

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

REGULACIÓ DEL PROMOTOR DE *Sp3*

ALICIA TAPIAS SOLER
Barcelona 2008

DISCUSSION



Donada la importància de la família Sp sobre la regulació transcripcional general i en concret sobre la regulació del gen *dhfr* que codifica per a la diana estudiada al nostre grup i tot considerant que en nombroses ocasions s'havia relacionat l'alteració de la funció d'aquestes proteïnes Sp amb la resistència a quimioteràpics, el nostre grup es va interessar en l'estudi de la regulació de la transcripció del membre Sp1 de la família. Per això, vam analitzar la regulació del promotor de *Sp1*. Donat que l'efecte final sobre un promotor regulat per caixes Sp depèn del balanç Sp1/Sp3 vam decidir estudiar també la regulació del factor de transcripció Sp3 i determinar els trets comuns i diferencials entre la regulació de *Sp1* i la de *Sp3*. D'altra banda, ens vam proposar aprofundir més en la regulació del promotor de *Sp1* mitjançant l'estudi de la regulació per proteïnes que podien interaccionar amb la proteïna Sp1.

1. REGULACIÓ DEL PROMOTOR DE *Sp3*

En el moment d'iniciar aquest treball, no existien referències a la bibliografia sobre la regió 5'-UTR del gen *Sp3* ni la seva estructura gènica completa. Aleshores Oleksial i Crawford van descriure que la seqüència coneguda fins al moment del mRNA de *Sp3* era incompleta ja que li mancaven tres exons a la regió 5' (Oleksiak and Crawford, 2002). Aquesta dada va modificar la visió de que la proteïna Sp3 tenia un inici de traducció no-AUG per a la seva isoforma gran (Hernandez et al., 2004, Hernandez et al., 2002). A partir de les dades de Oleksiak et al., vam dissenyar uns encebadors i vam amplificar un fragment de 546bp del promotor de *Sp3* utilitzant com a motillo DNA genòmic de cèl·lules HeLa. Aquest fragment es va emprar en l'estudi de la regulació transcripcional de *Sp3*.

Tal com s'havia descrit anteriorment per al promotor de *Sp1* (Nicolas et al., 2001), el promotor de *Sp3* no conté caixa TATA ni element iniciador (TCAGT) i és una regió rica en GC amb una caixa d'unió putativa per a Sp1, que en absència de caixa TATA o element iniciador podria estar dirigint l'inici de la transcripció (Bucher, 1990).

Utilitzant les tècniques de primer extension i ribonucleasa protection, es van localitzar múltiples inicis de transcripció a les posicions -70, -98, -108 i -132 respecte a l'inici de la traducció en cèl·lules HeLa, HT29 i MCF-7. L'existència de múltiples inicis de transcripció és un tret característic dels gens ubicus que no contenen caixa TATA a les seves regions promotores (Schatt et al., 1990). Paral·lelament a la publicació d'aquests resultats, va aparèixer una treball que determinava l'inici de transcripció de *Sp3* per RLM-RACE a les línies cel·lulars SHAC, PH2MT i HT1080 de fibrosarcoma. Aquest estudi arribava a la conclusió de que *Sp3* presentava múltiples inicis de transcripció a les tres línies analitzades i només un d'ells era comú. Aquests inicis de transcripció estaven situats entre les posicions -132 i -203 (Lou et al., 2005), de

manera que només un d'ells coincidia amb les nostres determinacions. Aquests resultats no són contradictoris donat que, tal com s'ha indicat anteriorment, és previsible l'existència de múltiples inicis de transcripció per a aquest gen i aquests poden variar segons la línia cel·lular. El fet de que *Sp3* presenti múltiples inicis de transcripció el diferencia de *Sp1* amb només un a -63bp respecte l'inici de traducció en cèl·lules HeLa, HepG2 i 293T (Nicolas et al., 2001).

Hem demostrat que la regió compresa als primers 281bp respecte l'inici de traducció de la regió 5'-UTR de *Sp3* conté tots els elements necessaris per a l'activitat del promotor. El promotor mínim de *Sp1* també estava comprés als primeres 281 bp respecte l'inici de traducció (Nicolas et al., 2001). L'anàlisi computacional del promotor proximal de *Sp3* va revelar llocs d'unió putatius per als factors de transcripció c-Myb, NF-1, Ap1, Sp1, NF-Y, E2F, elk-1 i USF. El fet de que aquestes caixes estiguin situades en una regió altament conservada entre la seqüència humana i la de ratolí suggeria que totes elles podien tenir rellevància *in vivo*. En una primera anàlisi no vam localitzar cap caixa de E2F al promotor de *Sp3*. Tanmateix, vam identificar posteriorment una possible caixa d'unió per a E2F que exerceix un paper important en la regulació de *Sp3* pel seu efecte repressor. Cal destacar que la caixa d'unió per *Sp* està parcialment solapada amb una caixa per a *Myb*. En promotors d'altres gens també s'ha observat solapament de la caixa d'unió per *Sp* amb caixes d'unió per a altres factors com *egr* o *NF-Y*. En el cas del promotor de *Sp1*, una de les caixes *Sp1* estudiades estava solapada amb una caixa *NF-Y*. La presència de caixes solapades sovint fa difícil determinar quin dels dos factors està regulant la transcripció i el resultat final de la regulació sempre serà dependent del context cel·lular.

Una conclusió important d'aquest treball és que *Sp3* s'autoregula de forma positiva. La cotransfecció de la construcció que contenia el promotor proximal (pSP3FOR4) amb el vector d'expressió de *Sp3* va demostrar que *Sp3* pot activar la seva pròpia transcripció. *Sp1* també és capaç d'activar el promotor de *Sp3*, obtenint un efecte additiu amb *Sp3* quan es sobreexpressen els dos factors al mateix temps juntament amb la construcció pSp3FOR4. La utilització de plàsmids dominants negatius per a *Sp1* i *Sp3* va posar de manifest la importància d'ambdues proteïnes en l'activitat basal del promotor de *Sp3*. La unió de *Sp1* i *Sp3* al promotor de *Sp3* es va demostrar mitjançant EMSA i ChIP. L'activació del promotor per *Sp3* és un altre tret diferencial remarcable entre la regulació dels promotors de *Sp3* i *Sp1* ja que *Sp3* es comporta com a repressor de l'activació mitjançada per *Sp1* pel promotor de *Sp1* (Nicolas et al., 2003). Aquesta diferència està d'acord amb la hipòtesi de que *Sp3* es pot comportar com a activador en aquells promotors amb una única caixa *Sp* i com a repressor en

aquells amb múltiples caixes Sp (Yu et al., 2003). El promotor de *Sp1* conté dues caixes Sp i el de *Sp3* només una. El mecanisme d'autoregulació positiva s'ha descrit per a altres factors de transcripció com Sp1 (Nicolas et al., 2003, Nicolas et al., 2001), NF-kB2 (Liptay et al., 1994), junD (Berger and Shaul, 1994) i CREB (Meyer et al., 1993). El fet de que Sp1 sigui activador de Sp1 i Sp3, i Sp3, al mateix temps, sigui repressor de Sp1 i activador de Sp3 representa un mecanisme de retroalimentació força complex que permet que la relació Sp1/Sp3 pugui variar de forma dinàmica (Fig.19).

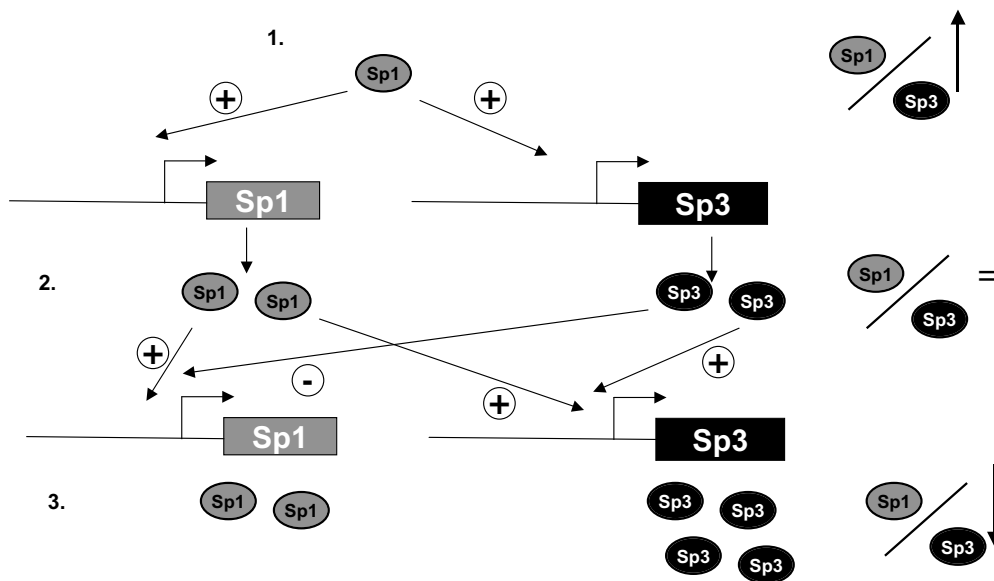


Figura 19. Esquema de la regulació creuada entre Sp1 i Sp3. Partint d'una molècula de Sp1 representativa d'una relació elevada Sp1/Sp3 (1), Sp1 activa la transcripció de Sp1 i Sp3 equilibrant la relació Sp1/Sp3 (2). Sp3 activa la seva transcripció i reprimeix la de Sp1, de manera que en un últim punt (3) la relació Sp1/Sp3 s'hauria invertit respecte a l'existent al punt 1.

El promotor de Sp3 també conté una caixa d'unió funcional per a NF-Y on s'uneix el factor NF-Y, tal i com s'ha demostrat per Gel-shift i ChIP. Addicionalment NF-Y és capaç d'unir-se a la caixa per NF-1 present al promotor. NF-YA activa el promotor de Sp3 a l'igual que és capaç d'activar el promotor de Sp1 (Nicolas et al., 2003). Quan NF-Y es va co-transfectar amb Sp1 o Sp3 es va observar un efecte sinèrgic. Aquest efecte entre Sp1 i NF-Y s'havia descrit per a altres promotors incloent el promotor de Sp1.

Hem observat que el promotor de Sp3 és activat pel factor de transcripció NF-1/CTF i que aquest es pot unir a la seva caixa al mateix temps que NF-Y s'uneix a aquesta regió. La co-expressió dels dos factors augmenta l'activitat del promotor de forma additiva demostrant que tots dos es poden unir de forma independent al promotor. NF-

1 pot disminuir l'activació causada per Sp1 en alguns promotors com el de la poli-(ADP-ribosa)polimerasa i el de la cadena DPGFA (Laniel et al., 2001, Rafty et al., 2002) i Sp1 disminueix l'activació mediada per NF-1 al promotor del col·lagen1 (Nehls et al., 1991). Sorprenentment, els nostres resultats indiquen que Sp1 i NF-1/CTF actuen de forma sinèrgica sobre el promotor de *Sp3*, tot i que altres membres de la família NF-1 com NF-1/X podrien comportar-se com a repressors del promotor de *Sp3* o disminuir l'activació produïda per Sp1.

Els nostres resultats indiquen que *Sp3* està regulat per factors de la família Myb que és una família important per a l'hematopoiesi (I. H. Oh and Reddy, 1999) La sobreexpressió de c-Myb i B-Myb augmenta l'activitat del promotor de *Sp3* així com els nivells de mRNA de *Sp3* i la combinació d'aquests factors amb Sp1 i *Sp3* demostra que existeix cooperació entre totes aquestes proteïnes per a activar el promotor de *Sp3*. La combinació de Sp1 i B-Myb té un efecte sinèrgic possiblement pel fet de que B-Myb té la capacitat d'actuar per un mecanisme independent de la unió al DNA en cooperació amb el factor Sp1. Aquest mateix mecanisme es dona pel promotor del propi *B-Myb*, Sp1 i B-Myb actuen de forma conjunta als dos promotors establint-se un altre mecanisme de retroalimentació (Sala et al., 1999). Mitjançant assajos de gel-shift vam observar que les proteïnes Myb no estan unides al promotor de *Sp3* si ho estan les proteïnes Sp, ja que les caixes Sp i Myb estan parcialment solapades. Els assajos d'immunoprecipitació de cromatina van demostrar que aquestes proteïnes s'uneixen *in vivo* al promotor de *Sp3*, tot i que aquest resultat no implica que la unió sigui directament a través les seves caixes d'unió, ja que la mutació de la caixa Myb a la construcció pSp3FOR4 no aboleix l'activació per c-Myb. El fet de que *Sp3* estigui regulat per proteïnes importants en el procés hematopoiètic permet explicar en part com una proteïna ubicua és important en el procés hematopoiètic. Els ratolins knockout de *Sp3* presenten una alteració en l'hematopoiesi general que afecta particularment als linatges mieloide i eritroide (Van Loo et al., 2003). Les alteracions hematopoiètiques derivades de l'absència de *Sp3* es deuen a l'existència de nombrosos llocs d'unió funcionals per a Sp als promotors de gens implicats en aquest procés (Van Loo et al., 2003).

L'anàlisi computacional del promotor de *Sp3* va situar dues caixes putatives per a AP-1 en aquesta regió. Només una de les dues caixes AP-1 així identificades és reconeguda per AP-1, tal com van mostrar els assajos de gel-shift. A més AP-1 es pot unir *in vivo* al promotor de *Sp3*. La sobreexpressió de c-Jun i c-Fos va tenir un efecte equivalent sobre el promotor de *Sp3* i la combinació dels dos va originar un efecte

additiu. La regió on està localitzada la caixa AP-1 és una regió amb baixa activitat luciferasa, indicant que l'efecte basal produït per aquestes proteïnes és poc significatiu. Les proteïnes de la família AP-1 s'activen en resposta a diferents senyals com la radiació UV i ionitzant, l'estrés oxidatiu, la despolarització neuronal, citocines i infeccions víriques (Shaulian and Karin, 2002) i tenen com a diana gens que són induïts en resposta a aquestes situacions. Diferents estudis han demostrat que Sp3 s'indueix de forma significativa en neurones corticals en situacions d'estrés oxidatiu afavorint així la supervivència cel·lular (Ryu et al., 2003). Un possible mecanisme per la inducció de Sp3 en resposta a l'estrés oxidatiu seria precisament a través de la seva regulació per AP-1. Així doncs, tot i que AP-1 no sembla contribuir de forma important a la transcripció basal de Sp3, podria jugar un paper important en la inducció de l'expressió de Sp3 en determinades situacions. Es sap que c-Jun pot interaccionar amb proteïnes de la família Sp i que això és important per a la funció d'alguns promotors com el de *p21* i *Smad6* (Brodin et al., 2000, Kardassis et al., 1999). En el nostre cas, la coexpressió de c-Jun amb Sp1 i Sp3 en cèl·lules HeLa té un efecte additiu sobre la construcció pSp3FOR4.

De tots els factors de transcripció que hem estudiat en relació amb la regulació del promotor de *Sp3*, només un ha demostrat tenir un paper repressor sobre aquest promotor, i aquest ha estat, curiosament, el factor de transcripció E2F1. E2F1/DP1 es comporta com a repressor potent del promotor de *Sp3* i és capaç de disminuir notablement els nivells de mRNA de *Sp3*. Altres estudis també han descrit efectes inhibitoris per a E2F1 pels gen de la *telomerase reverse transcriptase* o de l'inhibidor de l'activador de plasminogen tipus 1 (Crowe et al., 2001, Koziczak et al., 2001) tot i que habitualment aquest factor de transcripció es comporta com a activador transcripcional. E2F es pot unir a proteïnes com pRb, p107 o p130 que inhibeixen la seva activitat transcripcional o el converteixen en un repressor per reclutament d'activitats histona deacetilasa o metil transferasa. Als nostres experiments, la sobreexpressió de E2F1/DP1 produeix una repressió de l'activació transcripcional mitjançada per Sp1 i Sp3 sobre el promotor de *Sp3*, la sobreexpressió de E2F1/DP1 és capaç d'abolir l'activació produïda per la sobreexpressió d'aquests dos factors. Aquesta repressió pot ser deguda a la formació d'un complex transcripcional entre E2F i Sp1 i/o Sp3, donat que aquestes proteïnes poden interaccionar físicament (Rotheneder et al., 1999). La regulació negativa de *Sp3* per E2F1 és l'últim dels trets diferencials importants entre la regulació de la transcripció de *Sp1* i la de *Sp3*, ja que E2F1 es comporta com a activador transcripcional del promotor de *Sp1* (Nicolas et al., 2003). De fet, E2F1 és el factor amb efectes més diferenciats entre els dos promotors

ja que la repressió sobre el promotor de *Sp3* és forta, així l'activació de E2F1 en un moment donat seria capaç de disminuir fortament els nivells de Sp3 i augmentar els de Sp1 alhora (Fig. 20). Aquest mecanisme permetria invertir la relació Sp1/Sp3 gràcies a l'efecte d'un únic factor de transcripció.

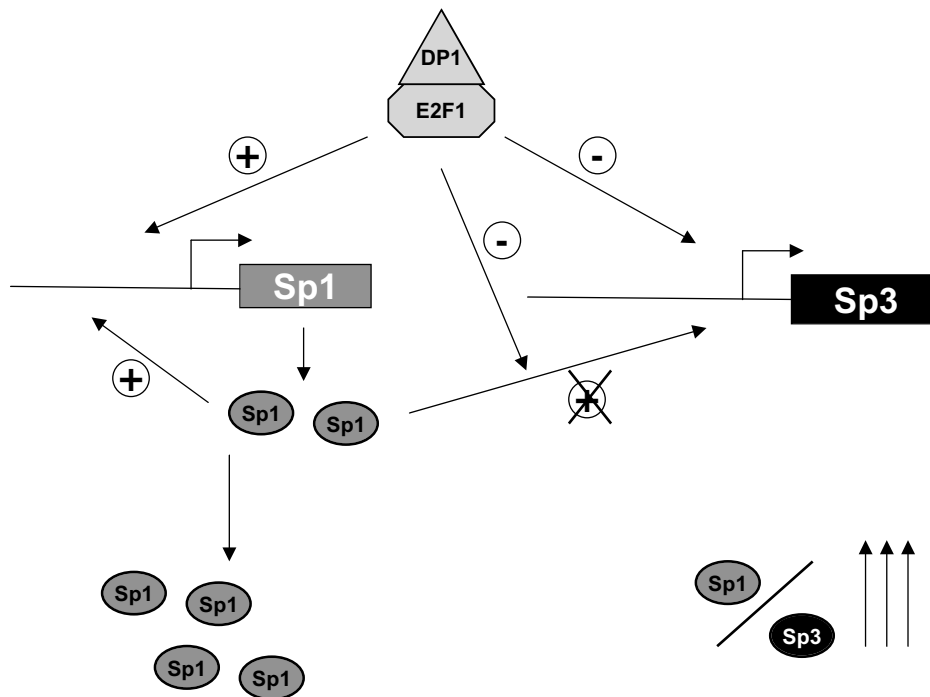


Figura 20. Esquema de la regulació dels promotors de *Sp1* i *Sp3* per E2F

En resum, les nostres dades representen un avenç en la comprensió de la complexa regulació de Sp3, que necessita de diferents factors ubicus com Sp1, Sp3, NF-Y, NF-1, B-Myb i E2F. A més hem pogut explicar com un factor de transcripció ubicu està regulat per activar-se en determinats processos com l'hematopoiesi gràcies a la participació dels factors de la família Myb, així com davant de situacions d'estrès gràcies a la família AP-1.

2. REGULACIÓ DE Sp1 PER REGULADORS DEL CICLE CEL·LULAR

El promotor de *Sp1* havia estat objecte d'estudi en el nostre grup i s'havia descrit que estava principalment regulat per Sp1, Sp3 i NF-Y (Nicolas et al., 2003). Donat que un dels elements que afecten l'activitat del factor de transcripció Sp1 és la seva interacció amb altres proteïnes, estudis previs s'havien centrat en l'estudi de la interacció de Sp1 amb Rb. Els resultats obtinguts demostraven que aquestes dues

proteïnes interaccionaven independentment de la fase del cicle cel·lular i que aquesta interacció augmentava l'activació produïda per Sp1 sobre el promotor del gen *dhfr* (Noe et al., 1998). A partir de totes aquestes dades, ens vam proposar identificar proteïnes que poguéssin interaccionar amb Sp1 i analitzar quin efecte tenia aquesta interacció sobre el promotor del propi *Sp1*, ja que aquest estava regulat per Sp1.

Sp1 s'ha relacionat amb el control de gens implicats en la regulació del cicle cel·lular, diferents estudis demostren la interacció de Sp1 amb reguladors del cicle. Per aquestes raons, vam decidir fer un cribatge de proteïnes reguladores del cicle cel·lular que poguéssin estar interaccionant amb Sp1 i per tant contribuint a la regulació transcripcional per Sp1 dependent del cicle. Per a aquest cribatge vam utilitzar un array que contenia 60 anticossos contra proteïnes del cicle cel·lular immovilitzats en una membrana. Els arrays d'anticossos permeten la determinació de la interacció d'una proteïna amb les diferents proteïnes que estan representades a l'array en un sol experiment. Sp1 era capaç d'unir-se putativament a moltes proteïnes diferents, de les quals 13 ja havien estat descrites pel que fa la interacció amb Sp1. La tècnica dels arrays d'anticossos és una tècnica de cribatge que pot originar falsos positius i és necessària una validació posterior. D'entre les diferents proteïnes que podrien interaccionar amb Sp1 vam triar un conjunt per a la seva posterior validació per immunoprecipitació, així com per a l'anàlisi del seu efecte sobre el promotor de *Sp1*. Aquestes proteïnes van ser CDK4, SKP2, Rad51, BRCA2 i p21. Totes elles juguen papers clau en diferents processos que podrien estar relacionats amb la funció transcripcional de Sp1. A més vam triar altres proteïnes, Stat3, p53, NFκB, E2F i Rb, per a les que la interacció amb Sp1 ja havia estat descrita.

Algunes de les proteïnes que interaccionen amb Sp1 estan formant part de la via bàsica de control de cicle cel·lular com ciclina/CDKs. El nostre grup havia descrit la interacció entre Sp1 i el gen supressor de tumors Rb (Noe et al., 1998). Rb és la principal diana dels complexos ciclina/CDK i la seva funció per al control del cicle cel·lular depèn, en gran mesura, de la seva interacció amb membres de la família de factors de transcripció E2F (Harbour and Dean, 2000). E2F1 pot interaccionar amb Sp1 per a la regulació de diferents promotors (Rotheneder et al., 1999). Finalment, Sp1 pot interaccionar amb CDK2 i Ciclina D de forma estable i aquesta unió afecta a la fosforilació de Sp1 (Banchio et al., 2004). En aquest treball hem demostrat mitjançant assajos de co-immunoprecipitació que Sp1 és capaç d'interaccionar amb CDK4 i amb l'inhibidor de CDKs p21. Aquesta interacció es pot donar mentre Sp1 està unit al seu propi promotor, ja que els assajos de CHIP utilitzant anticossos contra aquestes dues proteïnes van ser positius per a l'amplificació del promotor de *Sp1*. La

sobreexpressió de tots aquests reguladors del cicle cel·lular, CDK4, Rb, ciclinaD1, E2F i p21, augmenta l'activitat del promotor de *Sp1*.

Per analitzar amb més detall el paper d'aquestes proteïnes en la regulació de *Sp1*, vam determinar l'efecte de la combinació de la seva sobreexpressió sobre el promotor de *Sp1*. La combinació de CDK4 i p21 va tenir un efecte positiu sobre el promotor de *Sp1*, probablement degut al paper que juga p21 en l'ensamblatge del complex Ciclina D-CDK4 (Coqueret, 2003). La combinació de Rb i CDK4 va tenir un efecte additiu sobre l'activitat del promotor de *Sp1*, demostrant que l'efecte de Rb a través de la seva interacció amb *Sp1* és independent del seu grau de fosforilació d'acord amb observacions prèvies (Noe et al., 1998), i que podria variar en sobreexpressar la CDK4. D'acord amb aquests mateixos resultats i tot i que p21 produeix la defosforilació de Rb (Roninson, 2002), la combinació de Rb i p21 té efectes activadors sobre el promotor de *Sp1* però no additius. La combinació de E2F1 i Rb provoca un efecte produït principalment per Rb que possiblement segresta E2F i no permet que aquest produeixi la seva activació (Harbour and Dean, 2000).

A més d'activar el promotor de *Sp1*, E2F1, Rb i p21 van ser capaços d'activar un promotor artificial que contenia únicament caixes *Sp1*, de manera que els efectes observats podrien constituir un mecanisme general que afectaria a altres promotors regulats per *Sp1*. La sobreexpressió de ciclina D1 i CDK4 no va tenir efectes importants sobre aquest promotor suggerint que aquestes proteïnes necessiten la presència d'altres factors per a activar el promotor de *Sp1*. Un bon candidat per a contribuir a aquest l'efecte seria E2F1, ja que el promotor de *Sp1* conté una caixa per a aquest factor. La sobreexpressió de CDK4 i Ciclina D1 augmentaria la fosforilació de Rb, la qual cosa alliberaria a E2F i aquest podria unir-se al promotor de *Sp1*.

Un altre grup de proteïnes que podrien interaccionar amb *Sp1* era el complex SCF^{skp2} que juga un paper important en la degradació mitjançada per ubiquitina d'alguns reguladors del cicle cel·lular com p27 (Carrano et al., 1999) així com d'alguns factors de transcripció com E2F1 (Marti et al., 1999) o c-myc (von der Lehr et al., 2003). El complex SCF^{skp2} està format per quatre subunitats: cullin, SKP1, RBX1 i la proteïna F-box SKP2 (Deshaies, 1999). Les tres primeres formen una estructura comuna on poden unir-se diferents proteïnes F-box per a conferir especificitat al complex. La proteïna Cdc34 també està inclosa en aquest complex i permet la transferència de la molècula d'ubiquitina a la diana específica (Patton et al., 1998). Cdc34, p19Skp1, RbX1&2 i p45SKP2 estan presents a l'array d'anticossos i totes van originar senyals positius per a la interacció amb *Sp1*. Donat que SKP2 és la F-box del complex i qui reconeix el substrat, vam validar la seva interacció amb *Sp1* per co-

immunoprecipitació. Diferents estudis suggereixen una relació estreta entre l'activitat transcripcional d'un factor de transcripció i la seva ubiquïtinització/degradació (Conaway et al., 2002). Les nostres dades demostren que SKP2, en comptes d'inhibir el promotor de *Sp1* com a resultat de la degradació de *Sp1*, activa el promotor de *Sp1* i augmenta els seus nivells de mRNA. Aquest mateix efecte s'ha descrit per a la interacció entre el factor de transcripció c-myc i SKP2 (von der Lehr et al., 2003), i podria ser degut al reclutament de SKP2 al promotor de *Sp1* a través de la seva interacció amb *Sp1*, i la posterior degradació de reguladors negatius situats en aquesta regió. Aquesta hipòtesi és recolzada pel fet de que els assajos de ChIP són positius per a SKP2 sobre el promotor de *Sp1*. SKP2 també és capaç d'activar el promotor artificial que conté únicament caixes *Sp1* el que suggereix l'existència d'un mecanisme general de la regulació de la transcripció mitjançada per *Sp1* a través de la seva interacció amb el complex SCF. Alternativament, la ubiquïtinització de *Sp1* i la subsegüent degradació de la regió N-terminal podria degradar el domini repressor de *Sp1* convertint momentàniament a *Sp1* en un activador transcripcional més potent (Spengler and Brattain, 2006).

Un altre grup representat a l'array d'anticossos eren diferents proteïnes relacionades amb la reparació del DNA. Els gens BRCA són gens supressors de tumors involucrats en molts processos cel·lulars clau. Aquestes proteïnes contribueixen a la reparació del DNA i el manteniment de l'estabilitat cromosomal, protegint el genoma de lesions. Moltes d'aquestes funcions estan mitjançades per interaccions de diferents proteïnes amb BRCA (Yoshida and Miki, 2004). La interacció entre BRCA1 i *Sp1* ha estat descrita per a la regulació de l'expressió del gen IGF-IR (Abramovitch et al., 2003). En aquest treball hem demostrat que BRCA2 també és capaç d'interaccionar amb *Sp1* i augmenta l'activitat del promotor de *Sp1* i del promotor artificial que només conté caixes *Sp1*. Rad51 i RBBP són altres components de la maquinària de reparació que estan presents a l'array d'anticossos i que van originar resultats positius per a la interacció amb *Sp1*. La interacció amb Rad51 es va confirmar per co-immunoprecipitació. Rad51 va ser capaç d'activar el promotor de *Sp1* per unió directa o indirecta tal com van demostrar els assajos de ChIP, però no va ser capaç d'activar el promotor que contenia només caixes *Sp1*, indicant que l'efecte sobre el promotor de *Sp1* requereix altres elements a part de la caixa *Sp1*. Rad51 és un component de l'holoenzim RNA polimerasa II (Maldonado et al., 1996), però fins al moment no s'havia descrit una activitat transcripcional per ell mateix. S'havia demostrat una cooperativitat entre Rad51 i BRCA2 per a disminuir l'activitat de p53, de manera que Rad51 està acoblat al mecanisme de la transcripció a través de la seva

interacció amb p53 i BRCA2 (Marmorstein et al., 1998). Aquest mecanisme podria estar relacionat amb els nostres resultats ja que p53 es comporta com a repressor del promotor de *Sp1*. La combinació de BRCA2 i Rad51 no va tenir un efecte additiu sobre el promotor de *Sp1*, suggerint que aquestes proteïnes formen part d'un mateix complex que necessita d'altres per a produir un efecte més important sobre el promotor de *Sp1*. La interacció entre BRCA2 i Rad51 ha estat descrita a la literatura (Marmorstein et al., 1998) i existeixen evidències de que és fonamental per a la divisió cel·lular i l'estructura dels cromosomes (Yoshida and Miki, 2004).

La interacció de Sp1 amb altres proteïnes també inclou la interacció amb diferents factors de transcripció com Stat1, Stat3, p53 i NFκB. El supressor de tumors p53 està involucrat en l'activació transcripcional de gens importants en la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi, com p21 (Levrero et al., 2000), i ha estat relacionat amb el dany al DNA i el control del cicle cel·lular. En els nostres experiments, la sobreexpressió de p53 reprimeix l'activitat del promotor de *Sp1*. El mecanisme de repressió de diferents gens per p53 implica la seva interacció amb Sp1 evitant així la unió de Sp1 a les seves caixes d'unió (Borellini and Glazer, 1993, Yamabe et al., 1998). Els nostres resultats estan d'acord amb aquestes observacions; p53 és capaç de contrarestar l'efecte positiu de p21 quan es combinen tots dos, probablement perquè Sp1 no es pot unir a la seva caixa al promotor de *Sp1* i p21 no pot aleshores exercir el seu efecte activador.

NFκB és un efector nuclear de les vies de senyalització en resposta a un gran número d'estímuls en diferents tipus cel·lulars (Gerondakis et al., 2006). NFκB és capaç de participar en la regulació transcripcional de gens diana independentment de la presència del seu lloc d'unió, a través d'interaccions amb altres factors de transcripció. NFκB i Sp1 s'uneixen de forma cooperativa i activen de forma sinèrgica la transcripció del virus VIH (Perkins, 2004). NFκB pot tenir efectes repressors sobre l'enzim gluconeogènic PEPCK pel segrestament de proteïnes coactivadores com CBP (Xiao et al., 2004). En el nostre model, NFκB es comporta com un repressor de l'activació dependent de Sp1 sobre el promotor de *Sp1* i el promotor artificial que només conté caixes Sp1, demostrant que l'efecte repressor de NFκB sobre l'activació mitjançada per Sp1 pot ser un mecanisme general de promotors on no es troben caixes de reconeixement per a NFκB, però sí per a Sp1.

La família de proteïnes STAT engloba factors de transcripció involucrats en l'estimulació del creixement o diferenciació dependent de lligand així com en efectes antiproliferatius (Darnell, 1997). Tant Stat1 com Stat3 poden interaccionar amb Sp1 (Loeffler et al., 2005, Look et al., 1995). Stat3 activa la transcripció de VEGF gràcies a

la seva interacció amb un complex Sp1/DNA i no per unió directa a la seva seqüència de reconeixement (Loeffler et al., 2005). D'acord amb aquestes observacions, en les nostres condicions, Stat3 és reclutat al promotor de *Sp1*, tal com es va demostrar per CHIP i, gràcies a la seva interacció amb Sp1, és capaç d'activar el promotor de *Sp1* així com el promotor artificial dependent de Sp1.

La interacció Sp1-p21 va ser objecte d'un estudi més detallat donat que p21 va ser la proteïna que va activar de forma més notable el promotor de *Sp1* i existeixen diferents treballs que demostren que aquesta proteïna pot tenir efectes transcripcionals a través d'un mecanisme poc conegut (Chang et al., 2000, Gregory et al., 2002, Poole et al., 2004). En primer lloc, vam confirmar tot els resultats obtinguts en cèl·lules HeLa a les cèl·lules HT1080 p21-9, que contenen el gen *p21* induïble per IPTG. Aquestes cèl·lules permeten modular els nivells intracel·lulars de p21 assolint valors alts fisiològics. Es va observar que el promotor de *Sp1* era activat per l'expressió de p21 produïda per l'IPTG de manera dependent del temps d'incubació i de la concentració d'IPTG afegida al medi. També vam confirmar els efectes observats a nivell del mRNA de Sp1 i sobre el promotor artificial controlat per Sp1. Finalment, vam analitzar els nivells de la proteïna Sp1 després de la inducció de p21 amb IPTG. Sorprenentment, la inducció de p21 va reduir els nivells de proteïna Sp1 fins a un 80%. Aquest resultat concorda amb el fet que els nivells de Sp1 disminueixen en teixits animals vells i en cèl·lules senescent, degut a una reducció de l'estabilitat de Sp1 i a un augment de la seva degradació (Ammendola et al., 1992, Bouwman and Philipsen, 2002, J. E. Oh et al., 2007), ja que la inducció de p21 va acompanyada de senescència (Roninson, 2002). Per analitzar aquest efecte, vam tractar les cèl·lules amb E64d, un inhibidor de proteases lisosomals i calpaïnes, durant les 24 hores d'incubació amb IPTG i vam poder comprovar que els nivells de Sp1 es recuperaven, demostrant que l'efecte produït per p21 era degut a un augment de la degradació de Sp1 dependent de lisosomes. Sp1 i Rb poden ser degradats per la mateixa via (Nishinaka et al., 1997) i una publicació recent descriu la degradació de Rb mitjançada per p21 (Broude et al., 2007). L'activació del promotor de *Sp1* i l'augment dels nivells de mRNA esta d'acord amb observacions prèvies utilitzant inhibidors de CDKs (Penuelas et al., 2003). Dues hipòtesis diferents permeten explicar aquest efecte diferencial sobre els nivells de mRNA i proteïna produït per p21: la defosforilació de determinats residus de Sp1 que cursa amb un increment de l'activitat transcripcional de Sp1 tot i que s'estigui degradant i/o, la degradació del domini repressor que pot convertir a Sp1 en un activador més potent però inestable (Spengler and Brattain, 2006). En ambdós casos, un increment en l'activitat transcripcional de Sp1 incrementaria la transcripció de *Sp1*

donat que Sp1 s'autoregula positivament. De fet, les dues hipòtesis podrien tenir lloc simultàniament, en alguns casos, els canvis en l'estat de fosforilació són senyals per a la degradació de proteïnes. Efectes similars s'han descrit per a Rb que pot ser activat per p21 per defosforilació i degradat al mateix temps (Broude et al., 2007).

La conclusió final d'aquest treball és que el procés de transcripció és un mecanisme molt complex, que requereix l'acció coordinada de diferents factors de transcripció sobre un promotor, així com d'altres proteïnes que poden estar modificant l'activitat d'aquests factors, ja sigui per interacció directa amb ells o per la seva capacitat de modificar-los posttraduccionalment. La regulació paral·lela i creuada entre diferents factors de transcripció com Sp1-Sp3, B-Myb-Sp3, E2F1-Sp1/Sp3, implica l'existència de complexos mecanismes de retroalimentació. Sp1 i Sp3 presenten una complexa regulació amb alguns punts en comú (Fig.21). El fet de que Sp3 estigui regulat per Sp1 indica la seva possible regulació pels reguladors del cicle cel·lular, que interaccionen amb Sp1 i regulen el promotor de *Sp1*

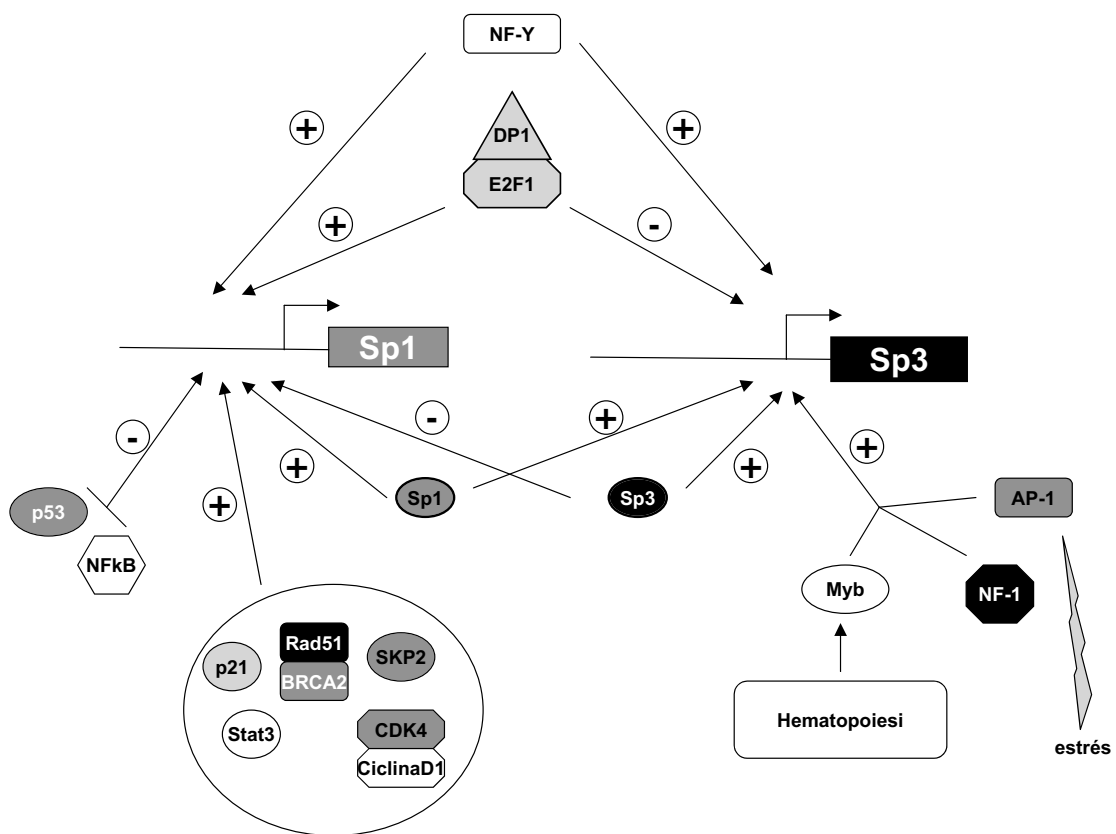


Figura 21. Esquema de la complexa regulació dels promotors de *Sp1* i *Sp3* amb els seus punts en comú.

CONCLUSIONS



⇒ La seqüència del promotor de *Sp3* humana és una seqüència conservada que no conté caixa TATA i que conté potencials llocs d'unió per als factors de transcripció: Sp1, NF-Y, NF-1, Myb, E2F, AP-1, elk-1, AP-2 i USF. *Sp3* conté múltiples inicis de transcripció a -70, -98, -108 i -132 nt respecte l'inici de traducció.

⇒ El promotor mínim de *Sp3* és la regió compresa fins a -225 bp respecte l'inici de traducció. La regió compresa fins a -281 bp respecte l'inici de traducció s'ha definit com a promotor proximal.

⇒ Sp1 i *Sp3* són capaços d'unir-se a les seves caixes d'unió presents al promotor de *Sp3* i ambdós són capaços d'activar la transcripció d'aquest gen.

⇒ NF-Y és capaç d'unir-se a dues caixes d'unió presents al promotor de *Sp3*, la pròpia i la corresponent al factor de transcripció NF-1, i es comporta com a activador de la transcripció de *Sp3*. La combinació de NF-Y amb Sp1/*Sp3* té efectes sinèrgics sobre l'activitat del promotor de *Sp3*.

⇒ El factor de transcripció NF-1 és capaç de reconèixer la seva caixa d'unió i activar la transcripció de *Sp3*. Aquest efecte és independent de la unió de NF-Y a la caixa d'unió que comparteixen NF-1 i NF-Y i tots dos poden activar el promotor de *Sp3* de forma conjunta. La sobreexpressió conjunta de NF-1 i Sp1 o *Sp3* té un efecte additiu sobre la transcripció del promotor.

⇒ Els factors de transcripció de la família Myb, c-Myb i B-Myb, poden unir-se al promotor de *Sp3* i activar la seva transcripció. La sobreexpressió conjunta de les proteïnes Sp i les proteïnes Myb té efectes sinèrgics sobre el promotor de *Sp3* possiblement de manera independent de la unió de Myb a la seva seqüència consensus present al promotor.

⇒ Les proteïnes c-Jun i c-Fos s'uneixen i activen el promotor de *Sp3*. La sobreexpressió conjunta de c-Jun i Sp1 o *Sp3* té efectes additius sobre l'activitat d'aquest promotor.

⇒ El factor de transcripció E2F1 s'uneix al promotor de *Sp3* i es comporta com a repressor de la transcripció, sent capaç d'abolir l'activació produïda per les proteïnes Sp.

⇒ El factor de transcripció Sp1 pot interaccionar amb les proteïnes reguladores del cicle cel·lular CDK4, p21, BRCA2, Rad51 i SKP2. Aquestes proteïnes són reclutades sobre el promotor de *Sp1* i són capaces d'activar-lo.

⇒ Stat3, Rb i E2F1/DP1 es comporten com a activadors transcripcionals del promotor de *Sp1* gràcies a la seva interacció amb Sp1. p53 i NFκB es comporten com a repressors de l'activitat dependent de Sp1.

⇒ La interacció Sp1-p21 té un efecte dual sobre Sp1. D'una banda, activa la seva transcripció i l'activitat dependent de Sp1, i d'altra indueix la degradació de la proteïna Sp1.