

18.191

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Biología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



* 5 3 0 9 5 6 6 7 7 9 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

LA FAMILIA DE GENES DE LA QUERATINA 6:
CARACTERIZACION Y REGULACION

Tesis Doctoral
Jose Manuel Navarro Espinel
Madrid, 1992

V°B° del Ponente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Perera González', written over a circular stamp.

Dr. J. Perera González

V°B° del Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Jorcano Noval', written over a diamond-shaped stamp.

Dr. J.L. Jorcano Noval

Este trabajo de investigación ha sido desarrollado en el Departamento de Biología Celular y Molecular del CIEMAT bajo la dirección del Dr. Jose Luis Jorcano Noval.

Quisiera mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en el desarrollo de esta tesis. En particular a algunos de ellos: Carmen Segrelles, por su fabuloso apoyo técnico y sin par compañerismo. Jose Casatorres, cuya ilimitada paciencia y valiosas ayudas científicas nunca agradeceré lo suficiente. Pepe Almendral participó activamente en la primera parte de este trabajo. Jörg Klug me ayudó con los *footprints*. Y también a Jesús (claro está), Jose Luis, Angel, Llanos, Mirentxu, Juan Carlos, Jose Carlos, Montse, Angus, Sole, Pilar, Cristina, Fernando, Rodolfo, Txusma y todos los demás miembros del laboratorio.

Y ya, en un plano más extralaboral, todos aquellos que han contribuido con su amistad a hacer de este periodo algo difícilmente olvidable (ojo, los del laboratorio también entráis aquí): Carmen, Javier, Sabine, Ana, Angel, Rosa, Isabel, Luis, Qus, Pepa, Juan, Olga, Elvira, y especialmente Candelas y Loreto, y todos aquellos que no cito aquí simplemente por no hacer otro apartado de la tesis.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. INTRODUCCION GENERAL	2
1.1.1. Microtúbulos	2
1.1.2. Microfilamentos	2
1.2. FILAMENTOS INTERMEDIOS	3
1.2.1. Estructura de los Filamentos Intermedios	4
1.2.2. Proteínas de la familia de los Filamentos Intermedios: Proteínas de tipo III	5
1.2.3. Proteínas de tipo IV	7
1.2.4. Proteínas de tipo V	7
1.2.5. Proteínas de tipo VI	8
1.2.6. Origen de los Filamentos Intermedios.	9
1.3. PROTEINAS DEL TIPO I Y II: QUERATINAS.	9
1.3.1. Expresión y estructura.	9
1.3.2. Función.	12
1.3.3. Expresión de queratinas en epidermis. La queratina K6.	13
1.3.4. Genes	15
1.3.5. Expresión de los genes de queratinas.	17
1.4. OBJETIVOS	20
2. METODOS	22
2.1. Material biológico	23
2.2. Medios de cultivo y mantenimiento.	23
2.3. Soluciones básicas para métodos de biología molecular.	24
2.4. Amplificación de la genoteca.	24
2.5. Análisis de la genoteca.	25
2.6. Extracción y preparación de DNA plasmídico.	25
2.7. Manipulaciones enzimáticas básicas con DNA.	25
2.8. Electroforesis de ácidos nucleicos. Recuperación de fragmentos de DNA.	25
2.9. Obtención de RNA	26
2.10. Marcado radioactivo.	26
2.11. Preparación de extractos nucleares.	27
2.12. Ensayos de retardo en gel.	28
2.13. <i>Footprinting</i>	28
2.14. Secuenciación de DNA.	28
2.15. Hibridaciones.	29
2.16. Deleciones.	29
2.17. Transfecciones.	29
2.18. Ensayos CAT.	30
2.19. Materiales.	31
2.20. Medios informaticos.	31
3. RESULTADOS	32
Nota preliminar	33
3.1 ESTUDIO DEL GEN DE LA QUERATINA BK6c	34
3.1.1 Caracterización del clon λ K6.	34
3.1.2 Búsqueda del gen BK6.	36
3.1.2.1. Preparación de la sonda	36
3.1.2.2. Amplificación de la genoteca	37
3.1.2.3. Búsqueda en la genoteca.	37
3.1.2.4 Analisis de los clones	38
3.1.2.5 Caracterización de los clones.	40
3.1.2.6. Secuenciación del extremo 3'	44
3.1.2.7. Expresión de K6c	45
3.1.2.8. Secuenciación de la zona 5'	48
3.1.2.9. Secuenciación y comparación de los intrones.	51
3.1.3. Análisis del promotor de K6c	54
3.1.3.1. Preparación de los clones.	54

3.1.3.1.1 Obtención del promotor proximal	54
3.1.3.1.2 Preparación del promotor proximal	56
3.1.3.1.3 Preparación de los clones conteniendo la parte distal del promotor	58
3.1.3.2. Actividad del promotor de la K6c.	58
3.2. ELEMENTOS IMPLICADOS EN LA REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA BK6*	60
3.2.1. Determinación de los fragmentos del enhancer que unen proteínas nucleares.	60
3.2.2. Caracterización por <i>footprinting</i> de las zonas de unión.	63
3.2.3. Preparación y análisis de nuevos fragmentos del promotor de BK6*.	66
3.2.4. Competiciones.	71
3.2.5. Actividad de los fragmentos del enhancer de BK6*.	74
3.2.6. Efecto del ácido retinoico en la actividad del enhancer del gen de la BK6*.	75
3.2.7. Factores que se unen al promotor de la BK6* en líneas epidérmicas.	76
4. DISCUSION	80
4.1. DISCUSION BK6c	81
4.1.1. La queratina 6: una minifamilia de genes.	81
4.1.2. Relación entre genes humanos y bovinos.	83
4.1.3. Comparación de los intrones.	85
4.1.4. Expresión de BK6c.	85
4.1.5. Posibles elementos reguladores del gen BK6c	86
4.2. DISCUSION BK6*	89
4.2.1. Efecto del ácido retinoico en la expresión de los genes de queratinas.	89
4.2.2. El elemento AP-1	91
4.2.3. El elemento AP-2.	93
4.2.4. La "caja epidérmica".	95
4.2.5. Regulación de la queratina BK6*.	96
5. CONCLUSIONES	97
6. BIBLIOGRAFIA	100

Si no puedes convencerlos, confúndelos.

Truman

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AcetilCoA	Acetil coenzimaA
CAT	Cloramfenicol acetiltransferasa
cols.	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
CTAB	Bromuro de cetil trimetilamonio
D, kD	Dalton, kilodalton
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EBS	Epidermolisis ampullosa simple
EDTA	Acido etilendiamintetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Acido etilenglicol-bis(2-aminoetil-eter)-N,N,N',N'-tetraacético
fig	Figura
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glía
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
HP	Fragmento <i>PstI-XmnI</i> del <i>enhancer</i> de la BK5
HX	Fragmento <i>HindIII-XhoII</i> del <i>enhancer</i> de la BK6*
IF	Filamento intermedio
IL	Interleukina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
Mnl	Fragmento <i>MnII</i> del <i>enhancer</i> de la BK6*
NF	Neurofilamento
NGF	Factor de crecimiento nervioso
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PCV	Volumen de células empaquetadas
pb	Par de bases
PEG	Polietilenglicol
RA	Acido retinoico
RAR	Receptor del ácido retinoico
RARE	Elemento de respuesta al ácido retinoico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
TGF	Factor de crecimiento transformante
TK	Timidina quinasa
TPA	12-O-tetradecanato-13-acetato de forbol
ufp	Unidad formadora de placa
vol	Volumen
X-gal	5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

1. INTRODUCCION

1.1. INTRODUCCION GENERAL

En las células eucariotas coexisten de manera ubicua dos sistemas citoesqueléticos: microtúbulos y microfilamentos. Además, en la mayoría de las células de los vertebrados y en algunos invertebrados se puede encontrar un tercer sistema, llamado de filamentos intermedios. Este tercer sistema de filamentos intermedios (IF) difiere sustancialmente de los otros dos en varios sentidos, el principal de los cuales tal vez sea su diversidad: tanto los microfilamentos de actina como las proteínas que forman los microtúbulos están codificados por familias multigénicas, pero presentan unas pocas formas muy homólogas entre sí. Sin embargo los IF muestran una sorprendente diversidad de proteínas, específicas de cada tipo celular. Además, mientras que las funciones de los citoesqueletos de actina y microtúbulos son conocidas desde hace bastante tiempo, no ocurre así en el caso del citoesqueleto de IF, donde sólo muy recientemente (1991) han empezado a conocerse los primeros datos sobre su utilidad.

1.1.1. Microtúbulos

Los microtúbulos están formados por el ensamblaje de dos proteínas, α y β tubulina, de unos 55 kD cada una, formando dímeros $\alpha\beta$ que se agrupan de forma helicoidal, generando túbulos huecos de unos 25 nm de diámetro, con 13 subunidades por vuelta. Su ensamblaje está asociado a la hidrólisis de GTP a GDP, y al parecer existe un equilibrio dinámico entre la proteína polimerizada y disociada (Kirschner, 1978; Timasheff, 1979). El ensamblaje de los microtúbulos está polarizado, y en la mayoría de los casos se realiza en los llamados "centros organizadores": centrosomas, centriolos del huso mitótico, cuerpos basales y, en neuronas, la membrana nuclear. Presentan un gran número de proteínas asociadas a ellos (Olmsted, 1986) y su función está asociada con la motilidad: movimiento de cromosomas y cromátidas durante mitosis y meiosis (Mitchinson, 1988), progresión de gránulos de secreción desde el aparato de Golgi a la membrana celular, flujo axoplasmático de neuronas (Vale, 1987) y, en asociación con la dineína, formación de cilios y flagelos (Porter y Johnson, 1989).

En mamíferos, las tubulinas están codificadas por familias multigénicas (Cowan, 1984; Sullivan, 1988), en las que la mayor parte de los elementos son pseudogenes no funcionales. Existe una expresión diferencial de los genes de las tubulinas, lo que podría implicar una diversidad funcional de los diferentes isotipos. No obstante, recientemente se ha demostrado el libre intercambio de isotipos entre diferentes clases funcionales de microtúbulos en células en cultivo (Lewis y cols., 1987).

1.1.2. Microfilamentos

Los microfilamentos, con un diámetro de 5-7 nm, están compuestos principalmente de actina. La actina representa la proteína más abundante en la mayoría de las células eucariotas, suponiendo entre el 5-10% y en ocasiones hasta el 25% del total del contenido proteico celular. Existe en dos formas: globular (G-actina) y fibrilar (F-actina). El ensamblaje de la actina, también polarizado como en el caso de los microtúbulos, precisa de una molécula de ATP por molécula de G-actina. En mamíferos, la actina presenta al menos seis isoformas diferentes: una en músculo esquelético, otra en músculo cardíaco, dos

en músculo liso y dos citoplásmicas (Vandekerckhove y Weber, 1987). Las diferentes formas de actina parecen estar codificadas por familias multigénicas, y en el caso de humanos se han identificado 30 genes (Soriano y cols., 1982). No obstante todo esto, las diversas isoformas presentan una homología del 90%, y las divergencias afectan a cambios en aminoácidos sin variar la estructura de su grupo radical. Pese a la diversidad de isoformas, su expresión específica de tejido y regulación de la expresión durante la diferenciación muscular, *in vitro* las diferentes proteínas son intercambiables (Gunning y cols., 1984).

Aunque sus funciones son diversas, su papel principal está relacionado con la contracción, tanto en músculo liso como estriado. En células no musculares también intervienen en procesos de contracción celular relacionados con el mantenimiento de la morfología celular y el movimiento ameboide (Warrick y Spudich, 1988).

1.2. FILAMENTOS INTERMEDIOS

El sistema citoesquelético de IF recibe este nombre por presentar un diámetro entre 8 y 11 nm, intermedio entre microtúbulos y microfilamentos. La principal característica diferencial de este grupo es que comprende una amplia familia de proteínas que se expresan diferencialmente en los diferentes tipos celulares del organismo, variando incluso el patrón de IF en un mismo tipo celular durante la diferenciación del mismo (Franke y cols., 1981 y 1982; Steinert y Roop, 1988). Debido a esta definida forma de expresión, los IF son ampliamente utilizados como marcadores moleculares de diferenciación celular, siendo además herramientas habituales en anatomía patológica, empleándose habitualmente en la

Tabla I. Tipos de filamentos intermedios

<i>Tipo de secuencia</i>	<i>Nombre</i>	<i>Origen</i>	<i>Número de polipéptidos</i>	<i>Peso molecular (kD)</i>
I	Queratinas ácidas	Epitelios	≈ 15	40-60
II	Queratinas básicas	Epitelios	≈ 15	50-70
III	Vimentina	Mesénquima	1	53
	Desmina	Músculo	1	52
	GFAP	Glía	1	51
	Periferina	Neuronas periféricas	1	57
IV	Neurofilamentos α -Internexina	Neuronas	3	57-150
		Neuronas	1	66
V	Laminas	Lámina nuclear	3	60-70
VI	Nestina	Neuroectodermo	1	240

tipificación tumoral, pues cada tumor, según su origen y desarrollo, expresa una diferente combinación de IF (Moll y cols., 1982; Osborn y Weber, 1989).

A partir de datos inmunológicos de reactividad con anticuerpos y según las secuencias de DNA y proteínas de los IF, se dividió a estos en un principio en cinco grupos (Lazarides, 1980 y 1982; Steinert y cols., 1985). Con posterioridad, el descubrimiento de nuevos tipos de IF, así como el conocimiento de nuevos datos sobre ellos han hecho variar la clasificación de los IF hasta quedar actualmente en la que se muestra en la tabla I, basada en Steinert y Roop (1988): El tipo I consta de queratinas ácidas. El tipo II, de queratinas neutro-básicas. El tipo III incluye la vimentina, desmina, proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y periferina. El tipo IV está formado por los neurofilamentos y la α -internexina y el tipo V por las laminas. Por último se encuentra el grupo VI, que incluye la nestina (Lendahl y cols., 1990) que aún no ha sido asignada a ningún tipo de los anteriores.

1.2.1. Estructura de los Filamentos Intermedios

Del estudio de las secuencias de los IF se deduce que todos los miembros de esta familia están contruídos de una forma similar (Fig. 1): todos ellos tienen un dominio central de estructura α -helicoidal formado por 311-315 aa (356 en el caso de las laminas). Esta región está altamente conservada, además del tamaño, en lo que a su estructura secundaria se refiere, y se encuentra flanqueada por dos regiones terminales de tamaño y composición variable, de tal forma que las diferencias en tamaño y propiedades de las distintas subunidades de los IF se deben principalmente a los dominios terminales variables, mientras que el dominio central conservado es responsable de la uniformidad estructural de los IF (Weber y Geisler, 1984 y 1985; Steinert y cols., 1985).

En todos los IF, el dominio central es de estructura α -helicoidal. Esto significa que la estructura de estos dominios consta de sucesiones de 7 aa, o héptadas, en las cuales los residuos 1 y 4 son generalmente de naturaleza apolar (Henderson y cols., 1982; Weber y Geisler, 1984). Esta estructura a base de repeticiones permite que los residuos apolares aparezcan hacia el exterior de la molécula en una zona definida, y favorece el que dos de estas hélices se asocien enfrentando sus respectivas zonas apolares, formándose una estructura cuaternaria de forma nuevamente helicoidal que recibe el nombre de *coiled-coil* (Crick, 1953; McLachlan, 1978; McLachlan y cols., 1982).

El dominio central α -helicoidal no es contínuo, sino que se trata más bien de cuatro subdominios denominados 1A (35 aa de longitud), 1B (101 aa), 2A (19 aa) y 2B (121 aa), entre los cuales se encuentran tres cortas secuencias, denominadas espaciadores o *linkers*, incapaces de formar una *coiled-coil*. En general, la longitud y localización de estos espaciadores está conservada (Steinert y Roop, 1988). El espaciador L1 conecta los segmentos 1A y 1B, y es de estructura no helicoidal y relativamente variable en su longitud (8-14 aa). El espaciador L2 (8 aa) conecta 2A y 2B y es α -helicoidal, si bien su estructura no es en héptadas. El espaciador L12 (16-17 aa), que une los segmentos 1B y 2A, tiene una secuencia de la forma (hidrofílico-apolar), que le permite adoptar una conformación en lámina β . Sin embargo, en las laminas todos los espaciadores tienen estructura α -helicoidal, aunque mantienen la longitud común. La longitud total del dominio central conservado es de 45-48 nm.

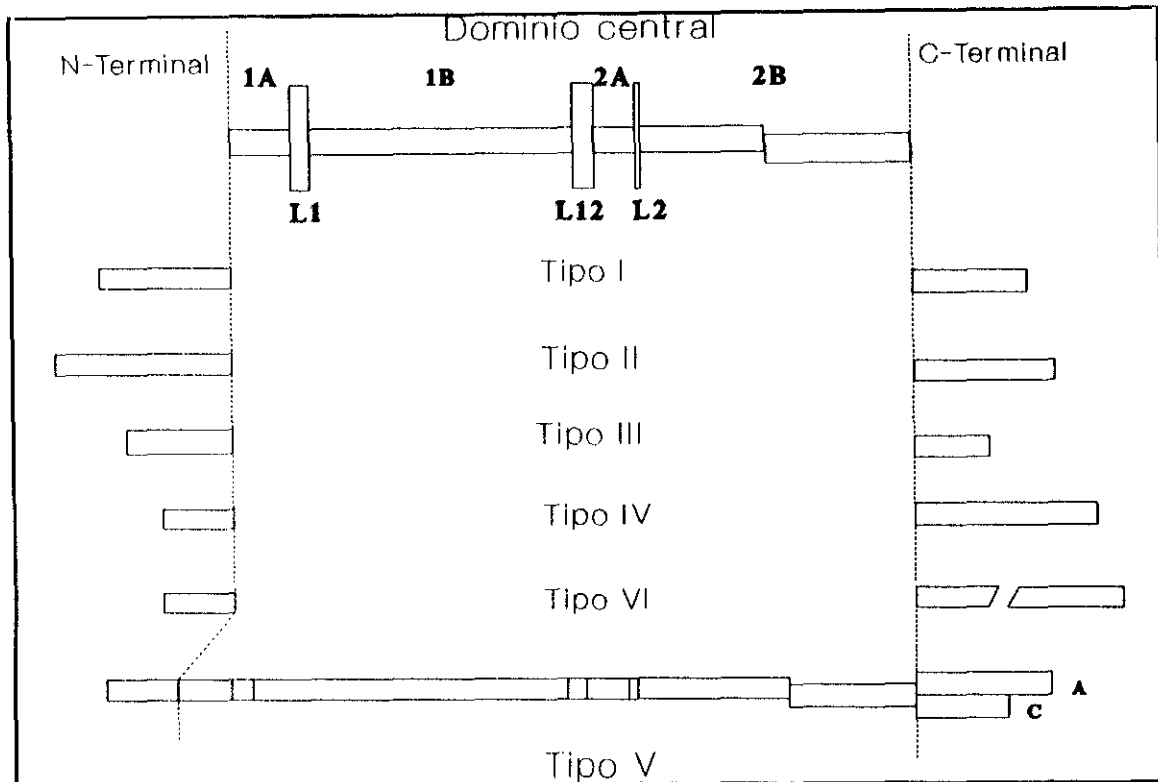


Fig. 1: Estructura de los filamentos intermedios. El dominio central en los tipos I-VI es semejante. Los bloques L1, L12 y L2 representan ruptura de la estructura en alfa-hélice.

Además de estos espaciadores, todos los IF contienen una discontinuidad en el centro del segmento 2B que rompe la regularidad de las héptadas. También se encuentran muy conservados los residuos 8-20 en el segmento 1A y los últimos 30 residuos del segmento 2B (Crewther y cols., 1983).

Los segmentos terminales de los IF son hipervariables, aunque también se puede encontrar en ellos algunos subdominios sin estructura definida basados en secuencias homólogas (H), variables (V) y de carácter fuertemente básico (E), hallándose estas últimas en los extremos C- o N- terminales. (Jorcano y cols., 1984b; Weber y Geisler, 1984; Steinert y cols., 1985; Steinert y Roop, 1988). Estos subdominios de los extremos son característicos para cada subgrupo dentro de los IF.

La homología de secuencia en los IF es de un 30-50% entre dos tipos, pero de hasta un 50-90% dentro de un tipo determinado. Una zona especialmente bien conservada es el final de la α -hélice, donde se encuentra una secuencia TYRKLLEGE que aparece en prácticamente todos los filamentos intermedios (Hanukoglu y Fuchs, 1983; Jorcano y cols., 1984a y b; Albers y Fuchs, 1987).

1.2.2. Proteínas de la familia de los Filamentos Intermedios: Proteínas de tipo III

Esta familia está formada por la vimentina, la desmina, la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y la periferina.

La vimentina, con un peso molecular de 53 kD, presenta un complejo patrón de expresión. Se encuentra principalmente en células de origen mesenquimal (endotelio vascular, fibroblastos, etc.). También se encuentra de forma transitoria en gran variedad de tipos celulares antes de que sean irreversiblemente determinados hacia un fenotipo totalmente diferenciado, y en algunos de estos casos se coexpresa con los IF característicos del tipo celular maduro. Igualmente aparece en gran número de líneas celulares en cultivo, independientemente de su origen embrionario (Lazarides, 1982; Traub, 1983). Cuando se coexpresa con otros IF, la vimentina puede copolimerizar con ellos en el mismo filamento, como con la desmina (Quinlan y Franke, 1982), el GFAP (Quinlan y Franke, 1983) y los neurofilamentos (Monteiro y Cleveland, 1989), o bien formar filamentos separados en una misma célula, como sucede cuando se coexpresa con queratinas (McCormick y cols., 1991).

Al igual que para los demás IF, la función de la vimentina es desconocida, aunque se supone que debe tener algún papel en la resistencia mecánica de los tejidos que la expresan, pues los filamentos de vimentina son capaces de resistir tensiones capaces incluso de romper la actina (Janmey y cols., 1991).

En los últimos años se han realizado descubrimientos que permiten sospechar que la carencia de esta proteína conduce a la formación de tumores. Así, se ha visto que la transfección con un cDNA de vimentina es capaz de revertir un fenotipo transformado (Eiden y cols., 1991). Igualmente, la adición de cAMP a células CHO transformadas provoca la fosforilación y polimerización de la vimentina como paso previo a la reversión del fenotipo transformado (Chan y cols., 1989), todo lo cual sugiere que la integridad del citoesqueleto de vimentina es necesaria para el no desarrollo de transformación celular. Sin embargo, estos datos deben ser tomados con precaución, puesto que existen otros muchos tumores que expresan vimentina.

El gen de la vimentina es de copia única (Quax y cols., 1983; 1984a; 1984b).

La desmina (53 kD) está también codificada por un gen de copia única (Quax y cols., 1984a y 1984b; Capetanaki y cols., 1984). Su expresión está prácticamente restringida a células musculares (Debus y cols., 1983) y se inicia en el momento en que las células miogénicas abandonan el ciclo celular, en un estadio temprano de la miofibrillogénesis (Fischman, 1986). Conforme se desarrollan las células musculares la expresión de la desmina se intensifica, pero su localización se restringe a la parte exterior de los discos Z, tanto en músculo esquelético como cardíaco. También se puede encontrar en las regiones de contacto celular y en la zona interfibrilar de las células musculares adultas (Ip, 1988).

La función de la desmina no está clara: Schultheiss y cols. (1991) han observado que la transfección de una versión truncada de la desmina desorganiza por completo la red de filamentos de vimentina de los mioblastos y las redes de desmina y vimentina de los miotubos, aunque no parece afectar para nada la formación y contracción de las miofibrillas.

La proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), de 51 kD, se encuentra presente de forma abundante en los astrocitos del sistema nervioso central. Los precursores de estos astrocitos sintetizan vimentina, cambiando a GFAP cerca del nacimiento (Bovolenta y cols., 1984). La GFAP parece estar implicada en la emisión por los astrocitos de prolongaciones

citoplásmicas inducidas por contacto con las neuronas (Weinstein y cols., 1991).

La periferina es el último IF del tipo III. Se expresa de manera específica en ciertas poblaciones de neuronas, principalmente periféricas. Su característica más peculiar es que, al menos en ratón, un único gen sufre *splicing* alternativo para resultar en al menos 3 proteínas de 56, 58 y 61 kD (Landon y cols., 1989).

1.2.3. Proteínas de tipo IV

Este grupo, de expresión restringida a neuronas, engloba los tres neurofilamentos: NF-L (60 kD), NF-M (160 kD) y NF-H (200 kD). Las diferencias de tamaño son debidas principalmente a los extremos carboxiterminales. Existe una diferencia temporal en su expresión durante el desarrollo: NF-L y NF-M comienzan a ser expresados en el feto, mientras que el NF-H no se expresa de forma apreciable hasta el periodo postnatal (Julien y cols., 1986). Las tres proteínas participan en la formación del filamento, aunque el NF-L es capaz por sí solo de formar un IF. Al parecer, NF-L forma la estructura central, mientras que los otros dos se encuentran insertados en ella, sobresaliendo los largos extremos carboxiterminales. Estos extremos, además, se encuentran altamente fosforilados (Julien y Mushynski, 1983), y permiten la interacción con otras estructuras celulares (Hisanaga y Hirokawa, 1988). Al parecer, el NF-H está implicado en la formación de puentes interfilamentosos (Hirokawa y cols., 1984). La sobreexpresión de NF-L en ratones transgénicos tiene como resultado la acumulación de esta proteína en diversos tipos celulares (músculo, riñón), sin aparente efecto. En neuronas periféricas, la sobreexpresión ni siquiera produce un aumento del calibre del axón (Monteiro y cols., 1990).

En este grupo se suele incluir también la α -internexina (66 kD), llamada así por su facilidad para asociarse *in vitro* con otros filamentos intermedios, concretamente vimentina, GFAP y NF-L, mientras que no lo hace con NF-H. Esta proteína se expresa en neuronas, aumentando cuando NF-L disminuye, y viceversa, lo que sugiere que α -internexina y NF-L tienen funciones diferentes durante el desarrollo (Fliegner y cols., 1990). La estructura de su gen es similar a la de los neurofilamentos (Ching y Liem, 1991).

1.2.4. Proteínas de tipo V

En este grupo se incluyen las proteínas del nucleoesqueleto o laminas (Franke, 1987). Forman parte de la lámina nuclear, una densa capa proteica inmediatamente subyacente a la membrana nuclear interna en el núcleo interfásico. Las laminas parecen estar presentes en todos los organismos eucariotas (Döring y Stick, 1990). Se pueden clasificar en laminas de tipo A, ácidas y B, neutras. Las de tipo B aparentan ser de expresión constitutiva, mientras que las de tipo A tienen una expresión altamente regulada durante el desarrollo y la diferenciación (Nigg, 1989; Röber y cols., 1989). En mitosis, durante la metafase, las laminas son fosforiladas en residuos concretos y se despolimerizan, quedando las laminas de tipo B asociadas a vesículas nucleares, mientras que las laminas de tipo A permanecen en forma soluble (Gerace y Blobel, 1980; Burke y Gerace, 1986). Esta fosforilación se realiza en zonas cercanas a la α -hélice y está mediada, al igual que en la vimentina (Chou y cols., 1990), por la proteína inductora de mitosis p34^{cdc2}, que en conjunción con la ciclina

B es responsable de la inducción de mitosis (Ward y Kirschner, 1990; Heald y McKeon, 1990; Peter y cols., 1990; Heitlinger y cols., 1991). En mamíferos y aves se han identificado tres proteínas mayoritarias, llamadas laminas A, B y C (también llamada B₂, por pertenecer al tipo B), aunque se sospecha que deben existir más. En anfibios, se han descrito al menos cinco, y una o dos en algunos invertebrados (Krohne y Benavente, 1986; Verheijen y cols., 1988). Sus pesos moleculares son similares (entre 60 y 80 kD), pero pueden diferir mucho en sus pI. Son proteínas bastante conservadas en todas las especies animales estudiadas, y ciertos tipos celulares parecen expresar un patrón específico de laminas.

Característica diferencial de las laminas con respecto al resto de los IFs es que debido a una inserción, la α -hélice central tiene una longitud de 360 aa, en vez de los 310 habituales. Por lo demás, la estructura de las proteínas es similar. La diferencia de tamaño entre las distintas laminas se debe a los largos extremos C-terminales (McKeon y cols., 1986; Fisher y cols., 1986). En estos extremos existe una señal de transporte al núcleo (Loewinger y McKeon, 1988), que es reconocida por un receptor específico de la envoltura nuclear (Worman y cols., 1988 y 1990). También en estos extremos existen cisteínas que les permiten unirse covalentemente. Una de estas cisteínas se encuentra en una secuencia CSIM implicada en la unión a membrana, de forma similar a las secuencias CaaX de las proteínas p21^{ras} (Holtz y cols., 1989) y, al igual que en p21^{ras}, esta cisteína es necesaria para la modificación de la proteína y unión a la membrana (Vorbürger y cols., 1989). En los extremos N-terminales se encuentra una secuencia consenso de fosforilación para p34^{cdc2} (Peter y cols., 1990).

Las laminas B parecen ser responsables de la unión de la lámina nuclear a la membrana nuclear interna. Son las primeras en expresarse, y forman la estructura a la que después se unen las otras laminas. También constituyen un sitio de unión para el citoesqueleto citoplásmico de IF (Georgatos y Blobel, 1987; Capco y cols., 1982; Carmo-Fonseca y cols., 1987), unión que se efectúa probablemente por mediación de la plectina (Foisner y cols., 1991).

Al contrario que la B, la lamina A se une a la cromatina interfásica (Yuan y cols., 1991) y a los cromosomas metafásicos (Burke, 1990; Glass y Gerace, 1990), lo que sugiere una función en la organización de la cromatina. Diffley y Stillman (1989) han propuesto, basándose en una fuerte homología de secuencia entre ciertas zonas de las laminas y determinados factores de transcripción, que estos dos tipos de proteínas pueden interactuar entre sí para actuar sobre el DNA.

1.2.5. *Proteínas de tipo VI*

En esta familia se encuentra exclusivamente la nestina (Lendahl y cols., 1990), proteína expresada de forma específica en células madre (*stem*) del sistema nervioso central (neuroectodermo) durante la embriogénesis, donde coexiste con la vimentina. Tras la diferenciación terminal, la expresión de la nestina cesa. También se expresa, en bajos niveles, en el músculo esquelético durante el desarrollo.

1.2.6. Origen de los Filamentos Intermedios.

Se han identificado en invertebrados algunas proteínas del tipo de los filamentos intermedios. Los datos de que se dispone en anélidos, nemátodos y moluscos indican que en ellos la complejidad es mucho menor, existiendo sólo dos prototipos de IF: uno neuronal y uno no neuronal. En general, dentro del tipo no neuronal se encuentran dos proteínas (A y B), capaces de formar homo- o heteropolímeros. En el caracol *Helix pomatia* estas dos proteínas se originan a partir de dos mRNAs procedentes de un único gen y procesados de forma diferencial, teniendo el filamento A el extremo carboxiterminal más largo que el filamento B (Weber y cols., 1988).

Los IF de invertebrados tienen dos rasgos en común con las laminas nucleares y que no se encuentran en los IF citoplásmicos de vertebrados: El dominio central con 42 aa (6 héptadas) adicionales en la hélice 1B y una zona de alta homología de secuencia en el extremo carboxi-terminal (Weber y cols., 1988, 1989). Igualmente, la estructura de los intrones del gen de IF no neuronal de *Helix pomatia* es similar a la de los IF de tipo III (Dodemont y cols., 1990). A partir de estos datos y otros, se ha propuesto que los IF derivan de un precursor similar a las laminas, que posteriormente perdió la señal de localización nuclear (que fue sustituida por un intrón) y el motivo CaaX de unión a membrana, con lo cual los filamentos resultantes quedaban liberados de la obligación de ensamblarse en el núcleo (Dodemont y cols., 1990; Döring y Stick, 1990). A partir de ahí, las diferentes proteínas que componen los IF evolucionaron probablemente por combinación del dominio central conservado con diferentes dominios carboxiterminales (Döring y Stick, 1990).

En plantas se han encontrado también proteínas similares a IF, pero al parecer no se distribuyen en filamentos, sino o bien de forma fibrosa, o de forma asociada a los microtúbulos (Goodbody y cols., 1989). Se ha identificado también una proteína similar a la queratina 8 (Ross y cols., 1991).

1.3. PROTEINAS DEL TIPO I Y II: QUERATINAS.

Las familias I y II comprenden las queratinas, responsables de la formación de los IF de células epiteliales. En ocasiones se da este nombre también a los filamentos de queratinas de escamas y plumas, cuyo nombre correcto es β -queratinas. Con un tamaño de 3 nm, estas β -queratinas están compuestas por proteínas de 10-20 kD y representan una familia de genes eliminada en la evolución de los mamíferos (Frazer y cols., 1972). Sin embargo, sí se incluyen en este grupo de queratinas epiteliales las diez α -queratinas (cinco de tipo I y cinco de tipo II) características del pelo, expresadas únicamente en los tricocitos de los folículos pilosos, uñas y algunas papilas linguales, y cuyas propiedades son ligeramente diferentes a las del resto de la familia, particularmente en la existencia de numerosos residuos de cisteína (Heid y cols., 1986 y 1988a y b).

1.3.1. Expresión y estructura.

Las queratinas se han encontrado en los citoplasmas de la casi totalidad de las células epiteliales. En humanos, se han caracterizado por ahora 20 proteínas epiteliales (Moll y

cols., 1982; Steinert y cols., 1985 y 1988; Moll y cols., 1990).

Las queratinas son muy similares en todos los vertebrados, y se pueden dividir en dos grupos según su homología de secuencia: las de tipo I son en general más pequeñas (40-62 kD) y relativamente ácidas ($pI=4.5-5.5$), mientras que las de tipo II son mayores (53-67 kD) y más básicas ($pI=5.5-7.5$) (Fig. 2). En contraste con otros tipos de IF, las queratinas son heteropolímeros obligados (Eichner y cols., 1984 y 1986; Hatzfeld y Franke, 1985; Giudice y Fuchs,

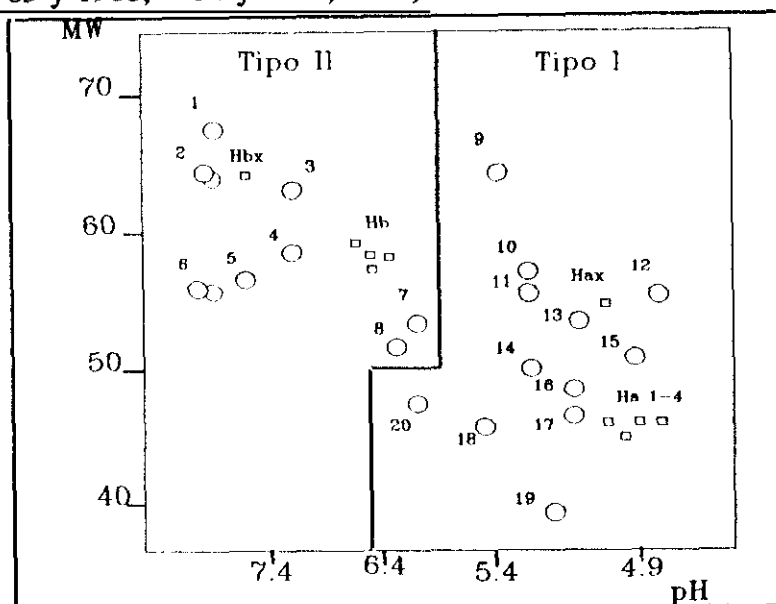


Fig. 2. Clasificación de las queratinas según su comportamiento en electroforesis bidimensional.

1987), es decir, que para la elaboración de un filamento de queratinas hacen falta cantidades equimolares de los tipos I y II. La formación del filamento es un proceso que no requiere fuentes de energía ni otros factores. *In vitro*, bajo determinadas condiciones iónicas, el filamento se forma espontáneamente (Hatzfeld y Franke, 1985). La figura 3 esquematiza el ensamblaje del filamento. El primer paso implica la formación de un dímero de dos moléculas por interacción de los dominios centrales α -helicoidales de éstas. En el caso de las queratinas, los filamentos se forman a partir de heterodímeros compuestos de una molécula de cada tipo, alineadas en paralelo (Crewther y cols., 1983; Coulombe y Fuchs, 1990; Hatzfeld y Weber, 1990; Steinert, 1990). El tetrámero se forma a partir de dos dímeros situados de forma antiparalela (Geisler y cols., 1985), y a partir de aquí los tetrámeros se asocian para formar los filamentos de 8 nm, que constan de 32 moléculas por sección (Weber y Geisler, 1984; Steinert y cols., 1985; Eichner y cols., 1986). Se ha propuesto que el filamento comienza a formarse junto a la membrana nuclear, extendiéndose hacia la periferia celular, aunque los tetrámeros se pueden unir al filamento en cualquier parte de éste (Albers y Fuchs, 1989; Miller y cols., 1991; para una revisión sobre el tema ver Coulombe y Fuchs, 1990 ó Steinert y Liem, 1990).

El IF de 8-11 nm está compuesto por los dominios centrales entrelazados, mientras que los extremos amino- y carboxi-terminales sobresalen de él, siendo demasiado pequeños para resultar en general visibles en microscopía electrónica (Steinert y Roop, 1988). El extremo carboxi-terminal no parece estar implicado en la formación del filamento, pues la queratina 19, que carece de él, es capaz de formar filamentos con normalidad, aunque tal vez este dominio C-terminal esté implicado en la interacción con otros componentes celulares (Bader y cols., 1986; Bader y cols., 1991). Sin embargo, el dominio central, particularmente la secuencia consenso TYRKLLEGE, y el extremo amino-terminal sí parecen importantes: su carencia impide la formación de filamentos, tanto en queratinas (Albers y Fuchs, 1987 y 1989; Hatzfeld y cols., 1987; Magin y cols., 1987; Coulombe y

cols., 1990; McCormick y cols., 1991; Hatzfeld y Weber, 1991) como en desmina (Kaufmann y cols., 1985) y vimentina (Traub y Vorgias, 1983).

Con posterioridad a su síntesis, las cadenas de IF sufren modificaciones de diversa índole, tales como fosforilación, acetilación del primer aa, entrecruzamientos y proteolisis (Traub, 1985). La utilidad de estas modificaciones es, en general, desconocida. Los complejos formados por las queratinas son extraordinariamente resistentes, mucho más que

los formados por los demás tipos de IF (Franke y cols., 1983; Coulombe y Fuchs, 1990). Las queratinas son proteínas muy estables, como demuestra el hecho de que, pese a ser proteínas mayoritarias en las células (hasta un 40% de la proteína total en queratinocitos en cultivo), la cantidad de mRNA que se puede encontrar es relativamente pequeña (Stellmach y Fuchs, 1989).

La expresión de las queratinas es un proceso altamente regulado. Así, cada tipo celular epitelial expresa una combinación específica de queratinas, de tal forma que es posible identificar el origen de una célula epitelial según el patrón de queratinas que presente (Moll y cols., 1982; Eichner y cols., 1984; Quinlan y cols., 1985). Igualmente, a lo largo del desarrollo una misma célula puede expresar diversas combinaciones de queratinas (Franke y cols., 1982). A partir de datos de expresión diferencial, Sun y cols. (1984) construyeron un modelo en el cual determinados pares de queratinas son específicos de diferentes rutas o tipos de diferenciación epitelial. Según este modelo cuanto más complejo sea un epitelio mayores son los tamaños de los pares de queratinas que expresa predominantemente, existiendo siempre una diferencia de ≈ 8 kD entre la queratina de tipo II y la de tipo I (para una relación del tamaño de cada queratina, véase la fig. 3). Así, de menor a mayor tamaño, las queratinas 8 y 18 son características de los epitelios simples. Las queratinas 7 y 17 se encuentran también en epitelios simples, además de en ciertas glándulas derivadas de epidermis. Las siguientes en tamaño, K6 y K16, son típicas de algunos epitelios estratificados y de epidermis sometida a hiperproliferación. Las K5 y K14 se expresan en la capa basal de la epidermis, y el par constituido por las queratinas K4 y K13 es mayoritario en los epitelios estratificados no queratinizados de los órganos internos (como por ejemplo, lengua y esófago), mientras que las queratinas K3 y K12 son específicas de córnea. Finalmente, las queratinas de mayor tamaño (1, 2, 9 y 10) son típicas de las capas suprabasales de epidermis queratinizada (todos estos datos se encuentran detalladamente expuestos en Moll y cols., 1982, Sun y cols., 1984 y 1985). Se conocen, además, algunas

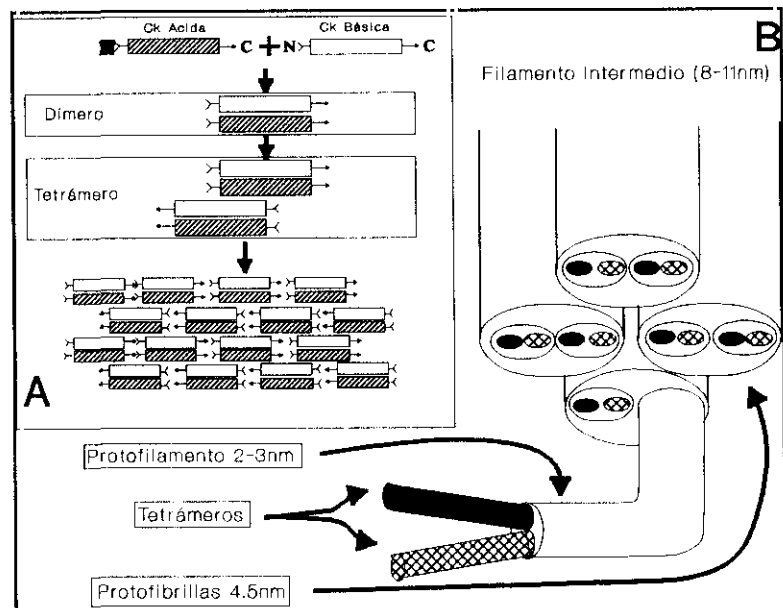


Fig. 3. Formación del filamento de queratinas de 10 nm a partir de subunidades de tipo I y II, mostrando los niveles de dímero y tetramero (A) y superiores (B).

raras excepciones en las que queratinas típicas de epitelio simple se expresan en células no epiteliales, como por ejemplo en células de endotelio microvascular y otras células de origen mesodérmico (Wu y cols., 1982; Kim y cols., 1987; Patton y cols., 1990).

1.3.2. Función.

En cuanto a la función de las queratinas, es por ahora en su mayor parte desconocida. El citoesqueleto de queratinas se extiende desde la membrana nuclear hasta la plasmática, donde interacciona con los desmosomas (Denk y cols., 1985; Franke y cols., 1987), al parecer con la desmoplaquina (Stappenbeck y Green, 1992). Se ha propuesto que tal distribución puede tener importancia en la transmisión de información entre la membrana celular y el núcleo, con posibles implicaciones en el control de la expresión génica. En este contexto, recientemente ha sido descubierto que la integrina $\alpha_5\beta_1$ forma parte del complejo hemidesmosómico asociado a la membrana basal (Stepp y cols., 1990; Jones y cols., 1991) y es posible por tanto que esté asociada con los IF de queratinas de las células epiteliales. Las integrinas son receptores trans-membrana que intercambian señales entre la matriz extracelular y el interior celular. Normalmente están asociadas al citoesqueleto de actina y actúan recibiendo señales externas y traduciéndolas en otras que afectan la organización citoesquelética, forma y motilidad celular. En el sentido contrario, cambios intracelulares pueden modificar la afinidad de las integrinas por ciertos ligandos. Quaranta y Jones (1991) han revisado la relación entre integrinas y citoesqueleto de IF.

La existencia de queratinas en todos los vertebrados estudiados hasta ahora y la conservación de sus secuencias entre especies sugiere una importante función para estas proteínas. Del mismo modo, la delicadamente regulada expresión de las queratinas en pares característicos en cada célula epitelial hace pensar que las diferentes proteínas son responsables de procesos específicos de cada tipo celular. Sin embargo, los datos de que se dispone se contradicen con estas suposiciones. *In vitro*, la combinación equimolar de cualesquiera proteínas de tipo I y II en las adecuadas condiciones conduce a la formación de filamentos, incluso entre queratinas de distintas especies, aunque la fuerza de interacción varía según el par. Este fenómeno ha recibido el nombre de *promiscuidad* (Hatzfeld y Franke, 1985). *In vivo*, la microinyección o transfección de mRNAs de epidermis en líneas celulares epiteliales de la misma o distinta especie (que expresan las queratinas típicas de epitelio simple K8 y K18) no parece producir ningún efecto. Las queratinas epidérmicas se integran en el citoesqueleto endógeno y las células crecen con normalidad (Franke y cols., 1984b; Giudice y Fuchs, 1987). Lo mismo sucede cuando se inyectan estos mRNA en células no epiteliales (Kreis y cols., 1983). Estos datos sugieren que tal vez la función de las queratinas deba ejercerse al nivel del organismo completo, o al menos en un nivel superior al celular.

Para determinar la función de las queratinas, se han realizado algunos experimentos en los que se han eliminado o sustituido los genes de ciertas queratinas en un organismo. La sobreexpresión de formas mutadas de la K18 de ratón en células de carcinoma embrional (EC) impide la aparición del endodermo visceral, comprometiendo el desarrollo del cuerpo embrionario (Trevor, 1990). Sin embargo, la eliminación de ambos alelos de la K8 en células *stem* (ES) de ratón no tiene ninguna consecuencia y permite la normal formación de la capa del endodermo visceral y la formación del cuerpo embrionario (Baribault y Oshima,

1991), aunque la eliminación de ambos alelos de la K8 en ratones transgénicos es letal en un momento cercano a la implantación (Baribault y Oshima, no publicado), lo que podría indicar que la función de las queratinas se lleva a cabo a partir de un cierto estado de desarrollo, siendo tal vez prescindibles en estadios embrionarios más tempranos.

Sin embargo, la utilidad del citoesqueleto de filamentos intermedios está fuera de toda duda: muy recientemente se han establecido las primeras relaciones entre queratinas mutantes y enfermedad: ratones transgénicos que expresan diversas formas truncadas de la queratina K14 tienen el citoesqueleto de IF de la capa basal de la epidermis perturbado en diversos grados y poseen fenotipos similares a los de varias formas del conjunto de patologías denominadas epidermolisis ampollosa simple, EBS (Vassar y cols., 1991; Coulombe y cols., 1991b). Estudios genéticos han demostrado que mutaciones en diversos residuos de la K5 y K14 son la causa de casos hereditarios de EBS (Bonifas y cols., 1991; Lane y cols., 1992). Una de estas mutaciones se da en la secuencia TYRKLLEGE del final de la α -hélice, conservada en todas las queratinas (Lane y cols., 1992). Igualmente, se ha detectado que una cierta forma de la EBS se debe a mutaciones puntuales que afectan a un determinado aminoácido de la primera parte de la alfa-hélice de la K14 (Coulombe y cols., 1991a). Este residuo (Arg-125) está altamente conservado no sólo en las queratinas, sino en todos los IF. Mutaciones en este aminoácido en la lamina A afectan seriamente a la formación de la lámina nuclear (Heald y McKeon, 1990).

Estos datos sugieren que las queratinas están directamente implicadas en la resistencia mecánica de la epidermis. Los individuos afectados por distintas formas de EBS tienen una piel macroscópicamente normal, aunque su citoesqueleto de queratinas esté desorganizado en la capa basal y la forma de estas células sea distinta. El fenotipo de la EBS, causado por la lisis de las células afectadas, sólo se manifiesta de forma post-traumática (Coulombe y cols., 1991b), lo que indicaría que las células que poseen queratinas defectuosas son capaces de subsistir de forma satisfactoria en condiciones de ausencia de estrés, sin descartar que otras mutaciones más fuertes sean letales.

1.3.3. Expresión de queratinas en epidermis. La queratina K6.

La epidermis es un epitelio estratificado escamoso que consta de varias capas celulares, de las cuales sólo la capa basal tiene capacidad para proliferar. Se desconocen las causas que hacen que las células de esta capa cesen de dividirse y comiencen a diferenciarse terminalmente, sufriendo una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que culminan en su transformación en escamas planas sin núcleo, que se desprenden de la superficie y son continuamente reemplazadas por nuevas células basales en proceso de diferenciación.

Las células basales de la epidermis se encuentran en un equilibrio entre crecimiento y diferenciación. Se conocen una serie de factores que están implicados en uno u otro. Entre los que estimulan el crecimiento (y por tanto impiden la diferenciación) se encuentran el EGF, el TGF- α , el ácido retinoico a concentraciones bajas, las interleukinas IL-6 y IL-1 α y el factor de crecimiento de queratinocitos (revisado en Fuchs, 1990). Entre las sustancias que permiten la diferenciación (es decir, las que inhiben el crecimiento o proliferación) se encuentran los TGF- β (Bascom y cols., 1989). Estos TGF- β son inducidos en piel tratada con TPA (Akhurst y cols., 1988) o calcio (Glick y cols., 1990), conocidos inductores de

queratinización epidérmica. Curiosamente el TPA también induce la expresión de TGF- α (Pittelkow y cols., 1989), lo que explica el hecho de que el TPA sea capaz de promover el crecimiento e inducir diferenciación simultáneamente en epidermis.

Las células basales presentan un citoesqueleto de IF formado por sólo dos queratinas: K5 y K14, en relación 1:1 (Nelson y Sun, 1983; Moll y cols., 1982). Conforme los queratinocitos van pasando a las capas superiores (estrato espinoso), estas células, sin capacidad de sufrir mitosis pero metabólicamente activas, cesan en la expresión de K5 y K14 y comienzan a producir grandes cantidades de K1 y K10, a lo cual dedican la mayor parte de la maquinaria traduccional (Fuchs y Green, 1980; Tyner y Fuchs, 1986). Además, producen otras proteínas, como la involucrina (Eckert y Green, 1986). La capa granular es la inmediatamente superior. En esta capa ya no se sintetizan queratinas, sino otras moléculas, como la transglutaminasa epidérmica, responsable de la cornificación, sus sustratos involucrina y loricrina (Mehrel y cols., 1990), y la filagrina, que interacciona con los IF para producir microfibrillas (Dale y cols., 1978; Rice y Green, 1979). Las estructuras fibrilares resultantes son altamente resistentes y capaces de soportar la degradación enzimática que tiene lugar al pasar al estrato córneo, donde las queratinas son fuertemente modificadas (sobre todo la K1) y el resto del contenido celular destruido, resultando una armadura córnea que protege al cuerpo del medio externo (Bowden y cols., 1984; Roop y cols., 1984; Steinert, 1988).

En epidermis sometida a cicatrización o afectada por diversas enfermedades asociadas con hiperproliferación (incluyendo neoplasias), aparece un nuevo par de queratinas: K6 y K16 (Moll y cols., 1982; Weiss y cols. 1984; Mansbridge y Knapp, 1987). En ratón no parece haber K16, ocupando la K17 su lugar (Schweizer, 1992). Estas queratinas aparecen también de forma natural en áreas hiperproliferativas de la epidermis, como la planta del pie, donde se coexpresan con la K9 (Knapp y cols., 1986), y en la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Moll y cols., 1982; Rentrop y cols., 1986; Stark y cols., 1987). En vaca, se expresan en la almohadilla de la pata y en el hocico (Schiller y cols., 1982; Blessing y cols., 1987). Al igual que la K1 y K10, se expresan en las capas suprabasales de la piel (Fisher y cols., 1987; Knapp y cols., 1987). Además de esta expresión inducible en epidermis, estas queratinas se expresan de forma constitutiva en otros epitelios estratificados, como son esófago, lengua y epitelio anal (Moll y cols., 1982).

La K6 y K16 son inducibles *in vivo*: múltiples estímulos, como el tratamiento con TPA, ácido retinoico o la simple cicatrización provocan la expresión de estas queratinas (Tyner y Fuchs, 1986; Roop y cols., 1991).

Las queratinas K6 y K16/17 son características, además de epidermis hiperproliferativas, de células epidérmicas cultivadas (Weiss y cols., 1984). En general, una célula epidérmica en cultivo *in vitro* presenta las queratinas K5, K14 (características de la capa basal proliferativa), K6 y K16/17. Estas queratinas K6 y K16/17 se expresan en todas las líneas epidérmicas en cultivo, y en algunas epiteliales no epidérmicas (como la línea derivada de epitelio de glándula mamaria bovina BMGE+H, Schmid y cols., 1983). Estas queratinas parecen sintetizarse en células epidérmicas *in vitro* también en las capas suprabasales (Kopan y Fuchs, 1989). Estos datos se ven apoyados por el hecho de que cultivos mantenidos en baja concentración de calcio (condiciones que favorecen la

proliferación, mejor que la diferenciación) incrementan espectacularmente la expresión de K6 y K16/17 al ser pasados a alto calcio, en donde se favorece la diferenciación (Hennings y cols., 1980; Yuspa y cols., 1989). La K6 se encuentra casi exclusivamente en las células diferenciadas, equivalentes a las suprabasales (Sutter y cols., 1991). La inducción de estas queratinas es muy rápida, del orden de unas horas tras el estímulo (Tyner y Fuchs, 1986).

1.3.4. Genes

La estructura de los genes de los IF, representada en la figura 4, es bastante similar en todos los IF. Salvo en el caso de los neurofilamentos y α -internexina, cuyos intrones poseen una localización única (Monteiro y Cleveland, 1989; Ching y Liem, 1991), en los demás genes el número y la posición de los intrones están más o menos conservados (sobre todo en la zona de la hélice- α), variando únicamente su tamaño (Lehnert y cols., 1984). Los intrones se suelen localizar en los puntos en que se interrumpe la secuencia de hélice- α : fronteras de los dominios estructurales y espaciadores (Lehnert y cols., 1984; Rieger y cols., 1985). En las queratinas de tipo II (básicas) hay 8 intrones, y siete en las ácidas de tipo I, más pequeñas. Es de destacar que el primero de estos intrones es específico de las dos subfamilias de queratinas, no dándose en ningún otro tipo de IF (Bader y cols., 1986; Dodemont y cols., 1990; Krauss y Franke, 1990).

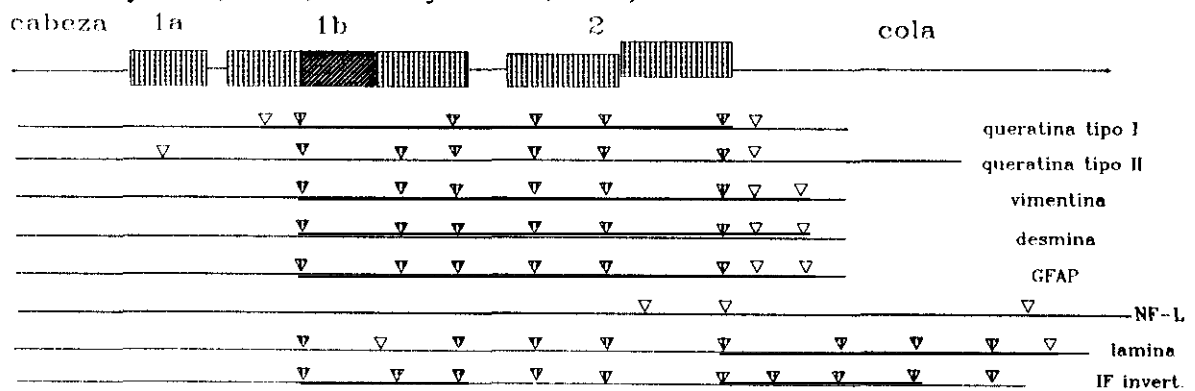


Fig. 4. Estructura de los genes de los IF, indicando la posición de los intrones. La caja rayada en el segmento 1b indica las seis héptadas extras típicas de laminas e invertebrados. Los triángulos rellenos indican los intrones derivados de los IF de invertebrados.

Las secuencias de los genes de queratinas, al igual que los demás IF, están extraordinariamente conservadas entre diferentes especies, habiendo aproximadamente un 90% de homología entre genes equivalentes en el dominio central (Stasiak y cols., 1989; Sémat y cols., 1988). Sin embargo, debido a que cada especie posee tejidos de distintas características, hay excepciones a esta norma. Así, aunque las queratinas humanas y bovinas están altamente conservadas (Schiller y cols., 1982), existen algunas diferencias, siendo una de ellas la existencia de queratinas específicas bovinas, sin contrapartida en humanos, como por ejemplo la K1a, expresada en el hocico de la vaca, que es diferente a la K1 humana. Estas diferencias han sido revisadas por Cooper y Sun (1986).

Los genes de las queratinas parecen hallarse ligados en grupos. En todos los casos conocidos hasta ahora los genes ligados pertenecen al mismo tipo y por ahora no hay pruebas fehacientes de que este agrupamiento esté relacionado de algún modo con la expresión específica de las queratinas, por lo que probablemente sea solamente el resultado de numerosas duplicaciones ocurridas en la historia evolutiva de las queratinas. En general, en humanos los genes de las queratinas de tipo II (K1 y K4) se encuentran en el cromosoma 12 y los de tipo I (K10, K14, K15, K16 y K19) en ambos brazos del cromosoma 17, (para un resumen ver Waseem y cols., 1990a y b). En este cromosoma 17 se han identificado dos cúmulos de genes. Uno de ellos contiene 3 genes para la K14, de los cuales sólo uno es activo, y el otro dos genes para la K16, que pese a ser altamente homólogos (94%) sólo uno de ellos es funcional (RayChaudhury y cols., 1986; Rosenberg y cols., 1988). Interesantemente, K16 es la queratina que se coexpresa con K6 en estados hiperproliferativos (Weiss y cols., 1984).

Los genes de queratinas también parecen encontrarse agrupados en otros mamíferos: en oveja se han encontrado dos cúmulos separados, uno de queratinas del tipo I y otro del tipo II. Dentro de cada cúmulo, la orientación de los genes varía (Powell y cols., 1986). En ratón y en vaca también se han identificado dos grupos. En bovinos, una de estas agrupaciones incluye los genes de la K6* y K5 (Blessing y cols., 1987).

Al parecer, la mayoría de las queratinas están codificadas por un único gen, con algunas excepciones. Para la K6 se han descrito dos genes diferentes, tanto en humanos (Tyner y cols., 1985) como en vaca (Jorcano y cols., 1984a; Blessing y cols., 1987). Estos dos genes son, dentro de cada especie, prácticamente idénticos en las zonas secuenciadas. En el caso de la K5 dos grupos independientes han aislado genes para esta queratina que difieren ligeramente entre ellos (Eckert y Rorke, 1988; Lersch y cols., 1989), lo cual junto con otras pruebas de comportamiento electroforético sugiere que se trata de dos alelos codominantes (Wild y Mischke, 1986). Algo similar parece suceder en el caso de la K10 (Rieger y Franke, 1988; Zhou y cols., 1988).

No es rara la presencia de genes inactivos o pseudogenes: Savtchenko y cols. (1990) afirman que se pueden encontrar varias duplicaciones inactivas de cúmulos de genes de queratinas. Se conoce también pseudogenes para la queratina K8, tanto humana como su equivalente murino (Vasseur y cols., 1985; Waseem y cols., 1990a). La K18, expresada en epitelios simples y determinados estadios embrionarios, también tiene varias copias: 5 en ratón y 20 en humanos (Trevor y Oshima, 1985). Al igual que en humanos, todos los primates estudiados hasta ahora tienen un alto número de copias para este gen, mientras que los demás animales sólo tienen unas pocas (Oshima y cols., 1988), lo cual sugiere que la duplicación de este gen en un paso temprano de la evolución de los primates. Sin embargo, sólo uno de estos genes se expresa, tanto en ratón (Oshima y cols., 1988) como en humanos (Kulesh y Oshima, 1988), siendo los demás pseudogenes.

El hecho de que la queratina K18 se encuentre situada junto con la K8 en el cromosoma 12 humano, al contrario de las demás queratinas de tipo I (Waseem y cols., 1990a y b) y el que estas queratinas típicas de epitelio simple sean las primeras que se expresen en la embriogénesis (Jackson y cols., 1980) sugiere que de ellas se derivaron las demás queratinas. Esta hipótesis es corroborada por el análisis de su secuencia

(Blumemberg, 1988) y la diferente regulación de su expresión (ver más adelante).

1.3.5. Expresión de los genes de queratinas.

Las aproximadamente 20 queratinas existentes en los mamíferos se expresan de forma diferencial en los epitelios corporales. Esta expresión específica, al igual que la necesidad de coexpresión de queratinas de ambos tipos, sugiere unos delicados mecanismos de regulación y convierte a este sistema en un atractivo modelo para estudiar la regulación de la transcripción.

La mayoría de los datos referentes a la expresión de los genes de los IF sugiere que ésta se regula a nivel transcripcional, aunque algunos autores han informado de que la regulación puede ocurrir al nivel de la traducción (Winter y Schweizer, 1983; Tyner y Fuchs, 1986). Sin embargo, los datos de estos autores no parecen concordar con los publicados por otros grupos. Particularmente, en uno de ellos (Tyner y Fuchs, 1986), se sugiere que el gen de la K6 humana se expresa de forma constitutiva en epidermis normal, pero sólo se traduce en respuesta a un estímulo hiperproliferativo, como por ejemplo una herida. En ratón, al menos, no se ha encontrado nada parecido (Steinert y Roop, 1988).

Se conocen las secuencias de DNA de las zonas en 5' de algunos genes de IF, bastantes de ellos queratinas. Sin embargo, no se conoce aún de forma general cuales son los diversos factores de transcripción implicados en la expresión de estos genes, ni si existen factores específicos para cada queratina o por el contrario cada queratina precisa de una diferente combinación de factores de transcripción para ser expresada. Se sabe que varios de estos genes son afectados por diversos estímulos ambientales (una herida induce la expresión de las queratinas K6 y K16 en la zona afectada). Igualmente se conoce que ácido retinoico, calcio y sustancias promotoras tumorales pueden regular la expresión de algunos genes. Sin embargo, aún se desconoce cómo actúan estas sustancias sobre los promotores de los genes. En los últimos años se ha comenzado a estudiar con mayor o menor profundidad un cierto número de promotores de genes de queratinas y otros IF.

Zopf y cols. (1990) secuenciaron 1 kb del promotor del gen del NF-L de pollo y encontraron cuatro secuencias de unión al factor SP1, aunque esta unión no ha sido demostrada. Igualmente acotaron por ensayos de CAT un fragmento de 140 pb responsable de la inducción tardía por NGF. Nakahira y cols. (1990) han acotado un fragmento de 300 pb con actividad promotora en el gen del NF-L murino y han encontrado homología con la secuencia de reconocimiento para el factor de transcripción AP-2, si bien sospechan que el grado de metilación del promotor determina su funcionalidad.

Besnard y cols. (1991) han identificado por en el promotor del GFAP tres regiones capaces de dirigir la expresión específica de un gen heterólogo. En esas tres regiones se pueden encontrar por *footprinting* secuencias de reconocimiento para AP-1, AP-2, NF-1 y una secuencia consenso GCCGCNNCCCAG.

En el gen de la vimentina humana se ha identificado por CAT un *enhancer* en -700 que posee dos sitios AP-1 en tándem, responsables de la inducción por suero y TPA (Rittling y cols., 1989). Al parecer estos sitios no son necesariamente activados por la unión

del complejo jun/fos, sino que también pueden ser estimulados por la unión de otras proteínas por ahora desconocidas. Igualmente identificaron otra región activadora proximal en -30 y dos regiones inhibitoras en -800 y -300. Sax y cols. (1988) encontraron que en la región proximal del promotor existen cinco secuencias GC, que se unen al factor SP1 y son responsables de la expresión basal del gen. Farrell y cols. (1990) han caracterizado una región inhibitora entre los dos *enhancers*. Este elemento, de 40 pb, funciona independientemente de su posición y orientación, y su capacidad represora se incrementa según el número de copias. Esta región presenta homología de secuencia con otros silenciadores, como el del gen de la lisozima de pollo (Baniahmad y cols., 1987), y une una proteína de 95 kD.

Se han identificado en los genes de las queratinas algunas zonas reguladoras capaces de dirigir correctamente la expresión en ratones transgénicos: es el caso de los promotores de las queratinas K1 (Rosenthal y cols., 1991), K10 (Bailleul y cols., 1990), K14 (Vassar y cols., 1991; Coulombe y cols., 1991), K18 (Abe y Oshima, 1990) y K19 (Bader y Franke, 1990). En el caso de la queratina murina K18 parece ser que un fragmento de promotor de 10 kb lleva toda la información necesaria para la correcta expresión del gen, siendo independiente del lugar del genoma donde se incorpore, lo que sugiere la existencia de elementos controladores del locus (Oshima, 1992). Sin embargo, cuando este mismo gen es ~~transfectado, se expresa de forma no específica (Kulich y Oshima, 1990)~~ esta queratina K18 (o endo B) parece ser regulada de dos formas diferentes: 1) En las células somáticas en las que no se expresa esta proteína, el promotor se encuentra permanentemente inactivado por metilación. En ambos genes murino y humano se ha encontrado cerca del inicio de la transcripción una secuencia HTF, implicada en la regulación por metilación de genes constitutivos (Bird, 1986). 2) En células de carcinoma embrionario (que expresan K8 y K18 en respuesta a la inducción con RA) el promotor no está metilado, pero aún así no se expresa el gen, lo que sugiere que debe existir algún factor de transcripción específico que o bien active o bien inhiba la expresión del gen, como sucede en la K8 murina, o endo A (Crémisi y Duprey, 1987). En la versión humana de la K18 se ha encontrado en el primer intrón una secuencia de 47 pb (que también se encuentra en el gen murino) que contiene un sitio AP-1 que se ha definido como *enhancer*, aunque su actividad parece variar según promotor, posición y orientación. Aunque esta secuencia es imprescindible, no es suficiente para conferir actividad *enhancer*, haciendo falta otros elementos del intrón. Este *enhancer* es débilmente activado por c-jun o c-jun+c-fos, y más fuertemente activado por c-fos (Oshima y cols., 1990). La K8, coexpresada con la K18, no parece tener ningún *enhancer* en el primer intrón, pero ha sido demostrado un *enhancer* en 3' del gen. Este *enhancer* posee seis repeticiones homólogas al motivo PEA3 del *enhancer* α del virus del poliovirus, (equivalente al motivo AP-1) y no es funcional en células de carcinoma embrionario (tratadas o no con RA), aunque sí en células diferenciadas que expresan K8 de forma constitutiva (Takemoto y cols., 1991). Este gen, al igual que el de la K18, tiene una zona en 5' que se encuentra fuertemente metilada en aquellas líneas celulares en que no se expresa (Tamai y cols., 1991). La regulación de estos dos genes parece ser, pues, diferente a la del resto de las queratinas (aunque la K13 también se regula por metilación, Winter y cols., 1990), y parece estar fuertemente regulada por el grado de metilación de los genes, como se puede inferir del hecho de que varias líneas celulares de diversos orígenes expresan este par de queratinas tras tratamiento con 5-azacitidina, e igualmente son muy frecuentes en multitud de líneas transformadas, epiteliales o no (Franke y cols., 1989; Knapp y Franke, 1989).

Parece ser, pues, que la regulación de las queratinas K8 y K18 se efectúa de una forma más relajada, en contraste con la estricta regulación encontrada en otras queratinas.

En el caso de la K14, Jiang y cols. (1990) encontraron que las primeras 300 bases del promotor tenían actividad promotora sobre un gen heterólogo en varios tipos celulares de origen epitelial, pero no en fibroblastos. Estos resultados son discutibles, puesto que utilizaron el promotor de un pseudogen, y chocan con los resultados de Vassar y cols. (1989), que encontraron que fragmentos del promotor de la K14 que abarcaban desde los 94 hasta los 2300 primeros nucleótidos dirigían expresión inespecífica al ser transfectados en células epidérmicas, epiteliales y fibroblastos. Sin embargo, en ratones transgénicos la expresión era correcta.

Recientemente dos grupos han identificado de forma independiente el primer factor de transcripción que afecta a la expresión de las queratinas. Jonas y cols. (1989) identificaron en el gen de la queratina XK81A1 de *Xenopus*, una queratina epidérmica expresada en las etapas tempranas del desarrollo de *Xenopus*, concretamente en el ectodermo en las últimas etapas de blástula (Jonas y cols., 1985; Winkles y cols., 1985) una secuencia de 460 pb suficiente para su regulación. Esta secuencia contenía una zona con supuestos elementos negativos y otra con elementos positivos. Snape y cols. (1990) han demostrado que en este fragmento contiene un sitio capaz de unir una proteína que ellos llamaron KTF-1. Este sitio es un palíndromo imperfecto ACCCTGAGGCT y su eliminación disminuye 8 veces la expresión del gen de la queratina XK81A1, quedando sin embargo una actividad residual. Sin embargo, aunque sólo existe un sitio KTF-1 en el promotor de esta queratina, son necesarios dos para conferir actividad a un promotor heterólogo. Igualmente, no confiere especificidad epitelial, aunque la proteína KTF-1 era especialmente abundante en epidermis, sugiriendo que no se trata de un *enhancer* específico, sino sólo de un activador transcripcional general. Finalmente, Snape y cols. (1991) han demostrado que KTF-1 tiene las mismas propiedades que el factor de transcripción XAP-2, correspondiente al AP-2 de mamíferos. Sin embargo, la identidad no es total: la movilidad del complejo DNA-proteína es menor para XAP-2 que para KTF-1, y anticuerpos contra XAP-2 no reconocen a KTF-1 con la misma eficacia. Estas diferencias pueden ser debidas a modificaciones post-transcripcionales o a *splicing* alternativo.

Igualmente, Leask y cols. (1990) han encontrado en la queratina humana K14 (expresada en las células basales de la epidermis) un dominio regulador proximal necesario para la activación del gen, pero que necesita la presencia de otro dominio distal. El dominio proximal contiene una secuencia GCCTGCAGGC necesaria para la actividad *enhancer* que es capaz de unir un factor de transcripción, que ellos llamaron KER-1. Aunque esta secuencia es ligeramente diferente de la que ha sido descrita como consenso para el factor de transcripción AP-2 (CCCCAGGC, Williams y cols., 1988), ha sido demostrado que KER-1 es en realidad AP-2 (Leask y cols., 1991).

1.4. OBJETIVOS

La expresión de las queratinas es un fenómeno extraordinariamente bien regulado. Como se ha visto, está limitada a epitelios únicamente, y dentro de éstos, cada tipo celular expresa una distinta combinación de queratinas, de tal forma que en epitelios estratificados las queratinas son diferentes en las diferentes capas. Además, las queratinas se coexpresan en parejas formadas por una molécula ácida y otra básica. Los pares de queratinas son determinados, de tal forma que, por ejemplo, la queratina 8 siempre se coexpresa con la K18 (ó K19), la K14 siempre se coexpresa con la K5, etc. Por si fuera poco, el patrón de expresión de las queratinas también varía con el desarrollo del animal. Estas peculiares características convierten a las queratinas en un modelo extraordinariamente interesante para el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica. Sin embargo, pese al gran número de datos publicados sobre la estructura y expresión de las queratinas, se desconoce prácticamente todo sobre de qué manera se lleva a cabo la regulación de su expresión. A primera vista, se podría esperar que estuviesen implicados en la regulación de la expresión de estos genes factores de transcripción que se encontrasen específicamente en epitelios, junto con otros característicos de cada tipo celular epitelial, que serían los responsables de la expresión diferencial de estos genes.

El objetivo final de esta tesis fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión de los genes de las queratinas.

El modelo que elegimos fue el estudio de la regulación de la expresión de la BK6. Esta queratina presenta un patrón de expresión peculiar: se expresa de forma natural en algunos epitelios estratificados, como esófago, lengua y exocérvix. En vaca, también se expresa en hocico. Además, se puede encontrar en las áreas de la piel que están sometidas a hiperproliferación, como la planta del pie. Igualmente, se expresa intensamente en las zonas de la epidermis en proceso de cicatrización y es inducible por gran cantidad de estímulos químicos y mecánicos. La fácil inducibilidad de esta queratina y su doble vertiente de expresión constitutiva e inducible la convierten en un atractivo candidato para el estudio de la regulación de su expresión génica.

La K6 se expresa, además en células de origen epidérmico cuando son cultivadas *in vitro*. Sin embargo, en otras células epiteliales no se expresa, salvo en el caso de las células BMGE+H, línea celular epitelial procedente de un cultivo primario de glándula mamaria bovina que, seleccionada y mantenida en medio con hormonas, produce elevadas cantidades de esta queratina, mientras que su equivalente seleccionada y mantenida en medio normal, BMGE-H, no lo hace. Se escogió pues la línea BMGE+H para realizar este trabajo, pues es, hasta donde nuestro conocimiento llega, la única línea cultivada de origen bovino capaz de expresar esta queratina.

Es conocido que tanto para humanos como para bovinos existen dos genes distintos que codifican dos proteínas semejantes que corresponden a la denominada queratina 6. Estas dos proteínas reciben, en el caso de la vaca, los nombres de BK6 y BK6*. Como primer objetivo, nos propusimos el aislamiento e identificación de los elementos reguladores del gen de la BK6, con objeto de compararlos con los del gen de la BK6*. El hallazgo temprano de un gen para otra forma de la queratina 6 (llamado BK6c) trasladó estos mismos objetivos

a la nueva proteína.

Así pues, este primer objetivo quedó redefinido como caracterización del gen de la queratina BK6c, y determinación de las zonas de secuencia en 5' responsables de su expresión.

Como segundo objetivo, y puesto que disponíamos de un clon conteniendo el gen de la queratina BK6*, en el que se ha identificado un *enhancer* capaz de conferir expresión específica (Blessing y cols., 1989), nos propusimos dilucidar cuáles eran los elementos de este *enhancer* responsables de la expresión del gen.

Para ello, se establecieron tres etapas, u objetivos parciales:

1. Determinación mediante experimentos de retardo en gel de las regiones del *enhancer* capaces de unir proteínas nucleares.
2. Utilización de técnicas de *footprinting* para determinar las secuencias de DNA responsables de la unión a estas proteínas.
3. Caracterización de la importancia relativa de estas áreas reguladoras, mediante ensayos de CAT.

Cuando se comenzó este estudio existía un absoluto desconocimiento sobre qué factores de transcripción podrían estar implicados en la regulación de la expresión de las queratinas. Desde entonces ha aparecido en la literatura una pequeña cantidad de datos al respecto referidos a otras queratinas. Estos datos no se contradicen con los obtenidos en este trabajo.

2. METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. Células.

Las líneas celulares eucarióticas empleadas han sido:

-BMGE+H, células de epitelio de glándula mamaria bovina crecidas en presencia de insulina, hidrocortisona y prolactina (Schmid y cols., 1983).

-AT-5, queratinocitos de ratón procedentes de la línea MCI3D transformada con Haras. Facilitadas por A. Balmain (Beatson Institute, Glasgow).

-MDBK, células de epitelio renal bovino (ATCC CCL22).

-3T3, fibroblastos embrionarios de ratón (ATCC CCL92).

-HeLa, células epiteliales humanas derivadas de un carcinoma cervical (ATCC CCL2).

-PB, células epidérmicas de ratón, derivadas de papilomas. Facilitadas por S. Yuspa (NIH, Bethesda, Maryland).

Se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*:

-HB101, JM109, Q358, LE392, DH5 α , XL-Blue (Stratagene).

Los siguientes bacteriófagos fueron usados:

-M13mp18 y 19 (Yanish-Perron y cols., 1985).

- λ EMBL3 y 4 (Frischauf y cols., 1983).

2.1.2 Vectores.

En los diversos clonajes se utilizaron los siguientes vectores:

-pUC8, pUC9, pUC18 y pUC19 (Yanish-Perron y cols., 1985).

-pGEM1 (Promega).

-pTZ18R y pTZ19R (Pharmacia).

-pBluescript (Stratagene).

-pPolyIII (facilitado por M. A. Vidal, CIB, Madrid).

-M13mp18, M13mp19 (Yanish-Perron y cols., 1985).

-pBLCAT2, pBLCAT3 (Luckow y Schütz, 1987).

2.2. MEDIOS DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO.

2.2.1. Células eucariotas.

Los medios utilizados fueron: medio de Eagle suplementado por Dulbecco (DMEM), obtenido de Flow y suplementado con 10 ml glutamina y 3 g NaHCO₃ por litro de medio; medio esencial mínimo (MEM, Flow), suplementado con 10 ml de aminoácidos no esenciales y 0.85 g NaHCO₃ por litro de medio; medio HAM's (Flow), suplementado con aminoácidos no esenciales.

- Las células BMGE+H se crecieron en DMEM suplementado con un 20% de suero fetal bovino (FBS), con adición de insulina, hidrocortisona y prolactina (1 μ g/ml de cada).

- Las células AT5 se mantuvieron en medio HAM's con un 10% de FBS.

- Las células MDBK se mantuvieron en medio MEM + 10% FBS.

- Las células HeLa se mantuvieron en DMEM + 10% FBS.

- Las células 3T3 se mantuvieron en DMEM + 10% FBS.

- Las células PB se mantuvieron en medio MEM con un 8% de FBS.

Todas las células se crecieron en placas Nunc a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y 98% de humedad, según se describe en Hershey (1987). Para subcultivarlas, se despegaron con tripsina.

Se almacenaron congeladas en N₂ en criotubos Nunc, en suero fetal bovino con 10% glicerol.

2.2.1.1 Soluciones y reactivos.

-PBS: 137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM Na₂HPO₄, 1 mM K₂HPO₄, pH 7.2.

-Tripsina: 0.125% Tripsina, 0.02% EDTA, 0.05% glucosa y 0.001% rojo fenol en PBS.

2.2.2 Bacterias.

Todas las cepas bacterianas se crecieron en medio líquido LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l), con fuerte agitación, a 37°C. Se mantuvieron en placas de Petri con LB + 2% de agar, salvo la cepa JM109 que se mantuvo en placas de medio mínimo (Sambrook y cols., 1989). El medio selectivo para la presencia de plásmido se preparó añadiendo ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

Las bacterias se conservaron congeladas a -80°C en medio de cultivo con 15% de glicerol.

Las células competentes se prepararon según Sambrook y cols. (1989).

2.2.3 Bacteriófagos.

Las infecciones con el fago M13 se realizaron a alta multiplicidad, añadiendo 10⁸ ufp a 100 µl de cultivo exponencial de *E. coli* JM109 y 3 ml de agar blando y vertiendo sobre placas de LB.

En el caso del bacteriofago λ, las infecciones a alta o baja multiplicidad se hicieron a 37°C en LB suplementado con 10 mM de Mg, en bacterias *E. coli* Q358 ó LE392.

2.3. SOLUCIONES BASICAS PARA METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

-TE: 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ó 8, 1 mM EDTA.

-TAE: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA.

-TBE: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA.

-SSC: 15 mM citrato sódico, 150 mM NaCl.

-100 X Denhardt's: 2% Ficoll, 2% polivinilpirrolidona, 2% BSA.

-SM: 50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM SO₄Mg, 0.1% gelatina.

2.4. AMPLIFICACION DE LA GENOTECA.

Se utilizó una genoteca de DNA total de timo de ternera digerido con Sau3A y clonado en el sitio BamHI del vector λEMBL-3, realizada por Ruppert y cols. (1984). Esta genoteca, de un tamaño medio de clon de 15 kb, tenía un título de 4·10⁶ ufp/ml. Su amplificación se realizó en dos pasos. En cada uno de ellos se mezclaron unas 2·10⁶ ufp con bacterias de la cepa LE392 y se vertieron con agar blando en varias placas de 22 X 22. Se incubó a 37°C durante 8 h. y se mantuvo durante toda la noche a 4°C cubierto con SM. Se recogió el líquido y añadió 1% de cloroformo. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación y se determinó el título de la genoteca amplificada.

2.5. ANALISIS DE LA GENOTECA.

La búsqueda en la genoteca se realizó esencialmente por el método de Benton y Davies (1977), con membranas Biodyne.

2.6. EXTRACCION Y PREPARACION DE DNA PLASMIDICO.

Las purificaciones de DNA plasmídico o de M13 a partir de cultivos bacterianos se hicieron por el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Según el volumen de cultivo se utilizaron diversas modificaciones de este método (Sambrook y cols., 1989). Las preparaciones a gran escala fueron purificadas por ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

Las soluciones de DNA se limpiaron, cuando fue necesario, mediante una extracción con fenol equilibrado en TE, seguida por otra extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y precipitación en frío por adición de 3 volúmenes de etanol en presencia de altas concentraciones iónicas (0.3 M acetato sódico, 0.1 M NaCl ó 2 M acetato amónico). Se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 15' a 4°C y posterior lavado de sales con etanol al 75%.

Para obtener DNA de λ , los cultivos infectados se lisaron con cloroformo y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000 rpm durante 10'. Se ajustó la concentración de NaCl a 1 M y se añadió PEG 12000 hasta un 10% del volumen final. Se incubó en hielo por 1h y las partículas virales se sedimentaron por centrifugación a 12000 rpm 10'. Se resuspendió el sedimento en SM y se ultracentrifugó en un gradiente discontinuo de CsCl, según se indica en Sambrook y cols. (1989). Se extrajo la banda de bacteriófagos, que sirvió tanto para reserva como para obtención de DNA. Para este último caso, se actuó como se indica en Sambrook y cols. (1989).

2.7. MANIPULACIONES ENZIMATICAS BASICAS CON DNA.

Las distintas modificaciones de las moléculas de DNA tales como cortes con enzimas de restricción, desfosforilación, relleno de extremos 5' protuberantes con el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I, ligación con DNA ligasa de T4, transformación, adición de *linkers* sintéticos, etc., se llevaron a cabo en las condiciones recomendadas por el suministrador o en las descritas en Maniatis y cols. (1982) o Sambrook y cols. (1989).

Para la selección por color de los clones positivos se añadió a las placas de LB + ampicilina IPTG y X-Gal a una concentración final del 0.002%.

2.8. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS. RECUPERACION DE FRAGMENTOS DE DNA.

2.8.1. Electroforesis en geles de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa del 0.7 al 1.8% en TBE con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. Los geles se observaron con luz UV de 300 nm y se fotografiaron en película Polaroid 665 ó 667.

2.8.1.1. Recuperación de DNA de geles de agarosa.

Siempre se utilizó agarosa de bajo punto de fusión. Las bandas se cortaron a la luz de 300 nm. Se utilizaron tres métodos de extracción, según conveniencia y disponibilidad:

- 1) CTAB (Langridge y cols., 1980)
- 2) GeneClean (Bio 101), según recomendaciones del suministrador.
- 3) La banda se fundió a 70°C. Se ajustó la concentración de NaCl a 100 mM y se hizo una extracción con fenol, otra con fenol-cloroformo y otra con cloroformo, y se precipitó con etanol.

2.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

La concentración de poliacrilamida varió del 4 al 8%, con una relación acrilamida:bisacrilamida de 29.2:0.8. Los geles se corrieron en TAE X 0.5 a 150 V, se transfirieron a papel Whatman, se secaron al vacío y se expusieron para autorradiografía.

2.8.2.1. Recuperación de DNA.

Una vez corridos los geles, se tiñeron en TAE X 0.5 con 1 µg/ml de bromuro de etidio o, si el DNA estaba marcado radiactivamente, se expusieron brevemente. Se cortaron las bandas de DNA, se introdujeron en bolsas de diálisis en TAE X 0.5 y electroeluyeron por 1 h. Se recuperó el tampón con el DNA eluido, se fenolizó y se precipitó.

2.8.3. Electroforesis de secuencia en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

La concentración de poliacrilamida varió del 6 al 10%, con una relación acrilamida:bisacrilamida de 19:1 y en presencia de urea 7M. Los geles se corrieron en TBE a 1500-2000 V a 50°C, se transfirieron a papel Whatman, se secaron al vacío y se expusieron para autorradiografía.

2.9. OBTENCION DE RNA

El RNA se preparó a partir de placas de células en cultivo creciendo activamente, por una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (1987):

Se rascaron las células en 1.8 ml de tampón de lisis por placa P100, y se fragmentó el DNA pasándolo por una aguja de 0.6 mm. Se añadió 1/10 vol. de acetato sódico 3M pH4, 1 vol. de fenol y 0.5 vol. de cloroformo. Tras 15' en hielo se centrifugó a 10000 rpm durante 20', se recogió la fase acuosa y se añadió 1 vol. de isopropanol. Se precipitó por una hora a -20°C y se centrifugó como antes. Se disolvió el precipitado en 1/3 vol. de tampón de lisis y se precipitó de nuevo con isopropanol. Se lavó con etanol 75% y tras secar el precipitado, se incubó a 37°C durante una hora con proteinasa K (100 µg/ml) en 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 0.3M acetato sódico pH6. Se extrajo dos veces con fenol y una con cloroformo y se precipitó con 1/10 vol. de 3M acetato sódico pH6 y 2.5 vol. de etanol. Tras lavar, se resuspendió en H₂O con 2 mg/ml de dietilpirocarbonato.

Tampón de lisis: 4M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato sódico pH 7, 0.5% sarcosil, 0.1% β-mercaptoetanol.

2.10. MARCADO RADIOACTIVO.

2.10.1. DNA.

Los fragmentos de DNA utilizados como sonda se marcaron en las dos bandas por *nick translation* (Rigby y cols., 1977), con ³²P-αdCTP. Se obtuvo una actividad específica superior a 10⁸ cpm/µg. Se purificaron por centrifugación en columnas de Sephadex G-50.

Los DNA utilizados para ensayos de retardo en gel y *footprinting* se abrieron con una enzima de restricción y se marcaron en tampón de *nick translation* con 30 µCi de ³²P-αdCTP

y 1 unidad de Klenow a RT durante 20', en un volumen final de 30 μ l. En el caso de que el dCTP no se incorporase en la última posición de la cadena de DNA se añadía a la mezcla de reacción 2 μ l de solución de caza (2 mM de cada dNTP) durante 2'. La enzima de Klenow se inactivó por calentamiento a 70°C durante 10' y se procedió a digerir con la segunda enzima de restricción, para separar el fragmento. El fragmento marcado se purificó en gel de poliacrilamida.

2.10.2. RNA.

10 μ g de mRNA se trataron con 1/10 vol. de NaOH 1 N durante 10' en hielo, seguido de 1/10 vol. de HCl, 1/10 vol. de 1 M Tris pH 8 y precipitación con NaCl y 2.5 vol. de etanol. Se desfosforiló, trató dos veces con fenol-cloroformo y una con cloroformo y se precipitó de nuevo. El marcado se realizó por incubación con 32 P γ -ATP y T4 polinucleótidoquinasa y posterior separación por centrifugación en columnas de Sephadex G-50.

2.11. PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES.

Se crecieron las células en placas Nunc de 150 mm, y se recogieron antes de estar confluentes. Se partió de un mínimo de 50 placas. Los extractos nucleares se prepararon por dos métodos principalmente: Dignam y cols. (1983) para ensayos de retardo en gel y por una variación del método de Shapiro y cols. (1988) para retardo en gel y *footprinting*. Para la preparación de extractos por este último método se procedió así:

Las células se precipitaron por centrifugación a 170 g 10' a 4°C, se resuspendieron en PBS y se reprecipitaron a 300 g. Se midió el volumen (PCV) y se resuspendió en 5 PCV de tampón hipotónico. Tras 10' en hielo se volvió a centrifugar como antes y se resuspendió en 2 PCV de tampón hipotónico. Las células se rompieron por 5 pases por un homogeneizador Dounce e inmediatamente se añadió 0.1 vol. de tampón de restauración, se mezcló y se centrifugó a 13000 rpm por 30' en un rotor Beckman JA20 a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2/3 PCV de tampón de resuspensión nuclear. Este fue transferido a un tubo de policarbonato para ultracentrifuga y agitado durante 30' en hielo. Se precipitaron los restos nucleares por ultracentrifugación a 47000 rpm durante 90' a 4°C en un rotor Beckman Ti50 y al sobrenadante se añadió lentamente y con agitación sulfato amónico sólido (0.33 g/ml). Tras 20' de agitación se centrifugó a 36000 rpm en el mismo rotor. Se recogió el precipitado y redisolvió en 1/10 vol. de centrifugación de tampón de diálisis. Se dializó frente a 200 vol. de este mismo tampón, durante 2 X 1 h. Se determinó la concentración de proteínas y se guardó en alícuotas a -70°C.

Tampón hipotónico: 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.75 mM espermidina, 0.15 mM espermina, 0.01% aprotinina, 0.2 μ g/ml leupeptina, 0.2 μ g/ml pepstatina, 0.5 mM PMSF.

10X Sales: 500 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 10 mM DTT, 2 mM EDTA, 7.5 mM espermidina, 1.5 mM espermina.

Tampón de restauración: 9 vol. de sacarosa 75%, 1 vol. de 10X sales. Añadir 5 mM NaF, 0.2 mM molibdato amónico, 0.5 mM PMSF.

Tampón de resuspensión nuclear: 25% glicerol, 20 mM Hepes pH 7.9, 2 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 0.75 mM espermidina, 0.15 mM espermina. Añadir 1/10

vol. de solución de sulfato amónico saturado. Añadir 0.2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina, 5mM NaF, 0.2 mM molibdato amónico, 0.5 mM PMSF, 10 μM benzamidina.

Tampón de diálisis: 20% glicerol, 20 mM Hepes pH 7.9, 2 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 100 mM KCl, 5 mM NaF, 0.2 mM molibdato amónico, 0.5 mM PMSF.

2.12. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL.

Las reacciones se hicieron en 5% glicerol, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Hepes pH 7.9. En un volumen final de 25 μl se añadieron 4 μg del competidor inespecífico sintético poly(dIdC)·(dIdC) y 1 a 10 μl de extracto nuclear crudo (4 a 15 μg). Tras una preincubación de 10' en hielo se añadieron 0.1 a 0.5 ng de fragmento de DNA marcado terminalmente (≈ 10000 cpm), y la reacción se prolongó por 30' en hielo. Las reacciones se pararon por adición de 1/10 de volumen de tampón de carga (50% glicerol, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.5 y 0.1% de azul de bromofenol), y se corrieron en geles de poliacrilamida del 5%.

2.13. FOOTPRINTING

2.13.1. Ortofenantrolina.

Se hicieron ensayos de retardo en gel como se describe arriba y los geles se incubaron por 10' con Cu^{++} -Ortofenantrolina, según el método de Kubawara y Sigman (1987). Los geles tratados y húmedos se sometieron a autorradiografía y las bandas de interés se escindieron, electroeluyeron, extrajeron con fenol-cloroformo y analizaron por electroforesis en geles de secuencia al 8%.

2.13.2. DNAsal.

Los ensayos se realizaron en un volumen de 45 μl , conteniendo 5% glicerol, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes pH 7.9, hasta 100 μg de extracto nuclear crudo y 1 μg de poly(dIdC)·(dIdC). Se preincubó la mezcla en hielo por unos minutos y se añadió el DNA marcado terminalmente (30000 cpm, ≈ 0.5 ng). Tras 30' de unión a 4°C, se añadieron 5 μl de mezcla de activación (25 mM CaCl_2 , 50 mM MgCl_2) y la reacción se pasó a 20°C. Un minuto más tarde, se añadió la DNAsal (5-15 ng para los controles, 100-600 ng para las muestras) y se dejó actuar durante 1', transcurrido el cual se pararon las reacciones por adición de 100 μl de tampón de parada (100 mM Tris pH 7.6, 0.5% SDS, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinasa K y 40 $\mu\text{g/ml}$ de glicógeno) e incubación a 45°C por 15', seguida de 2' a 90°C. Se hizo una extracción con fenol y otra con cloroformo y se precipitó por adición de 1/4 de volumen de acetato amónico 10 M. Las muestras se resuspendieron en tampón de carga de secuencia y se corrieron en geles de secuencia del 6 al 10%, según tamaño.

Se evitó específicamente la utilización de tRNA como *carrier*, pues se encontró que causaba falta de definición en las bandas mayores de 90 nucleótidos (Zorbas y cols., 1990).

2.14. SECUENCIACION DE DNA.

2.14.1. Métodos químicos.

Para la elaboración de marcadores de DNA para los experimentos de footprinting, el fragmento a ensayar fue secuenciado en parte por el método químico de Maxam y Gilbert

(1980), con las modificaciones introducidas por Chupilo y Kravchenko (1984). En general, sólo se hicieron dos reacciones: purinas (A+G) y pirimidinas (C+T).

2.14.2. Métodos enzimáticos.

Se empleó el método de los terminadores específicos de cadena (Sanger y cols., 1977), utilizando α -³²SdATP y *primers* directo (-40) e inverso. Se utilizó la enzima de Klenow, o bien sequenasa (DNA polimerasa del fago T7 modificada, USB), en las condiciones recomendadas por el suministrador.

2.15. HIBRIDACIONES.

2.15.1. DNA-DNA.

La transferencia de DNA de geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa o nylon se llevó a cabo durante toda la noche según el método de la transferencia alcalina. Las membranas se secaron a 80°C durante 2 h. Se prehibridaron en 50% formamida, 5 X Denhardt's, 5 X SSC, 0.5 % SDS durante 1 h. a 42°C en una estufa de hibridación Bachofer. Se añadió la sonda marcada (10⁸ cpm) junto con DNA *carrier* y se hibridó durante toda la noche. Se lavó en condiciones variables según la homología de secuencia de los DNAs hibridados y se secaron los filtros y autorradiografiaron con pantalla intensificadora.

2.15.2. RNA-DNA.

Las transferencias de RNA a nitrocelulosa BA85 se hicieron por *Slot blot* en un aparato Minifold II de Schleicher & Schüll, según las recomendaciones del fabricante. El RNA se preparó por adición de 3 vol. de formaldehído 6.15 M, 10 X SSC. Los filtros se secaron, prehibridaron e hibridaron como en el caso de DNA.

2.16. DELECCIONES.

2.16.1. Bal31.

El DNA a digerir se linearizó con una enzima de restricción apropiada y se incubó en Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 0.6 M, CaCl₂ 12.5 mM, MgCl₂ 12.5 mM, EDTA 5mM con 2 u de la exonucleasa Bal31. Se recogieron alícuotas a distintos tiempos, parando la reacción por adición de EGTA y congelación. Una parte de cada alícuota se corrió en gel de agarosa para ver su tamaño y el restó fue fenolizado, precipitado, rellenado con la enzima de Klenow y redigerido con una segunda enzima de restricción. El fragmento de DNA deleciónado fue purificado y religado en un vector adecuado.

2.16.2. ExoIII/S1.

Se realizaron con un *kit* de Pharmacia, según el protocolo facilitado por el suministrador.

2.17. TRANSFECCIONES.

Las transfecciones se efectuaron por el método del fosfato cálcico (Graham y van der Eb, 1973). En general, las células fueron pasadas el día antes de la transfección a una densidad de $\approx 10.000 / \text{cm}^2$. El día de la transfección, se cambió el medio a las células y cuatro horas más tarde se añadió 1/10 de volumen de una mezcla realizada por combinación de dos soluciones A y B. Para una placa de 10 cm de diámetro, conteniendo un volumen de 7.2 ml de medio, la solución A consistía en 400 μl de CaCl₂ 250 mM con 25 μg de DNA total, y la B en 400 μl de HeBS 2X (280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM Hepes/KOH

pH 7.1. La solución A se vierte poco a poco en la B mientras ésta es burbujeada, y tras agitar fuertemente y esperar unos minutos, se añade a la placa a transfectar). Se incubó en condiciones normales de cultivo durante cinco horas, pasadas las cuales se retiró el medio y se sometió a las células a un choque con una solución conteniendo 15% de glicerol en HeBS. Después de dos minutos se lavaron las placas tres veces con PBS y se añadió medio fresco. A las 40-72 h., las placas se lavaron dos veces con PBS y se recogieron con un rascador. Se centrifugaron 1' en frío y resuspendieron en 100 μ l de Tris 0.25 M pH 7.5. Seguidamente se lisaron mediante tres ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a 37°C, y tras centrifugar se guardó el sobrenadante conteniendo la actividad CAT y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. La eficiencia de transfección se determinó mediante ensayo de actividad β -galactosidasa (Maniatis y cols., 1989). Para este fin se cotransfectó con 5 μ g del plásmido Z-neo, que contiene el gen LacZ bajo el control del promotor de la β -actina. Este plásmido fue proporcionado por Ll. Casanova (CIEMAT).

El suero deslipidizado para el estudio del efecto de las hormonas esteroideas se preparó añadiendo 1.6 g de carbón activo y 4 g de resina AG501-8X (Bio-Rad) por cada 100 ml de suero e incubando con agitación a temperatura ambiente toda la noche. Se decantó el suero tras centrifugar 10' a 2000 rpm y se clarificó por nueva centrifugación a 12000 rpm durante 30' a 4°C. El sobrenadante se esterilizó por filtración a través de 0.22 μ m.

En las transfecciones con suero deslipidizado las células se crecieron por dos pases y transfectaron en medio suplementado con este suero, y tras la transfección se incubaron en este medio suplementado con 1 μ M de ácido retinoico disuelto en etanol.

2.18. ENSAYOS CAT.

Los ensayos de CAT se realizaron por un procedimiento adaptado de Gorman y cols. (1982). Se normalizó la cantidad de proteína de cada placa según la eficiencia de transfección (determinada por actividad β -galactosidasa) y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

4 μ l 100 μ Ci/ml ¹⁴C cloramfenicol (50 mCi/mmol)
 20 μ l AcetilCoA 4 mM
 32.5 μ l Tris 1M, pH 7.5
 H₂O hasta 150 μ l.

Se incubó durante 1 h a 37°C. Pasado este tiempo, se añadieron 20 μ l más de 4 mM AcetilCoA y se incubó durante otra hora. Se añadió 1 ml de acetato de etilo y tras agitar y centrifugar 1 minuto se extrajo la fase superior y se secó en el *Speed-Vac*. Se resuspendió cada muestra en 30 μ l de acetato de etilo y se aplicó a una placa de cromatografía en capa fina, equilibrada previamente en cloroformo/metanol 19:1. Las placas se desarrollaron en esta misma mezcla, y el resultado se analizó mediante autorradiografía y se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

2.19. MATERIALES.

Los productos químicos usados fueron suministrados fundamentalmente por Merck y Sigma. Otros suministradores fueron Fluka, Baker, BDH, Probus, Panreac, BioRad, C. Erba y Serva. Las endonucleasas de restricción y demás enzimas de modificación de DNA y RNA se obtuvieron de Boehringer, New England BioLabs, USB ó BRL. Los medios de cultivo para bacterias fueron de Difco. Los radioisótopos procedían de Amersham, NEN ó ICN. Se utilizaron películas autorradiográficas Kodak X-Omat R y AS. Las pantallas intensificadoras fueron de Dupont ó Kodak.

2.20. MEDIOS INFORMATICOS.

Los análisis de secuencias de DNA, búsquedas y comparaciones se realizaron utilizando el paquete de programas de análisis de secuencia del Genetics Computer Group (v 6.2) de la Universidad de Wisconsin (Devereux y cols., 1984), utilizando un *cluster* de VAX. Se utilizaron los bancos de datos EMBL y GenBank. La búsqueda de secuencias reguladoras en los promotores se realizó utilizando el programa SEQNCE (IntelliGenetics) con una base de datos de factores de transcripción compilada por Miguel Beato (Universidad de Marburg, Alemania). Este texto fue procesado en ordenadores tipo PC-AT 386, utilizando el programa WordPerfect 5.1, e impreso en una Hewlett-Packard LaserJet III. Las gráficas se crearon con Harvard Graphics v2.3 ó 3.0 y se exportaron a WordPerfect como metaficheros.

3. RESULTADOS

NOTA PRELIMINAR

La nomenclatura de las queratinas ha sido tradicionalmente un asunto relativamente confuso. En los primeros estudios que se realizaron, se denominaron éstas por su peso molecular. Con posterioridad, Moll y cols. (1982) establecieron un sistema de numeración para las queratinas humanas que rige en la actualidad. Sin embargo, en el caso de las queratinas de otros animales, frecuentemente este sistema no llegó a implantarse. Así, se habla de una queratina "endoA" de ratón (equivalente a la K8 humana) o de una "KIII" bovina (que equivaldría a la K5 humana). Aunque no en todos los casos se puede encontrar correspondencia entre las queratinas humanas y las de otros animales, en los últimos tiempos ha comenzado a implantarse la tendencia de nombrar las queratinas por el número de la queratina humana correspondiente precedido por dos letras, que indican la especie a que pertenece. Así, se utilizaría HK para las queratinas humanas, BK para las de vacas, MK para las de ratón y XK para *Xenopus*. Nosotros hemos decidido utilizar en lo posible este nuevo sistema, en el cual las queratinas objeto del presente estudio, anteriormente denominadas queratinas bovinas IV y IV* (y, en referencias más antiguas, 56K) pasan a llamarse BK6 y BK6*. Igualmente, la queratina que aquí llamamos BK5 corresponde a la que en la literatura anterior aparece como III ó 58K.

3.1 ESTUDIO DEL GEN DE LA QUERATINA BK6c

Al igual que en humanos, la queratina K6 presenta en vacas al menos dos isoformas, llamadas BK6 y BK6*, que son codificadas por dos genes distintos (Blessing y cols., 1987). Datos previos de estos autores, no publicados, indicaban que existe coexpresión de los dos genes en aquellos tejidos que han sido descritos como positivos para K6, salvo en esófago, donde se detecta expresión de BK6 pero no de BK6*. Por este motivo se decidió inicialmente abordar la identificación y estudio del promotor del gen de la BK6, con objeto de compararlo con el de la BK6* y comprobar si la regulación de ambos genes se lleva a cabo mediante la utilización de las mismas secuencias reguladoras y factores de transcripción y, en último término, cual es la causa de que ambos genes se coexpresen en una serie de tejidos y no en esófago.

3.1.1 CARACTERIZACION DEL CLON λ K6.

Jorcano y cols. (1984) aislaron un cDNA de queratinocitos de hocico de vaca que codificaba la queratina BK6. Con posterioridad, la búsqueda en una genoteca bovina utilizando como sonda el cDNA de la queratina bovina BK5 llevó al hallazgo de un gen ligado al de la BK5, e identificado finalmente como perteneciente a la queratina BK6*, estrechamente relacionado con el de la BK6 (Blessing y cols., 1987). Finalmente, Blessing y Jorcano (no publicado) escrutaron la misma genoteca utilizando esta vez como sonda la parte 3' del cDNA de la BK6, parcialmente divergente en los dos genes BK6 y BK6*, y obtuvieron otro clon, supuestamente perteneciente a la BK6, que sirvió como base para el inicio del presente trabajo.

Este clon genómico bovino, llamado λ K6 y de 12 kb de tamaño, estaba clonado en el fago λ -EMBL3 (fig. 5). Un fragmento *SalI-HindIII* de él, de 6.5 kb de tamaño (fragmento A), hibridaba con el cDNA de la BK6 (J.L. Jorcano, comunicación personal). Datos procedentes de microscopía electrónica de heterodúplex RNA-DNA indicaban que el fragmento contiguo *HindIII-HindIII* (fragmento B) contenía probablemente el promotor del gen. Por consiguiente, este fragmento fue extraído del clon genómico (fig. 5), subclonado en pUC8 y mapeado con diversas enzimas de restricción. Para comprobar si este fragmento contenía el extremo 5' del gen de la BK6 o si, por el contrario, comprendía el extremo 3', se realizaron diversas digestiones de este clon y se transfirieron a una membrana de nylon por *Southern blot*, e hibridaron utilizando como sonda la zona 5' codificante del gen BK6*. Esta sonda debe ser presumiblemente homóloga a la correspondiente del gen de la BK6, puesto que en el resto de las zonas codificantes secuenciadas de ambos clones la homología de secuencia es de prácticamente el 100% (Jorcano y cols., 1984; Blessing y cols., 1987). La hibridación se realizó en condiciones estándar, con 3 lavados de una hora cada uno en 2X SSC, 0.5% SDS a 68°C. El resultado de esta hibridación fue negativo (no se muestra).

Este resultado negativo se puede interpretar de diversas formas: era posible que el extremo 5' del gen de la BK6 no se encontrase en el fragmento B objeto de análisis, pero también era posible que ambos genes, en contra de lo previsto, divergieran en la parte 5' y no se hubiese permitido la hibridación debido a las rigurosas condiciones de lavado. Para dilucidar este dilema, se hicieron nuevos *Southern blots* de este fragmento B y del

inmediatamente adyacente en el clon genómico (fragmento A), digeridos con diversas endonucleasas de restricción. Esta vez fueron hibridados frente a tres sondas distintas:

- 1.- cDNA IV83, correspondiente a la BK6 (Jorcano y cols., 1984).
- 2.- fragmento 5' codificante del gen de la BK6*.
- 3.- poliA⁺-RNA total de hocico de vaca. Este tejido expresa ambas queratinas.

Se hicieron dos lavados de una hora a 56°C en 0.1X SSC, 0.5% SDS. En los resultados (fig. 5) se observó que ninguno de los dos fragmentos hibridaba con el extremo 5' de BK6*, lo que indica que probablemente este clon genómico de la BK6 no contiene el extremo 5' del gen. El caso contrario, que lo contenga pero la divergencia de los genes sea tan grande que no se detecte, no se puede descartar aunque no resulta probable, pues los genes de las queratinas están en general bastante conservados (Steinert y Roop, 1988), particularmente cuando una misma queratina es expresada por dos o más genes (Tyner y cols., 1985), y la conservación de secuencia entre K6 y K6* bovinas en la zona secuenciada (Jorcano y cols., 1984; Blessing y cols., 1987) no hace suponer que los extremos 5' vayan a ser divergentes.

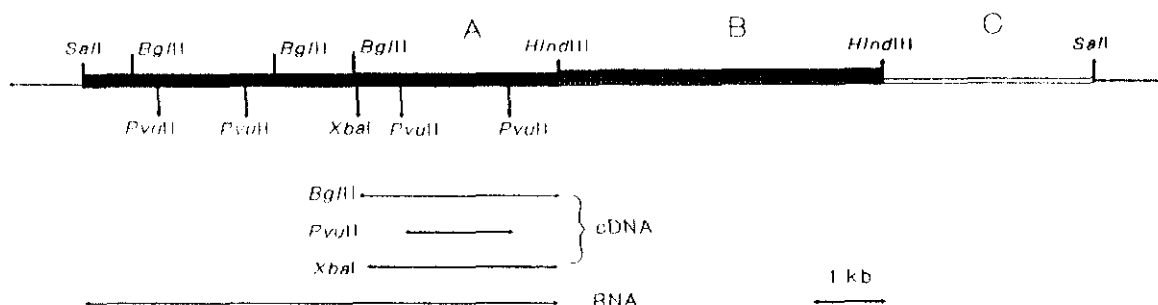


Fig. 5. Mapa del clon genómico λ K6 en el vector λ EMBL3 conteniendo presumiblemente el gen de la BK6 (Jorcano, comunicación personal). Debajo se muestran los fragmentos mínimos de las digestiones con BglII, PvuII ó XbaI que hibridan con el cDNA de la BK6 o con el mRNA total de hocico de vaca.

El mínimo fragmento capaz de hibridar con el cDNA de BK6 era uno PvuII-PvuII de un tamaño de 1.9 kb. La hibridación con el RNA fue débilmente positiva y su patrón fue muy semejante al observado para el cDNA. Puesto que tanto el RNA como el cDNA hibridan solamente con el extremo izquierdo del clon λ K6 (fragmento A), y el extremo derecho (fragmentos B y C) ofrece un resultado negativo, estos resultados sugieren fuertemente que este clon genómico no contiene el extremo 5' de la BK6, sino que está truncado en algún punto intermedio, conteniendo sólo la parte 3'.

Para comprobar hasta que punto del gen abarcaba el clon λ K6, se secuenció parte de éste. El fragmento SalI-PvuII (0.9 kb), que se encuentra en el extremo izquierdo del clon genómico, en la zona que hibrida con el RNA (ver fig. 5) se subclonó en M13 y se secuenció parcialmente por el método de Sanger y cols. (1977). La secuencia demostró que este fragmento a la izquierda del clon genómico incluía el primer intrón y parte del segundo

```

ctttttccctqca GTC CGa TTC CTA GAG CAG CAG AAC AAG GTC CTG
                Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn Lys Val Leu

GAC AaC AAG TGG ACC tTG CTG CAG GAG CAG GGC ACC AgG ACT
Asp Thr Lys Trp Thr Leu Leu Gln Glu Gln Gly Thr Lys Thr

GTG AGG CAG AAC CTG GAG CcT TTG TTC GAG CAG TAC ATC AAC
Val Arg Glu Asn Leu Glu Pro Leu Phe Glu Gln Tyr Ile Asn

AAC CTC AGG AGG CAG
Asn Leu Arg Arg Gln

```

Fig. 6. Secuencia parcial de la zona codificante del fragmento PvuII-Sall del clon genómico λ K6. El intrón, así como aquellos nucleótidos de la zona codificante que difieren de la secuencia de la queratina humana HK6 (todas las divergencias son conservativas) se representan en minúsculas. En cursiva se representa el área correspondiente al espaciador 1A. Un sitio de restricción PstI está subrayado.

exón del gen de la BK6, concretamente parte de la α -hélice y el espaciador 1A. La figura 6 muestra esta secuencia en su parte codificante y su relación con la zona correspondiente de la queratina humana HK6. La figura 7 muestra un esquema general de la posición del gen de la BK6 en el clon genómico λ K6. Según estos resultados, en este clon genómico no se hallaba el promotor del gen de la BK6, ni el extremo aminoterminal del mismo, sino que este clon genómico abarcaría desde el primer intrón de este gen en adelante, siendo por tanto inadecuado para nuestros propósitos.

3.1.2 BUSQUEDA DEL GEN BK6.

3.1.2.1. Preparación de la sonda

Decidimos entonces buscar en la genoteca otro clon que incluyese el promotor de este gen. Para ello era necesario disponer de una sonda específica que no hibridase con los demás genes de queratinas, particularmente con el de la BK6*. Habida cuenta de que la homología de secuencia es elevada, especialmente en la zona que codifica los dominios centrales (incluyendo la α -hélice), quedaba descartado realizar cualquier tipo de sonda a partir de esta zona. Igualmente, la búsqueda con el cDNA había dado lugar previamente al hallazgo de un clon incompleto, sugiriendo que no hay ningún clon genómico que contenga el gen completo, sino que este se halla partido. Se decidió entonces utilizar un intrón, con la esperanza de que una hibridación en condiciones de lavado rigurosas fuera capaz de seleccionar únicamente clones que incluyeran solamente el gen de la BK6. Decidimos utilizar el primer intrón del gen, por un doble motivo: primero porque conocíamos su localización y parte de la secuencia, y segundo porque al ser el más cercano al extremo aminoterminal existían más posibilidades de encontrar un clon que contuviese una adecuada longitud del promotor.

La secuencia del fragmento Sall-PvuII del clon 6.5 kb de la BK6 (fragmento A de la figura 5), que incluye el primer intrón del gen, muestra dos sitios de restricción PstI, uno de los cuales se encuentra justamente en el borde entre intrón 1 y exón B, haciéndolo un

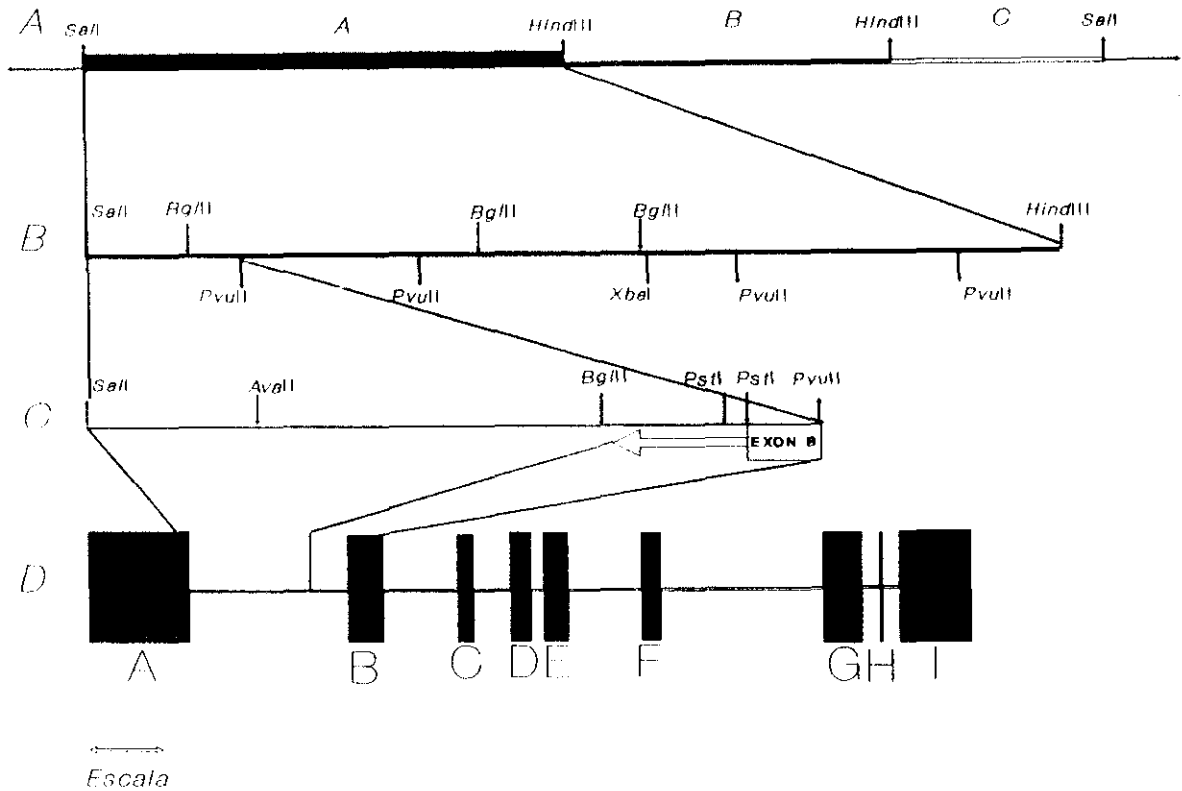


Fig. 7. Esquema de la caracterización del clon genómico λ K6. **A**, mapa del clon. **B**, mapa del subclon de 6.5 kb (fragmento A) que hibrida con el cDNA y RNA de BK6. **C**, el fragmento PvuII-Sall de este subclon fue a su vez de nuevo subclonado y parcialmente secuenciado, en la zona indicada por la caja (exón B) y la flecha (intrón 1). **D**, localización de esta secuencia dentro de la estructura general de los genes de las queratinas de tipo II. Los recuadros indican los exones, las líneas, los intrones. Escala: **A**, 1 kb. **B**, 0.5 kb. **C**, 0.1 kb. **D**, 0.4 kb.

candidato idóneo para obtener una sonda libre de exón (figs. 6 y 7). Así pues, se cortó este plásmido y se purificó un fragmento *PstI* que fue subclonado en el sitio de restricción *PstI* del vector pUC19.

3.1.2.2. Amplificación de la genoteca

Una genoteca de DNA total de vaca en el fago λ -EMBL4 fue amplificada en dos pasos según se describe en Métodos. Se obtuvo un título de $4 \cdot 10^8$ ufp/ml.

3.1.2.3. Búsqueda en la genoteca.

Se prepararon 5 placas *Nunc* de 22x22 cm con $\approx 2.5 \cdot 10^7$ ufp cada una (la máxima densidad de placas en la que éstas no se mezclan entre ellas), con un total de $\approx 1.25 \cdot 10^8$ ufp. Estas placas se transfirieron a nitrocelulosa utilizando básicamente el método de Benton y Davies (1977), modificado según se describe en Métodos, y se hibridaron durante toda la

noche con la sonda marcada con ^{32}P por *nick translation*. Se efectuaron tres lavados de una hora cada uno en 0.1x SSC, 0.5% SDS a 59°C con agitación. Como resultado de esta hibridación aparecieron 33 clones positivos. Debido a la casi confluencia de las placas y al pequeño tamaño de éstas, era prácticamente imposible aislarlas individualmente sin contaminarlas con las adyacentes, por lo que se optó por picar las placas positivas, diluirlas en tampón SM y volver a plaquearlas, esta vez en placas de Petri de tamaño normal. Se transfirieron a membrana igual que la vez anterior y se volvieron a hibridar con la misma sonda y en las mismas condiciones. En este caso, de los 33 clones iniciales, sólo 22 resultaron positivos, aunque algunos eran débiles y poco abundantes. Estos fagos positivos se volvieron a picar y a diluir en tampón SM. Se titularon entre 10^7 y 10^8 ufp/ml. Los resultados de esta segunda hibridación fueron:

Clones claros, presumiblemente bien aislados: 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 17, 22, 23, 24, 28, 30, 31.

Clones débiles, para repetir: 4, 12, 21, 26, 32, 33.

Clones negativos: 1, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 25, 27, 29.

Se preparó una nueva sonda recién marcada para volver a hibridar los clones. Se hizo de nuevo en las mismas condiciones que en el caso anterior, utilizando placas con ≈ 100 colonias. Ninguno de los clones que en la hibridación anterior resultaron negativos dió ninguna señal. En los otros, los resultados fueron:

Positivos fuertes: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24, 30, 33.

Positivos débiles: 2, 3, 10, 17, 23, 26, 28, 32.

Negativos: 11, 12, 21, 22, 31.

El sorprendente resultado obtenido con los clones n° 11 y 22 (fuertemente positivos en la primera hibridación, negativos en la segunda) nos llevó a hacer una tercera hibridación. Estos clones 11 y 22 fueron replaqueados a partir de los tubos iniciales, recogidos de la primera placa positiva. El resto de los clones positivos también fueron plaqueados, salvo el clon n° 9, que no volvió a crecer nunca más, pese a intentar recuperarlo en diferentes ocasiones y por múltiples medios.

Las placas fueron de nuevo transferidas a nitrocelulosa e hibridadas en las mismas condiciones que las anteriores. Los resultados fueron:

Positivos fuertes: 5, 7, 8, 10, 17, 23, 24, 30, 32, 33.

Positivos débiles: 2, 3, 4, 6, 28.

Negativos: 11, 22, 26.

No crecen: 9.

3.1.2.4 Analisis de los clones

Aunque todos los clones arriba obtenidos presentaban hibridación positiva con el primer intrón del gen de la BK6, era posible que no todos abarcasen la zona de interés, es decir, el promotor del gen. Puesto que no se disponía de sondas para esta parte del gen, y de nuevo asumiendo la suposición de que existe una fuerte homología entre las queratinas

En estas apreciaciones no se ha tenido en cuenta el efecto de intensidad causado por el diferente crecimiento de las placas.

La tabla II resume todos los resultados obtenidos hasta este punto en el análisis de los clones.

3.1.2.5 Caracterización de los clones.

Seguidamente se abordó la caracterización molecular de todos los clones positivos obtenidos. Se preparó primeramente DNA de todos ellos. La digestión de estos DNAs con dos enzimas de restricción (*SalI* para separar el DNA genómico del vector, y *EcoRI* para cortar aquél) permitió comprobar que los 15 clones encontrados se ajustaban a 6 modelos (Fig. 8 y tabla II). Dos de estos modelos correspondían a los clones genómicos $\lambda K6$ y $\lambda K6^*$, ya aislados con anterioridad, mientras que los otros cuatro eran formas nuevas. Para no trabajar con todos los clones, elegimos uno de cada modelo: los clones $\lambda 3$ (equivalente a $\lambda K6^*$), $\lambda 4$, $\lambda 6$, $\lambda 8$, $\lambda 10$ y $\lambda 23$ (equivalente a $\lambda K6$). Para saber cual de estas formas nuevas correspondía a la K6 y cual a la K6*, se utilizaron dos sondas:

Sonda K6: Intrón 1 del gen BK6.

Sonda K6*: Fragmento *EcoRI-XmnI* del promotor del gen BK6*.

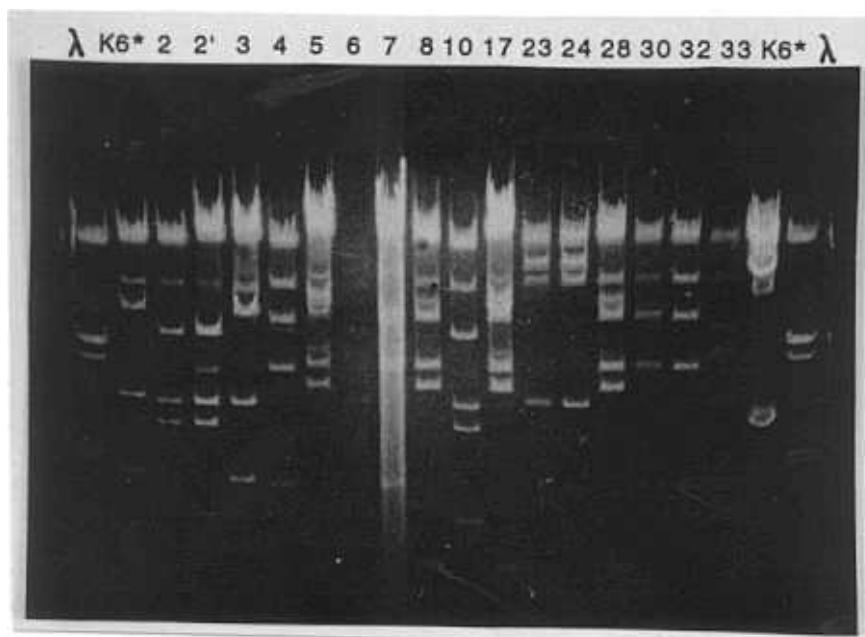


Fig. 8. Digestión con las enzimas *EcoRI* y *SalI* de los 16 clones genómicos obtenidos en la búsqueda de la genoteca, más dos controles para $\lambda K6$ y $\lambda K6^*$. Obsérvese que todos los clones se pueden agrupar en seis tipos: tipo $\lambda K6$, clones 23 y 24; tipo $\lambda K6^*$, clon 3; tipo 2, clones 2 y 10; tipo 4, clones 4, 7, 30 y 32; tipo 5, clones 5, 8, 17 y 28; tipo 6, clones 6 y 33.

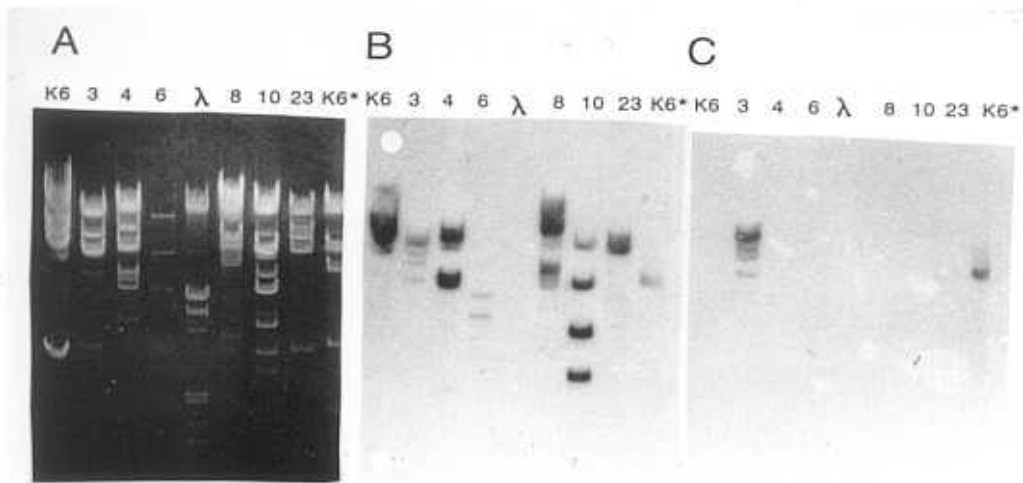


Fig. 9. Hibridación de los cuatro clones patrón (λ 4, λ 6, λ 8 y λ 10) obtenidos en la búsqueda de la genoteca bovina y los dos controles (λ K6 y λ K6*). Digestiones *EcoRI-SalI* de estos clones (A) se transfirieron a nylon y se hibridaron con el primer intrón del gen de la BK6 (B) o con el fragmento *EcoRI-XmnI* del promotor de la BK6* (C).

Digestiones de los clones positivos se transfirieron a membranas y se realizó la hibridación en las condiciones habituales, con las sondas marcadas por *nick translation*. Los lavados se hicieron en 0.1x SSC, 0.5% SDS y 60°C. El resultado fue sorprendente: mientras que con la sonda para BK6* solamente hibridaban aquellos clones de los cuales previamente se sabía que contenían parte del gen de esta queratina (aquellos clasificados como tipo 6* en la tabla II), absolutamente todos los clones, incluso los que contenían la BK6*, hibridaban con el primer intrón de la BK6 (Fig. 9). Estos resultados indican que o bien existía homología entre los intrones de BK6 y BK6* o bien ninguno de los nuevos clones incluía el promotor de la BK6*

Ante la sospecha de que esta hibridación generalizada se debiese a que la sonda del intrón 1 de la BK6 pudiese llevar algún pequeño trozo del 5' codificante de la BK6* (pues esta sonda no había sido secuenciada por completo), se preparó un nuevo clon, retirando un fragmento *SalI-AvaII* de 235 pb de la parte 5' (ver fig. 7). Esta nueva sonda fue parcialmente secuenciada en las inmediaciones del sitio *AvaII* y se comprobó que no contenía ninguna zona codificante. La sonda se marcó por *nick translation* y se hibridó con digestiones de todos los clones a estudiar, en las mismas condiciones que la anterior. El resultado fue idéntico, demostrándose que, puesto que esta sonda no contiene ninguna zona codificante, hay una elevada homología entre los primeros intrones de las queratinas BK6 y BK6*.

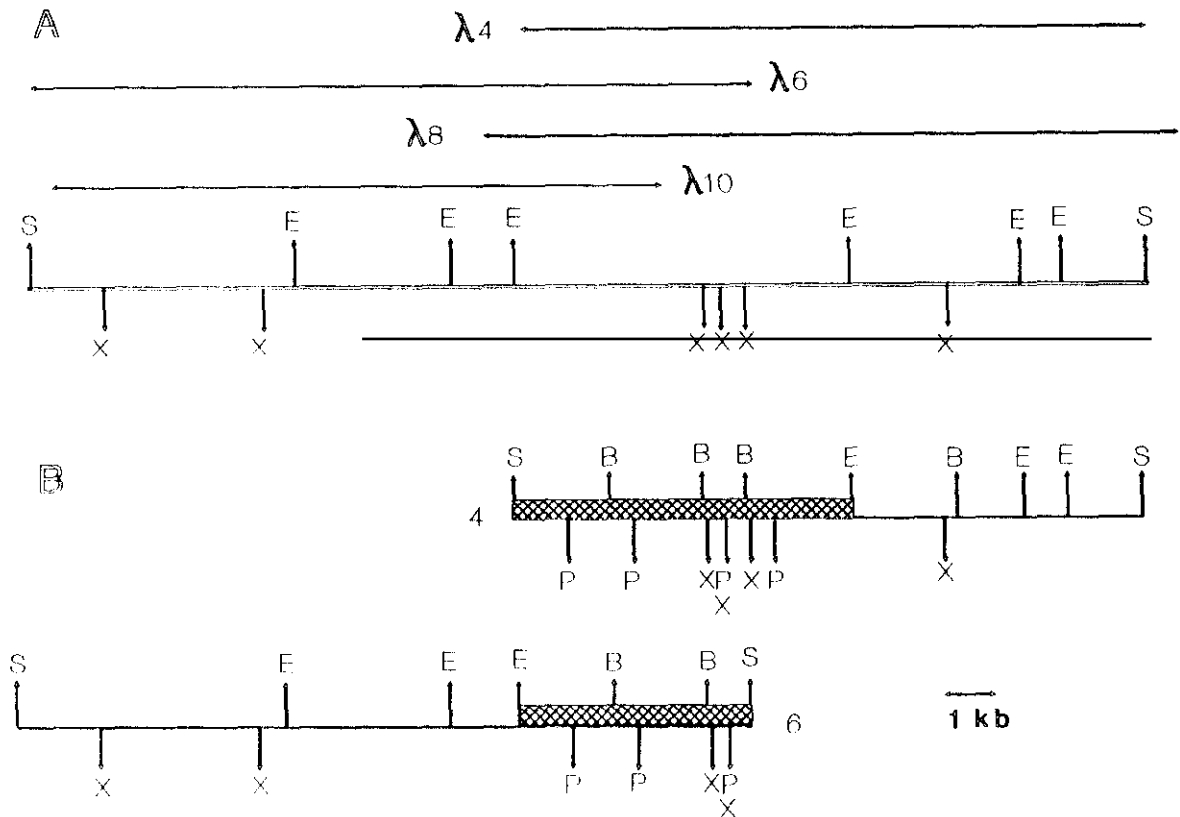


Fig. 10. A). Mapas de los cuatro clones genómicos λ_4 , λ_6 , λ_8 y λ_{10} , mostrando sus extensiones relativas sobre la zona que cubren. **B).** Mapas más detallados de los clones λ_4 y λ_6 . Las zonas que aparecen en recuadros fueron subclonadas posteriormente. **B,** BglIII. **E,** EcoRI. **P,** PvuII. **S,** Sall. **X,** XbaI. Todos los sitios Sall proceden de los vectores.

La hibridación de diversas digestiones de los cuatro clones nuevos con las sondas anteriormente citadas permitió efectuar mapas de restricción y determinar cuales son los fragmentos que hibridan con cada una de las sondas, descubriéndose entonces que los cuatro clones se solapan entre ellos, abarcando en total una extensión de unas 20 kb. La figura 10 muestra el mapa y posición relativa de estos cuatro clones.

Nos centramos en dos clones para hacer el estudio en profundidad de este gen. Estos dos clones, λ_4 y λ_6 , abarcan toda la extensión del locus. Como primera aproximación, se subclonaron en pUC19 dos fragmentos de estos clones que hibridaban con la zona 5' codificante del gen de la BK6*: el fragmento Sall-EcoRI (de ≈ 7 kb) del clon λ_4 , y el fragmento Sall-EcoRI (de ≈ 4.2 kb) del clon λ_6 (ver fig. 10B). Estos clones recibieron los nombres de p λ_4 y p λ_6 , respectivamente.

Los clones p λ_4 y p λ_6 fueron mapeados en profundidad con diversas endonucleasas de restricción (fig. 10B) y estas digestiones fueron hibridadas de nuevo con sondas para el primer intrón y zona 3' no codificante de la BK6 y la zona 5' codificante de la BK6*, en

las mismas condiciones que en ocasiones anteriores. Como resultado de estas hibridaciones y mapas, se determinó la orientación del gen en los clones y las posiciones aproximadas del primer intrón y las zonas 3' y 5' (fig. 11).

Los genes de las queratinas suelen encontrarse agrupados (Waseem y cols., 1990a y b). Para ver si en las ≈ 20 kb que contenían a este gen había algún otro gen de queratinas, se realizaron hibridaciones con una sonda de cDNA de la BK6 (Jorcano y cols., 1984) que incluía unos 200 pb de la zona de α -hélice, y concretamente el extremo final del dominio central, que es la zona más conservada en estas proteínas, incluyendo la secuencia

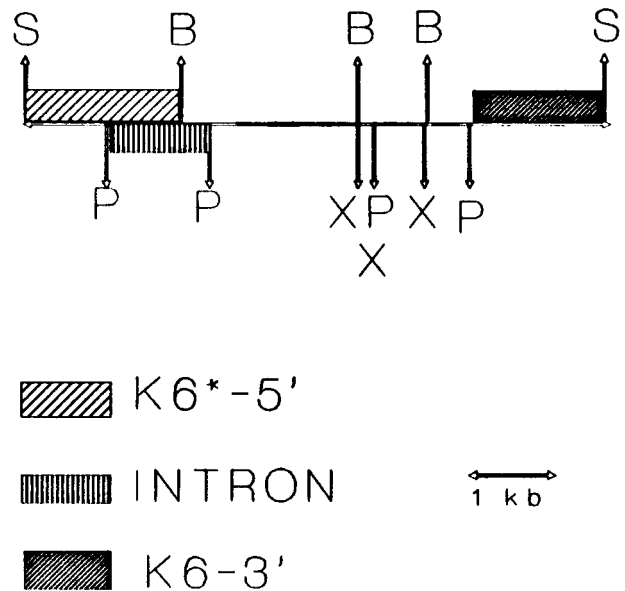


Fig. 11. Zonas del clon $p\lambda 6$ que hibridan con 5' de BK6*, intrón 1 de BK6 y 3' de BK6. Idénticos resultados se obtuvieron para $p\lambda 4$. Símbolos como en la figura 10.

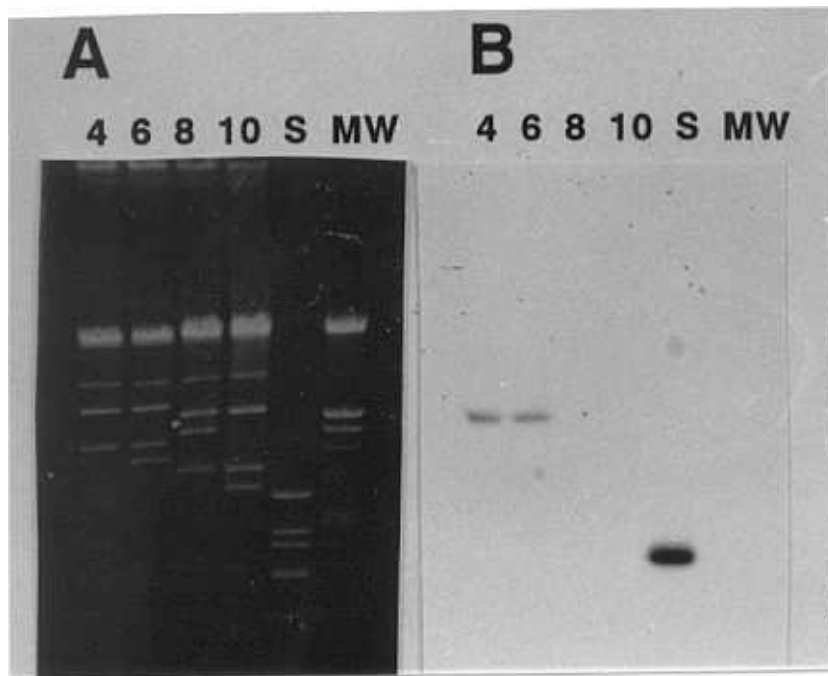


Fig. 12. Hibridación de digestiones EcoRI-Sall de los clones $\lambda 4$, $\lambda 6$, $\lambda 8$, $\lambda 10$ y el control $\lambda K6$ (A) con una sonda conteniendo unas 200 pb de secuencia de la zona final de la α -hélice de la K6. Sólo los clones que llevan esta zona de la α -hélice resultan positivos (B).

TYRKLLEGE (Hanukoglu y Fuchs, 1983; Albers y Fuchs, 1987), además de todo el extremo carboxiterminal y la zona 3' no traducida hasta la señal de poliadenilación. Esta sonda se hibridó frente a los cuatro clones genómicos $\lambda 4$, $\lambda 6$, $\lambda 8$ y $\lambda 10$, realizándose los lavados a 60°C en 0.5% SDS y 1x SSC. Se comprobó que no hibridaba ningún fragmento adicional (fig. 12), lo que indica que este gen no se haya en las cercanías de ninguno otro gen de queratinas.

```
GGA CAA GTC AAC ATCTGTAAGTACTTCCACCTGCCCCCATCCCCTGTCCTTGTGTCCCTTGAC
Gly Gln Val Asn
TGGATTGTGTGGCAGAGTGAGCTCACCATCCTCGATACTGACTTGTCCCTTTGACTCAAGCGTGTCA
GTCATGATCTTGTAGCATTGTGATCTGTGCATTGTGTGTCAGCGTCTGACGTGCTACG.....TGCAT
GCCCTGCAGGTCCGACTCTAGAGG ATC ccc GTG GTC CAG TCC ACT GTC TCT GGT GGC
Ile Pro Val Val Gln Ser Thr Val Ser Gly Gly
TAT GGT GGT GCT GGT GGC TAT GGT GGT GCC AGC GGT CTC GGC AGT GGC TTA
Tyr Gly Gly Ala Gly Gly Tyr Gly Gly Ala Ser Gly Leu Gly Ser Gly Leu
GGC GTG AGT GGA GGA AGT GGC TAC TCC TAC AGC AGC GGT CAC AGC CTT GGA
Gly Val Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Ser Tyr Ser Ser Gly His Ser Leu Gly
GGT GGC TTC AGT TCT GGC AGT GGC AGA GCC ATA GGA TGT GGC TTT GGC TCC
Gly Gly Phe Ser Ser Gly Ser Gly Arg Ala Ile Gly Cys Gly Phe Gly Ser
TCT GGG GGC AGC AGT TCC ACC ATC AAA TAC ACC ACC ACC ACC TCC TCC TCC
Ser Gly Gly Ser Ser Ser Thr Ile Lys Tyr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser
AGC AGG AAG GGC TAC AAG CAC TGA AGTCTGTGTCATGGGCCAAGCTCCCACAATGTCTCAG
Ser Arg Lys Gly Tyr Lys His ***
GCTCCCTCTGTTGCTTTGCACTCTCCTCCATTGCTTTATCTTTCTTCTGCTTCCTTTTCTTACTCCATTGA
ATTAAACTGGAAGCTCTCCGTGAGTGTCTCGAGTCTCCTCTCTCCCAAACCTCTTGCAACTGAGCT
TCCATTGTTCCACCATTGGAAGGTTGTTACTTGGGTCCTAGTCCAGACAGGTAATCCCACTTACTTTCT
ACTGGCCCAGGAGATCCCACTTACTTTCTACTGGCCAGGAGATCCCATCTCAGATGTTGTGTTCCCTCC
CTTGCAAGTGTATTGTGAAACCACAAGTGACTAGTTCTATGATGTACAGGATTGTACCCTGTGAGTGCAT
GTGCCTCATGCATGCATTTGCTCACTGTATTGCTGAAATGAAAGCAGAGGTATCATATAGATGTGTGGT
TTCACATAGCCATTTCTTTGTCAAAAATGGTTCCTGAGGTTTTCACGTGACAGATGAAGCATACTTCTC
AGGCATGAAGCACACTCCCCACCCCATATGCCTCACTCGGTTCTGTAGAGAAGTTCACAAACAGCA
GCTTGGGATACTGATAATCAGCTTTCTCTCACAGATACAATTTAATCCAAATGTTTGGCAAGTGTAAATG
GGAGGACTCTGGTCCAGCATCACGTATACTCTGCTTTTATTGTTGGGGCAAGTGTAACTCAATTAGT
CTCTCCTCCTAAGACCACCACTCAACCACACTCAAGGTCAAGTCTTAATGTTTCAATTTGAGAATT
ATGTTTGTGGCCCATCAGAGCAGAACAACATTTAGCAATTAATAGGATATTTGATTTTTATTTAGAGT
TAACTTCCCTAACAACTTGCCCTGAGAAAGTATGATCAAGGATAATTAAGCGTATGTACTTTTGA
ATCCAAAATTCTA
```

Fig. 13. Secuencia de la parte 3' del gen de la queratina bovina K6c. Las zonas que codifican exones están traducidas. Los únicos tres cambios en la zona codificante con respecto a los genes de la queratina K6 y K6 se muestran en minúscula. La señal de poliadenilación está subrayada.*

3.1.2.6. Secuenciación del extremo 3'

Abordamos el estudio de la secuencia del plásmido p $\lambda 4$ (7 kb) por incluir éste tanto la zona 5' como la 3' codificante (ver fig. 11). Para ello, varios fragmentos de restricción de este plásmido fueron subclonados en el vector M13 y secuenciados por el método de Sanger y cols. (1977). Algunos fragmentos demasiado largos para secuenciados de una sola vez fueron parcialmente deletionados utilizando la exonucleasa Bal31 y reclonados de nuevo en M13 tras realizar un *rellenado de extremos* con la polimerasa de Klenow.

En la figura 13 se muestra la secuencia del fragmento PvuII-EcoRI del clon p $\lambda 4$, que

contiene el extremo 3' del gen. Se secuenciaron en total 1.5 kb, de las cuales 0.5 estaban por detrás de la señal de poliadenilación. El resto de la zona secuenciada incluye un fragmento del penúltimo exón, el último intrón y el último exón completos y toda la zona 3' no traducida. La figura 14 muestra un esquema de la zona secuenciada, junto con los clones que se utilizaron para secuenciarla y la extensión y orientación de cada lectura.

La secuencia de la zona 3' del clon pλ4 reveló que este clon no pertenece al gen de la queratina BK6, sino que codifica una nueva queratina, distinta de la BK6 y BK6*, que hemos llamado BK6c. Del análisis de las secuencias se observa que la zona 3' codificante de la BK6c muestra una casi total homología de secuencia con la correspondientes zonas del cDNA de la queratina BK6 (Jorcano y cols., 1984) y el 3' del gen de la BK6* (Blessing y cols., 1987), encontrándose sólo tres cambios en todo el último exón, de los cuales solo el primero es no conservativo (Cys→Pro), lo que supone un 99% de identidad. Sin embargo, en la zona 3' no traducida los tres clones son diferentes entre sí (fig. 15), habiendo aproximadamente un 80% de homología entre cada dos de ellos. Debido a la muy alta variabilidad de esta zona, la similitud hallada en esta secuencia en los tres genes sugiere que codifican proteínas extremadamente similares.

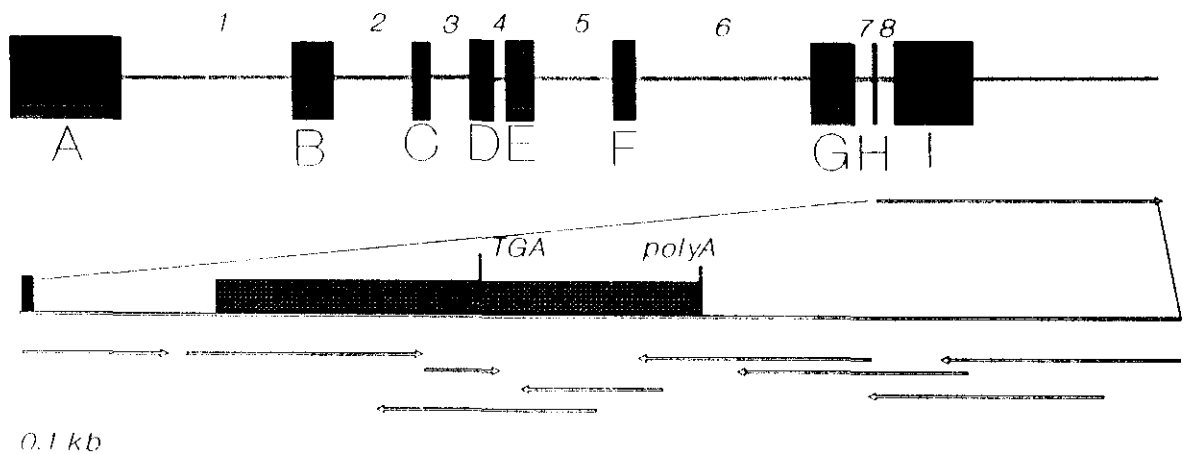


Fig. 14. Zona secuenciada y estrategia de secuencia del extremo 3' del gen de la queratina K6c.

3.1.2.7. Expresión de K6c

Para determinar la posibilidad de que este clon codificase un pseudogen, decidimos comprobar su expresión mediante análisis de RNA por *Northern blot*. Para ello, y puesto que los tres genes presentan una altísima homología, si no similaridad, en las zonas codificantes, decidimos preparar sondas que abarcasen la región 3' no traducida del mRNA, única con un $\approx 80\%$ de homología.

Para la obtención de la sonda específica del gen BK6c, se partió de una de las deleciones utilizadas para la secuencia del extremo 3' (ver fig. 14). Este clon se extiende desde cerca del final de la zona 3' no traducida en dirección 5', hasta el sitio *PvuII*. El inserto de este gen fue separado del vector M13 en que se hallaba y reclonado en el

```

consenso TGAAGTCCTGTCATGGGC-CAAGCTCCCACAATGTCTCAGGCTCCCTCT
BK6          T
BK6*         T
BK6c         -

consenso ---G-TT---C-C--TCTCCTC-A-TT--TT--T-T-T-CT-CT--C--
BK6  CCA T  CAC A CC          T G GC CC A C T A  CT TT
BK6* CCA T  CAC A CC          C A AT CC C C T G  CC TT
BK6c GTT C  TG- A --          C - GC TA C T C G  TC --

consenso C-T-TCTTACT---TT-A-TTA-AACTG-A-----T--GTG-----C-
BK6  A C          --- A T G          A GTTAT GA ----- C
BK6* T C          CC- G G G          A GTTAC TA ----- C
BK6c T T          CCA G A A          G AGCTC CC  AGTGTC T

consenso ----TC--C-CTCT-CCAA-ACCTG-T-----TGAG-TTCC--TGTTCA
BK6  TTCA -T C  G  T          C CTACC  C  AC
BK6* CTTA TT T  C  A          T ACCCA  G  CT
BK6c CGAG TC T  C  A          T GCAAC  C  AT

consenso -CATTGGAA--T-----TT--GTCCTA-TCCA--ACAGGG-AATCC--
BK6  G          -A TAACTA TG          G  -G          -  TC
BK6* C          GG CACCTC GA          C  TA          C  CA
BK6c G          GG TGTTAC GG          G  -G          T  CA

consenso CTT-CTTTC-ACTGGCCCAGGA--TCCC-TCTCAGA--TGTT-TG-TCC
BK6  G  C          AG  G          GG  G  A
BK6* G  C          GA  A          GG  A  T
BK6c A  T          GA  A          --  G  T

consenso TCC-TT-CAGTG-ATT---AAAG-A-AAGTGACT-GTTCT-TGATGTAC
BK6  A  T  -  GTG  C  G          G  T
BK6* C  G  -  ACT  T  C          G  T
BK6c C  G  T  GTG  C  C          A  A

consenso AGG-T-----TGT-----AT-----T--TGT-T-C--TGC--TTT-
BK6  G -----C ----- CTTCG GT  T C TC  TC  G
BK6* G -----T ----- CCCTG GG  T C TC  TC  T
BK6c A TCTACTC  GAGTGC  GTGCC CA  A G A-  A-  G

consenso CTC-----AC-TGTATTGCT-AAAT-AAAGC-GAT-TAT-ATAT
BK6  ----- T          -  -          T  T  C
BK6* TTTTAGCA T          -  -          A  T  A
BK6c ----- -          G  G          A  G  C

```

Fig. 15. Comparación de las secuencias de las zonas 3' no traducidas de los genes de las queratinas bovinas BK6, BK6 y BK6c. Cuando existe consenso, este se muestra en la hilera superior. La señal de poliadenilación se muestra en negrita.*

plásmido pGEM1, para obtener un *polylinker* completo. De aquí fue de nuevo extraído, purificado y digerido con la endonucleasa de restricción *AluI*. Se purificó de agarosa una banda de 140 pb, que se reclonó en el vector pUC18 digerido con *EcoRI* y *SmaI*. Se comprobó mediante secuencia que uno de los clones, que recibió el nombre de K6c-3', portaba el fragmento correcto. La sonda cubría una extensión de 150 pb en la parte final de la zona 3' no traducida, con una divergencia del 17% con cada uno de los otros dos genes, BK6 y BK6* (ver fig. 15).

Con esta sonda específica para el gen de la queratina BK6c y otras dos sondas, K6-3' y K6*-3' específicas respectivamente para los genes BK6 y BK6* (Blessing y cols, 1987 y fig. 15) se realizó una hibridación en *slot blot* con el RNA total de hocico y lengua de vaca (tejidos donde se sabe que se expresan las queratinas BK6 y BK6*), y de piel de glándula mamaria, carente de estas queratinas. Igualmente se ensayó con RNA de dos líneas celulares derivadas de epitelio de glándula mamaria bovina: BMGE-H, que no expresa estas queratinas, y BMGE+H, que sí las expresa (Schmid y cols., 1983; Cooper y Sun, 1986; Blessing y cols., 1987). Se cargaron diversas cantidades (1, 5 y 20 μg) de RNA total de cada línea y 10 μg de cada tejido, con objeto de comprobar la intensidad de la hibridación, y rRNA (20 μg) como control negativo. Se hibridó con las sondas marcadas por *nick translation* y se lavó en 0.1X SSC y 0.5% SDS a 65°C. La especificidad de las sondas se comprobó realizando otro *slot blot* paralelo en el que se fijó a la membrana 1 ng de cada sonda, desprovistas de vector para evitar hibridaciones cruzadas.

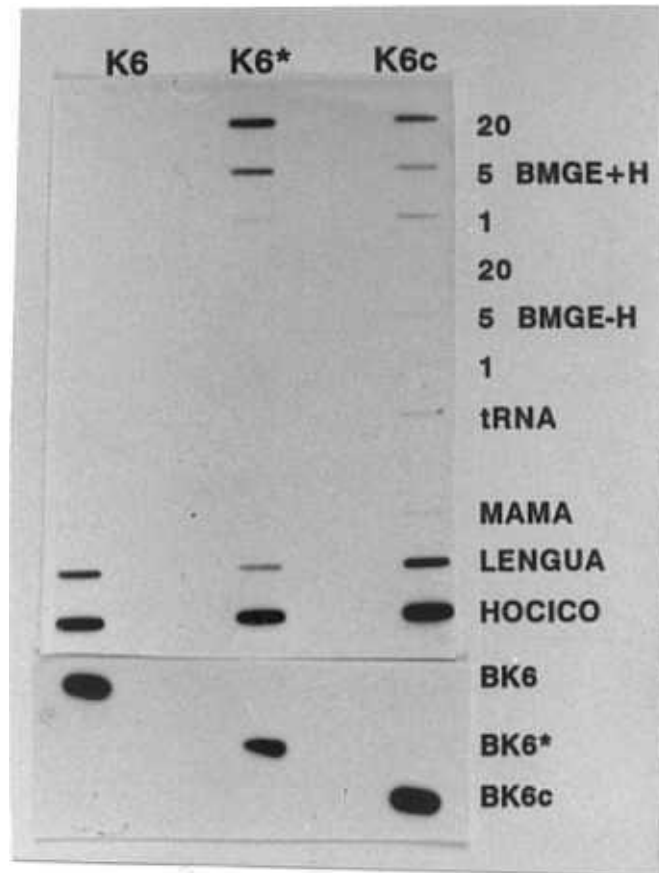


Fig. 16. A). Hibridación de sondas específicas para K6, K6* y K6c con diversas cantidades de RNA de células BMGE+H, BMGE-H y 10 μg de RNA de hocico, lengua o glándula mamaria bovina. Las tres calles inferiores muestran la hibridación de estas sondas entre sí (10 ng cada una).

La figura 16 muestra los resultados: las sondas son en realidad específicas para cada uno de los genes, puesto que ninguna hibrida con las demás en esas condiciones (fig. 16B), y la queratina BK6c, al igual que la BK6 y la BK6*, se expresa en hocico y lengua (fig. 16A), quedando descartada la posibilidad de que BK6c sea un pseudogen. Las tres queratinas se expresan en hocico y lengua en similares proporciones, aunque en lengua la expresión es menos intensa. Sin embargo, en células BMGE+H la queratina K6 no se expresa, y la K6* lo hace con mayor intensidad que la K6c, lo que sugiere que la regulación de estos tres genes se efectúa por un mecanismo diferente.

3.1.2.8. Secuenciación de la zona 5'

Una vez vista la existencia de tres genes diferentes, se planteó el problema de si estos tres genes se podían considerar como tres formas diferentes de la queratina 6 o si el nuevo gen tenía menos relación con los genes de las queratinas BK6 y BK6*, debiéndose considerar entonces como una queratina diferente. A la vista de que los extremos carboxiterminales eran virtualmente idénticos para las tres proteínas abordamos el estudio de la zona 5'-codificante con objeto de determinar la posible semejanza entre ellas, puesto que las zonas N- y C-terminales son las más divergentes en las queratinas (Steinert y Roop, 1988).

Para la secuencia de esta zona se utilizaron los fragmentos *EcoRI-BglIII*, *EcoRI-PvuII* y *PvuII-PvuII* del plásmido pλ6. Todos estos fragmentos hibridan con la parte 5' codificante del gen de la queratina BK6*, y los dos primeros lo hacen con el intrón de la BK6 (Fig. 11, nótese que pλ4 está clonado en *Sall-EcoRI*, mientras que pλ6 lo está en *EcoRI-Sall*, fig. 10). Estos fragmentos se subclonaron en M13 y se hicieron deleciones seriadas de ellos con la exonucleasa Bal31. La figura 17 muestra la estrategia de secuencia de estos clones y las distintas lecturas realizadas.

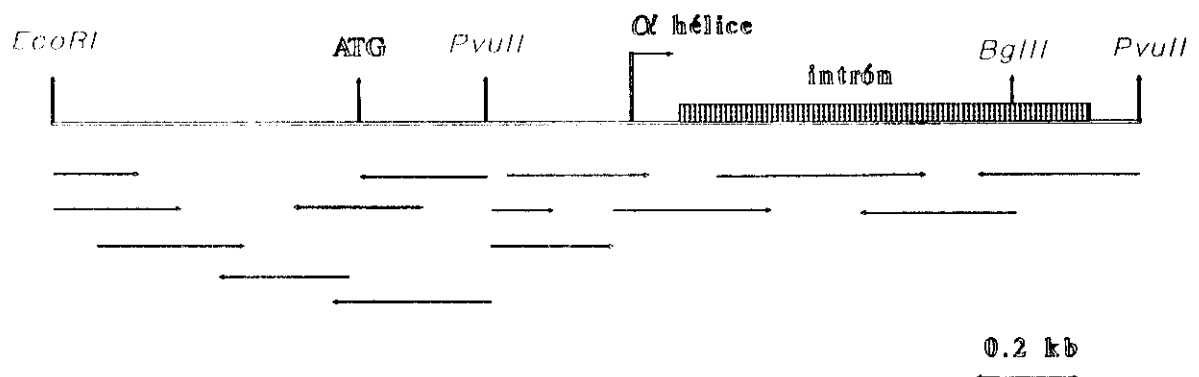


Fig. 17. Estrategia de secuencia del extremo 5' del gen de la K6c. Las flechas indican las distintas lecturas de secuencia que se hicieron de esta zona. La posición del primer intrón y el comienzo de la α -hélice están indicadas.

En total se secuenciaron unas 2000 pb del extremo 5' del gen de la queratina BK6c, entre unos 600 pb de la zona 5' no codificante, el primer exón y el primer intrón al completo, y parte del segundo exón. La secuencia de esta queratina, que se muestra en la figura 18, presenta algunos rasgos notables. No se puede comparar por completo con la BK6, por carecer de datos sobre la secuencia de esta última, pero sí se puede comparar con las correspondientes zonas de la BK6* (Blessing y cols., 1987) y la queratina humana HK6b (Tyner y cols., 1987). La figura 19 muestra la comparación entre las secuencias del primer exón de las queratinas K6* y K6c. Este exón abarca toda la zona aminoterminal y el comienzo de la α -hélice. Se puede observar que las dos proteínas son muy parecidas en esta zona, habiendo entre sus genes sólo seis cambios de base conservativos y cinco no conservativos (96% de identidad). Además merece mención especial la existencia en la K6c

```

1 GAATTCATG AGAGTGTAGA GGATATAAAA CGGATCATGA GAAATTAATT
51 TTTATAAAAT CCAGTGATAG GCATACAGAG ACCCATTTAT ATTGCAAATC
101 TACATACCTA CCTGTGGGAA ATTTTGAGGA AAGCAAAAAA AAAGTCATGT
151 TTAGCTTCTG TAATTAATGA CAAACATAAT AATTATTATT GTAAGAAAAG
201 CTAGGCTATT TTGCTCTCCA GGATTTCTGG CTGGTGGGTG AACACCAGG
251 GCAAATGAGC CTCAGTACAT TTCACACACG AGCATTACAT GGAGAACCTT
301 TGTGTGAGTT GCTGACTAAC TCCAGCTCA GTGAGTTGAG ACTAGTCTTA
351 CTGTACTCAG AGCTGTCAA GCTGGAAGGC AGGAGAAATT TTCCTGACT
401 AAAGGAAACC AAATATGCAA TCTTCACATT TCTAACTTTC TAATAAACCA
451 GATGTGATCT CACTCTTGT AAAGCCTGGC CCTTCCCAAC CTGCAGGCTC
501 ACCTTCCAGG ACTGAGCCCA GCCCATTTTC TCCATATATA AGCTGCTGCT
551 GGGAACTCC TCTTACAGAC CTGCTCCTCT CAGCTCTGCA CTGCAACCCCT
601 CGCTCCTTCC TCAGTCTCTG CTTCTCAGG AACCATGTCT TGCAAATCCA
651 CCGTGAAGAC CAAAGCATC AGCCGCAGGG GCTTCAGTGC CGGCTCAGCC
701 AGAGTCCCTG GGGTGTGCCG CTCTGGCTTC AGCAGCGTGT CCCTGTCCCG
751 CTCCAGGGGC AGTGGCGGCC TCGCTGGAGT GTGTGGAGGA GCTGGCTTTG
801 GCAGCCGCAG CCTGTATGGC CTGGGGGGCT CCAAGAGGAT CTCCATCGCA
851 GGGGGCAGCT GTGCCATCGG TGGTGGATAT GGCGGCAGAA TTGGAGTTGG
901 CTATGGCTTC GGGGGTGGAG CCGGGAGTGG ATTTGGTTTT GGTGCTGGGG
951 CTGGTAGTGG CTTTGGGCTC GGTGGTGGAG CTGGCTTCGG AGGTGGCTTC
1001 GGTGGTCCTG GCTTCCCTGT GTGCCCCCT GGAGGCATCC AAGAGGTCAC
1051 CGTCAACCAG AGTCTCCTGA CTCCCTCAA CCTGCAAATC GACCCACCA
1101 TCCAGCGGGT GAGGACTGAG GAGCGGACAG AGCATAGCCC CATCACAGTT
1151 GAGCAGATCA AGaccctcaa caacaagttt gtctccttca tcgacaaggt
1201 gagctgggag catctgccct agtggggatt gcagagtgcc caagagagcc
1251 aactaagaga cctgttctac cggagggaga ctcgggggag aggagggtgg
1301 gactcaggcg agctctccac tgggatacag gacaggttac atgtggaccc
1351 caggcagaag gtgatggaaa tcatttataa ttactcatgg cccattcct
1401 gccaaaggaaa tagtcacagt tcttgacaat cctgaaggaa agaacaggaa
1451 atgagagaat gcaatgagat ggcttgatct tctggatggt ctaagaagtt
1501 aaaagggtat tgcagtggaa actgcatttg agtcatagat cgatgctgga
1551 tggaggaaag aaagcaaaaa acaaaggagt tgaggaaaca actcaagtat
1601 atatccataa ggactttgta tcagccggat tcatgacta tatgggaaac
1651 aagattaaat tcaatcatta tagaattgga atctaateat tagattataa
1701 acatctgata tccctttaac tgaggcatgt gctttgtaaa agctctgtgc
1751 aataggagaa aatgctatg ataaaatata tttgtgcttg ttcttgteac
1801 gaggaagaca gaagggttga aagtcactga ctgacagtct ccataagtga
1851 gaggaggaac atctgacagc tccttgggaa acttggccat gagatctgtg
1901 tgggtgtaaag ctaaagagtc aggggagcag aactgtcagc ctctgtacag
1951 gctctggagc agcgcagcac caccagacca ccagatcagc ctgggacttg
2001 tcaactcaca gataaccatc ttgttggctg cagGTCCGAT TCCTGGAGCA
2051 GCAGAACAAG GTCGTGGACA CCAAGTGGAC CTTGCTGCAG GAGCAGGGCA
2101 CCAGGACTGT GAGG

```

Fig. 18. Secuencia parcial de nucleótidos del gen de la queratina BK6c. El inicio de traducción está en negrita y subrayado, y el intrón se representa en minúsculas. El codon subrayado indica el inicio de la α -hélice.

pero no en la K6* de una duplicación de cuatro aminoácidos (Gly-Phe-Gly-Gly) cerca del inicio de la α -hélice. La comparación entre los genes de las queratinas bovinas K6* y K6c acaba aquí, pues no se conoce el resto de la secuencia del gen de la K6*.

```

MetSerCysLysSerThrValLysThrGlnSerIleSerArgArgGlyPhe
BK6c 635 ATGTCTTGCAAATCCACCGTGAAGACCCAAAGCATCAGCCGCAGGGGCTT 684
      |||
BK6* 672 ATGTCTTACAAATCCACTGTGAAGACCCAAAGCATCAGCCGTAAAGGCTT 721
      Tyr                                Lys

SerAlaGlySerAlaArgValProGlyValCysArgSerGlyPheSer
685 CAGTGCCGGCTCAGCCAGAGTCCCTGGGGTGTGCCGCTCTGGCTTCAGCA 734
      |||
722 CAGTGCCGGCTCAGCCAGAGTCCCTGGGGTGTGCCGCTCTGGCTTCAGCA 771
      Leu

SerValSerLeuSerArgSerArgGlySerGlyGlyLeuAlaGlyValCys
735 GCGTGTCCCTGTCCCGCTCCAGGGGCAGTGGCGGCCTCGCTGGAGTGTGT 784
      |||
772 GCGTGTCCCTGTCCCGCTCCAGGGGCAGCGCGGCCTCGCTGGAGTGTGT 821

GlyGlyAlaGlyPheGlySerArgSerLeuTyrGlyLeuGlyGlySerLys
785 GGAGGAGCTGGCTTTGGCAGCCGCAGCCTGTATGGCCTGGGGGGCTCCAA 834
      |||
822 GGAGGAGCTGGCTTTGGCAGCCGCAGCCTCTATGGCCTGGGGGGCTCCAA 871

ArgIleSerIleAlaGlyGlySerCysAlaIleGlyGlyGlyThrGly
835 GAGGATCTCCATCGCAGGGGGCAGCTGTGCCATCGGTGGTGGATATGGCG 884
      |||
872 GAGGATCTCCATCGCAGGGGGCAGCTGTGCCATCGGTGGTGGATATGGCG 921

GlyArgIleGlyValGlyTyrGlyPheGlyGlyGlyAlaGlySerGlyPhe
885 GCAGAATTGGAGTTGGCTATGGCTTCGGGGGTGGAGCCGGAGTGGATTT 934
      |||
922 GCAGAATTGGAGTTGGCTATGGCTTCGGAGGTGGAGTCGGGAGTGGATTT 971
      Val

GlyPheGlyAlaGlyAlaGlySerGlyPheGlyLeuGlyGlyGlyAlaGly
935 GGTTTTGGTGCTGGGGCTGGTAGTGGCTTTGGGCTCGGTGGTGGAGCTGG 984
      |||
972 GGTTTTGGTGCTGGGGCTGGTAGTGGCTTTGGGCTCGGTGGTGGAGCT.. 1018

PheGlyGlyGlyPheGlyGlyProGlyPheProValCysProProGly
985 CTTCCGAGGTGGCTTCGGTGGTCCTGGCTCCCTGTGTGCCCCCTGGAG 1034
      |||
1019 .....GGCTTCGGTGGTCCTAGCTTCCTGTGTGCC 1050
      Ser

GlyIleGlnGluValThrValAsnGlnSerLeuLeuThrProLeuAsnLeu
1035 GCATCCAAGAGGTCACCGTCAACCAGAGTCTCCTGACTCCCCTCAACCTG 1084
      ↓
GlnIleAspProThrIleGlnArgValArgThrGluGluArgThrGluHis
1085 CAAATCGACCCACCATCCAGCGGGTGGAGTCTGAGGAGCGGACAGAGCA 1134

SerProIleThrValGluGlnIleLysThrLeuAsnAsnLysPheVal
1135 TAGCCCCATCACAGTTGAGCAGATCAAGACCCTCAACAACAAGTTTGTCT 1184

SerPheIleAspLys
1185 CCTTCATCGACAAGgt... 1201

```

Fig. 19. Secuencia de la zona codificante del primer exón del gen de la queratina BK6c (líneas superiores) y su comparación con la zona equivalente de la BK6* para la que existe secuencia (líneas inferiores). Las concordancias se indican por una línea vertical. Donde existen cambios no conservativos se ha escrito también el aminoácido correspondiente a la BK6*. El inicio de la α -hélice está indicado con una flecha.

La semejanza con la correspondiente queratina humana es menor. Las zonas 5' codificantes de los genes de las queratinas HK6b y BK6c presentan una identidad del orden del 78%. La figura 20 muestra la comparación entre las secuencias aminoterminales de las diferentes K6 conocidas por ahora. En la BK6c se puede apreciar la existencia de 8 aa en la frontera entre el extremo aminoterminal y el inicio de la α -hélice que no están presentes en la secuencia de la K6b humana (Tyner y Fuchs, 1985). Sin embargo, en el lugar ocupado por la duplicación de cuatro aminoácidos Gly-Phe-Gly-Gly encontrada en el gen de la BK6* aparece en el gen de la HK6b una secuencia Ala-Leu-Leu-Cys, mientras que, como hemos visto, en el caso de la BK6* bovina esta secuencia no se halla presente. El resto de las diferencias (muchas de ellas conservativas) entre HK6B, BK6* y BK6c están dispersas por toda la secuencia, si bien parece haber algunas zonas en las que estas diferencias se acumulan, como son los 38 primeros aa (8 de los 12 primeros aa son diferentes entre la queratina humana y las bovinas), y los aa 79 a 96. Además, en todos los casos (salvo uno) en que hay una diferencia de secuencia entre BK6* y BK6c, la secuencia de ésta última es igual a la de la K6b humana, lo cual sugiere que la HK6b humana tiene más relación con la BK6c bovina que con la BK6*.

BK6*	MSYKST-VKTQSI SRKGF SAGSARVLGVCRSGFSSVLSRSRGSGLAGV	49
BK6c	MSCKST-VKTQSI SRRGF SAGSARVPGVCRSGFSSVLSRSRGSGLAGV	49
HK6b	MASTTTIRSHSS RRGF SASSARLPGVSRSGFSSI SVSRRGSGLGGA	50
BK6*	CGGAGFGSRS LYGLGGSKRISIAGGSCAIGGGTGGRIGVGYFGGGVGS	99
BK6c	CGGAGFGSRS LYGLGGSKRISIAGGSCAIGGGTGGRIGVGYFGGGAGSG	99
HK6b	CGGAGFGSRS LYGLGGSKRISIGGGSCAISGGYGSRAGAGYGF-GGAGSG	99
BK6*	FGFGAGAGSG FGLGGGA----GFGGSPFPVC	126
BK6c	FGFGAGAGSG FGLGGGAGFGGGFGGPGFPVCPGGIQEVTVNQSLTPLN	149
HK6b	FGFGGAGIG FGLGGGPALLC-FGGPGFPVCPGGIQEVTVNQSLTPLN	149
	↓	
BK6c	LQIDPTIQRV RTQQRTEHSPITVEQIKTLNPKFVSFIDK	187
HK6b	LQIDPAIQRI GAQQR-----EQIKTLNPKFASFIDK	179

Fig. 20. Comparación de las secuencias de proteínas de las zonas aminoterminales de las queratinas BK6 (Blessing y cols., 1987), HK6b (Tyner y cols., 1985) y BK6c. Cuando las tres son iguales, se muestran en negrita. La flecha sobre la última fila marca el inicio de la α -hélice.*

3.1.2.9. Secuenciación y comparación de los intrones.

La comparación entre el primer intrón del gen de la queratina BK6c y su equivalente de la BK6 mostró una muy alta homología de secuencia entre ellos (fig. 21) y explicó por qué se obtuvieron clones de la BK6c con una sonda para la BK6. Previsiblemente el primer intrón del gen de la BK6* también está conservado, ya que también fue identificado un clon perteneciente a este gen mediante el uso de esta sonda. Sin embargo, al desconocerse su secuencia no se puede especular sobre el grado de conservación de éste.

En este trabajo se ha determinado toda la secuencia de este primer intrón en la queratina BK6c y gran parte en la BK6. En las zonas en la que la comparación es posible (unas 600 bases, casi todo el intrón menos el dominio central), la homología es de un 90%,

superior a la de la zona 3' no traducida (80%), y ligeramente inferior a la de la zona codificante secuenciada, lo que sugiere una importante función para este intrón. La comparación entre ambos se muestra en la figura 21. La búsqueda de motivos de unión a proteínas reguladoras permitió encontrar algunas posibles secuencias de unión a la familia de receptores de esteroides, hormonas tiroideas y RA (no se muestra), así como algunos sitios semejantes a secuencias de reconocimiento para AP-1 y AP-2. Curiosamente, todos los sitios AP-2 y AP-1 salvo uno de estos últimos sufren alguna discordancia en su secuencia entre los dos genes. La importancia de dichos sitios en la regulación de la expresión de estos genes está por determinar, aunque se sabe que en el gen de la queratina 18 existe un *enhancer* con un sitio de reconocimiento AP-1 (Oshima y cols., 1990).

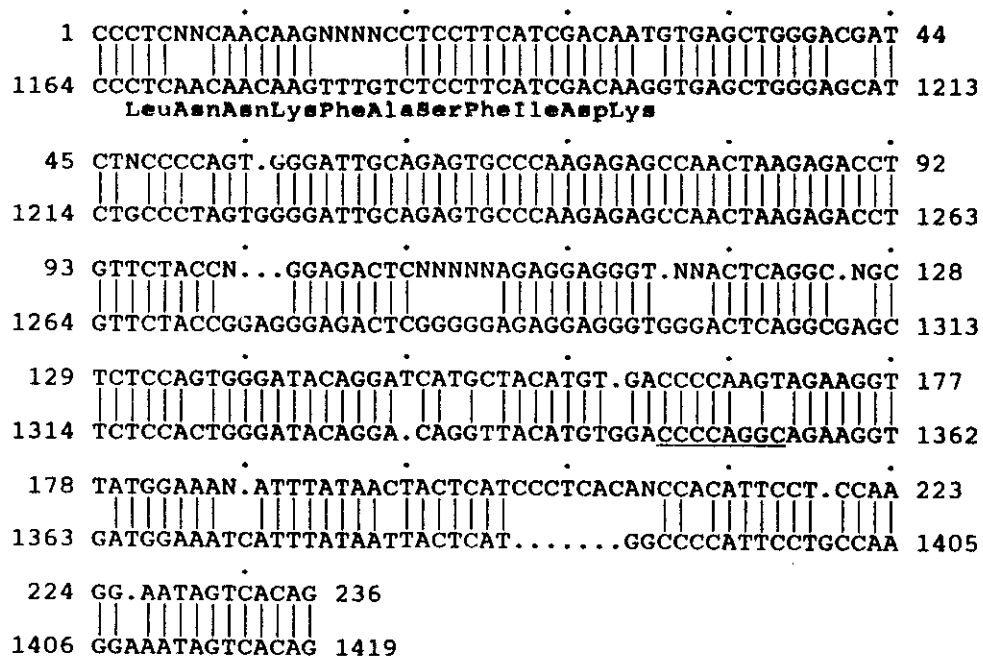


Fig 21. Comparación del primer intrón de los genes de las queratinas BK6 (arriba) y BK6c (abajo). En algunos casos en que no se ha podido determinar la secuencia con seguridad se pone una N. La zona codificante ha sido traducida para la BK6c. Las mitades 5' de los intrones se muestran en esta página, y las 3' en la siguiente. Se subrayan los sitios con homología con las secuencias consenso para AP-1 (TCAGTCA) y AP-2 (GCCCAGGC). Nótese que en algunos casos estos elementos están invertidos, es decir que el consenso estaría en la cadena complementaria, que no se muestra. La flecha indica el comienzo del espaciador 1A. La numeración del gen K6c es de acuerdo con la figura 13, la del gen K6 es arbitraria.

BK6 274 ATCATTAGATTATAA . CTCTGATATCCCTTTAACTGA . . . ATGTGATT . 317
 BK6c 1686 ATCATTAGATTATAAACATCTGATATCCCTTTAACTGAGGCATGTGCTTT 1735
 318 .GTAAAGCTCTGTGCAATAGGAGAAAAATGCTATGAT . AAATACA . TTGT 364
 1736 GTAAAAGCTCTGTGCAATAGGAGAAAAATGCTATGATAAAATATATTTGT 1785
 365 GCTTGTTCTTGTTCACGAGGAAAGACAGGAAGGGTTGAAGTCACTGACTGA 414
 1786 GCTTGTTCTTGTTCACGAGG . AAGACAGAAGGGTTGAAAGTCACTGACTGA 1834
 415 CAGTCTCCATAAGTGAGAGGGAGGGAACATCTGACAGCTCCTTGGGGAAA 464
 1835 CAGTCTCCATAAGTGAGAGG . . AGGAACATCTGACAGCTCCTT . GGGAAA 1881
 465 CTTGGCCATGAGATCTGTGTGGTGTAAAGCTAAACAGTCAGGGGAGCAGA 514
 1882 CTTGGCCATGAGATCTGTGTGGTGTAAAGCTAAAGAGTCAGGGGAGCAGA 1931
 515 ACTGTCAGCCTCTGTACAGGCTCTGGAGCAGCCAGCACCACCAGACCAC 564
 1932 ACTGTCAGCCTCTGTACAGGCTCTGGAGCAGCGCAGCACCACCAGACCAC 1981
 565 CAGATCAGCCTGGGGACTTGTCAACTCACAGATAACCATCTTGTTCCT 614
 1982 CAGATCAGCCT . GGGACTTGTCAACTCACAGATAACCATCTTGTGGCTG 2030

 ValArgPheLeuGluGlnGlnAsnLysValLeuAspAsnLysTrpThr
 615 GCAGTCCGATTCCCTAGAGCAGCAGAACAAGGTCCTGGACAACAAGTGGAC 664
 2031 CAGGTCCGATTCCCTGGAGCAGCAGAACAAGGTCGTGGACACCAAGTGGAC 2080
 Leu Val Thr
 ↓
 LeuLeuGlnGluHisGlyThrArgThrValArgGlnAsnLeuGluPro
 665 CTTGCTGCAGGAGCACGGCACCAGGACTGTGAGGCAGAACCTGGAGCCTT 714
 2081 CTTGCTGCAGGAGCAGGGCACCAGGACTGTGAGG 2114
 Gln

 LeuPheGluGlnTyrIleAsnAsnLeuArgGluGln
 715 TGTTTCGAGCAGTACATCAACAACCTCAGGAGACAG 749

Continuación de la figura 21 (ver página anterior).

3.1.3. ANALISIS DEL PROMOTOR DE K6c

3.1.3.1. Preparación de los clones.

Como siguiente paso, nos propusimos caracterizar el promotor de la queratina K6c con objeto de determinar en un principio las zonas funcionales de éste y comprobar posteriormente si la regulación de la expresión de los dos genes, BK6* y BK6c, se efectuaba por el mismo mecanismo, es decir, si poseían secuencias reguladoras similares que respondiesen a los mismos factores de transcripción.

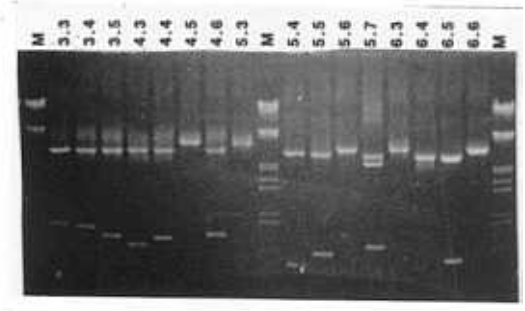
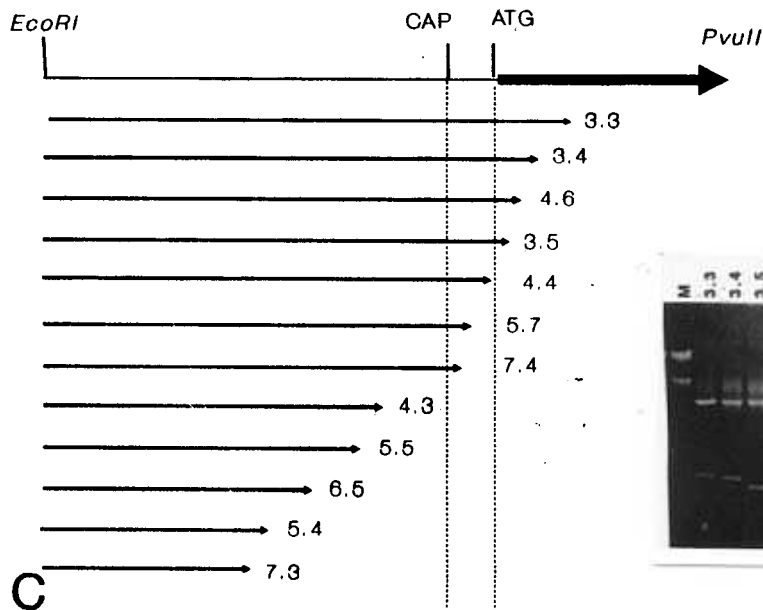
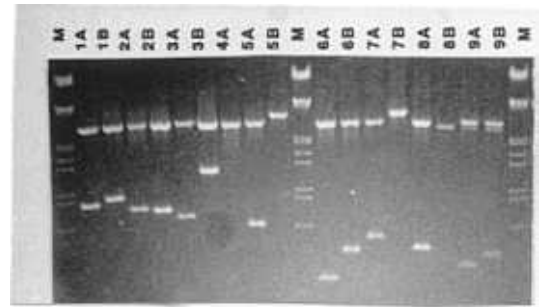
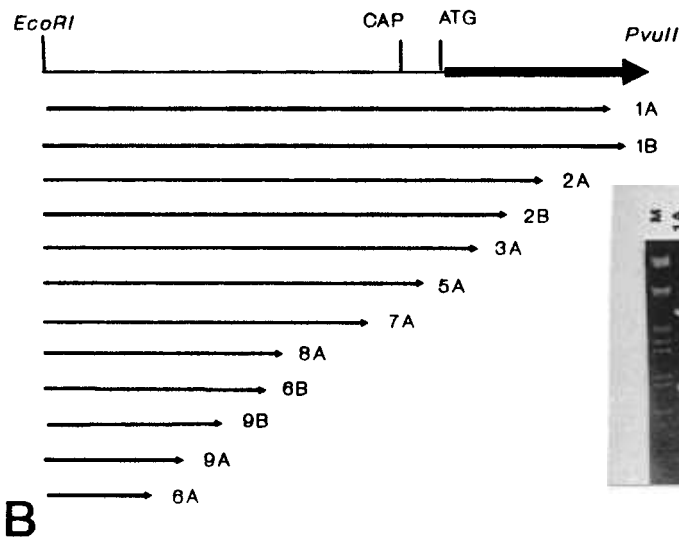
El estudio se realizó a partir del clon genómico $\lambda 6$, que poseía la mayor parte del gen de la BK6c y unas 9 kb de la secuencia en 5' (ver fig. 10), conteniendo presuntamente los elementos reguladores del gen. La estrategia adoptada consistió en acoplar diversos fragmentos de la secuencia 5' del gen de la K6c al vector pBLCAT3 (Luckow y Schütz, 1987) conteniendo el gen de la cloramfenicol acetil transferasa (CAT) y comprobar posteriormente la capacidad de estos fragmentos para actuar como promotor, dirigiendo la expresión de este gen CAT en células eucarióticas (Gorman y cols, 1982).

Debido al gran tamaño de la zona 5' de este gen (aproximadamente 9 Kb) al igual que a la inexistencia de ningún sitio de restricción útil en la zona cercana al punto de inicio de la transcripción que nos permitiese separar el promotor de la secuencia codificante, se decidió realizar las construcciones para los ensayos de CAT en dos fases:

- 1.- Utilización de las ≈ 600 pb de secuencia conocida del promotor proximal para obtener un fragmento de DNA que se extendiese hasta algún punto cercano al inicio de la transcripción.
- 2.- Acoplamiento de este fragmento al resto de secuencia correspondiente a la zona en 5' más distal.

3.1.3.1.1 Obtención del promotor proximal

Para la obtención de un fragmento de promotor proximal que se extendiese justo hasta el inicio de transcripción se decidió realizar deleciones parciales con las exonucleasas ExoIII y S1. Se partió de un subclon (procedente del clon $\lambda 6$) que recibió el nombre de K6cEP y que contenía un fragmento *EcoRI-PvuII* de aproximadamente 1 kb (ver figs. 10 y 11). En esta última se representa el clon $\lambda 4$, que es solapante con el clon $\lambda 6$). Este fragmento incluía ≈ 600 pb de secuencia 5' inmediatamente adyacente a la zona codificante del gen (incluyendo secuencias homólogas a la TATA *box*) y los primeros 250 pb de la zona codificante. La figura 22A muestra la estructura del inserto de este clon y los sitios de corte *BamHI* (sensible a la digestión con ExoIII) y *SphI* (protegido) necesarios para proceder a las deleciones. Se determinó primeramente que la velocidad de digestión de la enzima ExoIII para el DNA que estábamos utilizando era de ≈ 35 nucleótidos/minuto para una concentración de NaCl de 50 mM (esta velocidad varía según las características del DNA y la concentración de NaCl). Así pues, se preparó la reacción y se tomaron 20 muestras en total a diferentes tiempos en el intervalo que va desde los 2' 30'' a los 30'. Tras ser digeridas e inactivadas, estas alícuotas fueron religadas y transformadas en la estirpe



D.
 ACCTTCCAGG ACTGAGCCCA GCCCATT TTC TCCATATATA AGCTGCTGCT
 GGAAGCTCC TCTTACAGAC CTGCTCCTCT CAGCTCTGCA CTGCACCCCT
 CGCTCCTTCC TCAGTCTCTG CTTCTTCAGG AAC catgtcttgcaatcc

bacteriana *E. coli* JM109. Se preparó DNA de dos colonias de cada placa positiva y se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII* para comprobar el tamaño de

(PAGINA ANTERIOR) FIG. 22. Preparación de la parte 5' no codificante del gen de la BK6c. El proceso se describe exhaustivamente en el texto. A). El clon K6cEP, que contiene parte de secuencia 5' del gen se digirió con las enzimas BamHI y SphI y se realizaron deleciones con ExoIII y S1, para eliminar la zona codificante (indicada por la flecha gruesa). B). Extensión de algunas deleciones de este clon a distintos lapsos de tiempo, entre 2 y 30'. A la derecha se muestra la fotografía de la digestión EcoRI-HindIII, y a la izquierda su extensión relativa. C). Digestión de otros clones pertenecientes a las deleciones 4 a 7. D). Secuencia del clon 4.4, elegido para acoplar al gen CAT. La secuencia en mayúsculas muestra la extensión de la deleción, la de la derecha (en minúsculas) indica la continuación de la secuencia de la BK6c. La TATA box y el codon de inicio de traducción están en **negrita**.

las deleciones en un gel de agarosa (Fig. 22B). Se seleccionaron las placas cuyas deleciones tenían un tamaño similar al deseado (deleciones 3 a 7, entre 6 y 9 minutos de digestión). Se preparó más DNA de otras colonias procedentes de estas placas positivas seleccionadas, y se cortó y midió su tamaño como antes (fig. 22C). Aquellas cuyo tamaño estaba comprendido entre la hipotética señal de *capping* (determinada según comparación con la secuencia del gen de la BK6*) y el inicio de traducción fueron secuenciadas por una variante del método de Sanger (Kraft et al, 1988). La deleción 4.4, que comprendía justo hasta un nucleótido antes del inicio de traducción (fig. 22D), fue seleccionada para el trabajo posterior.

3.1.3.1.2 Preparación del promotor proximal

El siguiente paso consistió en el acoplamiento de esta zona 5' proximal no codificante del gen de la BK6c al plásmido pBLCAT3. Idealmente este clonaje se debería hacer en el sitio del *polylinker* más cercano al inicio del gen CAT, con objeto de a) no crear estructuras secundarias que pudieran interferir con la transcripción y b) dejar la mayor cantidad de sitios de clonaje libres en el extremo opuesto del *polylinker*, lo que permitiría posteriormente incluir una mayor variedad de fragmentos de DNA para ensayar su capacidad activadora.

Como la deleción dejó disponible solamente un sitio *HindIII* (el más alejado del gen CAT en el plásmido pBLCAT3), para subclonar este fragmento más cerca del gen se procedió a digerir el clon 4.4 con *HindIII* y rellenarlo con la polimerasa de Klenow, de forma que quedase un extremo romo, al cual posteriormente se ligó un *linker BamHI* previamente fosforilado. Tras precipitarlo con perclorato para evitar el exceso de *linker* no ligado se cortó el plásmido con *BamHI* (extremo 5') y *EcoRI* (extremo 3'), y se clonó en el vector pUC18. Finalmente, la secuencia quedó así:

(original) GGAACCATG...
 (final) ...GGAACCACGGATCC/*polylinker*

linker BamHI

BamHI es el tercer sitio de restricción, por orden de distancia al inicio del gen, en el

polylinker del plásmido pBLCAT3. De esta forma, las construcciones de fragmentos de promotor pueden ser subclonadas en un sitio apropiado de pBLCAT3.

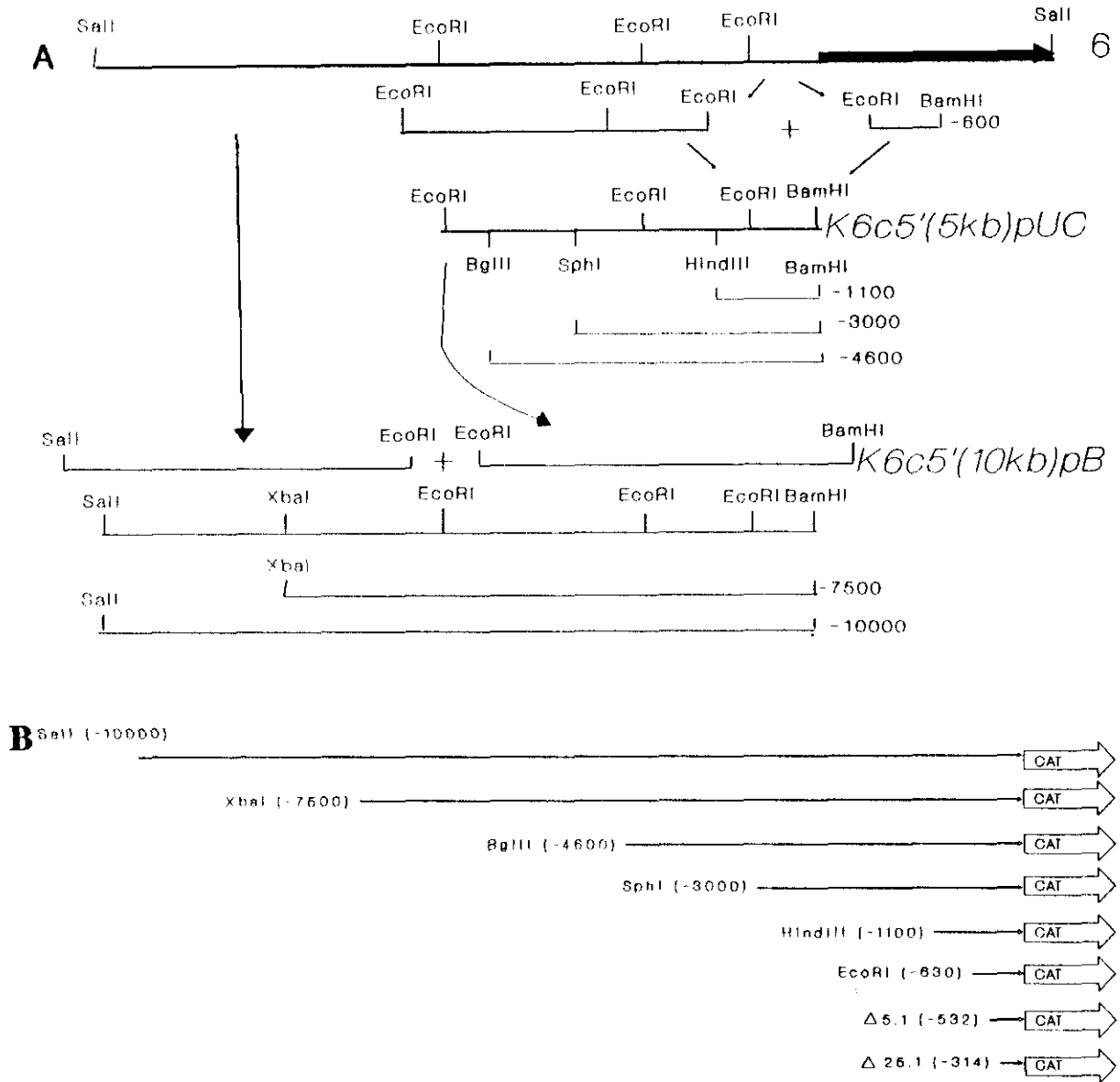


Fig. 23. Esquema del clonaje de las distintas deleciones del promotor del gen de la BK6c. **A)** De arriba a abajo: a partir del clon genómico $\lambda 6$ se prepararon dos plásmidos, conteniendo uno un fragmento EcoRI-EcoRI de 4.3 kb (clon 4.3) y otro la zona proximal (-600, ver fig. 22). Estos dos insertos se ligaron para dar el plásmido K6c5'(5kb)pUC. Posteriormente se clonó el fragmento SalI-EcoRI del clon $\lambda 6$ en Bluescript, y en el se incluyó el inserto del plásmido K6c5'(5kb)pUC para obtener otro plásmido llamado K6c5'(10kb)pBS que contenía 10 kb de secuencia 5' no codificante del gen. A partir de estos dos plásmidos se extrajeron fragmentos seriados de diferente longitud (1.1 a 10 kb) cortando con BamHI y otra enzima de restricción, y estos fragmentos se subclonaron en el vector pBLCAT3 (**B**).

3.1.3.1.3 Preparación de los clones conteniendo la parte distal del promotor.

La figura 22 ilustra esquemáticamente el proceso en el que las parte en 5' restantes fueron religadas al fragmento de 5' anteriormente deletado, con objeto de obtener toda la secuencia del 5' no codificante de este gen, separada de la secuencia codificante. Debido a consideraciones respecto a los sitios de restricción disponibles para efectuar los necesarios clonajes, se prepararon dos plásmidos conteniendo dos cantidades diferentes de zona 5' no codificante. Primeramente se obtuvo por digestiones parciales del clon genómico $\lambda 6$ un fragmento *EcoRI/EcoRI* de 4.3 kb del 5' distal y se subclonó en el plásmido que contenía la secuencia del 5' proximal. Este plásmido que contenía las 5 kb de secuencia en 5' inmediatamente adyacentes al inicio de la traducción recibió el nombre de K6c5'(5Kb)pUC.

Para poder clonar el último fragmento *Sall-EcoRI* junto con el resto del promotor, y debido a que sus sitios de restricción eran incompatibles con la estructura del *polylinker* de pBLCAT3, se procedió a subclonar éste fragmento *Sall-EcoRI* en el vector *Bluescript*, y posteriormente se le añadió el resto del promotor procedente del clon K6c5'(5Kb)pUC. A este plásmido, que contiene las 10 kb de secuencia en 5' de la BK6c, se le llamó K6c5'(10Kb)pBS. Todos estos clonajes se comprobaron exhaustivamente mediante mapas de restricción e hibridaciones por *Southern blot*.

Finalmente, para preparar los clones definitivos, los plásmidos K6c5'(5Kb)pUC y K6c5'(10Kb)pBS fueron escindidos con la endonucleasa de restricción *BamHI* en el extremo 3' de sus insertos y con las enzimas *HindIII*, *SphI*, *BglII* (en el caso de K6c5'(5Kb)pUC) y *XbaI* y *Sall* (para K6c5'(10Kb)pBS) y ligados a vectores pBLCAT3 con los sitios de corte adecuados. Los clones positivos fueron purificados por medio de centrifugación en gradiente de CsCl y se usaron para transfectar.

3.1.3.2. Actividad del promotor de la K6c.

Se abordó la identificación de las zonas reguladoras en 5' del gen de la BK6c mediante transfecciones con las construcciones arriba realizadas. Estas transfecciones se realizaron en células de la línea BMGE+H, originaria de epitelio de glándula mamaria bovina y cultivada en presencia de hormonas (insulina, hidrocortisona y prolactina). Esta línea expresa las queratinas BK6* y BK6c (pero no BK6, ver anteriormente), BK16, BK5 y BK14 (Schmid y cols., 1983). En la figura 25 se muestran algunos de los experimentos realizados. Se observó que la actividad máxima era producida por el fragmento *HindIII* (-1100) del promotor. La actividad del fragmento inmediatamente menor (*EcoRI*, -630) era aproximadamente la mitad de la del fragmento -1100, sugiriendo la existencia de varias zonas reguladoras responsables cada una parcialmente de la actividad transcripcional. Cuando se ensayaban fragmentos de promotor mayores de -1100, la actividad disminuía (si bien en un caso la delección *SphI*, -3000, daba una actividad similar a la del fragmento *HindIII*). La expresión en todos los fragmentos mayores fue muy baja, sugiriendo la existencia de un elemento represor de la transcripción que se encontraría al menos 1100 pb por delante del inicio de la traducción, esto es, en 5' del sitio de corte para *HindIII* en -1100.

Se realizaron nuevas deleciones del promotor por el método de la ExoIII-S1 antes descrito, con objeto de comprobar en qué punto se perdía la capacidad activadora del promotor de la K6c. Estas deleciones, llamadas $\Delta 5.1$ (-526) y $\Delta 25.1$ (-330), ver figura 23, más la deleción Δ PstI, que se extiende justo hasta el sitio de corte PstI en la posición -140 desde el inicio de la traducción, fueron ensayadas junto con el fragmento EcoRI (-600), que hizo las veces de control. El resultado (fig. 25) muestra que basta con quitar unos 100 pb

(deleción $\Delta 5.1$) para que la actividad caiga a un 30% de la del fragmento EcoRI, indicando que este pequeño trozo de secuencia contiene elementos importantes para la regulación de la actividad del gen de la BK6c. Las otras dos deleciones bajan aún más la actividad CAT, lo que indica que existen más elementos implicados en la expresión de este gen en estas regiones. En el apartado 3.3 se analiza la secuencia de la zona 5' no traducida del gen de la BK6c y se compara con la correspondiente zona del gen de la BK6*. Igualmente, a partir de estas comparaciones y de los datos de CAT, se hacen algunas consideraciones sobre la funcionalidad de algunas de estas secuencias.

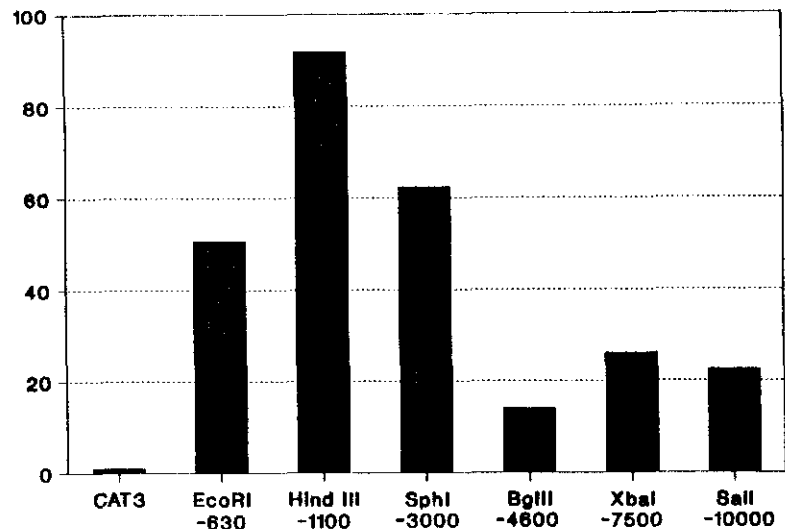


Fig. 24. Actividad CAT de las diversas deleciones del promotor de la queratina K6c, expresada en porcentaje de conversión CAT.

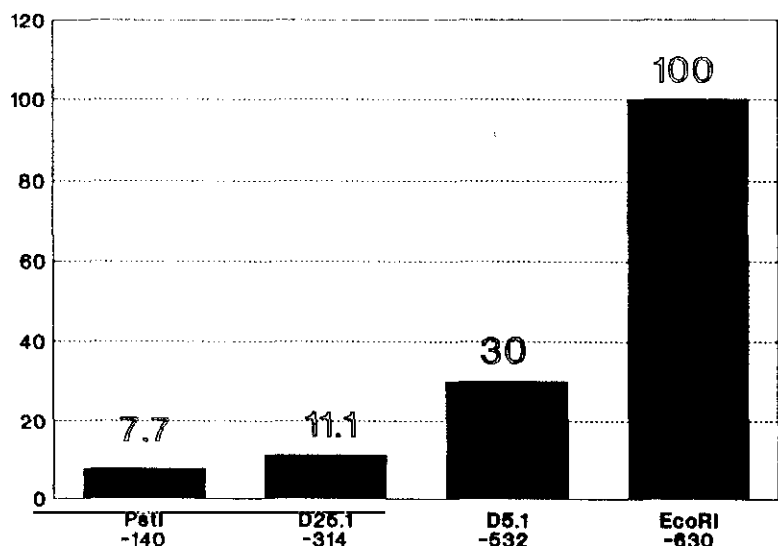


Fig. 25. Actividad CAT de distintas deleciones del promotor del gen de la K6c. Se expresa en porcentaje de la actividad de la deleción EcoRI.

3.2. ELEMENTOS IMPLICADOS EN LA REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA BK6*

En la segunda parte de este trabajo se ha abordado el estudio en profundidad de un *enhancer* de otro de los genes de la familia de la queratina 6, el denominado BK6*.

3.2.1. Determinación de los fragmentos del *enhancer* que unen proteínas nucleares.

Blessing y cols. (1989) identificaron un *enhancer* en el gen de la queratina BK6* y lo acotaron en una zona de 425 pb. Este *enhancer* es específico de tejido, ya que es funcional en aquellas líneas celulares en las que se expresa la queratina BK6* (BMGE+H y AT5), pero no en las que no se expresa (3T3 y MDBK). El *enhancer* se halla limitado por dos sitios de corte para las endonucleasas de restricción *Hind*III (-670 del inicio de traducción) y *Xmn*I (-240). En el presente trabajo se ha estudiado cuales son los elementos responsables de esta expresión.

Para ello, primeramente se prepararon tres plásmidos que incluían toda la extensión de este *enhancer*: son los plásmidos que incluyen los fragmentos *Hind*III-*Xho*II (-670 a -550), *Xho*II-*Xmn*I (-550 a -240) y *Mn*I (-620 a -460), en adelante, llamados HX, XX y Mnl, respectivamente. El último fragmento se solapa con los otros dos, abarcando una zona de cada uno (fig. 26).

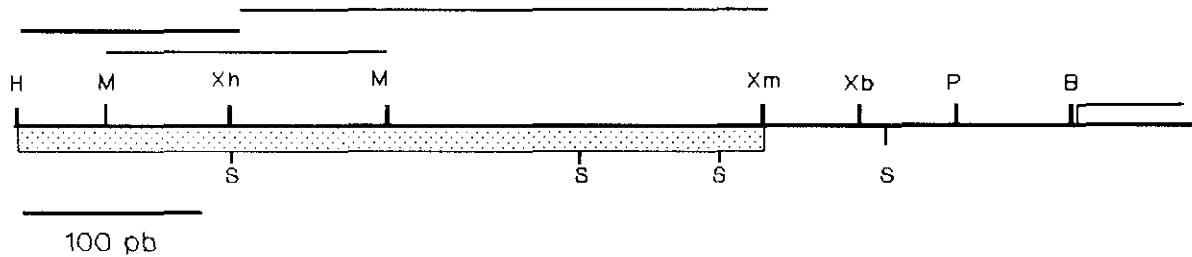


Fig. 26. Estructura del promotor del gen de la queratina bovina K6*. La zona punteada constituye el *enhancer* (Blessing y cols., 1987). Las tres líneas superiores representan los fragmentos utilizados inicialmente para el estudio del *enhancer*. B, *Bgl*III. H, *Hind*III. M, *Mn*I. P, *Pst*I. S, *Sau*3A. Xb, *Xba*I. Xh, *Xho*II. Xm, *Xmn*I.

Se utilizaron inicialmente extractos nucleares procedentes de dos tipos de células: AT-5 y BMGE+H. Estas dos líneas expresan elevadas cantidades de queratina K6 (en el caso de AT5, su equivalente murino). En ambos tipos celulares este *enhancer* muestra similar actividad (Blessing et al, 1989).

Se realizaron experimentos de retardo en gel (Fried y Crothers, 1981) con estos tres fragmentos, con objeto de determinar cual de ellos era capaz de retener proteínas procedentes de extractos nucleares. Estos extractos se realizaron por el método de Dignam y cols. (1983). Los fragmentos se marcaron terminalmente con ^{32}P y se purificaron según se describe en Métodos. Primeramente se determinó el tipo y concentración de catión que producía un retardo óptimo. Se encontró que una concentración de 25 mM de NaCl rendía una unión máxima, disminuyendo ésta a concentraciones mayores (fig. 27). Se encontró igualmente que

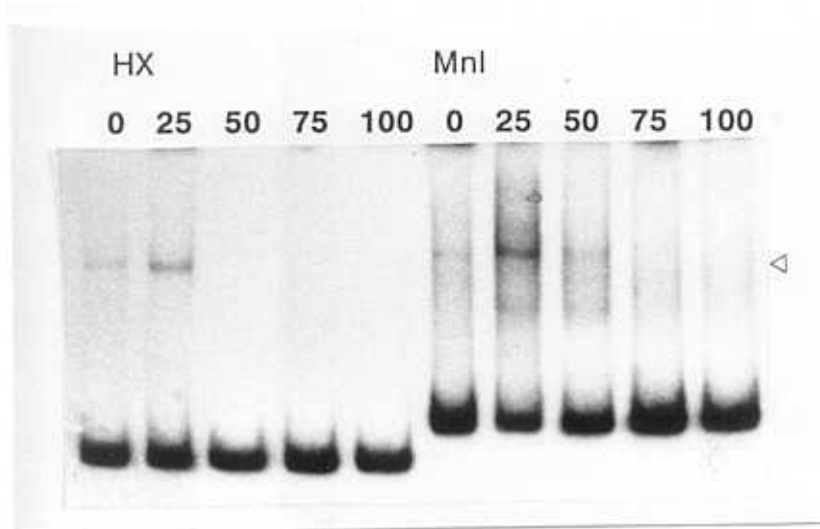


Fig. 27. Efecto de la concentración de NaCl en la unión entre los fragmentos HX y Mnl del enhancer de la K6 con extractos nucleares de la línea celular AT5. Se ensayaron concentraciones de NaCl entre 0 y 100 mM en una mezcla de reacción según se describe en métodos. El triángulo señala la banda retenida.*

máxima, disminuyendo ésta a concentraciones mayores (fig. 27). Se encontró igualmente que la adición del catión Na^+ daba los mejores resultados. Las uniones conseguidas en presencia de K^+ eran de intensidad y nitidez ligeramente menores y la adición de Mg^{++} causaba la degradación de la muestra en extractos de células BMGE+H, probablemente debido a la activación de alguna nucleasa inespecífica contenida en estos extractos nucleares (no se muestra).

Los experimentos mostraron que el fragmento HX era susceptible de ser retenido por proteínas presentes tanto en el extracto nuclear de células AT5 (fig. 28) como en el de BMGE+H. Esta banda no era debida a unión inespecífica DNA-proteína, pues además de efectuarse el retardo en presencia de una elevada cantidad del competidor sintético inespecífico poli(dIdC)·(dIdC) (4 μg frente a ≈ 0.5 ng de sonda marcada), la unión era competida por adición de cantidades crecientes del mismo fragmento sin marcar (fig. 28, calles 2-4), mientras que la adición de la misma cantidad de otro fragmento de DNA no relacionado como competidor inespecífico no tenía ningún efecto sobre la intensidad de la banda retenida (no se muestra).

El fragmento Mnl se comportó de forma similar: en ambos extractos nucleares se producía una banda retenida que era competida por la adición de este mismo fragmento sin marcar (fig. 29, calles 3-5), pero no por la adición de una cantidad equivalente de un fragmento inespecífico de DNA (no se muestra). Sin embargo, se debe resaltar el hecho de que mientras que el fragmento HX produce una banda retenida de similar tamaño y apariencia en ambos extractos nucleares (AT5 y BMGE+H), en el caso del fragmento Mnl la apariencia y movilidad de los complejos es diferente para los dos extractos, indicando

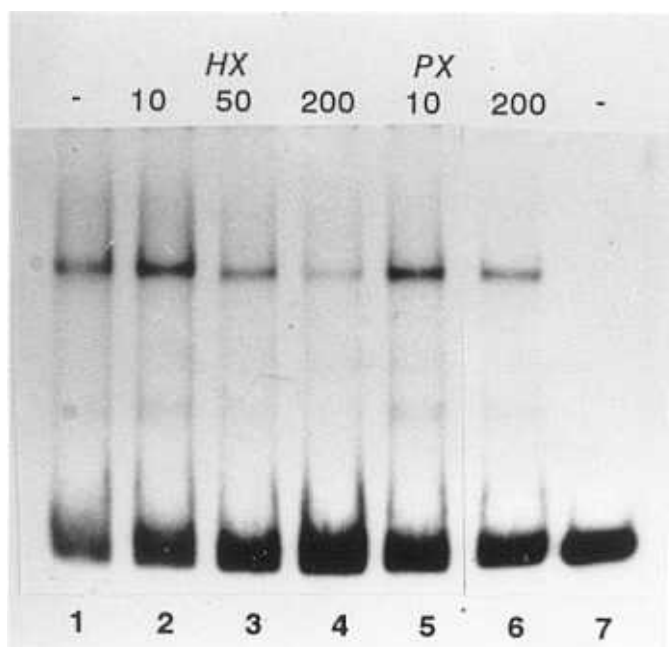


Figura 28. Retardos en gel del fragmento HX del promotor de la K6* con 10 μ g de extracto nuclear de AT5. Se indica el exceso molar de competidor. Calle 1: sin competidor. Calles 2-4: autocompetición con el fragmento HX no marcado. Calles 5-6: competiciones con el fragmento PX del promotor del gen de la BK5. Calle 7: sin extracto

posiblemente que en ambos tipos celulares distintas proteínas se unen a este fragmento (figs. 28 y 29).

En el gen de la queratina K5 bovina ha sido identificado un *enhancer* responsable de la expresión de este gen en células BMGE+H y AT5 (Casatorres y cols., en preparación). Para comprobar si la expresión de este gen se realiza mediante los mismos factores de transcripción que son responsables de la expresión del gen de la queratina BK6*, se realizaron experimentos de competición entre estos dos fragmentos HX y Mnl y el fragmento de 300 pb *HindIII-PstI* (en adelante, HP) que contiene el *enhancer* de la queratina K5. Los resultados mostraron que la adición de un exceso molar de 200 veces del fragmento HP a la mezcla de reacción no lograba competir la unión de los fragmentos HX y Mnl con proteínas de los extractos nucleares de células AT5 y BMGE+H, como se evidencia por la no alteración de la intensidad de la banda retenida, demostrándose la existencia de factores proteicos capaces de asociarse con el *enhancer* de la queratina BK6* pero no con el de la K5 (figs. 28, calles 5-7 y 29, calles 6-8). Experimentos complementarios, es decir, adición de estos fragmentos HX y Mnl del *enhancer* de la queratina BK6* como competidores de la unión del *enhancer* de la queratina K5 a extractos nucleares, dieron resultados similares (Casatorres y cols., en preparación).

Ensayos similares de retardo en gel se efectuaron con el fragmento de 300 pb XX. Sin embargo, estos experimentos resultaron difíciles de interpretar, puesto que la banda

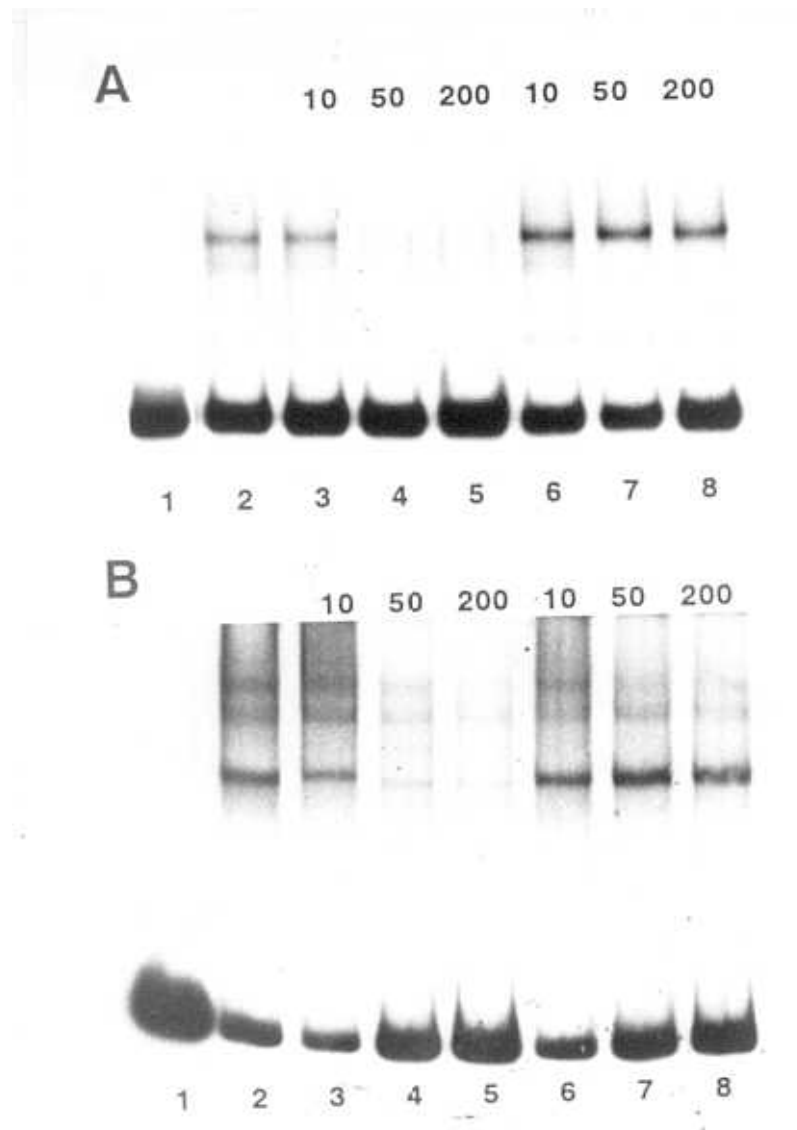


Figura 29. Retardos en gel del fragmento *Mnl* del promotor de la *BK6** con 10 μ g de extracto nuclear de *AT5* (A) o *BMGE+H* (B). Se indica el exceso molar de competidor. Calle 1: Sin extracto. Calle 2: sin competidor. Calles 3-5: autocompetición con el fragmento *Mnl* no marcado. Calles 6-8: competiciones con el fragmento *PX* del promotor del gen de la *BK5*.

retenida no aparecía de forma nítida, ni era claramente visible si competía o no con otros fragmentos del *enhancer* de la queratina *K5*. Debido a ello se decidió dividir este fragmento en otros de menor tamaño y estudiarlos por separado (ver más adelante).

3.2.2. Caracterización por footprinting de las zonas de unión.

Seguidamente se procedió a la realización de experimentos de *footprinting* para determinar las secuencias exactas de estos fragmentos de DNA responsables de la unión a factores de transcripción y la posible identidad de estos factores.

Se ensayaron inicialmente diversos métodos de preparación de extractos nucleares: Dignam y cols. (1983), Schreiber y cols. (1989), "miniextractos" de Lee y cols. (1988). Se eligió finalmente el método de Shapiro y cols. (1988), modificado según aparece en Métodos, por dar los mejores resultados. Igualmente, se ensayó la concentración de KCl óptima para el tratamiento con DNAsa I, resultando ser ésta de 40 mM. Para cada fragmento marcado y cada extracto celular se determinó empíricamente la cantidad de DNAsa I necesaria para obtener una digestión de <50% del fragmento, considerada óptima. Esta cantidad se hallaba, en general, entre 2 y 6 ng de DNAsa I por cada μg de extracto nuclear. La presencia de una potente nucleasa contaminante en los extractos de líneas celulares de origen bovino (BMGE+H, BMGE-H y MDBK) obligó a añadir espermina y espermidina a los tampones de extracción de proteínas para sustituir los cationes divalentes que activan dicha nucleasa. Igualmente fue necesaria la adición de varios inhibidores de proteasas (ver Métodos).

En el fragmento MnlI se encontró una zona protegida que abarcaba aproximadamente los nucleótidos -530 a -550 (fig. 30). La observación en detalle de esta zona mostró que se hallaban

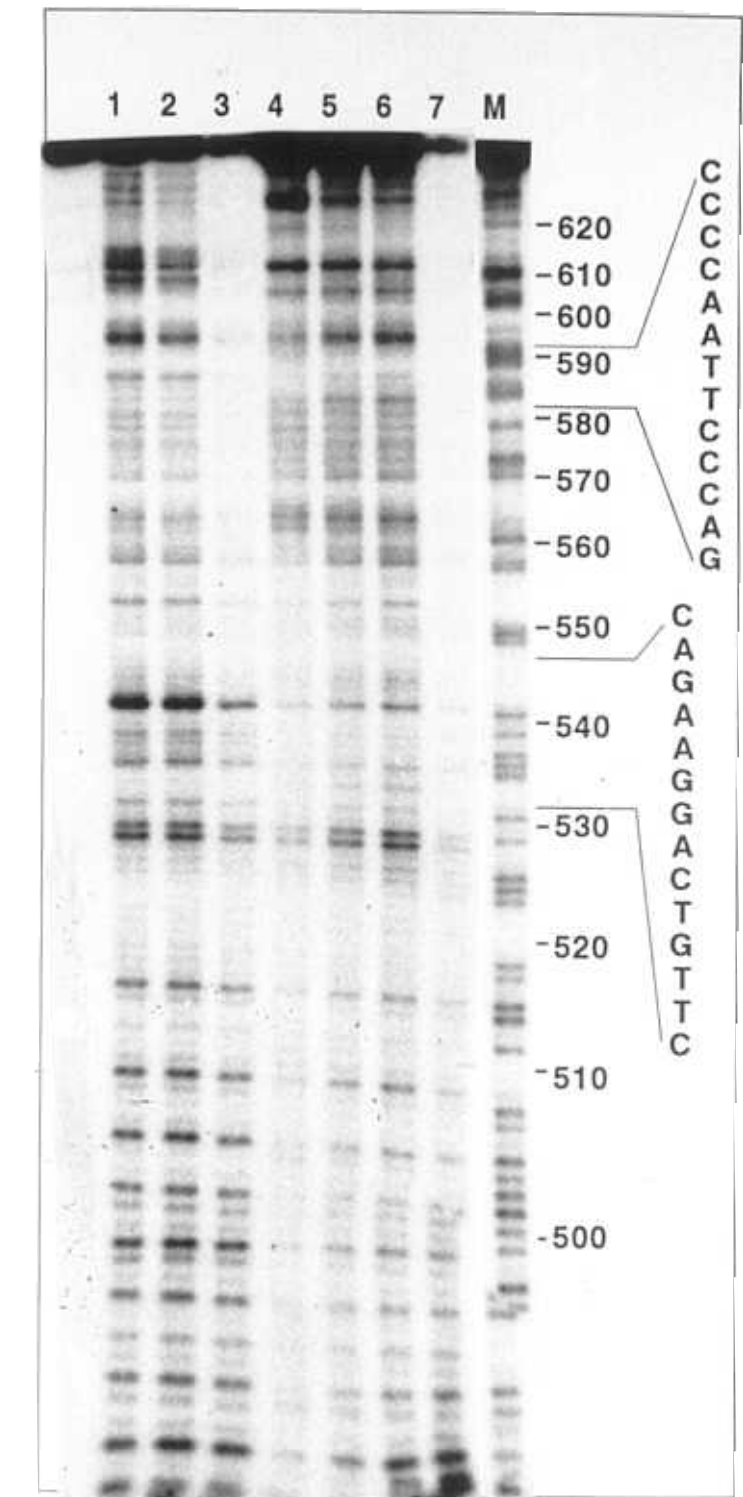
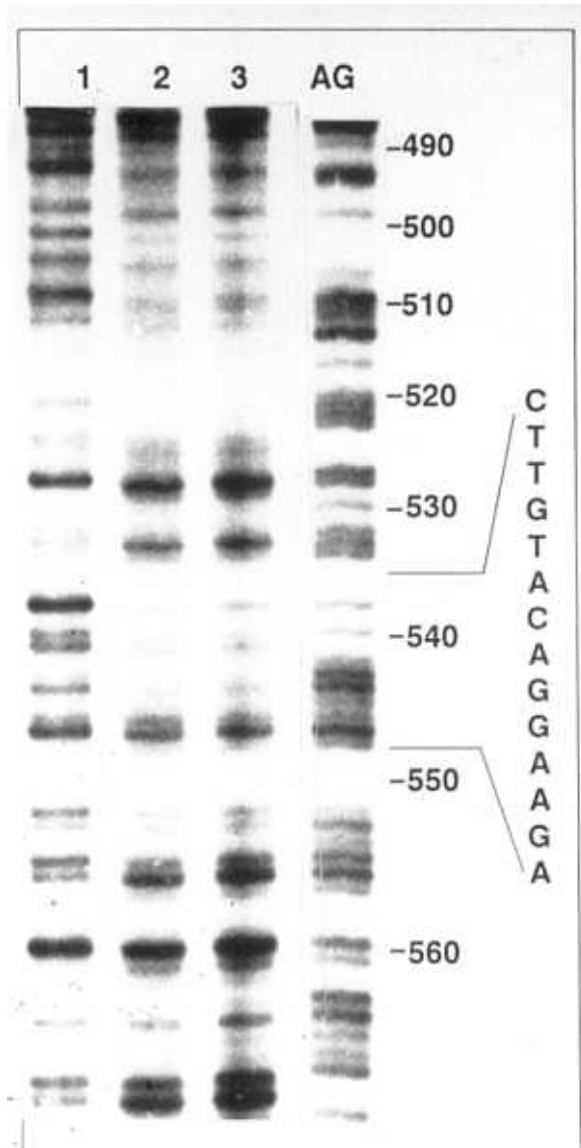
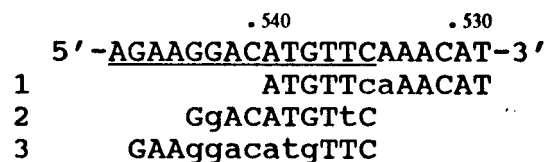


Fig. 30. Localización de los sitios de unión a proteína en el enhancer del gen de la K6* (fragmento MnlI) por footprinting con DNAsa I. Calles 1-3, sin proteínas y con 5, 10 y 20 ng de DNAsa I, respectivamente. Calles 4-7, 50 μg de extracto nuclear de BMGE+H con 50, 100, 200 y 500 ng de DNAsa I, respectivamente. M, marcadores de Maxam y Gilbert. La calle sin marcar lleva DNA sin tratar.

Fig. 31. Localización de los sitios de unión a proteínas en el enhancer del gen de la BK6* (fragmento MnlI) por footprinting con DNasa I. Calle 1, sin proteínas, 10 ng de DNasa I. Calle 2, 100 µg de extracto nuclear de BMGE+H y 100 ng de DNasa I. Calle 3, 100 µg de extracto y 200 ng de DNasa I. AG, marcadores de Maxam y Gilbert. Nótese que esta figura es la cadena complementaria de la figura 30.



protegidos los nucleótidos -534 a -547 (fig 31). En esta zona protegida y bases adyacentes se encuentra la secuencia 5'-GAAGGACATGTTCAAACAT-3', que muestra varios rasgos interesantes. A primera vista, se pueden encontrar tres secuencias casi palindrómicas, que pueden tener importancia en la regulación génica. Las bases que rompen el palíndromo se representan en minúscula, y la zona protegida está subrayada:



La primera de ellas, ATGTTcaAACAT, no es semejante a ninguna otra secuencia de reconocimiento de factores de transcripción presente en la bibliografía que hemos revisado. Es un palíndromo perfecto en torno al par de bases centrales CA, y desconocemos si puede

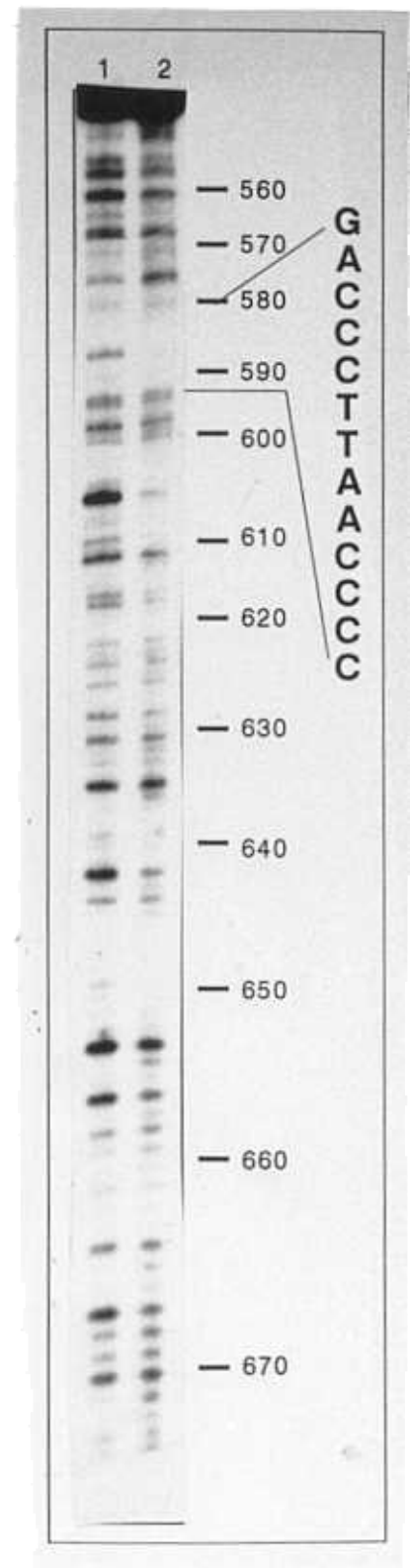
Kraft y cols. (1988), y se eligieron cuatro clones que abarcaban toda la extensión del promotor, hasta el sitio *Xho*II en -550. Este sitio marca el final del fragmento HX, ya ensayado. La figura 33 indica la localización y tamaño de los distintos fragmentos clonados de este promotor. Dos de estos fragmentos (llamados, por su tamaño, 195 y 85) se encuentran dentro de la zona definida como *enhancer*. Otro (fragmento 95) cubre solo una parte final del *enhancer*, y un último fragmento (105) se halla totalmente fuera de él, y adyacente al punto de *capping*. Los fragmentos 195, 85 y parte del 95 abarcan en conjunto la extensión del fragmento *Xho*II-*Xmn*I, que se comportaba de forma extraña en ensayos de retardo en gel (ver anteriormente). El fragmento 195 incluye a su vez la parte del fragmento *Mn*I en la que se encuentra la secuencia protegida que va desde -510 a -550.

Todos los fragmentos clonados fueron separados del vector, marcados terminalmente y ensayados en experimentos de retardo en gel con extractos nucleares de células BMGE+H.

El fragmento 195, que contiene la parte del fragmento *Mn*I que da un *footprint*, produjo una banda retenida de débil intensidad en los ensayos de retardo en gel (fig. 40, calle 2). En los consiguientes experimentos de *footprinting* se obtuvo una zona protegida cuya localización coincidía con la del fragmento *Mn*I (-533 a -548, fig. 34). El *footprint* producido en esta zona era bastante débil, pero reproducible. Esta debilidad puede deberse a una unión DNA-proteína deficiente motivada por la posición de la secuencia protegida justo al lado del *polylinker* del vector. Probablemente sea necesaria una determinada secuencia adyacente a la zona protegida para lograr una buena unión proteína-DNA. Otros resultados parecen avalar esta hipótesis (ver más adelante).

El fragmento 85 también produjo una banda retenida de intensidad notable en los experimentos de retardo en gel con extractos nucleares de células BMGE+H (fig. 35). Se realizaron experimentos de *footprinting* con este fragmento

Fig. 32. Localización de los sitios de unión a proteína en el *enhancer* del gen de la BK6* (fragmento HX) por *footprinting* con DNasa I. Calle 1: control. Calle 2: 100 µg de extracto nuclear de BMGE+H.



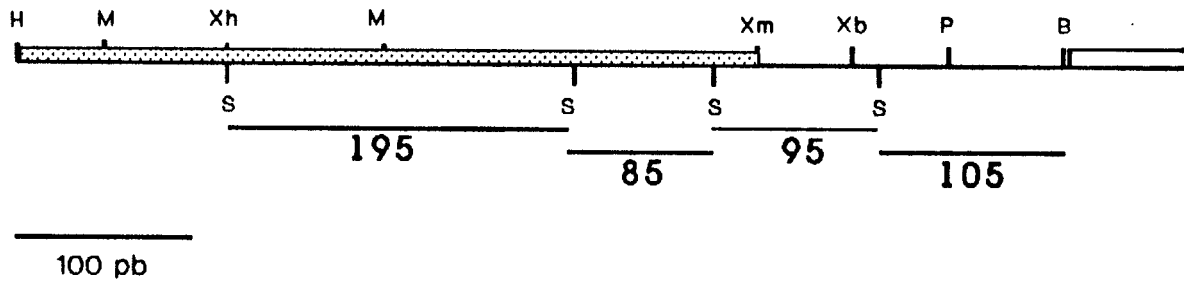
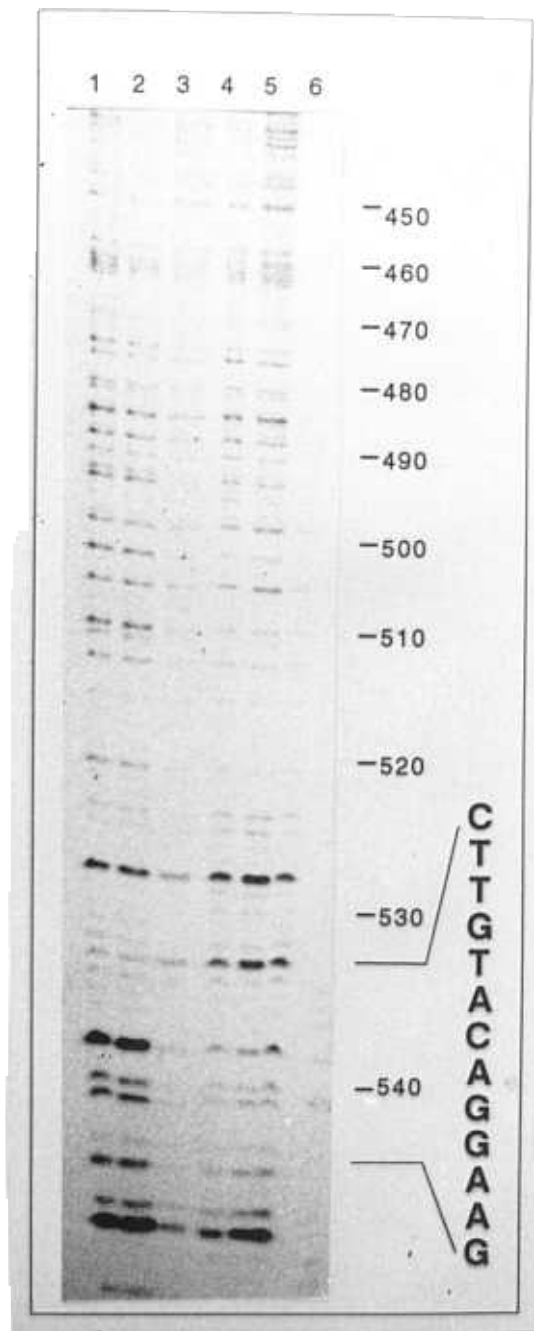


Fig. 33. Clonación de fragmentos del promotor de la queratina bovina K6*. La zona recuadrada representa el enhancer y las líneas inferiores los distintos fragmentos clonados para el estudio del mismo. Símbolos como en la figura 26.

Fig. 34. Footprinting del fragmento 195 del promotor de la K6*. Calles 1-2: controles sin proteína, 10 y 15 ng de DNAsa I. Calles 3-6: 100 µg extracto de BMGE+H; 100, 200, 300 y 400 ng de DNAsa I.

(fig. 36) y se encontró que era capaz de dar una zona protegida de unos 23 nucleótidos de extensión, comprendida entre las posiciones -307 y -330 y que incluía una secuencia TGACTAA similar al consenso para AP-1 (Angel y cols., 1987), indicando la implicación del complejo Fos-Jun en la regulación de este gen.

El fragmento 95 produjo un retardo en gel más débil que los producidos por los anteriores fragmentos (fig. 35), indicando que su capacidad de unir de forma específica proteínas nucleares de las células BMGE+H es inferior. La secuencia del fragmento 95 muestra que en él se haya el motivo AAACCAA, coincidente con el consenso AAPuCCAAA, que se encuentra en varios genes expresados en epidermis, como el de la involucrina (Eckert y Green, 1986) y numerosas queratinas (ver Blessing y cols., 1987 para una revisión) y papilomavirus. Se ha propuesto que este consenso es una secuencia específica de genes expresados en epidermis, llamada "caja epidérmica" (Blessing et al, 1987). Los consiguientes experimentos de footprinting realizados con este fragmento resultaron en una disminución de la intensidad de las bandas precisamente en la zona donde se encuentra la "caja epidérmica" (fig. 37). Este hecho demuestra que la "caja epidérmica" puede tener alguna



función en la regulación de los genes expresados en epidermis.

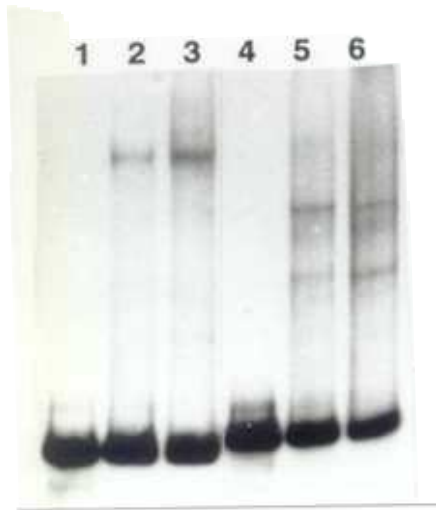
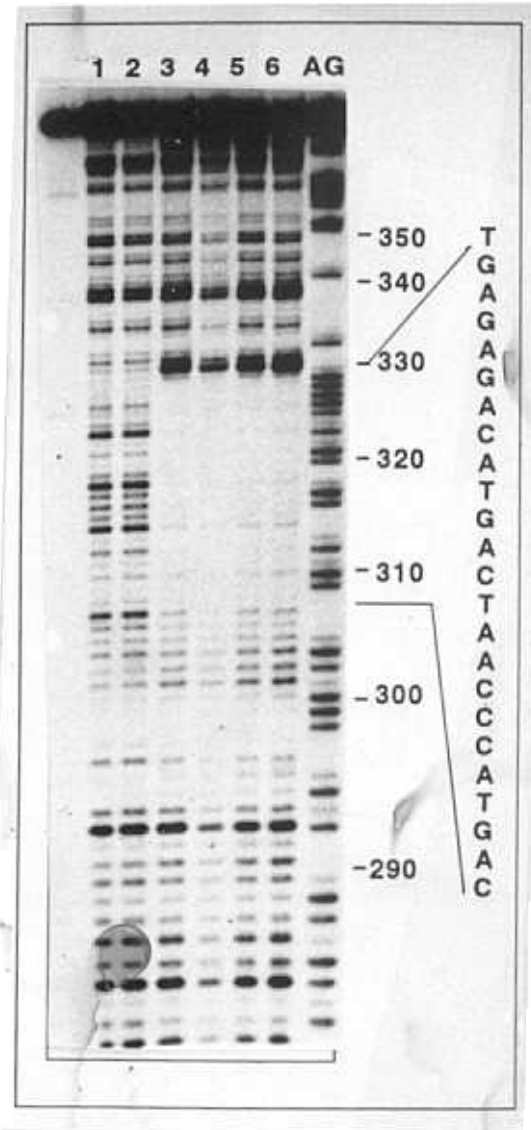


Fig. 35. Retardos en gel de los fragmentos 85 del enhancer del gen de la BK6* (calles 1-3), y 95, fuera del enhancer (calles 4-6). Calles 1 y 4 sin extracto, calles 2 y 5 con 10 µg de extracto nuclear de BMGE+H, calles 3 y 6 con 20 µg.

Fig. 36. Footprinting del fragmento 85 del enhancer del gen de la K6*. Calles 1-2: sin Proteína. 5 y 10 ng de DNasa I. Calles 3-6: 100 µg de extracto nuclear de BMGE+H, 75, 100, 200 y 300 ng de DNasa I. AG: marcadores de Maxam y Gilbert.



Igualmente, el fragmento 105 posee una secuencia ATCTGCAGGCT que tiene una gran similitud con las secuencias ACCCTGCAGGCT del gen de la queratina de *X. laevis* XK81A1 (Snape y cols, 1990) y GCCTGCAGGC del gen de la queratina humana K14 (Leask y cols, 1990), muy similares al consenso para el factor AP2 (CCCCAGGC), implicado en la regulación de éstas queratinas. Sin embargo, este fragmento 105 no fue capaz de unir ninguna proteína de extractos nucleares de células BMGE+H, indicando que esta secuencia no tiene ningún papel en la regulación del gen de la queratina BK6*, y sugiriendo que la secuencia AP-2 implicada es la que se encuentra entre -580 y -592, que sí es protegida en experimentos de *footprinting*.

Para corroborar los datos obtenidos en los ensayos de retardo en gel, se realizaron experimentos de *footprinting* con este fragmento 105, incapaz de producir retardo con extractos nucleares de células BMGE+H. En ningún caso se observó ninguna región protegida (no se muestra). Sin embargo, no se puede descartar que exista algún elemento regulador no detectado, pues en este mismo fragmento se encuentra la TATA box, que tampoco dió ningún retardo en gel ni *footprint* positivo.

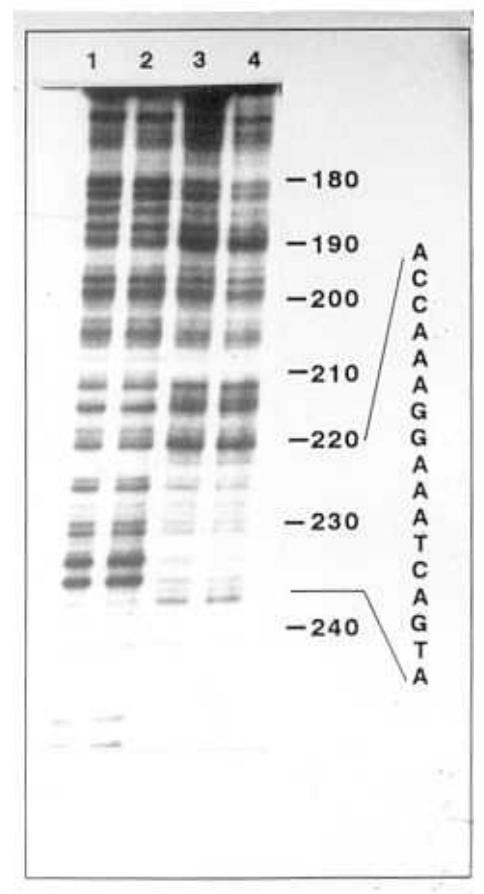


Fig. 37. *Footprinting* del fragmento 95 del promotor del gen de la BK6* (fuera del enhancer). Calles 1 y 2, controles sin proteína, 5 y 15 ng de DNasa I. Calles 3 y 4, 70 µg de extracto nuclear de células BMGE+H; 150 y 300 ng de DNasa I.

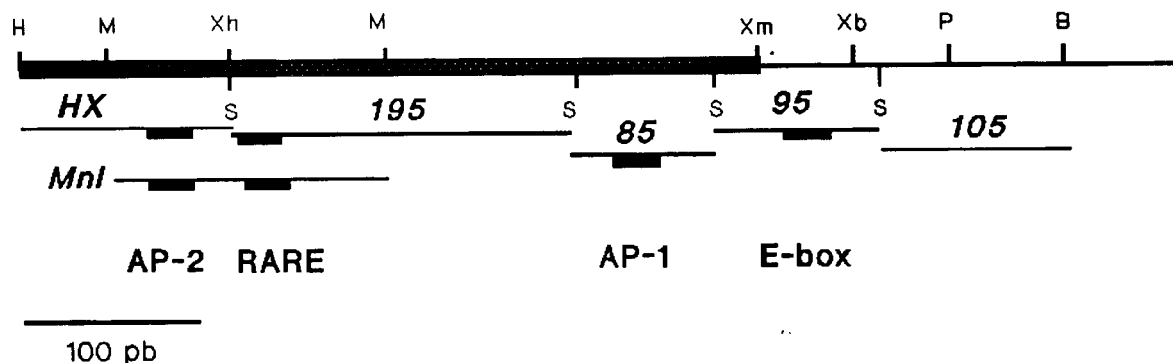


Fig. 38A. Esquema de los fragmentos del promotor de la BK6* y los footprints en él encontrados. RARE: elemento de respuesta a ácido retinoico. E-box: caja epidérmica.

La figura 38 (A y B, esta página y la siguiente) resume todas las zonas protegidas encontradas en la parte 5' no codificante (incluyendo el *enhancer*) del gen de la queratina BK6*.

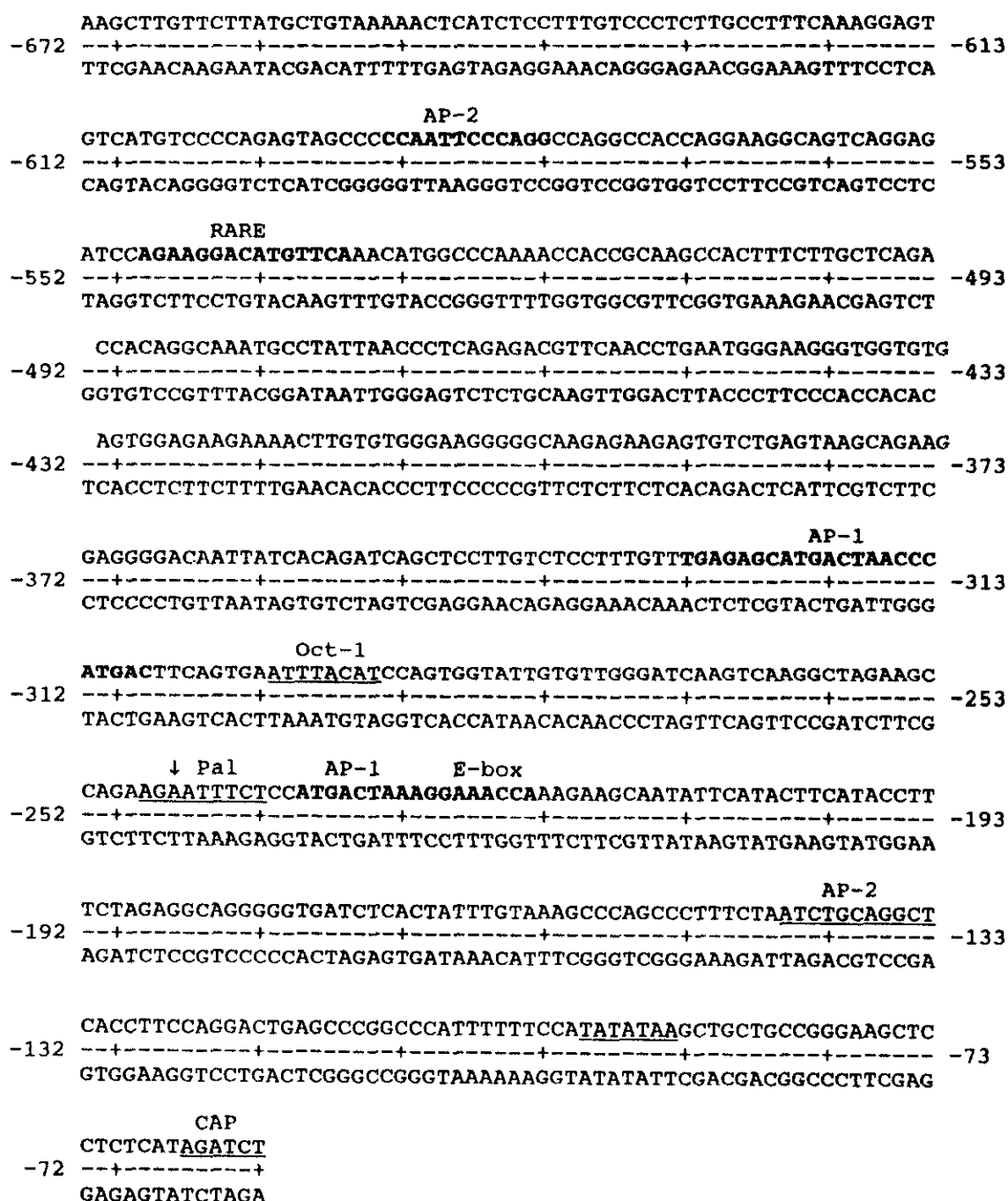


Figura 38B. Secuencia de nucleótidos del promotor del gen de la BK6*. La zona definida como enhancer se extiende desde la posición -672 a la -246 (flecha). Se representan en negrita las zonas protegidas, y subrayadas aquellas que, pese a no ser protegidas, son comentadas en el texto.

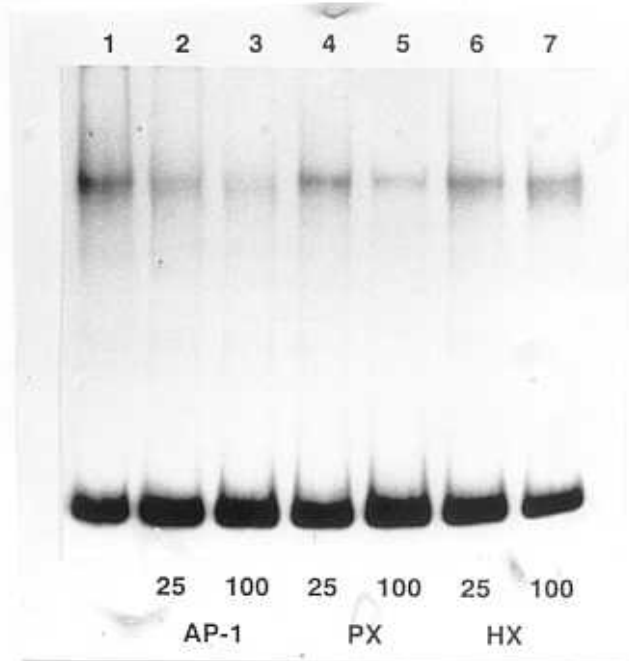
3.2.4. Competiciones.

Para intentar acotar más cuales son las zonas responsables de la unión de factores proteicos al promotor de la queratina BK6* e identificar tentativamente estos factores, se realizaron competiciones con los fragmentos que eran capaces de dar una banda retenida en

experimentos de retardo en gel con extractos nucleares de BMGE+H

El fragmento 85, conteniendo el hipotético sitio de unión para AP-1, era eficientemente competido por un oligonucleótido conteniendo un sitio AP-1, pero no por un competidor carente de sitios de unión para AP-1, como era el fragmento HX. La adición de un fragmento con un sitio de unión probado para AP-1, como el fragmento PX del *enhancer* de la queratina bovina K5 (Casatorres y cols., manuscrito en preparación) era capaz de competir esta unión, aunque no de forma tan eficiente como el mismo fragmento 85 (Fig. 39), indicando la posibilidad de que dentro del complejo AP-1 puedan ser distintas las proteínas Fos y Jun que se unen a esta secuencia en los dos genes.

Fig. 39. Competición de la unión del fragmento 85 del *enhancer* de la K6* (calle 1) con un oligonucleótido conteniendo un sitio AP-1 (calles 2-3), el fragmento PX del promotor de la K5 (calles 4-5) ó el fragmento HX del *enhancer* de la K6* (calles 6-7). Debajo se indican los excesos molares de cada competidor.



Se comprobó seguidamente si en el fragmento 195 había alguna otra zona capaz de unir alguna proteína de células BMGE+H. Los experimentos mostraron que este fragmento es competido con igual eficiencia por el fragmento MnlI y por sí mismo, indicando por tanto que no existe ningún otro factor nuclear en la línea BMGE+H capaz de interactuar con alguna otra parte de este fragmento diferente de la común a 195 y MnlI (Fig. 40). Apoyando este resultado, este fragmento era incapaz de ser competido por un oligonucleótido sintético conteniendo un sitio consenso para AP-1, pese a la existencia en la zona 3' del fragmento de una secuencia TGAGTAA similar a este consenso. Esta secuencia, por tanto, no parece ser funcional en el *enhancer* de la queratina BK6*.

El fragmento HX es capaz de ser eficientemente competido por el fragmento MnlI, con una eficiencia incluso similar a la del mismo fragmento HX (fig. 41), lo que indica que la secuencia responsable de la unión a proteínas se halla en los 90 pb que comparten ambos fragmentos y confirma los resultados positivos obtenidos en los *footprints*. El fragmento 85, que contiene un sitio AP-1, no es capaz de competir con el HX, y con el fragmento 195, que comienza justo cuando acaba el fragmento HX, aunque no se puede decir que exista una verdadera competición si se puede apreciar una ligera disminución en la intensidad de la

Fig. 40. Competición de la unión del fragmento 195 del enhancer de la K6* (calle 2) consigo mismo (calles 3-4), con el fragmento MnlI del enhancer de la K6 (calles 5-6) ó con un oligonucleótido conteniendo un sitio AP-1 (calle 7). Calle 1, sin extracto. Debajo se indican los excesos molares de cada competidor.

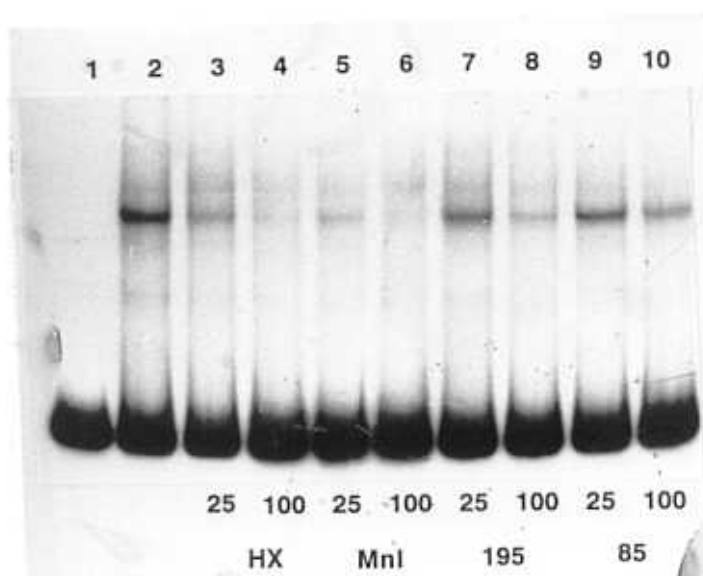
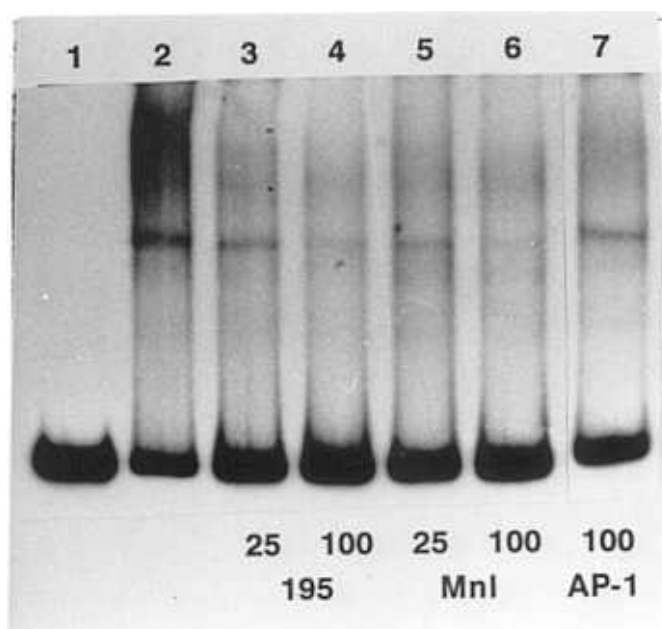


Fig. 41. Competición de la unión del fragmento HX del enhancer de la K6* a extractos nucleares de BMGE+H (calle 2) por un exceso molar de 25 ó 100 veces de sí mismo (calles 3-4), el fragmento MnlI (calles 5-6), 195 (calles 7-8) y 85 (calles 9-10). Calle 1, sin extracto.

banda retenida, lo que tal vez podría significar que la secuencia de unión a proteína está cerca o incluye este sitio de restricción *XhoII*, común a ambos fragmentos, y alguna secuencia residual presente en el fragmento 195 pero no en el HX es capaz de interferir en esta unión. El hecho de que el fragmento 195 presente en la zona comprendida entre -533 y -548 un *footprint* más débil que el que se da en la misma zona del fragmento MnlI también sugiere que es necesaria una cooperación de esta zona con el elemento AP-2 cercano. Alternativamente, otra explicación posible sería que alguna secuencia de la zona protegida dentro del fragmento 195 fuese capaz de unir AP-2 con baja afinidad.

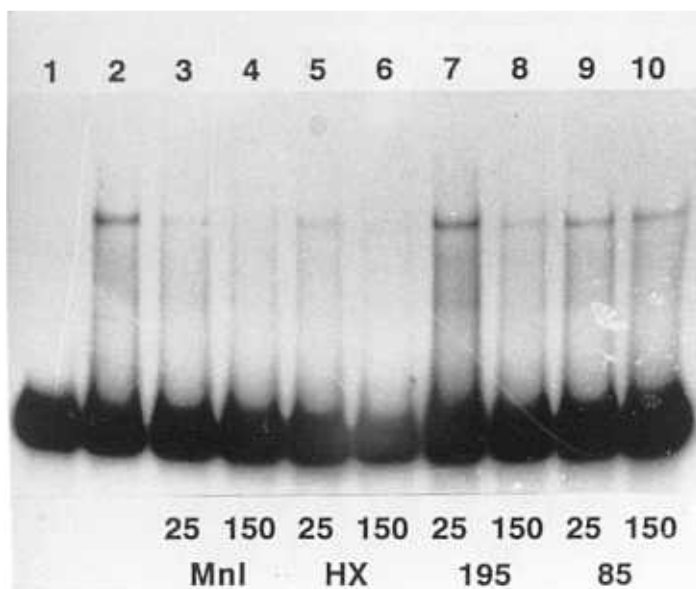


Fig. 42. Competición de la unión del fragmento Mnl del enhancer de la K6* a extractos nucleares de BMGE+H (calle 2) por un exceso molar de 25 ó 150 veces de sí mismo (calles 3-4), el fragmento HX (calles 5-6), 195 (calles 7-8) y 85 (calles 9-10). Calle 1, sin extracto.

El fragmento Mnl (fig. 42), por el contrario, presenta un comportamiento sorprendente. Es competido con la misma eficiencia tanto por sí mismo como por el fragmento HX, y un poco menos eficientemente por el 195. Sin embargo, no es competido en absoluto por el fragmento 85. El hecho de que ambos fragmentos Mnl y HX sean capaces de competir es tanto más sorprendente cuanto que los *footprints* obtenidos anteriormente con este fragmento se hallan localizados cada uno en la zona que corresponde a cada uno de los fragmentos HX y 195, es decir, que los dos competidores no comparten secuencia. Esto puede interpretarse si consideramos que la unión de AP-2 a su secuencia es más fuerte por abundancia o afinidad) que la del elemento que se une a la otra secuencia protegida, con lo cual este elemento, presente en el fragmento 195, es incapaz de competir por completo la unión de AP-2.

3.2.5. Actividad de los fragmentos del enhancer de BK6*.

Para evaluar el significado de estos hechos decidimos determinar la importancia funcional relativa de cada uno de estos fragmentos del *enhancer* mediante ensayos de CAT. Para ello se prepararon tres plásmidos en el vector pBLCAT2, que incluye el promotor del gen de la timidina quinasa (TK) del virus herpes simplex (Luckow y Schütz, 1987), conteniendo los fragmentos HX, Mnl y 85 del *enhancer* de la queratina BK6*. Igualmente se preparó otro plásmido que incluye en este mismo vector el fragmento *EcoRI/XmnI*, que abarca el *enhancer* del gen de la BK6* y unos 200 pb en 5' de éste. Las construcciones fueron transfectadas por el método del fosfato cálcico y los resultados normalizados por cotransfección de un plásmido conteniendo el gen LacZ bajo el control del promotor de la β -actina y posterior determinación de la actividad β -galactosidasa. El resultado (Fig. 43) mostró que el fragmento 85, que contiene el sitio AP1, era capaz de alcanzar la mayor parte (85%) de la actividad del *enhancer*. El fragmento HX poseía una pequeña parte de la actividad (35%), y el fragmento Mnl una mínima parte (20%).

queratina en ambos tipos de epitelios, intentamos determinar seguidamente si las secuencias del *enhancer* del gen de la BK6* implicadas en la unión a factores de transcripción eran las mismas en células BMGE+H y en células de origen epidérmico. Debido a la inexistencia de líneas celulares originarias de epidermis de vaca, se utilizaron las células PB, originarias de epidermis de ratón. Se prepararon extractos nucleares de estas células y se comprobó su funcionalidad mediante ensayos de retardo en gel, tras lo cual se realizaron experimentos de *footprinting* con todos los fragmentos de DNA del promotor de la BK6* utilizados anteriormente en su caracterización. Los resultados fueron en su mayoría similares a los obtenidos con los extractos nucleares de células BMGE+H. Aunque menos nítidas, debido probablemente a problemas en la obtención de los extractos, se encontraron en células PB las mismas zonas protegidas que en células BMGE+H: una zona conteniendo una secuencia de reconocimiento para AP-1 en el fragmento 85 (fig. 46) y una amplia zona comprendida aproximadamente entre las posiciones -530 y -550 en los fragmentos MnlI y 195 (figs. 47B y C), que incluye el elemento de respuesta a ácido retinoico.

El presunto elemento AP-2, situado en el fragmento HX entre los nucleótidos -580 y -592 apareció con bastantes dificultades (no se muestra). Sin embargo, parece bastante probable que este elemento sea en realidad reconocido por los extractos nucleares de células PB y que la deficiente protección se deba, como en los otros casos, a problemas del extracto proteico, pues este fragmento 95 presenta un buen retardo en gel (no se muestra) y en toda la extensión del fragmento no aparece ninguna otra zona de posible protección.

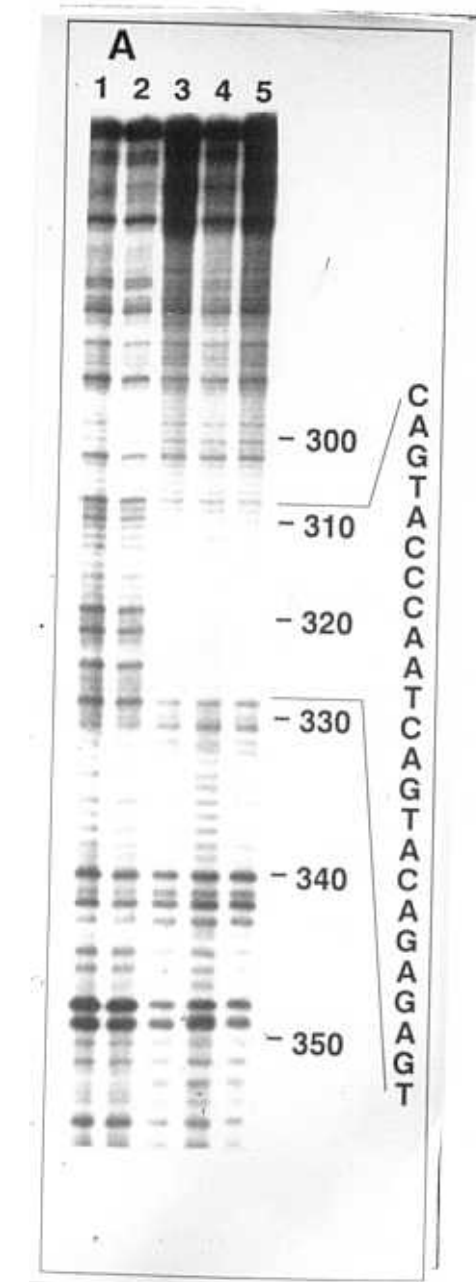


Fig. 46A. Footprint del fragmento 85 del *enhancer* del gen de la BK6* con extractos nucleares de células PB. Calles 1 y 2: sin proteína, 5 y 10 ng de DNasa I. Calle 3: 100 μ g de extracto, 300 ng de DNasa I. Calle 4: 100 μ g de extracto, 600 ng de DNasa I. Calle 5: 150 μ g de extracto, 600 ng de DNasa I.

el elemento en cuestión responde a ácido retinoico, y no a glucocorticoides.

Estos resultados son contradictorios con los recientemente publicados por Stellmach y cols. (1991), quienes encontraron que la expresión de la queratina HK6 disminuía tras la adición de ácido retinoico. Para confirmar nuestros resultados, estudiamos la respuesta al ácido retinoico del *enhancer* completo (fragmento *EcoRI/XmnI*) y los fragmentos HX y Mnl del *enhancer*. Para ello se cotransfectaron estos fragmentos dirigiendo la actividad del gen CAT junto con el receptor RAR α y tras la transfección se añadió ácido retinoico a una concentración de 1 μ M. Se observó que la cotransfección con RAR α y posterior adición de ácido retinoico producía una estimulación de tres veces en la actividad CAT del fragmento Mnl, mientras que también disminuía tres veces la actividad CAT del fragmento HX y unas dos veces y media la del *enhancer* completo (fig. 45). Estos resultados sugieren que en el fragmento Mnl existe un sitio de reconocimiento para el receptor del RA que es activado por el tratamiento con este compuesto. Sin embargo, también existe un efecto inhibitorio que se realiza a través de otros sitios de unión para este receptor, presumiblemente el sitio AP-2 del

fragmento HX (y esa es la causa de que la actividad del fragmento HX disminuya). En el fragmento Mnl el efecto negativo sobre el sitio AP-2 queda atenuado o anulado por el efecto positivo que se da sobre el supuesto elemento de respuesta a ácido retinoico, que se encuentra en el fragmento Mnl pero no en el HX. De forma similar, existe un efecto negativo que se da sobre el *enhancer* completo y que es más potente que el efecto activador sobre el fragmento Mnl. Este efecto negativo debe estar posiblemente mediado por otros sitios del *enhancer* que reconocen al receptor del ácido retinoico, probablemente el sitio AP-1, responsable de la mayor parte de la actividad del *enhancer*, y del que se sabe que puede interactuar con el ácido retinoico (Schüle y cols., 1991).

3.2.7. Factores que se unen al promotor de la BK6* en líneas epidermicas.

La queratina K6 es expresada en epitelios estratificados, algunos de ellos internos (como por ejemplo esófago y lengua), y otros de áreas epidérmicas (hocico y almohadilla de la pata en vacas, planta de pies y manos, epidermis sometida a diversos estímulos, etc.). Con objeto de profundizar en las posibles diferencias en la regulación de la expresión de esta

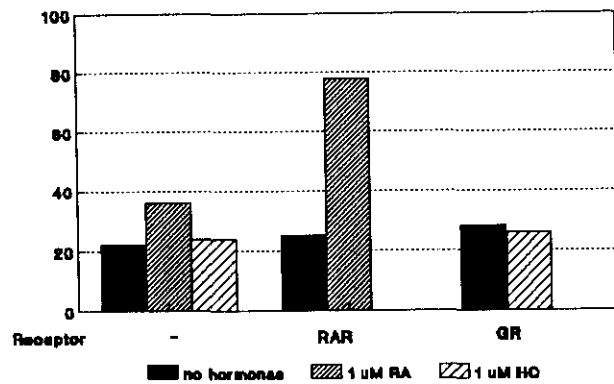


Fig. 44. Efecto de la cotransfección de RAR α y GR en el fragmento Mnl del *enhancer* de la BK6*, con y sin adición de hormonas. La actividad se expresa en porcentaje de conversión CAT.

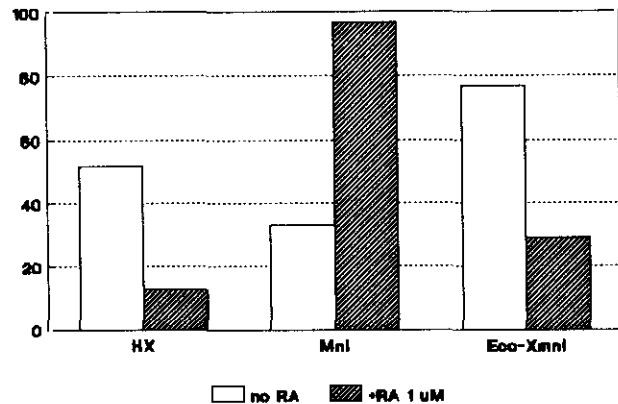


Fig. 45. Efecto de la adición de RA a distintos fragmentos del *enhancer* del gen de la BK6* cotransfectados con RAR α . La actividad se mide en porcentaje de conversión CAT.

queratina en ambos tipos de epitelios, intentamos determinar seguidamente si las secuencias del *enhancer* del gen de la BK6* implicadas en la unión a factores de transcripción eran las mismas en células BMGE+H y en células de origen epidérmico. Debido a la inexistencia de líneas celulares originarias de epidermis de vaca, se utilizaron las células PB, originarias de epidermis de ratón. Se prepararon extractos nucleares de estas células y se comprobó su funcionalidad mediante ensayos de retardo en gel, tras lo cual se realizaron experimentos de *footprinting* con todos los fragmentos de DNA del promotor de la BK6* utilizados anteriormente en su caracterización. Los resultados fueron en su mayoría similares a los obtenidos con los extractos nucleares de células BMGE+H. Aunque menos nítidas, debido probablemente a problemas en la obtención de los extractos, se encontraron en células PB las mismas zonas protegidas que en células BMGE+H: una zona conteniendo una secuencia de reconocimiento para AP-1 en el fragmento 85 (fig. 46) y una amplia zona comprendida aproximadamente entre las posiciones -530 y -550 en los fragmentos MnlI y 195 (figs. 47B y C), que incluye el elemento de respuesta a ácido retinoico.

El presunto elemento AP-2, situado en el fragmento HX entre los nucleótidos -580 y -592 apareció con bastantes dificultades (no se muestra). Sin embargo, parece bastante probable que este elemento sea en realidad reconocido por los extractos nucleares de células PB y que la deficiente protección se deba, como en los otros casos, a problemas del extracto proteico, pues este fragmento 95 presenta un buen retardo en gel (no se muestra) y en toda la extensión del fragmento no aparece ninguna otra zona de posible protección.

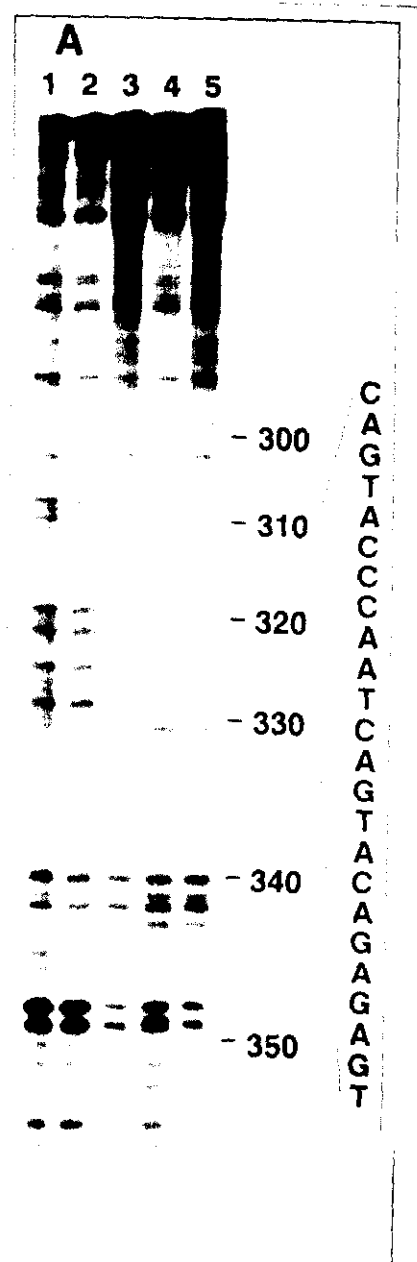


Fig. 46A. Footprint del fragmento 85 del *enhancer* del gen de la BK6* con extractos nucleares de células PB. Calles 1 y 2: sin proteína, 5 y 10 ng de DNasa I. Calle 3: 100 µg de extracto, 300 ng de DNasa I. Calle 4: 100 µg de extracto, 600 ng de DNasa I. Calle 5: 150 µg de extracto, 600 ng de DNasa I.

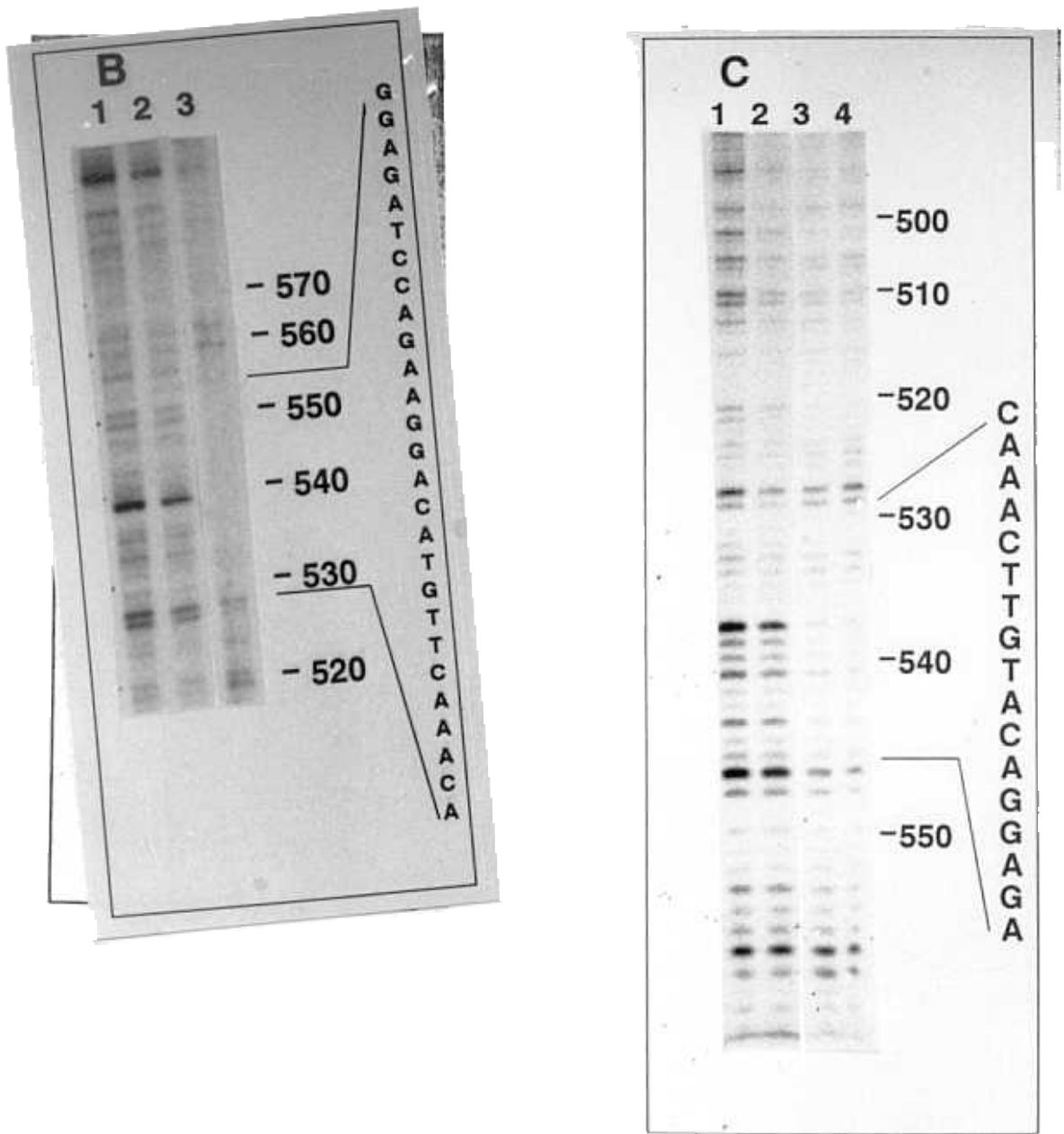
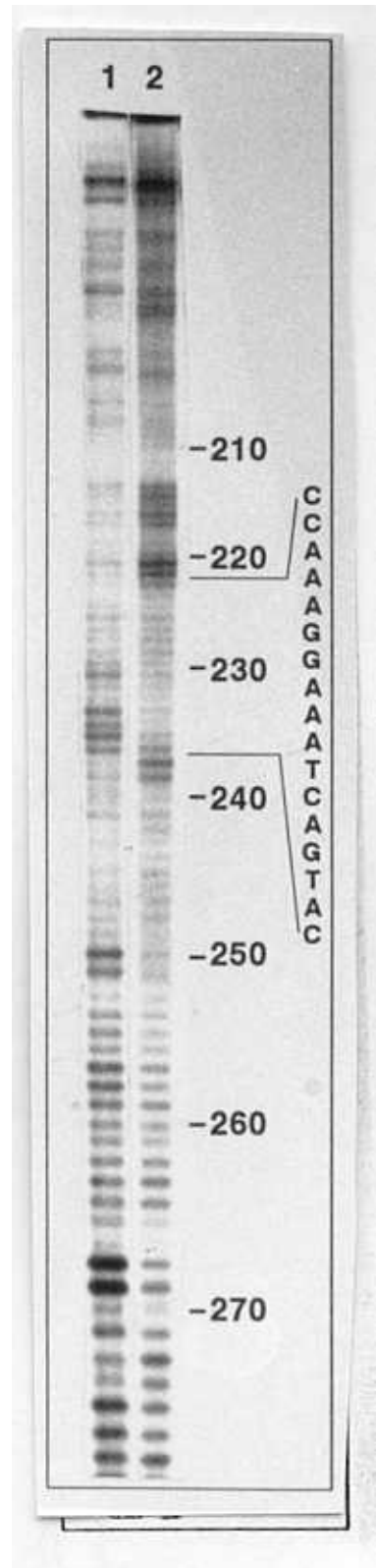


Fig. 47. Footprintings de diversos fragmentos del enhancer del gen de la BK6* con extractos nucleares de células PB. **B)** Fragmento Mnl. **C)** Fragmento 195. Para ambos fragmentos: Calles 1 y 2: sin proteína, 5 y 10 ng de DNAsa I. Calles 3 y 4: 100 µg de extracto, 300 y 600 ng de DNAsa I, respectivamente (en la figura 47B no hay calle 4).

En lo que se refiere a la "caja epidérmica" situada entre -220 y -237 que aparecía con dificultad en extractos nucleares de células BMGE+H (véase fig. 37), en extractos de células PB ésta volvió a aparecer (fig. 48), si no tan claramente como las demás secuencias protegidas sí con más nitidez que con los extractos de BMGE+H, sugiriendo que la proteína que se une a esta zona es más abundante en células PB que en BMGE+H. La *TATA box*, sin embargo, continuó carente de protección (no se muestra).

Fig. 48. Footprinting del fragmento 95 del promotor del gen de la BK6* con extractos nucleares de células PB. Calle 1: sin proteína, 10 ng de DNAsa I. Calle 2: 100 μ g de extracto, 300 ng de DNAsa I.



4. DISCUSSION

4.1. DISCUSION K6c

En el presente trabajo se ha intentado avanzar en el conocimiento de la estructura y regulación de la minifamilia de genes de la queratina K6 bovina, partiendo de la experiencia previa de que tanto en humanos como en bovinos existe más de un gen para esta queratina. Por ello, este trabajo consta de dos partes bien diferenciadas, pero relacionadas entre ellas: por un lado se han identificado las secuencias del *enhancer* del gen de la queratina bovina K6* implicadas en la funcionalidad de este *enhancer* específico de tipo celular. Por otro lado, se ha identificado y caracterizado un gen que codifica una nueva queratina llamada BK6c, estrechamente relacionada con la BK6* y la BK6.

4.1.1. La queratina 6: una minifamilia de genes.

En lo que respecta a la identificación del gen de la K6c, se realizó una búsqueda en una genoteca bovina con una sonda perteneciente al primer intrón del gen de la queratina K6 y se aislaron varios clones solapantes entre ellos que incluían un nuevo gen diferente de los de las queratinas K6 y K6* (que también fueron de nuevo identificados). Este gen codificaba una nueva proteína perteneciente a la familia de las queratinas. El gen aislado fue capaz de hibridar con la zona 5' codificante de la queratina K6*, al igual que con la zona 3' codificante de la queratina K6. Sin embargo, no fue capaz de hibridar con la zona 5' no codificante del gen de la queratina K6*, donde se encuentra la región reguladora (Blessing y cols, 1989), indicando que, aunque relacionado, es un gen distinto. Experimentos de hibridación DNA-RNA demostraron que este nuevo gen es abundantemente transcrito tanto en el animal *in vivo* como en líneas celulares en cultivo, y su patrón de expresión parece correlacionar bien con el de la queratina bovina K6*. Igualmente, los datos procedentes del análisis parcial de la secuencia de este gen indican que la proteína que codifica está estrechamente relacionada con las dos queratinas BK6 y BK6*. Debido a todo esto, ha recibido el nombre de queratina K6c.

El camino que ha llevado a la identificación de los tres genes de las queratinas 6 ha sido largo. La queratina K6 se identificó inicialmente a partir de un cDNA obtenido de hocico de vaca (Jorcano y cols., 1984). Con posterioridad, el análisis de una genoteca bovina llevó a la identificación del clon genómico para la K6* (Blessing y cols., 1987). Una búsqueda en esta misma genoteca condujo a la localización de un clon que incluía gran parte del gen de la K6 (Jorcano, no publicado, y este trabajo). De nuevo, y esta vez en este trabajo, otra búsqueda similar con una sonda más cercana a la zona aminoterminal condujo al hallazgo de cuatro clones diferentes, solapantes entre ellos, que incluían diversas partes del gen de la queratina K6c. Además, también fueron hallados los dos clones genómicos ya descritos para los genes de la BK6 y BK6*. Cabe preguntarse si posteriores búsquedas llevarán a la identificación de más genes relacionados con la familia de la K6, pero la respuesta es probablemente negativa: en esta última búsqueda se han analizado un total de $1.25 \cdot 10^6$ clones, que a una media de 15 kb de inserto por clon dan un total de $1.875 \cdot 10^{10}$ kb, es decir, más de cinco veces el tamaño del genoma de un mamífero. Se han encontrado 6 clones positivos diferentes, con un total de 15 copias, lo que indica que los cálculos correlacionan bien con los resultados, aunque no se puede descartar la posibilidad de que exista algún otro gen que esté representado con menor eficiencia en la genoteca o sea más recalcitrante a la amplificación y no haya sido detectado. Abundando sobre este tema, resulta

cuanto menos curioso que existan cuatro clones distintos que abarquen el gen de la K6c, con un total de 12 positivos encontrados, y sólo un clon (con dos positivos) para la K6 y un único positivo para la K6*.

Los datos de expresión obtenidos hasta ahora (experimentos de *dot-blot*) indican que la expresión de los genes de K6* y K6c es comparable. En cualquier caso, parece claro que en esta genoteca no existe ningún otro clon que incluya el gen de la K6 completa. Tal vez exista al final del primer exón de este gen un sitio hipersensible a la digestión que impida que esté representado en la genoteca un gen completo. Las únicas formas factibles de identificar el promotor del gen de la K6 con vista a posteriores estudios serían utilizar otra genoteca de diferente origen, con la esperanza de encontrar un gen completo para la K6, o bien hacer una hibridación con el extremo 5' codificante de las K6* ó K6c y posteriormente desechar aquellos clones que pertenezcan a alguno de estos dos genes. Esta última aproximación implica la presunción de que los extremos aminoterminales de esta queratina están conservados con respecto a las otras dos, suposición que parece lógica a la vista de la homología existente en las zonas comparadas.

Los genes de las queratinas suelen estar agrupados en cúmulos. En el caso de humanos, las queratinas ácidas parecen agruparse en el cromosoma 17 y las básicas en el 12 (Waseem y cols., 1990b; Savtchenko y cols., 1990). Sin embargo, no se conoce la localización precisa de los genes de la K6. Se sabe que en la vaca el gen de la K6* se encuentra a unas 11 kb por detrás del gen que codifica la K5 (Blessing y cols., 1987). En nuestro caso, hemos tratado de comprobar la existencia de algún otro gen de queratinas en los alrededores del gen de la K6c. La hibridación de todos los clones genómicos de la K6c con una sonda que contenía 200 pb de secuencia perteneciente al final de la α -hélice (la zona más conservada en las queratinas) dió resultado negativo, indicando que al menos en las 11 kb anteriores al gen y en las 6 que lo siguen no hay ningún otro gen de queratinas, lo que no excluye que existan más genes de queratinas fuera de estos márgenes.

El hecho de que existan tres formas prácticamente idénticas para una misma queratina es relativamente novedoso. Se conocen algunos casos en los que existen pseudogenes de queratinas, particularmente para las queratinas 8 y 18 (Vasseur y cols., 1985; Kulesh y Oshima, 1988; Savtchenko y cols., 1990), pero la mayoría de ellos parece haber perdido los intrones. Sin embargo, la K16 humana posee dos copias en tandem en el cromosoma 17, y aunque ambas poseen intrones, sólo una de ellas es activa (Rosenberg y cols., 1988). Este no es claramente el caso del grupo de queratinas K6 bovinas, en el que los tres genes se expresan *in vivo*, aunque *in vitro*, al menos en células BMGE+H, la expresión de K6 se pierde. Sin embargo, los estudios sobre la expresión de K16 de Rosenberg y cols. (1988) han sido hechos sólo mediante transfecciones en células COS de epitelio renal, por lo que aún sería posible que la situación *in vivo* fuera similar a la que ocurre con la K6, que es capaz de expresarse *in vivo* pero no *in vitro*. El hecho de que la K16 sea la queratina que forma pareja con la K6 añade interés a la idea.

Una importante diferencia en la secuencia del gen de la K6c es la que atañe a la señal de poliadenilación, que en este gen es AATGAAA en vez del consenso AATAAA. Esta señal indica el final de la transcripción y está implicada en la ruptura y posterior poliadenilación del mRNA, afectando a su estabilidad y traducibilidad, además de participar

en el *splicing* (Niwa y Berget, 1991). Experimentos de mutagénesis han demostrado que la tasa de poliadenilación *in vitro* de la secuencia AAUGAA es solamente el 4% de la del consenso (Sheets y cols., 1990). Sin embargo, la poliadenilación no sólo está regulada por la secuencia AAUAAA, sino que existe un segundo motivo en 3' que está implicado, y que puede modular al anterior (Proudfoot, 1991). Hasta el momento, no existe ningún dato que dé una idea de con qué eficiencia se traduce el RNA de la K6c.

4.1.2. Relación entre genes humanos y bovinos.

Los datos de que se dispone sobre patrón de expresión de queratinas se limitan, con la posible excepción de *Xenopus*, casi únicamente a mamíferos, y dentro de ellos principalmente a humanos y ratón (Moll y cols., 1982; Schweizer, 1992). También hay un cierto número de conocimientos referentes a las queratinas bovinas (Cooper y Sun, 1986), pero debido a que éstos animales son más difíciles de utilizar experimentalmente que el ratón y no tienen el mismo interés clínico que el hombre, la investigación sobre ellas es más limitada.

Mientras que en ratón sólo muy recientemente se ha encontrado un hipotético gen para la K6 (Finch y cols., 1991), en humanos también se han descrito dos genes que codifican formas diferentes de la K6. Inicialmente Hanukoglu y Fuchs (1983) aislaron de epidermis en cultivo un cDNA perteneciente a una queratina de 56 kD de peso que posteriormente recibiría el nombre de K6a. Con posterioridad, buscando la región reguladora de este gen en una genoteca humana, encontraron un clon genómico que codificaba la queratina K6b (Tyner y cols., 1985). Esta queratina K6b se expresa con bastante mayor intensidad que la K6a, habiéndose propuesto que la K6a es producto de una duplicación reciente y se encuentra en camino a convertirse en un pseudogen (Tyner y cols., 1985; Savtchenko y cols., 1990).

La semejanza del caso humano con el bovino hace pertinente el intentar determinar si existe alguna correspondencia entre los dos genes humanos y los tres de vacas. Las secuencias pertenecientes a las zonas codificantes son aún más similares entre sí en los genes de queratinas humanas que en los bovinos, pues existen sólo tres cambios no conservativos en toda la extensión del gen (Tyner y cols., 1985), y divergen relativamente de la secuencia de las queratinas bovinas. Pese a no poderse efectuar comparaciones intensivas de los extremos aminoterminal, por desconocerse por completo el de la BK6 y parcialmente los de la HK6a y BK6*, las comparaciones con las secuencias de que se dispone arrojan resultados interesantes. Aunque los 12 primeros aa de HK6b son absolutamente diferentes a los de BK6* y BK6c, el resto son bastante semejantes. De hecho, en esta zona HK6b difiere de BK6* en 36 aa de un total de 127 (72% de identidad), y de BK6c en 28 aa (78% de identidad). Además, en 4 de los 5 casos en que hay una diferencia en la secuencia de aa entre BK6* y BK6c (y en todas las diferencias conservativas en la secuencia de nucleótidos, excepto una) la secuencia de BK6c concuerda con la de HK6b, lo que hace pensar que HK6b es más similar a BK6c que a BK6*. Otro indicio de esto es la duplicación de cuatro aa (Gly-Phe-Gly-Gly) existente al final de la zona aminoterminal: mientras que BK6* carece de estos aa, HK6b tiene en esta posición una secuencia Ala-Leu-Leu-Cys. Estos resultados, a falta de conocer la secuencia en 5' de la BK6 y HK6a, sugieren que HK6b y BK6c representan una queratina equivalente.

La única zona que es conocida en los tres genes bovinos y los dos humanos, y lo suficientemente diferente para poder efectuar comparaciones es el extremo 3' no traducido. El análisis de las secuencias muestra que en esta zona, como en el resto del gen, las queratinas humanas y bovinas son más semejantes entre sí de manera intraespecífica que interespecífica, pero las semejanzas que se dan dentro de cada especie son muy diferentes. Así, las tres queratinas bovinas son idénticas (con una sola excepción) en las 50 primeras bases de esta zona, incluso en las 70 primeras para BK6 y BK6* (ver fig. 15) y posteriormente la similitud disminuye algo, manteniéndose en un 80% en los 400 pb de la zona 3' no traducida. Sin embargo, en el caso humano no ocurre así. Estas secuencias son considerablemente más largas que en el caso de bovinos (530 y 460 pb en HK6a y HK6b, respectivamente). La semejanza es también muy elevada inicialmente (91% en los primeros 124 pb), siendo el resto de la zona totalmente divergente, salvo en la señal de poliadenilación. En conjunto, la homología de toda la zona 3' no traducida sólo alcanza el 54% (Tyner y cols., 1985). La comparación entre genes humanos y bovinos arroja unos terminos del 40-50% de homología para cada dos genes comparados, lo que no es significativo. Sin embargo, existe un dato curioso: las similitudes entre humanos y bovinos en estas zonas 3' no traducidas de estas queratinas se dan principalmente en las últimas 200 bases de cada gen. La comparación de estas zonas da los siguientes resultados:

HK6a	100				
HK6b	40	100			
BK6	65	40	100		
BK6*	63	58	85	100	
BK6c	57	43	77	73	100
	HK6a	HK6b	BK6	BK6*	BK6c

Es decir, que en general el gen de la HK6a se parece en esta zona más a los tres genes bovinos que al gen de la HK6b. Este resultado es difícil de casar con el dato de que entre ambas queratinas HK6a y HK6b existen solamente 3 cambios no conservativos en toda la secuencia de su zona codificante. Sin embargo, es un argumento a favor de que queratinas humanas y bovinas sufrieron dos duplicaciones independientes con posterioridad a la separación de las ramas que dieron origen a ambos tipos de animales. En el caso de las queratinas humanas, su duplicación ha sido datada hace unos 25 millones de años, tras la separación de homínidos y cercopitecos (Savtchenko y cols., 1990). Para los genes bovinos esta duplicación o triplicación sería aún anterior, pues los tres genes son más diferentes entre sí que los humanos.

Esta homología relativamente baja entre las zonas 3' no traducidas no es habitual: en general, estas zonas están bastante conservadas entre genes homólogos de diferentes especies (Yaffe y cols., 1985). Incluso entre otras queratinas se dan homologías más altas en esta zona: es por ejemplo el caso de las queratinas M59 de ratón y B VI bovina, o de las queratinas K14 humanas y bovinas (Jorcano y cols., 1984b) o de la K19, con un 73% de

homología en el 3' no traducido entre la proteína humana y la bovina (Stasiak y cols., 1989).

4.1.3. Comparación de los intrones.

La secuenciación del primer intrón de los genes de las queratinas K6 y K6c permitió la comparación de los mismos, encontrándose una muy elevada homología entre ellos (fig. 21). Aunque no se han secuenciado ambos intrones en su totalidad, se pueden comparar unos 600 nucleótidos de cada uno (este intrón tiene una extensión entre 600 y 800 pb en las queratinas bovinas de tipo II, Lehnert y cols., 1984). En la zona secuenciada en ambos existe una homología de un 90%, ligeramente inferior a la de las zonas codificantes, pero superior a la de las zonas 5' y 3' no traducidas. Además, aunque no se dispone de la secuencia del intrón correspondiente de la K6*, no existe duda de que éste debe estar también conservado, pues hibridó con la sonda del intrón de la K6. Todos estos datos hacen pensar que estos intrones deben tener alguna importancia en la minifamilia de genes de la queratina 6. En este contexto, se conocen más genes de queratinas en los cuales hay conservación de intrones, si bien se refieren a conservación de un mismo gen entre diferentes especies. Así, Rieger y Franke (1989) han encontrado que el gen de la K10 está bastante bien conservado en humanos, vaca y ratón, incluyendo los intrones. Estos intrones están conservados en hasta un 70%, cifra similar a la de la zona codificante.

Desde hace algún tiempo, se conoce que los intrones pueden estar implicados en la regulación de la expresión de los genes. Brinster y cols. (1988) informaron que los intrones de diversos genes eran capaces de aumentar la actividad transcripcional de construcciones introducidas en ratones transgénicos. Se conocen actualmente algunos *enhancers* situados en el interior de intrones, incluso uno en el primer intrón del gen de la K18 (Oshima y cols., 1990). Este *enhancer* posee un sitio AP-1 que responde a la activación por *fos* y *jun*. Interesantemente, en los intrones de los genes de las queratinas K6 y K6c aparecen varias secuencias muy cercanas o coincidentes con los consensos de reconocimiento para AP-1, AP-2 y el receptor de glucocorticoides aunque, salvo en un caso, las secuencias no están conservadas entre los dos genes. Es una hipótesis a tener en cuenta, pues, el que estos intrones representen algún papel en la expresión de los genes de estas queratinas.

4.1.4. Expresión de BK6c.

Para estudiar el promotor del gen de la K6c se realizaron deleciones parciales de éste por el método de las digestiones con las nucleasas ExoIII y S1. Se analizaron fragmentos de este tamaño: 140 (Δ PstI), 314 (Δ 25.1), 532 (Δ 5.1), 630 (Δ EcoRI), 1100 (Δ HindIII), 3000 (Δ SphI), 4600 (Δ BglII), 7500 (Δ XbaI) y 10000 (Δ SalI). Debido a la dificultad derivada de las posiciones de los sitios de restricción en los diversos clones, estas construcciones fueron hechas a través de varios pasos intermedios. Finalmente se acoplaron todas ellas al vector pBLCAT3 (Luckow y Schütz, 1987) y se comprobó su capacidad activadora tras ser transfectadas en células BMGE+H. Estas células expresan la queratina BK6c, como se ha demostrado anteriormente. El resultado de estos experimentos mostró que la actividad máxima del promotor estaba localizada en los 1100 pb que cubría el fragmento HindIII. Los tamaños superiores eran gradualmente menos activos, sugiriendo la presencia de elementos inhibidores de la expresión génica en esta zona. Estos elementos inhibidores

o "silenciadores" han sido descritos en algunos genes, y parecen ser especialmente abundantes en el gen de la lisozima de pollo (Banahmad y cols., 1987). Tampoco son raros en los genes de filamentos intermedios: en el gen de la vimentina se ha identificado un silenciador a -568 del inicio de transcripción (Farrell y cols., 1990). Este silenciador puede ser inactivado por otras secuencias, sin capacidad *enhancer*, llamadas "antisilenciadores" (Stover y Zehner, 1992). Es posible, por tanto, que en el gen de la queratina BK6c suceda lo mismo, y la presencia de múltiples elementos silenciadores dispersos a lo largo del promotor sea la causa de que la actividad de éste baje gradualmente.

Para tamaños menores de 1100 nucleótidos, la actividad del promotor baja de nuevo gradualmente, indicando esta vez la progresiva pérdida de elementos activadores de la transcripción.

4.1.5. Posibles elementos reguladores del gen BK6c

A tenor de los elementos reguladores hallados en el *enhancer* del gen de la queratina BK6*, resulta pertinente intentar extrapolar estos datos a la queratina K6c, de la que se dispone de parte de su secuencia en la zona 5' no codificante. Si bien aún no se ha definido ningún *enhancer* en esta zona, sí se sabe que algunas partes de ella son necesarias para la actividad transcripcional (ver apartado 3.1.3). La figura 49 muestra la comparación de las secuencias 5' no traducidas de los dos genes BK6* y BK6c. Estas secuencias son muy parecidas en la zona que va desde el punto de *capping* del gen BK6* (nucleótido -60 a partir del inicio de traducción) hasta aproximadamente el nucleótido -178, es decir, durante los primeros 118 nucleótidos. A partir de este punto, la correspondencia se pierde gradualmente cuanto más se avanza en dirección 5'. Sin embargo, existen algunas zonas en las que vuelve a darse una homología muy elevada. Curiosamente, esas zonas corresponden a secuencias que parecen tener importancia en la regulación de la expresión del gen de la BK6*, como por ejemplo, la zona comprendida entre los nucleótidos -219 y -236, que incluye la *epidermal box* y un sitio de secuencia consenso para AP-1, y la zona que se encuentra entre -316 y -322, con el otro sitio AP-1. Es de destacar que en este último sitio sólo se encuentran conservados los nucleótidos que corresponden exactamente al consenso AP-1, es decir, la secuencia TGACTAA, mientras que el resto de esta zona protegida en experimentos de *footprinting* en el gen de la BK6* no está conservado en el caso de la BK6c, así como tampoco lo está el sitio Oct-1 que se encuentra en el gen de la BK6* fuera de la zona protegida, aunque contiguo a ella. Sin embargo, un palíndromo TCAGTGA que está situado entre las secuencias AP-1 y Oct-1 en el gen de la BK6*, fuera de la zona protegida, se encuentra también conservado en el gen de la BK6c, lo cual sugiere que pueda tener importancia biológica.

Igualmente parecen poseer alguna importancia biológica la *epidermal box* y el sitio AP-1 que la acompaña, puesto que están conservados en los dos genes. Aunque los experimentos de *footprinting* en células BMGE+H muestran solo una débil protección en esta zona del promotor de la BK6*, en las células epidérmicas murinas PB la protección parece ser mayor, lo que puede sugerir una mayor abundancia de este posible factor en las células de origen epidérmico.

La TATA *box* y la secuencia similar al consenso para AP-2 que se encuentra junto

Fig. 49 (página anterior). Comparación de las secuencias de nucleótidos de las partes 5' no traducidas de los genes BK6* y BK6c. La numeración se da a partir del inicio de traducción. La concordancia se indica por una barra vertical. Los sitios conservados de especial interés están en **negrita**. E-box: epidermal box. Pal: palíndromo no identificado. El interrogante en AP-2 denota la duda sobre su funcionalidad, y las flechas muestran el tamaño de algunas deleciones utilizadas en los experimentos de CAT.

a aquella en el promotor de la BK6* están perfectamente conservados en la BK6c, con una única sustitución de base en el consenso AP-2 de BK6c que la hace coincidir exactamente con la secuencia presente en el gen de la HK14 (Leask y cols., 1991). De nuevo, y como sucede en la BK6*, esta secuencia no parece capaz de conferir ninguna actividad por sí misma, pues su eliminación hace que la actividad CAT pase de un 11% (delección $\Delta 25.1$) a un 7.7% (delección Δ PstI) de la del fragmento EcoRI.

El sitio AP-1 situado a -320 sí parece ser importante, ya que su eliminación hace que la actividad CAT baje casi 3 veces, de un 30% (delección $\Delta 5.1$) a un 11% (delección $\Delta 25.1$). Aunque no se puede descartar que existan otros elementos importantes en el fragmento de DNA eliminado, a tenor de lo visto en el gen de la BK6*, en el que esta secuencia parece jugar un papel importante, y de la conservación de secuencia entre ambos promotores, este sitio AP-1 es un candidato obvio para estar implicado en la expresión de este gen.

Por encima del sitio AP-1 la homología se pierde casi por completo, no encontrándose nada que recuerde a los motivos AP-2 o RARE hallados en el promotor de la BK6*. Sin embargo, una búsqueda centrada en estas secuencias con condiciones más relajadas permite encontrar algunas similitudes de posible interés. Así, para el sitio AP-2 y sus inmediaciones se encuentran dos candidatos en el promotor de la BK6c, aunque ambos invertidos:

```

-586  TTCCCAGGCCAGG -574      -577  CAGGCCACCA -568
      |||||         |||
-513  TTCCA...CAGG -526      -393  CAC.CCACCA -401
  
```

Para el caso del elemento de respuesta a ácido retinoico también hay zonas con alguna homología, sobre todo para la segunda mitad. La más atractiva de todas ellas tal vez sea esta:

```

-539  ATGTTCAAACAT -528
      |||  |||||
-466  ATG.ACAAACAT -456
  
```

En cualquier caso, ninguna de las secuencias encontradas parece ser lo bastante similar a los consensos para AP-2 o el receptor del ácido retinoico como para estar implicada en la regulación por estos compuestos. Los elementos reguladores, si existen en este gen, deben hallarse por encima del sitio EcoRI, en la zona no secuenciada. Constituye, pues, un secreto cuales son los elementos eliminados en las deleciones $\Delta 5.1$ y $\Delta 25.1$ que causan que la actividad del promotor disminuya.

En resumen, a primera vista, las zonas en 5' de los genes BK6* y BK6c parecen ser muy diferentes en cuanto a su posible papel en la regulación: El gen K6* no tiene ningún silenciador identificado, y en la zona secuenciada de K6c no se encuentran varios de los elementos hallados en la BK6*. Por ahora no podemos saber si estas diferencias tienen sentido, pues no se sabe si ambas queratinas se regulan y responden a los mismos factores.

4.2. DISCUSION K6*

En la segunda parte de este trabajo se ha procedido a la caracterización del *enhancer* de la queratina bovina K6*. Este *enhancer* es, *in vitro*, responsable de la expresión específica de esta queratina, pues es activo sólo en los tipos celulares en los que ésta se expresa (Blessing y cols., 1989). Mediante experimentos de *footprinting* se muestra que en el *enhancer* existen tres sitios claramente protegidos. Uno de estos sitios es un sitio AP-1 y otro de ellos es similar al consenso para AP-2. El tercero de ellos consta de varios palíndromos superpuestos, lo que sugiere una compleja regulación. En esta tercera zona existen secuencias similares a las reconocidas por la familia de receptores de hormonas esteroideas, tiroideas y ácido retinoico. Se ha probado que este elemento se activa por ácido retinoico y no por glucocorticoides, pero también se demuestra que a pesar de ello el *enhancer* en su conjunto se inhibe por tratamiento con ácido retinoico, al igual que el propio gen.

4.2.1. Efecto del ácido retinoico en la expresión de los genes de queratinas.

Los retinoides son inhibidores de la diferenciación epitelial (Kopan y Fuchs, 1989). *In vivo*, la carencia de RA causa hiperqueratosis y promueve la diferenciación de los queratinocitos, mientras que la adición de retinoides estimula la actividad mitótica y promueve la hiperproliferación. *In vitro*, el exceso de retinoides en los cultivos de células epidérmicas suprime los rasgos asociados a la diferenciación, como la expresión de las queratinas K1 y K10, asociadas con la diferenciación terminal (Fuchs y Green, 1981) y las queratinas asociadas con hiperproliferación K6 y K16 (Kopan y Fuchs, 1989). La gran mayoría de estos efectos se dan a nivel transcripcional (Fuchs y Green, 1981; Kopan y cols., 1987; Kopan y Fuchs, 1987; Stellmach y Fuchs, 1989), aunque no se puede descartar que también se den durante la traducción (Stellmach y Fuchs, 1989).

Sin embargo, no todos los genes de queratinas responden de igual forma al tratamiento con RA. Mientras que *in vitro* los genes de las queratinas epidérmicas son inhibidos (Fuchs y Green, 1981; Kim y cols., 1984; Kopan y cols., 1987), en células epiteliales simples el RA estimula la producción de K7, K8, K18 y K19 (Kim y cols., 1987; Glass y Fuchs, 1988; Oshima y cols., 1988). Sin embargo, la expresión de estos genes tras la inducción está bastante retardada en el tiempo, del orden de 24 a 72 horas (Kim y cols., 1987; Stellmach y Fuchs, 1989). Puesto que los genes cuya transcripción se ve directamente afectada por hormonas esteroideas o RA responden en un plazo rápido, del orden de 3 a 24 horas (ver por ejemplo LaRosa y Gudas, 1988; Stellmach y cols., 1991), se puede pensar que en el caso de la inducción de las queratinas de epitelio simple algún otro gen es inducido directamente por el receptor del RA y su ligando, y es el producto de este gen intermediario el que está implicado en la variación de la transcripción de los genes de queratinas epiteliales.

En los queratinocitos epidérmicos el efecto del RA es radicalmente opuesto a lo que ocurre en células de epitelios simples. La adición de RA a queratinocitos provoca la disminución de la expresión de los genes de queratinas epidérmicas en menos de 24 horas, estando la transcripción disminuida ya a tiempos tan tempranos como 6 horas (Stellmach y cols., 1991).

Muy recientemente se ha comenzado a estudiar con mayor detalle cómo los genes de las queratinas son afectados por el RA. Stellmach y cols. (1991) hallaron que tanto un fragmento de 6 kb en 5' de la HK5 como otro de 2.3 kb en 5' de la HK14 reducían en gran medida su capacidad para activar la expresión de un gen heterólogo tras la adición de ácido retinoico, sugiriendo que en estos fragmentos hay secuencias de DNA responsables del fenómeno. Igualmente, Tomic y cols. (1990) han visto que el RA es capaz de reprimir en keratinocitos primarios la actividad promotora de cuatro fragmentos de promotor de las queratinas HK5, HK6, HK10 y HK14 unidos al gen CAT. Estos fragmentos sólo tienen actividad promotora en células de origen epidérmico, salvo el de HK14, que funciona en todos los tipos epiteliales (Jiang y cols., 1991). Para la represión de la expresión es necesaria la cotransfección con cualquiera de los tres receptores descritos para el ácido retinoico (Petkovich y cols., 1987; Brand y cols., 1988; Krust y cols., 1989).

El elemento presente en el fragmento Mnl del *enhancer* de la queratina BK6* se comporta de una forma distinta a los elementos descritos en el párrafo anterior. La capacidad de este elemento para activar la transcripción del gen CAT se multiplica por tres en respuesta al ácido retinoico en presencia de su receptor. Sin embargo, cuando se realiza el mismo experimento con el *enhancer* completo, el resultado es una inhibición de un 50%. Este hecho sugiere que el elemento sensible a ácido retinoico no actúa en solitario en la regulación de este gen, sino que su función se realiza interactuando con otros elementos, a los que quizás module.

Los ensayos de CAT muestran que el fragmento Mnl es activado por ácido retinoico. Sin embargo, en la zona protegida por *footprinting* existen varios palíndromos imperfectos superpuestos, resultando difícil identificar qué secuencia es la responsable de la respuesta a ácido retinoico. Recientes estudios han establecido que la respuesta a vitamina D, ácido retinoico u hormona tiroidea viene dada por la orientación y espaciado de un motivo básico (Näär y cols., 1991; Umesono y cols., 1991). La comparación con los modelos de secuencias propuestos por estos autores permitió encontrar semejanza con la estructura de disposición palindrómica del modelo AGGTCA (Näär y cols., 1991):

Palíndromo		AGGTCATGACCT	
BK6*	-544	AGGACATGTTCA	-533

Donde las bases que coinciden con el modelo están en negrita, y las protegidas en los *footprints* subrayadas. Un elemento natural análogo, el del gen de la hormona del crecimiento de rata, responde tanto a ácido retinoico como a hormona tiroidea (Näär y cols., 1991). Sin embargo, no es esta la única ordenación posible en la zona protegida. También se puede encontrar, y en los mismos nucleótidos, el motivo AGGTCA duplicado:

Repetición		AGGTCAAGGTCA	
BK6*	-544	AGGACATGTTCA	-533

Mientras que, según la disposición palindrómica, este elemento del gen de la BK6* sería activado por el ácido retinoico y la hormona tiroidea, una secuencia similar a la repetición directa hallada en el gen β TSH de ratón no es afectada por el ácido retinoico, pero sí inhibida por la hormona tiroidea (Näär y cols., 1991). Aunque se desconocen los posibles efectos de la hormona tiroidea sobre la expresión de la queratina K6*, el hecho de que ésta sea activada por el ácido retinoico sugiere que este elemento puede seguir el modelo del palíndromo sin espaciado. Otros posibles modelos, como la repetición del motivo con un espaciado de tres bases (que correspondería a elemento de respuesta exclusivamente a ácido retinoico) no han podido ser encontrados.

Al parecer existe un bajo nivel de receptor de ácido retinoico en las células BMGE+H, como parece desprenderse de la necesidad de cotransfectar con RAR α para obtener una activación de la expresión en respuesta al ácido retinoico (fig. 44), aún en condiciones en que este compuesto ha sido eliminado del medio, con lo que en teoría todo el receptor estaría disponible. Otro hecho que avala esta hipótesis es que el fragmento HX (AP-2) es capaz de competir con el fragmento Mnl de forma más eficiente que el fragmento 195 (RARE).

A primera vista resulta sorprendente que ambos fragmentos, HX y 195, puedan competir la unión de Mnl con factores nucleares de BMGE+H con alta eficiencia, sin que compartan ninguna secuencia (ver fig. 42). Particularmente, HX es capaz de competir por completo con el fragmento Mnl, pese a carecer de sitio RARE. De un modo similar, el fragmento 195 es capaz de competir parcialmente con la unión del fragmento HX (fig. 41). Este hecho podría indicar que ambos factores son capaces de interactuar con ambos elementos, RARE y AP-2, al menos en este entorno. Hasta donde hemos visto, tal cosa no ha sido descrita todavía en la literatura, aunque sí se conocen múltiples interacciones entre otros factores de transcripción (AP-1, GR, RARE).

Las células BMGE+H, que expresan las queratinas K5, K6, K14 y K16, son originarias de epitelio de glándula mamaria bovina, y sido cultivadas en presencia de hidrocortisona, insulina y prolactina. Las células BMGE-H, aisladas a partir de la misma población pero sin ser tratadas con hormonas, no expresan estas queratinas, sino K8 y K18 (Schmid y cols., 1983). Puesto que en el fragmento Mnl del *enhancer* de la K6* existe una zona protegida por *footprinting* en la que se encuentran secuencias que tienen cierta semejanza con las secuencias de reconocimiento de la familia de receptores de hormonas esteroides, particularmente la del receptor de glucocorticoides (Beato, 1989), se podría pensar que la hidrocortisona (hormona perteneciente al grupo de los glucocorticoides) podría tener algún papel en la expresión de este gen. Sin embargo, la adición de hidrocortisona a células BMGE+H crecidas en suero deslipidizado y transfectadas con el fragmento Mnl del *enhancer* de la K6* no tuvo ningún efecto en la actividad de este *enhancer*, ni aún cuando éste era cotransfectado con un plásmido que codificaba el receptor de glucocorticoides, lo que sugiere que esta hormona tampoco está implicada en la regulación de la expresión de esta queratina, al menos en lo que al *enhancer* se refiere.

4.2.2. El elemento AP-1

El fragmento 85 (situado entre las posiciones -270 y -353) es capaz de formar un

complejo con extractos nucleares de células BMGE+H y PB y dar una intensa banda retenida. Por experimentos de *footprint* se encuentra entre las posiciones -308 y -329 una zona protegida que incluye una secuencia TGACTAA cercana al consenso TGACTCA para el elemento AP-1 (Angel y cols., 1987). Esta secuencia TGACTAA parece ser responsable de la mayor parte de la actividad del *enhancer* de la BK6* en células BMGE+H, pues en experimentos de CAT este fragmento 85 es capaz de activar la expresión del gen CAT un 85% del valor conseguido utilizando el *enhancer* completo, un valor muy por encima del de los demás fragmentos.

La existencia de elementos AP-1 parece ser un hecho relativamente común en los genes de las queratinas: en el gen de la HK18 se ha definido una secuencia TGAGTCA, sensible a la activación por *c-fos* y *c-jun* (Oshima y cols., 1990). Igualmente, en la queratina bovina BK5 existe un *enhancer* con un sitio de unión AP-1 canónico responsable de la actividad de este *enhancer* (Casatorres y cols., en preparación), que es capaz de competir eficientemente con el elemento AP-1 del *enhancer* de la K6*. Así pues, la activación por AP-1 parece estar extendida entre los genes de las queratinas. Sin embargo, existen diferencias entre las secuencias de estos tres sitios AP-1, lo que tal vez indique diferencias en su actividad o en las proteínas que unen.

La secuencia TGACTAA encontrada en el *enhancer* del gen de la K6* es idéntica a las dos encontradas en el promotor del papilomavirus humano HP18 (García-Carranca y cols., 1988; Offord y Beard, 1990) e, invertida, en el *enhancer* constitutivo de este mismo gen (Mack y Laimins, 1991). Las comparaciones con papilomavirus son de interés, pues estos virus se expresan únicamente en las capas suprabasales de algunos epitelios estratificados. Las similitudes con el caso de HP18 van más allá: en este virus se ha encontrado que la activación transcripcional se debe a la presencia de dos elementos: un sitio AP-1 y otro llamado KRF-1 que confiere a este virus especificidad epidérmica. La secuencia de KRF-1 no ha sido delimitada con precisión, pero se ha visto que solapa con un sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Oct-1, con el cual compite (Mack y Laimins, 1991). También en HP18, Hoppe-Seyler y cols. (1991) han encontrado que existe un sitio de unión para este factor Oct-1 y que la expresión de la proteína Oct-1 es capaz de inhibir el *enhancer* de este virus. Curiosamente, cerca del sitio AP-1 del *enhancer* de la BK6* (posiciones -291 a -298) existe una secuencia ATTTACAT, muy cercana al consenso ATTTGCAT para Oct-1. Estas secuencias se hallan a la misma distancia (16 pb) una de otra en ambos *enhancers*, HP18 y BK6*, si bien en distinta orientación (para un mapa de la región activadora de HP18 ver García-Carranca y cols., 1988), lo que sugiere fuertemente que el factor transcripcional ubicuo Oct-1 puede estar implicado en la represión del gen de la BK6*.

Experimentos previos han demostrado que el *enhancer* de la BK6* es funcional en células AT5 y BMGE+H, pero no en células MDBK ni 3T3 (Blessing y cols., 1989). Aunque a primera vista pueda parecer curioso que un *enhancer* dependiente de AP-1 no sea funcional en estos tipos celulares, se han descrito casos similares. Al parecer, las diferentes proteínas fos y jun miembros del complejo AP-1 se expresan de forma diferente según el tipo celular (Curran y Franza, 1988). Así, volviendo de nuevo al papilomavirus humano HP18, se ha encontrado que un elemento AP-1 del promotor de este virus (responsable de la expresión específica en queratinocitos) es capaz de dar un *footprinting* con extractos

nucleares de queratinocitos y células HeLa, pero no de diversas líneas de fibroblastos, células en las que se sabe que otros genes sensibles a AP-1 son activados (Offord y Beard, 1990).

El tratamiento con RA es capaz de reducir la capacidad activadora del *enhancer* completo. Es de suponer que esta inhibición se haga a través del elemento AP-1, responsable de la mayor parte de la actividad del *enhancer*. Este hecho no resulta sorprendente, puesto que se sabe desde hace poco tiempo que el elemento AP-1 es susceptible de ser inhibido por otros factores de transcripción pertenecientes a la familia de los receptores de esteroides, como el receptor de glucocorticoides, que es capaz de inhibir este elemento mediante interacción directa con c-jun, sin necesidad de contacto con el DNA (Jonat y cols., 1990; Schüle y cols., 1990; Yang-Yen y cols., 1990). Igualmente, Schüle y cols. (1991) han hallado recientemente que el ácido retinoico también es capaz de reprimir la activación transcripcional del elemento AP-1 por mediación de los receptores RAR α , β y γ , mientras que los receptores RXR son incapaces de efectuar esta represión. La inhibición se efectúa, al menos en el caso del RAR α , por interacción directa con c-jun, como en el caso del receptor de glucocorticoides.

La presencia de un sitio AP-1 funcional en el *enhancer* de este gen explica satisfactoriamente la inducibilidad de esta queratina por TPA (Toftgard y cols., 1985), puesto que este compuesto actúa por mediación de la estimulación por fos y jun sobre un sitio AP-1 (Angel y cols., 1987).

4.2.3. El elemento AP-2.

En el *enhancer* de la K6* se encuentra protegida por *footprint* una zona comprendida entre las posiciones -580 y -592 a partir del inicio de traducción, que incluye la mayor parte de la secuencia GCCCCAGGC (-578 a -586). Esta secuencia es similar, pero no idéntica a la secuencia consenso GCCCCAGGC para el factor de transcripción AP-2 (Williams y cols., 1988). Experimentos recientes de *footprinting*, interferencia de metilación y mutagénesis han permitido definir como nuevo consenso para AP-2 la secuencia GCCNNCCG (Williams y Tjian, 1991). Sin embargo, muchos de los sitios AP-2 identificados hasta ahora se desvían de este consenso. Secuencias similares se han encontrado en varios genes de queratinas, como se muestra en la tabla II. Todas las secuencias de la parte superior de esta tabla están funcionalmente relacionadas con el factor de transcripción AP-2: las encontradas en los genes XK81A, HK14 y HK5 son capaces de unir este factor, y las halladas en HK1 y HK6b son capaces de competir esta unión, si bien en el caso de HK6b no muy eficientemente (Snape y cols., 1991; Leask y cols., 1991). En el caso de la queratina BK6* sólo la secuencia comprendida entre -578 y -586 de las varias mostradas en la tabla II parece ser capaz de unir algún factor, como se demuestra por experimentos de *footprinting* (figs. 30 y 31), aunque no se ha demostrado que esa proteína sea AP-2. La secuencia que se halla entre -133 y -141, pese a ser prácticamente idéntica a la identificada en la HK14, no parece ser funcional, pues como se ha visto no es capaz de producir una banda retenida en experimentos de retardo en gel ni está protegida en experimentos de *footprinting*. Lo mismo parece suceder con la secuencia situada entre -482 y -492 (figs. 30 y 34).

<i>Gen</i>	<i>Posición</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Referencia</i>
CONSENSO	---	GCCCCAGGC	Williams y cols., 1988
XK81A1	-152 -162	CCCTGAGGC	Snape y cols., 1991
HK14	-222 -231	CCTGCAGGC	Leask y cols., 1991
HK5	-92 -100	CCCCCAGGC	Lersch y cols., 1989
HK1	-113 -122	GCTGCAGGC	Johnson y cols., 1985
HK6b	-255 -265 (*)	GCTGGAGGC	Tyner y cols., 1985
BK6*	-578 -586 (*) -573 -581 -484 -492 -133 -141	TTCCCAGGC AGGCCAGGC ACCACAGGC TCTGCAGGC	Este trabajo

Tabla II. Secuencias relacionadas con AP-2 encontradas en genes de queratinas. La posición se indica desde el punto de inicio de la transcripción, salvo en los genes marcados con asterisco, desde el inicio de traducción. Los nucleótidos conservados se muestran en negrita.

La secuencia AP-2 no parece estar ni estar implicada en la expresión específica en epidermis, ni ser la única responsable de la actividad *enhancer*. En el gen de la HK14, se ha demostrado que un fragmento con el sitio AP-2 es insuficiente para dirigir la expresión de un gen heterólogo en ensayos de CAT o de una versión modificada de la queratina 14 en ratones transgénicos ó células SCC13, precisando la presencia de un elemento localizado entre 1000 y 2000 nucleótidos en 5' de esta secuencia para ser funcional (Leask y cols., 1990). En el gen de la BK6*, el fragmento HX, que contiene el hipotético sitio AP-2 es capaz de alcanzar el 30% de la actividad total del *enhancer* (fig. 40), lo cual constituye una importante diferencia con respecto al correspondiente fragmento del gen de la HK14, cuya contribución al funcionamiento del promotor en ensayos de CAT es inferior al 2% (Leask y cols., 1990). Sin embargo, la presencia de una zona situada entre las posiciones -600 y -610 y que de manera irreproducible aparece protegida en experimentos de *footprinting* no permite asegurar con certeza que el elemento AP-2 sea el responsable de esa actividad. Tal vez la presencia de este elemento sea necesaria para la correcta actividad de AP-2. Es claro que hace falta más trabajo antes de encontrar la respuesta.

Con respecto a la capacidad activadora de AP-2 los datos publicados son contradictorios. Imagawa y cols. (1987) han visto que cinco sitios AP-2 en tándem tienen actividad *enhancer* en células HeLa, mientras que Kanno y cols. (1989) no pudieron encontrar esa actividad, probablemente debido al diferente contexto de cada secuencia. Williams y Tjian (1991) han encontrado que en estas mismas células tres sitios AP-2 en tándem son capaces de tener actividad *enhancer* sólo si son cotransfectados con un plásmido de expresión del factor AP-2, indicando que o bien el nivel de la proteína AP-2 de células HeLa es demasiado bajo, o bien su expresión está reprimida.

El factor de transcripción AP-2 es inducible por varios estímulos diferentes, entre los que se cuentan TPA y cAMP (Imagawa y cols., 1987). Igualmente, la expresión de este factor se induce a nivel transcripcional por tratamiento con ácido retinoico (Lüscher y cols., 1989). Puesto que varios genes que se activan por ácido retinoico llevan una secuencia AP-2, se ha propuesto que el factor de transcripción AP-2 está implicado en la activación génica por tratamiento con ácido retinoico. Esto contrasta con los resultados que hemos obtenido, en los cuales la adición de 1 μ M de ácido retinoico (y su receptor) inhibe la capacidad del fragmento HX para activar la transcripción del gen CAT en más de un 50%. Hasta donde llega nuestro conocimiento, no hay noticia de que el ácido retinoico sea capaz de interactuar negativamente con el elemento AP-2, al igual que hace con el AP-1 (ver anteriormente).

4.2.4. La "caja epidérmica".

Blessing y cols. (1987) identificaron una secuencia consenso AARCCAAA que, con algunas desviaciones, se puede encontrar en la cercanía de la TATA-box en los promotores de los genes de las queratinas HK1 (Johnson y cols., 1985), HK6 (Tyner y cols., 1985), HK14 (Marchuk y cols., 1984), MK59 (Krieg y cols., 1985), BK1a y Ib, BK6* (Blessing y cols., 1987), BK10b (Rieger y cols., 1985), todas ellas expresadas en epidermis, mientras que en otras queratinas de epitelios simples no se halla presente. Esta secuencia se puede encontrar también, si bien algo más alejada de la TATA-box, en el promotor de la involucrina (Eckert y Green, 1986), otra proteína expresada específicamente en epidermis, y en el promotor del papilomavirus humano HP16 (Cripe y cols., 1987). Todos estos datos sugieren que esta secuencia puede estar implicada en la regulación de la transcripción de genes expresados en epidermis. Sin embargo esta caja epidérmica se hallaba fuera de la zona definida como *enhancer* en el gen de la queratina K6*, indicando que no era necesaria para la expresión del gen en las células de origen epitelial BMGE+H ni en las derivadas de epidermis AT-5 (Blessing y cols., 1989).

El análisis por retardo en gel y *footprinting* del promotor del gen de la K6* mostró que el fragmento 95, que incluía esta secuencia, era capaz de unir proteínas de extractos nucleares de la línea BMGE+H, si bien con menor intensidad que los demás fragmentos. Similarmente, en los ensayos de *footprinting* se apreciaba una zona ligeramente protegida que coincidía con la posición de la "caja epidérmica" y un sitio AP-1 contiguo. Del mismo modo, con extractos nucleares de la línea epidérmica PB también se obtuvo una banda retenida y la consiguiente zona protegida, en ambos casos con mayor definición que con extractos de células BMGE+H (a pesar de que las demás zonas de unión a proteínas en el *enhancer* estaban menos intensamente protegidas), sugiriendo que tal vez esta proteína sea especialmente abundante en células de origen epidérmico.

La zona protegida incluía las 6 primeras bases de las 8 con las que cuenta el consenso de la "caja epidérmica" y además las 11 bases inmediatamente anteriores a este consenso. Curiosamente, en estas 11 bases se encuentra un sitio consenso para AP-1, idéntico al que se encuentra en la zona delimitada como *enhancer*. También resulta curioso observar que esta secuencia AP-1 del promotor de la BK6* se halla conservada tanto en el promotor de la BK6c como en el gen humano correspondiente (HK6b, Tyner y Fuchs 1985), mientras que está ausente en el resto de los promotores de los otros genes de queratinas en los que existe *epidermal box* (BK1a y Ib, MK59, etc.). Al igual que en el caso de la

secuencia AP-1 del fragmento 85, este hecho podría estar implicado en la observada inducibilidad de la queratina K6 en respuesta a TPA. A este respecto, es interesante destacar que el gen de la BK5, que contiene un sitio AP-1, no es estimulado por el tratamiento con TPA (Casatorres y cols., en preparación)

4.2.5. Regulación de la queratina BK6*.

La queratina BK6* tiene una expresión compleja: constitutiva en ciertos tejidos e inducible en otros. Es de esperar que la regulación de su expresión sea también compleja. El *enhancer* analizado ha resultado, por tanto, complejo. En este estudio se han identificado varios factores presumiblemente implicados en la regulación: un elemento AP-1 (situado entre -308 y -329), un elemento de respuesta a ácido retinoico (entre -523 y -548) y un elemento AP-2 (entre -580 y -592). Estos elementos interactúan entre sí, como demuestran los ensayos de CAT. Los datos obtenidos explican potencialmente la respuesta de esta queratina al ácido retinoico y la inducibilidad por TPA y procesos inflamatorios.

Sorprendentemente, sólo se han encontrado elementos no específicos en este *enhancer* específico (La caja epidérmica, posible elemento específico, se halla fuera de la zona definida como *enhancer*). Tal vez se pueda atribuir esto a problemas metodológicos (incapacidad de detectar otras proteínas que se unan al DNA), o puede ser que en esta región sólo existan estos elementos, y sea la combinación de factores generales la que resulte en especificidad, quizás con el auxilio de otras proteínas específicas que no se unan directamente al DNA. Otra posibilidad sería que los factores que se unen a estos elementos no fuesen los comunes, sino otras formas específicas de estos tipos celulares que fuesen capaces de conferir actividad a este *enhancer*. Estas tres posibilidades no se excluyen mutuamente.

5. CONCLUSIONES

1.- A partir de una genoteca bovina se han aislado cuatro clones genómicos solapantes entre sí que codifican el gen de una queratina con homología con las queratinas BK6 y BK6*. El análisis parcial de la secuencia de esta nueva queratina ha revelado que pertenece a la misma familia que las queratinas BK6 y BK6*, y por consiguiente ha recibido el nombre de BK6c.

2.- La queratina BK6c tiene un promedio de un 97% de identidad con las otras dos (BK6 y BK6*) en las zonas hipervariables N- y C- terminales, y una homología del 80% en la zona 3' no traducida y del 90% en el primer intrón del gen.

3.- El gen de la BK6c se transcribe abundantemente en tejidos y líneas celulares descritos como positivos para K6 (lengua, hocico, células BMGE+H), pero no en aquellos donde no está descrita expresión de K6 (epitelio de glándula mamaria, células BMGE-H). El gen de la BK6, sin embargo, no se transcribe en células BMGE+H.

4.- Se han realizado diversas construcciones acoplado diferentes extensiones de secuencia 5' no codificante del gen de la queratina BK6c a un vector conteniendo el gen CAT, con objeto de localizar los elementos responsables de su expresión. Se ha encontrado que la expresión máxima se da con un fragmento que contiene las primeras 1100 pb desde el inicio de traducción, disminuyendo la expresión para tamaños mayores, lo que sugiere la existencia de elementos silenciadores. Igualmente, parecen existir varios elementos responsables de la expresión del gen, pues deleciones graduales llevan a disminuciones parciales de la actividad promotora. Esta estructura difiere de la del gen BK6*.

5.- En el *enhancer* del gen de la BK6* se han identificado, por experimentos de retardo en gel y *footprinting*, tres secuencias capaces de unir proteínas nucleares de células epiteliales que expresan esta queratina. Una de estas secuencias es un sitio AP-1, otra tiene alta homología con un sitio AP-2 y la tercera parece ser un elemento de respuesta a ácido retinoico.

6.- Estos tres elementos parecen contribuir de forma diferente a la actividad del *enhancer* en ensayos de CAT. El sitio AP-1 parece ser preponderante en este *enhancer*.

7.- Tras la adición de ácido retinoico 1 μ M, la actividad del fragmento Mnl (conteniendo sitios de respuesta a ácido retinoico y AP-2) se estimula tres veces, mientras que la actividad del sitio AP-2 (fragmento HX) y del *enhancer* completo se reduce a la mitad, lo que demuestra que este elemento es funcional y sugiere que el ácido retinoico puede interactuar negativamente con otros elementos de respuesta a factores de transcripción, como AP-1 y AP-2.

8.- La relación entre los sitios de respuesta a ácido retinoico y AP-2 es muy estrecha, puesto que, además de lo expuesto en el punto 7 de las conclusiones, los dos sitios son capaces de competir mutuamente en ensayos de retardo en gel, incluso estando situados en fragmentos que no comparten ninguna secuencia, sugiriendo de nuevo una posible interacción entre ambos sitios.

9.- Fuera del *enhancer* existe una secuencia que tiene homología con la llamada "caja

epidérmica", hallada en genes expresados en epidermis. Esta secuencia produce un *footprint* tanto en células BMGE+H como en las células epidérmicas PB, lo que constituye la primera prueba de la posible funcionalidad de este elemento.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abe, M. and Oshima, R.G. (1990). A single human keratin 18 gene is expressed in diverse epithelial cells of transgenic mice. *J. Cell Biol.* 1990, 1197-1206.
- Aebi, U., Häner, M., Troncoso, J., Eichner, R. and Engel, A. (1988). Unifying principles in intermediate filament (IF) structure and assembly. *Protoplasma* 145, 73-81.
- Agarwal, C., Rorke, E.A., Irwin, J.C. and Eckert, R.L. (1989). Immortalization by human papillomavirus type 16 alters retinoid regulation of human ectocervical epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 51, 3982-3989.
- Akhurst, R.J., Fee, F. and Balmain, A. (1988). Localized production of TGF β mRNA in tumour promoted-stimulated mouse epidermis. *Nature* 331, 363-365.
- Albers, K. and Fuchs, E. (1987). The expression of mutant epidermal keratin cDNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. *J. Cell Biol.* 105, 791-806.
- Albers, K. and Fuchs, E. (1989). Expression of mutant keratin cDNA in epithelial cells reveals possible mechanisms for initiation and assembly of intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 108, 1477-1493.
- Angel, P., Masayoshi, I., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell* 49, 729-739.
- Bader, B.L., Magin, T.M., Hatzfeld, M. and Franke, W.W. (1986). Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. *EMBO J.* 5, 1865-1875.
- Bader, B.L. and Franke, W.W. (1990). Cell type-specific and efficient synthesis of human cytokeratin 19 in transgenic mice. *Differentiation* 45, 109-118.
- Bader, B.L., Magin, T.M., Freudenmann, M., Stump, S. and Franke, W.W. (1991). Intermediate filaments formed de novo from tail-less cytokeratins in the cytoplasm and in the nucleus. *J. Cell Biol.* 115, 1293-1307.
- Bailleul, B., Surani, M.A., White, S., Barton, S.C., Brown, K., Blessing, M., Jorcano, J.L. and Balmain, A. (1990). Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a *ras* oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 62, 697-708.
- Baniahmad, A., Muller, M., Steiner, C. and Renkawitz, R. (1987). Activity of two different silencer of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. *EMBO J.* 6, 2297-2303.
- Baribault, H. and Oshima, R.G. (1991). Polarized and functional epithelia can form after the targeted inactivation of both mouse keratin 8 alleles. *J. Cell Biol.* 115, 1675-1684.
- Bascom, C.C., Wolfshohl, J.R., Coffey, R.J.J., Madisen, L., Webb, N.R., Purchio, A.R., Derynck, R. and Moses, H.L. (1989). Complex regulation of transforming growth factor β 1, β 2 and β 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factor β 1 and β 2. *Mol. Cell Biol.* 9, 5508-5515.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.
- Benton, W.D. and Davies, R.W. (1977). Screening λ gt10 recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196, 180-182.
- Besnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H.J. and Freese, E. (1991). Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J. Biol. Chem.* 266, 18877-18883.
- Bird, A. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

- Birnboim, H.L. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blessing, M., Zentgraf, H. and Jorcano, J.L. (1987). Differentially expressed bovine cytokeratin genes. Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5'-upstream sequences. *EMBO J.* 6, 567-575.
- Blessing, M., Jorcano, J.L. and Franke, W.W. (1989). Enhancer elements directing cell-type-specific expression of cytokeratin genes and changes of the epithelial cytoskeleton by transfections of hybrid cytokeratin genes. *EMBO J.* 8, 117-126.
- Blumemberg, M. (1988). Concerted gene duplications in the two keratin gene families. *J. Mol. Evol.* 27, 203-211.
- Bonifas, J.M., Rothman, A.L. and Epstein, E.H. (1991). Epidermolysis Bullosa Simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254, 1202-1205.
- Bovolenta, P., Liem, R.K.H. and Mason, C.A. (1984). Transitions in form and cytoskeletal content of cerebral astroglia *in vivo*. *Dev. Biol.* 102, 248-259.
- Bowden, P.E., Quinlan, R.A., Breikreutz, D. and Fusenig, N.E. (1984). Proteolytic modifications of acidic and basic keratins during terminal differentiation of mouse and human epidermis. *Eur. J. Biochem.* 142, 29-36.
- Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. and Dejean, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 332, 850-853.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E. and Palmiter, R.D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 836-840.
- Burke, B. (1990). On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 186, 169-176.
- Burke, B. and Gerace, L. (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 44, 639-652.
- Capco, D.G., Wan, K.M. and Penman, S. (1982). The nuclear matrix: three dimensional architecture and protein composition. *Cell* 29, 847-858.
- Capetanaki, Y.G., Ngai, J. and Lazarides, E. (1984). Characterization and regulation in expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6909-6913.
- Carmo-Fonseca, M., Cidadao, A.J. and David-Ferreira, J.F. (1988). Filamentous cross-bridges link intermediate filaments to the nuclear pore complexes. *Eur. J. Cell Biol.* 45, 282-290.
- Chan, D., Goate, A. and Puck, T.T. (1989). Involvement of vimentin in the reverse transformation reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2747-2751.
- Ching, G.Y. and Liem, R.K.H. (1991). Structure of the gene for the neuronal intermediate filament protein α -internexin and functional analysis of its promoter. *J. Biol. Chem.* 266, 19459-19468.
- Chou, Y.H., Bischoff, J.R., Beach, D. and Goldman, R.D. (1990). Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34^{cdc2} phosphorylation of vimentin. *Cell* 62, 1063-1071.
- Chupilo, S.A. and Kravchenko, V.V. (1984). A simple and rapid method for sequencing DNA. *FEBS Lett.* 179, 34-36.
- Cooper, D. and Sun, T.-T. (1986). Monoclonal antibody analysis of bovine epithelial keratins. Specific pairs as defined by coexpression. *J. Biol. Chem.* 261, 4646-4654.

- Coulombe, P.A. and Fuchs, E. (1990). Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J. Cell Biol.* 111, 153-169.
- Coulombe, P.A., Chan, Y., Albers, K. and Fuchs, E. (1990). Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro. *J. Cell Biol.* 111, 3049-3064.
- Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A.S. and Fuchs, E. (1991a). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* 66, 1301-1311.
- Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Vassar, R. and Fuchs, E. (1991b). A function for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases. *J. Cell Biol.* 115, 1661-1674.
- Cowan, N.J. (1984). Tubulin genes and the diversity of microtubule function. In: *Oxford surveys on eukaryotic genes*. N. Maclean, ed. Oxford University Press, pp 36-60.
- Crémisi, C. and Duprey, P. (1987). A labile inhibitor blocks endo A gene transcription in murine undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* 15, 6105-6116.
- Crewther, W.G., Dowling, L.M., Steinert, P.M. and Parry, D.A.D. (1983). The structure of intermediate filaments. *Int. J. Biol. Macromol.* 5, 267-274.
- Crick, F.H.C. (1953). The Fourier Transform of a coiled-coil. *Acta Cryst.* 6, 685-688.
- Cripe, T.P., Haugen, T.H., Turk, J.P., Tabatabai, F., Schmid, P.G., Dürst, M., Gissmaann, L., Roman, A. and Turek, L. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6, 3745-3753.
- Curran, T. and Franza jr., B.R. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.
- Dale, B.A., Holbrook, K.A., and Steinert, P.M. (1978). Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature* 276, 729-731.
- Debus, E., Weber, K. and Osborn, M. (1983). Monoclonal Antibodies to desmin, the muscle specific intermediate filament. *EMBO J.* 2, 2305-2312.
- Denk, H., Lackinger, E., Cowin, P. and Franke, W.W. (1985). Maintenance of desmosomes in mouse hepatocytes after drug-induced rearrangement of cyokeratin filament material. Demonstration of independence of desmosomes and intermediate-sized filaments. *Exp. Cell Res.* 161, 161-171.
- Devereux, J., Haeberly, P. and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- Diffley, J.F.X. and Stillman, B. (1989). Transcriptional silencing and lamins. *Nature* 342, 24.
- Dignam, J.D., Russell, M.L. and Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11, 1475-1489.
- Dodemont, H., Riemer, D. and Weber, K. (1990). Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins: implications for the origin and the diversification of IF proteins. *EMBO J.* 9, 4083-4094.
- Döring, V. and Stick, R. (1990). Gene structure of the nuclear lamin LIII of *Xenopus laevis*; a model for the evolution of IF proteins from a lamin-like ancestor. *EMBO J.* 9, 4073-4081.

- Eckert, R.L. and Green, H. (1986). Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* 46, 583-589.
- Eckert, R.L. and Rorke, E.A. (1988). The sequence of the human epidermal 58 kD (#5) type II keratin reveals an absence of 5' upstream sequence conservation between coexpressed epidermal keratins. *DNA* 7, 337-345.
- Eichner, R., Bonitz, P. and Sun, T.T. (1984). Classification of epidermal keratins according to its immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J. Cell Biol.* 98, 1388-1396.
- Eichner, R., Sun, T.T. and Aebi, U. (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 102, 1767-1777.
- Eiden, M.V., MacArthur, L. and Okayama, H. (1991). Suppression of the chemically transformed phenotype of BHK cells by a human cDNA. *Mol. Cell Biol.* 11, 5321-5329.
- Farrell, F.X., Sax, C.M. and Zehner, Z.E. (1990). A negative element involved in vimentin gene expression. *Mol. Cell Biol.* 10, 2349-2358.
- Finch, J., Andrews, K., Krieg, P., Fürstenberger, G., Slaga, T., Ootsuyama, A., Tanooka, H. and Bowden, T.J. (1991). Identification of a cloned sequence activated during multistage carcinogenesis in mouse skin. *Carcinogenesis* 12, 1519-1522.
- Fischman, D.A. (1986). Myofibrillogenesis and the morphogenesis of skeletal muscle. In *Myology: Basic and Clinical*. (Ed. A.G. Engel and B.Q. Baker) McGraw-Hill, New York, pp 5-30.
- Fisher, D.Z., Chaudary, N. and Blobel, G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6450-6454.
- Fisher, C., Jones, A. and Roop, D.R. (1987). Abnormal expression and processing of keratins in pupoid fetus (pf/pf) and repeated epilation (Er/Er) mutant mice. *J. Cell Biol.* 105, 1807-1819.
- Fliegner, K.H., Ching, G.Y. and Liem, R.K.H. (1990). The predicted aminoacid sequence of α -internexin is that of a novel intermediate filament protein. *EMBO J.* 9, 749-755.
- Foisner, R., Traub, P. and Wiche, G. (1991). Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3812-3816.
- Franke, W.W., Schiller, D.L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Krepler, R. and Platzter, B. (1981). Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Mol. Biol.* 153, 933-959.
- Franke, W.W., Schmid, E., Schiller, D.L., Winter, S., Jarasch, E.D., Moll, R., Denk, H., Jackson, B.W. and Illmensee, K. (1982). Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biol.* XLVI, 431-453.
- Franke, W.W., Schiller, D.L., Hatzfeld, M. and Winter, S. (1983). Protein complexes of intermediate-sized filaments: melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7113-7117.
- Franke, W.W., Schiller, D.L., Hatzfeld, M., Magin, T.M., Jorcano, J.L., Mittnacht, S., Schmid, E., Cohlberg, J.A. and Quinlan, R.A. (1984a). Cytokeratins: complex formation, biosynthesis and interactions with desmosomes. In: *Cancer Cells I*. (Levine et al, eds.) Cold Spring Harbor, New York, 177-189.
- Franke, W.W., Schmid, E., Mittnacht, S., Grund, C. and Jorcano, J.L. (1984b). Integration of different keratins into the same filament system after microinjection of mRNA for epidermal keratins into kidney epithelial cells. *Cell* 36, 813-825.

- Franke, W.W. (1987). Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell* 48, 3-4.
- Franke, W.W., Cowin, P., Schmelz, M. and Kapprell, H.P. (1987). The desmosomal plaque and the cytoskeleton. *CIBA Found. Symp.* 125, 26-48.
- Franke, W.W., Jahn, L. and Knapp, A.C. (1989). Cytokeratins and desmosomal proteins in certain epithelioid and non-epithelial cells. In: *Cytoskeletal proteins in tumor diagnosis*. Cold Spring Harbor, New York, pp. 151-172
- Fraser, R.D.B., MacRae, T.P. and Rogers, G.E. (eds.) (1972). *Keratins*. C.C.Thomas, Springfield, Illinois.
- Fraser, R.D.B., MacRae, T.P., Parry, D.A.D. and Suzuki, E. (1986). Intermediate filaments in α -keratins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1179-1183.
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 9, 6505-6525.
- Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A. and Murray, N.J. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.
- Fuchs, E. (1988). Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *TIG* 4, 277-281.
- Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.* 111, 2807-2814.
- Fuchs, E. and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042.
- Fuchs, E. and Green, H. (1981). Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25, 617-625.
- García-Carranca, A., Thierry, F. and Yaniv, M. (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62, 4321-4330.
- Geisler, N., Kaufmann, E. and Weber, K. (1985). Antiparallel orientation of the two double-stranded coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments. *J. Mol. Biol.* 182, 173-177.
- Georgatos, S.D. and Blobel, G. (1987). Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 105, 117-125.
- Gerace, L. and Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277-287.
- Giudice, G.J. and Fuchs, E. (1987). The transfection of human epidermal keratin genes into fibroblasts and simple epithelial cells: evidence for inducing a type I keratin by a type II gene. *Cell* 48, 453-463.
- Glass, C. and Fuchs, E. (1987). Isolation, sequence, and differential expression of a human K7 gene in simple epithelial cells. *J. Cell Biol.* 107, 1337-1350.
- Glass, C. and Gerace, L. (1990). Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* 111, 1047-1057.
- Glick, A.B., Flanders, K.C., Danielpour, D., Yuspa, S.H. and Sporn, M.B. (1989). Retinoic acid induces transforming growth factor- β 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Reg.* 1, 87-97.
- Glick, A.B., Danielpour, D., Morgan, D., Sporn, M.B. and Yuspa, S.H. (1990). Induction and autocrine receptor binding of transforming growth factor- β 2 during terminal differentiation of primary mouse keratinocytes. *Mol.*

Endocrinol. 4, 46-52.

Goodbody, K.C., Hargreaves, A.J. and Lloyd, C.W. (1989). On the distribution of microtubule-associated intermediate filament antigens in plant suspension cells. *J. Cell Sci.* 92, 371-378.

Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 2, 1044-1051.

Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.

Gunning, P., Ponte, P., Kedes, L., Hickey, R. and Skoultchi, A.I. (1984). Expression of human cardiac actin in mouse L cells: A sarcomeric actin associates with a nonmuscle cytoskeleton. *Cell* 37, 709-715.

Hanukoglu, I. and Fuchs, E. (1983). The cDNA sequence of a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins. *Cell* 33, 915-924.

Hatzfeld, M. and Franke, W.W. (1985). Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation *in vitro* of heterotypic complexes and intermediate sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J. Cell Biol.* 101, 1826-1841.

Hatzfeld, M., Maier, G. and Franke, W.W. (1987). Cytokeratin domains involved in heterotypic complex formation determined by *in vitro* binding assays. *J. Mol. Biol.* 197, 237-255.

Hatzfeld, M. and Weber, K. (1990). The coiled coil of *in vitro* assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and type II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J. Cell Biol.* 110, 1199-1210.

Hatzfeld, M. and Weber, K. (1990). Modulation of keratin intermediate filament assembly by single amino acid exchanges in the consensus sequence at the C-terminal end of the rod domain. *J. Cell Sci.* 99, 351-362.

Heald, R. and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579-589.

Heid, H.W., Werner, E. and Franke, W.W. (1986). The complement of native α -keratin polypeptides of hair-forming cells: a subset of eight polypeptides that differ from epithelial cytokeratins. *Differentiation* 32, 101-119.

Heid, H.W., Moll, I. and Franke, W.W. (1988a). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* 37, 137-157

Heid, H.W., Moll, I. and Franke, W.W. (1988b). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicles, nail bed and nail matrix, lingual papilla, Thymic reticulum). *Differentiation* 37, 215-230.

Heitlinger, E., Peter, M., Häner, M., Lustig, A., Aebi, U. and Nigg, E.A. (1991). Expression of chicken lamin B2 in *Escherichia coli*: Characterization of its structure, assembly and molecular interactions. *J. Cell Biol.* 113, 485-495.

Henderson, D., Geisler, N. and Weber, K. (1982). A periodic ultrastructure in intermediate filaments. *J. Mol. Biol.* 155, 173-176.

Hennings, H., Michael, D., Cheng, C.K., Steinert, P.M., Holbrook, K.A. and Yuspa, S.H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19, 245-254.

Hershey, R.I. (1987). *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* 2nd Edition. Alan R. Liss Edit. N.Y.

- Hirokawa, N., Glicksman, M.A. and Willard, M.B. (1984). Organization of mammalian neurofilaments polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 98, 1523-1536.
- Hisanaga, S.I. and Hirokawa, N. (1988). Structure of the periferal domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J. Mol. Biol.* 202, 4019-4025.
- Holtz, D., Tanaka, R.A., Hartwig, J. and McKeon, F. (1989). The CaaX motif on lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* 59, 969-977.
- Hoppe-Seyler, F., Butz, K. and zur Hausen, H. (1991). Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J. Virol.* 65, 5613-5618.
- Imagawa, M., Chiu, M. and Karin, M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51, 251-260.
- Ip, W. (1988). Modulation of desmin intermediate filament assembly by a monoclonal antibody. *J. Cell Biol.* 106, 735-745.
- Jackson, B.W., Grund, C., Schmid, E., Burke, K., Franke, W.W. and Illmensee, K. (1980). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17, 161-179.
- Janney, P.A., Euteneuer, U., Traub, P. and Schliwa, M. (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J. Cell Biol.* 113, 155-160.
- Jiang, C.K., Epstein, H.S., Tomic, M., Freedberg, I.M. and Blumberg, M. (1990). Epithelial-specific keratin gene expression: identification of a 300 base pair controlling segment. *Nucleic Acids Res.* 18, 247-253.
- Jiang, C.K., Epstein, H.S., Tomic, M., Freedberg, I.M. and Blumberg, M. (1991). Functional comparison of the upstream regulatory DNA sequences of four human epidermal keratin genes. *J. Invest. Dermatol.* 96, 162-167.
- Jonas, E.A., Sargent, T.D. and Dawid, E.B. (1985). Epidermal keratin gene expressed in embryos of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5413-5417.
- Jonas, E.A., Snape, A.M. and Sargent, T.D. (1989). Transcriptional regulation of a *Xenopus* epidermal keratin gene. *Development* 106, 399-405.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.
- Jones, J.C.R., Kurpakus, M.A., Cooper, H.M. and Quaranta, V. (1991). A function for the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in the hemidesmosome. *Cell Regulation* 2, 427-438.
- Jorcano, J.L., Franz, J.K. and Franke, W.W. (1984a). Amino acid sequence diversity between bovine epidermal cytokeratin polypeptides of the basic (type II) subfamily as determined from cDNA clones. *Differentiation* 28, 155-163.
- Jorcano, J.L., Rieger, M., Franz, J.K., Schiller, D.L., Moll, R. and Franke, W.W. (1984b). Identification of two types of keratin polypeptides within the acidic cytokeratin subfamily I. *J. Mol. Biol.* 179, 257-281.
- Julien, J.P., Meyer, D., Hurst, J. and Grosveld, F. (1986). Cloning and developmental expression of the murine neurofilament gene family. *Mol. Brain Res.* 1, 243-250.
- Julien, J.P. and Mushynski, W.E. (1983). The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. *J. Biol. Chem.* 258, 4019-4025.

- Kaufmann, E., Weber, K. and Geisler, N. (1985). Intermediate filament forming ability of desmin derivatives lacking either the amino-terminal 67 or the carboxi-terminal 27 residues. *J. Mol. Biol.* 185, 733-742.
- Kanno, M., Fromental, C., Sraub, A., Ruffenach, F., Davidson, I. and Chambon, P. (1989). The SV40 TC-II(α B) and the related H-2K^B enhancers exhibit different cell type specific and inducible proto-enhancer activities, but the SV40 core sequence and the AP-2 binding site have no enhancer properties. *EMBO J.* 8, 4205-4214.
- Kim, K.H., Schwartz, F. and Fuchs, E. (1984). Differences in keratin synthesis between normal epithelial cells and squamous cell carcinomas are mediated by vitamin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4280-4284.
- Kim, K.H., Stellmach, V., Javors, J. and Fuchs, E. (1987). Regulation of human mesothelial cell differentiation: opposing roles of retinoids and epidermal growth factor in the expression of intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 105, 3039-3051.
- Kirschner, M.W. (1978). Microtubule assembly and nucleation. *Int. Rev. Cytol.* 54, 1-71.
- Knapp, A.C., Franke, W.W., Heid, H., Hatzfeld, M., Jorcano, J.L. and Moll, R. (1986). Cytokeratin no. 9, an epidermal type I keratin characteristic of a special program of keratinocyte differentiation displaying body site specificity. *J. Cell Biol.* 103, 657-667.
- Knapp, A.C. and Franke, W.W. (1989). Spontaneous losses of control of cytokeratin gene expression in transformed, non-epithelial human cells occurring at different levels of regulation. *Cell* 59, 67-79.
- Knapp, B., Rentrop, M., Schweizer, J. and Winter, H. (1987). Three cDNA sequences of mouse type I keratins: cellular localization of the mRNA in normal and hyperproliferative tissues. *J. Biol. Chem.* 262, 938-945.
- Kopan, R. and Fuchs, E. (1989). The use of retinoic acid to probe the relation between hyperproliferation-associated keratins and cell proliferation in normal and malignant epidermal cells. *J. Cell Biol.* 109, 295-307.
- Kopan, R., Traska, G. and Fuchs, E. (1989). Retinoids as important regulators of terminal differentiation: examining keratin gene expression in individual epidermal cells at various stages of keratinization. *J. Cell Biol.* 105, 427-440.
- Kraft, R., Tardiff, J., Krauter, K.S. and Leinwand, L.A. (1988). Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded templates with sequenase. *Biotechniques* 6, 544-546.
- Krauss, S. and Franke, W.W. (1990). Organization and sequence of the human gene encoding cytokeratin 8 gene. *Gene* 86, 241-249.
- Kreis, T.E., Geiger, B., Schmid, E., Jorcano, J.L. and Franke, W.W. (1983). De novo synthesis and specific assembly of keratin filaments in nonepithelial cells after microinjection of mRNA for epidermal keratin. *Cell* 32, 1125-1137.
- Krohne, G. and Benavente, R. (1986). The nuclear lamins. *Exp. Cell Res.* 162, 1-10.
- Krust, A., Kastner, P.H., Petkovitch, N., Zelnt, A. and Chambon, P. (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5310-5314.
- Kulesh, D.A. and Oshima, R.G. (1988). Cloning of the human keratin 18 gene and its expression in nonepithelial mouse cells. *Mol. Cell Biol.* 8, 1540-1550.
- Kuwabara, M.D. and Sigman, D.S. (1987). Footprinting DNA-protein complexes *in situ* following gel retardation assays using 1,10 phenanthroline-copper ion: Escherichia coli RNA polymerase-lac promoter complexes. *Biochemistry* 26, 7234-7238.
- Landon, F., Lemonnier, M., Benarous, R., Huc, C., Fisman, M., Gros, F. and Portier, M.M. (1989). Multiple

mRNAs encode peripherin, a neuronal intermediate filament protein. *EMBO J.* 8, 1719-1726.

Lane, E.B., Rugg, E.L., Navsaria, H., Leigh, I.M., Heagerty, A.H.M., Ishida-Yamamoto, A. and Eady, E.A.J. (1992). A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature* 356, 244-246.

Langridge, J., Langridge, P. and Bergquist, P.L. (1980). Extraction of nucleic acids from agarose gels. *Anal. Biochem.* 103, 264-271.

LaRosa, G.J. and Gudas, L.J. (1988). An early effect of retinoic acid: cloning of an mRNA (era-1) exhibiting rapid and protein synthesis-independent induction during teratocarcinoma stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 329-333.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 282, 249.

Lazarides, E. (1982). Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 219-250.

Leask, A., Rosenberg, M., Vassar, R. and Fuchs, E. (1990). Regulation of a human epidermal keratin gene: Sequences and nuclear factors involved in keratinocyte-specific transcription. *Genes Dev.* 4, 1985-1998.

Leask, A., Byrne, C. and Fuchs, E. (1991). Transcription factor AP-2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7948-7952.

Lee, K.A.W., Bindereif, A. and Greem, M.R. (1988). A small-scale procedure for preparation of nuclear extracts that support efficient transcription and pre-mRNA splicing. *Gene Anal. Techn.* 5, 22-31.

Lehnert, M.E., Jorcano, J.L., Zentgraf, H., Blessing, M., Franz, J.K. and Franke, W.W. (1984). Characterization of bovine keratin genes: similarities of exon patterns in genes coding for different keratins. *EMBO J.* 3, 3279-3287.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B. and McKay, R.D.G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.

Lersch, R. and Fuchs, E. (1988). Sequence and expression of a type II keratin, K5, in human epidermal cells. *Mol. Cell Biol.* 8, 486-493.

Lersch, R., Stellmach, V., Stocks, C., Giudice, C. and Fuchs, E. (1989). Isolation, sequence and expression of a human keratin K5 gene: transcriptional regulation of keratins and insights into pairwise control. *Mol. Cell Biol.* 9, 3685-3697.

Lewis, S.A., Gu W. and Cowan, N.J. (1987). Free intermingling of mammalian β -tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* 49, 539-548.

Loewinger, L. and McKeon, F. (1988). Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO J.* 7, 2301-2309.

Luckow, B. and Schütz, G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 15, 5490.

Lüscher, B., Mitchell, P.J., Williams, T. and Tjian, R. (1989). Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and second messengers. *Genes Dev.* 3, 1507-1517.

Mack, D.H. and Laimins, L.A. (1991). A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9102-9116.

- Magin, T.M., Hatzfeld, M. and Franke, W.W. (1987). Analysis of cytokeratin domains by cloning and expression of intact and deleted polypeptides in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 6, 2607-2615.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mansbridge, J.N. and Knapp, A.M. (1987). Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J. Invest. Derm.* 89, 253-262.
- Marchuk, D., McCrohon, S. and Fuchs, E. (1985). Complete sequence of a gene encoding a human type I keratin: sequences homologous to enhancer elements in the regulatory region of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1609-1613.
- McCormick, M.B., Coulombe, P.A. and Fuchs, E. (1991). Sorting out IF networks: consequences of domain swapping on IF recognition and assembly. *J. Cell Biol.* 113, 1111-1124.
- McLachlan, A.D. (1978). Coiled coil formation and sequence regularities in the helical regions of α -keratins. *J. Mol. Biol.* 124, 297-304.
- McLachlan, A.D. and Stewart, M. (1982). Periodic charge distribution in the intermediate filament proteins desmin and vimentin. *J. Mol. Biol.* 162, 693-698.
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J.A., Longley, M.A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M.E., Steven, A.C., Steinert, P.M., Yuspa, S.H. and Roop, D.R. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope, loricrin. *Cell* 61, 1103-1112.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499-560.
- Miller, R.K., Vikstrom, K. and Goldman, R.D. (1991). Keratin incorporation into intermediate filament networks is a rapid process. *J. Cell Biol.* 113, 843-855.
- Mitchinson, T.J. (1988). Microtubule dynamics and kinetochore function in mitosis. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 527-549.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepel, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.
- Moll, R., Schiller, D.L. and Franke, W.W. (1990). Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J. Cell Biol.* 111, 567-580.
- Monteiro, M.J. and Cleveland, D.W. (1989). Expression of NF-L and NF-M in fibroblasts reveals coassembly of neurofilament and vimentin subunits. *J. Cell Biol.* 108, 579-593.
- Monteiro, M.J.; Hoffman, P.N., Gearhart, J.D. and Cleveland, D.W. (1990). Expression of NF-L in both neuronal and non-neuronal cells of transgenic mice: increased neurofilament density in axons without affecting caliber. *J. Cell Biol.* 111, 1543-1557.
- Näär, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65, 1267-1279.
- Nakahira, K., Ikenaka, K., Wada, K., Tamura, T., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1990). Structure of de 68-kDa neurofilament gene and regulation of its expression. *J. Biol. Chem.* 265, 19786-19791.
- Nelson, W. and Sun, T.T. (1983). The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified

- squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol.* 97, 244-251.
- Nigg, E.A. (1989). The nuclear envelope. *Curr. Opinion in Cell Biol.* 1, 435-440.
- Niwa, M. and Berget, S.M. (1991). Mutation of the AAUAAA polyadenylation signal depresses *in vitro* splicing of proximal but not distal introns. *Genes Dev.* 5, 2086-2095.
- Offord, E.A. and Beard, P. (1990). A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J. Virol.* 64, 4792-4798.
- Olmsted, J.B. (1986). Microtubule-associated proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2, 421-457.
- Osborn, M. and Weber, K. (eds.) (1989). *Cytoskeletal proteins in tumor diagnosis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Oshima, R.G. (1992). Intermediate filament molecular biology. *Curr. Opinion in Cell Biol.* 4, in press.
- Oshima, R.G., Trevor, K., Shevinsky, L.H., Ryder, O.A. and Ceceña, G. (1988). Identification of the gene coding for the endo A murine cytokeratin and its methylated, stable inactive state in mouse nonepithelial cells. *Genes Dev.* 2, 505-516.
- Oshima, R.G., Abrams, L. and Kulesh, D. (1990). Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev.* 4, 835-848.
- Patton, W.E., Yoon, M.U., Alexander, J.S., Chung-Welch, N., Hechtman, H.B. and Shepro, D. (1990). Expression of simple epithelial cytokeratins in bovine pulmonary microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 143, 140-149.
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C. and Nigg, E.A. (1990). *in vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591-602.
- Petkovich, M., Braud, N., Krust, A. and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor that belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Pittelkow, M.R., Lindquist, P.B., Abraham, R.T., Graves-Deal, R., Derynck, R. and Coffey, R.J.J. (1989). Induction of transforming growth factor- α expression in human keratinocytes by phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 264, 5164-5171.
- Porter, M. and Johnson, K.A. (1989). Dynein structure and function. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5, 119-151.
- Powell, B.C., Cam, G.R., Fietz, M.J. and Rogers, G.E. (1986). Clustered arrangement of keratin intermediate filament genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5048-5052.
- Proudfoot, N. (1991). Poly(A) signals. *Cell* 64, 671-674.
- Quaranta, V. and Jones, J.C.R. (1991). The internal affairs of an integrin. *Trends in Cell Biol.* 1, 2-4.
- Quax, W., Vree Egherts, W., Hendriks, W., Quax-Jeuken, Y. and Bloemendal, H. (1983). The structure of the vimentin gene. *Cell* 35, 215-223.
- Quax, W., van den Heuvel, R., Vree Egherts, W., Quax-Jeuken, Y. and Bloemendal, H. (1984a). Intermediate filaments cDNAs from BHK-21 cells: demonstration of distinct genes for desmin and vimentin in all vertebrate classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5970-5974.
- Quax, W., Quax-Jeuken, Y., van den Heuvel, R., Vree Egherts, W. and Bloemendal, H. (1984b). Organization and sequence of the genes for desmin and vimentin. In: *Molecular Biology of the cytoskeleton*. Cold Spring Harbor,

New York, pp 445-454.

- Quinlan, R.A. and Franke, W.W. (1982). Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by chemical crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3452-3456.
- Quinlan, R.A. and Franke, W.W. (1983). Molecular interactions in intermediate-sized filaments revealed by chemical cross-linking. Heteropolymers of vimentin and glial filament protein in cultured human glioma cells. *Eur. J. Biochem.* 132, 477-484.
- Quinlan, R.A., Schiller, D.L., Hatzfeld, M., Achtstätter, T., Moll, R., Jorcano, J.L., Magin, T.M. and Franke, W.W. (1985). Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann. NY Acad. Sci.* 455, 282-306.
- RayChaudhury, A., Marchuk, D., Lindhurst, M. and Fuchs, E. (1986). Three tightly linked genes encoding human type I keratins: conservation of sequence in the 5'-untranslated leader and 5'-upstream regions of coexpressed keratin genes. *Mol. Cell Biol.* 6, 539-548.
- Rentrop, N., Knapp, B., Winter, H. and Schweizer, J. (1986). Differential localization of distinct keratin RNA species in mouse tongue epithelium by *in situ* hybridization with specific cDNA probes. *J. Cell Biol.* 103, 2583-2591.
- Rice, R.H. and Green, H. (1979). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* 18, 681-694.
- Rieger, M. and Franke, W.W. (1988). Identification of an orthologous mammalian cytokeratin gene. High degree of intron sequence conservation during evolution of human cytokeratin 10. *J. Mol. Biol.* 204, 841-856.
- Rieger, M., Jorcano, J.L. and Franke, W.W. (1985). Complete sequence of a bovine type I cytokeratin gene: conserved and variable intron positions in genes of polypeptides of the same cytokeratin subfamily. *EMBO J.* 4, 2261-2267.
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- Rittling, S.R., Coutinho, L., Amram, T. and Kolbe, M. (1989). AP-1/jun binding sites mediate serum inducibility of the human vimentin promoter. *Nucleic Acids Res.* 17, 1619-1633.
- Röber, R.A., Weber, K. and Osborn, M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression on the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105, 365-378.
- Roop, D.R., Cheng, C.K., Titterington, L., Meyers, C.A., Stanley, J.R., Steinert, P.M. and Yuspa, S.H. (1984). Synthetic peptides corresponding to keratin subunits elicit highly specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 259, 8037-8040.
- Roop, D.R., Rothnagel, J.A., Greenhalgh, D.A., Longley, M.A., Bundman, D., Chung, S., Steinert, P.M., Ellis, C.N., Voorhees, J.J., Huff, C.A., Yuspa, S.H. and Rosenthal, D.S. (1991). Modulation of epidermal differentiation by retinoids. In: Saurat, J.H. (ed.): *Retinoids: 10 years on*. Karger, Basel
- Rosenberg, M., RayChaudhury, A., Shows, T.B., Le Beau, M.M and Fuchs, E. (1988). A group of type I keratin genes on human chromosome 17: characterization and expression. *Mol. Cell Biol.* 8, 722-736.
- Rosenthal, D.S., Steinert, P.M., Chung, S., Huff, C.A., Johnson, J., Yuspa, S.H. and Roop, D.R. (1991). A human epidermal differentiation-specific keratin gene is regulated by calcium but not negative modulators of differentiation in transgenic mouse keratinocytes. *Cell Growth & Differentiation* 2, 107-113.
- Ross, J.H.E., Hutchings, A., Butcher, G.W., Lane, B.E. and Lloyd, C.W. (1991). The intermediate filament-

related system of higher plant cells shares an epitope with cytokeratin 8. *J. Cell Sci.* 99, 91-98.

Ruppert, S., Scherer, S. and Schütz, G. (1984). Recent gene conversion involving bovine vasopressin and oxytocin precursor genes suggested by nucleotide sequence. *Nature* 308, 554-557.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Savtchenko, E.S., Tomic, M., Ivker, R. and Blumenberg, M. (1990). Three parallel linkage groups of human acidic keratin genes. *Genomics* 7, 394-407.

Sax, C.M., Farrell, F.X., Tobian, J.A. and Zehner, Z.E. (1988). Multiple elements are required for the expression of an intermediate filament gene. *Nucleic Acids Res.* 16, 8057-8076.

Schermer, A., Jester, J.V., Hardy, C., Milano, D. and Sun, T.-T. (1989). Transient synthesis of K6 and K16 keratins in regenerating rabbit corneal epithelium: keratin markers for an alternative pathway of keratinocyte differentiation. *Differentiation* 42, 103-110.

Schmid, E., Schiller, D.L., Grund, C., Stadler, J. and Franke, W.W. (1983). Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *J. Cell Biol.* 96, 37-50.

Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M. and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6419.

Schüle, R., Rangarajan, P., Kliwer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. and Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.

Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliwer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Verma, I.M. and Evans, R.M. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6092-6096.

Schultheiss, T., Lin, Z., Ishikawa, H., Zamir, I., Stoecker, C.J. and Holtzer, H. (1991). Desmin/vimentin filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J. Cell Biol.* 114, 953-966.

Schweizer, J. (1992). Mouse epidermal keratins. In: *Biology of the skin*. Darmon, H. and Blumenberg, M., eds. Academic Press, New York, in press.

Sémat, A., Vasseur, M., Maillet, L., Brûlet, P. and Darmon, Y.M. (1988). Sequence analysis of murine cytokeratin endo A (n.8) cDNA. Evidence for mRNA species initiated upstream of the normal 5' in PCC4 cells. *Differentiation* 37, 40-46.

Shapiro, D.J., Sharp, P.A., Wahli, W.W. and Keller, M.J. (1988). A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. *DNA* 7, 47-55.

Sheets, M.D., Ogg, S.C. and Wickens, M.P. (1990). Point mutations in AAUAAA and the poly(A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18, 5779-5805.

Snape, A.M., Jonas, E.A. and Sargent, T.D. (1990). KTF-1, a transcriptional activator of *Xenopus* embryonic keratin expression. *Development* 109, 157-165.

Snape, A.M., Winning, R.S. and Sargent, T.D. (1991). Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1). *Development* 113, 283-293.

Soriano, P., Szabo, P. and Bernardi, G. (1982). The scattered distribution of actin genes in the mouse and human

genomes. *EMBO J.* 1, 579-583.

Stappenbeck, T.S. and Green, K.J. (1992). The desmoplakin carboxyl terminus coaligns with and specifically disrupts intermediate filament networks when expressed in cultured cells. *J. Cell Biol.* 116, 1197-1209.

Stasiak, P.C., Purkis, P.E., Leigh, I.M. and Lane, B.E. (1989). Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggests it evolved from keratinocyte keratins. *J. Invest. Dermatol.* 92, 707-716.

Stark, H.J., Breikreutz, D., Limat, A., Bowden, P.E. and Fusenig, N.E. (1987). Keratins of human hair follicle: "hyperproliferative" keratins consistently expressed in outer root sheath cells *in vivo* and *in vitro*. *Differentiation* 35, 236-248.

Steinert, P.M. (1988). The dynamic phosphorylation of the human intermediate filament keratin 1 chain. *J. Biol. Chem.* 263, 13333-13339.

Steinert, P.M. (1990). The two-chain coiled-coil molecular of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer. *J. Biol. Chem.* 265, 8766-8774.

Steinert, P.M., Steven, A.C. and Roop, D.R. (1985). The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* 42, 411-419.

Steinert, P.M. and Roop, D.R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 593-625.

Steinert, P.M. and Liem, R.K.H. (1990). Intermediate filament dynamics. *Cell* 60, 521-523.

Stellmach, V.M. and Fuchs, E. (1989). Exploring the mechanisms underlying cell type-specific and retinoid-mediated expression of keratins. *New Biologist* 1, 305-317.

Stellmach, V.M., Leask, A. and Fuchs, E. (1991). Retinoid-mediated transcriptional regulation of keratin genes in human epidermal and squamous cell carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4582-4586.

Stepp, M.A., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Elwell, J. and Gipson, I.K. (1990). $\alpha 6\beta 4$ Integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8970-8974.

Stoler, A., Kopan, R., Duric, M. and Fuchs, E. (1988). Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *J. Cell Biol.* 197, 427-446.

Stover, D.M. and Zehner, P. (1992). Identification of a *cis*-acting DNA antisilencer element which modulates vimentin gene expression. *Mol. Cell Biol.* 12, 2230-2240.

Sullivan, M.F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 687-716.

Sun, T.T., Eichner, R., Schermer, A., Cooper, D., Nelson, W.G. and Weiss, R.A. (1984). Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: an unifying model. In: *Cancer Cells 1*. (Levine et al, eds.) Cold Spring Harbor, New York, 169-176.

Sun, T.T., Tseng, S.C.G., Huang, A.J.W., Cooper, D., Schermer, A., Lynch, M.H., Weiss, R. and Eichner, R. (1985). Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 455, 307-329.

Sutter, C., Nischt, R., Winter, H. and Schweizer, J. (1991). Aberrant *in vitro* expression of keratin K13 induced by Ca^{2+} and vitamin A Acid in mouse epidermal cell lines. *Exp. Cell Res.* 195, 183-193.

Takemoto, Y., Fujimura, Y., Matsumoto, M., Tamai, Y., Morita, T., Matsushiro, A. and Nozaki, M. (1991). The

- promoter of the endo A cytokeratin gene is activated by a 3' downstream enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19, 2761-2765.
- Tamai, Y., Takemoto, Y., Matsumoto, M., Morita, T., Matsushiro, A. and Nozaki, M. (1991). Sequence of the endo A gene encoding mouse cytokeratin and its methylation state in the CpG-rich region. *Gene* 104, 169-176.
- Timasheff, S.N. (1979). The *in vitro* assembly of microtubules from purified brain tubulin. *Trends Biochem. Sci.* 4, 61-65.
- Toftgard, R., Yuspa, S.H. and Roop, D. (1985). Keratin gene expression in mouse skin tumors and in mouse skin treated with 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 45, 5845-5850.
- Tomic, M., Jiang, C.K., Epstein, H.S., Freedberg, I.M., Samuels, H.H. and Blumenberg, M. (1990). Nuclear receptors for retinoic acid and thyroid hormone regulate transcription of keratin genes. *Cell Regul.* 1, 965-973.
- Traub, P. (1985). *Intermediate filaments: a review*. Springer Verlag, Berlin.
- Traub, P. and Vorgias, C.E. (1983). Involvement of the N-terminal polypeptide of vimentin in the formation of intermediate filaments. *J. Cell Sci.* 63, 43-67.
- Trevor, K.T. (1990). Disruption of keratin filaments in embryonic epithelial cell types. *New Biologist* 2, 1004-1014.
- Tyner, A.L., Eichmann, M.J. and Fuchs, E. (1985). The sequence of a type II keratin expressed in human skin: Conservation of structure among all intermediate filament genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4683-4687.
- Tyner, A.L. and Fuchs, E. (1986). Evidence for post-transcriptional regulations of the keratins expressed during hyperproliferation and malignant transformation in human epidermis. *J. Cell Biol.* 193, 1945-1955.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C. and Evans, R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell* 65, 1255-1266.
- Vale, R.D. (1987). Intracellular transport using microtubule-based motors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 347-378.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the aminoterminal peptide. *J. Mol. Biol.* 126, 783-802.
- Vassar, R., Rosenberg, M., Ross, S., Tyner, A. and Fuchs, E. (1989). Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1563-1567.
- Vassar, R., Coulombe, P.A., Degenstein, L., Albers, K. and Fuchs, E. (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64, 365-380.
- Vasseur, M., Duprey, P., Brûlet, P. and Jacob, F. (1985). One gene and one pseudogene for the cytokeratin endo A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1155-1159.
- Verheijen, R., van Veenroij, W. and Ramaekers, F. (1988). The nuclear matrix: structure and composition. *J. Cell Sci.* 90, 11-36.
- Vorburger, K., Kitten, G.T. and Nigg, E.A. (1989). Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *EMBO J.* 8, 4007-4013.
- Ward, G.E. and Kirschner, M.W. (1990). Identification of cell cycle regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* 61, 561-577.
- Warrick, H.M. and Spudich, J.A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3,

379-422.

- Waseem, A., Alexander, C.A., Steel, J.B. and Lane, E.B. (1990a). Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *New Biologist* 2, 464-478.
- Waseem, A., Gough, A.C., Spurr, N.K. and Lane, E.B. (1990b). Localization of the gene for human simple epithelial keratin 18 to chromosome 12 using polymerase chain reaction. *Genomics* 7, 188-194.
- Weber, K. and Geisler, N. (1984). Intermediate filaments -from wool α -keratins to neurofilaments: a structural overview. In: *Cancer Cells I*. (Levine et al, eds.) Cold Spring Harbor, New York, 153-159.
- Weber, K. and Geisler, N. (1985). Intermediate filaments: Structural conservation and divergence. *Ann. NY Acad. Sci.* 455, 126-143.
- Weber, K., Plessmann, U., Dodemont, H. and Kossmagk-Stephan, K. (1988). Amino acid sequences and homopolymer forming ability of the intermediate filament proteins from an invertebrate epithelium. *EMBO J*: 7, 2995-3001.
- Weber, K., Plessmann, U. and Ulrich, W. (1989). Cytoplasmic intermediate filament proteins of invertebrates are closer to nuclear lamins than are vertebrate intermediate filament proteins; sequence characterization of two muscle proteins of a nematode. *EMBO J*: 8, 3221-3227.
- Weinstein, D.E., Shelanski, M.L. and Liem, R.K.H. (1991). Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell Biol.* 12, 1205-1213.
- Weiss, R.A., Eichner, R. and Sun, T.T. (1984). Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-Kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J. Cell Biol.* 98, 1397-1406.
- Wild, G.A. and Mischke, D. (1986). Variation and frequency of cytokeratin polipeptide patterns in human squamous non-keratinizing epithelium. *Exp. Cell Res.* 162, 114-126.
- Williams, T., Admon, A., Luscher, B. and Tjian, R. (1988). Cloning and expression of AP2, a cell-type specific transcription factor, that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2, 1557-1569.
- Williams, T. and Tjian, R. (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5, 670-682.
- Winkles, J.A., Sargent, T.D., Parry, D.A., Jonas, E. and Dawid, I.B. (1985). Developmentally regulated cytokeratin gene in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 5, 2575-2581.
- Winter, H. and Schweizer, J. (1983). Keratin synthesis in normal mouse epithelia and in squamous cell carcinomas: evidence in tumors for masked mRNA species coding for high molecular weight keratin polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6480-6484.
- Winter, H., Rentrop, M., Nischt, R. and Schweizer, J. (1990). Tissue-specific expression of murine keratin K13 in internal stratified squamous epithelia and its aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis is associated with the methylation state of a distinct CpG site in the remote 5' flanking region of the gene. *Differentiation* 43, 105-114.
- Worman, H.J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S.D. (1988). A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8531-8534.
- Worman, H.J., Evans, C.D. and Blobel, G. (1990). The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J. Cell Biol.* 111, 1535-1542.

- Wu, Y., Parker, L., Binder, N., Beckett, M., Sinard, J., Griffiths, T. and Rheinwald, J. (1982). The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and non-keratinizing epithelia. *Cell* 31, 693-703.
- Yaffe, D., Nudel, U., Mater, Y. and Neuman, S. (1985). Highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mRNAs coding for homologous proteins in distantly related species. *Nucleic Acids Res.* 13, 3723-3737.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yuan, J., Simos, G., Blobel, G. and Georgatos, S.D. (1991). Binding of lamin A to polynucleosomes. *J. Biol. Chem.* 266, 9211-9215.
- Yuspa, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M. and Roop, S.H. (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations *in vitro*. *J. Cell Biol.* 109, 1207-1217.
- Zhou, X.M., Idler, W.W., Steven, A.C., Roop, D.R. and Steinert, P.M. (1988). The complete sequence of the human intermediate filament chain keratin 10. Subdomain divisions and model for folding of end domain sequences. *J. Biol. Chem.* 263, 15584-15589.
- Zopf, D., Dineva, B., Betz, H. and Gundelfinger, E.D. (1990). Isolation of the chicken middle-molecular weight neurofilament (NF-L) gene and characterization of its promoter. *Nucleic Acids Res.* 18, 521-529.
- Zorbas, H., Rein, T. and Winnacker, R. (1990). Transfer-RNA interferes with the uniform cleavage pattern of DNA by hydroxyl radicals. *Nucleic Acids Res.* 18, 6160.