimiento	Postpuberal	Adultos jóvenes	Postpuberal	Adultos jóvenes	Desconocida
<b>Fenotipo humano</b>	Disfunción de célula beta grave	Hiperglicemia leve	Disfunción de célula beta grave	Disfunción de célula beta con severidad heterogénea. Agenesia pancreática en homocigosis	Disfunción de célula beta de gravedad variable. Atrofia pancreática. Anomalías renales graves	Disfunción de célula beta de gravedad variable	Heterogénea
<b>Fenotipo murino</b>	Letalidad embrionaria temprana en homocigosis Fenotipo hipersecretor de insulina en modelos nulos específicos de célula beta		Diabetes por disfunción de células beta en homocigosis además de alteraciones metabólicas hepáticas y renales	Agénesis pancreática en homocigosis, intolerancia a la glucosa en heterocigosis	Letalidad embrionaria temprana en homocigosis	Diabetes Reducción de la masa de células beta. Gravedad muy dependiente del fondo genético	

Los primeros genes causantes de MODY fueron descubiertos por clonaje posicional y análisis genético por asociación de gen candidato en familias portadoras de la mutación. Hasta el momento se conocen 6 genes responsables del 50-80% de las familias MODY (Stride and Hattersley 2002): un enzima glucolítico, la glucocinasa (MODY2, Vionnet et al., 1992; Hattersley et al., 1992) y cinco factores de transcripción esenciales para el desarrollo y funcionamiento de la célula beta pancreática, HNF4 $\alpha$  (MODY1, Yamagata et al., 1996), HNF1 $\alpha$ /TCF1 (MODY3, Yamagata et al., 1996), IPF1/PDX1 (MODY4, Stoffers et al., 1997a), HNF1 $\beta$ /TCF2 (MODY5, Horikawa et al., 1997), NeuroD1/Beta2 (MODY6, Malecki et al., 1999). Recientemente, se ha descrito un nuevo locus MODY, CEL, que presenta no sólo disfunción de célula beta sino también insuficiencia exocrina (Raeder et al., 2006). Un 16-45% de casos MODY no tienen aún locus asociado y se los designa como MODY X, evidenciando que aún quedan genes por descubrir con un rol esencial en la célula beta (Chevre et al., 1998; Velho and Robert 2002). Esta heterogeneidad genética explica la heterogeneidad clínica existente en diabetes MODY (**Tabla 1**).

MODY2, junto con MODY3, es la diabetes monogénica más frecuente. Es la única causada por la mutación de un enzima, la glucocinasa, responsable de fosforilar la glucosa para que pueda ser procesada y sensada por la célula beta. La hiperglucemia es leve y no presenta mayores complicaciones (Froguel et al., 1993).

Por el contrario, las mutaciones en los factores de transcripción suponen una disfunción progresiva de la célula beta que puede derivar en una hiperglucemia severa (Horikawa et al., 1997; Stoffers 1997b; Beards et al., 1998; Chevre et al., 1998). Mientras que IPF1 y NeuroD1, ya eran conocidos factores de transcripción importantes para el desarrollo y funcionamiento del páncreas (Stoffers et al., 1997a), los *Hepatocyte Nuclear Factor*, previamente conocidos como reguladores del hígado como el nombre indica, supusieron una gran sorpresa en el campo del páncreas (Cereghini, 1996). Algunos pacientes MODY con mutaciones en IPF1 y HNF1 $\beta$  padecen un cierto grado de agénesis pancreática, revelando un posible rol de estos factores en el desarrollo del páncreas (Stoffers et al., 1997b; Gautier et al., 2002; Maestro et al., 2003).

En el caso de MODY1 (HNF4 $\alpha$ ) y MODY3 (TCF1/HNF1 $\alpha$ ), el fenotipo consiste en un defecto severo de secreción de insulina que aparece a partir de la segunda década de vida (Byrne et al., 1995; Byrne et al., 1996), pero no hay evidencia de que exista un defecto de la organogénesis pancreática. Ambas formas tienen un fenotipo muy parecido (Byrne et al., 1995; Byrne et al., 1996), sugiriendo que estos dos reguladores podrían estar compartiendo una misma red transcripcional.

## 2. Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ (HNF1 $\alpha$ )

### 2.1. HNF1 $\alpha$ es un factor de transcripción de la familia homeodominio atípico.

HNF1 $\alpha$  se describió por primera vez en hígado como regulador transcripcional de importantes genes hepáticos como la albúmina, la  $\alpha$ 1-antitripsina o el fibrinógeno, recibiendo el nombre de *Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$*  (HNF1 $\alpha$ ) (Courtois et al., 1987; Cereghini et al., 1988a; Tronche et al., 1989; Mendel and Crabtree 1991). Su asociación, junto con HNF4 $\alpha$  y HNF1 $\beta$ , casi diez años más tarde con diabetes tipo MODY por clonaje posicional fue totalmente inesperado y abrió todo un campo en el estudio de la función de la célula beta-pancreática (Yamagata et al., 1996).

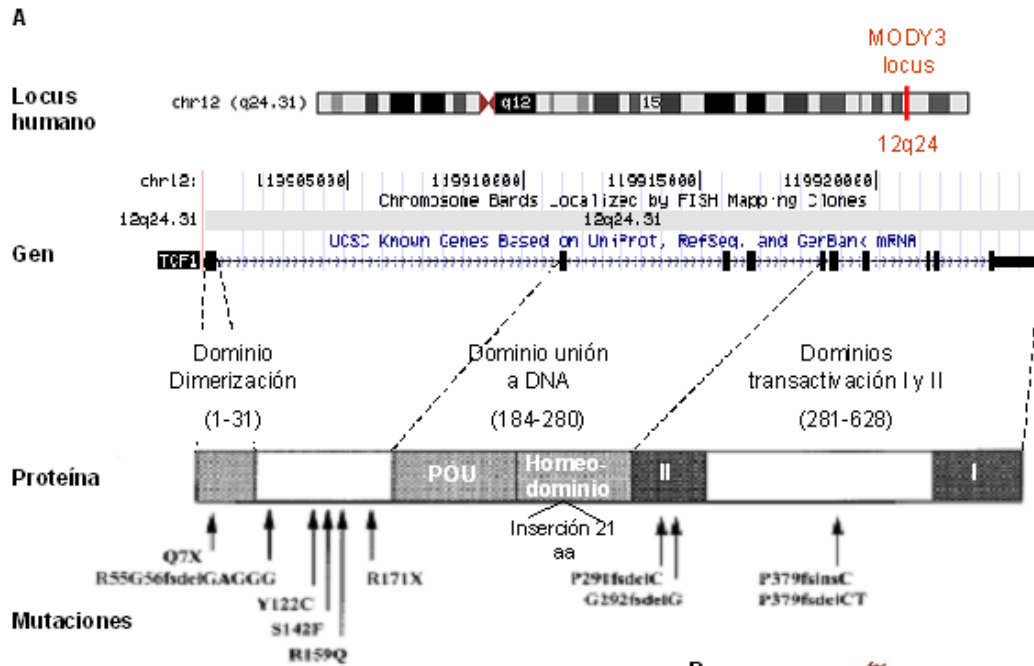
Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de HNF1 $\alpha$  están altamente conservadas en humano, rata y ratón. En humano, el gen que codifica HNF1 $\alpha$ , llamado TCF1, se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12 y consta de 10 exones que codifican una proteína de 630 aa (**Fig.2A**).

HNF1 $\alpha$  consta esencialmente de 3 dominios funcionales: el dominio de dimerización N-terminal, el dominio de unión a DNA (con un motivo POU y una región homeodominio), y el dominio de transactivación C-terminal rico en serinas y prolinas (**Fig.2A**) (Bach et al., 1992).

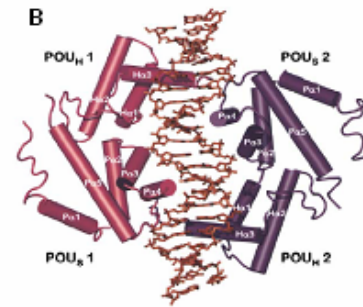
Para poder unirse al DNA, HNF1 $\alpha$  debe homodimerizar o heterodimerizar con HNF1 $\beta$  (MODY5) y a su vez formar tetrámeros con la proteína DCOH (**Fig.2B**) (Mendel et al., 1991). HNF1 $\alpha$  y HNF1 $\beta$  presentan una elevada homología proteica, especialmente a nivel del dominio de dimerización (75% de similitud) y unión a DNA (96% de similitud) y divergen a nivel del dominio de transactivación (47% de similitud) (Mendel et al., 1996). Ambas proteínas reconocen con igual afinidad una secuencia palindrómica de DNA altamente conservada (nGTTAAT) que suele encontrarse próxima al inicio de transcripción de los promotores dependientes de HNF1 $\alpha$  (Frain et al., 1989). Una particularidad de la estructura de HNF1 $\alpha$  y HNF1 $\beta$  que la distingue de otras proteínas homeodominio es la existencia de una inserción de unos 21 aa entre la segunda y tercera hélice del clásico homeodominio (Bach et al., 1992).

El estudio de las mutaciones que causan MODY3 ha permitido entender mejor las características moleculares de HNF1 $\alpha$  (Yamagata et al., 1996; Gagnoli et al., 1997; Frayling et al., 1997; Glucksmann et al., 1997; Hansen et al., 1997; Yamada et al., 1997; Vaxillaire et al., 1999; Boutin et al., 1999).





**Figura 2.** Estructura de HNF1 $\alpha$  en humano. **(A)** Representación esquemática de la estructura génica y proteica de HNF1 $\alpha$ , relacionando cada exón (rectángulos negros) con el dominio funcional (sombreado) que codifica. Entre paréntesis se indica el número de los residuos de aminoácidos. El homeodominio es atípico porque presenta una inserción de 21 aa. Con flechas se indican mutaciones responsable de MODY3. **(B)** Estructura 3D del complejo HNF1 $\alpha$ /DNA. Los dominios de unión a DNA de dos proteínas HNF1 $\alpha$  rodean la doble hélice de DNA (en medio). Adaptado a partir del UCSC Genome Browser, Bach et al, 1992; Vaxillaire et al, 1997 y Chi et al, 2002



Se han hallado mutaciones en los 3 dominios funcionales, aunque tienden a aglomerarse en los dominios de dimerización y unión a DNA (**Fig.2A**). La tercera parte de las mutaciones está representada por deleciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos, que interrumpen o modifican el marco de lectura, dando lugar a una proteína aberrante no funcional. Los otros dos tercios de mutaciones se deben a sustituciones de nucleótidos que modifican un aminoácido crítico de la proteína (*missense* o sin sentido). Este tipo de mutaciones son muy informativas, ya que señalan residuos de la proteína que son esenciales para la función de HNF1 $\alpha$ . También se ha identificado un lugar de riesgo mutacional en el exón 4 que corresponde a la región homeodominio (P291fsinsC) (Kaisaki et al., 1997). Los estudios funcionales realizados con estas mutaciones sin sentido, han confirmado que existe una disminución de las propiedades de unión al DNA o una pérdida de la fuerza de transactivación (Vaxillaire et al., 1999). También se han descrito mutaciones en el promotor de HNF1 $\alpha$  que afectan a su nivel de expresión (Graglioli et al., 1997).

## 2.2. HNF1 $\alpha$ es el gen responsable de MODY3.

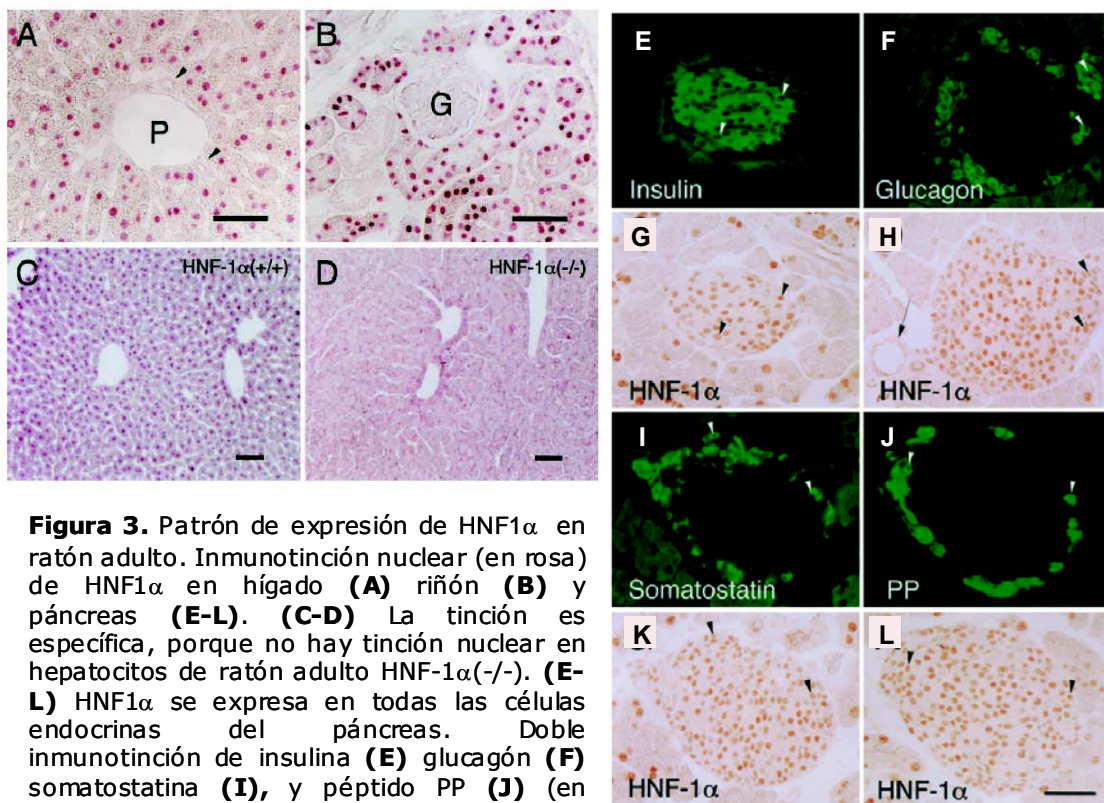
Se conocen más de 150 mutaciones en HNF1 $\alpha$  causantes de la forma más frecuente de diabetes MODY (MODY3) y que posiblemente constituyen hasta el 3% de todas las formas de diabetes. Estas mutaciones afectan a diversas poblaciones y culturas, y dan lugar a diabetes con una levada penetrancia a partir de edades tempranas (antes de los 25 años) (Yamagata et al., 1996; Gagnoli et al., 1997; Frayling et al., 1997; Glucksmann et al., 1997; Hansen et al., 1997; Yamada et al., 1997; Vaxillaire et al., 1999; Boutin et al., 1999). El fenotipo clínico consiste en una falta de respuesta apropiada a los niveles altos de glucosa en sangre por una falta de secreción de insulina y no por una resistencia a ésta última (Herman et al., 1994; Byrne et al., 1996; Lehto et al., 1997). Esta disfunción de la célula beta es progresiva y puede derivar en una diabetes severa con todas las complicaciones típicas de la diabetes tipo 1 y 2, como problemas microvasculares, retinopatía o disfunción renal (Isomaa et al., 1998). Los pacientes MODY3 también presentan problemas tubulares renales que se traducen en glicosuria (Menzel et al., 1998).

No se ha podido demostrar aún de forma clara una susceptibilidad consistente a diabetes tipo 2 clásica por parte de variantes genéticas de HNF1 $\alpha$ , excepto en el caso de una población india nativa de origen canadiense, Oji-Cree. Esta población aislada es la única portadora de la mutación en HNF1 $\alpha$  (S319) que otorga susceptibilidad a diabetes tipo 2 (Hegele et al., 1999)

Una particularidad de los pacientes MODY3 es que son sensibles a las sulfonilureas (Pearson et al., 2000). Las sulfonilureas actúan sobre el receptor SUR1, provocando el cierre del canal potásico ATP-dependiente de la célula beta pancreática. Esto ocasiona la depolarización de la membrana con la consiguiente entrada de calcio extracelular a través de los canales de calcio voltaje-dependiente y la consiguiente exocitosis de los gránulos de insulina. Esta sensibilidad evidencia que la disfunción de la célula beta es anterior a la fase final de secreción de insulina, y no corresponde a la síntesis y/o sensibilidad a esta última (**Fig.5**). Gracias a este descubrimiento científico, pacientes con MODY3 han podido sustituir el tratamiento con insulina por estos fármacos, convirtiéndose en un ejemplo de como los estudios moleculares en modelos murinos pueden traducirse en beneficios clínicos.

### 2.3. Patrón espacial y temporal de expresión de HNF1 $\alpha$ .

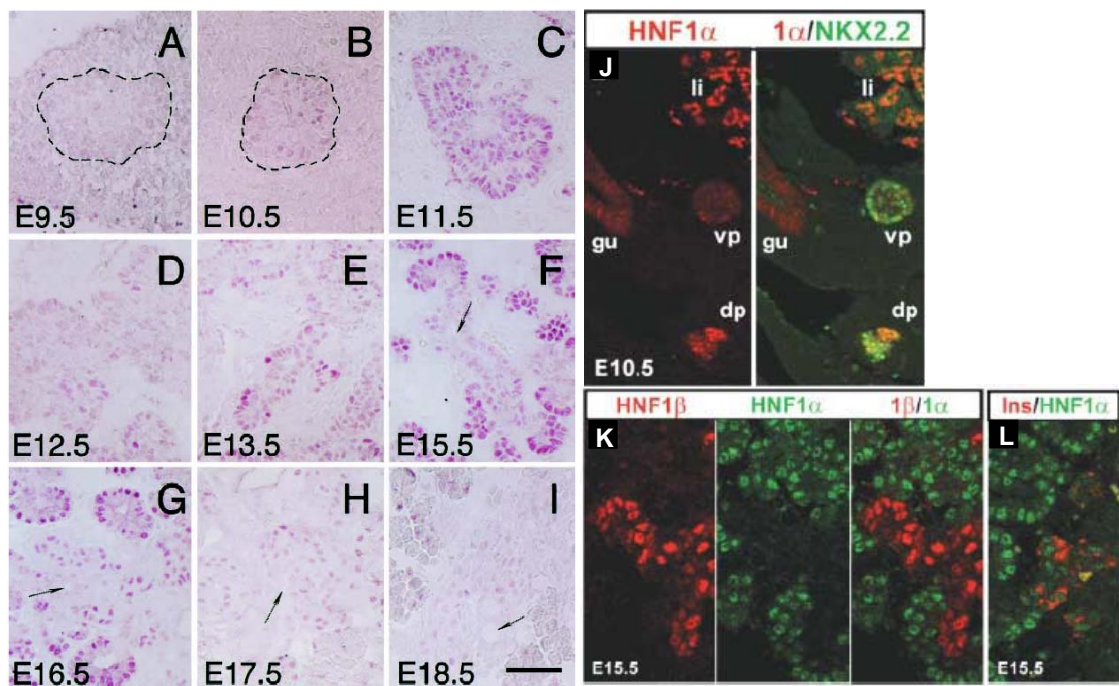
A pesar del fenotipo esencialmente diabético en pacientes MODY3, HNF1 $\alpha$  se expresa en varios tejidos. HNF1 $\alpha$  es una proteína de expresión nuclear, y se encuentra en hepatocitos, túbulos proximales renales, endotelio duodenal, estómago y páncreas tanto endocrino como exocrino (**Fig.3**) (Blumenfeld et al., 1991; Pontoglio et al., 1996; Nammo et al., 2002; Maestro et al., 2003). También se detecta expresión de HNF1 $\alpha$  en el saco vitelino (Blumenfeld et al., 1991). Sin embargo no se ha detectado expresión en células ductales u cualquier otro tipo de célula potencialmente precursora, sugiriendo que HNF1 $\alpha$  se expresa mayoritariamente en células diferenciadas (**Fig.4K**) (Cereghini 1996; Nammo et al., 2002; Maestro et al., 2003).



**Figura 3.** Patrón de expresión de HNF1 $\alpha$  en ratón adulto. Inmunotinción nuclear (en rosa) de HNF1 $\alpha$  en hígado (**A**) riñón (**B**) y páncreas (**E-L**). (**C-D**) La tinción es específica, porque no hay tinción nuclear en hepatocitos de ratón adulto HNF-1 $\alpha$ (-/-). (**E-L**) HNF1 $\alpha$  se expresa en todas las células endocrinas del páncreas. Doble inmunotinción de insulina (**E**) glucagón (**F**) somatostatina (**I**), y péptido PP (**J**) (en verde) y HNF1 $\alpha$  (**G,H,K,L**) (en rosa). Con puntas de flecha se señalan células que coexpresan la hormona y HNF1 $\alpha$ . HNF1 $\alpha$  no se expresa en ductos (flecha) Barra=40 $\mu$ m. A partir de Nammo et al, 2002

Es importante resaltar que los niveles de expresión de HNF1 $\alpha$  en las células endocrinas, y en particular las células beta, es especialmente bajo respecto al resto de tejidos, sugiriendo que la concentración de HNF1 $\alpha$  en célula beta está altamente regulada (**Fig.4G y 4L**) (Nammo et al., 2002; Maestro et al., 2003)

Se ha descrito que durante el desarrollo del hígado, riñón y páncreas, los patrones de expresión de HNF1 $\alpha$  y HNF1 $\beta$  son casi opuestos (Cereghini et al., 1988b; Cereghini et al., 1990; Ott et al., 1991; Lazzaro et al., 1992; Cereghini 1996; Maestro et al., 2003). Mientras que HNF1 $\beta$  se expresa en las células precursoras, como las células ductales del páncreas, los niveles de expresión de HNF1 $\alpha$  aumentan más bien con la diferenciación celular, desplazando HNF1 $\beta$  de la célula madura (Maestro et al., 2003). Más concretamente, en el ratón, el páncreas se especifica y diferencia a partir del endodermo definitivo a partir de E9 (Edlund 2002). HNF1 $\alpha$ , por inmunohistoquímica, ya es detectado en los primeros estadios, aunque el nivel de expresión es bajo y va incrementando progresivamente a medida que van apareciendo las células endocrinas y exocrinas, donde HNF1 $\alpha$  alcanza su plena expresión (**Fig.4A-J**) (Nammo et al., 2002; Maestro et al., 2003).



**Figura 4.** Patrón de expresión de HNF1 $\alpha$  durante el desarrollo de páncreas de ratón. **(A-I)** Inmunotinción de HNF1 $\alpha$  (en rosa) en diferentes edades embrionarias. No se detecta HNF1 $\alpha$  hasta E10.5. La expresión de HNF1 $\alpha$  va en aumento a medida que el páncreas se desarrolla, aunque el nivel de expresión es siempre mayor en el exocrino (rosetas acinares). Las flechas señalan ductos que no expresan HNF1 $\alpha$ . En E9.5 y E10.5 se delimita el esbozo pancreático con una línea discontinua. A partir de Nammo et al, 2002. **(J)** Doble inmunotinción de HNF1 $\alpha$  (rojo) y Nkx 2.2 (verde) en un embrión E10.5. HNF1 $\alpha$  se expresa más en el páncreas dorsal (d.p.) que en el ventral (v.p.) gu: intestino; li, hígado. **(K-L)** Doble tinción de HNF1 $\alpha$  (verde) y HNF1 $\beta$  (**K**,rojo) o insulina (**L**,rojo) en páncreas E15.5. HNF1 $\alpha$  no se expresa en la células ductales precursoras, HNF1 $\beta$ -positivas, sino en las células diferenciadas hormona-positiva. A partir de Maestro et al, 2003

En consonancia con estos patrones de expresión, a diferencia de los modelos deficientes para HNF1 $\beta$ , el ratón nulo para HNF1 $\alpha$  no es ni letal embrionario, ni presenta problemas graves de morfología o agénesis pancreática, sugiriendo que HNF1 $\alpha$  no juega un papel esencial en el desarrollo temprano del ratón (Pontoglio et al., 1996; Lee et al., 1998; Barbacci et al., 1999; Haumaitre et al., 2005).

En conclusión, el patrón de expresión de estas dos proteínas es compatible con el hecho de que HNF1 $\beta$  estaría implicado en la especificación e inicios de la morfogénesis, mientras que HNF1 $\alpha$  tendría una función más tardía durante el desarrollo en la diferenciación terminal y mantenimiento de las características funcionales de las células donde se expresa (Cereghini et al., 1992; Lazzaro et al., 1992).

#### **2.4. HNF1 $\alpha$ regula genes importantes para la función de la célula hepática y beta-pancreática.**

Los modelos murinos deficientes para HNF1 $\alpha$  han sido de gran ayuda para el estudio de la función de HNF1 $\alpha$  en la célula beta y por lo tanto para la comprensión de la disfunción de la célula beta existente en pacientes MODY3.

No obstante, a diferencia del humano, el ratón heterocigoto para la mutación en HNF1 $\alpha$  no es diabético y el ratón homocigoto presenta un fenotipo más complejo y severo que el humano. A pesar de las diferencias fenotípicas humano-ratón, el ratón homocigoto puede entenderse como un modelo para comprender la función de HNF1 $\alpha$  en la célula beta que a su vez es relevante para comprender mejor el fenotipo MODY3.

##### **a) Fenotipo de los modelos murinos deficientes para HNF1 $\alpha$ .**

El ratón homocigoto deficiente para HNF1 $\alpha$  (*Hnf1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*) presenta infertilidad, enanismo, disfunción hepática, problemas renales y diabetes (Pontoglio et al., 1996; Lee et al., 1998).

Los ratones *Hnf1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* pesan 40-80% menos que sus hermanos salvajes. A la segunda semana de vida, sufren caquexia progresiva, atrofia muscular y disminución de la grasa subcutánea que reduce dramáticamente su viabilidad, con un índice de mortalidad del 50% al mes de vida. El único tejido que presenta anomalías macroscópicas es el hígado con hepatomegalia (un incremento del 50% en tamaño respecto a hermanos control) y un grado variable de esteatosis (el hígado está vacuolado y es muy graso), a partir de la segunda semana de vida. Estos animales padecen una disfunción hepática severa, con elevados niveles de colesterol y transaminasas en suero, y fenilcetonuria. La disfunción hepática es el

resultado de la expresión deficiente de genes implicados en el metabolismo de los ácidos biliares, del colesterol, de los lípidos y el sistema detoxificador, entre otros. Algunos genes dependientes de HNF1 $\alpha$  destacables en hígado, confirmados por RT-PCR e inmunoprecipitación de cromatina, son *Pah*, *Cyp2j5*, albúmina,  $\alpha$ 1-antitripsina, fibrinógeno, transtiretina, *Hao3* y *Fxr* (Pontoglio et al., 1996; Shih et al., 2001; Parrizas et al., 2001; Odom et al., 2004). También padecen poliuria, glicosuria, aminoaciduria y otros síntomas típicos del Síndrome tubular renal de Fanconi. En la segunda quincena de vida, los ratones nulos para HNF1 $\alpha$  presentan una hiperglicemia crónica, resultado de una disfunción de la célula beta (Lee et al., 1998; Pontoglio et al., 1998).

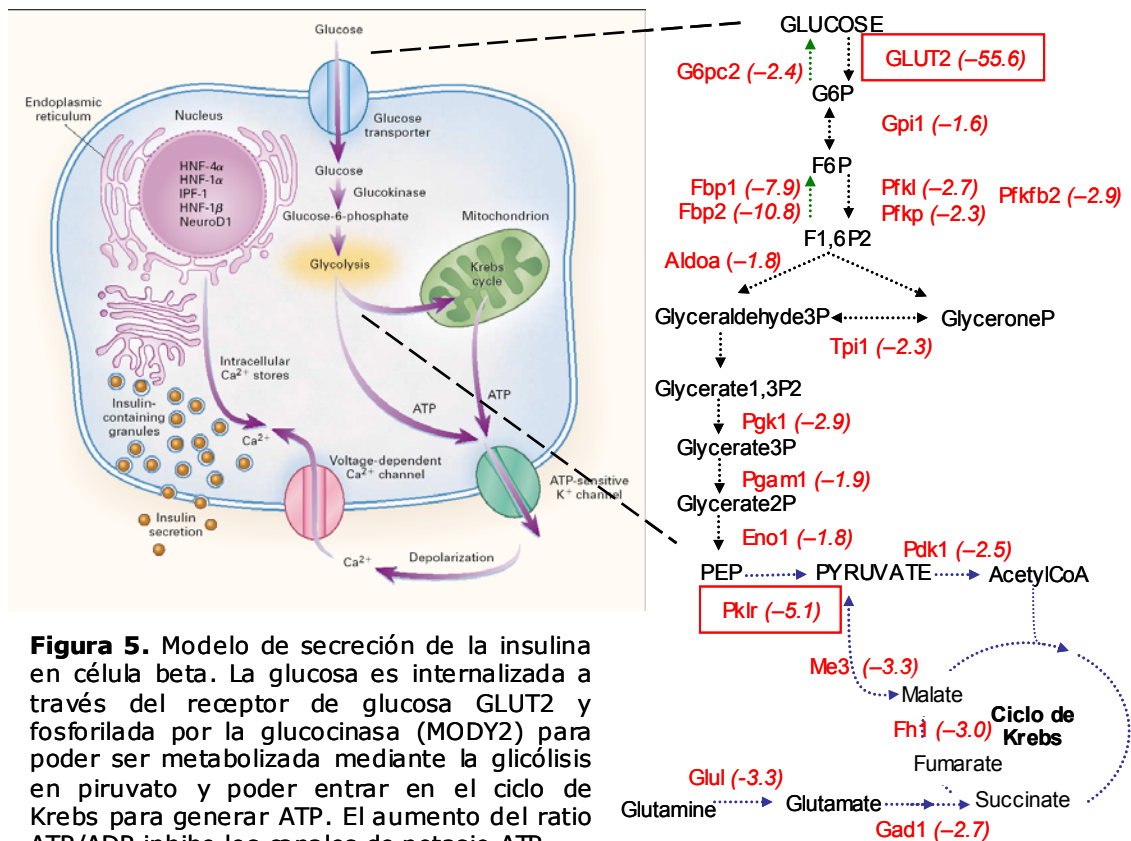
**b) HNF1 $\alpha$  regula la expresión de genes pancreáticos que explica la disfunción de célula beta.**

Los ratones nulos para *Hnf1 $\alpha$*  padecen hiperglicemia crónica por una falta de secreción de insulina adecuada a los niveles de azúcar en sangre. Aunque existen ciertas discordancias según el modelo utilizado, ni la masa de célula beta relativa al peso corporal, ni la expresión de insulina están mayormente afectadas (Pontoglio et al., 1998; Shih et al., 2001). Estudios realizados en ratones *Hnf1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* y líneas celulares derivadas de insulinomas que sobreexpresan un mutante dominante negativo de *Hnf1 $\alpha$*  han demostrado que la disfunción de la célula beta es en parte debida a un problema del metabolismo glucídico y oxidativo de la mitocondria que no es capaz de transformar la glucosa en ATP, mediante la glicólisis y el ciclo de Krebs (Wang et al., 1998; Pontoglio et al., 1998; Dukes et al., 1998). En la célula beta normal, el incremento del ratio ATP/ADP inhibe los canales de potasio dependientes de ATP, provocando la depolarización de la membrana y la entrada de calcio en la célula beta a través de los canales de calcio voltaje-dependientes. El incremento de calcio intracelular a su vez induce la secreción de insulina por exocitosis. (Deeney et al., 2000) (**Fig.5**).

Una evidencia que el problema es previo a la depolarización de la membrana, es que células beta derivadas de insulinoma (Ins-1), que sobreexpresan un mutante dominante negativo de HNF1 $\alpha$ , pueden aumentar los niveles internos de calcio en respuesta a KCl (Wang et al., 1998).

Estudios de expresión en ratones nulos para HNF1 $\alpha$  han demostrado que genes importantes para sensar la glucosa y convertirla en ATP están severamente afectados en la célula beta (Parrizas et al. 2001, Boj et al., 2001; Shih et al., 2001). Entre los genes más afectados se incluyen el transportador de glucosa *Glut2*, responsable de introducir la glucosa en la célula beta, y el enzima piruvato cinasa (*Pk1r*). Estudios realizados en nuestro grupo y otros laboratorios,

demonstraron por inmunoprecipitación de cromatina, que HNF1 $\alpha$  ocupa los promotores de estos genes y que su expresión varía en islote pero no en hepatocitos nulos para HNF1 $\alpha$ , evidenciando una función tejido-específica de HNF1 $\alpha$  en islote (Parrizas et al., 2001; Boj et al., 2001; Shih et al., 2001; Odom et al., 2004).



Así mismo, estudios Affymetrix de análisis de expresión a escala genómica en islote, realizados en nuestro laboratorio (Servitja et al., no publicado), han demostrado que existe un gran número de genes dependientes de HNF1 $\alpha$  que intervienen en el metabolismo de glucosa, como *Glut2* (*Slc2a2*), *Pklr*, *Pfk*, *Pgk1*, *Pdk1*, evidenciando que la disfunción de la célula beta por falta de HNF1 $\alpha$  está

causada por un defecto global a nivel de toda una vía metabólica, la cual cumple una función específica de célula beta, responsable de sensar los niveles de glucosa en sangre (**Fig.5**).

HNF1 $\alpha$  se expresa en otros tejidos aparte de la célula beta, que también podrían tener un papel importante en la regulación de los niveles de azúcar en sangre, e incluso indirectamente en la secreción de insulina. Las células alfa-pancreáticas secretan glucagón, la hormona antítesis de la insulina, de manera que podría influir en la función y desarrollo de las células beta. Las células enteroendocrinas del duodeno son responsables de la secreción de incretinas, como GLP1 o GIP. Las incretinas estimulan la secreción de insulina e inhiben la secreción de glucagón mediante su unión a receptores de GLP1 que se encuentran en la membrana de las células beta, alfa y delta (Thorens and Waeber 1993; Holst 1994; Kieffer and Habener 1999).

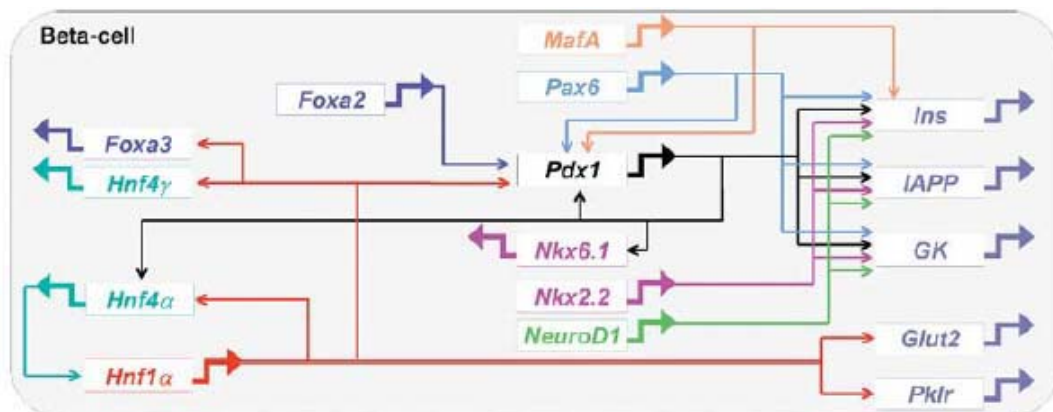
### **c) Modelos de sobreexpresión de mutantes de HNF1 $\alpha$ dominantes negativos.**

Según el modelo utilizado, existe cierta disparidad en el fenotipo deficiente para HNF1 $\alpha$ . En particular, los sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* de sobreexpresión de mutantes de HNF1 $\alpha$  con efecto dominante negativo, es decir la proteína mutada impide que la endógena salvaje sea funcional, presentan un fenotipo bastante diferente a los modelos de ablación del gen (knock-out). Por ejemplo, así como los ratones *Hnf1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* no parecen presentar anomalías morfométricas importantes en el islote (Lee et al., 1998; Pontoglio et al., 1998; Parrizas et al., 2001), varios dominantes negativos describen una reducción marcada de la masa de células beta, que afecta a la arquitectura del islote (Wang et al., 1998; Hagenfeldt-Johansson et al., 2001; Yang et al., 2002; Yamagata et al., 2002; Wobser et al., 2002). Estos estudios describen problemas de proliferación e inducción de muerte celular, que concuerdan con anomalías ultraestructurales, como estrés de retículo endoplasmático o hinchamiento de las mitocondrias. Incluso detectan una reducción en los niveles de expresión del gen de la insulina, los cuales tampoco son significativos en el ratón con una mutación nula (Wang et al., 1998; Hagenfeldt-Johansson et al., 2001; Yang et al., 2002; Yamagata et al., 2002; Wobser et al., 2002).



## 2.5. HNF1 $\alpha$ forma parte de una red transcripcional específica de célula beta.

Los islotes *Hnf1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* muestran una disminución importante de los niveles de expresión de toda una serie de factores de transcripción, como por ejemplo *Hnf3 $\gamma$* , *Hnf4 $\gamma$* , *Hnf4 $\alpha$*  y *Shp*, de gran relevancia potencial o conocida para el desarrollo y el correcto funcionamiento de la célula beta (Boj et al., 2001; Shih et al., 2001). Esta dependencia transcripcional de HNF1 $\alpha$  es específica de célula beta, ya que los niveles de expresión de estos reguladores no varían en ausencia de HNF1 $\alpha$  en hígado, duodeno o riñón (Boj et al., 2001; Shih et al., 2001). Todo esto sugiere que en la célula beta existe una compleja y única red transcripcional sensible a pequeñas variaciones de alguno de sus componentes, como el fenotipo MODY sugiere (**Fig.6**).



**Figura 6.** Red transcripcional de la célula beta. Los promotores génicos están representados como rectángulos con una flecha gruesa sobresaliendo. La unión directa de un factor de transcripción a un promotor está representada por una flecha fina. Todas las interacciones han sido demostradas *in vivo* bioquímicamente. HNF1 $\alpha$  forma parte de una red transcripcional específica de célula beta en la que están implicados otros factores MODY, como HNF4 $\alpha$  o Pdx1. A partir de Servitja and Ferrer, Diabetologia 2004

En particular, un elegante trabajo de Boj et al. demostró que existía una interdependencia, específica de islote, entre los dos genes MODY, *Hnf1 $\alpha$*  (MODY3) y *Hnf4 $\alpha$*  (MODY1). Ya se sabía con anterioridad que HNF4 $\alpha$  regula la expresión de HNF1 $\alpha$  en hígado (Tian and Schibler 1991; Li et al., 2000). La caracterización de una mutación causante de MODY3 que afecta al dominio de unión de HNF4 $\alpha$  a la región promotora de HNF1 $\alpha$ , sugería que esta regulación también podía darse en célula beta (Gagnoli et al., 1997; Hansen et al., 2002). Boj et al. descubrieron la existencia de un promotor alternativo P2 para HNF4 $\alpha$ , dependiente de HNF1 $\alpha$  y

activo sólo en célula beta, de manera que se cerraba el *loop* regulatorio HNF1 $\alpha$ -HNF4 $\alpha$  específico de célula beta (Boj et al., 2001).

Se hipotetiza que esta regulación cruzada entre los dos factores MODY podría actuar como un mecanismo de memoria celular que mantiene la expresión de los dos factores de transcripción, y consecuentemente de todos sus genes diana en las células beta diferenciadas. Otra posible regulación cruzada sería entre Pdx1 (MODY4) y HNF1 $\alpha$  (MODY3), ya que un estudio sugiere que los islotes *Hnf1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* tienen reducida la expresión de Pdx1 y los islotes *Pdx1<sup>+/-</sup>* tienen reducida la expresión de HNF1 $\alpha$  (Shih et al., 2001; Shih et al., 2002).

Estas interdependencias génicas, específicas de célula beta, sugieren que los niveles de expresión de cada uno de estos factores de transcripción deben estar altamente regulados, ya que pequeñas fluctuaciones, como la pérdida de la expresión de un alelo, pueden desestabilizar el sistema causando diabetes.

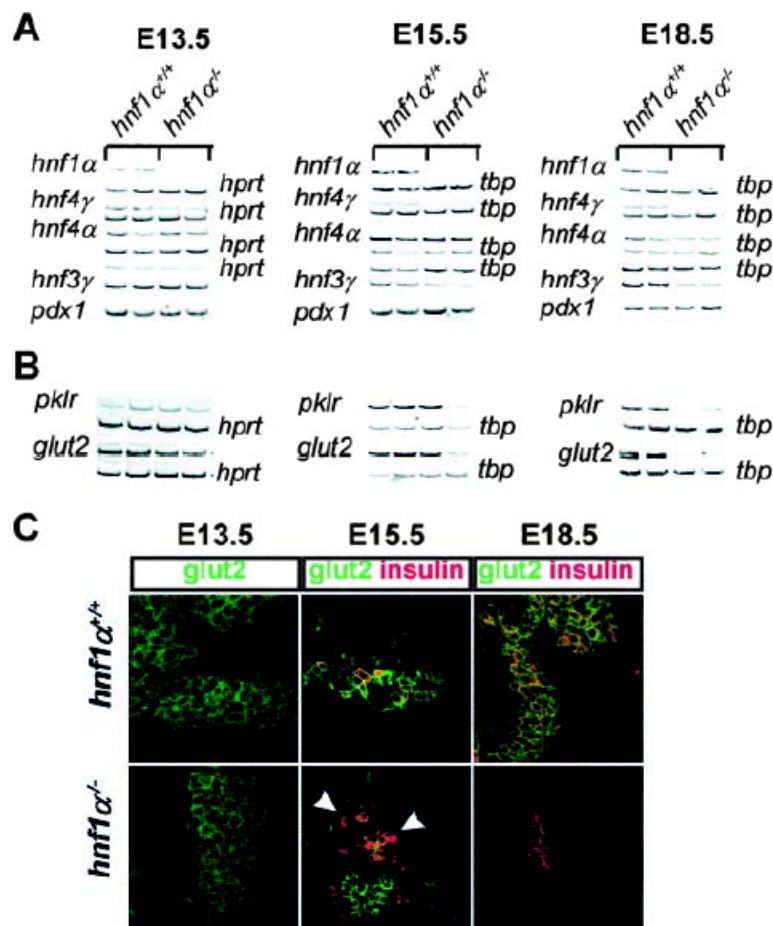
## **2.6. Posible rol epigenético de HNF1 $\alpha$ durante la diferenciación final de la célula beta**

La función de HNF1 $\alpha$  parece iniciarse en un momento determinado del desarrollo embrionario. De acuerdo con las observaciones de Boj et al., la dependencia de los genes diana de HNF1 $\alpha$ , tales como *Glut2*, *HNF4 $\alpha$* , *HNF3 $\gamma$*  y *HNF4 $\gamma$* , sólo aparece inmediatamente después de que la célula beta se diferencie (**Fig.7**). Esto plantea la posibilidad de que HNF1 $\alpha$  pueda tener un rol epigenético en este estadio, marcando los genes propios de célula beta madura y manteniéndolos activos para conservar las características diferenciales propias del linaje de célula beta. (Boj et al., 2001).

Actualmente disponemos de algunos conocimientos acerca de cómo HNF1 $\alpha$  regula la cromatina de sus genes diana. Se sabe que HNF1 $\alpha$  recluta directamente a la zona promotora de sus genes diana modificadores de cromatina como las histona acetiltransferasas (HAT) CBP y P/CAF, los cuales son potencialmente responsables de la hiperacetilación de las colas de histona de sus dianas (Soutoglou et al., 2000; Soutoglou et al., 2001a; Parrizas et al., 2001). La hiperacetilación modifica la conformación de la cromatina de los genes y crea superficies que favorecen la unión de proteínas que en conjunto promueven la activación transcripcional (Agalioti et al., 2000; Agalioti et al., 2002; Pokholok et al., 2005; Gorisch et al., 2005). En concordancia con el reclutamiento de reguladores de cromatina, en ausencia de HNF1 $\alpha$ , los genes diana están hipoacetilados y metilados en el DNA, cerrando la conformación de la cromatina e impidiendo la unión de otros

coactivadores a la región promotora y por lo tanto impidiendo la transcripción (Pontoglio et al., 1997; Parrizas et al., 2001).

Se piensa que las modificaciones de histonas y metilación de DNA no sólo tienen una función reguladora de la activación transcripcional a corto plazo, sino que además pueden participar en el mantenimiento de la memoria celular marcando positiva o negativamente los genes de una célula epigenéticamente. Ello plantea la pregunta de cuál es el posible papel de HNF1 $\alpha$  en este tipo de regulación.



**Figura 7.** Rol regulativo de HNF1 $\alpha$  durante el desarrollo. **(A-B)** Análisis por RT-PCR de páncreas total de ratón *hnf1α<sup>+/+</sup>* y *hnf1α<sup>-/-</sup>*, a partir de las edades embrionarias indicadas, de genes regulados por HNF1 $\alpha$ . La expresión de *hnf4α*, *hnf4γ*, *hnf3γ*, *glut2* y *pklr* depende de HNF1 $\alpha$  a partir de la aparición de las primeras células pancreáticas diferenciadas, en E15.5. **(C)** Doble inmunotinción de Glut2 (en verde) e insulina (en rojo) en páncreas total de *hnf1α<sup>+/+</sup>* y *hnf1α<sup>-/-</sup>* de las edades embrionarias indicadas. A partir de E15.5 se empiezan a encontrar las primeras células beta diferenciadas insulina-positivas que no expresan Glut2 en ausencia de HNF1 $\alpha$  (marcadas con una flecha). En E18.5 la dependencia génica de HNF1 $\alpha$  es total, sugiriendo un rol regulador epigenético de HNF1 $\alpha$  a partir de la diferenciación terminal de la célula beta. A partir de Boj et al, PNAS 2002.

### 3. La regulación de la transcripción génica.

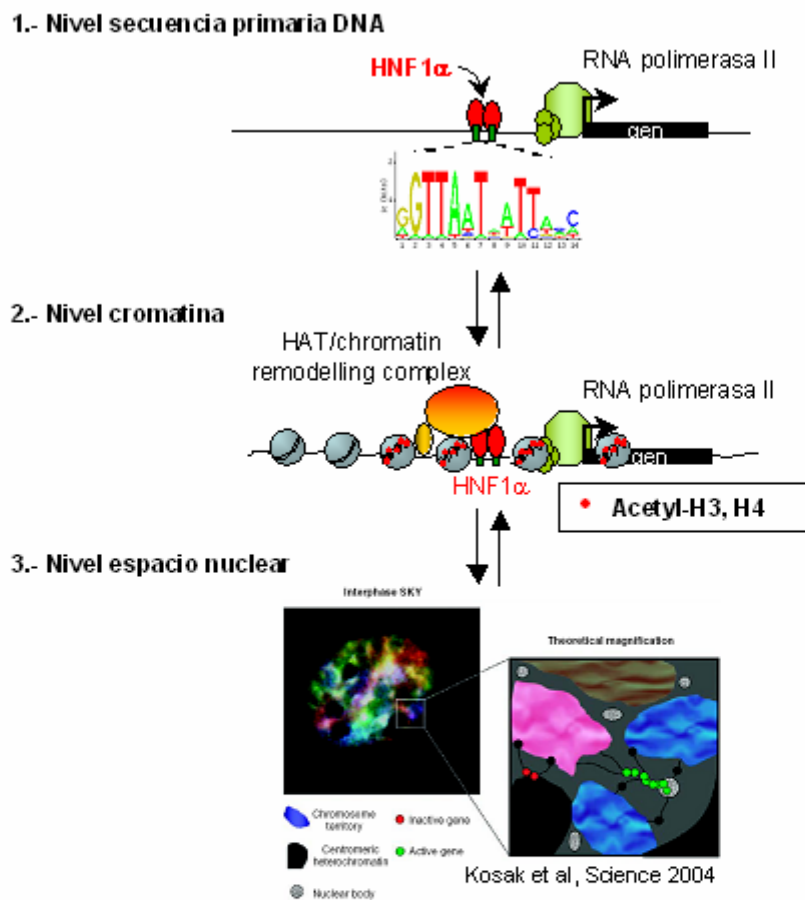
Gracias a la secuenciación del genoma humano, se ha podido estimar que disponemos de unos 20,000-25,000 genes codificantes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), y un número aún indeterminado de transcritos no codificantes. Así mismo, se ha observado que el porcentaje de DNA codificante es minoritario, y cuanto más complejo es el organismo, mayor es el porcentaje de DNA no codificante presente en el genoma (Venter et al., 2001). En los últimos años se ha empezado a vislumbrar parte del rol regulador de este DNA no codificante, revelando la gran complejidad de la organización y regulación de nuestro genoma.

La transcripción del genoma eucariota está regulada por diferentes niveles jerárquicos, integrados e interdependientes (**Fig.8**). A fin de simplificar su discusión, pueden distinguirse el nivel de la secuencia primaria de DNA, un nivel de la estructura de cromatina y por último un nivel en el que interviene la organización nuclear (van Driel et al., 2003).

#### 3.1. Regulación de la transcripción a nivel de la secuencia primaria de DNA

El DNA está compuesto por secuencias transcritas y regiones intra- e intergénicas que contienen una amplia variedad de secuencias reguladoras de la transcripción y del plegamiento en conformación secundaria y terciaria de la fibra de cromatina. Esta distinción es en realidad compleja, ya que si bien antiguamente se pensaba que la mayor parte de las secuencias transcritas codificaban secuencias de proteínas, en los últimos años se ha hecho patente que una importante fracción del genoma codifica transcritos no codificantes, muchos de los cuales tienen a su vez un papel regulador de la expresión génica (Costa 2006; Mattick et al., 2006).

La regulación de la transcripción a nivel de la secuencia primaria de DNA consta de dos elementos esenciales, las secuencias reguladoras de DNA (entre ellas los llamados *enhancers/silencers* y promotores), y las proteínas con dominios de unión a DNA (factores de transcripción secuencia-específicos) que reconocen estas secuencias y se unen específicamente a ellas. El objetivo final es el reclutamiento y activación de la maquinaria transcripcional, cuyo miembro principal es la RNA polimerasa II (van Driel et al., 2003; Kadonaga 2004).

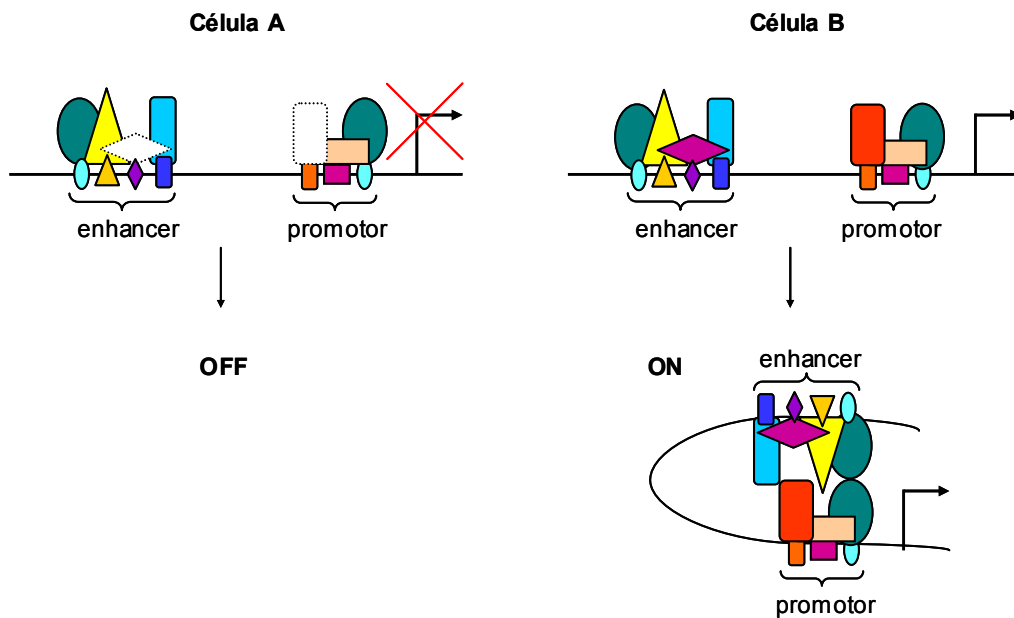


**Figura 8.** La transcripción está regulada a diferentes niveles jerárquicos íntimamente relacionados entre ellos. En un primer nivel, los factores de transcripción, como HNF1 $\alpha$  (óvalos rojos), reconocen y se unen específicamente a una secuencia reguladora consenso de DNA (rectángulo verde y secuencia ATGC) en la región promotora de un gen (rectángulo negro). Estos factores reclutan modificadores de cromatina, por ejemplo los HAT (en naranja), que en un segundo nivel de regulación, alteran la conformación de la cromatina y la vuelven apta para la transcripción (reclutamiento del complejo de la RNA polimerasa II, hexágonos verdes). Últimamente se ha visto que estas modificaciones de cromatina afectan el posicionamiento de los genes en el núcleo. Un nuevo nivel de regulación está surgiendo, la localización génica respecto a dominios nucleares (en rosa, azul, marrón o negro), tales como la heterocromatina centromérica (dominio negro).

### a) Las secuencias reguladoras de DNA.

Los elementos de DNA reguladores de la transcripción suelen encontrarse bien en las proximidades del inicio de transcripción en la región promotora, bien en una región más distal, en cuyo caso son conocidos con términos como *enhancer*, *silencer*, o *locus control region* (**Fig.9**). Estas secuencias pueden estar altamente conservadas entre diferentes organismos. El sustrato básico de estos elementos lo constituyen motivos de secuencia de típicamente 6-20 pares de base que son reconocidos selectivamente por proteínas específicas (van Driel et al., 2003; Kadonaga 2004). El elemento de unión de HNF1 $\alpha$  mencionado previamente es un

ejemplo clásico (Tronche et al., 1997). Frecuentemente, diferentes motivos de DNA reconocidos por distintas proteínas están situados en proximidad, formando en conjunto un elemento de secuencia regulador (van Driel et al., 2003; Kadonaga 2004).



**Figura 9.** Las secuencias de DNA están agrupadas en *clusters*, constituyendo las regiones reguladoras del gen (enhancer y promotor). Cada secuencia reguladora (figuras geométricas pequeñas) es reconocida específicamente por un factor de transcripción determinado (figuras más grandes). Un gen se expresa si la célula dispone de la combinación de factores de transcripción necesarios. Como a la célula A le faltan 2 factores (en blanco con línea discontinúa), el gen no se puede expresar (OFF). Se han descrito interacciones proteína-proteína entre los factores de transcripción que se unen a regiones reguladoras distales, de manera que se forma un complejo enhancer-promotor estable, indispensable para la activación de la maquinaria transcripcional.

### b) Los factores de transcripción secuencia-específicos.

Los factores de transcripción secuencia-específicos son modulares, con un dominio de unión al DNA de estructura característica que los define, uno o varios dominios de activación, y según el factor, dominios de dimerización y regulación. Ejemplos de familias de factores de transcripción son la familia homeodominio, a la que pertenece HNF1 $\alpha$ , *helix-turn-helix*, *zinc finger*, *leucine zipper*, *helix-loop-helix*. La unión del factor de transcripción a su diana inducirá el reclutamiento de toda una serie de coactivadores y remodeladores de cromatina que modificarán la conformación de la cromatina y permitirán la unión y activación de la maquinaria de la RNA polimerasa II (Ptashne et al, 1997; Kadonaga 2004) (**Fig.8**). Se han llegado a describir interacciones proteína-proteína entre factores de transcripción unidos al inicio de transcripción y a regiones reguladoras de DNA distales (enhancer-

promotor separados por varias miles de pares de base), de manera que se forma un complejo enhancer-promotor estable, indispensable para la activación de la maquinaria transcripcional (**Fig.9**) (Thanos et al, 1995; Hatzis and Talianidis 2002).

**c) La combinación de factores de transcripción secuencia-específicos otorgan especificidad a la expresión génica**

Estudios *in vitro* sugieren que los factores de transcripción, por sí solos, no definen la especificidad transcripcional que cabría esperar. La especificidad en la expresión de un determinado gen se basaría más bien en la existencia de múltiples secuencias de unión a DNA, agrupadas en las regiones reguladoras, de manera que sólo en presencia de la combinación de factores de transcripción adecuada, actuando la mayoría de veces en sinergismo, podría darse la expresión del gen (Kadonaga 2004). Así pues, el conjunto de secuencias de DNA que integran la región promotora de un gen determina si este gen puede o no transcribirse en función de si la célula dispone a su vez de todos los factores de transcripción secuencia-específicos necesarios para unirse al DNA y reclutar y activar la maquinaria de transcripción al nivel de ese gen (**Fig.9**).

Esta regulación a nivel de la secuencia primaria de DNA implica que los factores de transcripción secuencia-específicos transmiten la información genética desde las secuencias de DNA hasta la maquinaria de transcripción, representando un grado más de control de la expresión del genoma eucariota. Conocer la composición de secuencias reguladoras de DNA de un gen significaría poder determinar cuando y donde va a expresarse ese gen.

**d) Los genes están distribuidos en el genoma de manera no aleatoria**

Otra relación destacable entre la secuencia primaria del DNA y la regulación transcripcional viene dada por la existencia de agrupaciones no aleatorias de genes a lo largo del genoma.

Los genes parecen agruparse según el grado de expresión, la función celular o el momento de expresión durante el desarrollo. En algunos casos, los genes están regulados por una misma región reguladora, o LCR (región controladora de locus), que asegura la expresión coordinada de los genes integrantes del grupo. Ejemplos de esta organización genómica a nivel de la secuencia primaria son los genes Hox, los genes de histonas, las interleucinas (IL-5, -13 y -14) y las  $\alpha$ - y  $\beta$ -globina (Li et al., 2000; Cai et al, 2006).

Por otra parte, también se ha visto que el genoma humano está organizado en regiones ricas y pobres en genes con unas características cromatínicas y

citogenéticas determinadas. (Gilbert et al., 2004). Las regiones ricas en genes tienden a replicar antes, tienen una conformación de cromatina más abierta y forman una estructura citológica más laxa (las bandas T). Sin embargo, las regiones pobres en genes son más compactas y pueden separarse de las regiones ricas en genes por densidad (Gilbert et al., 2004). Estas diferencias estructurales al nivel de la fibra de cromatina influyen en la organización nuclear del genoma, de manera que regiones ricas en genes y por lo tanto más decondensadas tienden a formar dominios situados fuera de los territorios cromosómicos, mientras que las regiones pobres en genes tienden a localizarse más en la periferia nuclear (Gilbert et al., 2004; Shopland et al., 2006). Estas diferencias en compactación y distribución nuclear son independientes de la actividad génica, aunque se postula que los dominios ricos en genes de conformación abierta podrían crear un ambiente más favorable a la transcripción y por lo tanto que esta organización genómica podría reflejar una presión evolutiva para mantener ciertos genes agrupados en los cromosomas

### **3.2. Regulación de la transcripción a nivel de la cromatina.**

Una de las funciones de los factores de transcripción es reclutar modificadores y remodeladores de histonas, que modifican la cromatina de manera que se vuelve apta para la transcripción. Estas modificaciones de histona son muy diversas y también siguen una serie de reglas complejas determinantes para la transcripción, añadiendo otro nivel de información al genoma, independiente del código genético en sí.

#### **a) La cromatina, la configuración secundaria del DNA.**

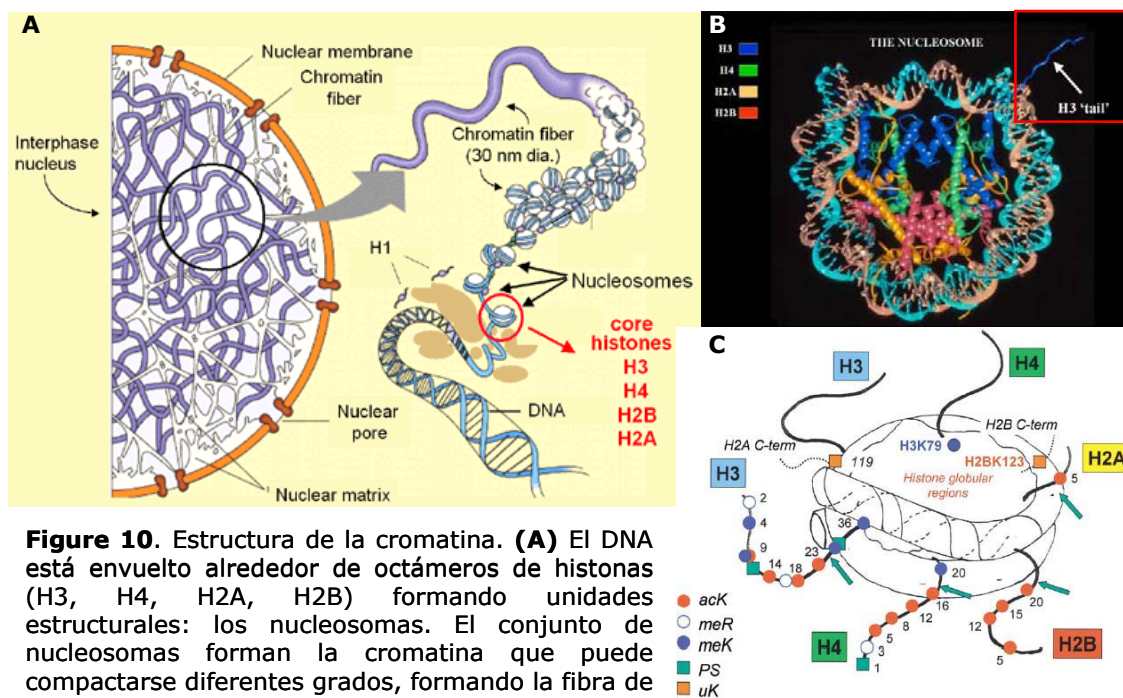
El DNA se pliega alrededor de proteínas nucleares, llamadas histonas, conformando una estructura secundaria, la cromatina. En un principio se creía que el único rol de las histonas era estructural para compactar el DNA para que quepa en el núcleo y protegerlo de daños externos, como los rayos UV. Más adelante se descubrió que estas proteínas también tienen un rol regulador dinámico esencial para procesos biológicos, tales como la reparación de DNA, la mitosis, la recombinación, la replicación y la transcripción (Bradbury 1992; Grunstein 1997; Zhang and Reinberg 2001).

Las histonas son una de las proteínas eucariotas más conservadas. El DNA da 2 vueltas (147bp) alrededor de la parte C-terminal globular de un octámero de histonas (2 de cada histona H2A, H2B, H3 y H4), mientras que la parte N-terminal que forma la llamada cola de la histona, protruye al exterior y queda accesible para



interaccionar con otras proteínas (Pruss et al., 1995). Las colas de histona son la región de estas proteínas que sufren más modificaciones covalentes post-traduccionales (**Fig.10b-c**). Estas modificaciones han resultado ser determinantes para la estructura de la cromatina y para la regulación de la transcripción.

Cada octámero de histonas envuelto por DNA corresponde a una subunidad básica de cromatina, llamado nucleosoma. Los nucleosomas están unidos entre sí por *DNA linker* (de unión). Existe una estructura característica de nucleosomas espaciados de forma más o menos regular por DNA linker formando "un collar de perlas", que es la fibra de cromatina de 11 nm. El DNA linker es el más accesible a proteínas como DNAsas y factores de unión a DNA. Además de las histonas del núcleo o *core*, existe la histona H1 que contacta aproximadamente 20 pb adicionales del nucleosoma. Al menos *in vitro*, los nucleosomas pueden adquirir un nivel superior de compactación formando una fibra de 30nm. La fibra de 30nm puede plegarse a su vez adoptando configuraciones terciarias con diferentes grados de compactación hasta el máximo nivel que es el cromosoma metafásico (100-130nm) (**Fig. 10a**) (Felsenfeld and Groudine 2003).



**Figure 10.** Estructura de la cromatina. **(A)** El DNA está envuelto alrededor de octámeros de histonas (H3, H4, H2A, H2B) formando unidades estructurales: los nucleosomas. El conjunto de nucleosomas forman la cromatina que puede compactarse diferentes grados, formando la fibra de cromatina, para entrar en el núcleo.

**(B)** Estructura 3D de un nucleosoma. La doble hélice de DNA envuelve la parte globular de las histonas (azul, H3; verde, H4; amarillo, H2A; rojo, H2B), mientras que las colas sobresalen para ser modificadas (recuadro rojo). **(C)** Representación esquemática de un nucleosoma, mostrando los diferentes tipos y posiciones de las modificaciones de histonas que puede tener cada cola. El círculo rojo es la acetilación de lisinas (acK), el círculo blanco la metilación de argininas (meR), el círculo azul la metilación de lisinas (meK), el cuadrado verde la fosforilación de serinas (PS) y el cuadrado amarillo la ubiquitinación de lisinas (uK). A partir de la página web del Dr. D.Allis y Turner, Cell 2002.

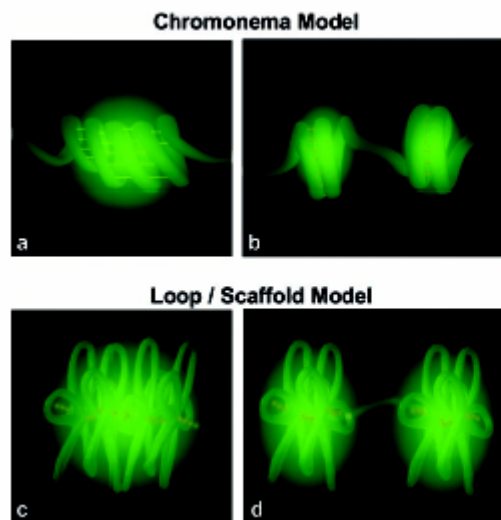
**b) La cromatina está organizada en diferentes grados de compactación altamente dinámicos.**

Existe evidencia de que la cromatina nuclear en interfase puede exhibir un grado de compactación altamente dinámico y variable según la región y tipo celular. Mientras que en ausencia de compactación la distancia entre dos puntos separados por 1000 bp sería de 340nm (3 bp/nm), se han descrito distancias interlocus en núcleos en interfase que muestran grados de compactación de 1:45 (135 bp/nm) en levadura y de 1:100 (300 bp/nm) o 1:400 (1200 bp/nm) en mamífero en cromatina activa e inactiva, respectivamente. (Zink et al, 2004; Bystricky et al., 2004). A modo de referencia, la fibra de 30 nm representa un grado de compactación de 1:40, de modo que dos puntos separados por 10,000 bp estarían situados a 85 nm.

Por otra parte se sabe que la fibra de cromatina no es estática. Estudios realizados en levadura demostraron que los genes se mueven en el espacio nuclear siguiendo movimientos oscilatorios dependientes de energía (Heun et al., 2001). La mayoría de los genes no se desplazan más de 200 nm y pueden alcanzar hasta 500-600 nm, representando 1/3 del diámetro del núcleo de una levadura (Heun et al., 2001). Estudios en células humanas confirmaron un desplazamiento génico similar de entre 500 y 1500 nm, representando 1/10-1/25 del diámetro total (Chubb et al., 2003). Teniendo en cuenta que el núcleo de mamífero es 5-10x veces mayor que el de levadura y que el coeficiente de difusión es 4x veces menor, los genes de mamífero parecen estar más restringidos en el espacio nuclear (Chubb et al., 2003). Sin embargo en ambas especies, la movilidad de un locus está afectada por su localización nuclear y actividad génica. En efecto, los genes situados en la periferia del núcleo o asociados al nucleolo, tanto en levaduras como mamíferos, muestran una menor capacidad de movimiento. (Heun et al., 2001; Chubb et al., 2003). Así pues, un locus activo puede desplazarse hasta 1000 nm, mientras que un locus inactivo no se mueve más de 200 nm del punto de referencia (Zink et al, 2004; Müller et al, 2004)

La forma exacta en que se organiza y pliega la cromatina en dominios de orden superior es controvertida (**Fig.11**) (Horn and Peterson, 2002; Muller et al., 2004). Existen diferentes modelos de plegamiento de la fibra de cromatina. El modelo "loop/scaffold" se basaría en la existencia de un andamio proteico (*scaffold*) que sirve de base para que la fibra de cromatina se pliegue formando lazos (*loops*) a su alrededor. El modelo del cromonema, sin embargo, propone que la fibra de cromatina se plegaría sobre sí misma de forma helicoidal dando lugar a diferentes grosores de fibra en función del grado de plegamiento sobre sí misma. Por último,

el modelo "random walk" postula que la fibra de cromatina iría tanteando aleatoriamente el espacio nuclear y agrupándose con las regiones cromosómicas de mayor afinidad formando así los dominios de orden superior. (Müller et al, 2004). Apoyando este último modelo, se ha descrito que las regiones ricas en genes y las regiones totalmente pobres en genes (desiertos génicos), a pesar de estar intercaladas en el genoma, se distribuyen diferencialmente en el núcleo, de manera que las regiones ricas en genes se agrupan entre ellas y los desiertos génicos se asocian juntos mirando siempre hacia la periferia (Shopland et al, 2006).

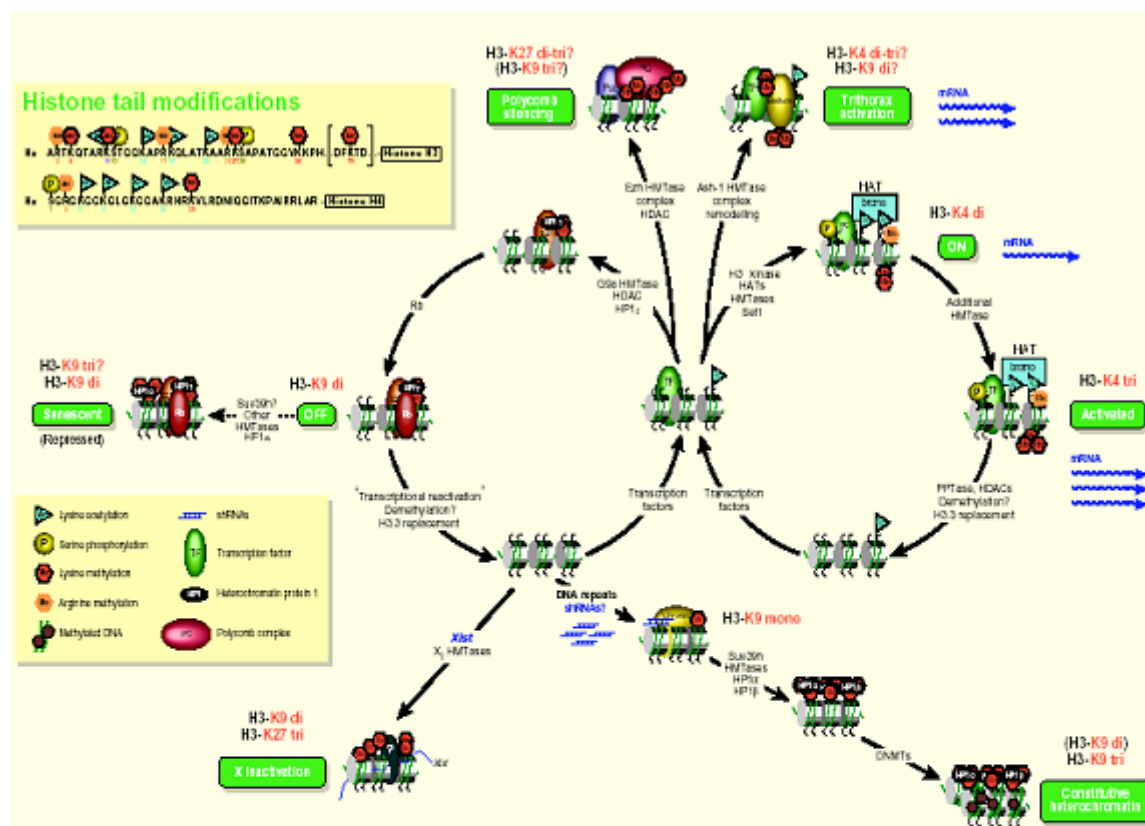


**Figura 11.** Modelos de plegamiento de la fibra de cromatina. El modelo del cromonema propone un plegamiento de la fibra de cromatina sobre sí misma helicoidalmente dando lugar a diferentes grosores de fibra. El modelo del "loop/scaffold" se basa en la existencia de un andamio proteico (en el centro) alrededor del cual la fibra de cromatina se pliega formando lazos. A partir de Müller et al., 2004

### c) El código de las histonas.

Las histonas pueden acetilarse, metilarse, fosforilarse, ubiquitilarse o sumoilarse en determinados residuos aminoacídicos. El hallazgo de los enzimas que inducen cambios de este tipo ha permitido comprender el papel decisivo que juegan muchas de estas modificaciones en la regulación transcripcional (Struhl 1998). Se sabe que pueden tener repercusión en la compactación de la cromatina, disposición de los nucleosomas y por consiguiente en la accesibilidad del DNA para ser unido por factores de transcripción secuencia-específicos (**Fig.10C**) (Krajewski et al., 1998). La acetilación de histonas puede neutralizar cargas positivas y la fosforilación puede añadir cargas negativas al polímero de cromatina provocando cambios electrostáticos que influyen en la estructura y estado de condensación de la cromatina (Clark et al., 1993; Wei et al., 1999). Las modificaciones de histonas, como la metilación de lisinas y argininas, la sumoilación de H4, o la acetilación de lisinas, también representan puntos de atracción e interacción proteína-proteína de coreguladores que influyen en el nivel de compactación de la cromatina y en la actividad génica (Fischle et al., 2003; Shilo and Eisenman 2003; Wysocka et al., 2005) (**Fig.12**).

Estudios *in vitro* han demostrado que las modificaciones de histona interaccionan entre ellas, de manera que se pueden inhibir o actuar sinérgicamente. Por ejemplo, la fosforilación en la serina 10 de la histona H3 favorece la acetilación de las lisinas 9 y 14 de la histona H3 (marcas activadoras), mientras que inhibe la metilación de la lisina 9 (marca típicamente represora) (Zhang and Reinberg 2001). A su vez la hiperacetilación de H3 favorece la metilación de H3-Lys4, adoptando así la cromatina su configuración óptima para reclutar coactivadores y factores de transcripción. Por el contrario, la metilación en H3-Lys9 y H4-Lys20 inhibe la hiperacetilación de las dos histonas cerrando la conformación de la cromatina a un estado característico de la heterocromatina constitutiva (Zhang and Reinberg 2001).



**Figura 12.** El código de las histonas. Cada estado de la cromatina (especificado en los recuadros verdes) viene definido por una combinación específica de modificaciones de histona (triángulo azul, acetilación de lisinas; círculo amarillo, fosforilación de serinas; hexágono rojo, metilación de lisinas; hexágono naranja, metilación de argininas). Estas modificaciones reclutan a su vez una combinación de coreguladores (rectángulo azul celeste, HAT; óvalo negro, HP1; óvalo rosa, complejo polycomb), DNA metiltransferasas (DNA metilado, hexágonos marrones) y remodeladores de cromatina que afectan a la conformación de la cromatina influyendo en el estado de activación del gen. Las modificaciones de histona interaccionan entre ellas, bien sinérgicamente como en el caso de la acetilación de H3 y la metilación de H3-Lys4, bien antagonísticamente como en el caso de la metilación de H3-Lys9 y la acetilación de H3. Estas modificaciones son más o menos reversibles, de manera que un gen puede alternar estados ON y OFF, o estabilizarse en un estado concreto, como la heterocromatina constitutiva. A partir de Lachner et al, 2002 J Cell Sci.

Una misma modificación puede tener diferentes consecuencias. Por ejemplo la fosforilación en H3-Ser10 está implicada en la condensación de los cromosomas durante la mitosis, pero también en la apertura de la cromatina para la transcripción (Wei et al., 2000). Se ha propuesto que es la combinación de determinadas modificaciones de histona, junto con el reclutamiento específico de los coreguladores, los que determinan la respuesta concreta de un gen en una célula concreta (**Fig.12**). Sumado al hecho que, a diferencia de la acetilación y fosforilación, la metilación de histona, al igual que la de DNA, es posiblemente una marca muy estable, se postuló que las modificaciones de histona representan un código, el código de las histonas, que ayuda a mantener el patrón de expresión de la célula diferenciada, también conocido como la memoria celular (Strahl and Allis 2000; Jenuwein and Allis 2001; Turner 2002).

Uno de los motivos por el cual se ha considerado que la metilación de histonas es una marca estable es que no se conocía ninguna actividad demetilasa. Se hipotetizaron diferentes estrategias para eliminar esta marca, como por ejemplo la sustitución de histonas o la escisión peptídica de la cola de histona metilada. Sin embargo, recientemente se han descubierto los primeros enzimas demetiladores de histonas, LSD1, los miembros de la familia Jumonji, o PAD (Shi et al., 2004; Wang et al., 2004; Metzger et al., 2005; Chen et al., 2006), demostrando que esta marca también es reversible y dinámica.

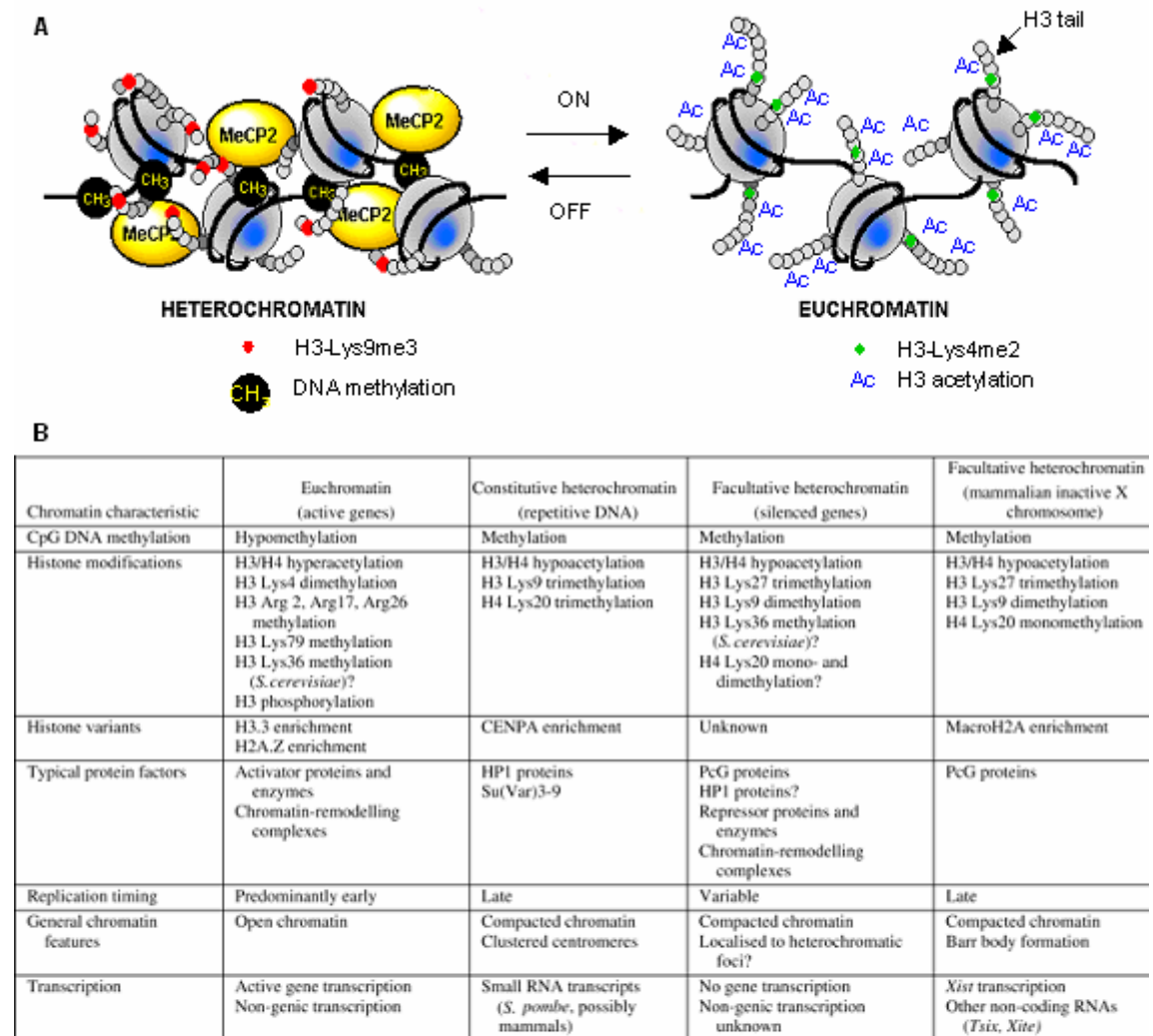
#### **d) Heterocromatina vs eucromatina.**

Existen dos grandes tipos de conformación de cromatina, la heterocromatina y la eucromatina. Cada una de ellas está definida por una combinación de modificaciones de histona, reconocida por proteínas con dominios de unión altamente específicos para estas modificaciones (bromodominios y cromodominios) (**Fig.13B**). Estos cofactores (activadores, represores y remodeladores de cromatina) serán los efectores que otorguen la conformación y características de la cromatina (Daniel et al., 2005).

##### *La eucromatina o cromatina transcripcionalmente activa.*

La eucromatina engloba las regiones del genoma que se transcriben activamente o que potencialmente pueden o van a transcribirse. Los genes activos se caracterizan por tener las lisinas de las histonas H3 y H4 acetiladas a lo largo de todo el gen (Roth et al., 2001). Esta hiperacetilación se hipotetiza que abre la estructura de la cromatina por neutralización de cargas eléctricas, pero también sirve como superficie para la unión de remodeladores de cromatina que desplazan

los nucleosomas a lo largo del DNA, volviendo las secuencias reguladoras de unión a DNA accesibles a factores de transcripción (Eberharther and Becker 2002) (**Fig.12 y 13**).



**Figura 13.** Características generales de la eucromatina, heterocromatina constitutiva y heterocromatina facultativa (cromosoma X inactivado y genes silenciados). **(A)** Representación esquemática de la heterocromatina y la eucromatina. La heterocromatina está altamente compactada, metilada en el DNA y H3-Lys9 e hipoacetilada. Por el contrario, la eucromatina es más laxa y está hiperacetilada y metilada en H3-Lys4. **(B)** Tabla resumen con las principales características de la eucromatina y los diferentes tipos de heterocromatina. A partir de Arney y Fisher, 2004 J Cell Scs

Otra propiedad que puede observarse en la eucromatina es la metilación de ciertos residuos de arginina y lisina. La metilación en argininas, junto con la fosforilación en H3-Ser10, son marcas que han sido asociadas a la transcripción de genes inducibles, dependientes de receptores nucleares, como el de estrógenos (Cheung et al., 2000; Stallcup 2001; Nightingale et al., 2006). En algunos casos, la metilación en la arginina H4-R3 parece preparar el gen para la transcripción, de manera que sólo necesita ser hiperacetilado para inducirse rápidamente (Huang et

al., 2005; Balint et al., 2005). Este tipo de activación génica requiere que ambas marcas, metilación en arginina y acetilación, sean reversibles y altamente regulables (Katan-Khaykovich and Struhl 2002; Cuthbert et al., 2004).

La metilación en lisinas, por el contrario, es una marca considerada más general y estable (Lachner et al., 2003). La metilación en la lisina 4 (H3-Lys4) es la forma de metilación de lisinas de histona más claramente asociada con actividad transcripcional (**Fig.12 y 13**). Se conocen diferentes complejos metiladores de H3-Lys4, como TrxG en *Drosophila* o MLL1 en mamíferos (Poux et al., 2002; Dou et al., 2005). Tal como se menciona anteriormente, más recientemente se han identificado enzimas cuya actividad catalítica estriba en desmetilar H3-Lys4 (Shi et al., 2004; Huang et al. 2006). Existen tres niveles de metilación, mono-, di- y trimetilación, que se distribuyen diferentemente a lo largo de los genes transcripcionalmente activos. La dimetilación de H3-Lys4 (H3-Lys4me2) se encuentra más o menos a lo largo de todo el gen, con un pico en la región promotora proximal del inicio de transcripción y el primer exón, mientras que H3-Lys4me3 está generalmente muy restringida al inicio de transcripción y suele darse cuando el gen está plenamente activo (Santos-Rosa et al., 2002; Schubeler et al., 2004; Pokholok et al., 2005). Por ello se hipotetiza que la trimetilación es una marca más determinante y decisiva para la transcripción. Se ha propuesto que la dimetilación en H3-Lys4 podría mantener el gen en un estado de transcripción basal, y la trimetilación de H3-Lys4, junto con la hiperacetilación de las histonas induce la activación intensa del gen (**Fig.12**) (Santos-Rosa et al., 2002; Schubeler et al., 2004; Pokholok et al., 2005).

Existe probablemente una interrelación estrecha entre la metilación y acetilación de histonas. La acetilación de las histonas es un fenómeno altamente dinámico que depende del equilibrio entre la acetilación mediada por histona acetiltransferasas (HATs) y la desacetilación mediada por histona desacetilasas (HDAC) (Katan-Khaykovich and Struhl 2002). Cualquier factor que rompa este equilibrio será determinante para la expresión final del gen. Los factores de transcripción, como HNF1 $\alpha$ , la propia acetilación de histonas y la metilación en H3-Lys4 son posibles reclutadores de HATs (Soutoglou et al., 2001b; Martin et al., 2006). Conviene mencionar de todos modos que esta relación es compleja, ya que de la misma manera que la metilación en H3-Lys4 puede reclutar HATs, complejos remodeladores de cromatina (NURF) o coactivadores (WDR5) que influyen en la actividad transcripcional (Wysocka et al, 2005; Wysocka et al., 2006), también puede interferir en el reclutamiento de complejos inhibidores de la transcripción como HDAC (NurD) y HMTases de H3-Lys9 (Suv39h1) (Nishioka et al., 2002)

También se ha descrito que las regiones codificantes de los genes activos están enriquecidas en H2B ubicuitilada y lisinas metiladas en H3-Lys36 y H3-Lys79. Se hipotetiza que estas marcas son importantes para la correcta elongación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II (Ng et al., 2002; Schaft et al., 2003; Schubeler, et al., 2004) (**Fig.13**).

Aparte de las modificaciones de histona, los genes activos también se caracterizan por tener una variante de histona diferente, la H3.3. Esta variante de H3, esta más frecuentemente hiperacetilada y metilada en H3-Lys4, y se piensa que asegura el mantenimiento de la estructura característica de la eucromatina incluso después de la mitosis (Chow et al., 2005) (**Fig.13**).

#### *La heterocromatina o cromatina transcripcionalmente inactiva*

Existen dos tipos de heterocromatina. La heterocromatina constitutiva de las regiones centroméricas y pericentroméricas, y la heterocromatina facultativa del cromosoma X inactivado y de los genes eucromáticos silenciados (**Fig.12 y 13**). Estos dos tipos de heterocromatina tienen en común que son de replicación tardía, están hipoacetilados, no están metilados en H3-Lys4 y la cromatina está altamente compactada, volviendo casi inaccesible a los factores de transcripción el sitio de unión a DNA. Sin embargo las marcas de metilación de histona y las proteínas corepresoras que reclutan estas marcas varían según el tipo de heterocromatina (**Fig.12 y 13**) (Arney and Fisher 2004).

#### La heterocromatina constitutiva

Es una de las estructuras de cromatina más estudiadas y caracterizadas. Está altamente compactada, se encuentra característicamente (si bien no exclusivamente) en las regiones centro- y pericentroméricas, y es pobre en genes. Una propiedad fundamental de estas regiones heterocromáticas es que inserciones al azar de secuencias transgénicas en su seno desencadenan una heterocromatización del transgén y su silenciamiento por un fenómeno de variegación por efecto de la posición (PEV, position-effect variegation) (Karpen and Allshire 1997; Schotta et al., 2003).

La heterocromatina constitutiva esta compuesta por secuencias repetitivas de DNA en tándem muy ricas en AT, lo cual junto con su alto grado de compactación, permite su identificación como subdominios nucleares superteñidos con marcadores como DAPI, Topro3, o Hoescht. Se sabe que estas secuencias repetitivas se transcriben mediante la maquinaria RNA<sub>i</sub>, dando lugar a <sup>sh</sup>RNAs (small heterochromatic RNAs) que hibridan con el DNA por complementariedad (Csink and Henikoff 1998; Volpe et al., 2002). Este proceso recluta histona



metiltransferasas (HMTasas) de la familia de Suv39h1 a estas regiones cromatínicas. Suv39h1 trimetila específicamente H3-Lys9, la marca más característica de la heterocromatina constitutiva. La trimetilación en H3-Lys9 recluta a su vez, con una elevada especificidad, el corepresor HP1 que participa en la formación de la estructura tan compacta de la heterocromatina (Nakayam et al., 2001; Hall et al., 2002). Además la trimetilación en H3-Lys9 induce la metilación en DNA, añadiendo un grado más de represión a este tipo de cromatina altamente estable e irreversible (Lehnertz et al., 2003) (**Fig.12 y 13**). Estas modificaciones se propagan a lo largo de la cromatina regionalizándola en acúmulos nucleares visibles no sólo mediante tinciones DAPI (*DAPI dense nuclear bodies*) sino también con inmunotinciones con anticuerpos específicos contra H3-Lys9me3 (Peters et al., 2003).

Otra marca metil típica de la heterocromatina constitutiva es la trimetilación en H4-Lys20 y la variante de histona H3, CENPA, esencial para la correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis (Howman et al., 2000; Schotta et al., 2004) (**Fig.13**).

#### La heterocromatina facultativa

La heterocromatina facultativa es la cromatina silenciada que se compacta durante el desarrollo por un fenómeno de diferenciación o durante la edad adulta por un fenómeno de regulación génica.

Clásicamente, se ha asociado la heterocromatina facultativa con la inactivación del cromosoma X en hembras de mamífero para compensar la dosis génica. La heterocromatización del cromosoma X inactivo también se basa en la transcripción de un RNA no codificante, *Xist*, situado en el mismo cromosoma X (Lee et al., 1999; Plath et al., 2002). *Xist* envuelve el cromosoma X y recluta el complejo Polycomb PRC2 (formado por Eed, Ezh2, Suz12 y YY1) que trimetila específicamente H3-Lys27, una marca de histona característica de la heterocromatina facultativa (Plath et al., 2003). La trimetilación en H3-Lys27 es reconocida específicamente por miembros de la familia polycomb (PRC1) que promueven la compactación de la cromatina (Fischle et al., 2004) (**Fig.12 y 13**). Existe una sustitución por una variante de histona, la macroH2A, que ayuda a compactar el cromosoma X inactivado formando una estructura nuclear diferenciada, el corpúsculo de Barr (Costanzi and Pehrson 1998) (**Fig.13**).

El silenciamiento génico mediado por la trimetilación de H3-Lys27 y el reclutamiento del complejo polycomb (PcG) no está limitado a la inactivación del cromosoma X. El mismo proceso de silenciamiento génica dependiente del sistema polycomb fue inicialmente descrito como un mecanismo de represión epigenética de

genes implicados en el desarrollo de *Drosophila*. En *Drosophila*, se conoce la existencia de secuencias de DNA reconocidos específicamente por PcG presentes en las regiones reguladoras de los genes diana, denominadas "Polycomb Response Elements" (PRE), aunque en mamíferos estos elementos no están bien establecidos (**Fig.12**). El complejo PRC2 contiene la actividad catalítica necesaria para metilar H3-Lys27, que en mamíferos corresponde a Ezh2. El complejo PRC1 reconoce específicamente la metilación en H3-Lys27 y se une, induciendo la compactación y silenciamiento de la cromatina (Cao et al., 2002; Breiling et al., 2004; Grimaud et al., 2006). Recientemente, se ha descubierto que Ezh2 recluta directamente DNA metiltransferasas, añadiendo un mayor grado de represión a la inactivación vía polycomb (Vire et al., 2006). La maquinaria RNA<sub>i</sub> también está implicada en la estabilización y mantenimiento del complejo PcG a nivel de las secuencias PRE y promotoras de los genes dependientes (Grimaud et al., 2006).

Existen varios contextos en los que la trimetilación en H3-Lys27 y el subsiguiente reclutamiento de los corepresores de la familia polycomb (PRC1) juega un papel en el silenciamiento génico en mamíferos (**Fig.13**). Los casos más conocidos son los genes del cluster Hox, y los genes activos en células embrionarias que se inactivan durante el proceso de diferenciación celular (Cao and Zhang 2004; Bracken et al., 2006; Lee et al., 2006). Aunque probablemente exista una diversidad de formas de cromatina inactiva. Por ejemplo, un proceso de silenciamiento activo eucromático muy estudiado es la inactivación del locus de la transferasa terminal murina *Dnnt* durante la maduración del timocito (Su et al., 2004). En las dos primeras horas, se da una hipoacetilación de todo el locus, seguido por la compactación de la cromatina y su reposicionamiento a regiones pericentroméricas. Seguidamente, H3-Lys4 se demetila, mientras que H3-Lys9 se di- y/o trimetila (el anticuerpo no sabe diferenciar las dos marcas). La metilación de H3-Lys9 se propaga bidireccionalmente por todo el locus a partir del promotor consolidando la inactivación. No es hasta el final del proceso de diferenciación que se detecta metilación del DNA, sugiriendo que es la marca definitiva e irreversible del proceso de silenciamiento. Otros estudios de silenciamiento en linfocitos, también sugieren que es una heterocromatización constitutiva, inducida por la unión a DNA del corepresor Ikaros, la responsable de la inactivación de los loci silenciados en linfocito B (Brown et al., 1997).

También se ha descrito la dimetilación de H3-Lys9, inducida por G9a, como una marca típica de silenciamiento de eucromatina, como en el caso de la inactivación del locus de la  $\beta$ -globina en pollo o de Oct3/4 en células embrionarias de ratón (Litt et al., 2001; Tachibana et al., 2002; Roopra et al., 2006).

En resumen, los datos existentes apuntan a que no existe un proceso generalizado de silenciamiento de la cromatina, sino que podría ser dependiente del proceso celular o del locus. Así mismo, casi todos los estudios en mamífero se han realizado en modelos de diferenciación celular, dejando un gran vacío respecto a la comprensión del silenciamiento génico que ocurre cuando simplemente falta un activador que normalmente está presente.

*La relación entre metilación de histonas y actividad génica es compleja.*

Últimamente han surgido varias excepciones a los conceptos básicos que relacionan metilación de histonas con silenciamiento génico, lo que complica su comprensión. Por ejemplo, se ha descrito trimetilación de H3-Lys9 y asociación de HP1 en la región codificante de genes activos, sugiriendo un rol de estas marcas típicamente represoras en la elongación de la RNA polimerasa II (Vakoc et al., 2005). G9a, una metiltransferasa de H3-lisina 9 que se esperaba que cumpliera una función inhibitoria, induce sinérgicamente junto con una metiltransferasa de argininas (CARM1) la expresión de genes dependientes del receptor nuclear de glucocorticoides (Lee et al., 2006).

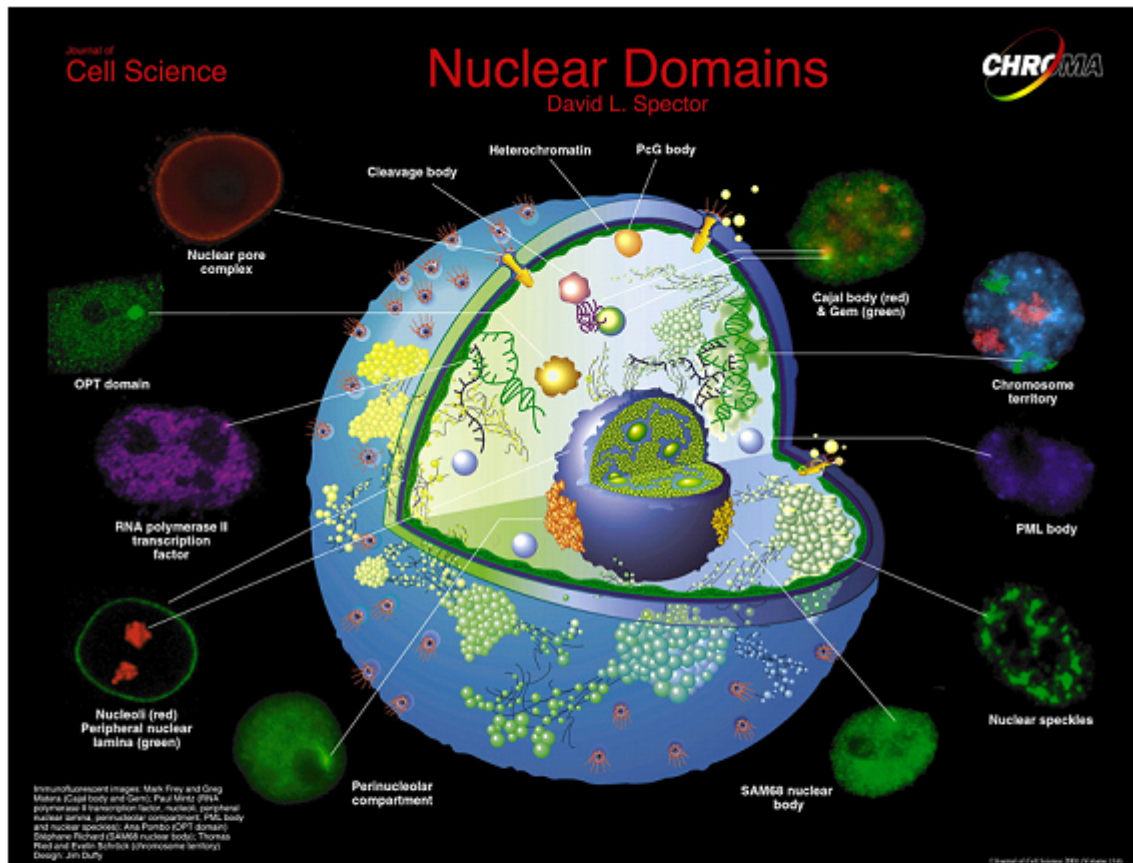
Los estudios en células troncales embrionarias han mostrado una complejidad adicional, ya que se ha demostrado que existe un grupo de genes activos que serán reprimidos por diferenciación celular que ya tienen unidos miembros de la familia PcG como marca de memoria celular (Bracken et al., 2006). Por otra parte, genes clave para el desarrollo celular hacia un linaje celular determinado, reprimidos en células embrionarias, tienen en sus regiones promotoras dominios bivalentes ricos en H3-Lys4me y H3-Lys27me, de manera que están reprimidos pero preparados para la activación llegado el momento (Bernstein et al., 2006).

### **3.3. Regulación de la transcripción a nivel del espacio nuclear**

#### **a) El núcleo está altamente organizado en dominios funcionales.**

Con el desarrollo en los últimos años de nuevas técnicas de análisis de imagen y de estudio de células in vivo, hemos descubierto que el genoma eucariota y el núcleo que lo encierra son estructuras altamente organizadas y dinámicas que interactúan continuamente entre sí. Los primeros estudios de microscopía electrónica realizados en el núcleo evidenciaron una estructura no homogénea con áreas poco electrodensas, de las cuales fibras de cromatina se extendían para asociarse con pequeñas acumulaciones electrodensas, los cuerpos nucleares (Swift 1959). Más adelante se descubrió que las diferentes funciones realizadas en el

núcleo, la replicación, la reparación del DNA, la transcripción y el procesamiento del RNA, estaban compartimentalizadas en el núcleo, al nivel de estos cuerpos nucleares caracterizables por inmunotinción. (**Fig.14**) (Spector 2001; Dundr and Misteli 2001; Cremer and Cremer 2001; Chubb and Bickmore 2003; Parada et al., 2004; Kosak and Groudine 2004b).



**Figura 14.** El núcleo está altamente compartimentalizado en dominios funcionales. La cromatina se distribuye en territorios discretos, los territorios cromosómicos. La RNA polimerasa y otros componentes relacionados con la transcripción y el procesamiento del RNA se agrupan en subdominios (*Pol II factories*, *Cajal body*, *PML body*, *Nuclear speckles*, etc.). La lámina basal rodea el núcleo y se ha asociado con represión transcripcional y heterocromatina constitutiva. Mientras que los poros nucleares, también periféricos, se han asociado con activación transcripcional. Los genes se posicionan en un dominio u otro en función de su estado transcripcional. A partir de Spector, 2001 J Cell Sci.

### *La membrana y lámina nuclear*

El núcleo es un orgánulo que consta de su propia membrana lipídica, la membrana nuclear. La membrana nuclear externa está en íntimo contacto con el retículo endoplasmático y los ribosomas, responsables de la traducción del mRNA. A lo largo de la membrana nuclear, existen fusiones de la membrana externa e interna formando poros, los poros nucleares, que permiten el tránsito de RNAs y otros elementos del núcleo al citoplasma y viceversa (Stoffler et al., 1999). Se han

asociado los poros nucleares con transcripción activa de loci, ya que representan el puente directo entre la transcripción (RNA) y la traducción (los ribosomas) (**Fig.14**) (Ishii et al., 2002; Casolari et al., 2004).

La lámina nuclear se encuentra en contacto directo con la membrana interna nuclear. La lámina nuclear está compuesta por un entramado de filamentos, las laminas A/B y C. Estas proteínas forman una capa con función estructural y de anclaje de los cromosomas en interfase. Mutaciones en el gen de la lámina A, implicadas en fenómenos de envejecimiento, vuelven el núcleo más vulnerable al estrés mecánico y altera la formación de la heterocromatina constitutiva (Scaffidi and Misteli 2006).

#### *El nucleolo*

Uno de los dominios nucleares más evidentes y estudiados es el nucleolo. El nucleolo es la fábrica de ribosomas. Es donde se agrupan los genes ribosómicos (rDNA) que se transcriben con RNA polimerasa I, se procesan los rRNA y se ensamblan las subunidades ribosomales (Scheer and Hock 1999). Los núcleos de mamífero suelen contener 1-5 nucleolos de 0.5-5.0  $\mu\text{m}$  de diámetro. En humanos, agrupaciones de cientos de copias de rDNA, dispuestos en tándem y provenientes de 5 cromosomas diferentes se agrupan en el centro del nucleolo, conformando las regiones organizadoras nucleolares (NORs). Los rDNAs se transcriben y se procesan alrededor de estos centros y la maduración y ensamblaje en ribosomas ocurre en la región granular (**Fig.14**).

#### *Cuerpos nucleares (Speckles, cuerpos de Cajal, cuerpos PML y polycomb)*

Dentro del núcleo, coexisten un gran número de orgánulos pequeños (25-100 orgánulos de 0.2-1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro), distribuidos homogéneamente por todo el núcleo, con funciones variadas y detectables mediante microscopía electrónica e inmunotinción con anticuerpos específicos contra sus componentes (**Fig.14**).

Los *Speckles* agrupan y almacenan los factores de *splicing* del pre-mRNA y pueden ser identificados con tinciones para SC35 o SF2/ASF. Los *Speckles* son dominios altamente dinámicos porque sus factores son reclutados hacia las unidades de transcripción, y viceversa (Misteli 2000).

En los *cuerpos de Cajal*, que pueden ser identificados con tinciones para coilina, se sintetizan y administran los snRNPs, responsables del procesamiento del 3'UTR del pre-mRNA y de su correcto *splicing* (Gall 2000).

Los *cuerpos PML* agrupan proteínas tales como SUMO1, CBP, Sp100, que tienen funciones en la regulación de la transcripción (Maul et al., 2000).

Los cuerpos polycomb pueden identificarse con tinciones para Pc2 y Bmi1, y tal como se discute más adelante podrían representar un dominio represor (Hernandez-Muñoz et al., 2005; Grimaud et al., 2006; Bantignies and Cavalli 2006).

Existen además otros cuerpos nucleares, como los dominios OPT (paraspeckles, Clastosomes, Cleavage bodies y Nuclear stress bodies) y muchos otros más pendientes de caracterizar

#### *Compartimentalización de la actividad transcripcional*

La transcripción está altamente compartimentalizada en el núcleo eucariota. La incubación de núcleos humanos con BrUTP, un análogo del ribonucleótido UTP que se puede detectar por inmunohistoquímica, reveló que la transcripción génica se da en dominios discretos del núcleo, formando unidades transcripcionales (Jackson et al., 1993; Iborra et al., 1996). Estos dominios se encuentran por todo el núcleo y se estima que existen unas 2,100 unidades (Iborra et al., 1996). El número de unidades transcripcionales es bastante menor al de genes activos por célula, lo que sugiere que deben transcribirse más de un gen en una misma unidad. Inmuntinciones contra RNA polimerasa II revelaron que el responsable final de la transcripción tampoco se distribuye al azar en el núcleo, sino que colocaliza perfectamente con las unidades transcripcionales ricas en BrUTP (**Fig.14**) (Iborra et al., 1996; Grande et al., 1997).

La naturaleza de estos dominios nucleares ricos en RNA polimerasa II está aún por esclarecer. Se ha propuesto que podría tratarse de una estructura formada por auto-organización, altamente dinámica y que se mantiene estable por un recambio continuo de las diferentes subunidades (Cook 2002).

Se ha propuesto también que las unidades transcripcionales están ancladas a una matriz nuclear y que son los genes los que se desplazan hacia las unidades transcripcionales y no la RNA polimerasa II hacia los loci (Kimura et al., 1999; Cook 2002). Al tratar células permeabilizadas con nucleasas, si asumimos que la cromatina no está suelta en el espacio nuclear sino anclada a algún tipo de andamio proteico o la lámina basal, la cromatina se perderá con los lavados de las células. Si se incubaba previamente estas células vivas con biotina-CTP para detectar transcripción por incorporación del nucleótido marcado, en el caso de que las RNA polimerasas II fueran reclutadas al DNA, se deberían lavar con la cromatina digerida. Sin embargo se sigue detectando biotina-CTP por microscopía electrónica, sugiriendo que es el DNA el que se desplaza hacia la RNA polimerasa II y se mantiene asociado a la polimerasa anclada en la matriz nuclear (Cook 2002).

Se ha descrito que algunos factores de transcripción básicos como TFIID o TBP colocalizan con los acúmulos de RNA polimerasa II. Sin embargo, otros factores de transcripción secuencia-específicos como el receptor de glucocorticoides o E2F, muestran una distribución en el núcleo bastante más dispersa (Grande et al., 1997).

#### *Los territorios cromosómicos*

En el núcleo, cada cromosoma ocupa su propio espacio, formando los territorios cromosómicos (**Fig.14**) (Cremer and Cremer 2001). No obstante, en las regiones limítrofes existe entrecruzamiento de fibras de cromatina de diferentes cromosomas (Branco et al., 2006) La distribución relativa de los cromosomas en el núcleo muestra una tendencia a mantenerse después de la división celular y a ser característica del tipo celular (Parada et al., 2004).

En general, los territorios cromosómicos ricos en genes tienden a encontrarse en el interior del núcleo, mientras que los cromosomas más pobres en genes se localizan más frecuentemente en la periferia (Parada et al., 2004).

Existe un modelo de organización del núcleo basado en dos compartimentos: los territorios cromosómicos (CT) y la intercromatina (IC) (Cremer and Cremer 2001). Cada territorio cromosómico corresponde a un cromosoma y consta de una región más condensada, visible al microscopio mediante el uso de pinturas cromosómicas, y de una región más laxa y móvil, rodeando a la anterior. El compartimento intercromático engloba todo lo que no es cromatina y por lo tanto alberga los dominios nucleares, las unidades transcripcionales y otros complejos reguladores del núcleo. Este compartimento rodea e incluso penetra en el territorio cromosómico para volver accesible a los loci los complejos reguladores de la transcripción, replicación, *splicing* y reparación del DNA (Cremer and Cremer 2001).

Se ha visto que los genes activos e inactivos están en la superficie de los territorios cromosómicos, mientras que las regiones heterocromáticas o no codificantes tienden a situarse más hacia el interior (Verschure et al., 1999; Cremer and Cremer 2001).

#### *Rol del nucleoesqueleto en la organización nuclear.*

Cómo se organizan y mantienen las diferentes subestructuras y orgánulos nucleares, y como se mueve la cromatina en el espacio nuclear son procesos aún poco comprendidos. Se hipotetiza que la matriz proteica, o nucleoesqueleto, podría ser una buena candidata para estructurar y organizar el núcleo.

Un componente esencial del nucleoesqueleto son las láminas A/B y C que conforman la lámina nuclear y están en íntimo contacto con la membrana nuclear.

Se ha descrito que los cromosomas están anclados a la lámina nuclear e incluso varios estudios han asociado silenciamiento génico con reposicionamiento a la lámina basal en la periferia nuclear, sugiriendo que la lámina nuclear podría tener un rol en la regulación de la transcripción y el posicionamiento génico (Kosak et al., 2002; Zink et al., 2004).

Otro componente esencial del citoesqueleto es la actina. Recientemente, se ha descrito que la actina también se encuentra en el núcleo e interacciona con factores de transcripción, complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes, HATs e incluso RNA polimerasas, regulando así la transcripción a diferentes niveles (Miralles y Visa, 2006). Por ejemplo, la actina regula la localización subcelular de algunos factores de transcripción y el proceso de elongación de la RNA polimerasa II (Miralles y Visa, 2006). Por otro lado, el descubrimiento de una forma de miosina nuclear (NM1) ha abierto varias hipótesis sobre un posible rol motor del nucleoesqueleto de actina, aunque aún no existe evidencia clara de que la dinámica de la actina como polímero del nucleoesqueleto pueda jugar un papel en el posicionamiento de estructuras subnucleares. (de Lanerolle et al., 2005).

### **b) Reposicionamiento de los loci en el núcleo según el estado transcripcional.**

Los cromosomas son estructuras 3D altamente dinámicas. En los últimos años han surgido un gran número de estudios que apuntan a que el posicionamiento de loci respecto a sus territorios cromosómicos y los dominios nucleares puede tener una gran importancia para la actividad génica.

El reposicionamiento génico inducido por un determinado estado transcripcional puede tener diferentes puntos de referencia.

#### *Reposicionamiento radial*

Tal como se apunta anteriormente, el análisis FISH de cromosomas en núcleos humanos reveló que un cromosoma pobre en genes (crs.18) se localiza preferentemente en la periferia, asociado a la lámina basal, mientras que un cromosoma rico en genes (crs.19) se sitúa más céntricamente en el núcleo (Croft et al., 1999). Esto sugiere una organización radial del genoma en función de su densidad génica y en consecuencia de su actividad transcripcional, ya que las regiones más ricas en genes son las más activas transcripcionalmente.

Zink et al. demostraron que cuando el gen CFTR está activo, el locus tiende a internalizarse, mientras que genes flanqueantes inactivos se mantienen asociados a la periferia nuclear, y en particular a la lámina basal. Un aspecto importante de



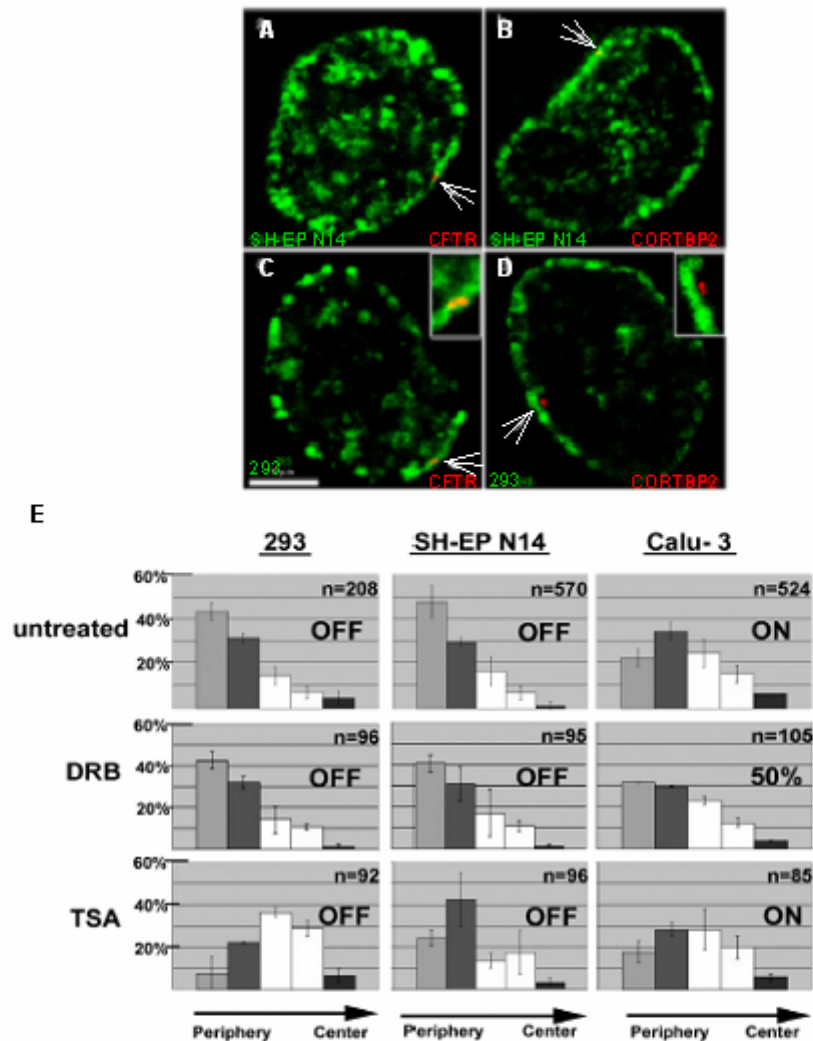
este estudio es que este comportamiento diferencial se da entre loci situados a 85 kb de distancia, indicando un reposicionamiento delimitado. Por otra parte, el uso de inhibidores de las HDAC (TSA), que aumentan la acetilación de histonas, indujo un reposicionamiento del gen hacia el interior del núcleo, pero no dio lugar a activación transcripcional. En definitiva, demostraron que la localización radial en función de la actividad génica es gen-específico, y depende de la conformación de la cromatina, pero que no es por sí sola suficiente para determinar la activación de la transcripción (**Fig.15**) (Zink et al., 2004).

Otro ejemplo de asociación entre periferia nuclear y represión transcripcional es la regulación de la expresión de los loci *Ig* murinos durante el desarrollo linfocitario. En los progenitores linfocitarios, los genes *IgH* e *Igκ* inactivos se encuentran asociados a la lámina basal. Con el proceso de diferenciación a linfocito B, ambos genes se relocalizan hacia el interior del núcleo permitiendo la expresión del gen *IgH*. El bloqueo de la diferenciación inhibe esta relocalización y la subsiguiente activación del gen. Sin embargo, el internamiento no es decisivo para la transcripción, ya que el locus *Igκ* no se activa. Esta asociación entre periferia y represión es independiente de la asociación con la heterocromatina constitutiva, sugiriendo que la lámina basal podría tener alguna capacidad represora (Kosak et al., 2002). Es posible que la región próxima a la lámina basal, más que la periferia nuclear en sí, sea el compartimento ligado a la represión transcripcional, lo cual es importante ya que la membrana nuclear se invagina hacia el interior del núcleo.

Resumiendo, la actividad transcripcional parece estar en parte regulada radialmente en el núcleo, siendo la lámina basal un dominio represor independiente de la heterocromatina constitutiva y el interior del núcleo un dominio permisivo pero no suficiente para la transcripción.

Sin embargo, es importante resaltar que paradójicamente también se ha asociado actividad transcripcional con la periferia al nivel de los poros nucleares. Un estudio a nivel genómico realizado en levaduras reveló que diferentes componentes de los poros nucleares y proteínas asociadas al transporte nuclear (nucleoporinas y carioferinas) estaban asociados con genes transcripcionalmente activos. Incluso demostraron como los genes *GAL*, al inducirse en un medio rico en galactosa, se asociaban con componentes de la maquinaria de transporte nuclear y se translocaban a la periferia nuclear para localizarse en los poros nucleares. (Casolari et al., 2004). Esta aparente discordancia podría explicarse porque en la periferia nuclear deben coexistir dos dominios subnucleares probablemente excluyentes, un dominio represor asociado a la lámina basal (lámina A) y un dominio activador

asociado a los poros nucleares y los complejos de transporte de mRNA al citoplasma que perforan la membrana nuclear.



**Figura 15.** Posicionamiento espacial de los genes *CFTR* y *CORTBP2*. **(A-D)** Detección por FISH (puntos rojos, señalados con flechas) de *CFTR* (A y C) y *CORTBP2* (B y D) en núcleos fijados de las líneas celulares SH-EP N14 (A y B) y HEK 293 (C y D). La heterocromatina perinuclear y perinucleolar se detectó por incorporación de BrdU durante la replicación (en verde). *CFTR* no se expresa en ninguno de los dos tipos celulares y colocaliza con la periferia nuclear en ambos casos. Mientras que *CORTBP2* se expresa en HEK 293, donde no colocaliza con la periferia (D). En C y D se muestra agrandado el punto FISH y el ambiente cromatínico que lo rodea. Barra, 5  $\mu$ m. **(E)** Análisis por FISH de la localización radial de *CFTR* en los tres tipos celulares especificados. Se dividió el núcleo en discos concéntricos del centro hacia la periferia y se calculó el porcentaje de loci que se encontraban en cada sector (análisis por erosión). Se utilizaron inhibidores de la transcripción (DRB) y de las histona deacetilasas (TSA). ON/OFF hace referencia al estado transcripcional de *CFTR* en cada tipo celular y condición, el DRB redujo a la mitad el nivel de expresión de *CFTR* en Calu-3. La n indica el número de loci que se cuantificaron para cada condición. Existe una tendencia del locus *CFTR* a situarse en la periferia nuclear cuando está inactivo. La inhibición de su expresión vía DRB relocaliza *CFTR* hacia la periferia en Calu-3. Sin embargo la relocalización hacia el centro del núcleo en HEK 293 y SH-EP N14, inducida por una apertura de la conformación de la cromatina vía TSA, no es suficiente para la transcripción. Zink et al, 2004 J Cell Biol

*Reposicionamiento y territorios cromosómicos.*

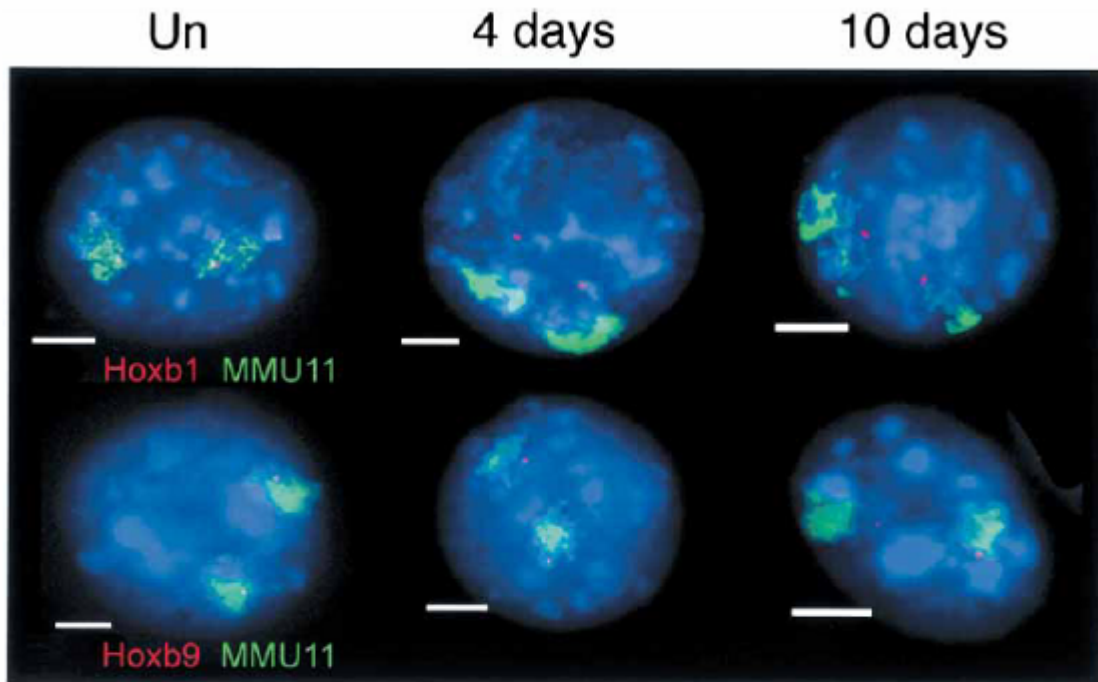
La disposición de la cromatina en territorios cromosómicos con agrupaciones transcripcionales situadas en el espacio intercromático, sugiere que los loci tienen que tener una cierta movilidad para poder transcribirse.

Estudios realizados en núcleos humanos y de levadura han demostrado que la fibra de cromatina es dinámica y que un gen puede desplazarse hasta 0.5 $\mu$ m en el núcleo. Sin embargo esta movilidad varía según la localización del gen, siendo más restrictiva cuando el gen está asociado con la periferia nuclear (Heun et al., 2001; Chubb et al., 2002). Estudios *in vivo* con modelos artificiales demostraron que una amplia región cromosómica heterocromatizada (90Mb) puede remodelarse y desplegarse hacia otro dominio nuclear mediante la inducción con un potente transactivador (VP16) (Tumbar et al., 1999)

Hay evidencias basadas en modelos naturales que indican que regiones cromosómicas grandes pueden extenderse fuera de su territorio, como es el caso del locus *MHC* (Volpi et al., 2000). El grado de alejamiento del territorio cromosómico en forma de lazo, o *looping*, del locus varía según el tejido y es dependiente del grado de actividad transcripcional (Volpi et al., 2000). Por lo tanto, la inducción génica con interferon-gamma aumenta considerablemente la frecuencia de *looping* del locus MHC fuera de su cromosoma (Volpi et al., 2000).

Otro ejemplo de movilidad cromatínica es el caso del locus *HoxB* (Chambeyron and Bickmore 2004). Este locus está conformado por varios genes (*Hoxb1-Hoxb9*) y con la diferenciación celular, se van activando uno tras otro en el tiempo. Correlacionando con el patrón temporal de activación génica, la cromatina de estos genes se modifica, se decondensa y se desplaza fuera del territorio cromosómico para ser transcrita (**Fig.16**) (Chambeyron and Bickmore 2004).

Finalmente, el uso de variantes transgénicos del locus de la  $\beta$ -globina permitió establecer una relación directa entre las secuencias reguladoras de DNA y el despliegue del locus fuera del territorio cromosómico (Schubeler et al., 2000; Ragoczy et al., 2003). En células eritroides, la  $\beta$ -globina se encuentra fuera del territorio cromosómico, incluso antes de ser transcrita. En ausencia de la región de control de la transcripción (LCR), la  $\beta$ -globina se queda dentro del territorio cromosómico y no se expresa. Interesantemente, si se cambia el LCR por una secuencia de regulación represora, el locus de la  $\beta$ -globina se desplaza pero hacia un dominio de heterocromatina pericentromérica que lo inactiva (Schubeler et al., 2000; Ragoczy et al., 2003).



**Figura 16.** Alejamiento progresivo del territorio cromosómico (*looping*) del grupo de genes *HoxB*. FISH del cromosoma MMU11 detectado con pintura cromosómica (en verde) y del locus *Hoxb1* y *Hoxb9* (en rojo) en núcleos fijados de células indiferenciadas (Un) o diferenciadas durante 4 y 10 días. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra, 5  $\mu$ m. En células indiferenciadas, ningún gen *Hoxb* se expresa. A medida que la célula se diferencia, van activándose progresivamente los genes *Hoxb*. A partir del cuarto día, *Hoxb1* se expresa y se ve como se aleja de su territorio cromosómico. Mientras que *Hoxb9* se expresa más tarde y no se aprecia el alejamiento hasta el décimo día. A partir de Chambeyron et al., 2004 *Genes Dev.*

El territorio cromosómico representa la cromatina más compacta, fácilmente detectable por FISH. El reposicionamiento respecto a territorios cromosómicos asociado a actividad génica sugiere que la cromatina tiene que adoptar una conformación más laxa y abierta, y que necesita elementos externos al territorio cromosómico para poder transcribirse, posiblemente los dominios RNA polimerasas II. Sin embargo, todavía no se han podido realizar experimentos para determinar si este tipo de reposicionamiento es determinante para la transcripción, aunque existen datos que sugieren que el *looping* del territorio cromosómico por sí sólo no es suficiente para la activación génica

#### *Reposicionamiento génico y dominios represores.*

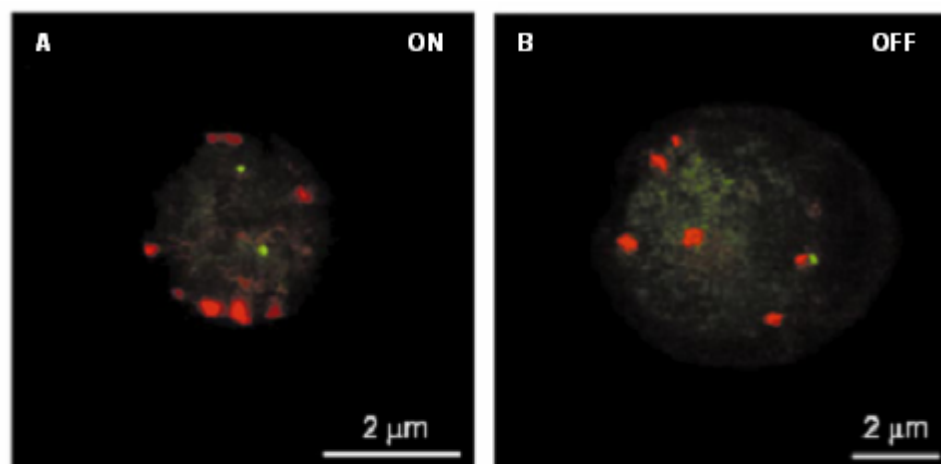
Cuando la cromatina se despliega y los loci se alejan del territorio cromosómico, se dirigen hacia el espacio intercromático. En este tipo de reposicionamiento se asume que los loci implicados se sitúan en espacios favorables para la transcripción. Pero también es posible el desplazamiento hacia dominios represores como la heterocromatina pericentromérica o los cuerpos polycomb (Osborne et al., 2004; Ragozcy et al., 2006; Grimaud et al., 2006;

Bantignies and Cavalli 2006; Dernburg et al., 1996; Brown et al., 1997; Brown et al., 1999; Brown et al., 2001; Francastel et al., 2001; Merckenschlager et al., 2004).

Se ha asociado en más de una ocasión represión transcripcional con localización del locus con dominios heterocromáticos constitutivos: la heterocromatina pericentromérica (Dernburg et al., 1996; Brown et al., 1997; Brown et al., 1999; Brown et al., 2001; Francastel et al., 2001; Merckenschlager et al., 2004). Esta cromatina se puede detectar mediante hibridación in situ (FISH) de las secuencias repetitivas  $\alpha$ -satélite, mediante tinción del DNA con DAPI (dominios DAPI-dense) o por inmunofluorescencia contra H3-Lys9me3.

Uno de los casos clásicos es el locus *brown* en *Drosophila*. La inserción de una secuencia heterocromática en un alelo *brown*, provoca la heterocromatización de los dos alelos y su relocalización a heterocromatina pericentromérica por un fenómeno de PEV (Dernburg et al., 1996).

Otros ejemplos de silenciamiento génico por reposicionamiento a heterocromatina pericentromérica son los loci del linaje hematopoyético que se inactivan por un proceso de diferenciación celular, como el locus de la  $\beta$ -globina (**Fig.17**) (Brown et al., 1997; Brown et al., 1999; Brown et al., 2001; Francastel et al., 2001; Merckenschlager et al., 2004). Interesantemente, se ha propuesto que la asociación de estos loci con dominios heterocromáticos es mediante el reclutamiento directo de represores, como Ikaros o NF-E2p18, que se unen al DNA y arrastran los loci a los dominios pericentroméricos (Brown et al., 1997; Francastel et al., 2001).



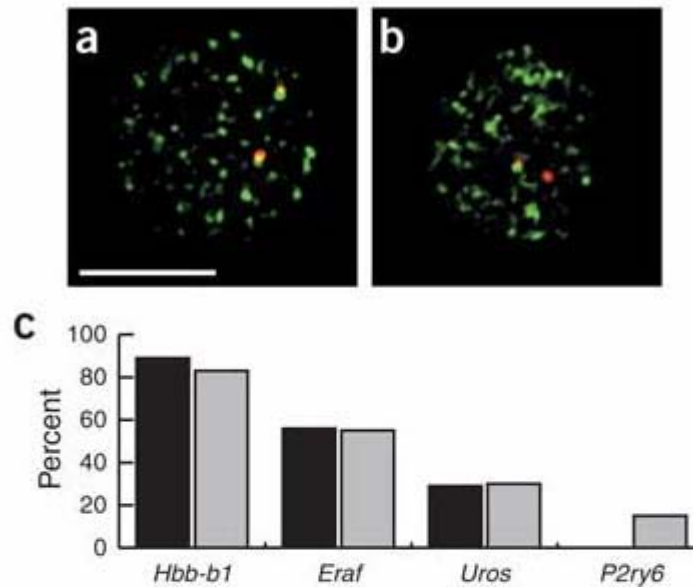
**Figura 17.** Los genes transcripcionalmente inactivos colocan con heterocromatina constitutiva. Doble FISH de  $\beta$ -globina (en verde) y secuencias repetitivas  $\alpha$ -satélite que marcan la heterocromatina constitutiva pericentromérica (en rojo) en núcleos interfásicos provenientes de eritroblastos (**A**) o linfocitos T activados (**B**) humanos. ON/ OFF hace referencia al estado transcripcional del gen en cada tipo celular. Barra, 2  $\mu$ m. El locus de la  $\beta$ -globina colocaliza con la heterocromatina constitutiva cuando el gen está inactivo, en linfocitos T. A partir de Brown et al., 2001 Nature Cell Biol.

Sin embargo este fenómeno no es de ningún modo generalizable a la silenciación génica, existen casos en los que el silenciamiento génico se asocia con reposicionamiento a la periferia nuclear y nucleolar y no con dominios heterocromáticos. Son el caso del gen neuronal *Mash1* y del gen linfocitario *IgH* (Kosak et al., 2002; Williams et al., 2006). Ambos genes se asocian con mayor frecuencia a la periferia nuclear que a dominios heterocromáticos constitutivos cuando están silenciados en células precursoras, al contrario que en células neuronales y linfocitos B, donde se inducen respectivamente (Kosak et al., 2002; Williams et al., 2006). Esto sugiere que la asociación de genes inactivos a dominios heterocromáticos pericentroméricos podría ser un fenómeno más bien concreto de ciertos procesos de silenciación, posiblemente en contextos específicos como la diferenciación eritrocitaria.

Otro dominio represor es el formado por las proteínas polycomb que están agrupadas en el núcleo formando los cuerpos PcG. Se ha descrito en *Drosophila* que los genes silenciados vía polycomb se asocian entre ellos a través de las secuencias PRE, y se localizan en los cuerpos PcG en el núcleo (Grimaud et al., 2006; Bantignies and Cavalli 2006).

*Reposicionamiento de genes activos hacia agrupaciones de RNA polimerasa II.*

Recientemente, Osborne et al. han demostrado que sólo los genes transcripcionalmente activos colocalizan con dominios ricos en RNA polimerasa II, llamados factorías Pol II, que no son otros que los sitios de transcripción descritos anteriormente (**Fig.18**). En este trabajo demostraron que el porcentaje de alelos activos por RNA FISH es el mismo que el porcentaje de alelos asociados a dominios ricos en RNA polimerasa II por DNA FISH y que todos los alelos transcripcionalmente activos (RNA FISH) se asocian con dominios RNA polimerasa II (Osborne et al., 2004). Sin embargo, vieron que no todos los alelos están siempre transcribiéndose y que existe una correlación positiva entre el porcentaje de alelos asociados a factorías Pol II y el nivel de expresión, sugiriendo que la transcripción es un fenómeno discontinuo y que sólo el alelo transcribiéndose se asocia a un dominio RNA polimerasa II. (Osborne et al., 2004; Wijgerde et al., 1995). Curiosamente, con una frecuencia mayor de la esperada, dos genes situados en dos cromosomas diferentes pero con funciones similares se reposicionan al mismo dominio RNA polimerasa II para transcribirse, sugiriendo que podría existir una especialización de las factorías Pol II que atraen el mismo tipo de genes, según la función o especificidad celular, para coordinar la expresión (Osborne et al., 2004).



**Figura 18.** Los genes transcripcionalmente activos se asocian con dominios nucleares ricos en RNA polimerasa II. **(A)** RNA inmuno-FISH del transcrito de *Hbb1-b1* (en rojo) e inmunotinción de RNA polimerasa II (en verde) en células eritroides de ratón. **(B)** DNA inmuno-FISH del locus de *Eraf* (en rojo) e inmunotinción de RNA polimerasa II en células eritroides de ratón **(C)** Comparación del porcentaje de alelos transcripcionalmente activos detectados por RNA-FISH (barras negras), con el porcentaje de alelos que colocalizan con un dominio rico en RNA polimerasa II por DNA-FISH (barra gris) para cada gen indicado. Barra, 5  $\mu$ m. La mayoría de alelos transcripcionalmente activos colocalizan con RNA polimerasa II. Además, el porcentaje de alelos que colocalizan con RNA polimerasa II coincide con el porcentaje de alelos transcripcionalmente activos, sugiriendo que un alelo activo está situado en dominios nucleares ricos en RNA polimerasa II, también llamados factorías Pol II. A partir de Osborne et al., 2004 Nature Genet.

Otros trabajos, como el de Ragoczy et al. han confirmado la existencia de estas factorías transcripcionales. Ragoczsy et al. demostraron que la  $\beta$ -globina, a pesar de estar inactiva, ya está asociada con dominios RNA polimerasa II no fosforilados en la periferia nuclear de las células precursoras. Con la diferenciación celular, el locus se activa, se internaliza y se asocia con mayor frecuencia con dominios RNA polimerasa II hiperfosforilados activos (Ragoczy et al., 2006). Así pues existirían diferentes tipos de dominios RNA polimerasa II, y un gen inactivo pero preparado para la transcripción podría estar asociado con RNA polimerasa II no fosforilada. La inducción génica reposicionaría el locus de una Pol II inactiva a una Pol II fosforilada y activa.

Recapitulando, la regulación de la transcripción es un proceso complejo que integra diferentes niveles de regulación jerárquicos, pero a la vez interdependientes. Las secuencias reguladoras de DNA reclutan en cis remodeladores de cromatina y modificadores de histonas que afectan a la conformación y movilidad de la cromatina. Además existe un nivel de regulación

determinado por la localización del locus en un dominio nuclear u otro. La forma en que se relacionan los cambios locales producidos en genes en función de su actividad y los cambios espaciales están aún por esclarecer.







Da Vinci

## **HIPÓTESIS y OBJETIVOS**

---



## Hipótesis

Múltiples factores genéticos y ambientales influyen en el desarrollo de la diabetes. En particular, se han descrito defectos transcripcionales de las células beta-pancreáticas. El caso más claro es la diabetes monogénica tipo MODY causada por la mutación de un sólo gen en heterocigosidad. La mayoría de genes MODY son factores de transcripción y HNF1 $\alpha$  es el más frecuentemente mutado.

Los modelos deficientes para HNF1 $\alpha$  no sólo nos permiten estudiar las bases moleculares de esta patología para el desarrollo de nuevas terapias génicas, sino también nos ayudan a comprender el programa transcripcional responsable de la diferenciación y función de la célula beta, esencial para el correcto desarrollo de protocolos de diferenciación *in vitro* de células beta para el posterior trasplante. Por otro lado, estos modelos genéticos de deficiencia de un activador representan un buen modelo *in vivo* para el estudio de los mecanismos de regulación de la transcripción.

Actualmente sabemos que los factores de transcripción reclutan específicamente a sus genes diana modificadores de cromatina que favorecen la unión y activación de la maquinaria transcripcional. Sin embargo existen pocos estudios referentes a esta función en un contexto celular.

En este proyecto de tesis proponemos que HNF1 $\alpha$  es un regulador epigenético que altera la cromatina y la organización espacial de sus genes diana durante el desarrollo de la célula beta, estableciendo así una memoria celular. En su ausencia, la célula beta no alcanza la maduración final y por lo tanto no puede ejercer correctamente su función derivando en diabetes.

Más concretamente, el trabajo se basa en dos hipótesis:

1.- Desconocemos si la función de HNF1 $\alpha$  debe ejercerse en un momento determinado del desarrollo pancreático o si es recapitulable en edad adulta. HNF1 $\alpha$  podría ejercer cambios a nivel de la cromatina de sus genes diana que establezcan un patrón de expresión heredable en las células beta. Esta función sería específica de célula beta y debería ocurrir en un momento determinado del desarrollo pancreático.

2.- En la actualidad, se sabe que HNF1 $\alpha$  promueve la acetilación de histonas en sus genes diana, aunque se desconoce si regula otras modificaciones de cromatina importantes para la transcripción. Por otra parte, recientemente ha surgido un nuevo nivel de regulación transcripcional con cada vez más relevancia, la organización nuclear y el reposicionamiento de genes respecto a dominios subnucleares. Sin embargo, se desconoce en que medida están ligados estos dos

niveles fundamentales de regulación. Tampoco sabemos hasta que punto un activador puede influir en la localización nuclear de sus genes diana, teniendo en cuenta que la organización espacial de los genes podría estar determinada principalmente por el entorno cromosómico, como por ejemplo por factores como la densidad génica. Planteamos que el reposicionamiento génico puede ser directamente dependiente de un activador. Además, proponemos que HNF1 $\alpha$  podría no sólo influir en diversas modificaciones de la cromatina localmente en sus genes diana, sino que también podría existir una representación funcional de estas modificaciones en el espacio nuclear.

## Objetivos

Los objetivos de este trabajo de doctorado son responder a dos cuestiones importantes sobre la función *in vivo* del factor de transcripción HNF1 $\alpha$ .

### 1) Dónde, cuándo y cuánto debe expresarse HNF1 $\alpha$ para realizar su función en la célula beta.

Mediante el uso de un modelo murino de expresión de HNF1 $\alpha$  inducible por tetraciclina y específico de célula beta ( $Tg^{tet-Hnf1\alpha/RIP-tTA}$ ) en un ratón deficiente para HNF1 $\alpha$ , planteamos responder las siguientes preguntas:

- a) ¿Tiene la función de HNF1 $\alpha$  en la célula beta autonomía celular?
- b) ¿Está la función de HNF1 $\alpha$  en la célula beta restringida a un momento determinado del desarrollo del páncreas?
- c) ¿Son los niveles de expresión de HNF1 $\alpha$  en célula beta críticos para su correcta función?

### 2) ¿Cómo afecta HNF1 $\alpha$ la cromatina y la posición de sus genes diana en el espacio nuclear? ¿Qué relación existe entre estos dos niveles de regulación?

Mediante el uso de un modelo deficiente para HNF1 $\alpha$  ( $Hnf1\alpha^{-/-}$ ), estudiaremos posibles mecanismos mediante los cuales HNF1 $\alpha$  regula la transcripción de sus genes diana, determinando los cambios que promueve en estos genes a nivel de la cromatina y en el espacio nuclear en hepatocitos e islotes. En particular planteamos responder las siguientes preguntas:

- a) ¿Cómo regula HNF1 $\alpha$  las modificaciones de histona y la conformación de la cromatina de sus genes diana?
- b) ¿Existe una distribución no aleatoria de estas marcas de histona en el espacio nuclear?
- c) ¿Cómo se distribuye HNF1 $\alpha$  en el espacio nuclear?
- d) ¿Es HNF1 $\alpha$  capaz de reubicar de manera localizada sus genes diana a dominios subnucleares, y cómo se relaciona este reposicionamiento con los cambios de cromatina inducidos localmente?