

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

REGULACIÓ DEL PROMOTOR DE *Sp3*

ALICIA TAPIAS SOLER
Barcelona 2008

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Programa de doctorat de Biotecnologia
Bienni 2003-2005

REGULACIÓ DEL PROMOTOR DE *Sp3*

Memòria presentada per Alicia Tapias Soler per optar al títol de doctor per la universitat de Barcelona

Dra. Verónica Noé Mata

Alicia Tapias Soler

Barcelona, 2008

Hi ha moltes persones que han contribuït directa o indirectament a la realització d'aquesta tesi, potser en són conscients o potser no. La veritat és que no se'm donen gaire bé aquestes coses, però aquí va!

Voldria agrair:

A la Vero, la meva directora de tesi, per haver-me ajudat i ensenyat durant tots aquests anys. Per tota la seva ajuda en els diferents articles i en l'escriptura d'aquesta tesi, per la seva paciència i els seus bons consells quan tot semblava que no tenia solució. Moltes gràcies pel teu paper com a "mediadora de conflictes".

Al Carles per haver-se preocupat d'ensenyar-me la duresa de la vida. Per haver-me donat l'oportunitat de fer la tesi al seu grup. Pel temps, sempre que els compromisos li han permès, i pels consells no només en temes professionals si no també d'esbarjo... Moteles forever!

A les companyes del laboratori "jornada completa", amb les que he compratit moltes i moltes hores, alegries i penes. Pel suport i comprensió, per escoltar-me i per aguantar-me en els meus "dies antipàtics". A l'Eli, la meva companya de taula, poiatas, pilots de papers, dinars i penes, gràcies per tot. *A Cris por tu actitud positiva y feliz.* A la SilviaC per portar organització en el caos i per mantenir-nos informades de l'actualitat (des que vas marxar, ja no ens empanem de res). A la SilviaC i l'Eli per les lliçons de català. A la SilviaP per ajudar-me en els meus primers passos al lab, ensenyant-me coses com les luciferases que després he fet i refet mil cops.

Als companys de laboratori "mitja jornada", Carlota, Pau i Isabel per aportar nous punts de vista, alegria i moviment al dia a dia del lab. Gràcies pel vostre suport i per la Coca Cola.

A tota la resta de gent que ha anat passant pel lab durant més o menys temps: Andrea S, Gerard C, Cinzia, Esther M, Cristina F, Irina, Mariane, Miriam, Àlex N i no sé si em deixo algú. Tot i que no vam coincidir llargues temporades, ha estat un plaer aprendre amb vosaltres. A la Marta Nicolás que, tot i que no ha sigut mai companya, encara que no vam coincidir, em va aconsellar en els meus primers entrebancs.

A tota la gent del departament, professors, becaris, secretàries, tècnics, personal de neteja i personal vari, que he conegut durant aquests anys. Gràcies a tots. Especialment, a tots aquells que he tingut el plaer de conèixer millor compartint hores de dinar, festes o sopars i també a tots aquells que han intentat arribar a ser amics, encara que no ha sigut una cosa fàcil.

A toda la gente del departamento (profesores, becarios, secretarias, técnicos, personal de limpieza y personal vario), que he conocido durante estos años. Gracias a todos. Especialmente, a todos aquellos que he tenido el placer de conocer mejor compartiendo horas de comer, fiestas o cenas y también a aquellos que han intentado ser amigos, aunque no haya sido algo fácil.

To the whole people of the Department I have met during this time. Thanks to you all. Specially, to all those that I have had the pleasure of knowing better sharing lunchtime, parties or dinners and also to those who have tried to be my friends, although it is not easy.

Al grup d'investigació de Merck Farma per donar-me l'oportunitat de veure com funciona una empresa. Espero que us vagi a tots molt bé.

Al Dr. Mantovani i tot el seu grup de la Universitat de Milà per ensenyar-me la tècnica de CHIP i per la seva ajuda quan la vaig necessitar. Una gent francament maca.

Al Dr. Roninson i tot el seu grup d'Albany (USA) per la seva ajuda amb els experiments de Sp1-p21. Per les seves crítiques constructives i per fer-me sentir com a casa estan tan lluny d'ella.

A tota la meva gent, als meus amics, "col·legues" i "coneguts", als d'ara i als d'abans; als que veig molt, als que veig poc i als que ja no veig mai; als que m'han escoltat i als qui he escoltat; als que m'han donat suport i als qui s'han distanciat; als que he fallat i als que ja no hi són. A tots us agraïxo la vostra companyia perquè la suma dels diferents moments amb vosaltres és el que m'ha conduït a aquest moment.

A tota la meva família (inclosa la política) per ser com és. *Especialmente a mis abuelos por su cariño desde la distancia.*

Als meus pares per donar-me la llibertat de triar les meves conviccions i per respectar el meu camí, tant a nivell personal com a nivell professional. Per donar-me tot el que he necessitat. A la meva mare pel disseny de la portada d'aquesta tesi.

A Lluís per aguantar-me. *A spiderman por defenderme de los malos.*

Muchos pocos hacen un mucho
Refranero popular

ÍNDEX	1
ABREVIATURES	5
PRESENTACIÓ	9
INTRODUCCIÓ	13
1. LA FAMÍLIA SP/KLF	14
1.1 El domini d'unió al DNA.....	17
1.2 La família Sp.....	19
1.2.1. El factor de transcripció Sp1.....	22
1.2.1.1. Regulació dels nivells de Sp1.....	23
1.2.1.2. Modificacions posttraduccionals de Sp1.....	24
1.2.1.2.1. Fosforilació de Sp1.....	24
1.2.1.2.2. Glicosilació de Sp1.....	27
1.2.1.2.3. Acetilació de Sp1.....	27
1.2.1.2.4. Sumoilació de Sp1.....	27
1.2.1.3. Interaccions de Sp1 amb altres proteïnes.....	28
1.2.1.3.1. Interacció amb la maquinària basal de transcripció.....	28
1.2.1.3.2. Interacció amb altres factors de transcripció.....	29
1.2.1.3.3. Interacció amb reguladors del cicle cel·lular.....	29
1.2.1.3.4. Interacció amb receptors nuclears.....	30
1.2.1.3.5. Interacció amb altres proteïnes.....	30
1.2.2. El factor de transcripció Sp3.....	31
1.2.2.1 Regulació dels nivells de Sp3.....	32
1.2.2.2. Modificacions posttraduccionals de Sp3.....	33
1.2.2.2.1. Fosforilació de Sp3.....	33
1.2.2.2.2. Sumoilació de Sp3.....	34
1.2.2.2.3. Acetilació de Sp3.....	35

1.2.2.3. Interaccions de Sp3 amb altres proteïnes.....	35
1.2.3. La regulació dependent de Sp1/Sp3.....	35
1.2.3.1. Similituds i diferències etre Sp1 i Sp3.....	36
1.2.3.2. Relació Sp1/Sp3.....	36
1.2.3.3. Vies regulades per Sp1/Sp3.....	37
2. ALTRES FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ.....	40
2.1. La família AP-1.....	40
2.1.1. Regulació transcripcional per AP-1.....	41
2.2. La família E2F.....	42
2.2.1. Regulació transcripcional per E2F.....	43
2.3. La família Myb.....	44
2.3.1. Regulació transcripcional per Myb.....	45
2.4. La família NF-1.....	46
2.4.1. Regulació transcripcional per NF-1.....	47
2.5. El factor de transcripció NF-Y.....	48
2.5.1. Regulació transcripcional per NF-Y.....	49
3. EL CICLE CEL·LULAR.....	51
3.1. Control del cicle cel·lular.....	51
3.2. Reparació del DNA.....	54
3.3. Degradació de proteïnes.....	56
OBJECTIUS.....	59
MATERIALS I MÈTODES.....	63

1. MATERIALS.....	65
1.1. Línies Cel·lulars.....	65
1.2. Vectors plasmídics.....	66
1.2.1. Vectors d'expressió eucariota.....	66
1.2.2. Vectors amb el gen <i>luc</i>	67
2. MÈTODES.....	68
2.1. Array d'anticossos.....	68
2.2. Immunoprecipitació de Cromatina.....	70
2.3. Mutacions puntuals.....	71
2.4. Real Time – PCR.....	71
RESULTATS.....	75
1. ARTICLE I: Characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp3 gene.....	77
2. ARTICLE II: Transcriptional regulation of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp3 gene by NF-1, c-Myb, B-Myb, AP-1 and E2F.....	91
3. ARTICLE III: Regulation of Sp1 by cell cycle related proteins.....	105
DISCUSIÓ.....	139
1. REGULACIÓ DEL PROMOTOR DE <i>Sp3</i>	141

2. REGULACIÓ DE <i>Sp1</i> PER REGULADORS DEL CICLE CEL·LULAR.....	146
CONCLUSIONS.....	154
BIBLIOGRAFIA.....	157

aa	aminoàcid
Ab	Anticòs
A	Adenina
AMV	Virus del Mosaic de l'alfalfa
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
bp	parells de bases
Btd	<i>Buttonhead</i>
BSA	Albúmina sèrica humana
C	Citosina
cdc(2,25A)	<i>Cell division cycle (2,25A)</i>
CDK	Cinasa depenent de Ciclina
cDNA	DNA complementari
ChIP	Immunoprecipitació de Cromatin
Ci, μ Ci	Curies, Microcuries
CK-II	<i>Casein kinase II</i>
CMV	Citomegalovirus
dNTPs	desoxirribonucleòtids trifosfat
CSRP	cofactor requerit per Sp1
Cys	Cisteina
DBS	Ruptures de la doble cadena
DHFR	Dihidrofolat Reductasa
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTPs	Trifosfat de desoxiribonucleòtids
DTT	1,4-ditiotreitòl
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMSA	Assaig de Retardació de la movilitat electroforètica
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G	Guanina
HDAC	Histona deacetilasa
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltons
M, mM, μ M, nM	Molar, milimolar, micromolar, nanomolar
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein kinase</i>
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
NF-Y	<i>Nuclear Factor Y</i>
nt	Nucleòtid
32 P	Isòtop 32 del fòsfor
PBS	Tampó fosfat salí
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Reacció en cadena de la Polimerasa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluorur
PP (1,2A)	<i>Protein phosphatase</i>
Rb	Retinoblastoma
RNA	Àcid ribonucleic
RNAsa	Ribonucleasa
RT	Transcriptasa Reversa
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SDS	dodecil sulfat sòdic
SKP1/2	<i>S phase kinase-associated protein</i>

ABREVIATURES

Sp	<i>Specificity Protein</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activator of Transcription</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Timina
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TE	Tampó Tris EDTA
TFIID	<i>Transcription Factor IID</i>
TNF	Factor de necrosi tumoral
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate</i>
Tyr	Tirosina
UI	Unitats interacionals
UTR	Regió no traduïda
UV	Ultraviolat
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular

PRESENTACIÓ



Aquest treball es troba emmarcat en un projecte d'estudi de la regulació del gen *dihidrofolat reductasa (dhfr)* que codifica per a la diana terapèutica del quimioteràpic Metotrexat. La sobreexpressió de la proteïna DHFR cursa amb un augment de la resistència al tractament amb aquest fàrmac. Estudis previs al nostre grup van demostrar que el promotor del gen *dhfr* era regulat al llarg del cicle cel·lular gràcies al factor de transcripció Sp1 i que la unió de Sp1 al promotor augmentava al llarg de la proliferació. Fins a aquell moment, s'havia considerat que Sp1 era un gen ubicu i que la seva expressió era constant.

Paral·lelament, en el nostre grup, es va estudiar la interacció entre Sp1 i la proteïna supressora de tumors Retinoblastoma. Aquestes dues proteïnes formen un complex que s'uneix al promotor del gen *dhfr* a través de la seqüència de reconeixement de Sp1 i es pot detectar a totes les fases del cicle cel·lular. A més, els nivells de proteïna de Sp1 i Rb augmenten al llarg de la proliferació. Altres estudis del nostre grup van demostrar que els nivells de mRNA de Sp1 augmentaven amb la incubació de cèl·lules amb concentracions baixes d'inhibidors de CDKs com la roscovitina, l'olomucina, l'UCN-01 o l'inhibidor endògen p21. Aquests inhibidors també produïen un augment en els nivells de mRNA de Rb. L'augment en els nivells de Sp1 i Rb es correlacionava amb un augment de l'activitat DHFR i un augment de la resistència al Metotrexat.

Donada la importància de Sp1 en la regulació del gen *dhfr*, es va estudiar el promotor del factor de transcripció *Sp1*. Aquest promotor està regulat principalment per Sp1, Sp3 i NF-Y, tot i que E2F1 també és capaç d'activar-lo. Sp1 és capaç d'activar la seva pròpia transcripció mentre que Sp3 és capaç de contrarestar aquesta activació.

Els estudis sobre el promotor de *Sp1* van permetre constatar un cop més que la regulació dependent de Sp està determinada de forma molt notable pel balanç Sp1/Sp3 a les cèl·lules, de forma que l'efecte final sobre un promotor específic dependrà del context i el tipus cel·lular. Per això, en el present treball, ens hem centrat especialment en l'estudi de la regulació del factor de transcripció Sp3, regulador dels gens estudiats anteriorment, *dhfr* i *Sp1*. En aquesta direcció, ens vam proposar estudiar la regulació del promotor de *Sp3*, tot comparant-la amb la regulació del promotor de *Sp1*, així com aprofundir en els mecanismes de regulació del promotor de *Sp1*.

Hem portat a terme una anàlisi detallada de la regió promotora del factor de transcripció Sp3 amb la identificació dels inicis de transcripció i les possibles caixes d'unió per a diferents

factors de transcripció. Així mateix, hem definit la seqüència mínima promotora i hem demostrat la unió dels factors Sp1, Sp3, NF-Y, NF-1, c-Myb, B-Myb i c-Jun a aquesta seqüència. D'altra banda hem estudiat l'efecte de la sobreexpressió i la inhibició d'aquestes proteïnes sobre l'activitat del promotor de *Sp3* i sobre els nivells endògens del seu mRNA. Sp3 s'autoregula de forma positiva i és també activat per Sp1, NF-Y, Myb, AP-1 i NF-1. Per contra, la transcripció de *Sp3* és reprimida per la sobreexpressió de E2F1/DP1.

Addicionalment s'ha estudiat la interacció de Sp1 amb diferents proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular i s'ha caracteritzat l'efecte de la seva sobreexpressió sobre l'activitat del promotor de *Sp1*, ja que aquest és regulat per Sp1. Sp1 és capaç d'interaccionar amb CDK4, p21, SKP2 i BRCA2. El promotor de *Sp1* és regulat de forma positiva per la sobreexpressió de CDK4, SKP2, BRCA2, Ciclina D1, E2F1/DP1 i Stat3; mentre que és reprimat per la sobreexpressió de p53 i NFκB. Els efectes d'aquestes proteïnes es van analitzar sobre els nivells de mRNA de Sp1, així com sobre l'activitat d'un promotor artificial que només contenia caixes Sp1.

La interacció entre Sp1-p21 va ser objecte d'estudi en més detall, gràcies a la col·laboració amb el grup del Dr. Roninson (Albany, NY). L'expressió de p21 en cèl·lules de fibrosarcoma indueix el promotor de *Sp1* així com els nivells de mRNA, però, al mateix temps, indueix la degradació de Sp1.

En resum, en aquest treball hem demostrat que la regulació transcripcional de Sp1 i Sp3 és un procés molt complex que depèn de l'efecte conjunt de diferents factors de transcripció, així com d'altres proteïnes que fins al moment no havien mostrat tenir efectes transcripcionals.

INTRODUCCIÓ



Perquè la informació genètica de l'individu (genotip) es converteixi en les proteïnes que li donen les característiques individuals corresponents (fenotip), el DNA s'ha de convertir primer en RNA mitjançant el procés de transcripció.

L'inici de la transcripció requereix una sèrie de processos que inclouen la descondensació del locus, el remodelament del nucleosoma, les modificacions de les histones, la unió dels factors de transcripció i coactivadors a les seqüències promotores i enhancers i el reclutament de la maquinària basal de transcripció al promotor.

La maquinària basal de transcripció està formada per la RNA polimerasa II juntament amb altres proteïnes, anomenades comunament factors de transcripció (Tjian and Maniatis, 1994). Els factors de transcripció poden estar units directament a la RNA polimerasa, a altres factors de transcripció o a les seqüències cis de DNA. Típicament, el lloc d'unió del complex iniciador de la transcripció, format per la RNA polimerasa II juntament amb d'altres proteïnes, és l'anomenada caixa TATA localitzada a uns 30 parells de bases del lloc d'inici de la transcripció. En absència de caixa TATA, l'inici de la transcripció es du a terme gràcies a la presència d'elements iniciadors o altres seqüències promotores com les caixes GC on s'uneixen els factors de transcripció de la família Sp.

El promotor d'un gen és la seqüència de DNA que conté els llocs d'unió per a la RNA polimerasa i els factors de transcripció necessaris per a la transcripció normal. A més del complex transcripcional de la RNA polimerasa II, existeixen nombrosos elements d'unió per a factors de transcripció a les regions promotores dels gens. Molts d'aquests factors són actius només en presència d'un determinat estímul o a un teixit concret, permetent la regulació de la transcripció en determinades situacions. Altres factors estan actius de forma constitutiva i són capaços d'unir-se al DNA i interaccionar amb el complex basal de transcripció augmentant la transcripció d'un gen concret.

Així doncs, la regulació transcripcional s'exerceix per l'acció combinada de la unió de proteïnes a diferents elements promotors i enhancers. Els llocs d'unió al DNA són reconeguts normalment per diferents proteïnes relacionades estructuralment (Latchman, 1990).

1. LA FAMÍLIA SP/KLF

La família de proteïnes Sp/KLF (specificity protein/Krüppel-like factor) és una família de factors de transcripció que es caracteritzen per la seva capacitat d'unir-se al DNA a les caixes GC i GT o CACCC presents a les zones promotores d'una gran varietat de gens cel·lulars i virals. Aquestes caixes s'han trobat i analitzat en promotors, enhancers i regions de control de *locus* (locus control regions LCR) de gens que estan sota diferents mecanismes de control, com la regulació del cicle cel·lular, l'activació hormonal i el patró de desenvolupament (Philipsen and Suske, 1999).

La característica més important dels membres de la família és la presència de tres dits de zenc tipus Krüppel. Aquest tipus de dits de zenc són presents a la proteïna Krüppel (de l'alemany lisiat) de *Drosophila melanogaster* i tenen com a característiques diferencials que el zenc està quelat mitjançant dos residus de cisteïna i dos d'histidina i que els dits estan connectats per una seqüència característica. Per aquesta raó alguns dels membres de la família s'han anomenat Krüppel-like factors (Turner and Crossley, 1999). S'ha descrit un gran número de proteïnes que contenen dits de zenc tipus Krüppel, però que no pertanyen a la família Sp/KLF. Per a que siguin considerats de la família, els factors han de tenir els dits de zenc a la zona C-terminal (Turner and Crossley, 1999). Els factors Sp-related també es troben en organismes simples pluricel·lulars com el nematode *Caenorhabditis elegans*, però no en organismes unicel·lulars com el llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Suske et al., 2005).

La família Sp/KLF està formada per 26 membres (Taula 1 i Fig 1) agrupats en dues subfamílies segons la seva similitud estructural: la subfamília Sp i la subfamília KLF. Tot i que totes les proteïnes reconeixen els mateixos llocs d'unió, les afinitats relatives per les seqüències varien i s'ha demostrat que els factors Sp s'uneixen amb més afinitat a les caixes GC (Thiesen and Bach, 1990) mentre que els KLF s'uneixen preferentment a les caixes GT (Crossley et al., 1996, Feng et al., 1994, Matsumoto et al., 1998, Shields and Yang, 1998).

Nom	Sinònims	AN	aa	Chr	Fenotip knockout	Ref.
SP1		NM_138473.2	785	12q13.13	Letal embrionari (E10)	[1]
SP2		NM_003110.3	606	17q21.32		
SP3	SPR-2	NM_003111.1	781	2q31.1	Letal perinatal. Hematopoiesi i desenvolupament de dents i ossos danyat	[2-4]
SP4	HF1B SPR-1	NM_003112.1	784	7p15	Retardament del creixement, desenvolupament sexual anormal, mort cardíaca	[5-7]

					repentina.	
SP5		NM_001003845.1	398	2q31.1	Sense fenotip aparent	[8]
SP6	KLF14	NM_199262.2	376	17q21.31/32		
SP7	OSX, osterix	NM_152860.1	431	12q13.13	No formació òssia	[9]
SP8		NM_182700.2	508	7p21.2	Mortalitat perinatal. Malformacions del cervell, esquelet posterior axial truncat i membres curts	[10,11]
SP9		(hCT1831218)	484*	2q31		
KLF1	EKLF	NM_006563.1	362	19p13	Letal embrionari (E14). Anèmia severa.	[12,13]
KLF2	LKLF	NM_016270.1	355	19p13.1	Letal embrionari (E12E14). Múltiples alteracions.	[14-17]
KLF3	BKLF	NM_016531.2	345	4p14	Desordre mieloproliferatiu progressiu	[18]
KLF4	GKLF EZF	NM_004235.1	470	9q31	Letalitat perinatal degut a la perdua de la barrera de pell. Requerit per a la diferenciació de les cèl·lules globet del colon.	[19,20]
KLF5	CKLF, IKLF BTEB2	NM_001730.2	457	13q21.33	Letalitat temprana embrionària.	[21]
KLF6	COPEB, GBF, ZF9, BCD1, CPBP, PAC1, ST12	NM_001300.2	283	10p15	Fallada letal de l'eritropoesi.	[22]
KLF7	UKLF	NM_003709.1	302	2q32	Mort produïda per defectes neuronalss severa a 2 dies del naixement.	[23,24]
KLF8	BKLF3, DXS741, ZNF741	NM_007250.2	359	Xp11.21		
KLF9	BTEB, BTEB1	NM_001206.1	244	9q13	Defectes del comportament lleugers. Hiperplasia uterina i resistència parcial a la progesterona.	[25,26]
KLF10	EGRA, TIEG, TIEG1	NM_005655.1	480	8q22.2	Desenvolupament dels ossos alterat.	[27]
KLF11	FKLF, FKLF1, TIEG2	NM_003597.2	512	2p25.1	Sense fenotip aparent	[28]
KLF12	AP2REP, AP-2rep, HSPC122	NM_007249.3	402	13q22.1		

INTRODUCCIÓ

KLF13	BTEB3, FKLF2, NSLP1, FKLF-2, RFLAT1, RFLAT-1	NM_015995.1	289	15q13.2	Viable amb defetes a la diferenciació de les cèl·lules T.	[29]
KLF14	BTEB5	NM_138693.1	323	7q32.2		
KLF15	KKLF	NM_014079.2	325	3q21.3	Viable amb susceptibilitat augmentada a la distrofia cardíaca	[30]
KLF16	DRRF, BTEB4, NSLP2	NM_031918.1	252	19p13.3		
KLF17		NM_173484.3	389	1p34.1		

Taula 1. Tots els factors representats són humans. Els números dels aminoàcids corresponen a la isoforma més gran coneguda. * Deduït de la base de dades Ensembl human genome per comparació amb Sp9 de ratolí AY591908. [1] (M. Marin et al., 1997), [2-4] (Bouwman et al., 2000, Gollner et al., 2001b, Van Loo et al., 2003), [5-7] (Gollner et al., 2001a, Nguyen-Tran et al., 2000, Supp et al., 1996), [8] (Harrison et al., 2000), [9] (Nakashima et al., 2002), [10,11] (Bell et al., 2003, Treichel et al., 2003), [12,13] (Nuez et al., 1995, A. C. Perkins et al., 1995), [14-17] (Kuo et al., 1997a, Kuo et al., 1997b, Wani et al., 1998, Wani et al., 1999), [18] (Nilson et al., 2006)[19, 20] (Katz et al., 2005, Segre et al., 1999), [21] (Shindo et al., 2002), [22] (Matsumoto et al., 2006), [23,24] (Laub et al., 2006, Laub et al., 2005), [25,26] (Morita et al., 2003, Simmen et al., 2004), [27] (Subramaniam et al., 2005), [28] (Song et al., 2005), [29] (M. Zhou et al., 2007), [30] (Fisch et al., 2007)

La majoria dels factors de la família Sp/KLF són activadors transcripcionals, però alguns d'ells poden tenir efectes inhibitoris de la transcripció. Concretament, s'ha demostrat que Sp3, Sp4, KLF3, KLF5, KLF4 i KLF9 poden activar o reprimir la transcripció depenent de la línia cel·lular o del promotor examinat (Hagen et al., 1994, Turner and Crossley, 1999).

L'anàlisi filogenètica de la família mostra una gran quantitat de subgrups. A excepció del domini de dits de zinc, hi ha relativament poca homologia entre els membres de la família (Kaczynski et al., 2003) (Fig. 1).

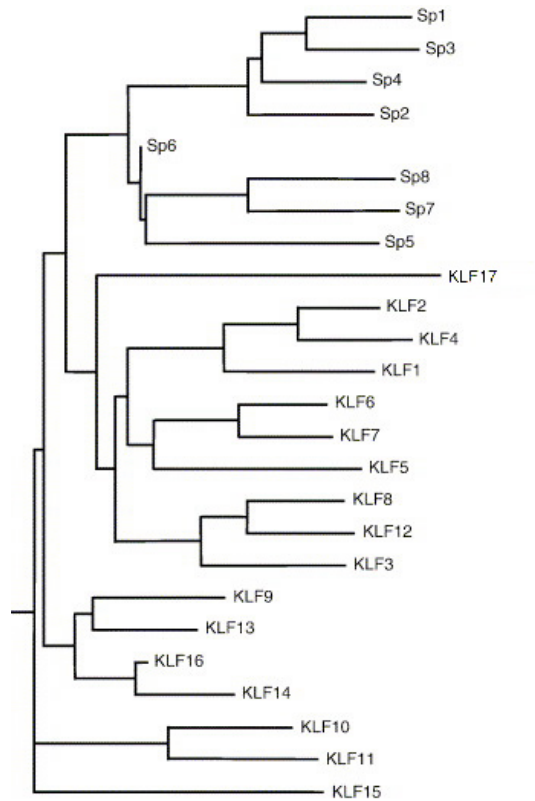


Figura 1. Relació entre els diferents factors de transcripció Sp/KLF humans. Els factors més similars estan agrupats. L'arbre filogenètic s'ha extret de (van Vliet et al., 2006). Per a generar l'arbre es van utilitzar les seqüències completes de les diferents proteïnes.

1.1. EL DOMINI D'UNIÓ AL DNA

L'agrupació dels tres dits de zinc és la característica més important dels membres de la família Sp/KLF. Sense excepcions, el domini de dits de zinc de les proteïnes Sp/KLF de mamífers consisteix en 81 aminoàcids que formen una estructura repetida de mòduls independents amb la seqüència consensu (Tyr, Phe)-X-Cys-X_{2,4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃₋₅-His-X₂₋₆. Estructuralment un dit de zinc Cys₂-His₂ és un motiu $\beta\beta\alpha$ estabilitzat per la quelació d'un ió de zinc unit a histidines i cisteïnes, i s'uneix a una seqüència concreta de 3bp a través de la α -hèlix (Pavletich and Pabo, 1991). El fet de que estiguin altament conservats, no només en les unitats Cys₂-His₂, si no també en les regions entre dits (Fig. 2), recolza la idea de que els dits actuen com una sola unitat.

La porció α -hèlix de cada dit és capaç d'encaixar al solc major del DNA de manera que la unió dels dits successius fa que la proteïna s'enrotlli al voltant del DNA. Cada dit de zinc típicament reconeix 3 parells de bases successius de la seqüència del DNA.

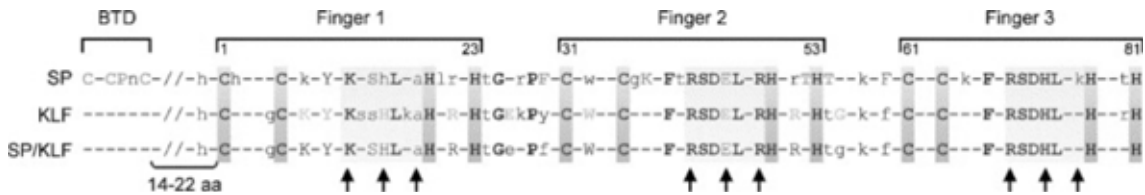


Figura 2. Característiques dels membres de la família Sp/KLF. Seqüències consensu del domini en dits de zinc de tots els factors Sp i KLF. Es mostren les seqüències per als factors Sp, KLF i per a la família completa. Tots els dominis són de 81 aminoàcid en humans. La regió altament conservada BTB a la zona N-terminal dels dits de zinc només es troba a les proteïnes Sp. Les fletxes indiquen els residus que probablement determinen l'especificitat de reconeixement dels dits a través dels contactes amb les bases del DNA. (Suske et al., 2005)

El conjunt dels tres dits de zinc reconeix la seqüència general de CCN CNC CCN (Klevit, 1991), per tant, reconeix una seqüència rica en G i C, anomenada GC (GGGGCGGGG) o GT(GGTGTGGGG) i també caixa CACCC. S'ha determinat per cristal·lització l'estructura del domini de dits de zinc de Sp1 unit a la seva diana (Elrod-Erickson et al., 1996, Pavletich and Pabo, 1991). Els tres dits de zinc ocupen el solc major del DNA (Elrod-Erickson et al., 1996). La proteïna interacciona amb les dues cadenes de DNA, però la major part del contacte es fa amb la cadena rica en guanines. S'ha observat que els tres dits de zinc no contribueixen amb la mateixa força en la unió al DNA. Els dits de zinc 2 i 3 tenen una major afinitat d'unió al DNA que el dit de zinc 1 (Kriwacki et al., 1992, Kuwahara et al., 1993, Saegusa et al., 1997, Yokono et al., 1998). Aquest fet també es demostra perquè la seqüència de DNA on s'uneixen els dits de zinc 2 i 3 està més conservada que la del dit de zinc 1 (Bucher, 1990, Shi and Berg, 1995, Thiesen and Bach, 1990).

En el cas del factor de transcripció Sp1 s'ha analitzat la forma d'unió concreta de cada dit de zinc al DNA, com es mostra a la següent figura:

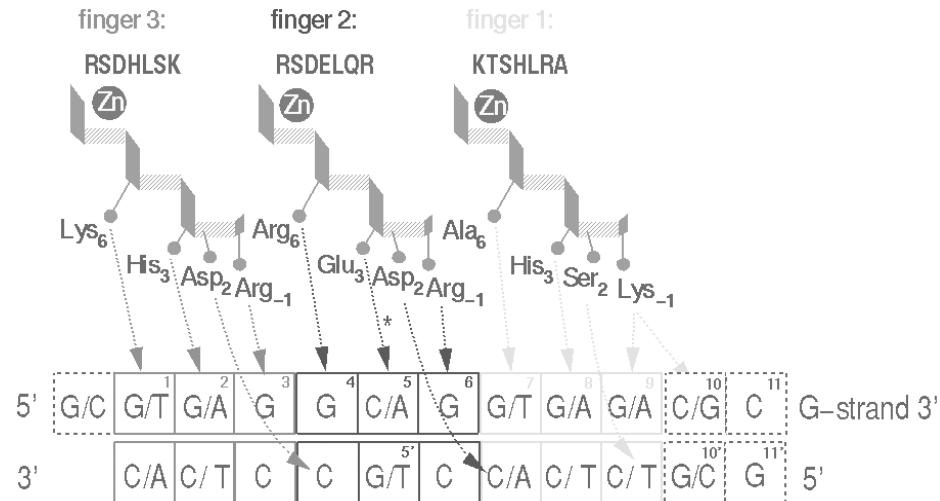


Figura 3. Diagrama del reconeixement modular entre el triplet de DNA que conté les bases permeses i els tres dits de zenc. Les fletxes indiquen contactes directes, mentre que els asteriscs representen discriminació per repulsió electrostàtica. Les caixes puntejades contenen bases situades a fora del lloc d'unió mínim. (Marco et al., 2003).

1.2. LA FAMÍLIA SP

Sp1 va ser considerat durant molt de temps la única proteïna capaç de regular la transcripció a través de les caixes GC i GT. Aquesta visió va canviar quan es van clonar els factors relacionats Sp2, Sp3 i Sp4 (Hagen et al., 1992, Kingsley and Winoto, 1992). Va seguir la identificació de Sp5 (Harrison et al., 2000), Sp6 o KLF14 (Schohy et al., 2000), Sp7 o Osterix (Nakashima et al., 2002) i Sp8 (Ravasi et al., 2003). Finalment, Sp9 es va identificar per comparació de seqüències a partir de la proteïna aïllada en pollastre i encara no s'ha estudiat la proteïna Sp9 humana (Kawakami et al., 2004).

Els membres de la subfamília Sp, a més de tenir en comú el domini d'unió al DNA, tenen regions conservades a la zona N-terminal. La característica diferencial més important entre les proteïnes Sp i KLF és la presència a les proteïnes Sp de l'anomenada caixa Buttonhead (Btd) immediatament a la regió N-terminal del domini de dits de zenc (Harrison et al., 2000). Aquesta regió conservada d'onze aminoàcids va ser identificada a l'homòlog de Sp1 de *Drosophila* Buttonhead (Btd) (Wimmer et al., 1993) i es creu que contribueix a la capacitat transactivadora d'aquestes proteïnes (Athanihar et al., 1997, Yieh et al., 1995). El fet que la caixa Btd també es trobi als factors Sp de *Drosophila* i *C.elegans* suggereix que té un paper important a nivell fisiològic. Una altra regió conservada entre les proteïnes Sp és la caixa Sp que consisteix en la seqüència SPLALLAATCSR/KI localitzada a l'extrem N-terminal de les proteïnes. Aquest element conté un lloc de tall endoproteolític i està a prop de la regió N-terminal diana de la degradació dependent del proteasoma *in vitro* (Su et al., 1999).

Les proteïnes Sp estan agrupades en clusters gènics HOX (Philipsen and Suske, 1999) i situades de dos en dos amb els promotors encarats l'un a l'altre (Fig.4). L'únic membre que està localitzat independentment als altres és Sp5. Sp1-Sp7 es troben al cromosoma al 12q13.13 (HOX C); Sp2 - Sp6 al 17q21.31/32 (HOX B); Sp3 – Sp9 i Sp5 al 2q31.1 (HOX D); Sp4 - Sp8 al 7p21.2 (HOX A). Aquests agrupaments suggereixen que els gens Sp provenen d'un avantpassat comú per duplicacions en tàndem i duplicació cromosòmica.

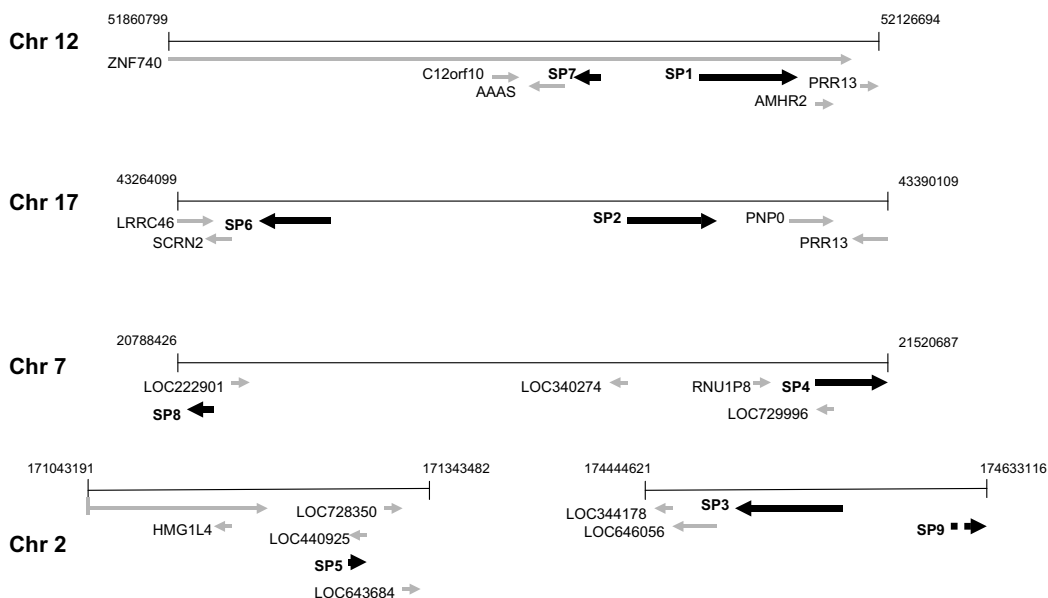


Figura 4. Localització cromosòmica dels gens de les diferents proteïnes Sp. Les fletxes negres corresponen als gens Sp. Els números al començament i final de la línia corresponen al número de nucleòtids del cromosoma.

Sp1, Sp2, Sp3 i Sp4 formen un subgrup basat en la seva similitud estructural (Fig. 5). Sp1-4 contenen dos dominis activadors rics en glutamina A i B necessaris per a l'activació transcripcional. Al costat d'aquests dominis, es troben seqüències riques en serina/treonina que poden ser dianes de modificacions post-traduccionals. Sp2 només conté un domini activador amb les seqüències adjacents altament conservades amb els altres membres del grup. Amb l'excepció de les caixes Btd i Sp, la regió N-terminal de les proteïnes Sp5-9 és completament diferent de la dels factors Sp1-4 i semblen ser formes truncades d'aquestes, on les regions N-terminals s'han deletat (Bouwman and Philipsen, 2002).

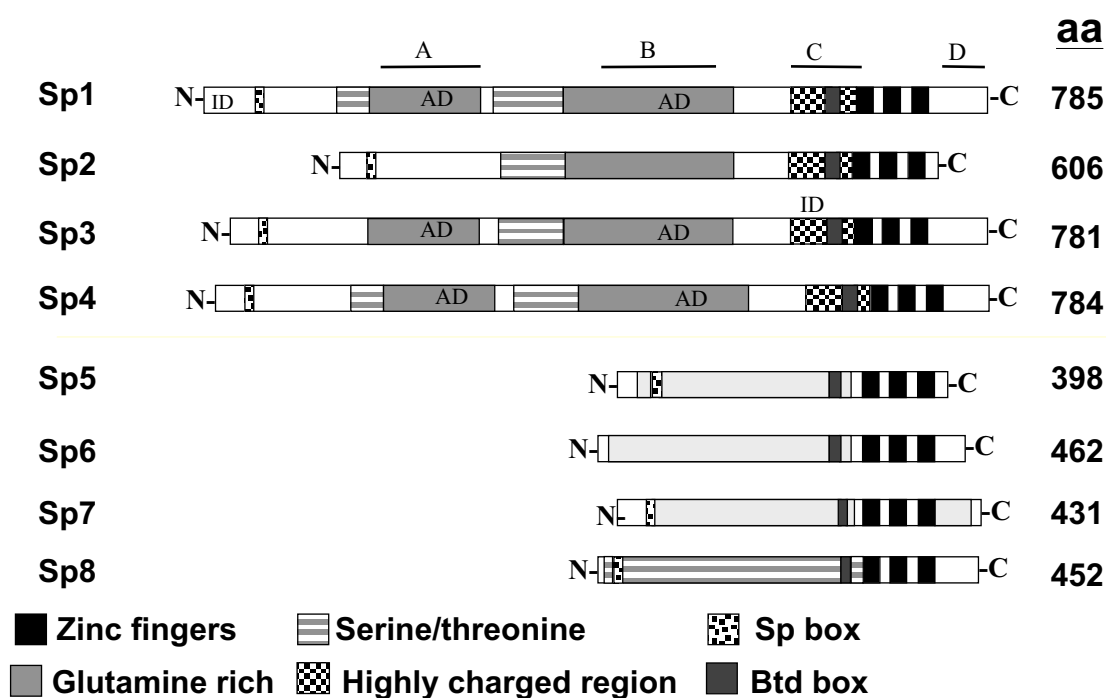


Figura 5. Característiques estructurals de les proteïnes Sp. Esquema representatiu on es mostren les caixes Btd, Sp, regions riques en serina/treonina, glutamina i amb aminoàcids carregats, els dits de zenc, els dominis activadors (AD) i inhibidor (ID). Les regions A, B, C i D de Sp1 (Courey and Tjian, 1988) també estan indicades. A la dreta la longitud en aminoàcids segons els números d'accés: P08047 (Sp1), M97190 (Sp2), Q02447 i AF494280 (Sp3), CAA4853 (Sp4), XM_092566 (Sp5), XP_064386 (Sp6), AF477981 (Sp7) i AK056857 (Sp8). (Bouwman and Philipsen, 2002). La proteïna Sp9 encara no ha estat caracteritzada i per això no es troba representada.

L'alineament aminoacídic del domini d'unió al DNA, dins dels membres de la família Sp, mostra com les proteïnes Sp1, Sp3 i Sp4 estan més properes entre elles que de Sp2. Conseqüentment, Sp1, Sp3 i Sp4 reconeixen la seqüència clàssica consensus d'unió per Sp1 amb igual afinitat (Hagen et al., 1992) mentre que Sp2 reconeix una seqüència consensus lleugerament diferent degut a la substitució d'una histidina per una leucina en el primer dit de zenc (Kingsley and Winoto, 1992).

El patró d'expressió varia entre les diferents proteïnes Sp. Mentre Sp1, Sp3 i Sp6 s'expressen a tots els teixits i Sp2 s'ha detectat en diferents línies cel·lulars, Sp4 s'expressa de forma elevada al sistema nerviós central i és abundant als teixits epitelials, dents en desenvolupament i testicles. Sp5 té un patró d'expressió molt dinàmic durant l'embriogènesi en ratolins al cervell en desenvolupament, la medulla espinal, el gangli trigeminal i altres zones del sistema nerviós. Els ratolins knockout de Sp7 no poden formar ossos, demostrant la importància d'aquesta proteïna en aquests

teixits. El patró d'expressió de Sp8 i Sp9 encara no està encara estudiat (Bouwman and Philipsen, 2002).

1.2.1. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ Sp1

Sp1 va ser un dels primers factors de transcripció eucariotes en ser identificat i es va clonar per la seva capacitat d'unir-se al promotor del Simian Virus 40 (SV40) (Dyran and Tjian, 1983) i al promotor de la timidina quinasa (TK).

Sp1 està codificada per un mRNA complet de 8,2 Kb, tot i que s'han descrit altres formes minoritàries. S'han observat fins a quatre variants d'empalmament diferents durant l'espermatogènesi en ratolins (4.1, 3.7, 3.2 i 1.4 Kb), que codifiquen per a diferents formes de la proteïna (90-60KDa) amb funcions diferencials durant el desenvolupament de les cèl·lules geminals masculines (K. Thomas et al., 2007). A més, s'han observat variants de trans-empalmament al mRNA de Sp1 en cèl·lules humanes HepG2 i en cèl·lules de rata formant-se la seqüència d'exons 3-2-3 en ambdós casos i 3-3 en rata (Takahara et al., 2000, Takahara et al., 2002).

Pel que fa a la proteïna, només s'ha identificat una forma en humans, d'entre 95 i 105 KDa, mentre que en ratolins s'ha identificat una forma de 48kDa anomenada mSp1-S produïda per empalmament alternatiu, on falten els dominis A i B necessaris per a interaccionar de forma sinèrgica. La capacitat transcripcional de mSp1-S és diferent de la de Sp1 sencer (Persengiev et al., 1995).

Sp1 és important per al control de la transcripció dels gens constitutius que no contenen caixa TATA ni element iniciador, ja que és capaç d'unir-se a la maquinària basal de transcripció i determinar l'inici de transcripció d'aquests gens. Durant molt de temps es va considerar que la seva única funció era la regulació d'aquests gens constitutius, però actualment es sap que els nivells de Sp1 varien al llarg del desenvolupament (Saffer et al., 1991), del cicle cel·lular (Black et al., 1999, Noe et al., 1997) i de la diferenciació (Leggett et al., 1995, Vinals et al., 1997) i que Sp1 juga un paper important en la regulació de gens en tots aquests processos.

L'activitat transcripcional de Sp1 és molt complexa i tot i que es comporta habitualment com a activador transcripcional també s'ha descrit com a inhibidor de la transcripció en algunes ocasions (N. Li et al., 1998a, Murata et al., 1994, Ogra et al., 2001, Shou et al., 1998, Zaid et al., 2001). Aquesta complexa regulació ve determinada per diferents mecanismes interrelacionats entre els que es troben: els nivells de proteïna, les modificacions posttraduccionals, les interaccions proteïna-proteïna i la competició pel lloc d'unió amb altres proteïnes.

1.2.1.1. REGULACIÓ DELS NIVELLS DE Sp1

L'alteració dels nivells de Sp1 s'ha relacionat amb diverses malalties com el càncer (Safe and Abdelrahim, 2005), l'esquizofrènia (Ben-Shachar and Karry, 2007) o l'Alzheimer (Santpere et al., 2006).

Els nivells de proteïna Sp1 varien al llarg del cicle cel·lular en cèl·lules de hámster amb una disminució de la proteïna després de deprivació de sérum i un posterior augment després d'addicionar-lo (Noe et al., 1997). D'altra banda, nombrosos estudis han demostrat una disminució en l'activitat de Sp1 en teixits d'animals vells així com en cèl·lules senescentes (Adrian et al., 1996, Ammendola et al., 1992, Araki et al., 1991, Bouwman and Philipsen, 2002, Helenius et al., 1996, J. E. Oh et al., 2007) degut a una disminució en la seva estabilitat (J. E. Oh et al., 2007, Spengler and Brattain, 2006). Per tant, els nivells intracel·lulars de proteïna Sp1 depenen de la transcripció del gen i la degradació de la proteïna.

Per a determinar la regulació de la transcripció de Sp1, el nostre grup va clonar i estudiar el promotor de *Sp1*. Es va situar l'inici de transcripció a la posició -63 de l'ini de traducció i es va establir el promotor mínim entre les posicions -443 i -20 (Fig. 6). El promotor de Sp1 és una zona rica en GC i sense caixa TATA ni element iniciador. La transcripció de Sp1 està regulada principalment per les proteïnes Sp1, Sp3 i NF-Y. És destacable el paper que té Sp1 sobre la seva pròpia regulació de manera que Sp1 està autorregulat positivament mentre que Sp3 es comporta de forma inactiva i competeix pel lloc d'unió amb Sp1, contrarrestant així el seu efecte. NF-Y i E2F1 són també activadors transcripcionals de Sp1 (Nicolas et al., 2003, Nicolas et al., 2001).

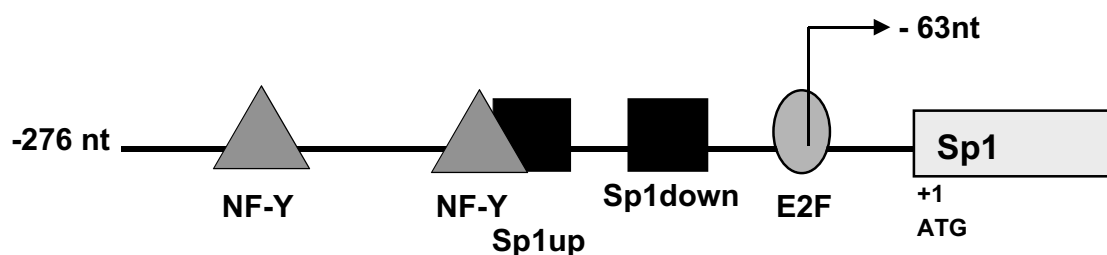


Figura 6. Regió promotora del gen *Sp1*. S'indiquen les diferents caixes per a factors de transcripció, així com l'inici de transcripció (fletxa). La numeració és relativa a l'inici de traducció.

La degradació de Sp1 pot ser activada per diferents estímuls. Les proteases que regulen la degradació de Sp1 i el mecanisme que activa aquestes proteases varia considerablement amb el tipus cel·lular i estímulo. En cèl·lules T humanes els retinoids promouen la proteolisi per activació de les caspases, i genera un pèptid de la zona

C-terminal que podria ser un inhibidor de la transcripció, donat que és capaç d'unir-se al DNA però no d'activar la transcripció (Rickers et al., 1999).

En cèl·lules de ronyó de rata, s'ha descrit un procés de degradació en que primer es produeix un tall endoproteolític dels 54 aminoàcids de la regió N-terminal i seguidament una degradació de la porció C-terminal. Estudis recents han demostrat que la proteïna que es forma després del primer tall és més activa que Sp1 sencer tot i que és inestable. (Su et al., 1999). La degradació de Sp1 en cèl·lules de pulmó també pot tenir lloc a través d'una proteasa trypsin-like de rata en presència de LPS (Ye and Liu, 2002).

Sp1 també pot ser degradat per una proteasa cathepsin-like anomenada Spasa que s'expressa a la línia cel·lular de ronyó de mico CV-1 (Nishinaka et al., 1997). Aquesta Spasa té relativa especificitat de substrat i també és capaç de degradar Rb fosforilat, però no a altres factors com c-Jun o c-Fos. L'expressió d'aquesta proteasa és regulada a través del cicle cel·lular amb nivells màxims en G1/S (Fu et al., 1998).

1.2.1.2. MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS DE Sp1

L'alteració de l'activitat de Sp1 relacionada amb patologies pot cursar amb nivells normals de proteïna i mRNA i estar produïda per una alteració de les modificacions posttraduccionals. En el nostre grup s'ha observat una relació entre l'augment de la fosforilació de Sp1 en cèl·lules resistents al quimioteràpic metotrexat i la sobreexpressió de la AKR1C1 en aquestes cèl·lules, factor que afavoreix la resistència (Selga et al., 2008).

La primera evidència de que la proteïna Sp1 era modificada posttraduccionament correspon a l'observació de que la proteïna Sp1 produïda en *Escherichia coli* es comporta com a un activador transcripcional menys efectiu *in vitro* que la proteïna derivada de cèl·lules HeLa (Kadonaga et al., 1988).

Les principals modificacions que afecten a Sp1 són: fosforilació, glicosilació, acetilació i sumoilació (Bouwman and Philipsen, 2002, Spengler and Brattain, 2006).

1.2.1.2.1. Fosforilació de Sp1

La fosforilació de Sp1 pot regular gens de forma positiva i negativa. Sp1 pot ser fosforilat per moltes cinases i aquesta fosforilació es veu afectada per fosfatases. La fosforilació té lloc a diferents posicions de Sp1 de les quals s'han identificat cinc diferents (Fig. 7, taula 2), incloent la regió C-terminal. Els efectes de la fosforilació produeixen canvis funcionals com l'alteració de la capacitat d'unió al DNA o la capacitat transactivadora. Les cinases capaces de fosforilar Sp1 són: DNA-PK, PKA,

PKC- ζ , casein kinase II, ERK, CDKs i altres identificades només pel seu pès molecular i l'activitat cinasa (Chu and Ferro, 2005). Sp1 es pot fosforilar com a resposta a diferents senyals com infeccions víriques, factors de creixement, certes drogues, citocines, estrès, etc (Chu and Ferro, 2005).

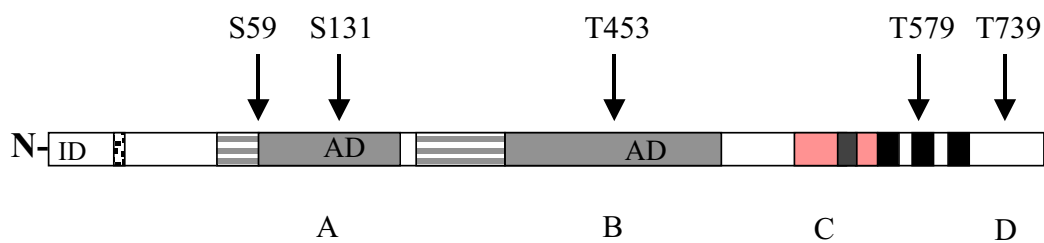


Figura 7. Representació esquemàtica dels llocs de fosforilació als diferents dominis de Sp1.

Pel que fa a les infeccions virals, la infecció per SV40 és un exemple clàssic que produeix un clar augment dels nivells i la fosforilació de Sp1 (Jackson et al., 1990). Es creu que aquest augment de la fosforilació és produït per la supressió de fosfatases, com la proteïna fosfatasa 2 (PP2A) (Pallas et al., 1990). La fosforilació de Sp1 també es veu augmentada per la infecció del virus HIV-1 gràcies a la cinasa DNA-PK i això s'ha correlacionat amb l'activació de l'expressió del promotor de HIV-1-LTR (long terminal repeat) per la proteïna Tat del virus (Chun et al., 1998).

Durant el cicle cel·lular es produeix un augment de la fosforilació en G1 que es correlaciona amb un augment de l'activitat de Sp1 i la regulació de certs gens importants per a aquesta fase del cicle. S'ha proposat que la fosforilació de Sp1 pot produir-se al llarg de tot el cicle per complexes ciclina-CDK, excepte en la fase M. Fins al moment, s'ha descrit que Sp1 pot formar complexos estables amb ciclina E/CDK2 i ciclina A/CDK2 mentre està unit al DNA (Banchio et al., 2004), tot i que no es pot descartar la seva unió amb altres CDKs.

Diferents factors de creixement són capaços d'induir la fosforilació de Sp1. EGF (epidermal growth factor) activa la fosforilació de Sp1 a través de MEK (Chupreta et al., 2000, Milanini et al., 1998, Zheng et al., 2001). La via de senyalització de MEK-ERK també fosforila a Sp1 quan és activada per FGF-2 (fibroblast growth factor) (Bonello and Khachigian, 2004). D'altra banda també s'ha proposat que la disminució de la fosforilació de Sp1 està relacionada amb un creixement ràpid, indicant que els efectes sobre Sp1 varien en funció del factor de creixement (Chu and Ferro, 2005).

Cinasa o Fosfatasa	Senyal	Residus	Efecte	Ref
DNA-PK	HIV-1 Tat	N-terminal (610aa) Ser131	Sense canvis	[1,2]
CKII	Diferenciació terminal	C-terminal (Thr579)	Disminució unió	[3,4]
CDK2	CyclinA	Ser59	Augment unió i efecte	[5,6]
ERK2	EGF		Augment	[7,8]
PKA			Augment	[9]
PKC- ζ			Augment	[10]
Activitat kinasa associada a Sp1 (growth-related)	Estimulació amb sèrum	aa 612-678	Augment activitat	[11]
60kd cinasa	Neu differentiation factor (NDF)		Augment	[12]
P42/p44 MAPK		Thr453 Thr739	Augment	[13]
PI3 kinase	HNF		Augment activitat	[14]
ERK1/2	FGF-2, drogues antiinflamatories no esteroidals	Thr453 Thr739	Augment	[15,16]
PP1	Glucosa, Trombopoietina		Disminució	[17-20]
PP2A	CD2/CD28 estimulació Lysophosphatidylcoline		Disminució	[21,22]

Taula 2. Llistat de fosforilacions de Sp1 amb les cinases i fosfatases implicades. [1,2] (Chun et al., 1998, Jackson et al., 1990), [3,4] (Armstrong et al., 1997, Leggett et al., 1995), [5,6] (Fojas de Borja et al., 2001, Haidweiger et al., 2001), [7,8] (Chupreta et al., 2000, Merchant et al., 1999), [9] (Rohlf et al., 1997), [10] (Rafty and Khachigian, 2001), [11] (Black et al., 1999), [12] (Alroy et al., 1999), [13] (Milanini et al., 1998), [14] (Reisinger et al., 2003), [15,16] (Bonello and Khachigian, 2004, Pan and Hung, 2002), [17-20] (Chu et al., 2003, Daniel et al., 1996, Schafer et al., 1997, Z. Wang et al., 1999b), [21,22] (Cieslik et al., 1999, Lacroix et al., 2002)

1.2.1.2.2. Glicosilació de Sp1

Sp1 va ser el primer factor de transcripció pel que es va descriure una modificació d'aquest tipus (Jackson and Tjian, 1988). Aquesta modificació és catalitzada per la O-GlcNAc transferasa (OGT) i consisteix en la modificació de residus de serina i treonina per monosacàrids O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc).

Cada molècula de Sp1 té múltiples llocs susceptibles de ser glicosilats (Jackson and Tjian, 1988) i existeixen evidències de que alguns residus de Sp1 poden ser fosforilats i glicosilats alhora i que les dues modificacions són excloents.

Existeixen resultats contradictoris sobre l'efecte de la glicosilació de Sp1 degut al fet de que pot ser glicosilat en diferents punts. Així, la glicosilació de Sp1 pot ser modulada per la disponibilitat de glucosa extracel·lular i serveix com a sensor de la disponibilitat de nutrients, permetent l'acoblament de l'estat metabòlic i la transcripció de gens. La deprivació de glucosa juntament amb la activació de l'adenilat ciclase té com a resultat la hipoglicosilació de Sp1 que facilita la seva degradació pel proteasoma (Han and Kudlow, 1997).

D'altra banda, la glicosilació del domini activador de Sp1 sembla inhibir la seva capacitat transcripcional degut a la inhibició de les interaccions proteïna-proteïna entre Sp1 i altres activadors (Yang et al., 2001). Per contra, la hiperglicèmia pot induir la glicosilació de Sp1, augmentant la seva capacitat transcripcional per una disminució de la seva fosforilació (Du et al., 2000).

1.2.1.2.3. Acetilació de Sp1

Sp1 està acetilat de forma constitutiva a la lisina 703. El domini d'unió al DNA de Sp1 pot interaccionar amb la regió acetiltransferasa de p300 per a ser acetilat (Song et al., 2003, T. Suzuki et al., 2003). Un cop unit al DNA, Sp1 no pot unir-se a p300 ni ser acetilat (T. Suzuki et al., 2003). Estudis *in vitro* sugereixen que l'acetilació de Sp1 augmenta la seva unió al DNA i per tant la seva activitat. A més, s'ha determinat que la incubació amb inhibidors de HDAC augmenta l'acetilació de Sp1 i la seva capacitat activadora (Ferrante et al., 2003, H. Ryu et al., 2003). El problema que presenten aquests resultats és que no és possible discernir entre l'efecte dels inhibidors de HDAC sobre Sp1 i sobre la inhibició del reclutament de HDAC a la construcció reportera. És necessari per tant estudiar el paper de l'acetilació de Sp1 en més detall.

1.2.1.2.4. Sumoilació de Sp1

La sumoilació és el procés pel qual SUMO-1, -2 -3 són lligats de forma covalent reversible a lisines específiques de les proteïnes diana. La sumoilació s'ha relacionat amb diverses funcions reguladores com la localització subcel·lular, l'estabilitat protèica, la regulació de l'estructura de la cromatina, l'activitat dels factors de transcripció, la unió al DNA i l'ensamblatge de complexos protèics. Generalment, la sumoilació reprimeix l'activitat transcripcional encara que alguns estudis han demostrat l'efecte contrari (Gill, 2003, Verger et al., 2003).

Sp1 conté un motiu consensus de sumoilació localitzat a la regió de regulació negativa N-terminal (Spengler and Brattain, 2006). La lisina 16 sembla ser un punt de control important perquè quan s'ubiquïtina, el proteasoma és reclutat i es produeix el tall d'un domini d'unió a co-repressors que genera una forma de Sp1 més activa. Quan SUMO-1 competeix per la unió covalent de la lisina 16, la integritat del domini d'unió a co-repressors es manté, fent possible la unió de co-repressors que produeixen una repressió de la transcripció dependent de Sp1 (Spengler and Brattain, 2006).

1.2.1.3. INTERACCIONS DE Sp1 AMB ALTRES PROTEÏNES

Sp1 és capaç de formar interaccions amb ell mateix i amb nombroses proteïnes, i aquestes interaccions són de gran importància per a l'efecte final de Sp1.

Quan interacciona amb ell mateix un cop unit al DNA, Sp1 és capaç de formar multímers gràcies a la formació de llaços al DNA (L. Li et al., 2004). L'habilitat per formar complexos d'ordre superior amb ell mateix a través del seu domini D té com a resultat l'activació transcripcional sinèrgica per unió a múltiples llocs. Això suggereix que Sp1 pot establir interaccions entre promotors i elements regulatoris distals a través d'aquest mecanisme. A més, quan s'organitza com a multímer, Sp1 presenta múltiples llocs d'unió per a proteïnes localitzats al llarg de tota la proteïna.

Les proteïnes que interaccionen amb Sp1 es poden agrupar en diferents categories: la maquinària basal de transcripció, altres factors de transcripció, reguladors del cicle cel·lular, receptors nuclears i altres proteïnes.

1.2.1.3.1. Interacció de Sp1 amb la maquinària basal de transcripció

Com molts altres activadors, Sp1 requereix el complex factor de transcripció IID (TFIID) per a una estimulació eficient de la transcripció *in vitro* (Pugh and Tjian, 1990, Smale et al., 1990, Tanese et al., 1991, Q. Zhou et al., 1992). A més, Sp1 pot establir directament la unió de TFIID a les regions promotores (Kaufmann and Smale, 1994).

Diferents estudis han demostrat la interacció de Sp1 amb altres cofactors associats a la maquinària basal de transcripció com TBP (TATA binding protein), dTAFII130, hTAFII130, a través dels dominis activadors A i B, i hTAFII55 a través del domini C-terminal (Bouwman and Philipsen, 2002).

L'activació dependent de Sp1 requereix de la seva interacció amb el complex CRSP (S. Ryu and Tjian, 1999, S. Ryu et al., 1999, Taatjes et al., 2002). CSRP funciona en conjunció amb els factors associats a TBP i conté subunitats úniques polipeptídiques que es comparteixen amb altres complexos de cofactors (S. Ryu et al., 1999).

1.2.1.3.2. Interacció amb altres factors de transcripció

La majoria de dades sobre proteïnes que interaccionen amb Sp1 respon a la seva interacció amb altres factors de transcripció, ja sigui mentre un dels dos o tots dos factors estan units al DNA o independentment de la seva unió al DNA.

Alguns d'aquest factors són Oct-1, NF-Y, NFkB, E2F, Jun, MEF-2 i les proteïnes GATA. Aquests factors poden activar la transcripció de forma sinèrgica juntament amb Sp1 (Bouwman and Philipsen, 2002, Safe and Abdelrahim, 2005). Per exemple, Sp1 pot interaccionar directament amb E2F1-3, però no amb E2F4-5 (Lin et al., 1996) i aquesta interacció sembla necessària per a la transcripció de gens regulats al llarg del creixement i el cicle cel·lular com la timidina kinasa (Karlseder et al., 1996).

La unió amb factors de transcripció pot tenir també efectes negatius sobre l'activació produïda per aquests factors a través de diferents mecanismes. Per exemple, la proteïna PML (pro-myelocytic leukemia protein) s'associa amb el domini de dits de zinc de Sp1 i no permet la seva unió al DNA (Vallian et al., 1998). Aquest mateix mecanisme té lloc quan c-myc interacciona amb el domini d'unió al DNA de Sp1 impedit la seva unió al promotor de *p21* i per tant inhibint l'activació de *p21* (Gartel et al., 2001).

1.2.1.3.3. Interacció amb reguladors del cicle cel·lular

Sp1 és capaç d'interaccionar amb diferents reguladors del cicle cel·lular que inclouen oncogenes i gens supressors de tumors.

La transcripció dependent de Sp1 és una diana per a la transformació oncogènica produïda per la mutació de p53, donat que p53 salvatge és capaç d'inhibir la transcripció d'alguns gens com IGF-I, IGF-II i els promotors del receptor d'insulina mentre que p53 mutat té l'efecte oposat (Webster et al., 1996, L. Zhang et al., 2000). A més, l'habilitat de p53 d'inhibir l'angiogènesi s'ha relacionat amb la seva capacitat d'inhibir VEGF a través de les caixes Sp (Salimath et al., 2000). La unió directa de Sp1 amb p53 s'ha correlacionat tant amb l'augment com amb la disminució de l'activitat de

Sp1 i també amb l'alteració de la unió de Sp1 amb la maquinària basal de transcripció (Black et al., 1999).

Estudis al nostre grup van demostrar la interacció de Sp1 amb la proteïna Retinoblastoma. Aquesta interacció és independent de la fase del cicle cel·lular i es correlaciona amb un augment de l'activitat del promotor del gen *dhfr* (Noe et al., 1998).

El factor de transcripció Sp1 pot interaccionar amb la Ciclina A a través dels dits de zinc de Sp1 i la part N-terminal de la Ciclina (Haidweger et al., 2001). A més, s'ha descrit que la Ciclina D1 es pot unir a Sp1 i inhibir la transcripció mitjançada per aquest (Opitz and Rustgi, 2000).

1.2.1.3.4. Interacció amb receptors nuclears

Sp1 es pot unir a diferents receptors nuclears com el receptor d'estrogens (ER), progesterona (PR), androgens (AR), àcid retinoic (RAR), retinoic X (RXR), PPAR γ , vitamina D, HNF-4 i altres (Safe and Abdelrahim, 2005).

Els receptors nuclears poden formar complexos ternaris amb Sp1 i el DNA ric en GC. La unió de Sp1 augmenta en presència de receptors nuclears possiblement degut a canvis conformationals que incrementen l'estabilitat de la interacció Sp1-DNA (Husmann et al., 2000). La majoria dels receptors estudiats són capaços d'incrementar la unió de Sp1 al DNA, indicant que estan competint entre ells per la seva unió amb Sp1.

L'estrogen pot induir l'expressió dels gens de resposta a estrogen per la formació de complexos entre el receptor d'estrogen (ER) i Sp1 (K. Kim et al., 2003), on ambdós factors poden afavorir la unió de l'altre. Per exemple, ER- α pot augmentar l'afinitat de Sp1 per a activar el gen SK3 en cèl·lules L6 (Jacobson et al., 2003). D'altra banda, la interacció física entre Sp1 i el receptor d'àcid retinoic (RAR) comporta un augment de la transcripció de l'activador de *urokinase plasminogen* (Y. Suzuki et al., 1999).

1.2.1.3.5. Interacció amb altres proteïnes

S'ha demostrat que el domini en dits de zinc i el domini inhibitori de Sp1 estan involucrats en interaccions proteïna-proteïna amb els corepressors SMRT, NcoR i BcoR i que aquestes interaccions són importants per a la regulació transcripcional de Sp1 (J. A. Lee et al., 2005).

La unió de Sp1 amb la histona deacetilasa 1 (HDAC-1) pel seu domini C-terminal converteix a Sp1 en un repressor de la transcripció. La coexpressió de E2F1 es capaç de desplaçar HDAC1 de Sp1 (Doetzlhofer et al., 1999). A més d'interaccionar amb HDAC1, Sp1 també pot interaccionar amb una forma modificada de HDAC2, però no amb HDAC3 (J. M. Sun et al., 2002).

1.2.2. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ Sp3

Sp3 es va clonar a través de dos estudis independents sobre la contribució dels elements GC i GT a la transcripció específica de teixit (Hagen et al., 1992, Kingsley and Winoto, 1992). Estudis amb ratolins Sp3^{-/-} han revelat que existeix redundància de funcions entre Sp3 i altres membres de la família, però que Sp3 és imprescindible per a la diferenciació d'alguns tipus cel·lulars com les dents, els ossos o les línies geminals eritroides i mieloides (Gollner et al., 2001b, Van Loo et al., 2003, van Loo et al., 2007).

La regulació per Sp3 ha estat molt controvertida. La proteïna Sp3 és una proteïna bifuncional descrita com a activador i repressor transcripcional, i la seva funció depèn del context cel·lular i de l'estructura del promotor. Aquesta dualitat és deguda a la presència dels dominis activadors i d'un domini repressor situat entre el segon domini activador i el domini de dits de zinc. El domini inhibitori de Sp3 sembla tenir funció inhibidora per ell mateix, ja que és capaç de funcionar independentment de la seva posició a la proteïna o quan està fusionat a altres dominis activadors (Dennig et al., 1996). S'ha proposat que Sp3 pot comportar-se com a repressor quan està unit a promotors que contenen múltiples caixes d'unió, mentre que en promotors amb una única caixa d'unió es comporta com a activador (Majello et al., 1997).

Durant molts anys es va considerar que la forma completa de Sp3 era derivada d'un inici de traducció en un codó no-AUG i que dues isoformes més petites derivaven de llocs d'inici de traducció AUG interns (Kennett et al., 1997). Estudis per Oleksiak *et al.* van demostrar que la seqüència de DNA genòmic de Sp3 estava formada per tres exons addicionals en 5', que implicaven l'existència de 85 aminoàcids més (Oleksiak and Crawford, 2002). Recentment, Sapetschnig *et al.* van demostrar l'existència de quatre isoformes diferents, totes elles derivades d'inicis de traducció alternatius AUG. Les dues isoformes grans es comporten com a activadors transcripcionals, mentre que les dues petites que deriven d'inicis de traducció a l'exó 4 semblen ser sempre inactives (Sapetschnig et al., 2004).

Estudis recents han demostrat que el gen Sp3 està format per 7 exons que s'estenen més de 55kb i que existeixen tres transcrits predominants: el sencer amb 4 kb (AY441957), una variant d'empalmament de 3,6kb a la que li manquen l'exó 3 i l'exó 1 (AY441958), i que per tant no conté el primer domini activador, i un transcrit de 3,9 kb que no conté els exons 1 i 2 i que contindria una regió 5'-UTR alternativa (AY070137) (Fig.8) (Moran et al., 2004). A més s'ha descobert l'existència d'un pseudogen al cromosoma 13 (Moran et al., 2004). Un pseudogen es defineix com una seqüència no funcional amb una elevada homologia a un o més gens. Els pseudogens processats es caracteritzen per l'absència d'introns i de regions promotores (Mighell et

al., 2000). El pseudogen del cromosoma 13 és 93% idèntic al cDNA sense introns de Sp3, i està flanquejat per seqüències repetitives, suggerint que es podria haver insertat al genoma per retrotransposició (Mighell et al., 2000). Es desconeix si aquest pseudogen es pot transcriure o no.

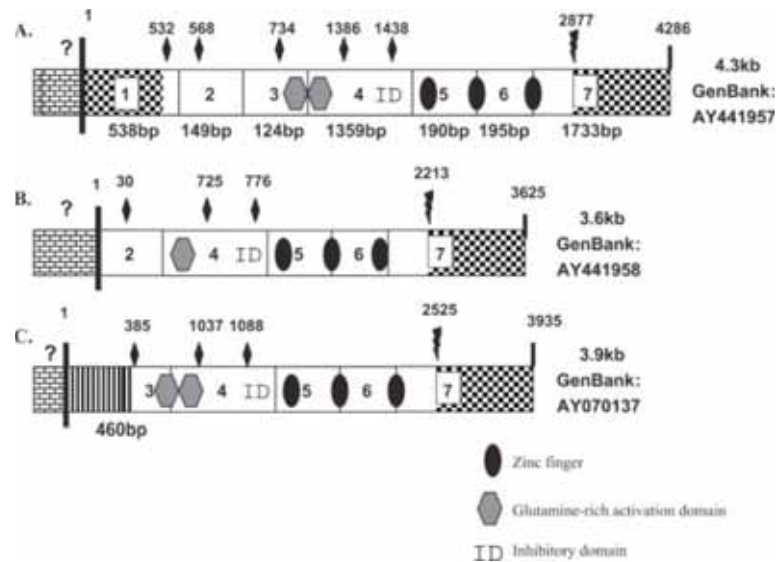


Figura 8. Estructura del cDNA de Sp3 i variants d'empalmament. Els rombs representen llocs putatius d'inici de la traducció i els números a sobre dels rombs representen el nucleòtid a dins del transcrit. Els hexàgons representen els dominis activadors i les rodones negres els dits de zinc.

Tot i que Sp3 va ser descoberta fa més de 14 anys, fa relativament poc temps que es té coneixement de la seva forma completa i les seves isoformes així com dels mecanismes posttraduccional més importants per a la seva regulació. Això implica que la majoria de treballs publicats fins al moment on s'han utilitzat plàsmids d'expressió per Sp3 sense una part important de la regió N-terminal són treballs incomplets.

Al igual que Sp1, la funció de Sp3 pot ser regulada a diferents nivells que inclouen: la regulació dels seus nivells, les modificacions posttraduccional, la interacció amb altres proteïnes i la competició pels llocs d'unió amb altres factors de transcripció.

1.2.2.1. REGULACIÓ DELS NIVELLS DE Sp3

Els nivells de Sp3 estan augmentats a diferents patologies com el càncer o l'Alzheimer (Boutillier et al., 2007). Els mecanismes de regulació dels nivells de Sp3

són encara força desconeguts i, fins al moment, el promotor de Sp3 no havia estat clonat ni analitzat.

S'ha observat que, durant la diferenciació de cèl·lules CaCo-2, els nivells de Sp3 disminueixen i aquesta disminució es correlaciona amb un augment de la monoamino oxidasa B (MAO) (Wong et al., 2003). Els nivells relatius de les diferents isoformes de Sp3 varien al llarg de la diferenciació amb un augment de l'expressió de les isoformes grans respecte a les petites en cèl·lules CaCo-2 diferenciades (Gartel et al., 2000).

Tot i que no s'ha demostrat, és possible que la Spasa pugui degradar també a Sp3, donat que el tractament amb aquesta proteasa produeix la completa abolició de l'efecte d'algunes caixes Sp (Bouwman and Philipsen, 2002).

1.2.2.2. MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS DE Sp3

Donada la similitud estructural que existeix entre Sp1 i Sp3, és possible que moltes de les modificacions que pateix Sp1, afectin també a Sp3.

Les modificacions posttraduccionals que pot patir Sp3 inclouen: fosforilació, acetilació i sumoilació. Al contrari que Sp1, Sp3 no pot ser glicosilat (Sapetschnig et al., 2004).

1.2.2.2.1. Fosforilació de Sp3

Es sap que Sp3 és una fosfoproteïna tot i que la seva fosforilació no ha estat tan estudiada com la de Sp1.

Sp3 pot ser fosforilat per la cinasa Erk, en una regió que només contenen les isoformes llargues, i aquesta fosforilació té un efecte positiu sobre l'activitat de Sp3 (Bakovic et al., 2003, Pages, 2007). A més, s'ha observat un augment de la fosforilació de les isoformes curtes i una disminució de la fosforilació de les isoformes llargues en cèl·lules transformades amb Ha-Ras (Bakovic et al., 2003).

L'augment dels nivells de ciclina A s'ha correlacionat amb un augment de la unió de Sp3 al possiblement per la fosforilació de Sp3 (Haidweger et al., 2001).

L'estat de fosforilació de Sp3 és regulat també per fosfatases i s'ha observat que la proteïna fosfatasa 2 és capaç de defosforilar Sp3 en cèl·lules de pulmó de rata (Chu et al., 2003).

1.2.2.2. Sumoilació de Sp3

La funció inhibidora de Sp3 s'ha atribuït a un triplet carregat (KEE) localitzat al domini inhibitori (Dennig et al., 1996). La lisina d'aquest triplet pot ser sumoilada i acetilada. La mutació d'aquesta lisina converteix a Sp3 en un potent activador transcripcional similar a Sp1 (Braun et al., 2001). La modificació de Sp3 per sumoilació és una de les més importants per a la regulació de la seva activitat i pel seu comportament com a activador o repressor transcripcional.

Sp3 és una diana de SUMO-1 *in vivo* i el lloc majoritari d'aquesta modificació és la lisina localitzada al domini inhibitori Lys551. La mutació d'aquesta lisina o la cotransfecció amb la proteasa de SUMO-1, SuPr-1, converteix a Sp3 en un activador transcripcional potent (Ross et al., 2002).

La sumoilació de Sp3 és un procés dinàmic; la modificació ve mitjançada per l'activació de l'enzim E1 Aos/Uba2, la conjugació de l'enzim E2 Ubc9 i la lligasa E3 PIAS1. La desumoilació és mitjançada per SENPs (SUMO-specific proteases).

A més la sumoilació de Sp3 modifica la seva localització cel·lular. En condicions normals, Sp3 es troba a la perifèria nuclear i en punts nuclears, i l'eliminació de SUMO-1, fa que la distribució de Sp3 al nucli sigui més difosa (Ross et al., 2002).

Les quatre isoformes de Sp3 són modificades per SUMO (Sapetschnig et al., 2004) i l'efecte és diferent en cadascuna d'elles. Estudis recents demostren que fins i tot les isoformes curtes de Sp3, tradicionalment considerades com a inactives, són capaces d'activar la transcripció del promotor de *SRC1A* quan s'evita la seva sumoilació, però no quan s'evita la seva acetilació (Ellis et al., 2006). Aquestes dades posen novament de manifest la importància de la sumoilació en el paper dual activador/repressor de Sp3.

1.2.2.3. Acetilació de Sp3

La lisina 551 situada al domini inhibitori pot ser acetilada per CBP i p300, però no per PCAF. Els efectes de l'acetilació sobre Sp3 són poc clars degut a que aquesta lisina pot ser modificada també per sumoilació. A més els estudis amb inhibidors de l'acetilació no permeten discriminar entre els efectes sobre Sp3 i sobre les HDACs.

Aquest residu de lisina és crític per a l'efecte inhibitori de Sp3 i, sembla que el control més important sobre ella és degut a la sumoilació. És possible que l'efecte de l'acetilació sigui precisament evitar la sumoilació del domini inhibitori i per tant la inhibició de l'activitat de Sp3.

1.2.2.3. INTERACCIONS DE Sp3 AMB ALTRES PROTEÏNES

La majoria d'interaccions proteïna-proteïna estan descrites per a la proteïna Sp1, però la similitud entre Sp1 i Sp3 i el fet que algunes interaccions es donen en dominis de Sp1 amb alta homologia amb Sp3 com el C-terminal, suggereix que moltes d'aquestes proteïnes poden interaccionar també amb Sp3.

Una de les hipòtesis de l'acció negativa de la sumoilació sobre l'activitat de Sp3 es basa en que SUMO és capaç de reclutar corepressors que reprimeixen l'activitat de Sp3. Aquesta teoria està d'acord amb el clonatge de la proteïna SIF-1 (Sp3-interacting protein 1) que interacciona específicament amb el domini inhibitori de Sp3 (Suske, 1999).

Existeixen evidències de que Sp3, al contrari que Sp1, no pot formar múltimers i, per tant, no pot establir els mateixos complexos protèics d'ordre superior (Yu et al., 2003).

Les dades sobre la interacció entre Sp1 i Sp3 són contradictòries, alguns estudis demostren que es troben formant part d'un mateix complex, mentre altres demostren que no és així (L. Li et al., 2004). Aquestes diferències podrien ser degudes als diferents mètodes experimentals o a que la interacció Sp1/Sp3 fos dependent del tipus o estat cel·lular.

Algunes proteïnes de la maquinària basal de transcripció es poden unir tant a la isoforma gran com a les petites de Sp3 (Kennett et al., 2002).

Sp3 pot reclutar a HDAC1 i HDAC2 al promotor de TFIIB i inhibir la seva activitat (Spencer and Davie, 1999). A més, les HDACs semblen jugar un paper important en la funció repressora de Sp3 (Spengler and Brattain, 2006).

Finalment, diferents estudis han demostrat la interacció de Sp3 amb altres reguladors transcripcionals com E2F i NF-YA, GABP, la família de p53 (p63 i p73), NFκB o Rb i aquestes interaccions semblen tenir efectes positius sobre l'activitat de Sp3 (Koutsodontis et al., 2005, Liu et al., 2004, Rotheneder et al., 1999, Udvadia et al., 1995, Yamada et al., 2000).

1.2.3. LA REGULACIÓ DEPENDENT DE Sp1/Sp3

La similitud estructural entre Sp1 i Sp3 així com la seva expressió ubicua semblaven indicar originàriament que totes dues proteïnes tenien propietats similars i funcions equivalents. Estudis bioquímics i biològics han demostrat posteriorment que Sp1 i Sp3 presenten múltiples diferències en quan a la seva funció i a la regulació d'aquesta funció. El que sí és cert, és que el fet que ambdues reconeixin les mateixes

seqüències d'unió al DNA fa que aquestes dues proteïnes actuïn conjuntament sobre els mateixos promotors ja sigui amb efectes equivalents o contraris.

1.2.3.1. SIMILITUDS I DIFERÈNCIES ENTRE Sp1 i Sp3

Sp1 i Sp3 comparteixen un 95% de similitud al domini d'unió al DNA, però presenten algunes diferències. La diferència més clara entre ambdues és que Sp3 presenta quatre isoformes mentre que Sp1 només una. Les isoformes grans de Sp3 tenen un tamany similar a Sp1 i per tant una estructura similar, però les dues petites són diferents ja que han perdut un dels dos dominis activadors (L. Li et al., 2004).

Ambdues proteïnes són modificades posttraduccionalment per fosforilació, acetilació i sumoilació, però el paper d'aquestes modificacions no és el mateix. La sumoilació de Sp3 té un paper clau en la regulació del pas d'activador a repressor, mentre que per Sp1 no sembla tenir un paper tan important. A més, mentre la glicosilació de Sp1 té un paper important en la seva estabilitat, Sp3 no sembla glicosilar-se (L. Li et al., 2004, Sapetschnig et al., 2004).

Una altra característica diferencial entre Sp1 i Sp3 és la seva localització subnuclear. Sp1 i Sp3 no colocalitzen probablement degut a la seva associació amb la matriu nuclear (He et al., 2005). La diferent localització de Sp1 i Sp3 pot jugar un paper en l'efecte temporal sobre un promotor per un factor abans que per l'altre. Sp1 i Sp3 mantenen aquesta localització separada al llarg de la mitosi i són completament desplaçats dels cromosomes condensats i dispersats per la cèl·lula (He and Davie, 2006). Els dos factors es reparteixen a parts iguals entre les cèl·lules filles i Sp3 és capaç d'entrar als nuclis fills abans que Sp1 per a unir-se als llocs d'unió abans que aquest (He and Davie, 2006).

La funció biològica de Sp1 i Sp3 també és diferent ja que els ratolins deficients en Sp1 o Sp3 presenten diferents fenotips. Els embrions Sp1^{-/-} moren al voltant del dia 10,5 de desenvolupament embrionari (M. Marin et al., 1997) mentre que els embrions Sp3^{-/-} arriben fins al naixement i moren només néixer per fallada respiratòria (Bouwman et al., 2000).

1.2.3.1. RELACIÓ Sp1/Sp3

Sp1 i Sp3 es poden unir als mateixos llocs d'unió i per tant competeixen pel lloc d'unió. Aquesta competició no té efectes molt importants quan les dues proteïnes es comporten com a activadors transcripcionals, però es de gran importància quan Sp3 es comporta com a repressor. De fet, en aquests casos, Sp3 es comporta com una

proteïna inactiva que competeix amb Sp1 pel lloc d'unió contrarrestant l'efecte d'aquest. Mutants de Sp3 que no contenen el domini d'unió al DNA no són capaços d'inhibir l'activació de Sp1 (Hagen et al., 1994). Així doncs, en aquells promotors en el que Sp1 sigui activador i Sp3 inhibidor, la relació a la cèl·lula entre Sp1 i Sp3 és la que determinarà el grau d'activació final del promotor. Nombrosos estudis han descrit la regulació de regions promotores per la relació Sp1/Sp3, donat que Sp3 es comporta en moltes ocasions com a inhibidor.

L'abundància de Sp1 i Sp3 varia entre les diferents línies cel·lulars. En queratinocits primaris, els nivells de Sp3 superen els de Sp1 i aquesta relació s'inverteix quan les cèl·lules es diferencien (Apt et al., 1996). També es produeixen canvis en la relació Sp1/Sp3 quan es cultiven miocits C2C12 en condicions hipòxiques. La hipòxia produeix una disminució progressiva de Sp3 mentre que els nivells de Sp1 es mantenen (Discher et al., 1998). Així, alguns enzims glicolítics com la isoforma M de la piruvat quinasa o la β -enolasa estan regulats per la relació Sp1/Sp3 i estan sobreexpressats en condicions d'hipòxia (Discher et al., 1998).

L'efecte final sobre els promotors regulats per la relació Sp1/Sp3 vindrà també determinat per l'estat de les modificacions posttraduccionals d'aquestes proteïnes així com de la relació existent entre les diferents isoformes de Sp3.

A més de competir entre ells pel lloc d'unió, Sp1 i Sp3 han de competir amb altres proteïnes de la família Sp/KLF, així com amb altres factors que tinguin caixes d'unió solapades. Aquest és el cas per exemple del promotor mínim de Sp1, que conté dues caixes Sp1, una d'elles solapada amb una caixa per al factor de transcripció NF-Y. La mutació de la caixa NF-Y té com a resultat un augment de l'activitat del promotor produït per una unió majoritària de Sp1, que és un activador més potent (Nicolas et al., 2003).

1.2.3.1. VIES REGULADES PER Sp1/Sp3

Sp1 i Sp3 s'han descrit com a reguladors de gens constitutius, específics de teixit i virals, així com de diferents processos com el cicle cel·lular o la diferenciació. A més, Sp1 és necessari per a prevenir la metilació de les illes CpG (L. Li et al., 2004).

Els ratolins knock out de Sp1 i Sp3 demostren que cap de les dues proteïnes és essencial per a l'expressió de molts gens que prèviament s'havia demostrat que eren controlats per elles. Els knock out de Sp3 presenten alteracions morfològiques a nivell de la formació dels ossos i les dents (Gollner et al., 2001b), així com alteracions de l'hematopoiesi (Van Loo et al., 2003) i del desenvolupament del cor (van Loo et al., 2007). Els ratolins heterozigots compostos Sp1^{+/-} Sp3^{+/-} no són viables i presenten

una gran varietat d'anormalitats com anèmia i defectes a la placenta. Aquests resultats indiquen que Sp1 i Sp3 actuen de forma conjunta en la regulació de dianes del desenvolupament de la placenta i altres teixits (Kruger et al., 2007).

L'alteració dels nivells de Sp1 i Sp3 ha estat àmpliament relacionada amb el càncer (Black et al., 2001, Safe and Abdelrahim, 2005). Cada cop existeixen més evidències de que els factors de la família Sp estan involucrats en la regulació de l'apoptosi i els promotors de molts gens proapoptòtics contenen caixes Sp. Aquests gens inclouen Fas i el lligand de Fas, Bcl-2,-3,-x, Bak, Bax, survivina, TGF- β i els seus receptors, TNF α (Black et al., 2001). Els factors Sp també juguen un paper important en l'angiogènesi ja que Sp1 i Sp3 estan involucrats en la regulació de VEGF i FGF, dues molècules centrals en el procés angiogènic. L'expressió de VEGF en línies cel·lulars tumorals està regulada a través de les caixes Sp (Safe and Abdelrahim, 2005). A més, Sp1 i Sp3 juguen un paper important en la regulació de gens associats amb el creixement cel·lular i la progressió a través del cicle cel·lular com p21, ciclina D1, E2F1, c-fos o TGF α , en la regulació de gens del metabolisme de purines i pirimidines com la timidilat sintasa, adenosina deaminasa, DNA polimerasa α (Safe and Abdelrahim, 2005) o dihidrofolat reductasa (*dhfr*), la regulació de la qual ha estat àmpliament estudiada en aquest grup (Ciudad et al., 1992, Ciudad et al., 1988, Noe et al., 1998, Noe et al., 1997). Estudis del nostre grup han relacionat l'increment de l'activitat de Sp1 amb un augment de la resistència al quimioteràpic metotrexat, ja que aquest és un inhibidor de la *dhfr*, i aquest gen està regulat a través de caixes Sp (Noe et al., 2001, Noe et al., 1997, Selga et al., 2008).

L'alteració de l'activitat de Sp1 i Sp3 ha estat relacionada amb altres patologies. S'ha detectat absència o nivells molt baixos de Sp3 en cèl·lules monocítiques de circulació perifèrica de pacients d'esclerosi múltiple (Grekova et al., 2000). A la malaltia d'Alzheimer també s'han trobat alteracions a la funció de Sp1 i Sp3. S'ha descrit l'augment dels nivells de Sp3 i Sp4 en cervells de malalts d'Alzheimer (Boutillier et al., 2007) i altres estudis han demostrat que les proteïnes Sp regulen l'expressió dels gens APP (β -amyloid precursor protein), BACE1, BACE2 i *tau*, totes elles proteïnes importants per al desenvolupament de la malaltia (Christensen et al., 2004, Heicklen-Klein and Ginzburg, 2000, X. Sun et al., 2005). A més, s'ha observat que els nivells de Sp1 estan disminuïts en esquizofrènia i això sembla estar relacionat amb l'expressió anormal de certs gens en aquesta patologia (Ben-Shachar and Karry, 2007).

A més de la regulació directa dels factors Sp sobre els diferents processos, les proteïnes Sp poden tenir un efecte indirecte sobre l'expressió d'altres gens ja que regulen la transcripció d'altres factors de transcripció que, al seu torn, podran estar

regulant l'expressió de molts altres gens. Per exemple, Sp1 pot regular l'expressió dels factor de transcripció E2F1 (W. Wang et al., 1999a) i B-Myb (Sala et al., 1999).

Així doncs, la família de factors de transcripció Sp està involucrada en la regulació de gens de tot tipus i la seva acció està regulada a diferents nivells fent que sigui possible la coordinació correcta dels diferents processos regulats. La resposta de les caixes Sp a un estímul concret cel·lular variarà en funció del promotor i del context cel·lular i intervindrà la competició entre els diferents membres de la família que dependrà de l'estat de les seves modificacions posttraduccionals i dels nivells relatius de tots ells. (Fig. 9).

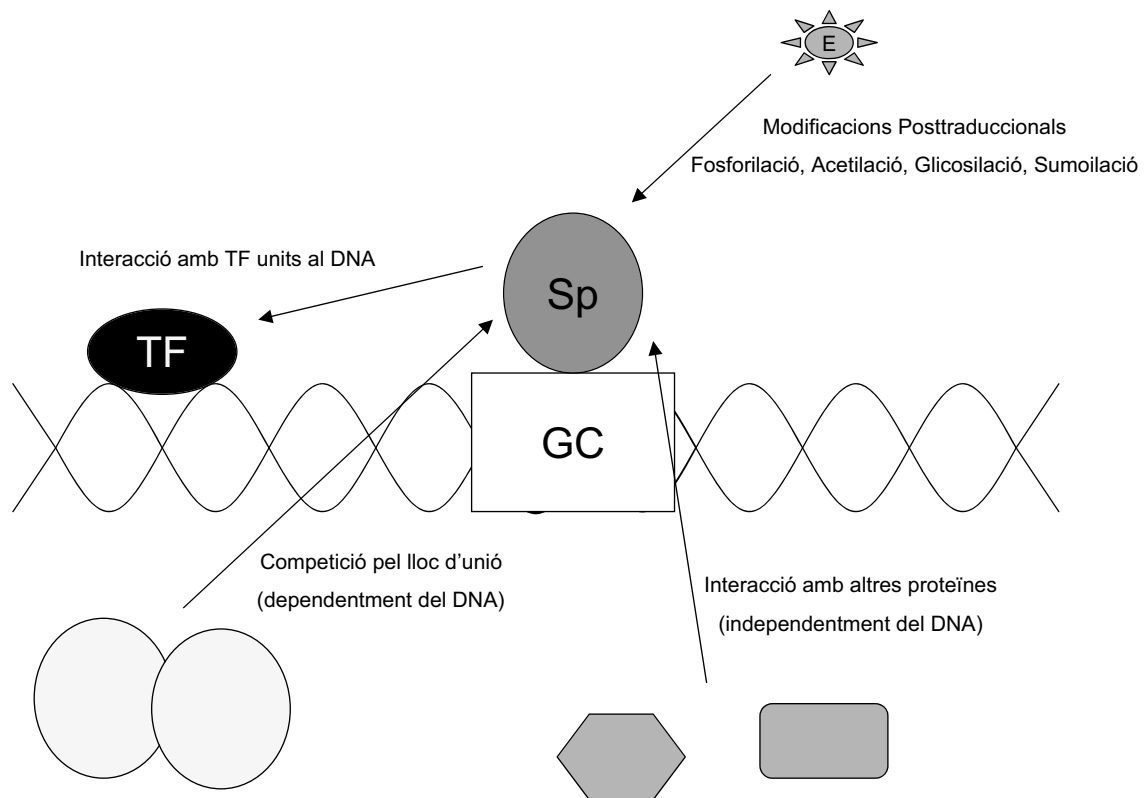


Figura 9. Model de la regulació dependent de Sp i les vies que la regulen (Safe and Abdelrahim, 2005)

2. ALTRES FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ

2.1. LA FAMÍLIA AP-1

AP-1 es va identificar com una proteïna que s'unia al DNA de forma induïble a elements reguladors situats al promotor del simian virus 40 (SV40) i al gen de la metalotioneïna (Angel et al., 1987, W. Lee et al., 1987a, W. Lee et al., 1987b). La seva purificació bioquímica va demostrar que AP-1 no era un factor de transcripció únic, si no una serie de complexos dimèrics formats per proteïnes bZIP (basic region-leucipe zipper) que pertanyen a les subfamílies Jun (c-Jun, JunB i JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 i Fra-2), Jun dimerization partners (JDP1 i JDP2), ATF (activating transcription factors) (ATF2, LRF1/ATF3 i B-ATF) i Maf (v-Maf, c-Maf, Nrl, MafB, MafF, MafG i MafK) (Shaulian and Karin, 2001).

Les proteïnes Jun poden formar homodímers estables que s'uneixen al DNA, mentre que les proteïnes Fos no formen homodímers però formen heterodímers amb les proteïnes Jun, més estables que els dímers Jun:Jun (Halazonetis et al., 1988, Kouzarides and Ziff, 1988). Les proteïnes ATF poden formar homo i heterodímers amb les proteïnes Jun i, finalment, algunes de les proteïnes Maf poden heterodimeritzar amb c-Jun i c-Fos, mentre que altres heterodimeritzen amb c-Fos però no amb c-Jun (Shaulian and Karin, 2001).

El lloc d'unió al DNA de AP-1 són les regions TRE [phorpol 12-O-tetradecanoat-13-acetate (TPA) reponse elements, 5'-TGAG/CTCA-3'], anomenades així per la seva habilitat d'estimular la transcripció en resposta a TPA (Angel et al., 1987), o les seqüències CRE (cAMP responsive elements, 5'-TGACGTCA-3'), reconegudes principalment per les proteïnes ATF (Angel et al., 1988). L'afinitat per la unió al DNA així com la capacitat de transactivació de les proteïnes Jun varia considerablement, c-Jun és el que es comporta com l'activador més potent (Ryseck and Bravo, 1991). La unió de c-Jun amb c-Fos augmenta la seva capacitat transcripcional per la formació de dímers més estables (Halazonetis et al., 1988) mentre que la dimerització amb JunB atenua el potencial activador de c-Jun (Chiu et al., 1989, Schutte et al., 1989). A més, s'ha descrit l'antagonisme entre c-Jun i JunB. En el cas de les proteïnes Fos, c-Fos i FosB contenen dominis activadors que no estan presents a la resta de membres de la subfamília (Shaulian and Karin, 2002).

Inicialment, es va descriure AP-1 com un factor que contribuïa a la transcripció basal i que responia a l'estímul del TPA (Angel et al., 1987, W. Lee et al., 1987a), però posteriorment es va descriure la seva resposta a altres estímuls com la radiació UV i ionitzant, l'estrés oxidatiu, la despolarització neuronal, citoquines (TNF- α , interleukina-1, gamma interferon) i infeccions virals (Shaulian and Karin, 2001). Cadascuna de les

proteïnes AP-1 respon de forma diferent als diferents estímuls extracel·lulars i s'ha proposat que aquest mecanisme és un dels més importants a l'hora de modular la seva activitat (Chiu et al., 1989). A més, les proteïnes AP-1 poden ser fosforilades, el que representa una altra ruta de control a través d'estímuls extracel·lulars (Karin, 1995, 1998).

Les proteïnes AP-1 poden interaccionar amb altres factors de transcripció que poden augmentar o disminuir la seva activitat transcripcional (Chinenov and Kerppola, 2001). S'ha descrit que c-Jun pot interaccionar amb els factors de transcripció Sp1 i Sp3 i que pot activar la transcripció independentment de la seva unió al DNA gràcies a la seva interacció amb Sp1. Sp1 pot actuar com a proteïna d'ancoratge per a c-Jun a promotors que contenen caixes Sp com el promotor de la *12(S)-lipoxigenasa* (Chang and Chen, 2005).

2.1.1. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL PER AP-1

La família AP-1 està considerada com una família de proto-oncogens perquè presenten una elevada homologia amb algunes proteïnes virals oncogèniques (v-Jun i v-Fos) i pel seu paper en processos cel·lulars com la proliferació, la supervivència i l'apoptosi (Shaulian and Karin, 2001). A més, l'activitat d'AP-1 es veu augmentada per alguns promotors tumorals i oncoproteïnes (Shaulian and Karin, 2002).

Els factors de creixement poden activar AP-1 principalment a través de la via de ERK MAP quinasa (MAPK). Això condueix a la inducció dels gens *fos* que poden heterodimeritzar amb les proteïnes Jun, i aquests dímers Jun:Fos poden activar el promotor de *c-jun* per a augmentar encara més l'activitat AP-1 (Angel et al., 1988). Una altra via que regula la funció proliferativa d'AP-1 és JNK i p38 MAPK; JNK pot fosforilar c-Jun per a augmentar la seva activitat (Karin, 1996). L'activació d'AP-1 pot produir la inhibició de gens supressors de tumors com *p53*, *p21* o *p16* (Shaulian and Karin, 2001).

c-Jun i c-Fos són necessaris per a la proliferació i la progressió a través del cicle cel·lular. Una ruta a través de la qual aquestes proteïnes regulen el cicle cel·lular és l'activació del promotor de *Ciclina D1* (Shaulian and Karin, 2001). Els defectes més importants en la proliferació s'han observat en ratolins c-Jun^{-/-} (R. S. Johnson et al., 1993), mentre que per a tenir efectes importants sobre la proliferació deguts a la inhibició de les proteïnes Fos, és necessari analitzar knockouts dobles c-Fos/FosB (Brusselbach et al., 1995).

AP-1 té un paper important en la regulació de la supervivència i la mort cel·lular i existeixen dos models que expliquen el seu paper en aquests processos. D'una banda, la inducció d'AP-1 produeix l'activació de diferents gens com *FasL*, *Bim* o *Bcl3* i les

proteïnes resultants tenen efectes positius o negatius sobre l'apoptosi. L'efecte final sobre l'apoptosi vindrà determinat pel balanç entre els gens diana positius i negatius per al procés apoptòtic. Aquest balanç dependrà de l'estímul i el tipus cel·lular. D'altra banda, s'ha proposat que AP-1 podria actuar com a regulador homeostàtic mantenint la cèl·lula en un estat de proliferació determinat. L'activació persistent d'AP-1 produiria apoptosi a través dels mateixos mecanismes que produeixen mort cel·lular per l'expressió constitutiva d'oncogens (Shaulian and Karin, 2002).

2.2. LA FAMÍLIA E2F

E2F és una família de factors de transcripció formada per vuit gens que codifiquen per a nou proteïnes majoritàries molt relacionats entre elles (E2F1 a E2F8) (Iaquinta and Lees, 2007), originàriament identificades per la seva capacitat d'unir-se al promotor de l'adenovirus E2 (Kovesdi et al., 1986).

Els membres de la família E2F presenten dominis força conservats, com són el d'unió al DNA, el de transactivació i el de unió a *pocket proteins* (Ivey-Hoyle et al., 1993, J. A. Lees et al., 1993). El domini d'unió al DNA reconeix la seqüència consensus TTT(G/C)(G/C)CG(G/C), que es troba al promotor de gran quantitat de gens. La capacitat d'activar o reprimir la transcripció varia entre els diferents membres de la família.

Aquesta família forma heterodímers amb membres de la família de factors de transcripció DP (DP-1 i DP-2) per a donar lloc a complexos més actius que s'uneixen al DNA (La Thangue, 1994). Aquesta unió augmenta l'activitat transcripcional i és necessària per a la unió de E2F amb els membres de la família Rb. Els únics membres que són capaços d'unir-se al DNA sense formar dímers amb les proteïnes DP són E2F7 i E2F8 (Iaquinta and Lees, 2007).

Les proteïnes E2F presenten un domini d'unió a "pocket proteins" o proteïnes de la família Rb. La unió entre E2F i les pocket proteins produeix la inhibició de l'activitat de E2F per dos mecanismes diferents: per l'emascament de residus crítics per a la seva activitat transcripcional i pel reclutament de complexos co-repressors als promotors (Iaquinta and Lees, 2007). Aquests complexos es formen en diferents etapes del cicle cel·lular amb els complexos Rb a la fase G1 del cicle, els complexos amb p107 tant a la fase G1 com la fase S i els complexos amb p130 a la fase G0 (N. S. Thomas et al., 1998). E2F5, 7 i 8 no presenten el domini d'unió a pocket proteins, però són capaços de reprimir la transcripció per altres mecanismes.

La unió entre E2F1 i Rb és molt important per a la regulació del cicle cel·lular, ja que només es produeix quan Rb està hipofosforilat durant la fase G1 del cicle, de manera

que inhibeix l'activitat transcripcional de E2F1. A mesura que les cèl·lules superen la interfase G1/S, es produeix la fosforilació de Rb pels complexos ciclina/CDK i E2F queda lliure per a actuar sobre els promotors dels genes diana (Chellappan et al., 1991). Així, a cada cicle, E2F passa de forma coordinada d'activador a repressor transcripcional. A nivell de la fase S, E2F es troba complexat amb p107, ciclina A i CDK2; aquest complex té activitat cinasa H1 i es pot unir a seqüències específiques de DNA (Shirodkar et al., 1992). Durant la fase G1 es forma un tercer complex format per E2F, p107, ciclina E i CDK2 que desapareix quan les cèl·lules entren en fase S (E. Lees et al., 1992).

El dany al DNA pot induir canvis en l'estat de les modificacions posttraduccionals de E2F. En primer lloc, E2F1 és fosforilat per ATM/ATR afavorint així la seva degradació. D'altra banda, E2F1 és acetilat en resposta a dany al DNA de manera que augmenta la seva activitat transcripcional.

E2F1 pot interaccionar físicament amb altres proteïnes entre les que s'inclou Sp1. La interacció E2F1-Sp1 podria explicar com promotors que no tenen seqüències clàssiques d'unió pel factor E2F poden regular la seva transcripció a través del cicle cel·lular. En aquest sentit, s'ha observat que després de l'estimulació per sèrum en cèl·lules 3T3, seqüències d'unió pel factor de transcripció Sp1 poden induir la transcripció del promotor de la *dhfr* al final de la fase G1 (Jensen et al., 1997), al mateix temps que s'indueixen E2F-1-2 i -3. Tot i així, s'hauria de determinar si aquesta activació mitjançada per seqüències d'unió per Sp1 depèn de la interacció directa de E2F-Sp1. Altres modificacions podrien estar influenciant en aquesta regulació, com la fosforilació de Sp1 que es produeix en la mateixa zona on Sp1 interacciona amb E2F (Black et al., 1999), o bé el paper de la proteïna pRB, que també s'uneix a aquestes proteïnes.

2.2.1. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL PER E2F

Els gens regulats per E2F comprenen gens implicats en la síntesi de DNA, com el de la *dhfr* (Slansky and Farnham, 1996), la *DNA polimerasa* α (Pearson et al., 1991), la *timidina quinasa* (Dou et al., 1991), la *histona H2A* (Oswald et al., 1996) i el *PCNA* (H. H. Lee et al., 1995); gens implicats en la regulació del cicle cel·lular, com el de la *ciclina E* (Botz et al., 1996), la *ciclina A* (Schulze et al., 1996), la *cdc2* (Tommasi and Pfeifer, 1995) i *Rb* (Shan and Lee, 1994); i gens que codifiquen per a factors de transcripció, com el factor *B-myb* (Lam et al., 1992), *jun* (La Thangue, 1994), *Sp1* (Nicolas et al., 2003) i el propi *E2F* (Hsiao et al., 1994).

Durant molt de temps es va considerar que E2F es comportava com a activador transcripcional, però s'ha observat que en molts promotors les seqüències d'unió d'E2F actuen més aviat com a repressores. Aquest és el cas dels promotors dels gens *B-myb* (Lam et al., 1992, Shan and Lee, 1994), el mateix E2F-1 (Cress and Nevins, 1996) i la *cdc2* (Tommasi and Pfeifer, 1995). En el cas del promotor del gen *dhfr*, el nostre grup havia establert que la mutació de la seqüència de reconeixement d'E2F, la qual aboleix la unió d'aquest factor de transcripció al promotor mínim del gen *dhfr*, no altera la regulació de l'activitat transcripcional del gen *dhfr* al llarg del cicle cel·lular (Noe et al., 1997). Jensen i col·laboradors demostraren en un sistema heteròleg, que el paper d'E2F en quant a la regulació transcripcional del promotor del gen *dhfr* es reduïa a una acció repressora en la fase G0/G1 del cicle (Jensen et al., 1997).

E2F1 també juga un paper important en l'apoptosi ja que regula l'expressió de gens com *Bcl-2* o *p73* intermediaris de senyals apoptòtics i també regula l'expressió de la pròpia maquinària apoptòtica incluint caspases iniciadores (caspases 8 i 9) i efectores (caspases 3 i 7) (Nahle et al., 2002). A més, E2F1 activa l'expressió de la proteïna supressora de tumors p14ARF humana (el seu homòleg a ratolí és la proteïna p19ARF), la qual s'unirà al complex MDM2-p53 prevenint la degradació de p53 (Bates et al., 1998). L'increment en els nivells de p53 conduiran a les cèl·lules a una aturada en el cicle o a l'apoptosi.

2.3. LA FAMÍLIA MYB

Els gens *Myb* (*A-myb*, *B-myb* i *c-myb*) són una família de factors de transcripció relacionats amb el control de la proliferació i diferenciació de cèl·lules normals i tumorals (I. H. Oh and Reddy, 1999). *c-Myb* és el prototip de la família i és l'homòleg en mamífers de *v-Myb*, un oncogen que contenen els retrovirus E26 i AMV i que produeix leucèmia aguda en ocells (I. H. Oh and Reddy, 1999).

Les proteïnes codificades pels gens *myb* tan virals com de mamífer es localitzen al nucli i es poden unir al DNA per a funcionar com a reguladors de la transcripció. Encara que els tres gens presenten una elevada homologia, el seu patró d'expressió és força diferent. Mentre que *c-myb* s'expressa principalment en cèl·lules hematopoiètiques immadures (Shin et al., 2001, Zorbas et al., 1999), *A-myb* s'expressa principalment en limfòcits B germinals i cèl·lules dels sistemes reproductors femení i masculí (Toscani et al., 1997, Trauth et al., 1994) i *B-myb* s'expressa de forma ubicua i els seus nivells protèics depenen del grau de proliferació de les cèl·lules (Nomura et al., 1988, Sala and Watson, 1999).

El domini d'unió al DNA de *Myb* és una estructura poc usual de tres repeticions en tàndem de 50 aminoàcids (R1, R2 i R3) que reconeixen la seqüència consensus

C/ATAACNG (I. H. Oh and Reddy, 1999). A més, totes les proteïnes Myb contenen un domini inhibitori a la regió C-terminal, l'eliminació del qual augmenta la seva activitat transcripcional (Ness, 1999).

La funció transcripcional varia entre els diferents components de la família. c-Myb i A-Myb són activadors transcripcionals (I. H. Oh and Reddy, 1999). La capacitat activadora de A-Myb varia segons el context i s'ha descrit que es pot arribar a comportar com a activador transcripcional 6-10 vegades superior a c-Myb (Apt et al., 1996). Per contra, B-Myb és capaç d'activar o reprimir la transcripció de gens diana depenent del tipus cel·lular i el context del promotor (Sala, 2005). Aquest efecte dual pot ser degut a interaccions proteïna-proteïna entre B-Myb i altres coactivadors o corepressors (Brandt and Kroll, 1997, Tashiro et al., 1995).

La funció de les proteïnes Myb està regulada per modificacions posttraduccionals i interaccions proteïna-proteïna (Ness, 1999, I. H. Oh and Reddy, 1999). c-Myb és fosforilat en múltiples regions *in vivo*. La caseina kinasa II pot fosforilar c-Myb a dues serines de la regió N-terminal amb un efecte inhibitori directe sobre l'activitat de Myb, perquè afecti a la seva capacitat d'unir-se al DNA, o indirecte perquè afecti a la interacció amb altres proteïnes (Luscher and Eisenman, 1990, Oelgeschlager et al., 1996). Pel que fa a les altres proteïnes de la família, la seva regulació per CK-II és poc clara. S'ha demostrat que B-Myb és fosforilat durant la fase S del cicle cel·lular a través de les ciclines A i E augmentant la seva capacitat transactivadora (Robinson et al., 1996, Sala et al., 1997).

A més de l'efecte dependent del lloc d'unió, B-Myb pot activar la transcripció per altres mecanismes, com a través de la unió amb Sp1. S'ha descrit que el promotor del propi *B-myb* està regulat positivament per B-Myb a través de caixes Sp1 (Sala et al., 1999). De forma similar, B-Myb és capaç d'activar la transcripció de les Ciclines D1 i A1 gràcies a la seva unió directa o indirecta amb Sp1 a través de la regió C-terminal (Bartusel et al., 2005). No es pot excloure que B-Myb sigui capaç d'unir-se també a altres factors de la família Sp.

2.3.1. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL PER MYB

Diferents estudis han demostrat la relació entre les proteïnes Myb i la proliferació cel·lular. El tractament de diferents tipus cel·lulars amb oligonucleòtids antisentit contra c-Myb produeix una disminució de la proliferació cel·lular sense afectar a la diferenciació i, a més, provoca una aturada de les cèl·lules en G1 (Gewirtz et al., 1989, Gewirtz and Calabretta, 1988). Els ratolins knockout de c-Myb es desenvolupen normalment fins al dia 13 de gestació, però moren al voltant del dia 15 per anèmia severa. L'anàlisi dels embrions va demostrar que l'eritropoiesi fetal no estava afectada

pel silenciament de c-Myb, però l'eritropoiesi de tipus adult estava greument disminuïda, demostrant un important paper de c-Myb en aquest procés (Mucenski et al., 1991). A més, la inhibició de B-Myb s'ha correlacionat amb una disminució de la proliferació en cèl·lules mieloides i limfoides, així com en fibroblasts (Arsura et al., 1992). Els knockout de B-Myb no és viable, ja que es produeix mort embrionària temprana per falta de formació de massa cel·lular (Tanaka et al., 1999).

Les proteïnes Myb s'han relacionat també amb la diferenciació cel·lular, ja que l'expressió de c-Myb és elevada en cèl·lules hematopoiètiques immadures, però disminueix conforme aquestes esdevenen més diferenciades (Westin et al., 1982). L'expressió de c-Myb és dependent del cicle cel·lular amb un pic a la fase G1 mitjana o a la fase S (I. H. Oh and Reddy, 1999). Es creu que l'expressió de B-Myb també està regulada a través del cicle cel·lular ja que es correlaciona amb proliferació cel·lular.

Alguns dels gens regulats per c-Myb semblen ser específics de cèl·lules hematopoiètiques mentre que altres estan involucrats en la regulació general del cicle cel·lular, el que permet relacionar l'expressió de *c-myb* amb la progressió del cicle.

Les proteïnes Myb s'han relacionat amb la regulació de l'apoptosi a través de l'activació de gens diana clau com *Bcl-2* (Frampton et al., 1996, Salomoni et al., 1997).

2.4. LA FAMÍLIA NF-1

Aquesta és una família de factors de transcripció i replicació implicada en la replicació de diferents virus, així com en la regulació de la transcripció d'un gran número de gens cel·lulars i virals. Les proteïnes NF-1 (Nuclear Factor 1) s'han associat amb canvis a l'estat de creixement cel·lular i amb diferents processos oncogènics i patològics (Gronostajski, 2000).

NF-1 es va clonar inicialment per la seva capacitat d'unir-se a l'origen de replicació de l'adenovirus (Nagata et al., 1982). Les proteïnes NF-1 s'uneixen com a dímer a la seqüència consensus simètrica TTGGC(N5)GCCAA, però també a llocs partits (TTGGC o GCCAA) amb una afinitat menor (Meisterernst et al., 1988). El fet que NF-1 pogués regular tant la transcripció com la replicació va ser un dels primers indicis de que les mateixes proteïnes podien ser importants per a ambdós processos (Jones et al., 1987).

Existeixen quatre gens NF1 en humans (NF-1A, NF-1B, NF-1C, NF-1X). Els transcrits provinents de cadascun dels gens poden patir empalmaments alternatius generant múltiples proteïnes per a cada gen (Gronostajski, 2000). La proteïna NF-1 típica està formada per un domini N-terminal d'unió al DNA i dimerització i un domini C-terminal per a l'activació o repressió transcripcionals (Gronostajski, 2000). La

dimerització és essencial per a la unió al DNA i per a l'estimulació de la replicació dels adenovirus (Armentero et al., 1994, Boshier et al., 1990). El domini d'unió al DNA no presenta homologia detectable amb altres dominis d'unió al DNA.

Les proteïnes NF-1 poden activar o inhibir la transcripció depenent del tipus cel·lular i del context del promotor. El mecanisme més conegut d'activació de la transcripció per NF-1 és la interacció directa amb proteïnes de la maquinària basal de transcripció com TFIIB (T. K. Kim and Roeder, 1994). Un altre mecanisme és el desplaçament d'histones repressores per competició en la unió al DNA o per unió directa entre NF-1 i la histona (Gao et al., 1998, Ristiniemi and Oikarinen, 1989). A més, s'han descrit interaccions entre NF-1 i altres coactivadors, com TAFII55 o p300/CBP, que juguen un paper important en l'activació transcripcional (Chiang and Roeder, 1995). Pel que fa a la repressió transcripcional, un mecanisme d'acció és la competició directa pel lloc d'unió amb altres factors activadors més potents com Sp1. La competició pel lloc d'unió entre NF-1 i Sp1 ha estat descrita per al promotor de α -col·lagen de ratolí (Nehls et al., 1991) i la cadena A de PDGF (Rafty et al., 2002). En aquest últim cas, es va descriure el desplaçament de Sp1 del seu lloc d'unió per una interacció directa amb NF-1X. De forma similar, s'ha descrit la competició pel lloc d'unió entre NF-1 i HNF4 per la presència de llocs d'unió solapats al promotor de la piruvat cinasa de rata (Bernier et al., 1993). A més, existeix la possibilitat de que NF-1 pugui funcionar com a repressor actiu *in vivo* pel reclutament de co-repressors a través de la regió C-terminal (Gronostajski, 2000).

2.4.1. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL PER NF-1

Donat que els productes dels gens NF-1 són coexpressats i s'uneixen a les mateixes seqüències de DNA, és molt difícil determinar els papers individuals de cada membre de la família en l'expressió gènica durant el desenvolupament.

Knockouts de NF-1C/CTF presenten anomalies en la formació de l'arrel dentària, mentre que knockouts de NF-1A moren al poc temps de néixer i els supervivents presenten defectes neurològics (das Neves et al., 1999, Steele-Perkins et al., 2003).

Les proteïnes NF-1 afecten a l'expressió de gens regulats en resposta a vies de senyalització com les controlades per la insulina, TGF- β , cAMP, hormones esteroidees, vitamina D i altres (Gronostajski, 2000); però és difícil determinar si els efectes sobre NF-1 són directes o indirectes.

S'han caracteritzat llocs d'unió per a NF-1 en gens expressats específicament a la majoria de teixits i òrgans i per a la majoria d'ells, els llocs d'unió per a NF-1 han resultat ser importants per a l'expressió del gen. NF-1 juga un paper important en el desenvolupament, però existeixen pocs estudis al respecte (Gronostajski, 2000).

Les proteïnes NF-1 s'han relacionat amb el control del creixement cel·lular en humans. El gen NF-1B pot patir una translocació amb el gen HMGIC en adenomes pleomòrfics humans, l'extrem C-terminal de NF-1B es fusiona a HMGIC i la proteïna aberrant s'expressa al teixit afectat (Geurts et al., 1998). D'altra banda, la sobreexpressió de les proteïnes NF-1 produeix resistència a la transformació per diferents oncogens nuclears com *fos*, *jun* i *qin* en fibroblasts d'embrió de ratolí (Schuur et al., 1995). Finalment, la sobreexpressió de NF-1X evita l'aturada del creixement produïda pel TGF- β en cèl·lules d'epiteli de pulmó de visó (P. Sun et al., 1998), relacionant un cop més NF-1 amb la proliferació cel·lular.

El fet de que les proteïnes NF-1 siguin capaces d'activar la replicació d'alguns virus i estiguin implicades en la proliferació cel·lular indica la possibilitat que aquestes proteïnes siguin capaces de regular la replicació del DNA.

2.5. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ NF-Y

El factor de transcripció NF-Y, nuclear factor-Y (també anomenat CBF [CAAT-binding factor], a-CP1 i CP1) va ser identificat originalment per la seva unió a la caixa Y del complex major d'histocompatibilitat (MHC) classe II (Dorn et al., 1987).

NF-Y és un factor de transcripció heteromèric format per tres subunitats, NF-YA, NF-YB i NF-YC, totes elles necessàries per a la unió al DNA (Maity and de Crombrughe, 1998, Mantovani, 1999). La subunitat NF-YA es caracteritza per tenir un domini ric en glutamines, i NF-YB per tenir varies zones riques en aminoàcids àcids (R. Hooft van Huijsduijnen et al., 1990). NF-YB i NF-YC contenen motius tipus histona (histone fold motifs, HFMs) que són comuns a totes les histones principals; la dimerització de NF-YB i NF-YC és essencial per a l'associació de NF-YA i la unió específica al DNA (Romier et al., 2003, Sinha et al., 1995). En aquest sentit, s'ha observat que NF-Y presenta activitat histona acetiltransferasa per la associació física amb enzims histona acetiltransferasa com GCN5, P/CAF o p300 (Currie, 1997, Jin and Scotto, 1998, Q. Li et al., 1998b). L'estructura de NF-YA es pot dividir entre el subdomini d'associació i el subdomini d'unió al DNA (Maity and de Crombrughe, 1992, Mantovani et al., 1994, Xing et al., 1993, Xing et al., 1994).

Les tres subunitats són regulades a diferents nivells. NF-YA presenta dues isoformes majoritàries que es formen per empalmament alternatiu i s'expressen diferencialment als diferents teixits (X. Y. Li et al., 1992). NF-YC també presenta diferents isoformes que estan regulades de forma cèl·lula-específica (Benatti et al., 2008). La localització nuclear de NF-YC és regulada al llarg del cicle cel·lular i depèn de la presència de NF-YB (Frontini et al., 2004). Els heterodímers NF-YB/NF-YC es

detecten a la majoria de teixits, mentre que NF-YA no és detectable al múscul esquelètic adult ni al teixit cardíac (Gurtner et al., 2003).

NF-Y reconeix la seqüència de DNA 5'-CCAAT-3' (Dorn et al., 1987, Hatamochi et al., 1986, R. A. Hooft van Huijsduijnen et al., 1987, C. G. Kim and Sheffery, 1990). Les caixes CCAAT són element promotors comuns que, en eucariotes superiors, es troben a les regions promotores d' aproximadament el 60% dels gens (Y. Suzuki et al., 2001). La seqüència CCAAT va ser un dels primers elements identificats com a seqüència de reconeixement per factors de transcripció (Benoist et al., 1980, Efstratiadis et al., 1980). La majoria de caixes CCAAT situades properes a l'inici de transcripció són reconegudes pel factor de transcripció NF-Y, tot i que s'han identificat altres proteïnes capaces d'unir-se a aquesta seqüència (Bucher, 1990).

NF-Y no és un activador transcripcional molt potent però és necessari per a organitzar la cromatina propera als llocs d'inici de la transcripció, afavorint així la unió de coactivadors (Caretta et al., 1999, Q. Li et al., 1999).

2.5.1. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL PER NF-Y

Un gran nombre d'estudis han demostrat la importància de les caixes CCAAT tant per l'expressió de gens constitutius i regulats com per les seves diverses funcions incloent la regulació de la transcripció durant el desenvolupament i el cicle cel·lular (Collins et al., 1985, Gelinias et al., 1985, Knight et al., 1987, van Wijnen et al., 1988).

Un estudi bioinformàtic va mostrar una abundància remarcable de caixes CCAAT en promotors regulats durant la fase G2/M (Elkon et al., 2003). Posteriorment, assajos de ChIP van demostrar que la interacció de NF-Y amb promotors regulats durant el cicle cel·lular com *CDC2*, *CDC25A/B/C*, *ciclina Aa*, *ciclina B1/B2* i *E2F1* és altament variable durant el cicle cel·lular (Caretta et al., 2003).

NF-Y ha estat relacionat amb la modulació de l'activitat de promotors del cicle cel·lular en resposta a un dany al DNA a través de la inhibició transcripcional de *p53* (Adachi et al., 2000, Imbriano et al., 2005, Manni et al., 2001, Yun et al., 1999). NF-Y pot formar un complex amb *p53* a les regions promotores que contenen caixes CCAAT i, quan es produeix una lesió al DNA, aquest complex pot reclutar HDACs i produir la repressió d'aquests promotors (Imbriano et al., 2005). A més, la inhibició de NF-YA en cultius primaris de fibroblasts de ratolí comporta un bloqueig total de la progressió del cicle cel·lular (Bhattacharya et al., 2003).

A la literatura existeixen molts exemples de gens regulats per caixes GC i CCAAT, i per tant susceptibles de ser regulats conjuntament pels factors de transcripció Sp i NF-Y. S'ha observat que al promotor de *E2F1* es forma un complex entre ER/Sp1 i NF-Y

que regula la seva activitat basal (W. Wang et al., 1999a). En aquest exemple, queda demostrat com el factor de transcripció Sp1 augmenta la capacitat d'unió del factor de transcripció NF-Y, però no a l'inrevés. De manera molt similar, als promotors dels gens de l'àcid gras sintasa i del complex d'histocompatibilitat classe II, la proteïna Sp1 també augmenta la unió de NF-Y al DNA. Aquest fet es podria relacionar amb un augment de la vida mitja d'unió de NF-Y al DNA mitjançada per Sp1 (Roder et al., 1997, Wright et al., 1995). Existeixen molts altres exemples de promotors regulats conjuntament pels factors de transcripció NF-Y i Sp1 com és el cas del promotor del propi *Sp1* (Nicolas et al., 2003) on es troba una caixa Sp1 solapada amb una per a NF-Y, de manera que NF-Y disminueix l'activació produïda per Sp1.

3. EL CICLE CEL·LULAR

El cicle cel·lular és la seqüència d'esdeveniments que condueixen al creixement i la divisió cel·lular en cèl·lules eucariotes. Quan les cèl·lules quiescents (en fase G₀) són estimulades a proliferar, es posen en marxa una sèrie de processos bioquímics per tal d'iniciar la replicació del DNA (fase S) i finalitzar amb la divisió cel·lular (fase M). Entre les fases G₀, S i M es troben les fases G₁ i G₂ que poden ser de longitud variable. Cada etapa del cicle cel·lular comprèn una sèrie d'etapes que han d'estar coordinades i que requereixen la síntesi de nous components.

L'entrada i sortida de les diferents fases del cicle cel·lular està finament controlada pel que s'anomenen *checkpoints* que produeixen una aturada del cicle per a reparar els possibles errors produïts i bé continuar amb el cicle o entrar en apoptosi (Grana and Reddy, 1995, D. G. Johnson and Walker, 1999).

3.1. CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR

Els principals reguladors de la transició d'una fase del cicle a l'altra són les cinases dependents de ciclins (CDKs). Les CDKs són proteïnes de pes molecular entre 35 i 40 KDa que s'associen a subunitats reguladores anomenades ciclins formant un heterodímer actiu. Els nivells de ciclins oscil·len al llarg del cicle cel·lular determinant així la funcionalitat de les CDKs. Les ciclins no tenen activitat catalítica i les CDKs són inactives en absència de les ciclins. Quan les CDKs són activades per la unió amb les ciclins són capaces de fosforilar diferents proteïnes diana per tal d'activar-les o inactivar-les, i coordinar l'entrada a les fases consecutives del cicle cel·lular. Les diferents combinacions de ciclins-CDK determinen les proteïnes diana que seran fosforilades (Fig.10).

La primera fase del cicle cel·lular (G₁) prepara a la cèl·lula per a la fase S. Diferents estímuls, com els factors de creixement, determinen que una cèl·lula en estat quiescent comenci a proliferar. La progressió a través de G₁ està regulada per un mecanisme complex que necessita al menys tres CDKs (**CDK4**, CDK6 i CDK2) i els seus corresponents reguladors (Malumbres and Barbacid, 2005). Aquestes CDKs s'associen amb ciclins del tipus D (D1, D2 o D3 segons el tipus cel·lular) al començament de la fase i amb ciclina E cap al final. Els complexos actius de CDK4 o CDK6 amb ciclins del tipus D fosforilen membres de la família retinoblastoma (pRb, p107 i p130) (Fig. 10).

Retinoblastoma va ser el primer gen supressor de tumors identificat i és una fosfoproteïna de 928 aminoàcids important per al control del cicle cel·lular. Existeix una forma activa defosforilada i una forma inactiva fosforilada. En el seu estat actiu Rb

evita la replicació cel·lular perquè està unit al factor de transcripció **E2F**, impedit que aquest s'uneixi al seu lloc d'unió del DNA i activi la transcripció de gens importants per a la fase S del cycle cel·lular. Quan Rb és fosforilat pels complexos ciclina/CDK, allibera E2F i aquest pot activar la transcripció de gens per a la progressió en el cycle (Fig.10).

La fase S o de síntesi es caracteritza perquè tot el DNA del nucli de la cèl·lula es replica completament i de manera precisa en un període de poques hores. Una errada en la replicació completa dins de la fase S pot donar lloc a una fragmentació cromosòmica en la mitosi que ve a continuació. La progressió entre S i G2 requereix la ciclina A unida a les CDKs 2 i 1 (Cdc2) (Pines and Hunter, 1990, Tsai et al., 1991).

Després de la replicació del DNA és necessària una fase de síntesi proteica (fase G2) abans d'entrar a la fase M. La transició G2/M necessita de l'acumulació de ciclina B.

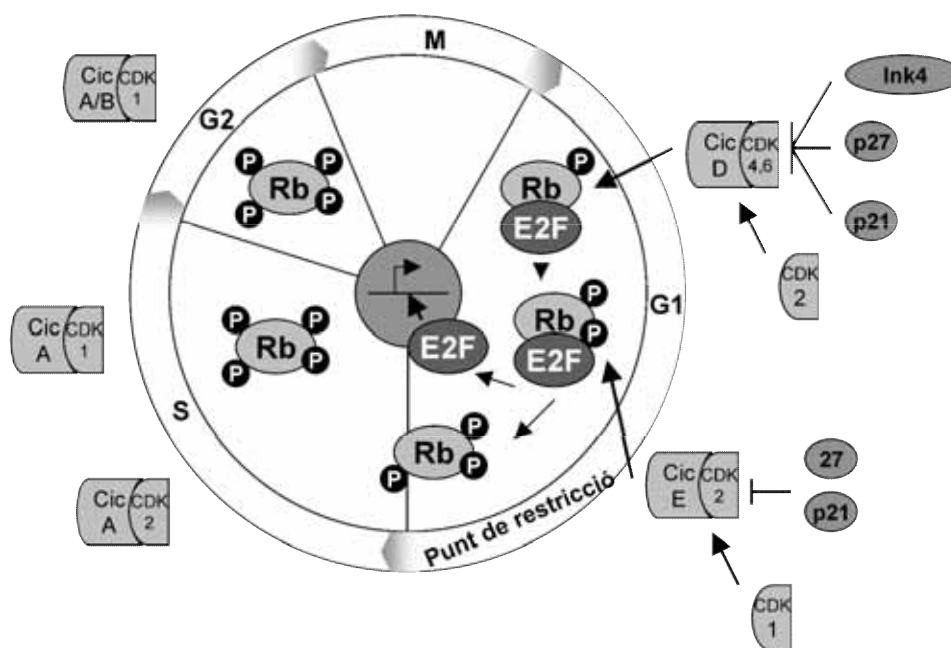


Figura 10. Esquema del cycle cel·lular en eucariotes. Es mostren els complexos Ciclina/CDK, l'estat de fosforilació de Rb i el lloc d'actuació dels inhibidors de CDKs.

Un mecanisme de control de la regulació de les CDKs consisteix en la interacció amb els inhibidors que actuen com a mitjançadors d'estímuls antimitogènics. Aquests inhibidors actuen principalment a la fase G1 del cycle cel·lular abans del punt de restricció, després del qual, ja no hi ha marxa enrera en la progressió a través del cycle. S'han descrit dues famílies diferents d'inhibidors dels complexos ciclina/CDK. La família Ink4 i la família Cip/kip inclouen les proteïnes p21Cip1/Waf1, p27Kip1 i p57Kip2 (Coqueret, 2003). La proteïna **p21** (també anomenada Cip1, Sdil, Mada6 i Cap20)

s'associa principalment als complexes CDK4/ciclina D i CDK2/ciclina E formant un complexe quaternari que també inclou PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Harada and Ogden, 2000). S'ha descrit que els complexes amb una sola molècula de p21 associada mantenen l'activitat catalítica, mentre que l'augment del número de molècules de p21 és el que produeix la inhibició d'aquests complexes (Elledge et al., 1996, Harper et al., 1995). Alguns treballs han demostrat que p21 és necessari per a la progressió del cicle cel·lular desde la fase G1 a la S. Aixó pot ser degut a que p21 pot promoure l'acoblament del complex CDK4/ciclina D1 i dirigeix el complex cap al nucli (Coqueret, 2003).

Els nivells de p21 estan controlats a nivell transcripcional per p53 (Gorospe et al., 1998). L'activació de p21 per p53 requereix de la presència dels llocs d'unió per a **Sp1** al promotor de p21 en cèl·lules HepG2 humanes i SL2 de *Drosophila* (Koutsodontis et al., 2001). **p53** pertany a una família de factors de transcripció que inclou també als seus homòlegs p63 i p73 amb funcions similars a p53 (Levrero et al., 2000, M. C. Marin and Kaelin, 2000). Aquestes proteïnes poden actuar com a activadors o inhibidors transcripcionals, el seu efecte repressor és produït en alguns casos per la interacció amb el factor Sp1 que evita la seva unió al DNA i la consegüent activació transcripcional (Borellini and Glazer, 1993, Yamabe et al., 1998). La relació entre p21 i p53 permet l'aturada del cicle cel·lular dependent de p53 en resposta a estímuls d'estrés, tot i que p21 pot aturar el cicle a través de mecanismes independents de p53 (Macleod et al., 1995, Sheikh et al., 1994, Zeng and el-Deiry, 1996). La pèrdua de funció de p53 o p21 afavoreix el creixement cel·lular i s'han descrit mutacions d'aquests gens en diferents tipus de tumors (Harada and Ogden, 2000).

Estudis recents han demostrat que perturbacions en el cicle cel·lular poden comportar l'activació de la via de **NFκB** (Thoms et al., 2007a). NFκB és un factor de transcripció format per diferents subunitats que juga un paper clau en la resposta cel·lular davant de diferents senyals extracel·lulars, com les infeccions víriques o bacterianes, i que regula la transcripció de gens importants en la proliferació i supervivència cel·lular. L'aturada del cicle cel·lular produïda per la inhibició de la CDK4 o la ciclina D1 comporta la degradació de la proteïna repressora de NFκB, IκB, i indueix la translocació de RelA (un component de NFκB) des del citoplasma al nuclèol. El segrestament de RelA al nuclèol pot produir la repressió de la transcripció regulada per NFκB i de l'apoptosi (Stark and Dunlop, 2005). Aquest mateix efecte es produeix quan el cicle cel·lular s'atura en resposta a una inhibició de CDK4 (Thoms et al., 2007b). Hi han diferents hipòtesis per a explicar l'activació de NFκB deguda a inhibició de CDK4. Una de les hipòtesis és pel fet conegut de que el factor de transcripció E2F

pot establir i κ B i, per tant, l'atenuació de l'activitat de E2F per inhibició de CDK4 podria produir la desestabilització de i κ B i la subsegüent activació de NF κ B (Thoms et al., 2007a).

Existeixen diferents factors que juguen un paper important en la regulació de la transcripció de gens implicats en el control del cicle cel·lular i que per tant, la seva desregulació pot conduir a una desregulació de la progressió del cicle. Un d'aquests factors és el factor de transcripció **Sp1** que pot ser fosforilat pels complexos ciclina/CDK (Banchio et al., 2004) i pot activar el promotor de reguladors del cicle com Rb o E2F (Penuelas et al., 2003, W. Wang et al., 1999a). S'ha descrit que el factor de transcripció **STAT-3** és important per la transició G1 a S a través de la via de la subunitat gp130 del receptor de citocines. Així, després de l'estimulació de gp130 per citocines es produeix la sobreexpressió de les ciclines D2, D3 i A, i de cdc25A, així com la repressió de p21 i p27, afavorint la progressió del cicle. Les formes mutades de la subunitat gp130 que elimina l'activació JAK-STAT-3 produeixen la reducció de l'expressió de ciclines i de l'activitat CDK2, CDK4 i CDK6 (Fukada et al., 1998).

Tots aquests processos es poden controlar a diferents nivells. D'una banda, trobem checkpoints que controlen la replicació correcta del DNA reparant el DNA danyat. D'altra banda, els processos de degradació són importants per a l'eliminació de proteïnes necessàries en fases concretes del cicle.

3.2. REPARACIÓ DEL DNA

La causa més freqüent de dany al DNA és la radiació ionitzant que indueix ruptures a la doble cadena. Les cinases de detecció del dany inclouen ATM, ATR i DNA-PK i transduïxen el senyal a altres proteïnes que afecten a l'activació de la via (Jeggo and Lobrich, 2006). Aquesta funció cinasa impedeix la divisió cel·lular i inicia les vies de reparació del DNA (Fig. 11).

Per una banda, les cinases de detecció del dany poden induir la fosforilació de **p53**, la qual cosa produeix la seva estabilització i activació (Kohn, 1999). Els nivells de **p21** incrementen ràpidament en resposta a aquests estímuls i s'indueix l'aturada del cicle cel·lular en G1 (Gorospe et al., 1998, Suardet et al., 1996). La inducció de p53 produirà l'aturada del cicle cel·lular o l'apoptosi depenent del context cel·lular (Fig. 11).

ATM, ATR i CHK2 són capaços de fosforilar la proteïna **BRCA1** en resposta a dany al DNA permetent que es pugui localitzar a nivell de les forquilles replicadores on està unit el PCNA (Scully et al., 1997, J. E. Thomas et al., 1997). BRCA1 pot formar complexos amb les proteïnes **BRCA2** i **Rad51** per a activar la reparació de les ruptures de doble cadena (DSBs) en el DNA i per a iniciar la recombinació homòloga (HR) (Yoshida and Miki, 2004) (Fig. 12).

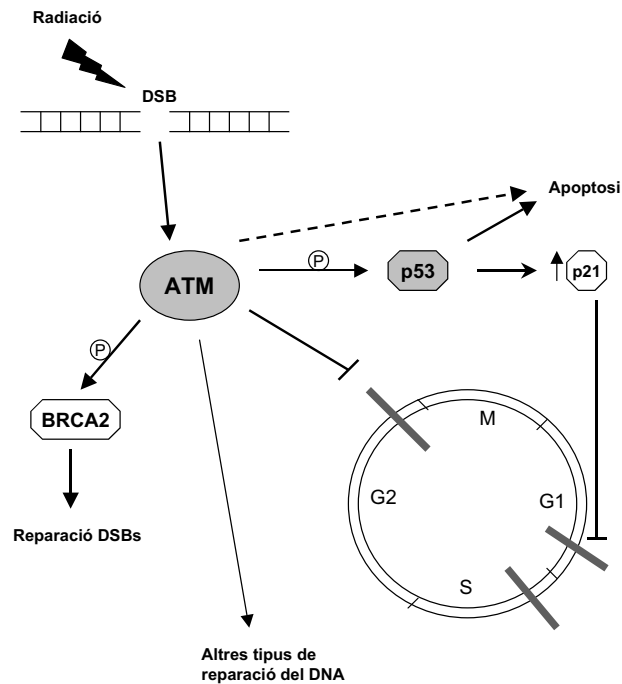


Figura 11. Esquema de la resposta cel·lular davant els DSB.

A més, BRCA1 també pot activar la transcripció de p21 per a aturar el cicle cel·lular. Mutacions als gens BRCA han estat relacionades amb la predisposició en dones de patir càncers de pit i d'ovari (Yoshida and Miki, 2004). BRCA1 i BRCA2 tenen activitat transcripcional potencial (Milner et al., 1997, Monteiro et al., 1996), però tot i que Rad51 és un component de l'holoenzim RNA polimerasa II (Maldonado et al., 1996), no es coneix que tingui activitat transcripcional per ell mateix. Tot i així, s'ha descrit la disminució de l'activitat transcripcional de p53 per interacció amb Rad51 i BRCA2 (Marmorstein et al., 1998). BRCA1 pot interaccionar amb el factor de transcripció **Sp1** i s'ha observat que aquesta interacció impedeix la unió de Sp1 al DNA en el promotor de IGF-IR (insulin-like growth factor-I receptor) (Abramovitch et al., 2003).

Recentment s'ha demostrat que STAT-1 pot modular els punts de control del cicle cel·lular en resposta a dany al DNA. Així, cèl·lules deficientes en STAT-1 presenten alteracions als punts de control de la fase S i al G2/M en resposta a dany al DNA i associats a una disminució de la funció de la via ATM-Chk2 (Townsend et al., 2005).

El procés de transcripció i reparació del DNA ha d'estar associat per a permetre la reparació, de manera que els activadors transcripcionals podrien estar afavorint la reparació del DNA, ja que s'uneixen al DNA i produeixen remodelacions de la

cromatina que afavoririen la unió de la maquinària de reparació del DNA (Frit et al., 2002).

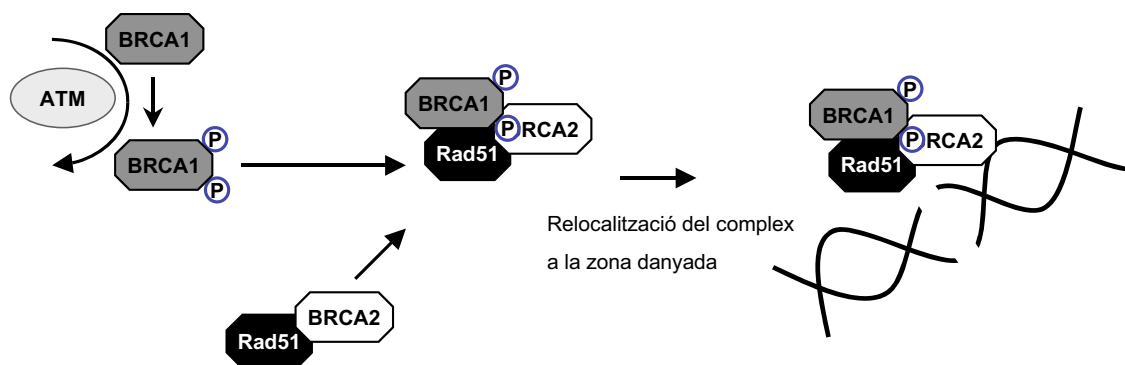


Figura 12. Esquema del mecanisme d'acció de les proteïnes BRCA

A més de la reparació per HR, hi han altres mecanismes de reparació del DNA que permeten la detecció, eliminació i correcció de la zona del dany incloent nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER) i non-homologous end joining (NHEJ) (Bassal and El-Osta, 2005).

Les lesions al DNA poden activar també la via de **NFκB**, tot i que aquesta via d'activació ha estat poc estudiada i no es coneix encara la seva rellevància fisiològica (N. D. Perkins, 2004).

3.3. DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES

La degradació de proteïnes via proteasoma té un paper important en la regulació del cicle cel·lular, ja que permet disminuir ràpidament els nivells de proteïnes que regulen les diferents etapes del cicle.

La via de conjugació d'ubiquitina implica l'activitat de tres complexos protèics anomenats E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) i E3 (ubiquitin-protein ligase) (Hershko and Ciechanover, 1998). El E1 catalitza la formació d'un pont tioester entre la ubiquitina i l'enzim E1. Posteriorment, la ubiquitina es transfereix a l'enzim E2 i finalment, l'enzim E3 facilita la formació de la unió entre la proteïna diana i la ubiquitina (del Pozo and Estelle, 2000) (Fig. 13). Existeixen un gran nombre de complexos E3 que es poden classificar en tres grups: SCF, APC i pVHL (del Pozo and Estelle, 2000).

El complex SCF està format per quatre subunitats: cullin, SKP1, RBX1 i la proteïna F-box (Deshaies, 1999, Patton et al., 1998). Les tres primeres proteïnes formen un complex on es poden unir diferents proteïnes F-box que determinaran l'especificitat del complex (del Pozo and Estelle, 2000). Nombrosos estudis indiquen que és necessària una fosforilació prèvia de la proteïna diana per a que pugui actuar el complex SCF (Fig. 13).

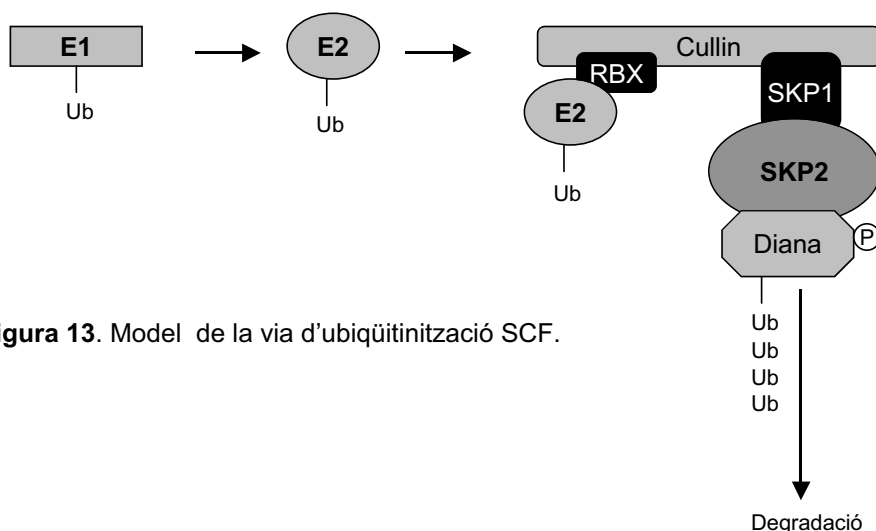


Figura 13. Model de la via d'ubiquïtinització SCF.

SKP2 és una proteïna F-box, originàriament identificada per la seva associació amb el complex Ciclina A/CDK2 (H. Zhang et al., 1995). Aquesta proteïna és important per a la regulació del cicle cel·lular perquè està implicada en la degradació de l'inhibidor del cicle p27 (Carrano et al., 1999), així com del factor de transcripció **E2F** (Marti et al., 1999). SKP2 s'acumula de forma dependent del cicle cel·lular augmentant els seus nivells durant les fases G1-S, acumulant-se a la fase S i decaient a la fase M (Lisztwan et al., 1998, Michel and Xiong, 1998), de forma que condiona el moment d'ubiquïtinització i degradació de les seves dianes (Marti et al., 1999). La proteïna SKP2 també ha estat relacionada amb la regulació de la transcripció per degradació de diferents factors de transcripció, així com de co-repressors que poden estar afectant a l'activitat d'alguns factors de transcripció (Conaway et al., 2002). Concretament, SKP2 actua com a cofactor juntament amb c-Myc per a activar el promotor de la α -prothymosin (von der Lehr et al., 2003). A més, s'ha proposat la possibilitat de que SKP2 pugui tenir un paper en la regulació del cicle cel·lular a través d'interaccions proteïna-proteïna amb altres reguladors del cicle com la CDK2 i CksHs1 (Michel and Xiong, 1998, Sutterluty et al., 1999).

OBJECTIUS



El principal objectiu d'aquesta tesi ha consistit en estudiar la regulació del promotor de *Sp3*, així com aprofundir en la regulació del promotor de *Sp1*.

Els objectius concrets han estat:

⇒ Analitzar el promotor de *Sp3*:

1. Clonar la regió promotora del factor de transcripció *Sp3*, determinar l'inici de transcripció del gen *Sp3*, i establir l'extensió de la regió mínima promotora.
2. Estudiar els diferents factors de transcripció capaços d'unir-se al promotor mínim de *Sp3*.
3. Analitzar funcionalment la regió 5'-UTR de *Sp3*. Estudiar la possible autorregulació del gen pel seu propi producte, *Sp3*, i per altres factors de transcripció.
4. Analitzar l'efecte dels diferents factors de transcripció que regulen el promotor de *Sp3* sobre els nivells de mRNA endògens per a *Sp3*.

⇒ Aprofundir en la regulació del promotor de *Sp1*:

1. Identificar les proteïnes que puguin interaccionar amb el factor de transcripció *Sp1*.
2. Determinar l'efecte d'aquestes proteïnes sobre el promotor de *Sp1* a nivell de la seva unió al promotor i de la seva funcionalitat.
3. Analitzar l'efecte de les proteïnes estudiades sobre els nivells de mRNA endògens per a *Sp1*.