

Terapia génica y regulación tejido-específica.

M. Esperanza Cerdán Villanueva.

Dpto. de Biología Celular y Molecular. Arca de Bioquímica

Facultad de Ciencias. Universidad de La Coruña

La correcta aplicación de las técnicas de terapia génica depende de la adecuada expresión del gen introducido en el tejido o línea celular que es objeto de dicha terapia. La regulación célula específica, es por otra parte un fenómeno que se produce de manera natural en los organismos pluricelulares y que permite una expresión génica diferencial a lo largo de los procesos de desarrollo o en diferentes tejidos.

La activación de un gen concreto en una célula de un organismo eucariota depende de dos etapas consecutivas, el desplagamiento o apertura de la cromatina y posteriormente la formación de un complejo de iniciación del que forman parte diversos factores transcripcionales, unos generales y otros específicos, que reconocen determinadas secuencias de DNA o interaccionan con otros factores transcripcionales, y determinan la activación de la correspondiente RNA polimerasa. Los niveles de expresión pueden verse aumentados por la existencia de secuencias de DNA denominadas "enhancer" a las que se unen factores activadores solubles.

La primera de estas etapas, apertura de la cromatina, es un proceso todavía poco estudiado pero que en algunos casos, como el gen de la alfa-fetoproteína (Krumlauf *et al.* 1985, Hammmmer *et al.* 1987) y en el de la albúmina (Pinkert *et*

al. 1987) depende de secuencias situadas en la región 5' pero bastante lejanas respecto del punto de inicio de la transcripción. La segunda etapa, que depende de la interacción de secuencias específicas del DNA, elementos *cis*, con proteínas activadoras, elementos *trans*, ha sido mucho más estudiada. Combinando estos dos controles de expresión, cabría pensar que un gen exógeno sólo será capaz de expresarse en aquellos tejidos en que el gen autóctono se exprese habitualmente; esta sería la situación ideal deseable para el recambio de un gen dañado por un gen reparado, sin embargo hay algunos resultados experimentales que devalúan esta explicación simplista; diversos laboratorios han aportado datos sobre la expresión del gen de la alfa-globina transferido a tejidos en los que habitualmente ese gen no se expresa (Mellonn *et al.*, 1981; Treisman *et al.*, 1983; Charnay *et al.*, 1984), en estos casos parece ser que si el gen tiene acceso a una región "abierta" de la cromatina, podrá ser activado por factores transcripcionales ubicuos, generales, no específicos de ese gen en ese tejido.

Mecanismos transcripcionales de regulación tejido-específica

Entre los diversos mecanismos que, a nivel del inicio de la transcripción, permiten una regulación célula específica pueden citarse:

- Existencia selectiva en ese tipo celular de los factores transcripcionales activadores, necesarios para interaccionar con secuencias *cis* específicas.
- Existencia de secuencias *cis* específicas de cada tejido y con distinta afinidad por los activadores.
- Represión selectiva del gen en los tejidos en que no se expresa.
- Efectos posicionales, que afecten a la eficacia de la transcripción del gen o a la estabilidad del RNA transcrito, debidos a las secuencias de DNA que lo flanquean.

Cada uno de estos mecanismos se ilustra a continuación con algunos ejemplos seleccionados entre los numerosos datos experimentales que se van acumulando en estos últimos años. Diversas técnicas han permitido investigar la existencia de estos mecanismos moleculares, cabe citar entre ellas: la transcripción "in vitro" utilizando extractos de proteínas nucleares obtenidos a partir de

diferentes tejidos; experimentos de retardación en gel y “foot-printing” ; mutagénesis dirigida de las secuencias reguladoras, y disrupciones de determinadas secuencias por inserción vírica.

Regulación tejido-específica basada en la existencia de factores solubles diferenciales.

La transcripción a partir del promotor del gen de la albúmina en ratón es más eficiente en extractos nucleares procedentes de hígado que en los procedentes de bazo o cerebro. (Lichtsteiner *et al.*, 1987). El promotor del gen de la albúmina de ratón tiene 6 sitios de unión para proteínas nucleares localizados entre la caja TATA y la posición -170. Comparando los niveles de transcripción “in vitro” de “templates” que contienen todos los elementos, solamente algunos, o varios repetidos en tándem, y utilizando como fuente de factores transcripcionales distintos extractos nucleares de hígado y bazo, se ha encontrado que los sitios de unión de los factores HNF-1 y C/EBP activan fuertemente la transcripción de una forma tejido-específica. El sitio de unión de otro factor, NF-Y, tiene un potencial activador menor y es menos específico de tejido; el resto de los elementos son activadores muy débiles. Los factores protéicos estudiados comprenden factores específicos del tejido hepático o que se encuentran en éste en mayor proporción: HFN-1, C/EBP, DBP, CTF/NF-1 y el factor general que se une a la región CAAT, NF-Y. El factor HNF-1 parece ser el único elemento capaz de unirse al promotor de albúmina que ha sido bien conservado en el proceso de evolución de los vertebrados; secuencias de reconocimiento para este factor se encuentran en otros genes específicos hepáticos como los de alfa-feto proteína, beta-fibrinógeno y alfa-1-antitripsina. (Maire *et al.* 1989). Los factores específicos que afectan la transcripción del gen de la albúmina en hígado protegen también una región específica del promotor del gen hepático alfa2-globulina. Esto avala la idea de la existencia de factores reguladores *trans* tejido-específicos que ejercen su acción mediante combinación con otros factores transcripcionales ubicuos. La existencia de un elevado número de sitios de unión para factores reguladores generales y específicos, sugiere que la compleja regulación de los genes está organizada en gran parte en base a mecanismos combinatorios; esto tiene la ventaja de que puede alcanzarse una gran diversidad en los niveles de expresión génica en distintos tejidos con un número limitado de factores reguladores.

Otro mecanismo de regulación que está basado en la existencia de factores *trans* específicos lo constituye la expresión de las hormonas pituitarias, TSH, LH y FSH en líneas celulares gonadotrópicas. El grupo está integrado por una familia de hormonas de estructura glicoprotéica, estructuradas como heterodímeros; el dímero está compuesto por una subunidad alfa, común a toda la familia, y otra beta específica de cada hormona. Horn ha identificado un factor soluble capaz de reconocer a un elemento regulador que confiere a las subunidades alta expresión gonadotropo-específica; este factor soluble se localiza de manera exclusiva en las células de la línea gonadotrópica (Horn *et al.*, 1992).

Regulación diferencial basada en la existencia de secuencias *cis* tejido-específicas

El gen MCL-2 codifica para una forma de las cadenas ligeras de la miosina, precisamente la que puede sufrir procesos de regulación por fosforilación y que por tanto juega un papel importante en la regulación de la contracción muscular. Se produce un aumento en los niveles de RNA mensajero de este gen durante el crecimiento de las células miocárdicas y en los procesos de hipertrofia muscular. El grupo de Henderson ha caracterizado este gen a partir del músculo de corazón de rata. La estructura de los exones y las posiciones de los intrones en músculo cardíaco y esquelético están perfectamente conservadas. Si se comparan las regiones 5' de los genes en ambos tejidos, se ven divergencias, mientras que cuando se comparan las regiones 5' de los genes aislados a partir de músculo cardíaco de rata y pollo aparecen unas secuencias conservadas; estas secuencias están constituidas por un motivo CARG y otros elementos *cis*, cada uno de 10 pb, localizados en posición -250 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Próxima a la caja Hogness hay una región conservada de 28 pb que contiene una secuencia TAAAATAAC, que también se encuentra en un "enhancer" del gen de la creatin-quinasa de rata; el motivo CARG es similar al encontrado en los genes actina cardíacos de vertebrados (Henderson *et al.*, 1987).

En el mutante de ratón Mov13, la inserción del virus Moloney en el primer intrón del gen del colágeno I bloquea su transcripción, excepto en los odontoblastos en los que el gen se expresa correctamente (Kratochwil *et al.* 1989). La expresión del alelo Mov13 en odontoblastos, pero no en otras células mesenquimáticas sugiere que la inserción del provirus interfiere con la regulación

transcripcional célula-específica. A diferencia de los fibroblastos, en los que se expresan de forma coordinada los genes del colágeno I y III, los odontoblastos producen grandes cantidades del tipo I pero no producen el III; según la hipótesis que formulan estos investigadores, la transcripción célula-específica de los genes del colágeno estaría estructurada en base a la utilización de distintas secuencias cis que se ven afectadas de forma diferente por la inserción del virus. Estas secuencias reguladoras se hallan presentes tanto en la región 5' upstream (Schmidt *et al.* 1986) como en el primer intrón (Bornstein and McKay, 1988).

En experimentos similares se puso de manifiesto que un transposón insertado en la región 5' terminal del locus "yellow" de *Drosophila* afecta a la expresión de este gen de una forma célula-específica y se interpretó como resultado de la inactivación célula específica de "enhancers" que ocupan distintas posiciones en el gen (Geyer and Corces 1987). La expresión del gen "yellow" en la larva de *Drosophila* está restringida a partes de la boca, microsetas y placas anales y es responsable de la correcta pigmentación de la cutícula. La correcta expresión de este fenotipo en la larva requiere de regiones cis localizadas entre -294 y -92 pb y una porción del intrón; las secuencias contenidas dentro del intrón pueden actuar en una forma independiente de la posición; la región 5' sería la responsable de la regulación tejido específica y la región del intrón actuaría como exaltadora de los niveles de expresión (Martin et al. 1989).

En monocitos, el gen CSF-1R (receptor del factor 1 estimulante de colonias) posee múltiples sitios de inicio de la transcripción localizados próximos a la región codificadora. En cambio, en células de placenta el RNAm incluye un exón no codificador adicional que se localiza a 26 kb en posición 5'. Esto sugiere una utilización diferencial de promotores en los dos tipos celulares. Un fragmento de 775 pb, conteniendo los sitios de inicio de la transcripción del gen CSF-1R y su región upstream, aislado a partir de placenta, dirige la transcripción de un gen "reporter" en células de coriocarcinoma y fibroblastos de rata pero no en células mieloides o linfoides; un fragmento de 550 pb de origen monocítico dirige la expresión del gen en células mieloides humanas pero no en los otros tipos celulares. Esto significa que estas secuencias contienen los mínimos elementos necesarios para programar una expresión tejido-específica (Roberts *et al.* 1992).

El conocimiento de estas secuencias de regulación tejido-específicas es muy amplio, siendo numerosísimos los ejemplos actualmente descritos, y está

teniendo ya aplicaciones prácticas orientadas a la terapia génica. Recientemente se ha descrito un sistema de expresión génica basado en un promotor con características tejido-específicas incluido en un retrovirus (Kuriyama *et al.* 1991). Este vector, que contiene el enhancer y promotor específicos del gen de la albúmina hepático, se expresa de manera exclusiva en hepatocitos en procesos de división activa; en un futuro, estos sistemas podrán ser utilizados para la eliminación selectiva de células de hepatomas, sin necesidad de causar daños en otras células normales de división activa como es el caso de las células de la médula ósea.

Regulación tejido-específica mediada por factores represores

El gen ADA, adenosina desaminasa, es un gen típico “housekeeping” con la estructura clásica de estos genes en el promotor. Sin embargo, este gen es capaz de experimentar expresión tejido-específica. Su promotor, rico en G+C, posee un elemento cis represor de 13-pb ,GCGTGGGCGGGGC, que contiene, en lectura solapada, el motivo GCGTGGGCG al que se une Zif268, un represor, y el motivo TGGGCGGGGC al que se une Sp1, un regulador general de la transcripción; la existencia de estos dos factores resulta por tanto en una competencia de unión a la misma región (Ackerman *et al.* 1991). Si la hipótesis es correcta, la concentración relativa de SP1 y Zif268 en cada tipo celular, o la presencia en ellos de otros factores que influenciasen su unión específica, modularía de forma tejido-específica la expresión del gen. Una situación similar se ha encontrado en el promotor del gen Hox1.4 también rico en G+C y modulable desde el punto de vista de distintos tejidos o distintas etapas de desarrollo (Chavrier *et al.* 1990).

Otros represores son capaces de impedir interacciones específicas que son responsables de la activación de genes de forma tejido-específica. Factores transcripcionales que contienen motivos helix-loop-helix (HLH) regulan la expresión de genes tejido-específicos en mamíferos e insectos. En mamíferos existe evidencia bioquímica de la inhibición de la expresión génica en estudios de miogénesis (Benezra *et al.*, 1990) y también en neurogénesis (Biggs *et al.* 1992). Durante la proliferación y diferenciación de mioblastos los productos de los genes miogénicos HLH tales como la proteína específica MyoD y la ubi-
cua E12 están presentes en niveles constantes. En la diferenciación, un monómero de MyoD y un monómero de E12 forman un heterodímero que activa ge-

nes músculo específicos como el de creatin kinasa. Durante el proceso de proliferación E-12 y MyoD no son capaces de dimerizar porque existe otra proteína HLH, Id, que actúa como supresor de la diferenciación miogénica. Id interactúa con la proteína E12, y de esta forma impide la correcta dimerización con MyoD, pero Id carece de la región rica en aminoácidos básicos que es necesaria para formar el dominio de unión al DNA. En el proceso de neurogénesis el factor inhibidor se ha denominado Id-2 y los resultados de Biggs sugieren que la represión por Id-2 se requiere para que la diferenciación neuronal y glial se produzca. En *Drosophila* los genes HLH (daughterless y achete-scute) se requieren para la neurogénesis y existe un gen de función opuesta (emc) cuyo producto forma heterodímeros no activos con los genes achete-scute (Ellis *et al.*, 1990).

Regulación basada en efectos posicionales

Goldhamer, estudiando los elementos reguladores que controlan la expresión específica de línea del gen myoD, ha identificado un enhancer distal que regula positivamente la expresión del gen myoD humano; tanto el enhancer como el promotor son activos en células miogénicas y no miogénicas. En embriones de ratón transgénico el enhancer y el promotor juntos dirigen la expresión del gen fusionado al gen *lacZ* de *E.coli* de modo específico en la línea celular de músculo esquelético. Estos datos sugieren que durante el desarrollo el gen es regulado por mecanismos que restringen la accesibilidad de los elementos de control de myoD a factores positivos que actúan en trans; en este proceso podría estar implicada la metilación ya que la 5-azacitidina convierte las células no miogénicas en miogénicas por activación del gen myoD cromosómico (Goldhamer *et al* 1990).

Transcripción ilegítima y diagnóstico molecular

La transcripción “ilegítima”, es decir la existencia en concentraciones muy pequeñas o basales de RNAm correspondientes a genes que no se expresan habitualmente en ese tejido, combinada con las técnicas de amplificación de cDNAs proporciona la posibilidad de analizar transcritos de características patológicas que sean específicos de un tejido de difícil acceso a partir de cualquier

célula fácilmente accesible. Chelly y colaboradores han demostrado que existen transcritos del gen de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) no sólo en músculo y cerebro como sería de esperar, sino también en fibroblastos en cultivo, linfoblastos y células de hepatoma HepG2 (Chelly *et al.* 1988). Posteriormente los mismos autores han ampliado el estudio a otros genes, el gen de la hormona AMH que se expresa específicamente en las células de Sertoli de los testículos, el gen de la beta-globina que es específico de las células eritroides adultas y el gen del factor de coagulación VIIIc que se expresa fundamentalmente a nivel hepático y cuya deficiencia está ligada a un tipo de hemofilia A asociada al cromosoma X, encontrando en todos ellos procesos de transcripción ilegítima (Chelly *et al.* 1989).

Este sistema tiene la ventaja adicional de que el RNAm tiene una estructura más condensada, sin intrones, que el gen original y es más fácil detectar en ella una mutación. El posible mecanismo molecular que subyace a la explicación de la transcripción ilegítima está basado en la existencia de factores transcripcionales generales. En los promotores eucariotas están implicados varios factores transcripcionales, algunos son ubicuos o generales y otros tejido-específicos, en ausencia de estos últimos la transcripción es probablemente muy baja, pero no totalmente nula; en algunos casos se ha comprobado que la transcripción puede ser activada en circunstancias en que los factores transcripcionales tienen más fácil acceso al promotor como sucedería por ejemplo al abrirse una región de cromatina o por cambios de metilación que varían cuando el DNA se replica. Esta relación entre transcripción ilegítima y replicación de DNA podría explicar por ejemplo el por qué la transcripción ilegítima es más abundante en linfoblastos que proliferan activamente que en fibroblastos que están llegando a confluencia.

REFERENCIAS

- Ackerman, S. L., Minden, A. G., Williams, G.t., Bobonis, C. and Yeung C. Y. (1991). Funtional significance of an overlapping consensus binding motif for Sp1 and Zif268 in the murine adenosine deaminase gene promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7523-7527
- Biggs, J., Murphy, V and Israel, M. A.(1992) A human Id-like helix-loop-helix protein expressed during early development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1512-1516.
- Bornstein, P., MCKAy, J., Liska, D.J., Apone, S., and Devarayalu, S. (1988) Interactions between the promoter and first intron are involved in transcriptional control of alfa(1) collagen gene expression. Mol. Cell. Biol. 8, 4851-4857.
- Charnay, P., Teriman, R., Mellon, P., Chao, M., Axel, R., and Maniatis, T. (1984) Differences in human alfa andbeta-globi gene expression in mouse erythroleukemia cells: the role of intragenic sequences. Cell 38, 251-263.
- Chelly, J., Concordet, J. P., Kaplan; J. C. and Kahn, A. (1989) Illegitimate trascription: transcription of any gene in any cell type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 2617- 2621.
- Fleming, R. E. and Gitlin, D. (1990). Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue-specific gene expression during development. J.Biol. Chem 265, 7701-7707.
- Geyer; P K., and Corces, V. G. (1987) Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and developmental transcription of the yellow locus in *Drosophila melanogaster*. Genes Dev. 1, 996-1004.
- Goldhamer, D. J., Faerman, A. Shani, M. and Emerson C. P. Jr. (1992) regulatory ellements that control the lineage-specific expression of myoD. Science 256, 538-542.
- Hammer, R. E., Krumlauf, R., Camper, S. A., Brinster, R. L. and Tilghman, S. M: (1987) Diversity of alfa fetro protein gene expression is geenrated by a combination of separate enhancer elements. Science 235,53-58.

- Henderson, S.A., Spencer, M., Sen, A., Kumar, C., Siddiqui, M. A. Q. and Chien K. R., (1989). *J. Biol. Chem.* 25, 18142-18148.
- Horn, F., Windle, J. J., Barnhart, K. M. and Mellon, P. L. (1992). Tissue-specific gene expression in the pituitary: the glycoprotein hormone α -subunit gene is regulated by a gonadotrope-specific protein. *Mol. Cell Biol.* 12, 2143-2153.
- Kratochwill, K. von der Mark, K., Kollar, E. J., Schwarz, M., Haase, K., Gmachl, I., and Harbers, K. (1989). Retrovirus-induced Insertional mutation in *Mov13* Mice affects collagen I expression in a tissue-specific manner. *Cell* 57, 807-816.
- Kratochwil, K., Dziadek, M., Löhler, J., Harbers, K., and Jaenisch, R. (1986) Normal epithelial branching morphogenesis in the absence of collagen I. *Dev. Biol.* 117, 596-606.
- Krumlauf, R., Hammer, R. E., Tilghman, S. M. and Brinster, R. L. (1985) Developmental regulation of α -fetoprotein genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1639-1648.
- Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Ishizaka, S., Tsujii, T., Ikenaka, K. Kagawa, T., Morita, N., and Mikoshiba, K. (1991). A potential approach for gene therapy targeting hepatoma using a liver-specific promoter on a retroviral vector. *Cell Struct. and Funct.* 16, 503-510.
- Lichtsteiner, S., Wuarin, J. and Schibler, U. (1987). The interplay of DNA-binding proteins on the promoter of the mouse albumin gene. *Cell* 51, 963-973.
- Maire, P., Wuarin, J. Schibler, U. (1989) The role of cis-acting promoter elements in tissue-specific albumin gene expression. *Science* 244, 343-346.
- Martin, M., Meng, Y. B. and Chia, W. (1989) Regulatory elements involved in the tissue-specific expression of the yellow gene of *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 218, 118-126.
- Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y., and Maniatis, T., (1981) Identification of DNA sequences required for transcription of the human α -1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* 27, 297-288.
- Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D. (1987) An albumin enhancer located 10 Kb upstream functions along with its promoter

to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes and Development* 1, 268-276.

Roberts, W. M., Shapiro, L. H., Ashmun, R. A. and Look, A. T. (1992). Transcription of the human colony-stimulating factor 1- receptor A gene is regulated by separate tissue-specific promoters.

Schmidt, A., Rossi, P. and de Crombrughe, B. (1986). Transcriptional control of the mouse alpha2 collagen gene: functional deletion analysis of the promoter and evidence for cell-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* 6, 347-354.

Treisman, R., Green, M. R., and Maniatis, T. (1983). Cis and Trans activation of globin gene transcription in transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7428-7432.