

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR "SEVERO OCHOA"

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX17 EN
LA REGULACIÓN HORMONAL DEL GEN DE LA
UTEROGLOBINA DE CONEJO**

CARLOS GARCÍA GARCÍA

Madrid, 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR "SEVERO OCHOA"

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX17 EN
LA REGULACIÓN HORMONAL DEL GEN DE LA
UTEROGLOBINA DE CONEJO**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por:

Carlos García García

Directores de Tesis:

Antonio Nieto López

Esteban Montejo de Garcini Guedas

Madrid, 2008

Hoy es siempre todavía.

(Antonio Machado)

*The number of names by which uteroglobin
is known is exceeded only by the number of
suggestions for its physiological relevance.*

(T.A. Pressley en "American Journal of Kidney Diseases",
Vol. 30, No 5, 1997: pp.720-724).

AGRADECIMIENTOS

Hace más de veinte años que empecé a trabajar en el CBMSO. Durante todo este tiempo he experimentado una serie de vivencias, tanto fuera, como dentro del "Centro", que me han convertido en el que soy. Y la persona que soy en este momento, ha decidido realizar, escribir y defender esta Tesis Doctoral. Con esto quiero decir que la lista de personas a las que debo agradecimiento es muy amplia. Algunas nos abandonaron incluso antes de que existiera en mí la idea de realizar el Doctorado. Pero son tan responsables de la realización de esta Tesis, como toda la gente que, ejerciendo la amistad sin obligación, me han apoyado, ayudado y animado en este reto concreto ("el Doctorado"), así como en el resto de retos ("la Vida"). Siendo tantos, es imposible mencionarlos a todos. Pero no los olvido.

En primer lugar está mi familia, mi amplia familia. Mis padres, mis hermanos (Ricardo, Celia, Ana y Sergio), y lo que no es muy habitual en este tipo de escritos (ya soy un poco carroza), mi familia política (Antonio, Encarna, Lawrence), mis cuñados (Vivi, Susana, Sonia, Fernando, Edu, Quique y Francis, que fue amigo antes que familia), y mis sobrinos (Samuel, Adrián, Marcos, Miriam, Mateo, Andrés, Miranda, Claudia y Jorge). Y por supuesto, las más importantes: Pepa, Vera y Sandra. La primera es la mayor responsable de lo que soy; en cuanto a mis hijas, más que dejar huella en ellas, son ellas las que me han marcado a mí. La conclusión es que lo poco bueno que tengo, proviene de ese trío femenino.

En segundo lugar están los amigos. 9 horas al día. 5 días a la semana. Aproximadamente 46 semanas al año. Más de veinte años. No es extraño que los mejores amigos hayan surgido aquí, en el CBMSO. Hay que tener en

cuenta que sobre ellos ha actuado una especie de "selección natural" durante todo este tiempo; los que perduran, son amigos de verdad. Por supuesto Antonio, amigo y maestro, con el que aprendí a hacer Ciencia; Esteban, amigo y maestro, con el que aprendí lo que es la Ciencia... y lo que es cualquier otra actividad humana, excepto las prospecciones mineras; Mar, incansable, trabajadora y bondadosa (no he conocido otra persona a la que le pegue mejor este adjetivo).

Como soy afortunado, tengo muchos más amigos. Algunos han coincidido conmigo en el laboratorio, otros me han ayudado en mi trabajo y otros me han soportado en los desayunos: Paloma, Marina, Elena, Esther, Juan, Valentina, Raquel, Santi, Enrique, Mach, Marisol, Luís, Paco, Henry, Rubén, Keybell, Marta, Karla, Hisse, Rashmi, Olga, Juanjo. A todos ellos también les debo una parte de lo conseguido. Además, siempre guardaré un recuerdo muy especial de Charo.

Como mencionaba al principio, esta lista de personas a las que tengo algo que agradecer es muy amplia, y seguro que, sin querer, me dejaré a varias en el tintero. Pero debo mencionar a los "antiguos". A mis compañeros de Instituto; a los de la Facultad de CC. Biológicas de la UCM. Y por supuesto a ese grupo de estudiantes de la Escuela Especial de Ingenieros de Minas: Ignacio, Ricardo, Ramón, Manuel, Eduardo y Enrique; sin su aportación todo sería más sencillo, pero mucho más aburrido.

Carlos García. Madrid 2008.

INDICE

1	ABREVIATURAS	3
2	ABSTRACT	7
3	INTRODUCCIÓN	8
3.1	Regulación de la expresión génica.	8
3.2	Hormonas esteroides y sus mecanismos de acción en la regulación de la expresión génica.	10
3.3	La progesterona y su receptor.	13
3.4	La uteroglobina y su gen.	18
3.5	Los factores de transcripción de la familia SOX.	23
4	OBJETIVOS	26
5	MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1	Productos Químicos y Reactivos.	28
5.2	Anticuerpos.	28
5.3	Animales de experimentación.	28
5.4	Obtención de extractos celulares.	29
5.5	Ensayos de protección a la digestión con DNAsa I.	30
5.6	Ensayos del cambio de la movilidad electroforética (EMSAs).	31
5.7	Análisis de Ferguson de los complejos DNA-proteína.	32
5.8	Plásmidos.	33
5.9	Cultivo de células y ensayos de la actividad del promotor.	35
5.10	Purificación de proteínas que se unen al elemento G'.	35
5.11	Identificación de proteínas por técnicas de proteómica.	37
5.12	Inmunoblot (Western blot).	38
5.13	Valoración del mRNA de UG.	38
5.14	Determinación cuantitativa de UG por radioinmunoensayo.	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Análisis del promotor proximal del gen <i>ug</i> por ensayos de protección a la digestión con DNAsa I.	39

6.2	Caracterización preliminar del factor nuclear dependiente de progesterona que se une al elemento G'	44
6.3	Purificación del factor nuclear que se une al elemento G'	52
6.4	Identificación del factor nuclear que se une al elemento G' como SOX17	59
6.5	Unión de SOX17 al promotor de UG: ¿dímero o monómero?	66
6.6	Análisis de la funcionalidad del factor SOX17 en el contexto del promotor del gen de la UG	68
6.7	Análisis de la localización subcelular de SOX17 en las células endometriales.	73
7	DISCUSIÓN.....	80
7.1	El promotor proximal del gen <i>ug</i> de conejo: interacción con diferentes factores de transcripción.	81
7.2	Caracterización de SOX17 como factor de transcripción que se une al elemento G'	85
7.3	Participación de SOX17 y el elemento G' en la regulación de <i>ug</i>	89
7.4	Efecto de la progesterona en la expresión y localización subcelular de SOX17.	93
7.5	Posible mecanismo de acción de SOX17 en el contexto del promotor de <i>ug</i>	96
8	CONCLUSIONES.....	101
9	BIBLIOGRAFÍA.....	102
10	ANEXO: PUBLICACIONES	114

1 ABREVIATURAS

AF:	Dominio de activación de la transcripción. Función activadora (<i>“<u>A</u>ctivation <u>F</u>unction”</i>).
ARE:	Elemento de respuesta a andrógenos.
CBP:	Proteína de unión a CREB (<i>“<u>C</u>REB-<u>b</u>inding <u>p</u>rotein”</i>).
CC10:	Proteína de 10 kDa de las células Clara de pulmón.
CCSP:	Proteína de secreción de las células Clara de pulmón.
CHAPS:	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio] propanosulfonato.
CMV:	Citomegalovirus.
CREB:	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (<i>“<u>c</u>AMP-<u>r</u>esponse <u>e</u>lement-<u>b</u>inding <u>p</u>rotein”</i>).
Da:	Dalton.
DBD:	Dominio de unión al DNA.
DEAE-celulosa:	Dietilaminoetil-celulosa.
DMEM:	Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco.
DRIP:	Proteína que interacciona con el receptor de la vitamina D (<i>“<u>V</u>itamin <u>D</u> <u>r</u>eceptor-<u>i</u>nteracting <u>p</u>rotein”</i>).
DTT:	1,4-ditiotreitol.
DNAsa I:	Desoxirribonucleasa I.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
EMSA:	Ensayo del cambio de la movilidad electroforética.
ERE:	Elemento de respuesta a estrógenos.
g:	Aceleración de la gravedad.
GATA:	Proteína de unión a la secuencia GATA (<i>“<u>G</u>ATA <u>b</u>inding <u>p</u>rotein”</i>)
GRE:	Elemento de respuesta a glucocorticoides.
GRIP1:	Proteína 1 que interacciona con el receptor de glucocorticoides (<i>“<u>G</u>lucocorticoid <u>r</u>eceptor-<u>i</u>nteracting <u>p</u>rotein <u>1</u>”</i>).
GSK-3:	Quinasa 3 de la glucógeno sintasa (<i>“<u>G</u>lycogen <u>s</u>ynthase <u>k</u>inase <u>3</u>”</i>)
hCG:	Gonadotropina coriónica humana.

HMG:	Grupo de proteínas de alta movilidad electroforética.
HNF-3:	Factor nuclear 3 de hepatocitos (<i>"Hepatocyte nuclear factor 3"</i>).
hnRNPs:	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas.
HRE:	Elemento de respuesta a hormonas.
HRP:	Peroxidasa de <i>Armoracia rusticana</i> (rábano picante).
ID:	Dominio de inhibición.
LBD:	Dominio de unión al ligando.
LC:	Cromatografía líquida.
LEF-1:	Factor 1 que se une al estimulador linfoide (<i>"Lymphoid enhancer-binding factor 1"</i>).
MALDI-TOF:	Desorción/ionización láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo.
M_r:	Masa molecular relativa.
MS:	Espectrometría de masas.
N-CoA1:	Co-activador 1 de receptores nucleares (<i>"Nuclear receptor coactivator 1"</i>).
NES:	Señal de exportación nuclear.
NF-Y:	Factor nuclear que se une a la caja Y (<i>"Nuclear factor for Y box"</i>).
NLS:	Señal de localización nuclear.
NRE:	Elemento negativo de respuesta a hormonas.
NS1:	Principal proteína no estructural de parvovirus
NSAP1:	Proteína 1 que se asocia a NS1 (<i>"NS1-associated protein 1"</i>).
Oct1:	Proteína 1 de unión a octámeros (<i>"Octamer-binding protein 1"</i>).
pb:	Pares de bases.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PCBs:	Policlorobifenilos.
PLA₂:	Fosfolipasa A ₂ .
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PR:	Receptor de progesterona.
PRE:	Elemento de respuesta a progesterona.
P/V:	Peso/Volumen.

RUSH:	Proteína que se une al promotor del gen de la uteroglobina de conejo, miembro del complejo SWI/SNF, y que facilita la transcripción remodelando la cromatina gracias a su actividad similar a la de las helicasas (<i>“<u>R</u>abbit <u>u</u>teroglobin promoter-binding protein member of the <u>S</u>WI/<u>S</u>NF complex that facilitates transcription by remodeling chromatin (<u>h</u>elicase-like)”</i>).
SAB:	Seroalbúmina bovina.
SCGB1A1:	Secretoglobina 1A1.
SDS:	Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
SMARCA:	Proteína reguladora de la cromatina de la subfamilia A, relacionada con SWI/SNF, asociada a la matriz y dependiente de actina (<i>“<u>S</u>WI/<u>S</u>NF-related, <u>m</u>atrix-associated, <u>a</u>ctin-dependent, <u>r</u>egulator of <u>c</u>hromatin, subfamily <u>A</u>”</i>).
SOX:	Factores de transcripción con caja HMG relacionados con SRY (<i>“<u>S</u>RY-related HMG <u>b</u>ox transcription factors”</i>).
SRC-1:	Co-activador de receptores de hormonas esteroides (<i>“<u>S</u>teroid receptor <u>c</u>oactivator 1”</i>).
SRY:	Región del cromosoma Y determinante del sexo (<i>“<u>S</u>ex-determining <u>r</u>egion <u>Y</u>”</i>).
SWI/SNF:	Proteínas de levaduras responsables de los fenotipos “Switch” y “Sacarosa no fermentable” (<i>“<u>S</u>witch/<u>s</u>ucrose <u>n</u>on-fermentable”</i>).
SYNCRIP:	Proteína que interacciona con RNA citoplasmático y que se une a sinaptotagmina (<i>“<u>S</u>ynaptotagmin-binding <u>c</u>ytoplasmic <u>R</u>NA <u>i</u>nteracting <u>p</u>rotein”</i>).
TBE:	Tampón de electroforesis Tris-Borato-EDTA.
TCA:	Ácido tricloroacético.
TCF-4:	Factor 4 de células T (<i>“<u>T</u>-cell <u>f</u>actor-<u>4</u>”</i>).
TIF2:	Factor intermediario transcripcional 2 (<i>“<u>T</u>ranscriptional <u>i</u>ntermediary <u>f</u>actor <u>2</u>”</i>).
TRAP:	Proteína que se asocia al receptor de hormona tiroidea (<i>“<u>T</u>h thyroid hormone <u>r</u>eceptor-<u>a</u>ssociated <u>p</u>rotein”</i>).

TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano.
UG:	Uteroglobina.
<i>ug:</i>	Gen de la uteroglobina.
UI:	Unidad internacional farmacológica.
USF:	Factor estimulador que se une corriente arriba (" <u>U</u> pstream <u>s</u> timulatory <u>f</u> actor").
YY1:	Factor de transcripcion Ying y Yang 1 (" <u>Y</u> ing <u>Y</u> ang <u>1</u> ").

2 ABSTRACT

The *UG* gene is expressed in several tissues of rabbit and other mammals. In each tissue a determined hormone, including glucocorticoids, androgens, progesterone and estrogens, specifically regulates the gene. An estrogen response element (ERE) and several putative progesterone/glucocorticoid/androgen response elements (PRE/GRE/ARE) have been observed in the promoter at -0.26 kpb and -2.7/-2.4 kpb respectively. Several studies have demonstrated that these response elements can be modulated by other transcription factors that bind at different sites in the *ug* promoter. In the rabbit endometrium, the *ug* is induced by progesterone, primarily through the binding of progesterone receptor to the distal region of the *ug* promoter. However, other transcription factors participate in progesterone action. The proximal *ug* promoter contains several putative consensus sequences for the binding of various progesterone-dependent endometrial nuclear factors, suggesting that several transcription factors might be implicated in the hormonal induction of *ug*. I report here that one of these progesterone-dependent factors specifically binds to the sequence CACCATG (-183/-177) of the rabbit *ug* promoter. This sequence (element G') is very similar to the consensus sequence for binding of the SOX family of transcription factors. Mutation of the element G' reduced transcription from the *ug* promoter in transient expression experiments. The endometrial factor was purified and analyzed by nano-liquid chromatography and ion trap coupled mass spectrometry yielding two partial amino acid sequences corresponding to a region of SOX17 that is highly conserved inter-species. This identification was confirmed by immunological techniques using a specific anti-SOX17 antibody. In agreement with the above findings, overexpression of SOX17 in transfected endometrial cells increased transcription from the *ug* promoter. SOX17 gradually accumulated in the nucleus in vivo concomitant with the induction of *ug* expression by progesterone in the endometrium. Thus, these findings implicate, for the first time, SOX17 in the transcriptional control of rabbit *ug*.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Regulación de la expresión génica.

La regulación de la expresión génica se basa en un conjunto de procesos biológicos complejos. Esta complejidad se pone de manifiesto con mayor intensidad en el caso de los organismos pluricelulares, donde en cada órgano o tejido particular, las células llevan a cabo funciones diferentes a pesar de tener un contenido de DNA idéntico. La enorme flexibilidad en el control de los genes de los organismos pluricelulares viene determinada por una expresión génica diferencial, tanto en el tiempo como en el espacio. Así, las células expresan solo un conjunto de genes del total que poseen, y este conjunto varía en cada tipo celular en función de la fase del ciclo celular, del estadio del proceso de diferenciación celular, de estímulos externos, de las necesidades metabólicas, etc. La manifestación principal de esta flexibilidad de la expresión génica es la aparición en cada célula de un conjunto de proteínas en una determinada proporción. Esto provoca la aparición de diferentes fenotipos celulares, es decir, una diferenciación celular.

La expresión de los genes de un organismo superior puede ser regulada a distintos niveles:

- Control pretranscripcional caracterizado por la variación de la accesibilidad del DNA a la maquinaria transcripcional (condensación de la cromatina, metilación del DNA);¹
- Control de la transcripción, en el que se puede regular la frecuencia del inicio de la transcripción (lo más frecuente), así como la velocidad de la elongación del RNA naciente o la eficacia de la terminación de la transcripción;
- Control postranscripcional, en el que se engloban mecanismos que regulan el procesamiento y la maduración del RNA recién

¹ Para algunos, este nivel y el siguiente formarían uno solo, aunque la metilación del DNA sí se consideraría un mecanismo pretranscripcional epigenético.

sintetizado, el transporte al citoplasma y la estabilidad del mRNA, y el control de la traducción a diferentes niveles (frecuencia y velocidad de inicio, velocidad de elongación del polipéptido y eficacia de la terminación). Además, juegan un papel importante la estabilidad de las proteínas sintetizadas y su conversión a formas activas.

Por un principio de economía celular, la regulación a nivel transcripcional es la más importante. El control de la transcripción se ejerce fundamentalmente a nivel de su iniciación y se basa en la interacción de la RNA polimerasa (junto con factores de transcripción) con los promotores de los genes. Los promotores son regiones de DNA necesarias para la transcripción de un gen. Se conocen también como regiones reguladoras de los genes o como “factores cis”, por encontrarse en la misma molécula de DNA cuya expresión regulan. Los factores de transcripción son proteínas que se unen a los promotores y poseen una afinidad específica por determinadas secuencias del DNA. A cada promotor se pueden unir un número variable de factores de transcripción que actúan favoreciendo o dificultando la unión y la actividad de la RNA polimerasa y de otros factores de transcripción. Esto determina la eficacia del inicio de la transcripción y, en muchos casos, su especificidad en cada tipo de célula. Puesto que son extrínsecos a la molécula de DNA, son denominados “factores trans”.

Una de las características de la expresión génica en organismos eucarióticos, es la existencia de secuencias reguladoras en el DNA que pueden estar localizadas a grandes distancias del sitio de inicio de la transcripción. Estos elementos pueden situarse antes (“upstream”) o después (“downstream”) del punto de inicio de la transcripción, e incluso funcionar en cualquier orientación de su secuencia. No poseen actividad promotora por si mismos, sino que actúan modulando la actividad de un promotor, por lo que se les denomina “estimuladores” o “enhancers” (Latchman, D. S. 1991). La conexión entre los “enhancers” y las secuencias promotoras se produce a través de un complejo multiprotéico conocido como “Mediator” (Complejo Mediador). Actualmente se reconoce al complejo “Mediator” como la principal vía de

transmisión de información desde los “enhancers” hasta los promotores, conectando las proteínas reguladoras (activadores y represores) con la maquinaria transcripcional de la RNA polimerasa II en todos los eucariotas, desde las levaduras hasta los humanos (Kornberg, R. D. 2005).

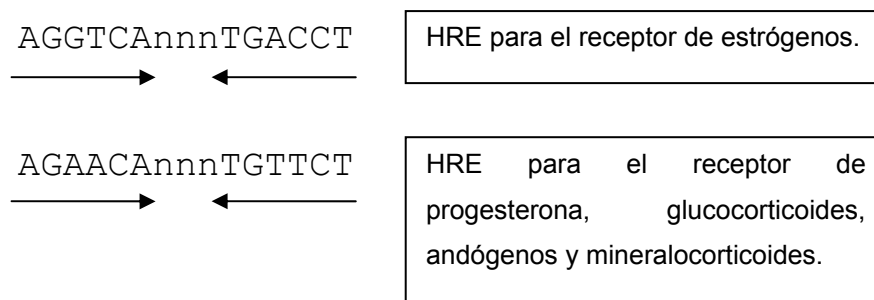
3.2 Hormonas esteroides y sus mecanismos de acción en la regulación de la expresión génica.

Las hormonas esteroides son moléculas lipofílicas derivadas del colesterol. En los vertebrados superiores, estas hormonas son sintetizadas en la corteza adrenal (glucocorticoides, mineralocorticoides, y andrógenos adrenales), los testículos (andrógenos y estrógenos testiculares) y por el ovario y la placenta (estrógenos y progestágenos o progestinas) (Beato, M. y Klug, J. 2000). Las hormonas esteroides viajan hasta sus células blanco a través de la sangre unidas a proteínas transportadoras, y atraviesan, probablemente por simple difusión, la membrana plasmática debido a su naturaleza lipofílica. Las hormonas esteroides regulan un gran número de procesos fisiológicos en las células diana que contienen sus receptores.

La primera prueba de que las hormonas esteroides estaban relacionadas con el control transcripcional surgió al observarse que la hormona esteroide de insectos ecdisona inducía la formación de “puffs” en cromosomas gigantes (Clever, U. y Karlson, P. 1960). Esta relación se estableció puesto que ya entonces se sabía que los “puffs” eran la expresión (visible al microscopio) de la activación de algunos genes.

En las células blanco, estas hormonas ejercen su función a través de su unión a un receptor proteico específico. Los receptores de hormonas esteroides son proteínas intracelulares activadas por la unión específica y de alta afinidad de su ligando y fueron uno de los primeros grupos de factores de transcripción estudiados. Son los mediadores clave de su acción y suelen estar formando complejos con chaperonas para mantener una conformación que permite la unión de la hormona. Una vez que la hormona se une a su receptor, éste viaja

al núcleo de las células, o se une fuertemente a él si ya estaba débilmente asociado en este compartimento. Ahí los receptores de hormonas esteroides ejercen su efecto sobre la expresión de determinados genes, al unirse a ciertas secuencias del DNA conocidas como “Elementos de respuesta a hormonas” (HRE) (Beato, M. y Klug, J. 2000). Estos HRE son secuencias reguladoras cortas (13-15 pb) del tipo “enhancers” y pueden situarse a varias kpb del inicio de la transcripción del gen que regulan. La estructura “perfecta” de dos típicos HRE para los receptores de esteroides es:



Puede observarse la estructura palindrómica de la secuencia de nucleótidos de los dos brazos o sitios de unión y la separación entre ellos mediante 3 nucleótidos cualesquiera. En muchos genes, esta secuencia consenso no es perfecta y existen algunas variaciones en su estructura.

La hormona esteroide estimula la transcripción de un gen diana por la unión del receptor activado a un determinado HRE de ese gen, aunque también puede realizar el efecto contrario si se une a los llamados “elementos de respuesta negativa” (NRE). En ambos casos el complejo hormona-receptor unido al DNA es capaz de iniciar la remodelación de la cromatina por su asociación con co-activadores o co-represores. Esto determina el estado transcripcional activo o inactivo de la cromatina (Kumar, R., Wang, R. A. et al. 2004). Este es el mecanismo clásico (o genómico) de actuación de las hormonas esteroides y de sus receptores, que se conoce desde hace casi tres décadas. Los detalles de este mecanismo clásico, y común para todas estas hormonas, serán explicados en el siguiente apartado (1.3) tomando como paradigma la acción de la hormona progesterona.

En los últimos años se ha podido demostrar que existen otros mecanismos por los que las hormonas esteroides y sus receptores pueden regular la expresión de algunos genes. Por ejemplo, el receptor activado por la hormona, puede interactuar con un determinado componente de otra vía de señalización existente en la célula. Como resultado, se produciría la activación de dicha vía en respuesta a la hormona esteroide. Es lo que se conoce como “cross-talk” (intercomunicación) entre diferentes vías de señalización, y puede conducir a la modulación de la expresión de determinados genes sin que el complejo receptor-hormona interactúe necesariamente con los HREs de dichos genes. Otro ejemplo lo proporciona la propia existencia de receptores de membrana para hormonas esteroides. Son diferentes a los clásicos receptores solubles (Walters, M. R. y Nemere, I. 2004; Revankar, C. M., Cimino, D. F. et al. 2005), e inician vías de señalización intracelulares, sin la participación del receptor hormonal en ningún proceso dentro del núcleo celular. Así podemos hablar de los efectos genómicos de las hormonas esteroides como aquellos que conllevan la actuación de su receptor como factor de transcripción que directamente regula la transcripción de determinados genes diana. Se caracterizan por ocurrir, en general, en periodos de tiempo relativamente largos, horas o incluso días. Por otra parte los efectos no genómicos tienen lugar mucho más rápidamente (en segundos o minutos) y no implican la actuación como factor de transcripción del receptor hormonal (Losel, R. y Wehling, M. 2003).

Por último hay que mencionar otro aspecto de la actuación de las hormonas esteroides y sus receptores. La respuesta a las hormonas esteroides puede ser de dos tipos. En la respuesta primaria, el receptor activado por la hormona directamente activa la transcripción de los genes diana, interactuando con sus regiones reguladoras. Esta respuesta es relativamente rápida. La conocida como respuesta secundaria, requiere la síntesis de novo de proteínas (por ejemplo factores de transcripción y co-activadores) activada por dicha hormona; a continuación estos factores de transcripción y co-activadores regulan la expresión de los genes diana (Schoneveld, O., Gaemers, I. C. et al. 2004). Esta respuesta es, lógicamente, más lenta que la primera.

Por supuesto existen genes que son regulados simultáneamente por la misma hormona, a través de varios de los mecanismos anteriormente descritos.

3.3 La progesterona y su receptor.

Desde el punto de vista de la visión clásica (mecanismo genómico), la diversidad de efectos biológicos de la progesterona está mediada por el Receptor de Progesterona (PR). El PR es miembro de la superfamilia de receptores nucleares, dentro del grupo de factores de transcripción dependientes de ligando. Aunque el papel principal de la progesterona es la regulación de la expresión de conjuntos de genes específicos en el tracto reproductor femenino, otros tejidos y órganos son también dianas de su acción (Li, X. T., Lonard, D. M. et al. 2004).

Como miembro de la familia de receptores nucleares, el PR contiene tres dominios funcionales: un dominio N-terminal, un dominio central donde se localiza el dominio de unión a DNA (DBD), y un dominio de unión al ligando (LBD) en la zona C-terminal. Mientras que las estructuras atómicas tridimensionales de los dominios DBD y LBD de los diferentes miembros de la familia de los receptores de hormonas esteroides muestran motivos comunes y conservados, la estructura del dominio N-terminal es menos conocida; es la zona menos conservada tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos. Pero esta zona N-terminal es funcionalmente importante, ya que es necesaria para la actividad transcripcional de dichos receptores. En el LBD también se han identificado determinantes estructurales importantes para la dimerización independiente de la unión a DNA, la unión de proteínas de choque térmico y señales de localización nuclear (NLS). El DBD contiene un segundo NLS así como un determinante de dimerización dependiente de la unión a DNA. Los receptores de hormonas esteroides contienen al menos dos dominios de activación de la transcripción (AF). El AF-2 está situado en el LBD en el extremo C-terminal y es dependiente de la unión de la hormona. Se activa como resultado del cambio conformacional que provoca la hormona al unirse en el LBD, lo que permite la unión en esa zona de co-activadores conocidos

(N-CoA1/SRC-1, TIF2/GRIP1, CBP/p300, TRAP/DRIP, SWI/SNF, etc.). El AF-1 se encuentra en la zona N-terminal y el tipo de co-activadores que se unen a él y que son responsables de su actividad no están correctamente caracterizados (Beato, M. y Klug, J. 2000; McKenna, N. J. y OMalley, B. W. 2002b; Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V. et al. 2003).

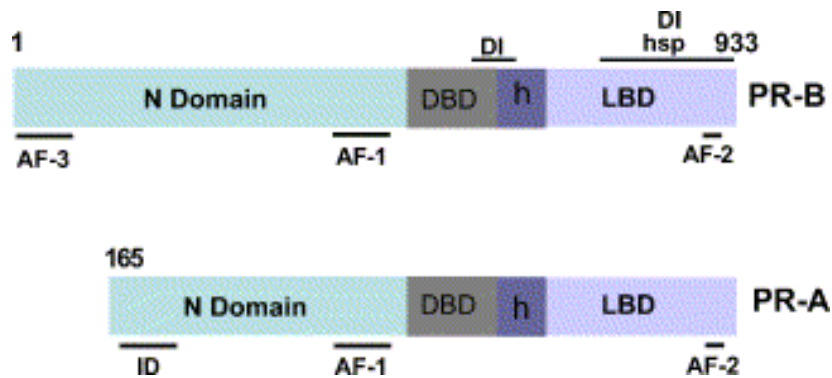


FIGURA 1. Dominios de las isoformas humanas del PR. “DBD”: dominio de unión al DNA; “LBD”: dominio de unión al ligando; “h” (hinge): dominio bisagra, importante para la conformación tridimensional del receptor; “DI”: dominio determinante de dimerización; “hsp”: dominio de unión a proteínas de choque térmico; “AF”: dominios de activación de la transcripción; “ID”: dominio de inhibición. (Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V. et al. 2003).

El PR humano se expresa como dos isoformas por el uso alternativo de dos promotores de un único gen (Conneely, O. M., Kettelberger, D. M. et al. 1989; Kastner, P., Krust, A. et al. 1990; Kraus, W. L., Montano, M. M. et al. 1993). El PR-A (94 kDa) se diferencia del PR-B (120 kDa) en que pierde 164 aminoácidos en el N-terminal. Ambas isoformas se unen al DNA y a la hormona de forma similar, pero su actividad transcripcional es diferente. En general, el PR-B es un activador más fuerte que el PR-A (aunque dependiendo del contexto celular y del promotor el PR-A puede ser también un fuerte activador). En parte esto es debido a que en esos 164 aminoácidos extras, el PR-B posee un tercer dominio de activación transcripcional AF-3 (FIGURA 1). Bajo determinadas circunstancias el PR-A puede comportarse como un represor

dependiente de ligando (agonistas o antagonistas). Este comportamiento es debido a la existencia de un dominio de inhibición (ID) situado en el N-terminal. Aunque también existe en el PR-B, parte de los 164 aminoácidos extras que posee, jugarían un papel en la supresión de este dominio de inhibición (Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B. et al. 2003; Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V. et al. 2003).

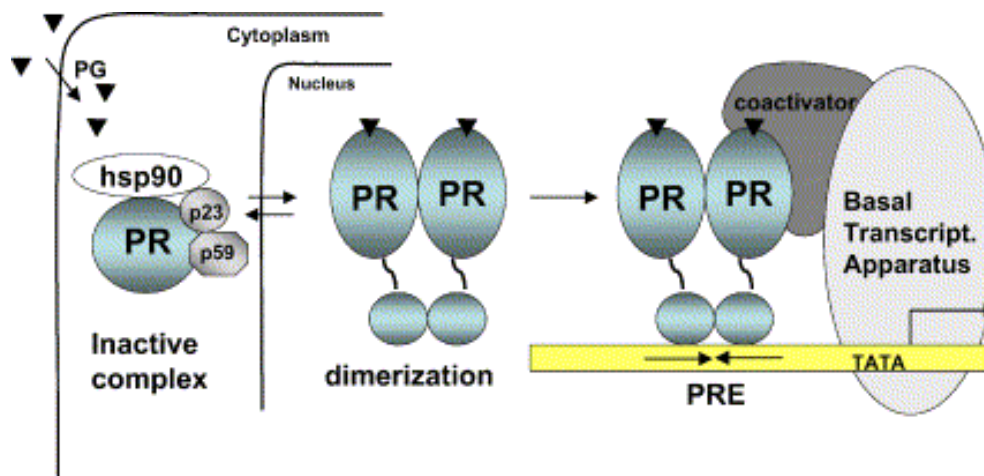


FIGURA 2. Mecanismo clásico de la acción de la progesterona y su receptor (Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V. et al. 2003). "PG": progesterona; "hsp90, p23 y p59": proteínas asociadas al complejo inactivo; "PRE": elemento de respuesta a progesterona en el DNA.

El mecanismo clásico de acción del PR mediado por progesterona en la regulación de la transcripción, está bastante bien definido. La unión de la progesterona induce un cambio conformacional en el PR que permite que este se disocie de un multicomplejo citoplasmático de chaperonas (proteínas de choque térmico e inmunofilinas). Al mismo tiempo se produce un aumento de la fosforilación del receptor, la homodimerización del mismo y la unión a los Elementos de Respuesta a Progesterona (PRE) dentro del promotor de los genes diana. Los PR unidos al DNA modifican la tasa de transcripción de los genes al influir en el reclutamiento de la RNA polimerasa II al sitio de inicio de la transcripción (FIGURA 2). El PR activado por la hormona, a través de interacciones proteína-proteína, recluta co-activadores que funcionan como

intermediarios esenciales para transmitir las señales desde el receptor al complejo de iniciación de la transcripción. Los co-activadores facilitan el inicio de la transcripción a través de interacciones con los componentes de la maquinaria transcripcional y al provocar la remodelación local de la cromatina en los promotores específicos (McKenna, N. J. y OMalley, B. W. 2002b; McKenna, N. J. y OMalley, B. W. 2002a; Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B. et al. 2003; Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V. et al. 2003; Li, X. T., Lonard, D. M. et al. 2004).

Una vez visto el mecanismo clásico de actuación de la progesterona y su receptor, hay que tener en cuenta dos consideraciones. En primer lugar, este mecanismo clásico se ve complementado y modulado por diferentes factores. En segundo lugar, la propia hormona y su receptor pueden estar involucrados en procesos celulares a través de otros mecanismos de actuación. En ambos casos, los puntos más importantes a tener en cuenta son:

1. Los receptores nucleares como el PR pueden actuar como mediadores en varias rutas de señalización a través de su fosforilación que puede incluso, ser independiente de su unión al ligando hormonal. En general la fosforilación por quinasas asociadas con los factores de transcripción generales, o por quinasas activadas por una gran variedad de señales, cooperan con la hormona para producir una actividad transcripcional máxima. Pero también se empiezan a conocer eventos de regulación negativa de receptores nucleares por fosforilación (Rochette, E. C. 2003).
2. El PR puede interaccionar con otros factores de transcripción produciéndose la intercomunicación ("cross-talk") con otras rutas de señalización celular iniciadas por citoquinas y factores de crecimiento (Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V. et al. 2003).
3. Se ha postulado la existencia de receptores de hormonas esteroideas (incluida la progesterona) en la membrana plasmática para poder explicar algunas de las llamadas acciones no genómicas de éstas que se producen de forma muy rápida (Hammes, S. R. 2003; Losel, R. y Wehling, M. 2003; Jang, S. y Yi, L. S. H. 2005).

4. También es importante señalar la acción de los antagonistas en la modulación de la función de los receptores nucleares. En el caso del PR el antagonista más estudiado es el RU486. Los antagonistas actúan permitiendo que los receptores recluten co-represores en vez de co-activadores, con la consiguiente inhibición de la transcripción de determinados genes, en determinados contextos celulares y en función de cada promotor (Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V. et al. 2003; Spitz, I. M. 2003).
5. Existen evidencias de la activación de genes, como el de la uteroglobina de conejo, a través de factores de transcripción estimulados a su vez por la progesterona (Haywardlester, A., Hewetson, A. et al. 1996). Como hemos dicho anteriormente, se conoce como respuesta secundaria a la hormona, y está más estudiado en el caso de los glucocorticoides y su receptor (Schoneveld, O., Gaemers, I. C. et al. 2004) .
6. Los promotores de los genes regulados por las hormonas esteroides contienen con frecuencia secuencias consenso para la unión de otros factores de transcripción que pueden modular la acción de los receptores de dichas hormonas, o incluso ser indispensables para la misma (Beato, M. 1989; Lucas, P. C. y Granner, D. K. 1992; Beato, M. y Klug, J. 2000). La interacción de los receptores de hormonas esteroides con sus correspondientes HRE (incluido el PR con los PREs), provoca cambios en la estructura de la cromatina que permiten el reclutamiento posterior de algunos de esos factores de transcripción (Truss, M., Bartsch, J. et al. 1995; Scholz, A., Truss, M. et al. 1998; Scholz, A., Truss, M. et al. 1999; Vicent, G. P., Koop, R. et al. 2002).
7. Se sabe que “enhancers” distales, que activan eficientemente la transcripción en el contexto de su promotor natural, son incapaces de hacerlo cuando son colocados en un promotor heterólogo (Kramer, M. G., Barajas, M. et al. 2003). Por esa razón se ha postulado la existencia de los llamados “Elementos acopladores” en los promotores proximales. Su función sería transmitir la señal activadora desde el “enhancer” distal hasta la maquinaria transcripcional basal a través de interacciones proteína-proteína (Schoneveld, O., Gaemers, I. C. et al. 2004). Todo esto supone la existencia de una organización tridimensional adecuada

del promotor y del conjunto de proteínas asociadas a él (histonas, factores de transcripción, co-activadores, proteínas acopladoras y otras con funciones estructurales). Además, esta estructura tridimensional podría estar regulada por la unión de factores como los receptores nucleares, los cuales permitirían el paso de una estructura que es inactiva respecto a la transcripción, a otra que es activa. (Hebbar, P. B. y Archer, T. K. 2003).

3.4 La uteroglobina y su gen.

La uteroglobina (UG) es una proteína de secreción, globular, homodimérica y de bajo peso molecular (16 kDa). Fue detectada por primera vez en el fluido uterino de conejas preñadas en la etapa preimplantacional (Krishnan, R. S. y Daniel, J. C., Jr. 1967; Beier, H. M. 1968), momento en que se convertía en el principal componente proteico de la secreción uterina. La UG se sintetiza y se secreta en el endometrio de la coneja durante los primeros días de la gestación, siguiendo un patrón de expresión temporal bastante definido. Su concentración aumenta a partir del segundo o tercer día de la preñez, alcanzando un máximo alrededor del quinto o sexto día (llega a constituir entre el 50% y el 80% de las proteínas totales del fluido uterino) y posteriormente disminuye hasta desaparecer casi completamente a partir del décimo día de la gestación (Mayol, R. F. y Longenecker, D. E. 1974; Gutiérrez-Sagal, R., Pérez-Palacios, G. et al. 1993). Este patrón puede reproducirse, de manera indistinguible del de la preñez natural, mediante un tratamiento hormonal que da lugar al estado de pseudopreñez (Bullock, D. W. y Willen, G. F. 1974; Daniel, J. C., Jr. 1976; Nieto, A. y Beato, M. 1980). La UG fue la primera proteína de mamíferos de la que se describió su regulación por progesterona. Además la UG y su gen demostraron ser un modelo adecuado para el estudio de la acción de la progesterona y de su receptor a un nivel molecular (Beier, H. M. 2000).

Después de su identificación inicial en el útero de las conejas, la UG también se ha detectado en otros órganos: en el oviducto (Kay, E. y Feigelson, M. 1972; Kirchner, C. 1972), el tracto genital masculino (Beier, H. M., Bohn, H.

et al. 1975; Kirchner, C. y Schroer, H. G. 1976; Noske, I. G. y Feigelson, M. 1976), el tracto respiratorio y el tracto digestivo (Noske, I. G. y Feigelson, M. 1976). En todos los casos se trata de una proteína sintetizada y secretada por los epitelios de dichos órganos (Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994; Beier, H. M. 2000).

Originalmente la UG se encontró en conejos y en otros miembros del género *Lagomorpha* (Nieto, A. y Lombardero, M. 1982; López de Haro, M. S. y Nieto, A. 1986). Posteriormente se detectó en otras especies de mamíferos: rata (Hagen, G., Wolf, M. et al. 1990; Nordlund-Moller, L., Andersson, O. et al. 1990), ratón (Sandmoller, A., Voss, A. K. et al. 1991; Ray, M. K., Magdaleno, S. et al. 1993), cerdo (Gutiérrez Sagal, R. y Nieto, A. 1998a), hámster (Gutiérrez Sagal, R. y Nieto, A. 1998b), mono (Hashimoto, S., Nakagawa, K. et al. 1996) y también en humanos (Dhanireddy, R., Kikukawa, T. et al. 1988; Kikukawa, T., Cowan, B. D. et al. 1988; Singh, G., Singh, J. et al. 1988; Mantile, G., Miele, L. et al. 1993). En ninguna de estas especies su expresión alcanza los valores que se dan en el endometrio de la coneja, considerándose incluso que la secreción masiva de UG en el útero de la coneja, que acompaña a la implantación del embrión, representa un caso especial. Aun así, su patrón de expresión en el útero humano se utiliza como marcador para identificar el estado biológico del microambiente intrauterino durante el periodo preimplantacional (Beier, H. M. 2000).

La UG ha recibido diferentes nombres en función del tejido de origen, la especie donde se ha identificado y las posibles funciones que se le han asignado, como por ejemplo: “proteína de 10 kDa de las células Clara de pulmón” (CC10), “proteína de secreción de las células Clara de pulmón” (CCSP) y “proteína de unión a bifenilos policlorados”. Después de años de controversias, se ha admitido que se trata de proteínas homologas. Además, hoy en día, al haberse descrito varias proteínas similares a la UG, se ha demostrado la existencia de una familia de proteínas a las que formalmente se denomina Secretoglobinas. La UG sería, en este esquema formal de nomenclatura, la SECRETOGLOBINA 1A1 (SCGB1A1) (Klug, J., Beier, H. M. et al. 2000).

La función fisiológica de la UG no se ha establecido de forma convincente, aunque existen varias hipótesis en función de algunas de sus propiedades más relevantes. Una de estas propiedades es su capacidad de unir compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular como progesterona y agentes xenobióticos como policlorobifenilos (PCBs) (Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994). En función de esta propiedad se le han atribuido funciones tales como agente protector en diversos epitelios (pulmonar, endometrial, etc.) frente a compuestos xenobióticos, proteína transportadora de progesterona en el útero o incluso como proteína secuestradora de progesterona para la protección del embrión frente a las altas concentraciones de la hormona que se alcanzan durante el periodo preimplantacional. También se ha descrito su capacidad de unir ácido retinoico y retinol por sitios diferentes a los de progesterona (López de Haro, M. S., Pérez Martínez, M. et al. 1994). Dado el papel importante que juegan estas sustancias en el sistema reproductor, así como en el desarrollo del embrión, la UG podría actuar en el útero como un transportador de las mismas, o incluso como un modulador de su acción. Además se ha demostrado su unión a la superficie de los espermatozoides (Mukherjee, D. C., Agrawal, A. K. et al. 1983; García, C., Regalado, F. et al. 1988) y su presencia en el interior del blastocisto (Krishnan, R. S. y Daniel, J. C., Jr. 1967; Beier, H. M. 1968; Kirchner, C. 1972).

Otras propiedades importantes de la UG son su capacidad de inhibir la fosfolipasa A₂ (PLA₂), así como ser sustrato de las transglutaminasas. Por ello se propuso un papel de la UG como inmunomoduladora o inmunosupresora de la respuesta inmune materna contra el feto (Mukherjee, A. B., Laki, K. et al. 1980). Aunque esta hipótesis no está plenamente aceptada, sí se ha seguido avanzando en los estudios del papel de la UG como moduladora de fenómenos inmunes e inflamatorios (Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994). Por último habría que señalar el posible papel de la UG en la regulación de la migración celular e invasión de la matriz extracelular del endometrio durante la implantación del embrión a través de su unión con un receptor proteico de membrana (Díaz González, K. y Nieto, A. 1995; Kundu, G. C., Mantile, G. et al. 1996).

Aunque la función fisiológica de la uteroglobina de conejo no esté plenamente establecida, su papel como sistema modelo para el estudio de la regulación de la expresión génica por hormonas esteroides ha hecho que su gen sea objeto de muchos trabajos. El gen de la UG de conejo (*ug*), ha sido clonado (Chandra, T., Bullock, D. W. et al. 1981; Menne, C., Suske, G. et al. 1982), así como los genes de humano (Singh, G., Katyal, S. L. et al. 1988), rata (Nordlund-Moller, L., Andersson, O. et al. 1990), ratón (Margraf, L. R., Finegold, M. J. et al. 1993) y hámster (Gutiérrez Sagal, R. y Nieto, A. 1998b).

El gen *ug* se encuentra en forma de copia única en el genoma haploide. Comprende aproximadamente 5 kpb del genoma y está compuesto por tres exones cortos de 103, 188 y 174 nucleótidos, separados por dos intrones de 2270 y 332 nucleótidos (Suske, G., Wenz, M. et al. 1983; Wolf, M., Klug, J. et al. 1992; Ray, M. K., Magdaleno, S. et al. 1993). Esta estructura está conservada en las diferentes especies donde se ha estudiado.

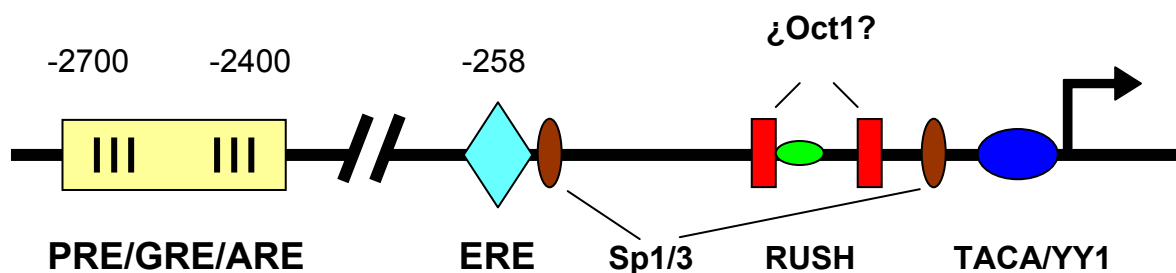


FIGURA 3. Esquema del promotor del gen *ug* de conejo. Sólo se representan los elementos de respuesta a hormonas (PRE/GRE/ARE y ERE) así como los sitios de unión de factores de transcripción en el promotor proximal (en marrón: Sp1/3; en rojo: Oct1; en verde: RUSH; en azul marino: TACA/YY1). En la parte superior se indica la distancia, en pares de bases, de los HREs al sitio de inicio de la transcripción (representado por la flecha).

Hace más de 20 años que se inició la caracterización de la región 5' del gen de la UG de conejo. En la FIGURA 3 se muestra un esquema básico de dicha región. La característica principal viene determinada por el hecho de que es un gen que está regulado por diferentes hormonas esteroides en diferentes

órganos. En el útero está regulado por progesterona, en el pulmón lo está por glucocorticoides, en el oviducto por estrógenos y en el epidídimo y próstata por andrógenos (Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994). En el caso de los glucocorticoides, andrógenos y progesterona la regulación se lleva a cabo posiblemente a través de los mismos HRE (PRE/GRE/ARE), situados lejos del inicio de la transcripción del gen *ug* (Cato, A. C., Geisse, S. et al. 1984; Bailly, A., Le Page, C. et al. 1986; Jantzen, K., Fritton, H. P. et al. 1987; Gómez Lahoz, E., López de Haro, M. S. et al. 1992; Scholz, A., Truss, M. et al. 1999). Por otra parte, los estrógenos lo harían a través de un ERE localizado en el promotor proximal (López de Haro, M. S., García, C. et al. 1990; Slater, E. P., Redeuhl, G. et al. 1990).

La expresión de *ug* en las células epiteliales del conejo está regulada por las hormonas esteroides a través de varios elementos de respuesta a hormonas. Pero parecen existir otros mecanismos de regulación que permiten la modulación o la complementación de la acción de las hormonas esteroides. Estos pueden ser muy importantes en ciertas especies donde los HRE no están conservados en el gen de la UG (Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994). Por ejemplo, en el caso del útero se ha descrito un bucle de realimentación positiva entre la progesterona y la prolactina, en el que cada hormona produciría un aumento de los niveles del receptor de la otra hormona en el endometrio de la coneja (Randall, G. W., Daniel, J. C., Jr. et al. 1991).

Como se comentó anteriormente, los promotores de los genes regulados por las hormonas esteroides contienen sitios de unión para otros factores de transcripción. Estos pueden colaborar con los receptores en su acción sobre la transcripción, e incluso ser imprescindibles para la misma. También pueden ser factores necesarios para el acoplamiento tridimensional correcto de otros factores que intervienen en la regulación de la transcripción o, incluso, actuar como transmisores de las señales de las hormonas esteroides en el caso de promotores que carecen de HREs. En el caso del gen *ug*, se ha demostrado que varios factores de transcripción están implicados tanto en su transcripción basal, como en la regulación por progesterona en el endometrio de la coneja. Entre estos factores nos encontramos con: el factor YY1 (Klug, J. y Beato, M.

1996), miembros de la familia de factores Sp (Dennig, J., Hagen, G. et al. 1995; Scholz, A., Truss, M. et al. 1998), NF-Y (Scholz, A., Truss, M. et al. 1999) y los factores RUSH/SMARCA3 (Haywardlester, A., Hewetson, A. et al. 1996).

Por otra parte, estudios de protección a la digestión con DNAsa I realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que un fragmento de aproximadamente 400 pb del promotor proximal del gen *ug* de conejo, es capaz de unir in vitro varios factores nucleares endometriales, algunos de ellos dependientes de progesterona (Pérez Martínez, M., García, C. et al. 1996). Dentro de ese promotor proximal, existía una zona a la que se unía un factor (o factores) dependiente de progesterona, al que se denominó elemento G' (-173/-184). En dicho elemento, la protección a la digestión con DNAsa I sólo aparecía en una de las dos cadenas, aunque de una forma muy intensa. La comparación de secuencias con las bases de datos de los sitios de unión de factores de transcripción, indicaba la posible existencia de un sitio de unión para los factores de transcripción de la familia SOX.

3.5 Los factores de transcripción de la familia SOX.

Las proteínas SOX constituyen una familia de más de 20 factores de transcripción relacionados estructuralmente. Se caracterizan por tener un dominio de unión al DNA muy conservado, del tipo "HMG-box", similar al que se encuentra en el factor de transcripción SRY (factor determinante del sexo) (Gubbay, J., Collignon, J. et al. 1990; Wegner, M. 1999). Las proteínas SOX juegan un papel clave en la regulación de la transcripción durante diversos procesos del desarrollo, la diferenciación y el destino celular (Wegner, M. 1999; Kamachi, Y., Uchikawa, M. et al. 2000).

El dominio "HMG box" está muy conservado entre todas las proteínas SOX y es capaz de unirse a la misma secuencia de DNA en diversos promotores: 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' (Wegner, M. 1999). Se han propuesto varias hipótesis para explicar cómo las distintas proteínas SOX pueden regular específicamente genes diferentes, puesto que su sitio de unión en los promotores tiene una secuencia muy parecida: en primer lugar se ha propuesto

que las diferencias en especificidad puedan deberse a las variaciones en los aminoácidos situados fuera del dominio de unión al DNA; en segundo lugar, a la interacción de los factores SOX con otros factores de transcripción específicos de tejido; y por último, a patrones diferentes de expresión espacio-temporal de los propios factores SOX (Pevny, L. H. y Lovell-Badge, R. 1997; Mertin, S., McDowall, S. G. et al. 1999; Kamachi, Y., Uchikawa, M. et al. 2000; Wilson, M. y Koopman, P. 2002).

Además de funcionar como factores de transcripción clásicos (en los que en muchos casos se han identificado los dominios de activación de la transcripción), algunas de las propiedades de las proteínas SOX hacen pensar que también pueden actuar modificando la estructura tridimensional de los promotores. Así, a diferencia de la mayoría de los factores de transcripción conocidos, se unen al DNA por el surco menor (Pevny, L. H. y Lovell-Badge, R. 1997; Wegner, M. 1999), induciendo una curvatura (“bending”) muy acusada en el DNA (Ferrari, S., Harley, V. R. et al. 1992; Connor, F., Cary, P. D. et al. 1994; Werner, M. H., Huth, J. R. et al. 1995). En función de estas características se ha postulado que las proteínas SOX podrían funcionar como elementos acopladores, interaccionando con otros factores de transcripción, incluso cuando éstos se encuentran unidos al DNA a bastante distancia de los sitios SOX.

En algunos miembros de esta familia (SOX9, SOX10 y SRY) se han caracterizado tanto “Señales de localización nuclear” (NLS), como “Señales de exportación nuclear” (NES) (Smith, J. M. y Koopman, P. A. 2004). Estas señales parecen estar conservadas en otras proteínas de esta familia como SOX1, SOX4, SOX13, SOX17, SOX20 y SOX30 (Argentaro, A., Sim, H. et al. 2003). Se ha postulado que el control del equilibrio entre la importación y la exportación nuclear de estas proteínas pudiera ser un medio de regular su actividad como factores de transcripción.

Los factores SOX se han clasificado en 9 subgrupos en función del grado de homología dentro del dominio “HMG box”, y en función de la presencia de motivos conservados fuera de él (Wegner, M. 1999; Bowles, J., Schepers, G. et

al. 2000). El subgrupo F está formado por tres factores relacionados llamados: SOX7, SOX17 y SOX18. En *Xenopus*, SOX17 actúa como un inductor temprano del endodermo (Hudson, C., Clements, D. et al. 1997) y se expresa durante la espermatogénesis en el ratón, postulándose su participación como factor de transcripción en la fase premeiótica de la espermatogénesis (Kanai, Y., Kanai-Azuma, M. et al. 1996). Entre las características de este factor SOX17, es interesante señalar que se ha descrito su interacción con β -catenina (Zorn, A. M., Barish, G. D. et al. 1999) demostrándose que ambos factores cooperan en la regulación de la transcripción de determinados genes endodermales (Sinner, D., Rankin, S. et al. 2004). Recientemente se ha descrito la influencia de SOX17 en la diferenciación de las células del epitelio respiratorio en ratones (Park, K. S., Wells, J. M. et al. 2006). En ese mismo trabajo, sus autores detectan la presencia de la proteína SOX17 y de su mRNA en las células epiteliales del oviducto y del endometrio, tanto durante el desarrollo embrionario, como en el ratón adulto. Hay que recordar que es en esos tres epitelios (pulmonar, endometrial y el del oviducto) donde la secreción de la UG parece ser más importante. Estos datos concuerdan con los obtenidos en un estudio a gran escala de los transcriptomas de una gran variedad de tejidos de ratón y humano (Su, A. I., Wiltshire, T. et al. 2004). En este estudio se observa que en humanos, la expresión de SOX17 es significativamente alta en útero, pulmón y cardiomiocitos; por otra parte, en ratón, los tejidos que expresan mayor cantidad de SOX17 son el ovario, el útero y el pulmón.

En conclusión, los datos experimentales obtenidos por varios grupos de investigación, parecen mostrar, en diferentes especies, una relación entre la expresión de UG y SOX17 en tejidos y órganos donde se expresan intensamente: útero y pulmón. Estos antecedentes son compatibles con la hipótesis de una implicación del factor de transcripción SOX17 en la regulación por progesterona de *ug* en el útero de la coneja.

4 OBJETIVOS

En función de lo anteriormente expuesto, este trabajo se inició con el propósito de identificar y caracterizar factores de transcripción regulados por progesterona que se unen al promotor del gen de la UG de conejo, con el fin de establecer los efectos que la progesterona realiza en la regulación de este gen, ya sea de forma directa o indirecta, y estudiar el posible sinergismo entre ellos. Estos factores se buscaron en los extractos nucleares de conejas tratadas con progesterona o hCG durante 5 días (conejas pseudoembarazadas), que es el momento en el que la secreción de UG es máxima. Se puede dividir el proyecto en dos fases diferenciadas. Los objetivos concretos de la primera fase fueron:

- A. Comparar los patrones de protección a la digestión con DNAsa I que producen los extractos nucleares de endometrio de conejas controles y de conejas pseudoembarazadas en el promotor proximal (400 pb) del gen *ug*. Se buscaba la existencia de factores dependientes o inducidos por progesterona.
- B. Analizar las secuencias protegidas por los extractos de las conejas pseudoembarazadas a través de herramientas bioinformáticas buscando posibles sitios de unión de factores conocidos.

La segunda fase consistió en el estudio detallado de una de esas secuencias protegidas. Se eligió el denominado elemento G' (Pérez Martínez, M., García, C. et al. 1996) por varios motivos: por la intensidad de la protección diferencial entre coneja control y coneja tratada, por no haber sido caracterizado antes el factor proteico que se une a él, y por datos funcionales previos, que le atribuían una especial importancia en la expresión del gen *ug*. En esta segunda fase, los objetivos concretos fueron:

- C. Caracterizar por EMSA la unión de ese factor proteico a un oligonucleótido, que contenía la secuencia del elemento G' así como algunas secuencias flanqueantes del promotor.
- D. Purificar e identificar dicho factor por técnicas bioquímicas y de biología molecular.
- E. Comprobar la funcionalidad del elemento G' y del factor proteico identificado en el punto anterior, con ensayos en células en cultivo.
- F. Por último, estudiar el efecto de la progesterona en el endometrio de la coneja respecto al factor nuclear que se une al elemento G' en el promotor del gen de la UG. Es decir, analizar los posibles mecanismos por los que la progesterona podría inducir el gen *ug* a través de la unión de dicho factor al elemento G' (estimulación de la síntesis del factor, cambio de su localización subcelular, aumento de su afinidad por el DNA, etc).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Productos Químicos y Reactivos.

El [γ -³²P] ATP (3000Ci/mmol) se obtuvo de Amersham Internacional. Las enzimas de restricción y modificación, la Leupeptina y la Aprotinina (Trasylol), el Poli(dG-dC) y el Poli(dI-dC) fueron de Roche Applied Science. Los oligonucleótidos sintéticos fueron suministrados por Isogen Biosciences. La Gonadotropina Coriónica Humana (hCG-lepori 500) se obtuvo de Farma-Lepori (Grupo Angelini, Barcelona). Otros productos (sales, tampones, detergentes, etc.) fueron suministrados por las casas comerciales Bio-Rad, Gibco, Difco, Sigma, Fluka, Merck y Probus. El agua empleada en todos los experimentos fue de grado Milli Q (Millipore).

5.2 Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo son los siguientes: anti-USF1 (sc-229 X, Santa Cruz Biotechnology), anti-USF2 (sc-861 X, Santa Cruz Biotechnology), anti-SRY (sc-8233 X, Santa Cruz Biotechnology), anti-SOX9 (sc-17340 X, Santa Cruz Biotechnology), anti-SOX17 (sc-17355 X, Santa Cruz Biotechnology), anti-SOX4 (sc-17326 X, Santa Cruz Biotechnology), anti-FLAG (M2, Sigma), anti-Nucleolina (sc-13057, Santa Cruz Biotechnology) y anti- α -Tubulina (B-5-1-2, Sigma). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de diferentes casas comerciales (Dako, Pierce, Amersham). En algún caso, cuando la especie de origen del anticuerpo primario era conejo, se utilizó el anticuerpo secundario Trueblot HRP anti-Rabbit IgG (eBioscience).

5.3 Animales de experimentación.

Las conejas utilizadas eran de la raza New Zealand con edades de entre 8 y 12 meses. Los animales problema se trataron 5 días con progesterona para hacerlas pseudoembarazadas (previamente, las conejas habían sido tratadas

dos días con estradiol, con el fin de aumentar el número de receptores de progesterona en el endometrio) (Nieto, A. y Beato, M. 1980). Alternativamente, se trataron con gonadotropina coriónica humana (hCG) mediante una única inyección intravenosa de 50 U.I. (día 0). Este segundo tratamiento, aún funcionando a través de las mismas hormonas que el primero es, teóricamente, más similar al mecanismo fisiológico del embarazo puesto que produce la rápida ovulación y la secreción de altas cantidades de progesterona endógena.

5.4 Obtención de extractos celulares.

Los úteros se extrajeron quirúrgicamente, se abrieron longitudinalmente sobre una placa de vidrio enfriada sobre hielo y se obtuvo el endometrio por un raspado suave con un portaobjetos para microscopía. El tejido endometrial se homogenizó en un Potter de vidrio con vástago de Teflón en 5 volúmenes (P/V) de tampón H (0.3 M Sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 µg/ml de Aprotinina, 1 µg/ml de Leupeptina, 0.5 mM de PMSF y 50 µM de Ortovanadato Sódico). El homogenizado se filtró a través de varias capas de gasa y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró con cuidado y se volvió a centrifugar a 105000 g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante de esta última centrifugación se consideró la **Fracción Citosólica**.

Por otra parte, el precipitado de la primera centrifugación a 3000 g (fracción nuclear cruda), se resuspendió en tampón H, se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 0.2% (v/v) y se volvió a centrifugar 10 minutos a 3000 g a 4°C. El nuevo precipitado se resuspendió en tampón H conteniendo 1.9 M Sacarosa, se depositó sobre un colchón de 2 M Sacarosa en tampón H y se centrifugó durante 1 hora a 4°C a 12000 g. El "pellet" de núcleos purificados se usó para la preparación de extractos nucleares, esencialmente según el método de Dignam (Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. et al. 1983). Para ello, los núcleos se extrajeron durante 20 minutos con 3 volúmenes de 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 25% Glicerol, 0.4 M KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 2.5 µg/ml de Aprotinina y de Leupeptina, 0.5 mM PMSF y 50 µM de Ortovanadato Sódico. La mezcla se centrifugó 15 minutos a 35000 g a 4°C, y el

sobrenadante se consideró el **Extracto Nuclear**. La concentración de proteína de los extractos se determinó por el método de Lowry (Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. et al. 1951).

El endometrio procedente de animales no tratados, se denominó **Endometrio Control**, y el procedente de animales tratados con progesterona o hCG, **Endometrio Px**, donde x indicaba el número de días del tratamiento con progesterona, o el número de días desde la inyección de hCG.

Los extractos nucleares de hígado de conejo se obtuvieron por el mismo método que los de endometrio. Los extractos citosólicos y nucleares de células en cultivo se obtuvieron como está descrito en (Schreiber, E., Matthias, P. et al. 1989).

5.5 Ensayos de protección a la digestión con DNAsa I.

El plásmido pUG400 que lleva un fragmento *Bam*HI (-396/+8) del promotor de *ug* (Gómez Lahoz, E., López de Haro, M. S. et al. 1992), fue digerido con *Eco*R I o *Hind* III para marcar ambas cadenas del DNA con [γ -³²P] ATP y Polinucleótido Quinasa. Después de cada digestión, los fragmentos de restricción obtenidos, se purificaron por electroforesis en geles de acrilamida o agarosa. La digestión del plásmido pUG400 con la enzima *Ava* I proporcionó fragmentos internos del promotor (-396/-193 y -136/+8) que se podían marcar y usar para leer completamente ambas cadenas del DNA. Los extractos nucleares (50-100 μ g) se preincubaron 10 minutos a 0°C con 2 μ g de Poli(dI-dC) en 100 μ l de tampón B (15 mM Tris-HCl pH 7.5, 12% Glicerol, 5 mM DTT, 2mM EDTA, 5 mM MgCl₂ y 60 mM KCl). Posteriormente se añadió el fragmento de 400 pb o los subfragmentos generados con *Ava* I, marcados terminalmente en una única cadena, y la mezcla se incubó a 25°C durante 45 minutos. Después del tratamiento con DNAsa I (1.5 minutos a 25°C), las muestras se digirieron con Proteinasa K en presencia de 1% SDS y 10 μ g de tRNA. El DNA fue entonces fenolizado, precipitado con etanol y analizado en geles de poliacrilamida al 6% en presencia de urea 8M. Los geles se secaron y se

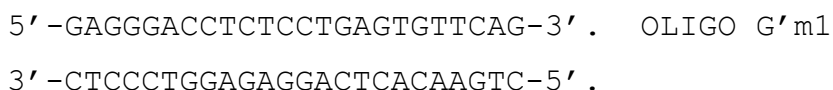
autoradiografiaron. En paralelo, se analizó en cada gel un carril con una reacción de secuencia por el método químico de Maxam y Gilbert (G+A) para asignar la secuencia correspondiente a las zonas protegidas a la digestión (Maxam, A. M. y Gilbert, W. 1980).

5.6 Ensayos del cambio de la movilidad electroforética (EMSAs).

Un oligonucleótido sintético que contenía la secuencia del elemento G' (oligo G'wt; el elemento G' está señalado por una caja) y correspondiente a una zona del promotor proximal del gen de la uteroglobina de conejo (-192/-169), se marcó terminalmente en 5' con Polinucleótido Quinasa y [γ -³² P] ATP. Posteriormente se anilló con su complementario y se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa. La secuencia de dicho oligonucleótido y la de su complementario es:



Para realizar los EMSAs, los extractos nucleares (5 μ g de proteína) se preincubaron 10 minutos a 4°C con 1-2 μ g de Poli(dG-dC) o Poli(dI-dC) en 15-25 μ L de tampón B con 2% CHAPS y 2mg/mL de SAB (concentración final). Posteriormente se añadió el oligonucleótido G'wt marcado. En los experimentos de competición, se añadieron también los correspondientes oligonucleótidos competidores no marcados (anillados con sus complementarios y purificados) en un exceso molar de 25 veces, y la reacción de unión se dejó continuar 20 minutos a temperatura ambiente. Las secuencias de los oligonucleótidos usados en los experimentos de competición, así como las de sus complementarios fueron:



5' -GAGGGACCTCTTGTGTGAGTTCAG-3' . OLIGO G'm2
3' -CTCCCTGGAGAACACACTCAAGTC-5' .

5' -GAGGGACCCATTGCATGAGTTCAG-3' . OLIGO G'm3
3' -CTCCCTGGGTAACGTACTCAAGTC-5' .

5' -GAGGGACCCATTGTGAGTGTTTCAG-3' . OLIGO G'm4
3' -CTCCCTGGGTAACACTCACAAGTC-5' .

5' -CCTATCGACATTGTGAATCGAGTC-3' . OLIGO G'm5
3' -GGATAGCTGTAACTTAGCTCAG-5' .

5' -GCGTACTCTGCCCCGCCCCCTCTGACTC-3' . OLIGO Sp1
3' -CGCATGAGACGGGCGGGGAGACTGAG-5' .

5' -GGGTAAACAGAACAAATGGAATCTGGTAGA-3' . OLIGO S9WT
3' -CCCAATTGTCTTGTACCTTAGACCATCT-5' .

Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 4 o 6% en tampón TBE 0.5X. Los geles se secaron bajo vacío a 80° C y se autoradiografiaron a -70° C con pantallas intensificadoras. En algunos casos se realizó un análisis densitométrico de las bandas retardadas en un scanner Bio-Rad GS-710 con el programa informático suministrado por la propia casa comercial (Quantity One). Cuando se trabajó con proteínas purificadas, no se añadió el competidor inespecífico Poli(dG-dC), o su cantidad se bajó a 0.1 µg. Para los ensayos de “super-shift” con anticuerpos, estos se añadieron a las reacciones de unión durante la preincubación, a una concentración de 0.05-0.2 mg/ml.

5.7 Análisis de Ferguson de los complejos DNA-proteína.

Para calcular el tamaño aproximado de las bandas retardadas observadas en el EMSA se realizó un análisis de Ferguson (Ferguson, K. A. 1964),

adaptado a EMSAs (Orchard, K. y May, G. E. 1993). El método de Ferguson permite determinar indirectamente la masa molecular de una proteína nativa, unida o no a un ligando, al someterla a electroforesis, junto a varias proteínas de masa molecular conocida, en una serie de geles no desnaturizantes de diferente concentración de poliacrilamida.

En el método adaptado a las bandas retardadas de un EMSA, se procede de forma similar: las mezclas del extracto nuclear y el oligonucleótido marcado (descritas en el apartado 3.6), se someten a electroforesis en una serie de geles de poliacrilamida al 4, 6, 8 y 10%. En los mismos geles, pero en carriles distintos, se analizan proteínas patrón de masa molecular conocida (Sigma-Aldrich), en el mismo tampón de carga. Estas fueron: la SAB, de masa molecular 66 kDa (y que en su estado nativo, permite apreciar en un gel no desnaturizante el dímero de 132 kDa y el trímero de 198 kDa); la Ovoalbúmina de 45 kDa; y la Anhidrasa Carbónica de 29 kDa. La cantidad utilizada de cada proteína fue de 4 µg. Trás la electroforesis, el carril con la reacción de EMSA se procesó para autoradiografía, mientras que la parte del gel con las proteínas patrón, se tiñó con azul de Coomassie (Fairbanks, G., Steck, T. L. et al. 1971). El procesamiento de los datos para obtener la masa molecular del complejo proteína-oligonucleótido se realizó según se describe en el trabajo original. La masa molecular del oligonucleótido se restó del valor obtenido.

5.8 Plásmidos.

La construcción del plásmido **pUG400/luc-wt**, que lleva un fragmento de 404 pb del promotor proximal del gen de la UG de conejo clonado en el plásmido **pGL3 Enhancer** (Promega), ya fue descrita en (Garcia, C. y Nieto, A. 1999). Esta construcción contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor proximal del gen *ug*. El plásmido **pUG3.2/luc-wt** es similar al anterior, pero con un fragmento de 3.2 kpb correspondientes al mismo promotor.

Por otra parte, el plásmido **pUG400** (Gómez Lahoz, E., López de Haro, M. S. et al. 1992), que lleva el mismo fragmento de 404 pb clonado en el

plásmido pUC18, sirvió como molde para realizar dos construcciones con cambios en la secuencia del elemento G', usando el kit Quick Change site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). En un caso, los oligonucleótidos usados en la mutagénesis del elemento G' fueron:

5' -CCCGAGGGACCCTCTCCTGAGTGTTCAGTTTCAATAGG-3' . OLIG.37
5' -CCTATTGAAACTGAACACTCAGGAGAGGTCCCTCGGG-3' . OLIG.37C

Para la otra construcción, los oligonucleótidos usados fueron:

5' -GAGGGACCCATTGTGAGTGTTCAG-3' . OLIGO G'm4
5' -CTGAACACTCACAATGGGTCCCTC-3' . OLIGO G'm4C

El oligo 37 es idéntico en su parte central al oligo G'm1 aunque con más bases flanqueantes para un mejor anillamiento. En ambos casos las bases subrayadas están mutadas respecto a la secuencia original. Las mutaciones en el elemento G' fueron confirmadas por la secuenciación de ambas construcciones usando los oligonucleótidos M13 Universal Primers (Boehringer-Mannheim) y se corresponden con las que están presentes en los oligonucleotidos G'm1 y G'm4, respectivamente. Las construcciones resultantes fueron digeridas con *Kpn* I y *Hind* III y el fragmento liberado fue subclonado en el vector pGL3 Enhancer (Promega). Los plásmidos obtenidos fueron denominados **pUG400/luc-m1** y **pUG400/luc-m4** y ambos llevan el gen de la luciferasa bajo el control del promotor proximal del gen *ug*, pero con dos versiones del elemento G' mutado.

El plásmido de expresión **pCMV-Tag2B/SOX17** fue una donación del Dr. A. Murakami de la Universidad de Kyoto, Japón (Murakami, A., Shen, H. et al. 2004); este plásmido contiene la región codificante del cDNA de SOX17 de ratón insertada en el plásmido **pCMV-Tag2B** (Stratagene). El plásmido **pSVβGal** era de Promega. El plásmido **pCI-NEO-β-CATENINXL-Δ45** provenía del Dr. B. Vogelstein (Universidad Johns Hopkins, EEUU; Instituto Médico Howard Hughes, Maryland, EEUU).

5.9 Cultivo de células y ensayos de la actividad del promotor.

La línea celular de origen endometrial HEC-1A fue obtenida de la ATCC, (Rockville, MD, USA). Las células se crecieron en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal de ternera (Gibco) al 10%.

Para los ensayos de la actividad del promotor por expresión transitoria, las células fueron transfectadas con Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies), según el protocolo suministrado por el fabricante, con 1 μ g de los plásmidos pUG400/luc-wt, pUG400/luc-m1, o con 1 μ g del plásmido sin promotor pGL3 Enhancer. Para ver el efecto de SOX17 en la actividad del promotor de *ug*, las células fueron co-transfectadas con 0.3 μ g del vector de expresión pCMV-Tag2B/SOX17. En paralelo se co-transfectaron células con 0.3 μ g del plásmido pCMV-Tag2B, para ver la actividad basal del promotor CMV. En todos los casos las células fueron co-transfectadas con 0.5 μ g del plásmido pSV β Gal, para corregir las diferencias en la eficiencia de la transfección. Las células se dejaron transfectando en medio sin suero entre 6 y 8 horas. Se cambió entonces el medio de transfección por medio con suero y las células se siguieron cultivando como se mencionó anteriormente. 48-72 horas después de la transfección, las células se lisaron y la actividad luciferasa y β -galactosidasa se midió tal como está descrito (Gutiérrez Sagal, R. y Nieto, A. 1998b).

5.10 Purificación de proteínas que se unen al elemento G'.

Los extractos nucleares de endometrio de conejas tratadas 5 días con progesterona (endometrio P5), se precipitaron a 0° C con sulfato amónico a una concentración final del 50% de saturación. En este paso precipitaban aproximadamente el 70% de las proteínas nucleares, incluyendo la mayor parte de aquellas que se unían al elemento G'.

El precipitado de proteínas se resuspendió en tampón B, pero sin KCl, y se añadió tampón de muestra 5X (Laemmli, U. K. 1970). Después de 10 minutos de incubación a 37° C, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel semipreparativo de poli(acrilamida) al 8% en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, U. K. 1970), con marcadores de masa molecular en carriles adyacentes. A juzgar por la tinción con Azul de Coomassie, este tratamiento suave con SDS resultó en un patrón de proteínas similar al que se obtenía calentando la muestra a 100° C, y era necesario para mantener íntegra la mayor parte de la actividad de unión al elemento G' (Ossipow, V., Laemmli, U. K. et al. 1993). Al final de la electroforesis, el gel se cortó en piezas de 2-3 mm y las proteínas se extrajeron de ellas durante 3 horas a 37° C en 10 volúmenes de tampón E (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 µg/mL Aprotinina, 10 µg/mL Leupeptina, 50 µM ortovanadato Sódico y 10% Glicerol). Las muestras se equilibraron y concentraron por centrifugación en microfiltros Ultrafree-MC (Millipore) tres veces consecutivas, añadiendo tampón B antes de cada centrifugación. Posteriormente se identificó por EMSA la fracción que contenía la actividad de unión al oligonucleótido G'wt (fracción correspondiente a una M_r de 50000-65000), y se estimó que la cantidad recuperada de actividad de unión al elemento G' era aproximadamente el 65%.

Para la cromatografía de afinidad se usó Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno, a la que se unieron covalentemente concatémicos del oligonucleótido G'wt, según las técnicas descritas por Kadonaga y Tjian (Kadonaga, J. T. y Tjian, R. 1986). La cantidad de DNA (oligonucleótidos G'wt autoligados) que se unió covalentemente a la matriz fue de 10-20 µg por mL de resina. Este contenido era suficiente según los trabajos anteriormente citados. Se realizó entonces una cromatografía de afinidad de extractos del gel semipreparativo, que contenían la actividad de unión al elemento G', en una columna de 1 mL de la mencionada resina. La cromatografía se desarrolló en tampón B, y se dejó que la muestra interaccionara con el oligonucleótido inmovilizado durante 3 horas a 4° C. La columna se lavó con 10 volúmenes de tampón B y las proteínas unidas se eluyeron con tampón B conteniendo 0.5 M

NaCl. El material eluído se analizó por SDS-PAGE. Las bandas de proteína se visualizaron con el método de tinción PlusOne Silver Staining Kit (Amersham Biosciences). La recuperación de la actividad de unión al elemento G' estimada por EMSA fue superior al 95% para la precipitación con sulfato amónico, del 70% para la extracción del SDS-PAGE semipreparativo, y del 50%, aproximadamente, en el caso de la cromatografía de afinidad.

5.11 Identificación de proteínas por técnicas de proteómica.

Para la identificación de las proteínas de interés por espectrometría de masas, fue necesario utilizar una importante cantidad del material purificado en el último paso de cromatografía de afinidad. Así, este material se concentró mediante precipitación con TCA al 10% (concentración final) durante 1 hora a 0° C, y centrifugación durante 15 minutos a 4° C a 20000 g. Esta preparación concentrada se sometió a electroforesis en un gel de acrilamida al 8% en presencia de SDS. El gel fue teñido con el método de tinción de plata que se mencionó anteriormente. Este método es compatible con las técnicas de proteómica, usadas para la identificación de proteínas, que se llevaron a cabo en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Las bandas de interés se escindieron del gel para su análisis.

Para estos análisis de proteómica, las piezas de gel con las bandas de proteína seleccionadas se incubaron varios minutos en agua de muy alta pureza y se digirieron con tripsina según está descrito (Shevchenko, A., Wilm, M. et al. 1996), con algunas variaciones. Los péptidos trípticos fueron analizados tanto por espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF, como por nano-cromatografía líquida y espectrometría de masas del tipo trampa iónica. En el primer caso, los espectros de MALDI-TOF se utilizaron para tratar de identificar proteínas por "huella peptídica" con el software Mascot (Matrix Science, London, UK) y la base de datos MSDB. En el segundo caso se obtuvieron los espectros de fragmentación de péptidos concretos, a partir de los cuales se pudieron deducir las secuencias de algunos de ellos.

5.12 Inmunoblot (Western blot).

Los inmunoblots se realizaron según técnicas típicas. Las proteínas separadas en SDS-PAGE se transfirieron a filtros de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en un aparato "Semi-dry blotter" de Sigma. Los filtros se bloquearon con proteínas de leche desgrasada y se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios. Tras el lavado, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. En todos los casos la señal fue detectada por quimioluminiscencia (Western lightning, PerkinElmer Life Sciences, Inc.). El análisis densitométrico de las bandas de proteína se realizó también con un scanner Bio-Rad GS-710 con el programa informático suministrado por la propia casa comercial (Quantity One).

5.13 Valoración del mRNA de UG.

La obtención del RNA total de endometrio así como la valoración del mRNA de UG, mediante hibridación con un cDNA radiactivo, se realizaron según se ha descrito (Gonzalez, M., Garcia, C. et al. 1996).

5.14 Determinación cuantitativa de UG por radioinmunoensayo.

La secreción del lumen uterino se obtuvo mediante perfusión del lumen con 5 mL de PBS. La valoración de su contenido en UG se realizó mediante un radioinmunoensayo específico según se ha descrito previamente (Nieto, A. y Beato, M. 1980).

6 RESULTADOS

6.1 Análisis del promotor proximal del gen *ug* por ensayos de protección a la digestión con DNAsa I.

En el endometrio de la coneja, el gen *ug* está fuertemente inducido por progesterona. Como se veía en la FIGURA 3, los elementos de respuesta a progesterona en el promotor del gen *ug*, están situados a más de 2 kpb del punto de inicio de la transcripción. Pensando que el efecto de la progesterona y de su receptor en la activación de la transcripción de este gen, pudiera estar facilitado por la existencia de factores de transcripción, que también se estimularían o activarían por la hormona y que se unirían al promotor proximal del gen de la UG, se realizaron experimentos de protección a la digestión con DNAsa I de dicho promotor proximal, en presencia de extractos nucleares de endometrio control y de endometrio P5 (animales tratados 5 días con progesterona). Como control, también se realizaron estos experimentos con extractos nucleares de hígado de conejo, un tejido donde la UG nunca se expresa.

Como se puede ver en la FIGURA 4, los resultados mostraron diferentes patrones de protección. Existían zonas protegidas comunes a los dos tejidos (endometrio e hígado) y otras específicas de los extractos de endometrio. Dentro de estas, se identificaron varias zonas donde la protección se intensificaba, o incluso solo aparecía, cuando se utilizaban los extractos endometriales de animales P5. En la FIGURA 5 se muestra un esquema de los resultados obtenidos con los diferentes extractos nucleares, donde se señalan los diferentes elementos protegidos, así como los sitios de hipersensibilidad.

Algunas de las zonas protegidas contenían secuencias similares a los sitios de unión de factores de transcripción conocidos (factores de la familia del Sp1, de

la del Oct-1, de la del HNF-3 y de la del factor GATA) (Pérez Martínez, M., García, C. et al. 1996).

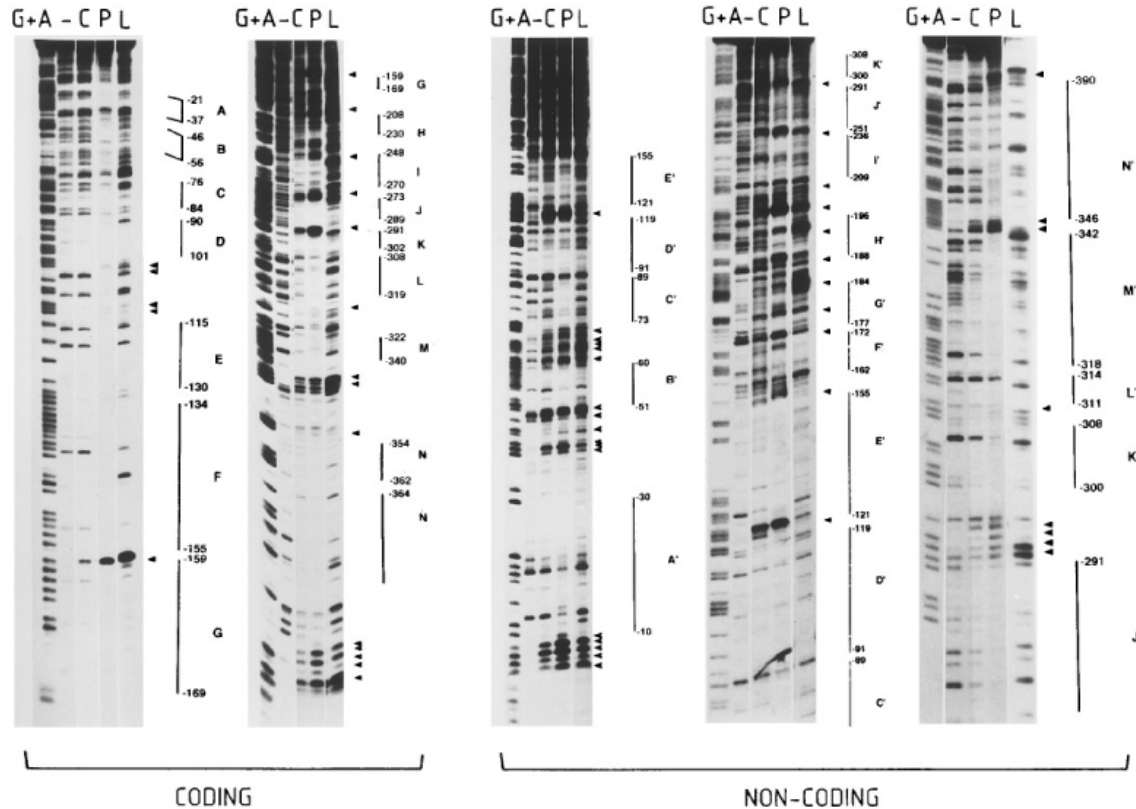


FIGURA 4. Análisis de la interacción de factores nucleares con el promotor proximal del gen de la UG: resultados de los experimentos de protección a la digestión con DNasa I. Estos experimentos se realizaron sobre ambas cadenas del DNA (codificante y no codificante) con extractos nucleares de hígado de conejo (L), de endometrio de conejas control (C), y de endometrio de conejas tratadas con progesterona 5 días (P). Se incluía un carril de una digestión sin extracto nuclear (-), así como una reacción de secuenciación (G+A), tal como se indicaba en Materiales y Métodos. Las protecciones a la digestión están indicadas por líneas verticales y sus límites en la secuencia del promotor, señalados por su numeración. Las puntas de flecha indican hipersensibilidades a DNasa. Los resultados son representativos de varios experimentos realizados con extractos nucleares de diferentes animales.

En algunos casos (elementos A, E, F y H), los elementos protegidos y los factores de transcripción que se unían a ellos, así como su funcionalidad en el

endometrio de la coneja, habían sido estudiados previamente por otros autores (Rider, V. y Peterson, C. J. 1991; Hagen, G., Muller, S. et al. 1992; Klug, J. y Beato, M. 1996), lo que parecía validar nuestros resultados de protección a la digestión por DNAsa I: es decir, que las protecciones observadas en nuestros estudios estarían producidas por factores de transcripción. Además, los elementos protegidos E y F, contienen secuencias de unión de factores implicados en la regulación de este gen (Oct-1 y HNF-3) aunque en otro tejido y en otra especie diferente (el pulmón de rata) (Bingle, C. D. y Gitlin, J. D. 1993; Sawaya, P. L., Stripp, B. R. et al. 1993).

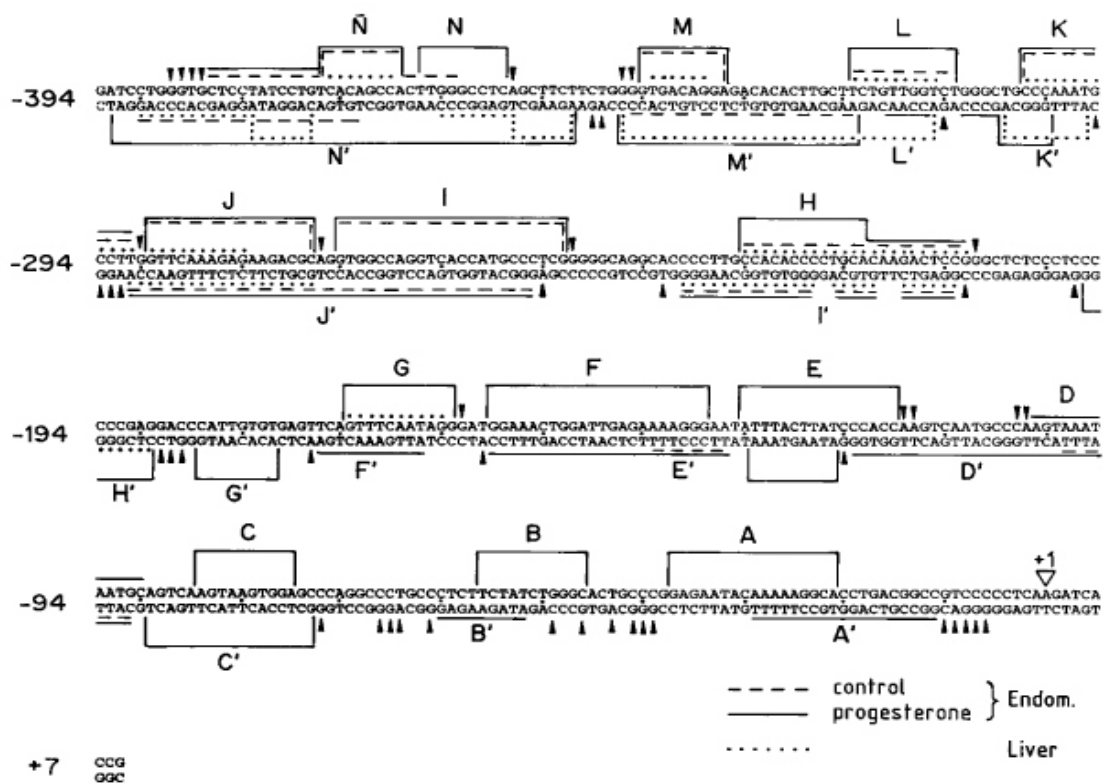


FIGURA 5. Representación esquemática de los elementos protegidos a la digestión con DNasa I (cajas) y de los sitios de hipersensibilidad (puntas de flecha), sobre la secuencia de nucleótidos del promotor proximal del gen de la UG. Los elementos con una protección más intensa se representan con una mayor altura de las cajas. También se indica el sitio de inicio de la transcripción (+1).

Los elementos que más interesaban, eran aquellos que, o solo aparecían protegidos con los extractos nucleares de endometrio P5, o en los que aumentaba la intensidad de la protección respecto a la que aparecía con los extractos endometriales de animales control: es decir, los elementos reconocidos por factores nucleares inducidos por progesterona. Así por ejemplo, los elementos E y F ya estaban descritos como sitios de unión de factores presentes en el endometrio estimulado por progesterona (Rider, V. y Peterson, C. J. 1991). Otro elemento interesante, el elemento A, contenía la región de la caja TATA. Mientras la mayoría de las regiones protegidas descritas en estos experimentos estaban relativamente bien conservadas entre los promotores de diferentes especies, en el caso de la caja TATA existe una diferencia significativa. Mientras que los promotores de ratón, rata y humano contienen una caja TATA típica, el de conejo tiene una secuencia TACA no canónica. Esto ha llevado a un estudio más profundo de esta región, que ha llevado a la identificación del factor YY1 como factor que se une en esta zona cercana a la caja TACA (Klug, J. y Beato, M. 1996), y a la caracterización de una secuencia del tipo "E-box" a la que parecen unirse factores dependientes de progesterona (García, C. y Nieto, A. 1999).

Otra zona interesante era el elemento G'. La protección sólo se manifestaba con claridad en la cadena complementaria (FIGURA 4 y FIGURA 5), y se seleccionó para su posterior análisis, porque en un estudio previo, la mutación de esta zona producía un importante descenso de la actividad de este promotor en experimentos de expresión transitoria en líneas celulares de origen endometrial, pero no en líneas de origen pulmonar (Suske, G., Lorenz, W. et al. 1992). Además, no se había realizado ningún trabajo para determinar la naturaleza del factor o factores implicados en esta protección, lo cual hizo del elemento G' un buen candidato para proseguir su estudio.

En la FIGURA 6 se muestra con más detalle la protección a la digestión con DNasa I que ejerce un extracto nuclear de endometrio P5. Puede apreciarse como este extracto nuclear produce una intensa protección de digestión sobre la secuencia del elemento G'. Además aparece una banda de

hipersensibilidad en posición -185 (respecto al sitio de inicio de la transcripción) de la cadena complementaria. Esta banda de hipersensibilidad a la digestión con DNAsa I también se produce con los extractos de animales controles y delimita uno de los extremos de la protección. Por otra parte esta protección está delimitada en el otro extremo por otra banda de hipersensibilidad en posición -174.

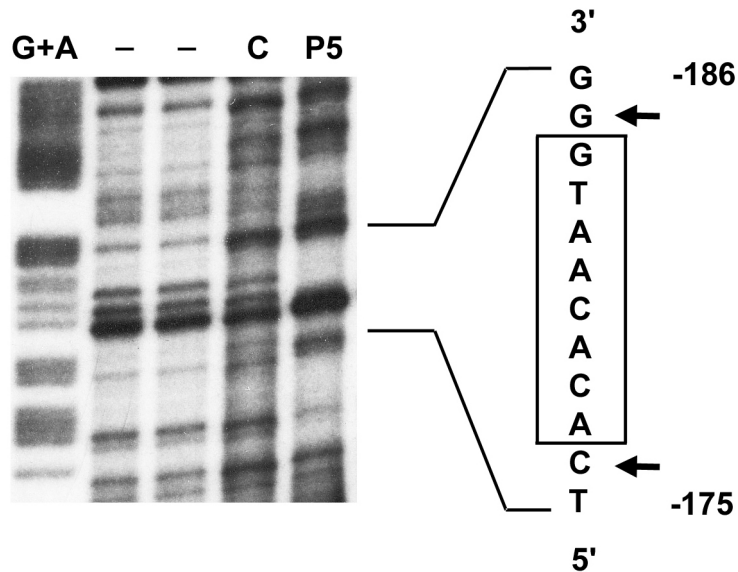


FIGURA 6. Detalle del “footprint” G’ o elemento G’. Los carriles marcados como “-“ indican digestiones con DNAsa I sin la presencia de extracto nuclear. El carril “C” corresponde a una digestión en presencia de extracto nuclear de endometrio control, y el marcado como “P5” en presencia de extracto nuclear de endometrio P5. En paralelo se analizó un carril G+A (ver Materiales y Métodos). A la derecha se expone parte de la secuencia de la cadena complementaria del promotor proximal del gen de la UG. En ella, dentro de una caja, se marca la secuencia protegida, y las flechas, que indican bandas de hipersensibilidad.

La comparación de las secuencias de los promotores del gen de la UG de diferentes especies (rata, ratón, conejo y humano), mostró un alto grado de conservación del elemento G’ (FIGURA 7). Esto sugería que dicho elemento podría ser importante también en la regulación de este gen en otras especies.

Conejo	5'	TCACACAATGGG	3'	(-175/-186)
Humano	5'	TCACACAATGGG	3'	(-180/-191)
Rata	5'	TCACACAAT <u>a</u> GG	3'	(-166/-177)
Ratón	5'	TCACACAAT <u>a</u> GG	3'	(-165/-176)

FIGURA 7. Comparación de la secuencia del elemento G' en varias especies. Se muestra la secuencia de la cadena complementaria y la distancia con el sitio de inicio de la transcripción. Las bases que cambian respecto a la secuencia de conejo están subrayadas y en minúscula. Las secuencias fueron obtenidas de las bases de datos públicas (conejo AC: X01423; humano AC: X59875; rata AC: X51318; ratón AC: U01247).

6.2 Caracterización preliminar del factor nuclear dependiente de progesterona que se une al elemento G'.

Un análisis de la secuencia del elemento G' en las bases de datos bioinformáticas, reveló que existía un posible sitio de unión para los factores de transcripción de la familia SOX (Wegner, M. 1999). El siguiente paso fue la caracterización mediante EMSAs del factor dependiente de progesterona que se unía al elemento G', y ver si pertenecía a esa familia de factores de transcripción. Estos ensayos se realizaron con un oligonucleótido sintético marcado radiactivamente (Oligo G'wt), el cual contiene el elemento G' así como las secuencias que lo flanquean en el promotor del gen *ug*. La secuencia de este oligonucleótido se muestra en la FIGURA 8. En la misma figura puede observarse la aparición de una banda retardada cuando se usan extractos nucleares de endometrio P5. Dicha banda es casi imperceptible con los extractos de endometrio control y con los de hígado. Aparecen también otras bandas de retardo de más movilidad, fundamentalmente en los extractos endometriales, aunque los análisis posteriores demostraron su carácter no específico y artefactual puesto que no aparecían siempre en este tipo de ensayos. Se puede apreciar como la secuencia unida a la proteína (elemento G') coincide con la posible zona de unión de los factores SOX. Hay que

destacar que, como es habitual en este tipo de experimentos, se utilizó Poli(dI-dC) como competidor inespecífico basal.

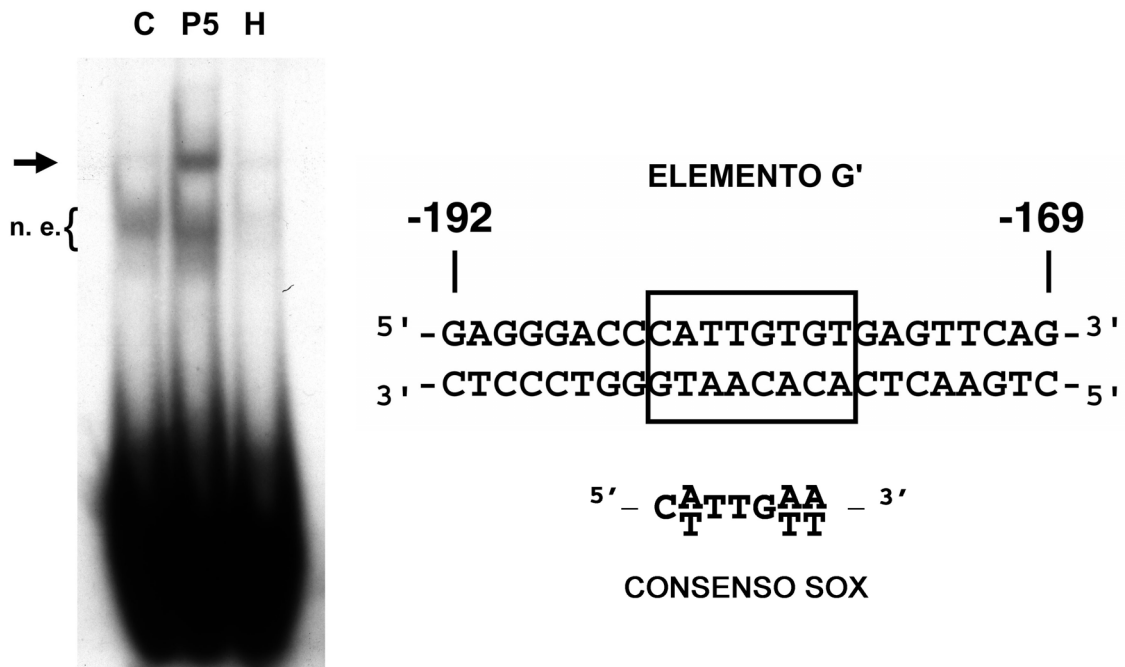


FIGURA 8. EMSA utilizando el oligonucleótido G'wt, cuya secuencia se muestra a la derecha, y extractos nucleares de endometrio control (C), de endometrio P5 (P5) y de hígado (H), en presencia de Poli(dI-dC). En la secuencia del oligonucleótido, dentro de una caja, se indica la zona correspondiente al elemento G'. La secuencia consenso de unión de los factores de transcripción de la familia SOX se muestra debajo. La flecha a la izquierda de la autoradiografía indica la banda inducida por progesterona. (n.e.: no específico).

En este tipo de ensayos, que se realizan con extractos crudos de proteína para detectar interacciones DNA-proteína, es necesario el uso de un polidesoxinucleótido competidor inespecífico para evitar interacciones no deseadas de proteínas con el DNA que se analiza. El problema es que no existe un competidor inespecífico que actúe de igual forma en las reacciones de unión entre los diferentes factores proteicos y sus correspondientes secuencias específicas. El más usado es el Poli(dI-dC), aunque está descrito que el uso de diferentes competidores inespecíficos puede revelar o, al

contrario, enmascarar la unión de diferentes factores a una determinada secuencia de DNA (Lee, T. C. y Schwartz, R. J. 1992). En el caso concreto de las proteínas SOX, el uso como competidor inespecífico de Poli(dl-dC), disminuye mucho la capacidad de estas proteínas de unirse a un oligonucleótido conteniendo su secuencia consenso. Por eso, los estudios in vitro de unión al DNA de las proteínas SOX se realizan en presencia de Poli(dG-dC), un competidor descrito como idóneo para optimizar esta unión (Di Rocco, G., Gavalas, A. et al. 2001).

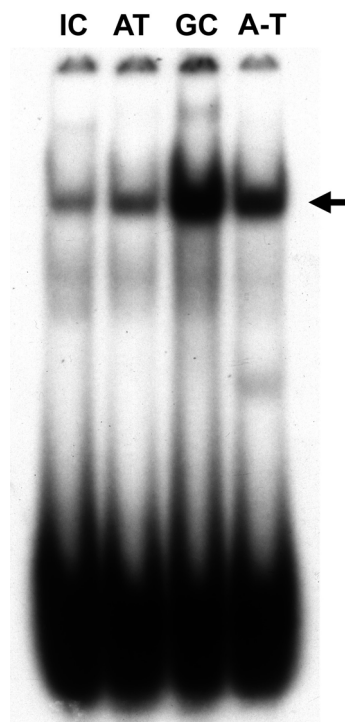


FIGURA 9. EMSA utilizando el oligonucleótido G'wt y extractos nucleares de endometrio P5 con diferentes competidores inespecífico. "IC": Poli(dl-dC), "AT": Poli(dA-dT), "GC": Poli(dG-dC) y "A•T": Poli(dA)•Poli(dT). La flecha indica la banda de retardo dependiente de progesterona.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizaron EMSAs con extractos nucleares de endometrio P5 en presencia de diferentes competidores inespecíficos. Como se puede observar en la FIGURA 9, al usar Poli(dG-dC), se producía un aumento sustancial de la intensidad de la banda dependiente

de progesterona. Estos resultados eran compatibles con la idea de que nuestro factor dependiente de progesterona pertenecía a la familia SOX: por una parte el Poli(dI-dC) se mostraba como el competidor que en mayor grado disminuía la unión del factor al oligonucleótido marcado, y por otra, era el Poli(dG-dC) el competidor más indicado para trabajar con nuestra proteína. La densitometría de una autoradiografía con menos tiempo de exposición, de las bandas retardadas del gel mostrado en la FIGURA 9, indicó que existía una diferencia de intensidad de casi 10 veces a favor del experimento realizado en presencia de Poli(dG-dC) frente al experimento con Poli(dI-dC). A partir de este momento, se utilizó Poli(dG-dC) en todos los experimentos que necesitaron el uso de un competidor inespecífico.

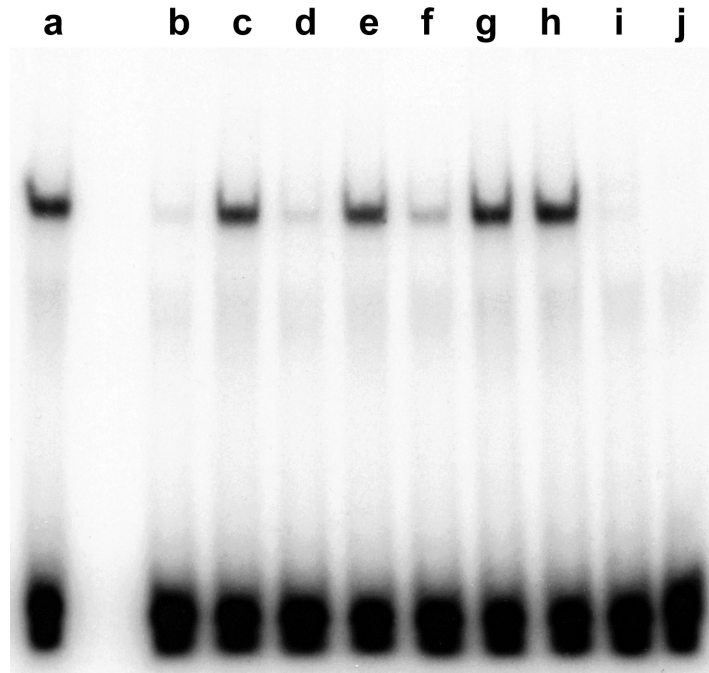
Los siguientes experimentos se realizaron para comprobar la especificidad de la unión de nuestro factor al oligonucleótido G'wt, así como para delimitar y demostrar que la secuencia responsable de esa unión, era la correspondiente a la consenso de unión de factores SOX. Para ello se realizaron estudios de competición en los que se utilizó el oligonucleótido marcado G'wt y diferentes oligonucleótidos no marcados que se añadieron como competidores en un exceso molar de 20 veces en las incubaciones de los EMSAs (FIGURA 10).

En primer lugar, la especificidad del factor por la secuencia del oligonucleótido G'wt quedó demostrada al comparar los carriles "a", "b" y "h" de la FIGURA 10. Se puede observar cómo al añadir el propio oligonucleótido G'wt como competidor, la banda dependiente de progesterona desaparecía (FIGURA 10, carril "b"); en tanto que si se añadía un oligonucleótido con una secuencia no relacionada a la del oligonucleótido G'wt (oligo SP1, FIGURA 10, carril "h"), dicha banda se mantenía.

En segundo lugar, se demostró la implicación del elemento G' en la formación de la banda retardada dependiente de progesterona. Se realizaron experimentos de competición en EMSA, con oligonucleótidos que llevaban diferentes mutaciones en la secuencia nativa del oligo G'wt (FIGURA 10). Como se puede comprobar, un cambio extenso de bases en el oligonucleótido

no marcado competidor que varían exclusivamente el elemento G' (carril "g" – oligo G'm1), no afectaba a la unión del factor dependiente de progesterona presente en los extractos nucleares con el oligo G'wt marcado, es decir, no unía el factor nuclear. Además, la mutación de dos bases en cada extremo de la posible zona de unión de factores SOX (carriles "c" y "e" – oligos G'm2 y G'm3), tampoco afectaba a la aparición de la banda específica de retardo. Sin embargo, si la zona G' se mantenía intacta, ya sea mutando dos bases fuera de ella (carril "d" – oligo G'm4), o cambiando todas las bases excepto las del posible elemento de unión para SOX (carril "f" – oligo G'm5), la competición era efectiva, disminuyendo fuertemente la intensidad de la banda de retardo específica. Como se señaló anteriormente, un oligonucleótido con una secuencia no relacionada (carril "h" – oligo SP1) no competía con el oligo G'wt por la unión del factor. Por otra parte, un oligonucleótido que lleva una secuencia perfecta de unión para las proteínas SOX (carril "i" – oligo S9WT), competía extraordinariamente bien con nuestro oligonucleótido marcado, lo que aportaba una nueva prueba de la pertenencia de nuestro factor a la familia de proteínas SOX. Se puede apreciar que la competición con el oligonucleótido G'wt es más pronunciada que con el oligonucleótido G'm4, y a su vez, la que produce éste, es más intensa que la que produce el oligonucleótido G'm5. Este resultado parecía lógico dado que, como está descrito, las secuencias adyacentes al sitio de unión de los factores SOX también son importantes para dicha unión (Mertin, S., McDowall, S. G. et al. 1999). En resumen, estos experimentos permitieron identificar, y delimitar, la secuencia de unión de nuestro factor como: CACAATG.

Como se puede apreciar en la parte inferior de la FIGURA 10, esta posible secuencia de unión para factores SOX que lleva el oligonucleótido G'wt (CACAATG), varía en el primer nucleótido respecto a la secuencia consenso para estos factores, que está presente en el oligonucleótido S9WT (ACAATG). No es extraño que este oligonucleótido, diseñado con una secuencia perfecta de unión de factores SOX, compita mejor que el propio oligonucleótido G'wt (comparar el carril "b" con el carril "i"). Estos datos reforzaban la hipótesis de la pertenencia del factor endometrial a la familia de proteínas SOX.



- a. Sin competidor.
- b. CTGAACTCACACAATGGGTCCCTC OLIGO G' wt
- c. -----GA----- OLIGO G' m2
- d. -----A-T----- OLIGO G' m4
- e. -----TG----- OLIGO G' m3
- f. GACTCGATT-----TCGATAGG OLIGO G' m5
- g. -----A-T--GG-GA----- OLIGO G' m1
-
- h. GCGTACTCTGCCCGCCCCCTCTGACTC OLIGO SP1
- i. GGGTTAACAGAAACAATGGAATCTGGTAGA OLIGO S9WT
- j. Con Distamicina 50 μ M.

FIGURA 10. EMSA con el oligonucleótido G'wt y extractos nucleares de endometrio P5, con diferentes oligonucleótidos competidores. En la parte inferior se muestra la secuencia (solo de la cadena complementaria) y el nombre de los oligonucleótidos usados como competidores. Carriles c-g: son variaciones del oligo G'wt; se muestran las bases que cambian respecto al G'wt. Se ha subrayado la secuencia de unión de las proteínas SOX en el oligonucleótido S9WT, y su posible secuencia en el oligonucleótido G'wt. El carril j se refiere al EMSA realizado en presencia de Distamicina 50 μ M.

En tercer lugar, otra de las características de los factores de transcripción SOX es que se unen al DNA por el surco menor (Wegner, M. 1999) . Esta característica les diferencia de la mayoría de los factores de transcripción conocidos, cuya unión se produce a través del surco mayor del DNA. La distamicina es una droga que se une al surco menor del DNA inhibiendo la unión de proteínas que interaccionan por este surco, y se usa típicamente para demostrar esta interacción a través del surco menor (Chiang, S. Y., Welch, J. et al. 1994). En la FIGURA 10 (carril "j") se puede apreciar que la presencia de distamicina en el EMSA, hace desaparecer por completo la banda específica retardada (comparar con el primer carril), sugiriendo la unión de nuestro factor en el surco menor. Este hecho es otro indicio de su pertenencia a un grupo de proteínas como la familia SOX.

La caracterización del factor endometrial dependiente de progesterona se completó con la realización de la cinética del aumento de la actividad (o cantidad) del factor nuclear en los extractos nucleares endometriales, durante el tratamiento con progesterona. Se trataron conejas dos días con estradiol (ver Materiales y métodos), y otras conejas 2 días con estradiol y posteriormente 1, 2, 5 o 10 días con progesterona. La cantidad (o actividad) de nuestro factor nuclear en los endometrios de estos animales se determinó mediante EMSA. Como se puede ver en la FIGURA 11, el aumento de la banda de retardo debida al factor endometrial dependiente de progesterona, era gradual y paralelo al tratamiento con progesterona, hasta alcanzar un pico a los 5 días (carril "P5"), que se corresponde con el momento de máxima secreción de UG en el lumen uterino de las conejas pseudoembarazadas (Kumar, N. M., Chandra, T. et al. 1982; Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994).

Hay que señalar que los niveles de expresión de la UG en el endometrio disminuyen a partir del quinto día de tratamiento con progesterona, y vuelven a ser mínimos en el día 10 (Kumar, N. M., Chandra, T. et al. 1982; Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994). En el caso del factor endometrial nuclear también se produce un descenso de la actividad de unión al oligonucleótido G'wt a partir del quinto día de tratamiento con progesterona, aunque en el día 10 su valor sigue siendo superior al del endometrio control (comparar el carril

“C” con el “P10”). En cualquier caso, la cinética de aparición del factor nuclear tiene un paralelismo muy similar a la de la síntesis de UG en el endometrio.

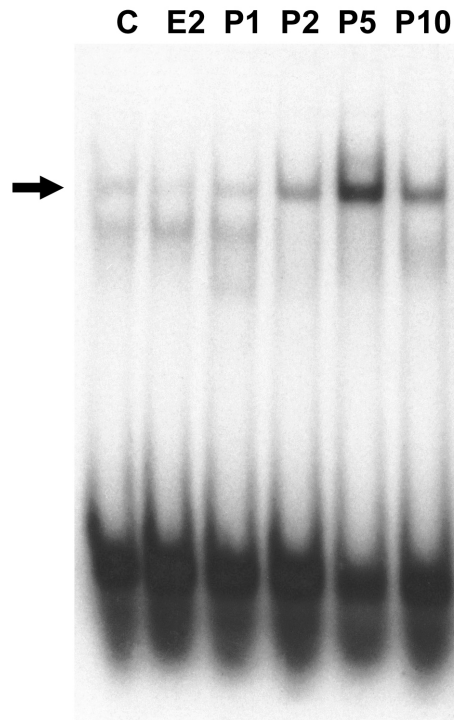


FIGURA 11. *Cinética de la aparición del factor nuclear durante el pseudoembarazo. El oligonucleótido G'wt marcado radiactivamente se incubó con extractos nucleares (5 μ g) de endometrio de conejas no tratadas (C), tratadas dos días con estradiol (E2) o tratadas dos días con estradiol y posteriormente 1, 2, 5 y 10 días con progesterona (P1, P2, P5 y P10, respectivamente). La banda inducida por progesterona se señala con una flecha.*

Por este conjunto de EMSAs, se concluye, que en el núcleo de las células del endometrio existe un factor, cuya unión a una secuencia similar a la de unión de los factores SOX, aumenta con el tratamiento con progesterona. Además, el efecto que la distamicina y el Poli(dl-dC) producen en dicha unión, son compatibles con la hipótesis que dicho factor podría pertenecer a la familia SOX.

6.3 Purificación del factor nuclear que se une al elemento G'.

El siguiente paso en este trabajo, era la purificación del factor dependiente de progesterona con el fin de identificarlo posteriormente. Se realizaron varias pruebas con diversas técnicas cromatográficas: cromatografía de exclusión molecular en Sepharosa 4B, de intercambio iónico en DEAE-celulosa y de afinidad en DNA-celulosa o DNA-Sepharosa (con DNAs de secuencia no determinada). En dichas pruebas, no se obtuvieron resultados aceptables, tanto por pérdidas excesivas del factor como por purificaciones parciales.

Teniendo en cuenta lo anterior, se pensó en utilizar una cromatografía de afinidad del tipo DNA-Sepharosa, pero conteniendo la secuencia del elemento G' en múltiples copias. Concatémeros del oligonucleótido G'wt se fijaron a una matriz de Sepharosa 4B activada por bromuro de cianógeno como se describe en Materiales y Métodos. Como se pudo apreciar tras una electroforesis en geles de agarosa, la mayor parte de los concatémeros obtenidos en la ligación previa, eran productos de entre 3 y 5 oligonucleótidos ligados, aunque también se producían especies moleculares más grandes. Este tamaño era lo suficientemente grande para asegurar que, una vez unidos covalentemente los concatémeros a la matriz por uno de sus extremos, las secuencias del elemento G' estuvieran lo suficientemente alejadas de la Sepharosa para permitir una unión eficaz de las proteínas del extracto nuclear.

El material inicial que se iba a usar en esta cromatografía de afinidad era un extracto nuclear P5. Para eliminar el exceso de sal de estos extractos (0.4 M KCl) se utilizaron dos estrategias: a) la diálisis extensiva del extracto nuclear frente al mismo tampón pero con la concentración de KCl reducida a 60 mM; b) la precipitación de las proteínas del extracto nuclear con sulfato amónico al 50% de saturación a 4° C, y posterior resuspensión del precipitado de proteínas en el mismo tampón pero con 60 mM KCl. En ambos casos los resultados fueron satisfactorios, pero se escogió la segunda alternativa dado que, además de eliminar el exceso de sal, servía también como primer paso de purificación, puesto que nuestro factor nuclear precipitaba con cierta selectividad. Así, la recuperación del factor en el precipitado (medida como la cantidad de actividad

de unión al oligonucleótido G'wt en EMSAs) era casi del 100% (FIGURA 12, carriles P5 y P5*), mientras que la cantidad de proteína total precipitada era del 70%.

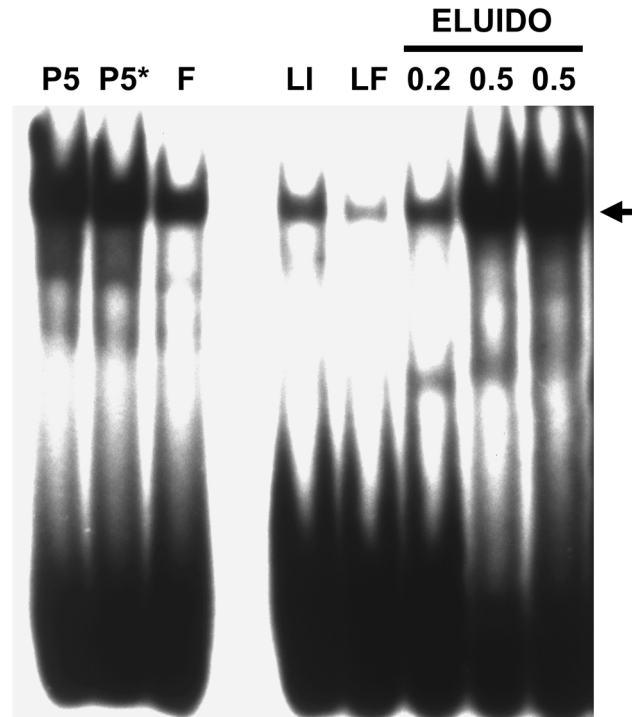


FIGURA 12. EMSA del material inicial y las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad en la matriz “OligoG'wt-Sepharosa”, en cantidades equivalentes. P5: extracto nuclear P5; P5*: proteínas precipitadas con sulfato amónico (material inicial de la cromatografía); F: material que no se une a la resina; LI: primer mL del lavado de la columna (lavado inicial); LF: último mL del lavado de la columna (lavado final). Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con tampón B 200 mM NaCl (ELUIDO 0.2) y posteriormente con tampón B 500 mM NaCl (ELUIDO 0.5) obteniéndose tres fracciones.

El material precipitado con sulfato amónico se aplicó a la columna de afinidad de Oligo G'wt-Sepharosa y después de lavarla para eliminar las proteínas no unidas, se eluyó con 0.5 M NaCl. La mayor parte de la actividad de unión al oligonucleótido G'wt (medida por EMSA) se recuperaba en las dos fracciones de proteínas eluidas con 0.5 M NaCl. Las pérdidas observadas en el

material no unido y en el lavado (FIGURA 12, carriles F, LI, LF), no eran importantes.

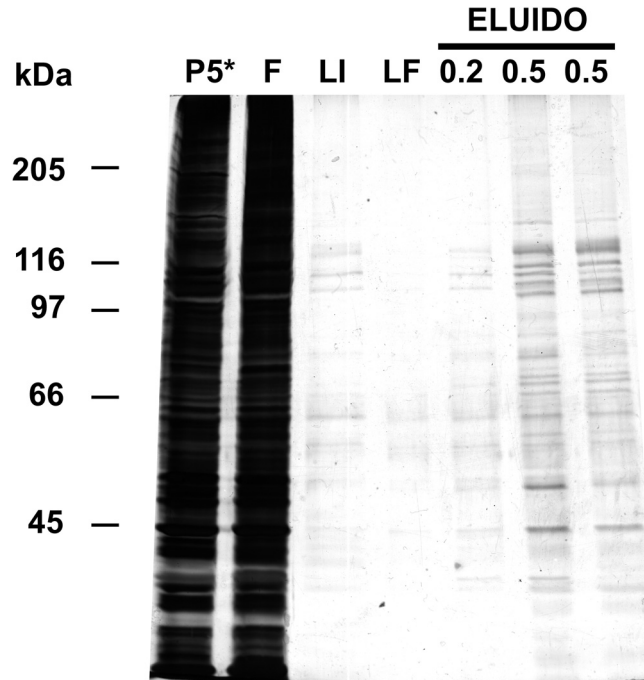


FIGURA 13. Análisis por SDS-PAGE de una purificación del factor nuclear mediante cromatografía de afinidad en la matriz de “OligoG^{wt}-Sepharosa”. Cada carril contiene cantidades equivalentes de: P5*: proteínas precipitadas con sulfato amónico (material inicial de la cromatografía); F: material que no se une a la resina; LI: primer mL del lavado de la columna (lavado inicial); LF: último mL del lavado de la columna (lavado final). Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con tampón B 200 mM NaCl (ELUIDO 0.2) y posteriormente con tampón B 500 mM NaCl (ELUIDO 0.5) obteniéndose tres fracciones. A la izquierda se indica la posición en el gel de marcadores proteicos de masa molecular conocida. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata.

El seguimiento de la purificación se realizó también mediante el análisis cuantitativo y cualitativo de las proteínas mediante SDS-PAGE (FIGURA 13). El material no fijado a la columna contenía más del 95% del inicialmente aplicado (carril F). En las fracciones eluidas con 0.5 M NaCl, se recuperaba el 1% de la proteína total inicial, una cantidad teóricamente excesiva para lo esperado en la

purificación de un factor de transcripción (Kadonaga, J. T. y Tjian, R. 1986). El análisis de las fracciones eluidas con 0.5 M NaCl mostró que, efectivamente, este material era bastante heterogéneo y contenía numerosas bandas de diferentes M_r (FIGURA 13, carril 0.5).

Puesto que el anterior protocolo de purificación no produjo resultados satisfactorios, se decidió utilizar otra variante consistente en pre-purificar el factor mediante SDS-PAGE antes de someterlo a la cromatografía de afinidad.

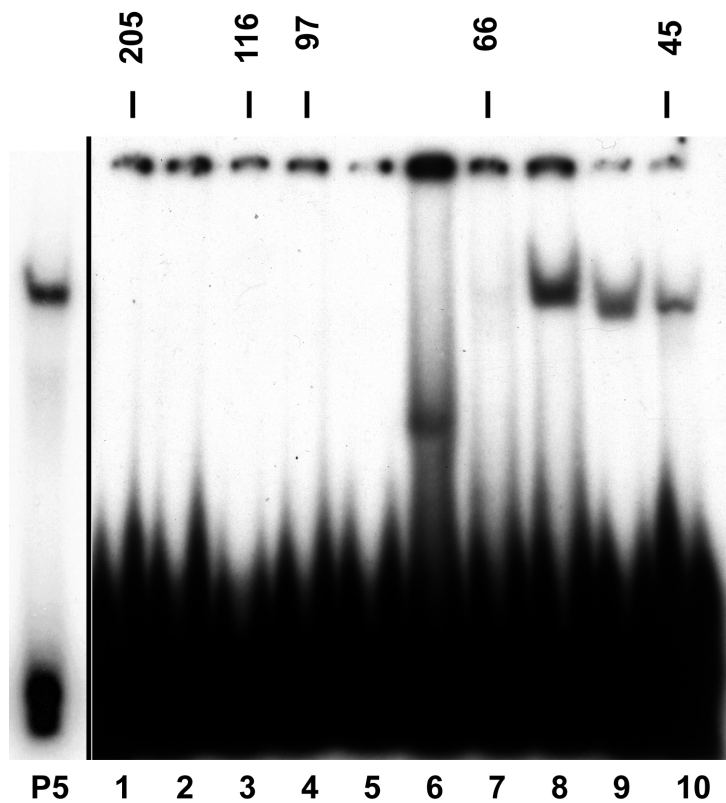


FIGURA 14. EMSA de las fracciones de un SDS-PAGE. En la parte superior se indica la posición relativa de los marcadores de masa molecular, respecto a las fracciones del gel. El primer carril se corresponde con un extracto nuclear P5, y sirve para identificar la banda de retardo de interés. El gel con los carriles 1-10 está sobrepuesto respecto al carril P5. En los carriles 1-10 la cantidad de Poli(dG-dC) fue de 0.1 μ g; en el carril P5 fue de 1 μ g.

Se realizó un experimento previo de fraccionamiento de las proteínas de un extracto nuclear P5 en un SDS-PAGE especial, en el que las muestras se desnaturalizaron con un tratamiento suave en presencia de SDS (Ossipow, V., Laemmli, U. K. et al. 1993). Una vez terminada la electroforesis, el carril del extracto nuclear se cortó en fragmentos de 2-3 mm como se indica en Materiales y Métodos, y las fracciones del gel se ensayaron en EMSA. Como se puede ver en la FIGURA 14, la banda de interés tenía una masa molecular de 50-60 kDa (carril 8). En las fracciones siguientes (carriles 9 y 10), aparecían otras bandas de retardo de masa molecular inferior. Al analizarse por experimentos de competición en EMSA, se comprobó que se comportaban como la banda del carril 8 y como la banda del extracto nuclear P5 (la banda de interés). Es posible que se tratara de fragmentos proteolíticos del factor endometrial, que retenían su capacidad de unirse al DNA.

El experimento anterior mostró la posibilidad de usar un SDS-PAGE semipreparativo como parte del proceso de purificación: en primer lugar, la recuperación de la actividad biológica del factor era bastante aceptable, lo que indicaba que nuestro factor se renaturalizaba sorprendentemente bien. Por otra parte, se podrían eliminar aquellas proteínas de masa molecular similar a la del factor endometrial que no renaturalizarían correctamente en el proceso extracción-renaturalización; perderían de esta forma su capacidad de unirse a la matriz cromatográfica y no copurificarían con el factor de interés. Por tanto, se estableció un protocolo de purificación del factor nuclear endometrial basado en tres pasos fundamentales: 1) precipitación fraccionada con sulfato amónico; 2) fraccionamiento de la muestra en un SDS-PAGE semipreparativo; 3) cromatografía de afinidad en "OligoG'wt-Sepharosa". Los detalles del protocolo se pueden ver en Materiales y Métodos. Los resultados del proceso de purificación se pueden ver en la FIGURA 15, analizados tanto mediante EMSA como con SDS-PAGE. La comparación de los dos primeros carriles del EMSA (FIGURA 15A), confirmó que en el paso del SDS-PAGE semipreparativo no se perdía la actividad biológica inicial. Además, las bandas de retardo inespecíficas de más movilidad presentes en el precipitado de sulfato amónico, desaparecían en el material que se extrajo del gel. En los últimos tres carriles del EMSA, se aprecia como la fracción eluida con alta sal de la columna de

afinidad, mantenía la mayor parte de la actividad biológica que se quería purificar.

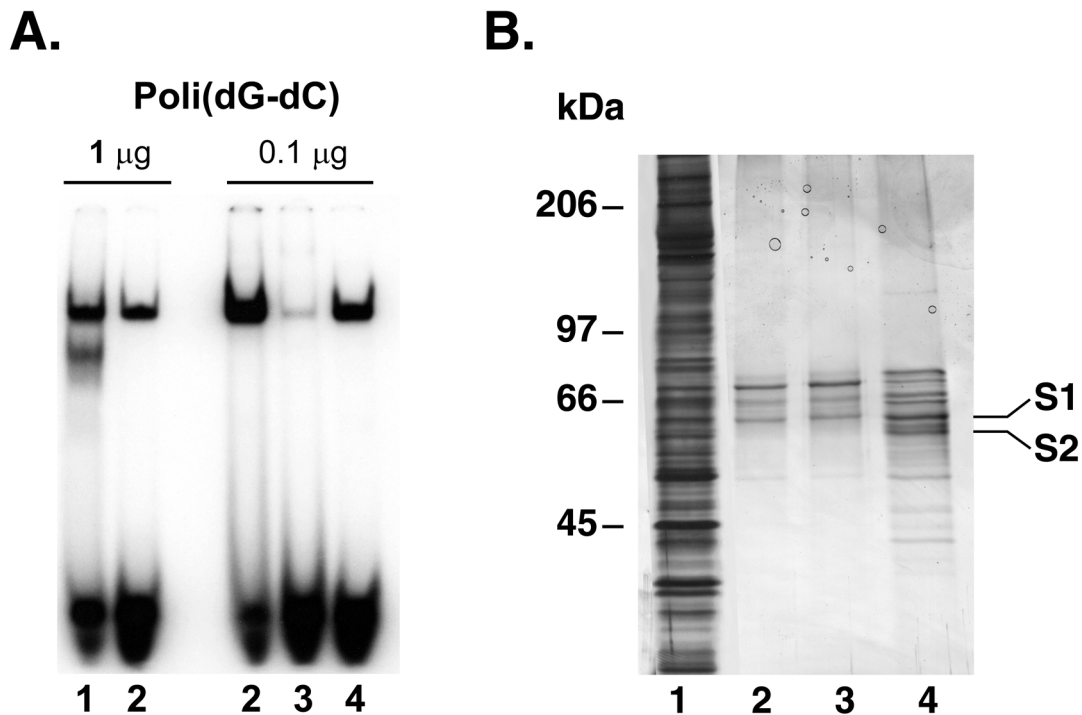


FIGURA 15. Purificación del factor endometrial dependiente de progesterona que se une al elemento G'. **A)** EMSA del material de cada paso de purificación. En la parte superior se indica la cantidad de Poli(dG-dC) presente en las reacciones de unión al oligonucleótido G'wt. Los carriles contienen: "1": precipitado de sulfato amónico del extracto nuclear P5 (material inicial); "2": proteínas extraídas de la zona seleccionada de un SDS-PAGE semipreparativo del material inicial; "3": proteínas que no se unen a la OligoG'wt-Sepharosa; "4": proteínas eluidas con alta sal en la cromatografía de afinidad. En todos los carriles se analizaron cantidades equivalentes de cada material. **B)** SDS-PAGE, teñido con plata, de cantidades equivalentes de los mismos materiales anteriores, excepto del carril 4, donde se analizó esa cantidad x100. A la izquierda se indica la posición relativa de los marcadores de masa molecular, y a la derecha las bandas que fueron sometidas a un posterior análisis (S1 y S2).

Las proteínas presentes en los diferentes pasos del proceso de purificación se pueden ver en el SDS-PAGE de la FIGURA 15B. Las proteínas que se extrajeron del gel semipreparativo tenían una masa molecular entre 55 y

70 kDa. El conjunto de las que no se unían a la columna (carril 3), tenía un patrón prácticamente idéntico al del material inicial de la afinidad (carril 2). Además, no se apreciaban cambios cuantitativos entre los dos carriles. Esto sugería que el factor a purificar se encontraba en muy pequeña cantidad. Efectivamente, en el caso del material eluido de la afinidad (carril 4), hubo que analizar 100 veces más de la dosis equivalente a los tres primeros carriles para conseguir la visualización de las proteínas purificadas. Este dato era consistente con una buena purificación. Debido a la sobrecarga de material, en este carril podían observarse bandas de proteínas que no eran apreciables ni en el material inicial ni en el material que no se une a la columna. Las bandas de este material purificado fueron de nuevo analizadas en EMSA tras separación en SDS-PAGE, fraccionamiento del gel en fragmentos y extracción de las correspondientes proteínas. Los resultados indicaron que las bandas marcadas en la FIGURA 15B como S1 y S2 eran las que se unían al oligonucleótido G'wt, y fueron seleccionadas para su posterior análisis por técnicas de proteómica. Las bandas S1 y S2 se correspondían con proteínas de una masa molecular de 58 y 56 kDa respectivamente. Los datos cuantitativos de una purificación típica del factor se muestran en la TABLA 1.

FRACCION	PROTEÍNA (μg)	FACTOR (μg)	RECUPERACIÓN (%)	PURIFICACIÓN (x)
EXTRACTO NUCLEAR	30000	3	100	1
PRECIPITADO (NH_4) ₂ SO ₄	21000	3	100	1.43
SDS-PAGE SEMIPREPARATIVO	900	2.1	70	23.33
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	9	1.05	35	1166.67

TABLA 1. Datos cuantitativos del proceso de purificación del factor endometrial dependiente de progesterona que se une al elemento G'. La cantidad de factor es una estimación de mínimos, en función de los datos densitométricos de EMSAs del material purificado, de la masa molecular aparente de las bandas S1 y S2 y del tamaño del oligonucleótido G'wt.

6.4 Identificación del factor nuclear que se une al elemento G' como SOX17

El siguiente paso fue la identificación de las proteínas purificadas mediante técnicas de proteómica. Se cortaron bandas de proteínas de geles similares al de la FIGURA 15B, se digirieron con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masas de dos tipos: MALDI-TOF y Trampa Iónica acoplada a nano-LC.

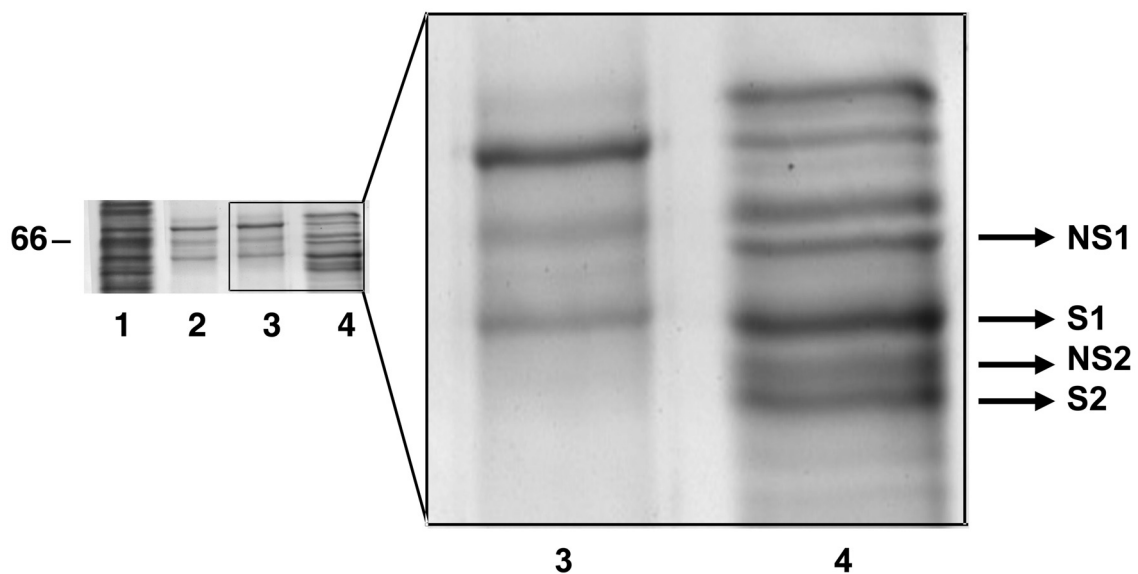


FIGURA 16. *Detalle de las bandas analizadas por espectrometría de masas. El SDS-PAGE es el mismo que el de la FIGURA 15B. A la derecha se muestra una ampliación de los dos últimos carriles.*

Las bandas que se analizaron fueron las indicadas como S1, S2, NS1 y NS2 en la FIGURA 16. Las dos primeras se eligieron por su capacidad de unirse al oligonucleótido G'wt, como se indicó en el apartado anterior. Además, se analizaron las bandas NS1 y NS2, ya que también se enriquecían en el proceso de purificación. El experimento se realizó por duplicado, con dos preparaciones diferentes del factor separadas en dos geles diferentes.

Al comparar el patrón de péptidos tripticos obtenido por MALDI-TOF con los patrones teóricos de las bases de datos (“huella peptídica”), se identificó a la proteína **SYNCRIP/NSAP1** como componente de la banda NS1. Es una proteína muy similar a las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) y su papel parece estar relacionado con la dinámica de los mRNAs en el citoplasma. Es ubicua y se encuentra asociada en el citoplasma al mRNA en los gránulos de transporte de éste. Por otra parte, en la banda S1 se identificó una isoforma de las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, la **hnRNP-K**. Fueron las dos únicas identificaciones proporcionadas por la espectrometría de masas MALDI-TOF. Ni en la banda S2 ni en la NS2 se pudo identificar ninguna proteína con esta técnica.

Sin embargo, la espectrometría de masas del tipo Trampa Iónica, seguida de un análisis del espectro de fragmentación de determinados péptidos (espectros MS/MS), fue mucho más efectiva. Permitió conocer la secuencia de varios de los péptidos tripticos de las bandas analizadas, y la identificación inequívoca de algunas de las proteínas que en ellas se encontraban. En la banda S1 se encontraron péptidos correspondientes a dos ribonucleoproteínas, **hnRNP-K** y **hnRNP-L**. De esta forma se confirmaba la presencia en la banda S1 de la proteína hnRNP-K, identificada por MALDI-TOF. Pero lo más importante, fue la identificación en esta banda S1, de un péptido (con una masa molecular 1677.85 en MALDI) de secuencia LAQQNPDLHNAELSK. Según las bases de datos, esta secuencia solo estaba presente en una proteína, el factor de transcripción **SOX17**.

En la banda NS2 no se identificó ninguna proteína al no conseguirse ningún espectro MS/MS de los péptidos que había en ella. En cambio, en la banda S2 se pudieron obtener los espectros de fragmentación de dos péptidos: uno también de masa molecular 1677.85, y otro de masa molecular 1132.57. La secuencia del primero se correspondía a la encontrada en la banda S1, mientras que la del segundo péptido era RPFVEEAER. Esta secuencia se encontraba solo en varias proteínas de la familia SOX: **SOX8**, **SOX9**, **SOX17** y **SOX18**. Hay que señalar, que aunque en la banda S1 no se pudo obtener el

espectro MS/MS de este péptido, un pico de ese mismo tamaño sí que estaba presente entre los obtenidos por MALDI-TOF.

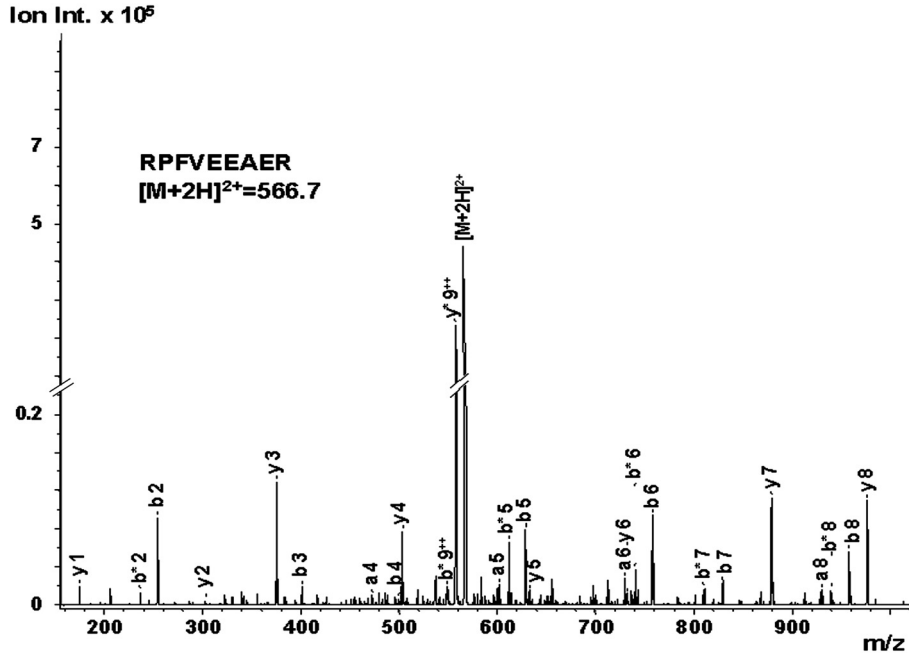
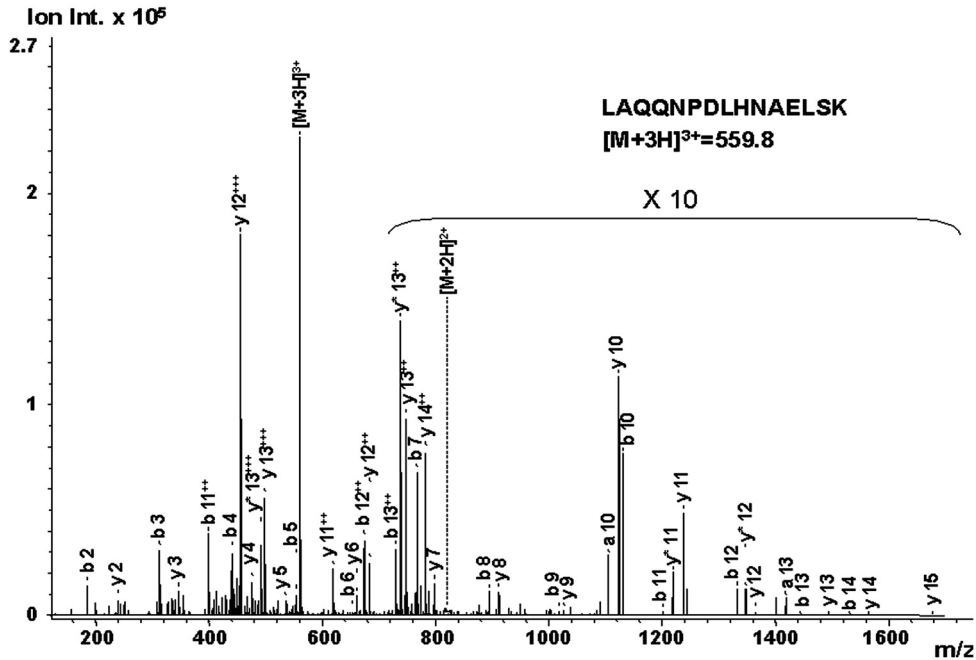


FIGURA 17. Espectros de fragmentación MS/MS correspondientes a las series principales de fragmentación (serie b y serie y) del ión parental triplemente cargado de $m/z=559.8$ (parte superior), y del ión parental doblemente cargado de relación $m/z=566.7$ (parte inferior). Se corresponden respectivamente con las secuencias: LAQQNPDLHNAELSK y RPFVEEAER.

En la FIGURA 17 se pueden ver los espectros de fragmentación de ambos péptidos. Se llegó a la conclusión de que, además de otras proteínas, en las bandas S1 y S2 se encontraba el factor de transcripción SOX17. El péptido de masa molecular 1677.85 lo indicaba de forma inequívoca, mientras que el de masa 1132.57 corroboraba que existía una proteína de la familia SOX en esas bandas. Aunque lo más probable era que los dos péptidos procedieran de la misma proteína (SOX17), no se podía descartar la presencia de otras proteínas, como SOX8, SOX9 ó SOX18, en esas bandas.

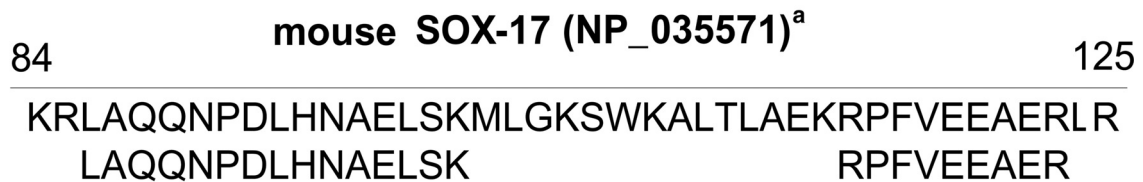


FIGURA 18. Localización de las secuencias parciales determinadas por el espectro MS/MS de péptidos tripticos de las bandas S1 y S2, respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína SOX17 de ratón entre los residuos 84 y 125. En la parte superior se indica el número de acceso en la base de datos de dicha secuencia.

Las dos secuencias encontradas estaban situadas dentro del dominio de unión al DNA (“HMG-box”) de las proteínas SOX. Este dominio está muy conservado entre diferentes especies, y entre diferentes proteínas SOX. La FIGURA 18 muestra la situación de las dos secuencias obtenidas dentro del dominio HMG-box del factor SOX17 de ratón, del que se muestra una secuencia parcial que es idéntica en todas las especies de mamíferos donde se ha secuenciado: rata, ratón y humano.

En resumen, los análisis basados en la espectrometría de masas indicaban que el factor endometrial era SOX17. Para confirmar estos resultados se utilizaron técnicas inmunoquímicas tales como la detección del factor en “Western blot” y ensayos de “super-shift” en experimentos del tipo

EMSA. Los experimentos de inmunodetección (“Western-Blot”) indicaron que en los extractos nucleares de endometrio existen dos bandas inmunoreactivas respecto al anticuerpo anti-SOX17. La intensidad de estas dos bandas aumenta progresivamente en paralelo al tratamiento con progesterona, alcanzando un máximo en los extractos nucleares P5 (FIGURA 19A).

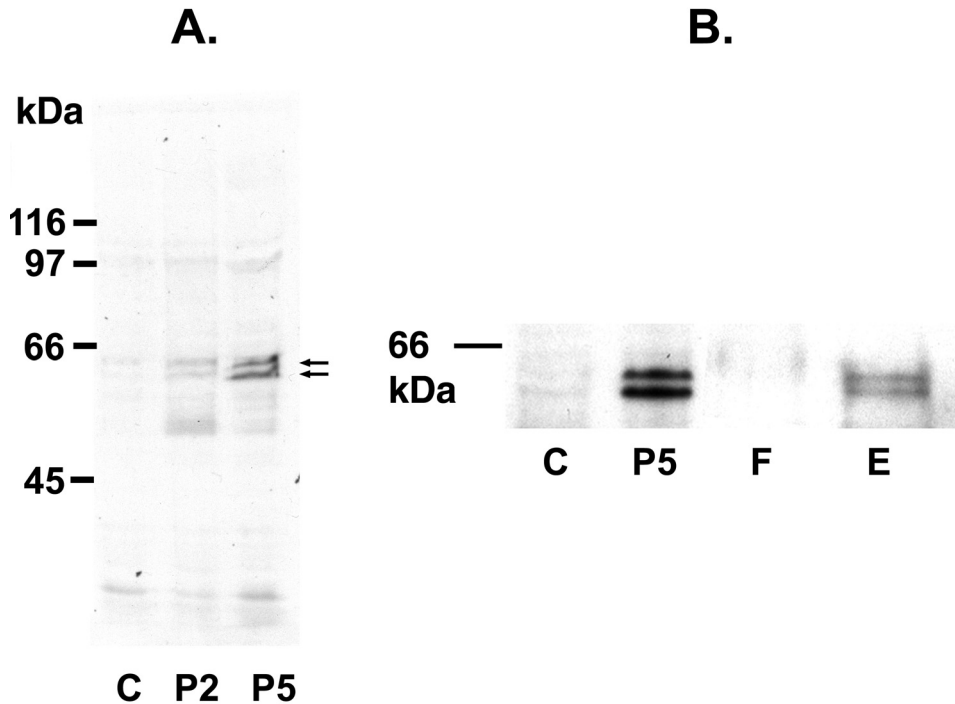


FIGURA 19. Experimentos de inmunodetección (Western Blot) de diferentes materiales. A) 50 μ g de proteínas de extractos nucleares de endometrio control (C) o de conejas tratadas 2 días (P2) o 5 días (P5) con progesterona, se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. Las bandas que reaccionaban con el anticuerpo anti-SOX17 están señaladas por las flechas. A la izquierda: marcadores de masa molecular conocida. B) Los dos primeros carriles: extractos nucleares C y P5. En los dos siguientes carriles se cargó una cantidad equivalente del material que no se une a la “OligoG’wt-Sepharosa” (carril F) y del material eluido con alta sal de esa cromatografía (carril E). A la izquierda: marcador de masa molecular conocida.

Por otra parte, al analizar por esa misma técnica el proceso de purificación del factor endometrial, se observó que esas dos bandas detectadas en los extractos nucleares con el anticuerpo anti-SOX17, aparecían también en el

material eluido con alta sal de la cromatografía de afinidad, mientras que no estaban presentes en el conjunto de proteínas nucleares que no se unían a la “OligoG’wt-Sepharosa” (FIGURA 19B). Además, esas dos bandas tenían una masa molecular idéntica a la de las bandas S1 y S2 de la FIGURA 15B. La FIGURA 19B muestra, de nuevo, la fuerte intensificación de las dos bandas tras el tratamiento con progesterona (comparar carriles C y P5).

En los experimentos de “super-shift” se puede determinar si una banda de retardo es debida a la unión de una proteína concreta a la sonda radiactiva. Para ello, se añade un anticuerpo específico en la incubación del extracto de proteínas con la sonda. Si el anticuerpo se une a una proteína implicada en la formación de la banda de retardo, ésta puede sufrir un nuevo desplazamiento o retardo en el gel (lo que se conoce como “super-shift”), o incluso desaparecer, si la unión del anticuerpo impide a la proteína asociarse con la sonda de DNA.

En la FIGURA 20 se muestra el efecto que diferentes anticuerpos ejercen en un EMSA de un extracto nuclear P5 y el oligonucleótido G’wt. Se utilizaron varios anticuerpos para asegurar que cualquier efecto observado fuera específico. También se efectuó la densitometría de las bandas producidas en el ensayo. Un anticuerpo contra una proteína no relacionada con la familia SOX, el factor de transcripción USF1, no producía ningún efecto en la intensidad de la banda retardada. Además, anticuerpos específicos contra proteínas de la familia SOX distintas a SOX17 (SRY, SOX4 y SOX9), tampoco influían en el EMSA. Hay que tener en cuenta que SOX9 era una de las proteínas que también tenía la secuencia correspondiente al pico de masa molecular 1132.57. Como se puede observar, el único anticuerpo que produce un efecto en la banda retardada, era el anti-SOX17. Con él aparecía una banda de “super-shift” de menor movilidad, con una intensidad del 20% de la intensidad de la banda de retardo original. En concordancia con este dato, la presencia de este anticuerpo producía un descenso correlativo del 20% en la intensidad de la banda producida por el factor.

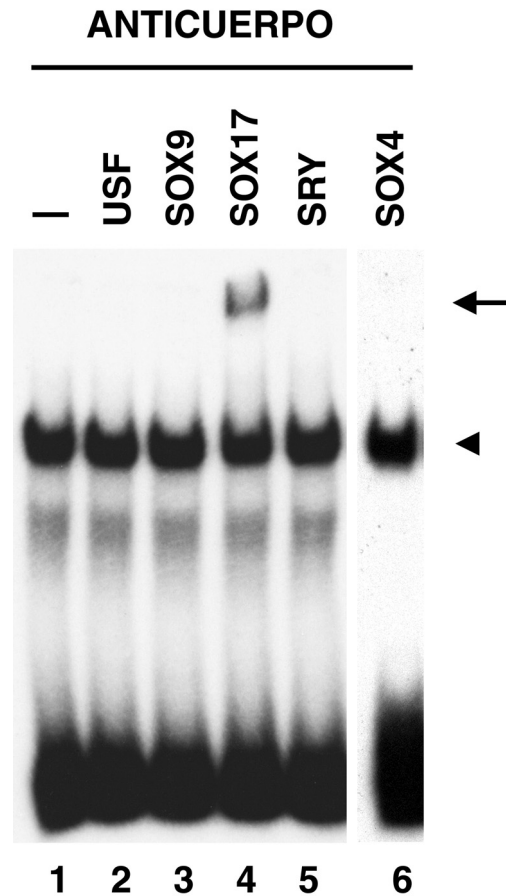


FIGURA 20. Efecto de los anticuerpos reseñados en un EMSA con extractos nucleares P5 y el oligonucleótido G'wt. En la parte superior se señalan los anticuerpos específicos utilizados. En el primer carril no se añadió ningún anticuerpo. La punta de flecha marca la banda de retardo debida al factor endometrial; la flecha señala la banda de super-shift que aparece con el anticuerpo anti-SOX17.

Por tanto, los datos conjuntos de los análisis proteómico e inmunológico demostraban que el factor nuclear endometrial dependiente de progesterona era el factor de transcripción SOX17.

6.5 Unión de SOX17 al promotor de UG: ¿dímero o monómero?

El factor de transcripción SOX17 se presenta en las células del endometrio como dos isoformas de 58 y 56 kDa. Este dato ha sido observado previamente por otros autores en ratón y será objeto de comentarios en la Discusión. Quedaba por resolver la cuestión de si esos polipéptidos se unían al promotor de UG como monómeros, como dímeros (heterodímeros u homodímeros), o incluso asociados a otros factores proteicos que no se hubieran detectado con las técnicas usadas anteriormente.

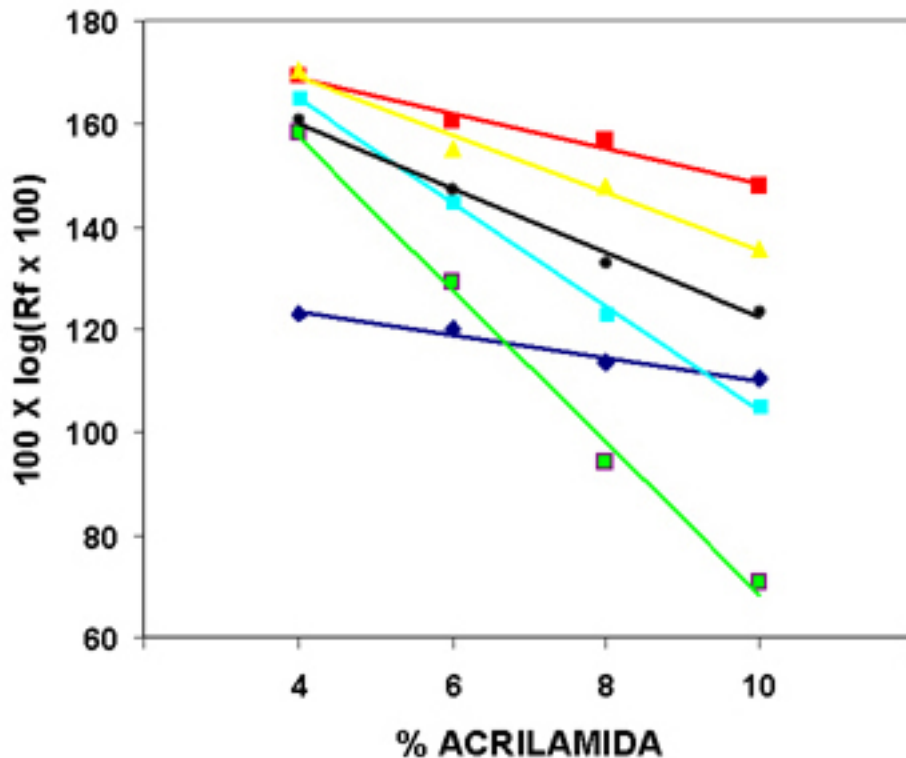


FIGURA 21. Representación grafica del logaritmo de la movilidad relativa (x100), frente a la concentración de acrilamida del gel. Los estándares son: Anhidrasa carbónica-29 kDa (en azul marino); Ovoalbúmina-45 kDa (en rojo); monómero de Seroalbúmina Bovina-66 kDa (en amarillo); dímero de Seroalbúmina Bovina-132 kDa (en azul claro); y trímero de Seroalbúmina Bovina-198 kDa (en verde). Los datos del complejo retardado se muestran en negro.

Para ello se realizó un análisis de Ferguson, tal como se describe en Materiales y Métodos. Este análisis nos proporciona una estimación indirecta de la masa molecular del complejo de la banda de retardo. Con esa estimación podemos deducir la composición de dicho complejo.

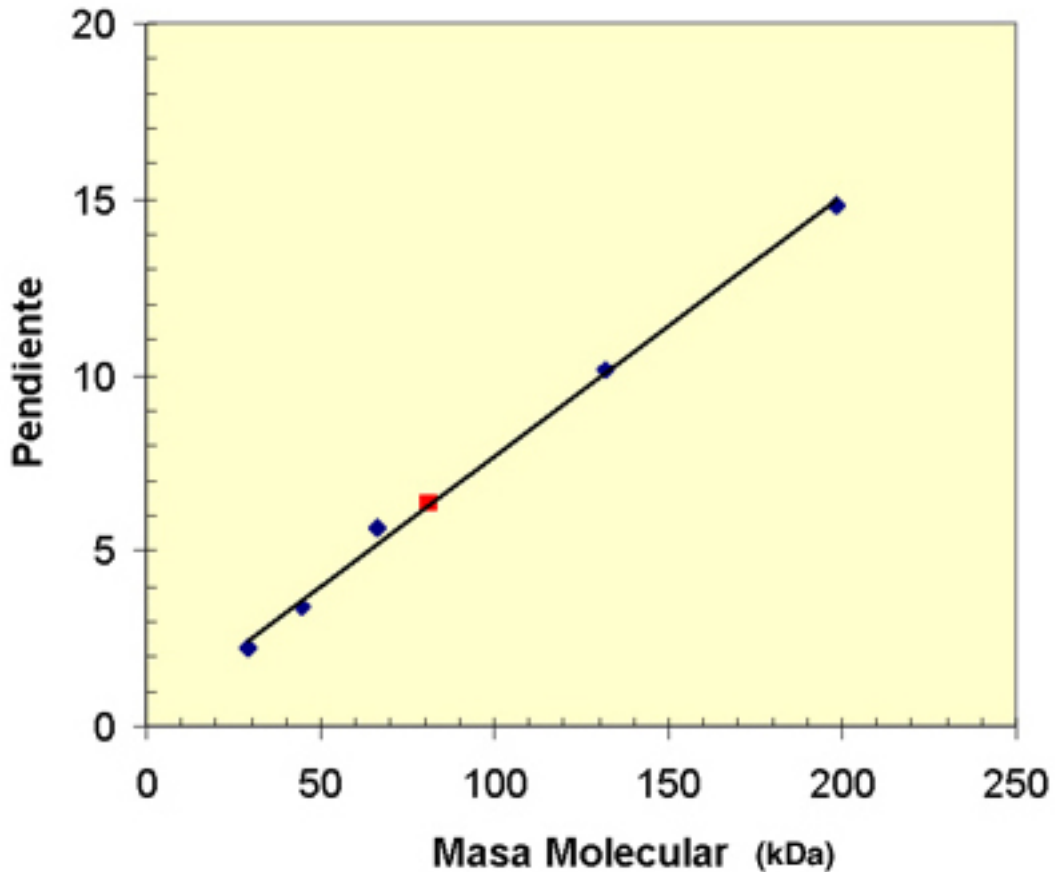


FIGURA 22. Representación grafica de las pendientes de los estándares frente a su masa molecular (en azul). La recta obtenida permite calcular el valor de la masa molecular del complejo de la banda de retardo (en rojo).

En la FIGURA 21 se representa la relación entre el logaritmo de la movilidad relativa de los patrones y de la banda de retardo en la que sabemos que está implicado SOX17, y el porcentaje de acrilamida del gel. De cada recta obtenida, se puede calcular su pendiente. Esta pendiente está relacionada con

la masa molecular de cada especie molecular. En la FIGURA 22 se representan las pendientes de los patrones frente a su masa molecular. Se obtiene una recta patrón que puede ser utilizada para calcular, a partir de su pendiente, la masa molecular aproximada del complejo de la banda retardada. En este caso el valor obtenido fue de **81.5 kDa**. Aunque no se muestra en la figura, se realizó el mismo análisis para el oligonucleótido libre del EMSA. El valor estimado de masa molecular del oligo fue de **21 kDa**. Sustrayendo esta cantidad a la anterior se obtiene un valor de masa molecular para la proteína responsable (SOX17) de la banda de retardo de **60.5 kDa**.

Aunque existe un cierto error, el valor obtenido está muy cerca del estimado anteriormente para las bandas de SOX17 (56-58 kDa). Por ello, se pudo concluir que SOX17 se unía al elemento G' del promotor de UG como un monómero, y no parecía estar asociado a ningún otro factor. Teniendo en cuenta que las dos isoformas se unían al elemento G', se pudo concluir que el EMSA no era capaz de discriminar los complejos formados entre el oligonucleótido y los polipéptidos de 56 y 58 kDa de SOX17. La relevancia de los datos obtenidos será discutida en la siguiente sección.

6.6 Análisis de la funcionalidad del factor SOX17 en el contexto del promotor del gen de la UG.

El siguiente paso fue comprobar in vivo la participación de SOX17 en el control transcripcional del gen *ug*, vía su unión al elemento G'. Se realizaron experimentos de expresión transitoria en células en cultivo, en las que se transfectaron diversos plásmidos como se indicó en "Materiales y Métodos". Estos ensayos se realizaron en la línea celular HEC-1A. Estas células tienen su origen en un adenocarcinoma endometrial humano y expresan tanto el receptor de estrógenos como el de progesterona.

Previamente otros autores habían mostrado que una zona, en la que estaba incluido el elemento G', era importante en la regulación de la transcripción del gen *ug*. Esta zona (observada por mutaciones seriadas del

promotor) era relativamente amplia y no definía la secuencia exacta que era importante para la regulación de *ug* (Suske, G., Lorenz, W. et al. 1992).

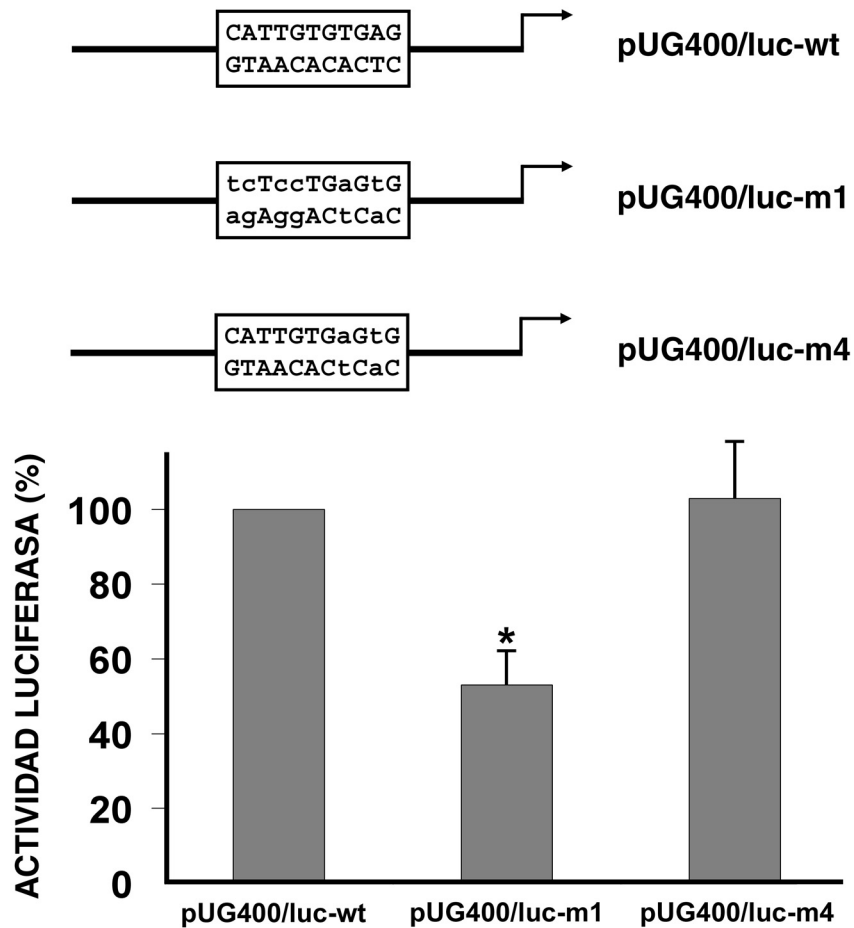


FIGURA 23. Efecto de dos mutaciones del elemento G' en la actividad del promotor de *ug*. Las células endometriales HEC-1A se transfectaron con las construcciones que se muestran en la parte superior de la figura. El plásmido pUG400/luc-wt lleva un fragmento proximal de 404 pb del promotor del gen de la UG, conteniendo el elemento G' natural (enmarcado). Este promotor dirige la transcripción del gen de la luciferasa. Los plásmidos pUG400/luc-m1 y pUG400/luc-m4 son como el anterior, pero con mutaciones en el elemento G' idénticas a las que llevan, respectivamente, los oligonucleótidos G'm1 y G'm4 de la Figura 10 (en minúscula en el esquema superior). Después de la expresión transitoria de estas construcciones, se midió la actividad luciferasa y se expresó como porcentaje respecto a la del pUG400/luc-wt. La barra vertical indica el error estándar de la media, obtenida de cinco experimentos diferentes realizados por duplicado. * : Significativamente diferente del valor de pUG400/luc-wt ($p < 0.01$).

Por esta razón, los primeros experimentos que se realizaron en las células HEC-1A, se diseñaron con el objeto de observar el efecto que la mutación del elemento G' producía en el nivel de expresión de un gen indicador controlado por el promotor del gen *ug*. Como se ve en la FIGURA 23, al introducir en el elemento G' las mutaciones presentes en el oligonucleótido G'm1 que destruían la funcionalidad de dicho elemento en los experimentos de EMSA (ver la FIGURA 10), la actividad del promotor proximal de 404 pb del gen *ug* en las células HEC-1A descendía casi a la mitad (plásmido pUG400/luc-m1). Por otra parte, la construcción pUG400/luc-m4, en la que se han introducido las mutaciones presentes en el oligonucleótido G'm4, (mutaciones que en los EMSAs no impedían la unión del factor nuclear), se comportaba de forma similar a la construcción conteniendo el elemento G' sin mutar (pUG400/luc-wt).

En segundo lugar, para determinar el efecto que SOX17 producía en la actividad transcripcional de las construcciones anteriores, se realizaron experimentos de co-transfección con un plásmido de expresión de SOX17 (pCMV-Tag2B/SOX17), o con su correspondiente plásmido vacío (pCMV-Tag2B). Como control, también se realizaron los experimentos con el plásmido sin promotor, pGL3 Enhancer, que había sido utilizado para clonar las construcciones que contenían el promotor de *ug*.

Como se puede ver en la FIGURA 24, tanto la construcción con el elemento G' intacto (pUG400/luc-wt), como aquella con mutaciones fuera del núcleo central del posible sitio de unión de SOX17 (pUG400/luc-m4), responden a la sobreexpresión de SOX17 de una forma similar (2.81 y 2.72 respectivamente, expresado en veces de estimulación). Por el contrario, ni el plásmido control (pGL3 Enhancer), ni lo que es más importante, el plásmido con el elemento G' mutado a una forma no funcional (pUG400/luc-m1), responden a la sobreexpresión de SOX17 con un aumento de la actividad transcripcional.

Los resultados de estos experimentos mostraban que la sobreexpresión de SOX17 estimulaba la transcripción dirigida por el promotor proximal de 404 pb del gen *ug* entre dos y tres veces, y que esta estimulación se ejercía a

traves del elemento G'. Con el objeto de ver si regiones distales dentro del promotor de *ug* podían modular la respuesta a SOX17, se realizó el mismo experimento de co-transfección pero con el plásmido pUG3.2/luc-wt. Este plásmido lleva el gen de la luciferasa dirigido por un fragmento de 3.2 kpb correspondientes al promotor del gen *ug*. Los resultados de este experimento (FIGURA 24) indicaron que SOX17 también estimulaba la transcripción de esa construcción cuando se sobreexpresaba, y que esa estimulación era de una magnitud similar (2.50 veces) a la que se producía sobre la construcción con el promotor proximal (2.81 veces).

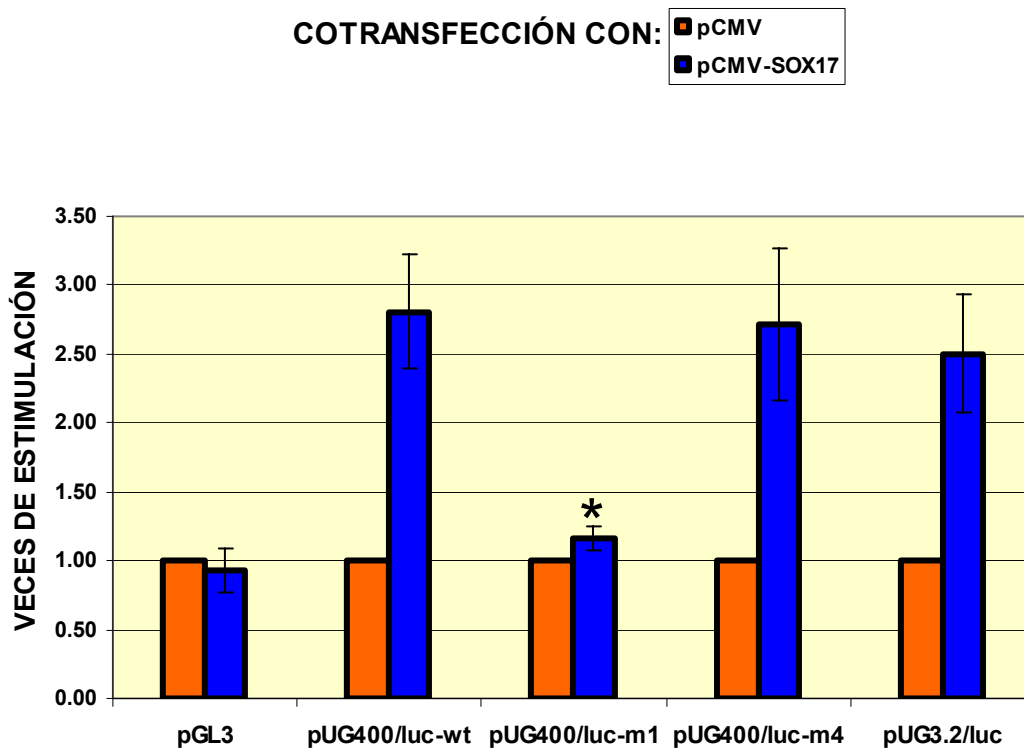


FIGURA 24. Efecto de la sobreexpresión de SOX17 en la actividad del promotor de *ug* con diferentes mutaciones del elemento G'. Las células endometriales HEC-1A fueron co-transfectadas con los plásmidos indicados en la parte inferior del histograma, y con un plásmido de expresión de SOX17 (en azul) o con un plásmido vacío (en naranja). La actividad promotora se mide como veces de estimulación respecto a cada construcción más el plásmido pCMV vacío (valor arbitrario 1). Los resultados son la media de al menos cinco experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras verticales indican el error estándar de la media. *: Estadísticamente diferente del valor de pUG400-wt ($p < 0.01$).

Los resultados mostrados en las FIGURAS 11 y 19A, indicaban que la cantidad de SOX17 en los núcleos de las células del endometrio aumentaba gradualmente en paralelo al tratamiento con progesterona. Además, el patrón temporal de ese incremento, era parecido al de la secreción de la UG en el lumen uterino de la coneja en respuesta a la progesterona (Nieto, A. y Beato, M. 1980; Kumar, N. M., Chandra, T. et al. 1982; Miele, L., Cordella-Miele, E. et al. 1994).

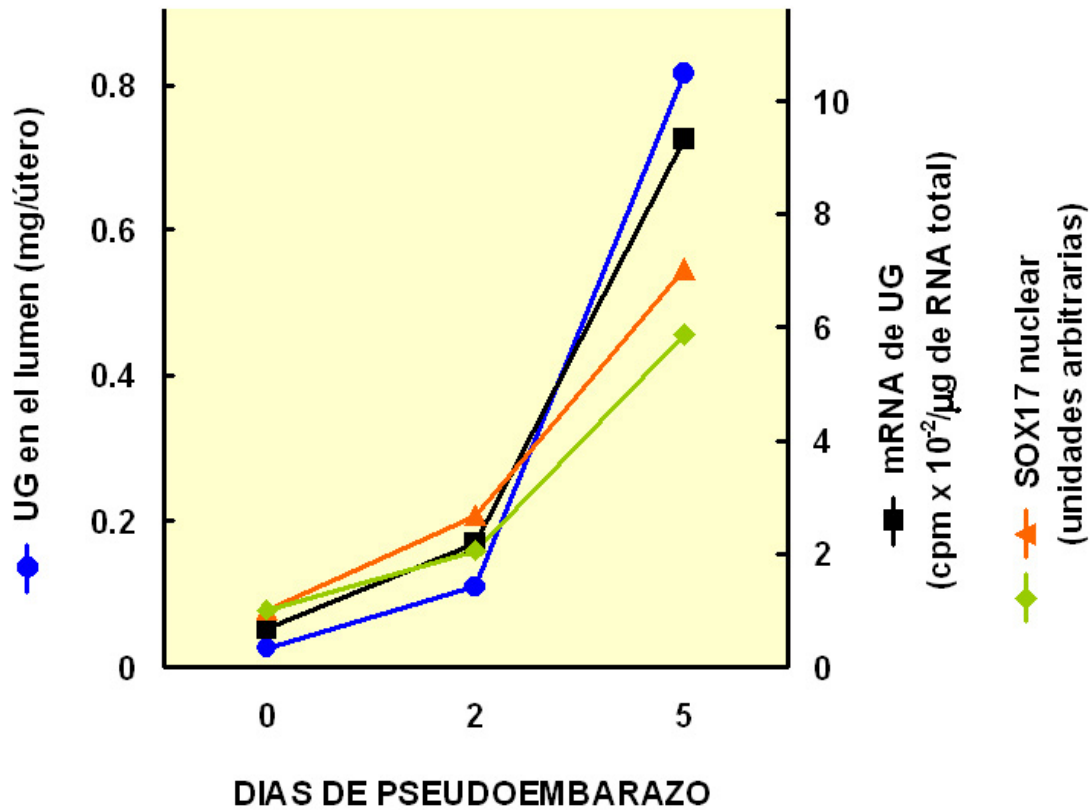


FIGURA 25. Correlación entre el patrón temporal de expresión de UG en el endometrio de la coneja durante el pseudoembarazo y la acumulación de SOX17 en los núcleos de las células del endometrio. La cantidad total de la proteína UG secretada en el lumen uterino (en azul), se midió por radioinmunoensayo. La cantidad relativa del mRNA de UG (en negro), se estimó por hibridación del tipo dot-blot con una sonda radiactiva específica derivada del cDNA de UG. La cantidad de SOX17 nuclear se midió por densitometría de EMSAs como el de la FIGURA 11 (en verde), y por densitometría de inmunoblots como el de la FIGURA 19A (en naranja).

Para comprobar este paralelismo, por una parte se determinaron (por EMSA y Western blot) los niveles de SOX17 en el núcleo de esas células y, por otra parte, se midió la cantidad de proteína UG en el lumen uterino y la de su mensajero en las células endometriales (por radioinmunoensayo y dot-blot respectivamente). En la FIGURA 25 se puede observar cómo durante el tratamiento con progesterona, los niveles de SOX17 aumentaban en el núcleo de las células endometriales, y cómo el patrón temporal de ese incremento estaba correlacionado con el de la inducción del gen *ug* por la hormona.

En resumen, SOX17 no solo parecía funcionar como un activador transcripcional de *ug* en el endometrio de la coneja, sino que además, su acumulación en el núcleo, coincidía temporalmente con el aumento de la proteína UG y su mensajero en ese órgano en respuesta a la progesterona.

6.7 Análisis de la localización subcelular de SOX17 en las células endometriales.

La acción de muchos factores de transcripción se produce tras su translocación del citoplasma al núcleo. Como se vió en la FIGURA 19A, la cantidad de SOX17 en los núcleos de las células del endometrio de la coneja, se incrementa gradualmente con el tratamiento con progesterona. Además, este aumento parece producirse en paralelo al aumento de la actividad transcripcional del gen *ug* que se produce en el endometrio. Para ver si este incremento de la concentración de SOX17 nuclear era la consecuencia de un aumento de su expresión o si se debía al aumento de la tasa de translocación de proteína preexistente desde el citoplasma hacia el núcleo, se analizó por EMSA y Western Blot la cantidad de SOX17 en la fracción citosólica y en la fracción nuclear de células del endometrio (FIGURA 26). Los datos obtenidos por EMSA (FIGURA 26A), indicaron que la cantidad de SOX17 total aumentaba al tratar las conejas con progesterona. Así, aunque en las conejas E₂P₂ el aumento respecto al control era moderado (1.15 veces de aumento), en las conejas E₂P₅ el aumento ya era importante (2.75 veces de aumento).

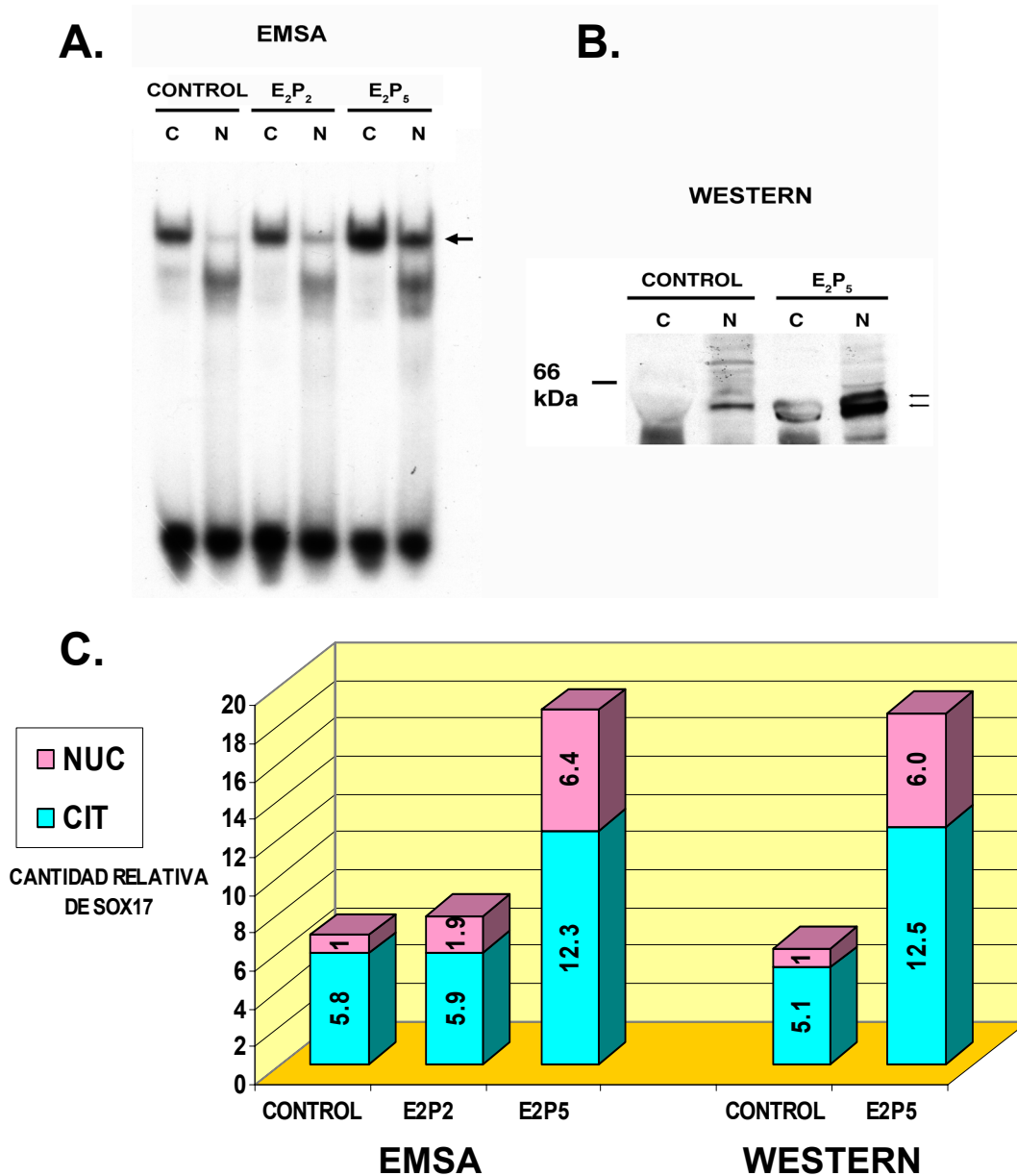


FIGURA 26. Análisis por EMSA (“A”) y por Western Blot con el anticuerpo anti-SOX17 (“B”), de extractos citosólicos (“C”) y nucleares (“N”) de endometrio de conejas control y conejas tratadas hormonalmente. En el EMSA se analizaron cantidades equivalentes de cada extracto (aproximadamente 30 μ g de proteínas citosólicas y 3 μ g de proteínas nucleares); en el Western Blot se usaron 100 μ g de proteína de cada extracto. La flecha en el EMSA indica la banda de retardo formada por SOX17 y el oligonucleótido G’wt. Las dos flechas de la derecha en el Western señalan las dos bandas (SOX17) que fueron analizadas cuantitativamente por densitometría. Este experimento se repitió varias veces, siendo los gels que se muestran representativos de los resultados obtenidos. El diagrama inferior (“C”) representa la cantidad total de SOX17 en cada fracción subcelular, medida en unidades arbitrarias (Extracto nuclear Control=1).

Significativamente, ese aumento era más pronunciado en la fracción nuclear. En las conejas E₂P₂ la cantidad de SOX17 nuclear casi se doblaba respecto al control (1.9 veces de aumento), mientras que en los núcleos de conejas E₂P₅ el aumento ya era considerablemente más alto (6.4 veces de aumento).

Cuando se realizó el análisis por Western Blot con un anticuerpo específico contra SOX17 (FIGURA 26B), los resultados fueron similares a los observados por EMSA (FIGURA 26A), concluyéndose que la progesterona, por una parte, inducía un aumento de la cantidad de proteína SOX17 total en el endometrio de la coneja y, por otra, provocaba un cambio en la relación proteína citosólica/proteína nuclear que conducía a una acumulación de SOX17 en el núcleo de las conejas tratadas hormonalmente.

Hay que señalar que, lamentablemente, no fue posible obtener buenos inmunoblots con las fracciones citosólicas endometriales. La razón fundamental fue la imposibilidad de analizar en el gel la cantidad de proteína equivalente a la cantidad utilizada con los extractos nucleares (aproximadamente se obtiene una cantidad 10 veces superior de proteína citosólica que de proteína nuclear por unidad de masa de tejido endometrial procesado). Además, también influía que las fracciones citosólicas estaban contaminadas con seroalbúmina de conejo al ser el endometrio un tejido muy vascularizado. La zona del gel donde se debía detectar SOX17 solapaba con la seroalbúmina, lo cual producía una mala detección de éste por su anticuerpo.

Un dato relevante es la existencia de SOX17 en cantidades importantes en todas las fracciones citosólicas endometriales analizadas, procedieran tanto de conejas controles como de conejas tratadas hormonalmente. Para comprobar que la distribución subcelular de SOX17 no era un artefacto, producto de una redistribución núcleo/citoplasma por un mal procesamiento del material utilizado, se analizaron los extractos obtenidos en el fraccionamiento subcelular por inmunoblots con anticuerpos que reconocían proteínas características del citoplasma y del núcleo.

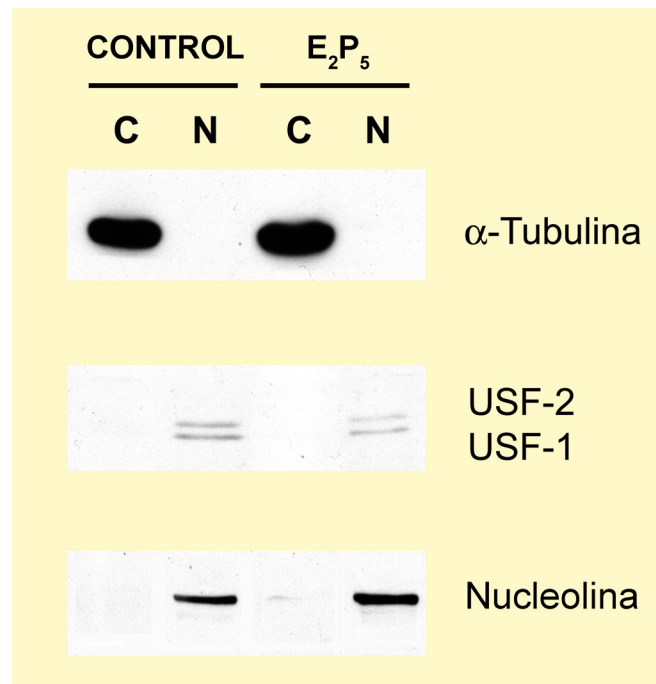


FIGURA 27. Ensayo de la integridad de las fracciones citosólicas (“C”) y nucleares (“N”) obtenidas del endometrio de conejas control y tratadas hormonalmente. Se usaron 50 μ g de proteínas nucleares y 100 μ g de proteínas citosólicas. Los filtros se incubaron con anticuerpos que reconocían las proteínas señaladas a la derecha de la imagen.

Como se muestra en la FIGURA 27, los extractos nucleares no estaban contaminados con una proteína citoplasmática abundante (α -Tubulina). A su vez, las fracciones citosólicas no parecían estar contaminadas con proteínas nucleares (Nucleolina, USF1 o USF2). Esto último parecía confirmar la presencia de SOX17 en el citoplasma de estas células.

A falta de comprobaciones posteriores, se podía concluir que SOX17 no tenía la distribución subcelular característica de muchos factores de transcripción (fundamentalmente nuclear), sino que un gran porcentaje de la proteína se encontraba en el citoplasma de las células del endometrio. Estos datos abrían la posibilidad de que se tratara de un factor cuya localización subcelular estuviera regulada por diversas señales, entre ellas, la progesterona.

Dado que se ha descrito que SOX17 interacciona con β -catenina (Zorn, A. M., Barish, G. D. et al. 1999; Sinner, D., Rankin, S. et al. 2004), era interesante analizar el posible efecto de β -catenina en la función de SOX17 en el endometrio. Para ello se realizaron experimentos de expresión transitoria en células HEC-1A. Las células se co-transfectaron con el plásmido reportero pUG3.2/luc-wt y con los plásmidos de expresión de SOX17 (pCMV-Tag2B/SOX17) y de β -catenina (pCI-NEO- β -CATENINXL- Δ 45). Este último expresa una forma de β -catenina que no puede ser fosforilada por GSK-3 y enviada a degradación, y que por lo tanto se acumula constitutivamente en el núcleo sin necesidad de la señal de Wnt. En la FIGURA 28 se observa como la β -catenina produce un pequeño aumento en la estimulación por SOX17 del promotor del gen de la UG. Como se verá en la siguiente sección, la acción de β -catenina sobre SOX17 podría ocurrir a dos niveles: como co-activador transcripcional, o como transportador nuclear.

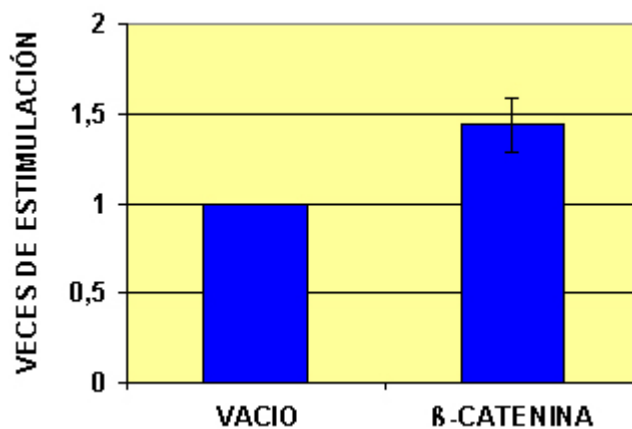


FIGURA 28. Ensayos de co-transfección en células HEC-1A de los plásmidos pUG3.2/luc-wt y pCMV-Tag2B/SOX17, junto con el plásmido de expresión de β -catenina pCI-NEO- β -CATENINXL- Δ 45, o con el mismo plásmido pero vacío (“vacío”). Los resultados son la media de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barra vertical indica el error estándar. Se da el valor relativo de 1 a la estimulación del reportero por SOX17 sin β -catenina.

Al analizar por Western Blot la localización subcelular del factor SOX17 sobreexpresado en las células HEC-1A (FIGURA 29), se comprobó que la mayor parte del SOX17 tenía una localización nuclear (más del 85%). Así, en este tipo de experimentos, era lógico que el posible efecto de β -catenina en el transporte al núcleo de SOX17 se encontrara limitado. Lamentablemente no se pudo disponer de un sistema experimental en el que SOX17 se comportara como lo hace en las células del endometrio, es decir, con una localización predominantemente citoplasmática, y donde se pudieran estudiar más a fondo los efectos desencadenados por la progesterona que conducían al aumento de la translocación de SOX17 al núcleo.

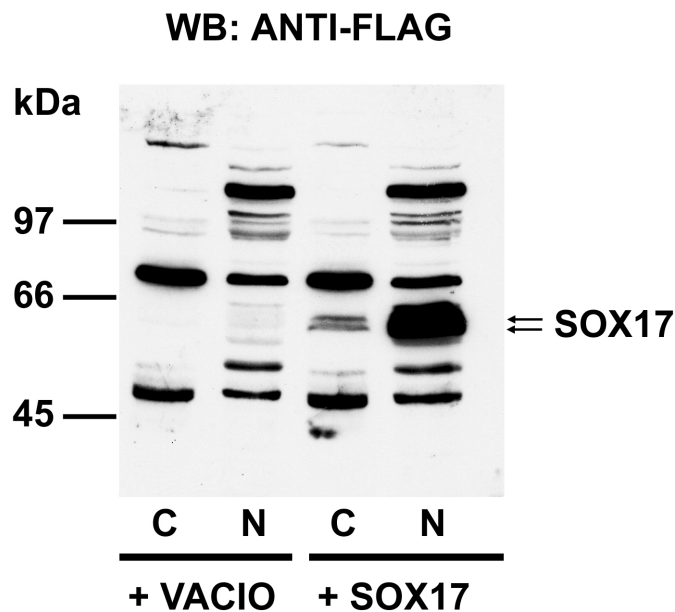


FIGURA 29. Localización subcelular del factor SOX17 transfectado en las células HEC-1A. 100 μ g de proteína de los extractos citosólicos (“C”) y 50 μ g de los extractos nucleares (“N”) de las células transfectadas con el plásmido pCMV/Tag2B (“+VACÍO”) o con el plásmido pCMV/Tag2B-SOX17 (“+SOX17”) se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. El blot se incubó con un anticuerpo contra el epítipo FLAG, que se encuentra presente en la proteína SOX17 expresada por el plásmido pCMV/Tag2B-SOX17.

También es importante destacar, en el inmunoblot de la FIGURA 29, que la proteína SOX17 sobreexpresada en las células HEC-1A a partir de un único cDNA insertado en el plásmido pCMV/Tag2B-SOX17, aparece también como una doble banda, con tamaños muy similares a los de las bandas de la proteína SOX17 endógena de las células del endometrio de la coneja.

En este trabajo solo se han realizado experimentos preliminares para averiguar los mecanismos implicados en la translocación nuclear de SOX17 en respuesta a la progesterona (los relativos al posible papel de la β -catenina). En la siguiente sección, se discutirán éste y otros posibles mecanismos por los que se podría regular la translocación al núcleo del factor SOX17 en el endometrio.

7 DISCUSIÓN

La uteroglobina (UG), el miembro fundador de la nueva superfamilia de proteínas conocidas como Secretoglobinas, es una pequeña proteína de secreción cuya síntesis es inducida por hormonas esteroides. Es una proteína que se expresa abundantemente en el epitelio respiratorio, gastrointestinal, uterino y de otros órganos de los tractos genitales. Su importancia biológica se pone de manifiesto por su conservación evolutiva en todos los mamíferos. Su expresión en el tracto respiratorio es también común para todos los mamíferos donde se ha estudiado, incluido el ser humano (Mukherjee, A. B., Kundu, G. C. et al. 1999).

Como se mencionó en la Introducción, su función fisiológica exacta no está bien establecida aunque podría ser una proteína con diferentes funciones en los variados órganos donde se sintetiza. Aunque estas posibles funciones han tratado de ser sugeridas en múltiples estudios, es su gen el que concentra un particular interés por varias razones: **a)** la inducción de la transcripción de *ug* en el útero por progesterona es un excelente modelo de estudio para conocer los mecanismos de acción de esta hormona; **b)** además de esta inducción por progesterona, *ug* está positivamente regulado por varias hormonas esteroideas en los epitelios de diferentes órganos: por estrógenos en oviducto, por glucocorticoides en pulmón y por andrógenos en varios órganos del tracto genital masculino (ver referencias en Introducción); **c)** el promotor del gen *ug* de conejo es bastante complejo, y así por ejemplo, los HREs funcionales para la progesterona se sitúan a una gran distancia del punto de inicio de la transcripción (2.7-2.4 kpb), mientras que en el promotor proximal (0.4 kpb) se encuentran sitios de unión para muchos factores de transcripción. Entre estos hay algunos, como Sp1 y NF-Y, cuya unión al promotor está relacionada con la estimulación por hormonas esteroides (Scholz, A., Truss, M. et al. 1998; Scholz, A., Truss, M. et al. 1999). En este trabajo de investigación se ha mostrado por primera vez el papel que el factor de transcripción SOX17 juega en la regulación de la expresión del gen de la uteroglobina en el útero de

la coneja. El control ejercido por SOX17 parece estar relacionado con la activación de la transcripción de dicho gen por la progesterona. De esta manera, SOX17 se añade a la lista de factores de transcripción que modulan la expresión del gen de la UG en el endometrio. Esto nos sitúa en un escenario donde varios factores de transcripción colaborarían con el receptor de progesterona para modular la actividad transcripcional del gen de la UG; esta acción conjunta sería necesaria para alcanzar los altos niveles de respuesta obtenidos en conejos. En la especie humana, el patrón de expresión de la UG en el endometrio es equivalente al del conejo (Muller-Schottle, F., Classen-Linke, I. et al. 1999), tanto a nivel temporal (niveles de expresión bajos en la fase folicular que se elevan desde la fase luteal hasta el final del ciclo menstrual), como espacial (epitelio glandular y luminal). Pero el nivel de expresión alcanzado tras la estimulación por progesterona, es mucho más bajo que en las conejas. Aunque está regulada por progesterona, no se ha determinado la existencia de PREs funcionales en el promotor del gen de la UG humana (Muller-Schottle, F., Classen-Linke, I. et al. 1999). La comparación de las secuencias promotoras de ambos genes muestra que los PREs del gen de conejo están pobremente conservados en el gen humano (Wolf, M., Klug, J. et al. 1992). Por todo esto, la acción de otros factores de transcripción distintos de los receptores de hormonas esteroideas, incluido SOX17, cobra interés por su función como co-adyuvantes o transmisores de la señal hormonal.

A continuación, voy a discutir con más detalle los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

7.1 El promotor proximal del gen *ug* de conejo: interacción con diferentes factores de transcripción.

En los ensayos de protección a la digestión con DNAsa I (FIGURAS 4 y 5) podemos apreciar cómo existen muchos factores nucleares endometriales que se unen al promotor proximal (aproximadamente 400 pb) del gen de la UG de conejo. Éste se escogió porque es un fragmento pequeño que permite la expresión de un gen indicador en el endometrio de ratones transgénicos

(Gómez Lahoz, E., López de Haro, M. S. et al. 1992), y por lo tanto posiblemente contenía sitios de unión para factores específicos endometriales. Algunas de las protecciones observadas eran producidas por factores que no eran específicos de endometrio, ya que también aparecían con los extractos nucleares de hígado. Preferentemente aparecen en la zona más alejada al sitio de inicio de la transcripción. Por el contrario, las protecciones debidas a factores específicos del endometrio dependientes de progesterona se sitúan en la zona más proximal del promotor (FIGURA 5). Las protecciones comunes se producirían por factores generales ubicuos necesarios para la expresión del gen de la UG. Por ejemplo, las zonas protegidas H e I' incluyen secuencias que contienen cajas GT que son reconocidas por los factores ubicuos de la familia de Sp1 (Hagen, G., Muller, S. et al. 1992) y que son importantes para la expresión eficiente del gen de la UG (Misseyyanni, A., Klug, J. et al. 1991; Dennig, J., Hagen, G. et al. 1995).

Es importante señalar que muchas de las protecciones observadas contienen secuencias que están conservadas en todos los genes de UG de diferentes especies estudiados. Además algunas comprenden secuencias similares a los motivos de unión de factores de transcripción conocidos. Todo ello hace pensar que el promotor del gen de UG de conejo es bastante complejo tal como se podría esperar del promotor de un gen cuya expresión es específica de tejido e inducible multihormonalmente.

Usando extractos nucleares de células Ishikawa (línea celular derivada de un carcinoma uterino humano) y de células HeLa, otros autores realizaron experimentos similares sobre el mismo promotor proximal de 400 pb del gen de conejo, con el fin de observar diferencias específicas de tejido (Misseyyanni, A., Klug, J. et al. 1991). Como en el presente trabajo, observaron protecciones a lo largo de gran parte del promotor proximal. Parte de esas protecciones coincidían con las observadas aquí, aunque en algunos casos existían diferencias en su localización precisa y en sus límites. Estas diferencias pueden deberse a que al ser las células Ishikawa una línea celular establecida de origen tumoral, pueden contener un conjunto de factores nucleares diferente del de las células endometriales normales con las que se realizó el presente

trabajo. Tampoco hay que descartar diferencias entre especies en ese conjunto de factores. En cualquier caso, los estudios realizados anteriormente por este grupo de investigación validaban, básicamente, los resultados expuestos en este trabajo, aunque nuestro estudio ha permitido delimitar, mucho más precisamente, las secuencias reconocidas por los posibles factores nucleares de las células endometriales en su contexto fisiológico.

Un aspecto importante de este estudio, es la comparación de los factores de transcripción presentes en el endometrio, antes y después de la estimulación hormonal del gen. Esta comparación, que nunca antes se había realizado, ha sido de crucial importancia para conocer posibles factores de transcripción inducidos hormonalmente e implicados en la regulación de *ug* por progesterona. Existen varias protecciones en la parte más cercana al inicio de la transcripción que se deben a factores dependientes de progesterona. Algunos de ellos ya fueron objeto de estudio por nuestro grupo y por otros grupos de trabajo (Rider, V. y Peterson, C. J. 1991; Klug, J. y Beato, M. 1996; Garcia, C. y Nieto, A. 1999). Una de esas zonas que no había sido estudiada previamente, el elemento G', se analizó con más profundidad en este trabajo.

Los extractos nucleares endometriales de conejas tratadas con progesterona son los únicos que producen una protección clara en esta zona, aunque los extractos de conejas controles provocan la aparición de una banda de hipersensibilidad en la posición -185 (FIGURA 6). Esto parece indicar que en esos extractos también existe el factor que provoca la protección del elemento G', aunque en muy pequeña cantidad. Esta sugerencia está sustentada por la débil banda de retardo obtenida en los EMSAs con este mismo material (FIGURAS 8, 11 y 26). La conclusión es que en el endometrio existe un factor que se une al elemento G', y que ese factor aumenta considerablemente tras un tratamiento con progesterona.

Generalmente, las protecciones producidas por factores de transcripción observadas por esta técnica, suelen darse en ambas cadenas del DNA, aunque los límites en cada una de ellas no tienen necesariamente que coincidir. En el elemento G' la protección se produce solo en la cadena complementaria. La

razón de ello puede estar en el tipo de factor que se une a este elemento. Si este factor produjera una curvatura o “bending” en la doble cadena de DNA, esta característica podría hacer que una de las dos cadenas del DNA fuera accesible a la DNAsa I incluso con el factor proteico unido. Por eso es interesante señalar que la secuencia protegida incluía un sitio de unión casi perfecto para los factores de la familia SOX. Una de las características de estos factores de transcripción es la de producir un plegamiento en la cadena de DNA a la que se unen (Wegner, M. 1999; Lefebvre, V., Dumitriu, B. et al. 2007).

La secuencia del elemento G' está muy conservada entre especies (ver la FIGURA 7). En el caso del gen de la UG humana, es idéntica a la de conejo, y en el caso de rata y ratón existe solamente un cambio de una base. ¿Afecta este cambio a la unión de un posible factor SOX? Probablemente no. Por una parte el cambio no se produce en la parte más importante o “núcleo” del sitio de unión (WCAAW donde W es A ó T) (Lefebvre, V., Dumitriu, B. et al. 2007), y por otra parte se sabe que existen varias proteínas SOX que se unen a los promotores de sus principales genes diana a través de secuencias de DNA que solo coinciden parcialmente con la secuencia consenso de SOX (Lefebvre, V., Dumitriu, B. et al. 2007). Además, tanto la secuencia de conejo y humano (CACAATG), como la secuencia de rata y ratón (CACAATA), aparecen entre las secuencias que son amplificadas en experimentos *in vitro* de selección de oligonucleótidos por la proteína SOX17 recombinante (Kanai, Y., Kanai-Azuma, M. et al. 1996). Se ha postulado que las proteínas SOX juegan un papel en el establecimiento de una estructura tridimensional del promotor que permite una configuración transcripcional activa (Wegner, M. 2005). Teniendo en cuenta que la distancia de la secuencia SOX con el punto de inicio de la transcripción es similar en los genes de las diferentes especies, el conjunto elemento G'-proteína SOX podría jugar el mismo papel en el endometrio de todas ellas.

7.2 Caracterización de SOX17 como factor de transcripción que se une al elemento G'.

El siguiente paso de este trabajo consistió en la identificación y caracterización del factor que se une al elemento G'. Una serie de experimentos previos, permitieron caracterizar el comportamiento en EMSAs del complejo formado por un oligonucleótido que contiene la secuencia del elemento G' y un factor nuclear dependiente de progesterona (FIGURAS 8, 9, 10 y 11). Los datos obtenidos indicaron que:

- a) Existe un factor endometrial dependiente de progesterona que se une al promotor proximal entre -192 y -169, en concordancia con los datos de los experimentos de protección a la DNAsa I.
- b) Este factor nuclear está presente en el endometrio de conejas no tratadas en cantidades muy pequeñas; su concentración en el núcleo de las células endometriales aumenta progresivamente en paralelo al tratamiento de las conejas con progesterona, alcanzando un máximo en el día 5 de tratamiento.
- c) La unión de ese factor al oligonucleótido G'wt está favorecida cuando se usa como competidor inespecífico Poli(dG-dC).
- d) La distamicina impide la unión del factor endometrial al oligonucleótido G'wt.
- e) Dentro del oligonucleótido G'wt, la secuencia responsable de esa unión coincide con la secuencia de unión de factores SOX detectada con herramientas bioinformáticas.

De los tres últimos puntos se podía deducir que era probable que el factor endometrial que se unía al elemento G' y al oligonucleótido G'wt, perteneciera a la familia de factores SOX. La secuencia de unión delimitada por los experimentos de competición en EMSA, la "preferencia" por el Poli(dG-dC) en los mismos ensayos, y el efecto negativo de una droga que se une al DNA por el surco menor, así lo indicaban. A este respecto, hay que indicar que el uso diferencial de Poli(dI-dC) y Poli(dG-dC) como competidor no específico, ha sido usado previamente, como evidencia indirecta de la identidad de una proteína SOX (Di Rocco, G., Gavalas, A. et al. 2001). El efecto negativo del Poli(dI-dC)

en los ensayos de unión de proteínas SOX al DNA, se explica por la similitud de este competidor en el surco menor con el de secuencias ricas en A y T (Dailey, L., Yuan, H. et al. 1994). En la FIGURA 9 podemos observar que el efecto del Poli(dI-dC) es similar al del Poli(dA-dT). En el caso del Poli(dA)-Poli(dT), es posible que la topología que adquiere este competidor no impida la unión de las proteínas SOX a sus sitios de unión en el DNA.

La familia SOX está formada por más de 20 proteínas (Wegner, M. 1999; Bowles, J., Schepers, G. et al. 2000; Kiefer, J. C. 2007; Lefebvre, V., Dumitriu, B. et al. 2007). Para identificar correctamente el factor endometrial era necesaria su purificación que, como en el caso de otros factores de transcripción, suele incluir, al menos, un paso de cromatografía de afinidad con un DNA que lleva la secuencia de unión del factor, unido covalentemente a un soporte inerte (Kadonaga, J. T. y Tjian, R. 1986). En la mayoría de los casos la unión específica al DNA es la propiedad más característica de este tipo de proteínas. Al estar presentes en pequeñas cantidades, se necesita partir de una gran cantidad de tejido, así como repetir la cromatografía de afinidad tres o cuatro veces. El endometrio, incluso el de una coneja pseudoembarazada, no es un tejido abundante en masa. La mejor solución para obtener la cantidad de proteína necesaria y de una pureza aceptable para ser usada con técnicas de identificación de proteínas por espectrometría de masas es, probablemente, la que se describe en este estudio. Se basó en acoplar la cromatografía de afinidad con la utilización previa de una electroforesis semipreparativa en presencia de SDS, proceso por el que se pudo recuperar una cantidad inusualmente elevada de proteína que conservaba sus propiedades nativas.

Como se puede observar en la FIGURA 16, con este procedimiento de purificación, se obtuvo un material donde varias bandas proteicas estaban enriquecidas (S1, S2, NS1 y NS2). Dos de ellas (S1 y S2) mantenían la capacidad de unirse en EMSA al oligonucleótido G'wt. Mediante espectrometría de masas del tipo Trampa Iónica se obtuvieron varios espectros MS/MS (FIGURAS 16, 17 y 18). Se determinó la presencia inequívoca de la proteína SOX17 en las bandas S1 y S2, ya que una de las secuencias obtenidas a partir de los espectros de fragmentación únicamente se encuentra en dicha proteína.

La presencia en ambas bandas de otro péptido con una secuencia que solo se encuentra en determinadas proteínas SOX (SOX8, SOX9, SOX17 y SOX18), no permitió descartar la presencia de otra proteína SOX, aunque lo más probable era que ese péptido procediera también de SOX17.

La presencia de varias ribonucleoproteínas, y de otras proteínas similares en la banda S1, no es significativa. Debido a su relativa abundancia en los extractos nucleares, es muy probable que contaminen cualquier preparación de proteínas nucleares. Por otra parte, no es extraño que, en los primeros intentos de caracterización mediante MALDI-TOF, no se pudiera identificar SOX17. Hay que tener en cuenta que esta técnica compara los espectros de las masas moleculares de los péptidos trípticos de una proteína obtenidos experimentalmente, con los espectros virtuales (obtenidos “in silico”) de todas las proteínas presentes en las bases de datos. Como ni la proteína SOX17 de conejo ni su gen están presentes en las bases de datos de secuencias, es posible que los péptidos trípticos obtenidos de las zonas muy conservadas de SOX17 entre especies (el dominio HMG-box fundamentalmente), no sean suficientes para dar identificaciones positivas con los programas informáticos de análisis de huella peptídica. En realidad, cuando se relajaron los parámetros de seguridad, algunos experimentos de MALDI-TOF sí que señalaron a SOX17 como proteína presente en las muestras analizadas. Estos datos, que no se han incluido en este trabajo ya que no eran estadísticamente significativos, no se tuvieron en consideración. Por todo lo anterior, se recurrió a experimentos de espectrometría de masas del tipo Trampa Iónica. Estos experimentos proporcionaron datos de espectros de fragmentación (secuenciación de novo), que sí que fueron concluyentes en la identificación de SOX17.

Para confirmar los datos anteriores, se realizaron experimentos de inmunoblot y ensayos de “super-shift” con un anticuerpo específico contra la proteína SOX17 de ratón, y que también reacciona con la proteína SOX17 de rata y humana. Como se puede ver en las FIGURAS 19 y 20, también parece reconocer la proteína de conejo. En el caso del inmunoblot, detecta dos bandas de un tamaño muy similar al de las bandas S1 y S2, que eran las que por espectrometría de masas rendían péptidos de SOX17 y que, por otra parte,

producían la banda de retardo específica en EMSA. Además, estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores, que mencionan la existencia de dos bandas de un tamaño similar a las aquí descritas y que son inmunoreactivas frente a un anticuerpo anti-SOX17, (Kanai, Y., Kanai-Azuma, M. et al. 1996), ¿Por qué las dos bandas proteicas de masa molecular diferente no producen dos bandas de retardo de movilidad diferente en EMSA?. En este punto hay que señalar que los geles de acrilamida utilizados en los EMSAs seguramente no son capaces de discriminar entre los complejos formados por el mismo oligonucleótido con dos proteínas que solamente se diferencian en 2 kDa. Por otra parte, se ha descrito que algunas proteínas SOX se comportan en SDS-PAGE como si tuvieran un tamaño mayor del simplemente deducido de su secuencia. Es el caso de SOX4 (Hur, E. H., Hur, W. et al. 2004) y SOX9 (Mertin, S., McDowall, S. G. et al. 1999), así como de SOX17 de ratón, que migra como dos polipéptidos de aproximadamente 59 kDa-60 kDa, cuando su masa molecular deducida a partir de su secuencia es de 46 kDa (Kanai, Y., Kanai-Azuma, M. et al. 1996), lo que concuerda con los resultados de este trabajo. En este último caso, los autores del trabajo atribuyen este comportamiento al alto contenido en prolinas de la proteína.

Respecto a los experimentos de “super-shift” en EMSA (FIGURA 20), el hecho de que el efecto del anticuerpo anti-SOX17 fuera limitado (la banda de retardo disminuye solo un 20% y la banda nueva que aparece de menor movilidad no es muy intensa) puede deberse a que el anticuerpo no funcione correctamente en conejo (donde no había sido probado anteriormente), o porque no tenga una afinidad suficiente para ser utilizado en esta técnica (EMSA), aunque si pueda ser útil en otras (inmunoblot, por ejemplo). La utilización de mayores concentraciones del anticuerpo para mejorar el “super-shift” no fue posible puesto que cantidades similares de otros anticuerpos no relacionados con anti-SOX17 inhibían inespecíficamente la reacción de unión. También se utilizó un anticuerpo contra SOX4, ya que se había descrito su regulación por progesterona en células mamarias (Graham, J. D., Hunt, S. M. N. et al. 1999), así como en el útero de ratón (Hunt, S. M. N. y Clarke, C. L. 1999). Los resultados de estos experimentos indicaron que SOX4 no estaba presente en la banda retardada específica.

Por último, con el análisis de Ferguson de la banda retardada, se concluyó que SOX17 se unía al elemento G' como un monómero (FIGURAS 21 y 22). Hay que tener en cuenta que algunas proteínas SOX pueden unirse al DNA como homodímeros o como monómeros (Lefebvre, V., Dumitriu, B. et al. 2007). También pueden heterodimerizar con otras proteínas, fundamentalmente factores de transcripción y co-activadores, aumentando su afinidad por el DNA (Wilson, M. y Koopman, P. 2002; Wissmuller, S., Kosian, T. et al. 2006; Kiefer, J. C. 2007; Lefebvre, V., Dumitriu, B. et al. 2007). Con este análisis se puede determinar de una forma aproximada la masa molecular del complejo DNA-proteína presente en la banda retardada. Se obtiene como resultado un valor de 81.5 kDa para el complejo. Aunque el oligonucleótido G'wt tiene una masa molecular de 17.7 kDa, se restó al complejo no ese valor, sino su masa molecular aparente (21 kDa), calculada por el mismo método, puesto que en el análisis de Ferguson también influye la forma de la macromolécula, además de la masa molecular. En el caso de proteínas globulares la diferencia puede ser poco importante. En el caso de un fragmento lineal de DNA, la desviación es mayor. En el método original adaptado para bandas retardadas de EMSA (Orchard, K. y May, G. E. 1993) se despreciaba este efecto, ya que utilizaban oligonucleótidos de un tamaño considerablemente menor al tamaño del oligonucleótido usado en este trabajo. Una vez restada esa cantidad, el valor que se obtiene es de 60.5 kDa, algo mayor al obtenido por SDS-PAGE para SOX17 (56-58 kDa), pero compatible con la unión de una única molécula de SOX17 al oligonucleótido.

7.3 Participación de SOX17 y el elemento G' en la regulación de *ug*.

Las regiones situadas a -2.6 kpb y -2.4 kpb en el promotor de *ug* de conejo, son sin duda las responsables primarias de la inducción del gen en el endometrio por la progesterona. Este efecto debe realizarse mediante la vía típica de interacción del receptor de progesterona (PR) con estas secuencias discretas. Así lo indican los siguientes resultados, descritos en distintos trabajos: **a)** estas dos regiones contienen secuencias con las características de

HREs para la progesterona. Aunque imperfectas, estas secuencias contienen el medio palíndromo derecho TGTTCT (típico de los HREs de progesterona/glucocorticoides), y un medio palíndromo izquierdo imperfecto separado del anterior por 3 nucleótidos (Cato, A. C., Geisse, S. et al. 1984; Jantzen, K., Fritton, H. P. et al. 1987); **b)** estos HREs putativos son reconocidos in vitro por los receptores de progesterona y de glucocorticoides (Cato, A. C., Geisse, S. et al. 1984; Jantzen, K., Fritton, H. P. et al. 1987); **c)** construcciones génicas conteniendo estas dos regiones delante de un promotor mínimo, confieren inducibilidad por progesterona a un gen indicador cuando se introducen en células en cultivo (Scholz, A., Truss, M. et al. 1999).

Tomando como base la consideración anterior, hay que tener en cuenta que en varios genes regulados por hormonas esteroideas existen elementos de unión para diferentes factores de transcripción que colaboran con los receptores hormonales, o incluso son imprescindibles, para la regulación hormonal (Schule, R., Muller, M. et al. 1988). En el caso del gen *ug* de conejo, los factores Sp1 (Dennig, J., Hagen, G. et al. 1995; Scholz, A., Truss, M. et al. 1998), RUSH/SMARCA3 (Haywardlester, A., Hewetson, A. et al. 1996), YY1 (Klug, J. y Beato, M. 1996) y NF-Y (Scholz, A., Truss, M. et al. 1999) son importantes para su transcripción.

El presente estudio ha mostrado que el factor de transcripción SOX17 está implicado en la transcripción e inducción de *ug* por progesterona a través de su unión a la secuencia denominada elemento G'. Así, la mutación del elemento G' (que impedía la unión de SOX17 in vitro) disminuía la transcripción dirigida por el promotor de UG al 50%, respecto al promotor natural. Consistente con este resultado, la mutación m4 (que no afectaba la unión in vitro, FIGURAS 10 y 23) se comportaba como el promotor natural. Los experimentos de sobreexpresión de SOX17 fueron también consistentes con la implicación del elemento G' y SOX17 en la transcripción de *ug*. Así, la sobreexpresión de SOX17 aumentaba unas 2.5 veces la transcripción dirigida por el promotor natural o por el promotor conteniendo la mutación m4. También, y como se esperaba, la transcripción dirigida por el promotor con el elemento G' destruido no se estimulaba en absoluto por la sobreexpresión de SOX17. Este conjunto

de resultados puede explicarse teniendo en cuenta el contenido intracelular (o intranuclear) de SOX17. Este factor no fue detectable con la técnica de EMSA en las células HEC-1A usadas en los anteriores experimentos, mientras que SOX17 producía una importante banda de retardo en las células que sobreexpresaban el factor. Por tanto, en células HEC-1A normales la escasa cantidad de SOX17 explicaría la moderada pérdida de transcripción (50%) producida por la destrucción del elemento G' en el promotor de *ug*. Sin embargo, tras el aumento intracelular de SOX17, producido por su sobreexpresión, este efecto se hace muy patente.

De todo lo anterior parece deducirse que, en principio, uno de los mecanismos de activación hormonal de la transcripción de *ug* en endometrio vendría mediado por un incremento en la concentración intracelular de SOX17 que activaría el promotor vía su unión al elemento G'. Los resultados obtenidos al comparar la cinética de activación transcripcional de *ug* en endometrio con la cinética de aumento de SOX17 intracelular (citoplasmática y nuclear, FIGURAS 25 y 26) sustentan este mecanismo de activación.

Otra cuestión es pertinente en relación con la estimulación transcripcional (2.5 veces) de *ug* observada en los experimentos de sobreexpresión de SOX17. Esta cuestión se plantea no pocas veces en este tipo de experimentos en los que puede aumentarse artificialmente la concentración celular de un factor por encima de la fisiológica. En otras palabras: ¿existe en las células endometriales una cantidad de SOX17 similar, o incluso superior, a la conseguida en las células HEC-1A tras la sobreexpresión de SOX17?. Medidas realizadas mediante la técnica de EMSA, indicaron que la concentración de SOX17 en las células endometriales estimuladas 5 días con progesterona era incluso superior a la observada en las células HEC-1A en los experimentos de sobreexpresión. Por tanto, parece perfectamente posible que, en condiciones fisiológicas la transcripción de *ug* sea estimulada más de 2 veces por el incremento intracelular de SOX17 producido por la progesterona. De cualquier manera, esa estimulación es relativamente modesta comparada con la activación transcripcional de *ug* producida por el tratamiento hormonal [10-12 veces, (Muller, H. y Beato, M. 1980; Shen, X. Z., Tsai, M. J. et al. 1983)]. Estos

datos sugieren que SOX17 es un co-estimulador de la transcripción producida principalmente por el receptor de progesterona tras su unión a los HREs de *ug*.

En relación con esta última consideración, cabe preguntarse si las acciones de ambos factores (SOX17 y PR) son simplemente aditivas o cooperativas de tal manera que, en este último caso, su acción sea más que simplemente sumatoria. Esto se trató de responder con experimentos mediante el uso de la construcción pUG3.2/luc-wt (ver la FIGURA 24) que lleva el promotor de *ug* y los HREs distales tal como se encuentran en el gen natural. En nuestro laboratorio, esta construcción, con los HREs tan alejados del promotor proximal, no respondía a progesterona en este tipo de experimentos. Solo cuando estos HREs se situaron por delante de un promotor mínimo de 79 pb del gen *ug*, se obtuvo respuesta a la hormona. Lamentablemente este pequeño promotor no lleva el elemento G', con lo que no se pudo sacar ninguna conclusión. Habría que hacer una construcción artificial, con un promotor mínimo conteniendo el elemento G' y los HREs para poder contestar a la pregunta anterior.

Ya se ha señalado que en las células HEC-1A no fue posible detectar SOX17 por EMSA. Teniendo en cuenta que en el endometrio la progesterona provoca un aumento de la cantidad de este factor, se trataron con progesterona las células HEC-1A (que expresan el PR), para ver si se producía el mismo efecto. En estos experimentos no fue posible inducir SOX17 de forma apreciable en análisis EMSA. Este no fue un resultado inesperado puesto que una línea celular de origen tumoral frecuentemente no reproduce con exactitud el fenotipo de las células de las que se derivan. La falta de expresión en estas células de algún factor, co-activador, etc., necesario para la inducción de SOX17 por progesterona, podría explicar estos resultados.

Con los experimentos de sobreexpresión quedó demostrado que SOX17 se comportaba como un activador de la transcripción del gen de la UG a través de su unión con el elemento G'. Pero era importante conocer si existían otras secuencias en el promotor que pudieran unir SOX17 y ser funcionales. Un análisis bioinformático de la secuencia del promotor distal del gen *ug* (-3.2

kpb/−0.4 kpb) mostró que existían varios posibles sitios de unión para proteínas SOX. Es importante señalar que las proteínas SOX, además de unirse al DNA con menos afinidad ($K_d \sim 10^{-7}$ a 10^{-9} M) que la mayoría de los factores de transcripción ($K_d \sim 10^{-9}$ a 10^{-11} M), también lo hacen con una menor especificidad de secuencia (Lefebvre, V., Dumitriu, B. et al. 2007). Se han descrito uniones de proteínas SOX a los promotores de sus genes diana a través de secuencias que sólo coinciden parcialmente con la secuencia consenso. Estos sitios imperfectos para SOX se encuentran abundantemente en el DNA, lo cual pone de manifiesto que la secuencia no es el único factor que dirige a las proteínas SOX a sus genes diana in vivo. No es raro, por tanto, que en el promotor del gen *ug* existan varias de esas posibles secuencias. Para ver si SOX17 podía actuar a través de alguna de ellas, se utilizó la construcción con el promotor de 3.2 kpb del gen de la UG. El resultado de la activación por SOX17 fue muy parecido al obtenido con el promotor proximal (FIGURA 24), lo que indicó que parecían no existir otros sitios para SOX17 en dicho promotor.

7.4 Efecto de la progesterona en la expresión y localización subcelular de SOX17.

El aspecto fundamental de este trabajo ha sido la identificación de SOX17 como un factor de transcripción implicado en la activación transcripcional de *ug* en el endometrio durante la inducción del gen por progesterona. Adicionalmente, un punto que llama la atención y que merece ser considerado es el paralelismo observado entre la progresiva aparición de SOX17 en el endometrio y la activación hormonal de la transcripción de *ug* ya que sugiere que un mecanismo de acción de la progesterona podría ser (al menos en parte) a través del aumento intracelular de SOX17.

Los primeros experimentos con la técnica de EMSA no permitían determinar si la progesterona producía un aumento de la cantidad del factor (SOX17) o bien si el aumento de la banda de retardo era la expresión de una mayor afinidad del factor por el oligonucleótido conteniendo el elemento G'. Posteriormente se pudo determinar que la cantidad de proteína (medida por

inmunoblot), y la cantidad de proteína con capacidad de unirse al oligonucleótido G'wt (EMSA), correlacionaban perfectamente en cualquier tipo de extracto o fracción subcelular. Así, en las FIGURAS 19A y 25 se vió que el aumento de la unión de SOX17 al elemento G' estaba correlacionado con un aumento en la cantidad de SOX17 en los extractos nucleares. Aunque la afinidad de SOX17 por el elemento G' durante la inducción hormonal no se ha determinado, esto sugería que el efecto de la progesterona no se producía a través de la "activación" de un "pool" de SOX17 nuclear preexistente (a través, por ejemplo, de un aumento de su afinidad por el DNA).

Una estrategia para controlar la actividad de algunos factores de transcripción consiste en la regulación de su localización intracelular. Así esta descrito, por ejemplo, para algunas proteínas SOX (Smith, J. M. y Koopman, P. A. 2004). En estos casos (SOX9, SOX10 y SRY) las proteínas poseen NLSs y NESs funcionales; esto hace que puedan ser transportadas del citoplasma al núcleo y viceversa. Estas señales también están conservadas en SOX17, aunque no se ha demostrado su funcionalidad. El transporte bidireccional citoplasma-núcleo puede ser regulado a diferentes niveles (Yoneda, Y. 2000; Cyert, M. S. 2001; Poon, I. K. y Jans, D. A. 2005), fundamentalmente, variando la velocidad de transporte hacia uno u otro compartimento, o por mecanismos que retienen el factor en una localización determinada. Por lo tanto existen dos posibilidades para explicar el aumento de la concentración de SOX17 en la fracción nuclear del endometrio de la coneja tratada hormonalmente. En primer lugar, podría ser la simple consecuencia de un aumento de la cantidad total de la proteína debido a que la progesterona estimularía la síntesis de novo de SOX17. En segundo lugar, podría suceder que la progesterona estimulara la translocación al núcleo de un "pool" citoplasmático preexistente de SOX17. Los experimentos, cuyos resultados se muestran en la FIGURA 26, sugieren que de hecho, ambas posibilidades ocurren. En las células endometriales existe una cantidad importante de SOX17, la cual aumenta aproximadamente 3 veces con el tratamiento hormonal. Pero el aumento en el núcleo es mayor, de aproximadamente 6 veces, y se puede explicar por un aumento de la tasa global de SOX17 que es transportado al interior del núcleo desde el citoplasma.

El mecanismo por el que la progesterona cambia la tasa global del transporte de SOX17 entre el citoplasma y el núcleo está por determinar.

Es muy interesante que un factor de transcripción como SOX17 tenga una localización mayoritariamente citoplasmática, sobre todo en las conejas no tratadas. Aunque la explicación más sencilla es que sea el resultado de procesos regulatorios que afectan a su transporte al núcleo (retención en el citoplasma por asociación con algún factor, enmascaramiento de las NLSs, etc.), es posible que SOX17 tenga alguna función fuera del núcleo de las células endometriales, como indica su presencia mayoritaria fuera de él en cualquier circunstancia de las estudiadas. Por último hay que señalar que para llegar a las conclusiones anteriores es necesario que el fraccionamiento subcelular y la obtención de extractos se realice correctamente. Del análisis de la integridad de los extractos utilizados (FIGURA 27) se deduce que puede descartarse la contaminación de los extractos nucleares con proteínas citoplasmáticas y viceversa.

Se ha descrito que SOX17 interacciona con β -catenina (Zorn, A. M., Barish, G. D. et al. 1999; Sinner, D., Rankin, S. et al. 2004). β -catenina es el efector clave de la vía canónica de señalización de Wnt. Esta vía de señalización parece funcionar en el endometrio humano, y además algunos de sus componentes pueden estar regulados por las hormonas esteroideas durante el ciclo menstrual (Kao, L. C., Tulac, S. et al. 2002; Kao, L. C., Germeyer, A. et al. 2003). En la glándula mamaria, se ha establecido que la señalización por Wnt juega un papel esencial en la función de la progesterona (Brisken, C., Heineman, A. et al. 2000; Robinson, G. W., Hennighausen, L. et al. 2000), de forma que, en respuesta a la progesterona, se produce un aumento de los niveles de β -catenina. Recientemente se ha propuesto que β -catenina podría actuar como un transportador de los factores de transcripción LEF-1 y TCF-4 desde el citoplasma hacia el núcleo (Asally, M. y Yoneda, Y. 2005; Hsu, H. T., Liu, P. C. et al. 2006). Con estos datos se planteó la hipótesis de que, aparte de conducir, directa o indirectamente, a un aumento de la concentración de SOX17, la progesterona pudiera promover la acumulación de SOX17 en el

núcleo a través de la estimulación de la vía de Wnt, cuyo efector final, la β -catenina, funcionaría como un receptor para la importación nuclear de SOX17. En la FIGURA 28 se observa como β -catenina aumenta ligeramente la acción de SOX17 sobre el promotor proximal del gen *ug*. Queda por establecerse si funciona como co-activador de SOX17 (aunque no es probable ya que su efecto es muy débil), o como transportador de SOX17 al núcleo. Aquí hay que tener en cuenta que el sistema utilizado tampoco es el más idóneo, ya que como se observa en la FIGURA 29, la proteína SOX17 sobreproducida en las células HEC-1A, se acumula mayoritariamente en el núcleo sin la necesidad de ningún estímulo.

Hace falta un sistema más apropiado para estudiar los mecanismos responsables de la localización subcelular de SOX17, y de su posible papel fuera del núcleo. Sería muy importante poder realizar experimentos *in vitro* que permitieran estudiar si la progesterona es el estímulo primario que dispara la translocación al núcleo de SOX17. Los cultivos primarios de células endometriales de conejo serían el sistema ideal. Podrían tratarse las células con progesterona y otros agentes y analizar su efecto en la localización subcelular de SOX17. Lamentablemente este sistema no se ha podido poner a punto en este trabajo. Una de las mayores dificultades encontradas fue que estos cultivos primarios perdían rápidamente la expresión de UG y no respondían adecuadamente a progesterona.

7.5 Posible mecanismo de acción de SOX17 en el contexto del promotor de *ug*.

Con el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que SOX17 participa en la regulación del gen *ug* en el endometrio en respuesta a la progesterona. Respecto al mecanismo de acción por el que SOX17, en conjunción con la progesterona, activa la transcripción del gen *ug* en conejo (y quizás en otras especies), hay varias posibilidades. La progesterona realiza su acción fundamental uniéndose junto a su receptor a los HREs distales, pero también actúa indirectamente, aumentando la concentración (o la unión) de

determinados factores de transcripción al promotor proximal del gen *ug*. Este parece ser el caso de SOX17. Los resultados de este trabajo indican que en el endometrio de las conejas tratadas con progesterona aumentan los niveles de SOX17, así como su translocación al núcleo. Ahora bien, queda por establecerse, si ésta es la única causa del aumento de la unión de SOX17 al promotor de UG (estaríamos básicamente ante una respuesta secundaria a la hormona, acompañada de algún mecanismo regulador de la localización subcelular del factor), o si también pueden existir, entre el PR y SOX17, procesos sinérgicos, de unión cooperativa, etc, debidos fundamentalmente a cambios en el estado de la cromatina provocados por la unión del receptor de progesterona a los HREs. Esta posibilidad ha sido descrita para otros factores, como por ejemplo NF-Y. En ese caso, el sitio de unión de NF-Y está situado cerca de los HREs, y la unión de NF-Y al promotor de *ug* se produce tras la remodelación de la cromatina inducida por la progesterona (Scholz, A., Truss, M. et al. 1999). En el caso de SOX17, el sitio de unión en el promotor del gen *ug* descrito en este trabajo, está alejado de los HREs aunque, por la conformación tridimensional que el promotor puede adoptar gracias a la unión de factores que modulan su arquitectura, el efecto de estos cambios en la cromatina provocados por la unión del PR a los HREs, podría transmitirse a zonas lejanas, situadas en el promotor proximal.

Por otra parte, SOX17 podría funcionar como uno de esos factores que modulan la topología del promotor, ayudando al PR a ejercer su función en el contexto del promotor de *ug*. Así, se ha postulado que las proteínas SOX pueden funcionar como “elementos acopladores”. Estos pueden interactuar con otros factores unidos a zonas lejanas del promotor, permitiendo que estos factores activadores puedan situarse cerca del promotor proximal (Schoneveld, O., Gaemers, I. C. et al. 2004). En el caso de las proteínas SOX, esta posibilidad puede radicar en su habilidad de producir en el DNA un “bending” muy acusado (Wegner, M. 1999), el cual se ha relacionado con la regulación transcripcional de varios genes (Perez-Martin, J. y de Lorenzo, V. 1997).

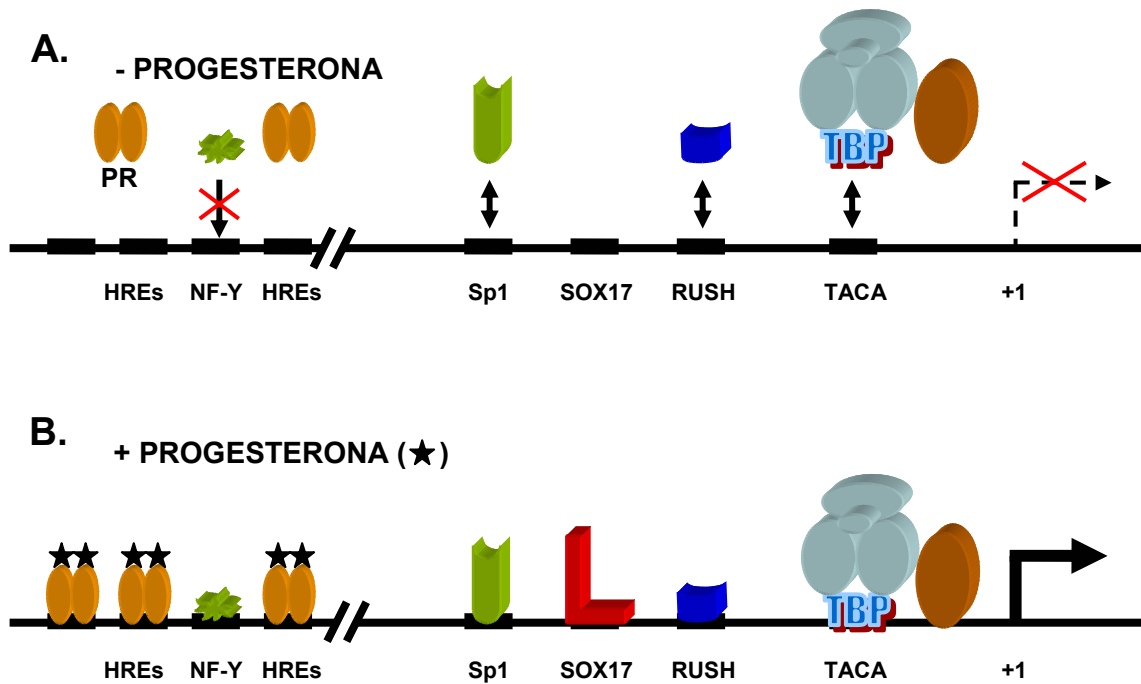


FIGURA 30. Modelo esquemático de la regulación del gen *ug* por progesterona y SOX17. **A.** En ausencia de progesterona, factores de transcripción como NF-Y, no pueden unirse a sus sitios en el promotor. Además, los niveles de SOX17 nuclear son muy bajos. Esto conduce a una falta de actividad transcripcional del gen *ug*. **B.** En presencia de progesterona los dímeros de PR se unen a los HREs, lo que permite que NF-Y sea reclutado en el promotor de *ug*. Por otra parte los niveles de SOX17 en el núcleo aumentan, SOX17 se une al promotor y estimula o estabiliza la formación de una configuración transcripcionalmente adecuada.

En resumen, la regulación por progesterona del gen *ug* en el endometrio de la coneja, es un proceso complejo que puede comprender varios eventos. Un posible modelo sería el siguiente: tras el estímulo primario hormonal, el PR se uniría al “enhancer” distal del promotor de gen *ug*, el cual está compuesto de varios HREs (FIGURA 30). A través del PR, se reclutaría un conjunto de proteínas con función de andamiaje, quinasas y factores modificadores y remodeladores de la cromatina, formándose un complejo multiproteico al que podríamos denominar “enhanciosoma”. Este complejo, al inducir cambios locales en la cromatina, permitiría la unión de otros factores de transcripción (como NF-Y) al “enhancer”. Paralelamente y en respuesta también a la hormona, aumentaría la concentración nuclear de otros factores de

transcripción como SOX17 (respuesta secundaria). Estos factores, al poseer características que les permiten organizar la cromatina, ayudarían al “enhanciosoma” distal a entrar en contacto con otras zonas del promotor mediante interacciones proteína-proteína. Esto facilitaría la unión al promotor proximal de otros factores de transcripción (como RUSH/SMARCA, Sp1 y YY1), el reclutamiento por éstos de otros co-activadores y la estabilización y/o activación del complejo pretranscripcional. El resultado final sería la activación de la transcripción del gen *ug* (FIGURA 31A).

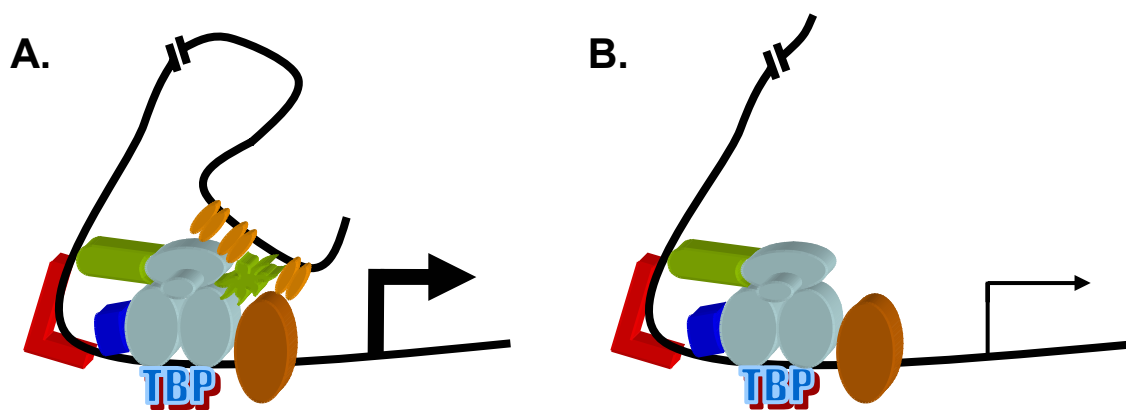


FIGURA 31. Posible modelo, tras la activación por progesterona, del promotor del gen *ug* de conejo (“A”), y del promotor del gen *ug* de otras especies como el hombre (“B”). En el caso del conejo, la interacción del “enhanciosoma” distal con componentes del promotor proximal, estructurados con la ayuda de SOX17 (en rojo), permite una conformación de fuerte actividad transcripcional. En el segundo caso, SOX17 permite la formación de una estructura en el promotor proximal que, aunque a niveles más bajos, también es transcripcionalmente activa.

Por otra parte, SOX17 podría no limitarse a servir de elemento acoplador entre el “enhanciosoma” y el complejo pretranscripcional, sino que también estaría implicado en la formación de una estructura transcripcionalmente competente en el promotor proximal, ya que en nuestros experimentos de transfección con una construcción sin los HREs distales para progesterona, SOX17 activa la transcripción, aunque sea de una forma moderada (2.5 veces). Una situación similar a esta última posibilidad podríamos encontrarla en los

genes *ug* de otras especies (por ejemplo, en el hombre). Estos genes, aunque a niveles más bajos que en conejo, también son estimulados por progesterona en el endometrio, a pesar de no haberse encontrado HREs funcionales en sus promotores (FIGURA 31B). En estos casos, factores de transcripción inducidos por progesterona podrían ser los mediadores indirectos responsables de la activación hormonal.

8 CONCLUSIONES

1. El promotor del gen *ug* de conejo es un promotor complejo al que se unen diversos factores de transcripción tanto comunes, como específicos de tejido.
2. La progesterona regula el gen *ug* en parte, induciendo la unión de determinados factores de transcripción a su promotor.
3. SOX17 es uno de estos factores de transcripción, cuya unión al promotor del gen *ug* aumenta en respuesta a la progesterona.
4. In vitro, SOX17 se une como un monómero al elemento G' situado en el promotor proximal de *ug*.
5. En células en cultivo, SOX17 es capaz de inducir la expresión del gen *ug* a través de su unión al elemento G' en el promotor del mismo.
6. La proteína SOX17 se expresa en el endometrio de la coneja con una localización subcelular predominantemente citoplasmática. La progesterona aumenta la cantidad total de SOX17 en las células endometriales, así como su translocación al núcleo.
7. En respuesta a la progesterona, existe una correlación entre las cinéticas de la aparición de la UG y de su mRNA en el lumen uterino y la del aumento de SOX17 en el núcleo de las células del endometrio.

9 BIBLIOGRAFÍA

Argentaro, A., Sim, H., Kelly, S., Preiss, S., Clayton, A., Jans, D. A. y Harley, V. R. (2003) "A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal." *J. Biol. Chem.* **278**(36): 33839-33847.

Asally, M. y Yoneda, Y. (2005) "beta-catenin can act as a nuclear import receptor for its partner transcription factor, lymphocyte enhancer factor-1 (lef-1)." *Exp. Cell Res.* **308**(2): 357-363.

Bailly, A., Le Page, C., Rauch, M. y Milgrom, E. (1986) "Sequence-specific DNA binding of the progesterone receptor to the uteroglobin gene: effects of hormone, antihormone and receptor phosphorylation." *EMBO J.* **5**(12): 3235-3241.

Beato, M. (1989) "Gene regulation by steroid hormones." *Cell* **56**(3): 335-344.

Beato, M. y Klug, J. (2000) "Steroid hormone receptors: an update." *Hum. Reprod. Update* **6**(3): 225-236.

Beier, H. M. (1968) "Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development." *Biochim. Biophys. Acta* **160**(2): 289-291.

Beier, H. M. (2000) "The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **923**: 9-24.

Beier, H. M., Bohn, H. y Muller, W. (1975) "Uteroglobin-like antigen in the male genital tract secretions." *Cell. Tissue Res.* **165**(1): 1-11.

Bingle, C. D. y Gitlin, J. D. (1993) "Identification of hepatocyte nuclear factor-3 binding sites in the Clara cell secretory protein gene." *Biochem. J.* **295 (Pt 1)**: 227-232.

Bowles, J., Schepers, G. y Koopman, P. (2000) "Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators." *Dev. Biol.* **227**(2): 239-255.

Briskin, C., Heineman, A., Chavarria, T., Elenbaas, B., Tan, J., Dey, S. K., McMahon, J. A., McMahon, A. P. y Weinberg, R. A. (2000) "Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling." *Genes Dev.* **14**(6): 650-654.

Bullock, D. W. y Willen, G. F. (1974) "Regulation of a specific uterine protein by estrogen and progesterone in ovariectomized rabbits." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **146**(1): 294-298.

- Cato, A. C., Geisse, S., Wenz, M., Westphal, H. M. y Beato, M.** (1984) "The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription." *EMBO J.* **3**(12): 2771-2778.
- Chandra, T., Bullock, D. W. y Woo, S. L.** (1981) "Hormonally regulated mammalian gene expression: steady-state level and nucleotide sequence of rabbit uteroglobin mRNA." *DNA* **1**(1): 19-26.
- Chiang, S. Y., Welch, J., Rauscher, F. J., 3rd y Beerman, T. A.** (1994) "Effects of minor groove binding drugs on the interaction of TATA box binding protein and TFIIA with DNA." *Biochemistry* **33**(23): 7033-7040.
- Clever, U. y Karlson, P.** (1960) "Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone." *Exp. Cell Res.* **20**: 623-626.
- Conneely, O. M., Kettelberger, D. M., Tsai, M. J., Schrader, W. T. y O'Malley, B. W.** (1989) "The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event." *J. Biol. Chem.* **264**(24): 14062-14064.
- Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B. y Lydon, J. P.** (2003) "Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms." *Steroids* **68**(10-13): 771-778.
- Connor, F., Cary, P. D., Read, C. M., Preston, N. S., Driscoll, P. C., Denny, P., Crane-Robinson, C. y Ashworth, A.** (1994) "DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry-related protein Sox-5." *Nucleic Acids Res.* **22**(16): 3339-3346.
- Cyert, M. S.** (2001) "Regulation of nuclear localization during signaling." *J. Biol. Chem.* **276**(24): 20805-20808.
- Dailey, L., Yuan, H. y Basilico, C.** (1994) "Interaction between a novel F9-specific factor and octamer-binding proteins is required for cell-type-restricted activity of the fibroblast growth factor 4 enhancer." *Mol. Cell. Biol.* **14**(12): 7758-7769.
- Daniel, J. C., Jr.** (1976) "Blastokinin and analogous proteins." *J. Reprod. Fertil. Suppl.*(25): 71-83.
- Dennig, J., Hagen, G., Beato, M. y Suske, G.** (1995) "Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter." *J. Biol. Chem.* **270**(21): 12737-12744.
- Dhanireddy, R., Kikukawa, T. y Mukherjee, A. B.** (1988) "Detection of a rabbit uteroglobin-like protein in human neonatal tracheobronchial washings." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**(3): 1447-1454.
- Di Rocco, G., Gavalas, A., Popperl, H., Krumlauf, R., Mavilio, F. y Zappavigna, V.** (2001) "The recruitment of SOX/OCT complexes and the

differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the Hoxb1 auto-regulatory enhancer function." *J. Biol. Chem.* **276**(23): 20506-20515.

Díaz González, K. y Nieto, A. (1995) "Binding of uteroglobin to microsomes and plasmatic membranes." *FEBS Lett.* **361**(2-3): 255-258.

Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. y Roeder, R. G. (1983) "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." *Nucleic Acids Res* **11**(5): 1475-1489.

Fairbanks, G., Steck, T. L. y Wallach, D. F. (1971) "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." *Biochemistry* **10**(13): 2606-2617.

Ferguson, K. A. (1964) "Starch-Gel Electrophoresis--Application To The Classification Of Pituitary Proteins And Polypeptides." *Metabolism* **13**: SUPPL:985-1002.

Ferrari, S., Harley, V. R., Pontiggia, A., Goodfellow, P. N., Lovell-Badge, R. y Bianchi, M. E. (1992) "SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA." *EMBO J.* **11**(12): 4497-4506.

García, C. y Nieto, A. (1999) "Two progesterone-dependent endometrial nuclear factors bind to an E-box in the rabbit uteroglobin gene promoter: involvement in tissue-specific transcription." *Arch. Biochem. Biophys.* **362**(2): 301-308.

García, C., Regalado, F., López de Haro, M. S. y Nieto, A. (1988) "Ultrastructural localization of epididymal secretory proteins associated with the surface of spermatozoa from rabbit cauda epididymis." *Histochem. J.* **20**: 708-714.

Gómez Lahoz, E., López de Haro, M. S., Esponda, P. y Nieto, A. (1992) "Tissue-specific and hormonally regulated expression of the puromycin N-acetyltransferase-encoding gene under control of the rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice." *Gene* **117**(2): 255-258.

Gonzalez, M., García, C. y Nieto, A. (1996) "Regional differences in uteroglobin biosynthesis along the rabbit oviduct: immunohistochemical and biochemical studies." *Histochem J* **28**(3): 209-215.

Graham, J. D., Hunt, S. M. N., Tran, N. y Clarke, C. L. (1999) "Regulation of the expression and activity by progestins of a member of the SOX gene family of transcriptional modulators." *J. Mol. Endocrinol.* **22**(3): 295-304.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. y Lovell-Badge, R. (1990) "A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes." *Nature* **346**(6281): 245-250.

- Gutiérrez-Sagal, R., Pérez-Palacios, G., Langley, E., Pasapera, A. M., Castro, I. y Cerbón, M. A.** (1993) "Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit." *Mol. Reprod. Dev.* **34**(3): 244-249.
- Gutiérrez Sagal, R. y Nieto, A.** (1998a) "Cloning and sequencing of the cDNA coding for pig pre-uteroglobin/Clara cell 10 kDa protein." *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**(1): 205-213.
- Gutiérrez Sagal, R. y Nieto, A.** (1998b) "Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster uteroglobin/Clara cell 10-kDa gene (ug/cc10): tissue-specific and hormonal regulation." *Arch. Biochem. Biophys.* **350**(2): 214-222.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M. y Suske, G.** (1992) "Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes." *Nucleic Acids Res.* **20**(21): 5519-5525.
- Hagen, G., Wolf, M., Katyal, S. L., Singh, G., Beato, M. y Suske, G.** (1990) "Tissue-specific expression, hormonal regulation and 5'-flanking gene region of the rat Clara cell 10 kDa protein: comparison to rabbit uteroglobin." *Nucleic Acids Res.* **18**(10): 2939-2946.
- Hammes, S. R.** (2003) "The further redefining of steroid-mediated signaling." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(5): 2168-2170.
- Hashimoto, S., Nakagawa, K. y Sueishi, K.** (1996) "Monkey Clara cell 10 kDa protein (CC10): a characterization of the amino acid sequence with an evolutionary comparison with humans, rabbits, rats, and mice." *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**(3): 361-366.
- Haywardlester, A., Hewetson, A., Beale, E. G., Oefner, P. J., Doris, P. A. y Chilton, B. S.** (1996) "Cloning, characterization, and steroid-dependent posttranscriptional processing of RUSH-1 alpha and beta, two uteroglobin promoter-binding proteins." *Mol. Endocrinol.* **10**(11): 1335-1349.
- Hebbar, P. B. y Archer, T. K.** (2003) "Chromatin remodeling by nuclear receptors." *Chromosoma* **111**(8): 495-504.
- Hsu, H. T., Liu, P. C., Ku, S. Y., Jung, K. C., Hong, Y. R., Kao, C. H. y Wang, C. H.** (2006) "beta-catenin control of T-cell transcription factor 4 (Tcf4) importation from the cytoplasm to the nucleus contributes to Tcf4-mediated transcription in 293 cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**(3): 893-898.
- Hudson, C., Clements, D., Friday, R. V., Stott, D. y Woodland, H. R.** (1997) "Xsox17alpha and -beta mediate endoderm formation in *Xenopus*." *Cell* **91**(3): 397-405.
- Hunt, S. M. N. y Clarke, C. L.** (1999) "Expression and hormonal regulation of the Sox4 gene in mouse female reproductive tissues." *Biol. Reprod.* **61**(2): 476-481.

Hur, E. H., Hur, W., Choi, J. Y., Kim, I. K., Kim, H. Y., Yoon, S. K. y Rhim, H. (2004) "Functional identification of the pro-apoptotic effector domain in human Sox4." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**(1): 59-67.

Jang, S. y Yi, L. S. H. (2005) "Identification of a 71 kDa protein as a putative non-genomic membrane progesterone receptor in boar spermatozoa." *J. Endocrinol.* **184**(2): 417-425.

Jantzen, K., Fritton, H. P., Igo-Kemenes, T., Espel, E., Janich, S., Cato, A. C., Mugele, K. y Beato, M. (1987) "Partial overlapping of binding sequences for steroid hormone receptors and DNaseI hypersensitive sites in the rabbit uteroglobin gene region." *Nucleic Acids Res.* **15**(11): 4535-4552.

Kadonaga, J. T. y Tjian, R. (1986) "Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**(16): 5889-5893.

Kamachi, Y., Uchikawa, M. y Kondoh, H. (2000) "Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development." *Trends Genet.* **16**(4): 182-187.

Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Noce, T., Saido, T. C., Shiroishi, T., Hayashi, Y. y Yazaki, K. (1996) "Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis." *J. Cell. Biol.* **133**(3): 667-681.

Kao, L. C., Germeyer, A., Tulac, S., Lobo, S., Yang, J. P., Taylor, R. N., Osteen, K., Lessey, B. A. y Giudice, L. C. (2003) "Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility." *Endocrinology* **144**(7): 2870-2881.

Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J. P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R. N., Lessey, B. A. y Giudice, L. C. (2002) "Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation." *Endocrinology* **143**(6): 2119-2138.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. y Chambon, P. (1990) "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B." *EMBO J.* **9**(5): 1603-1614.

Kay, E. y Feigelson, M. (1972) "An estrogen modulated protein in rabbit oviducal fluid." *Biochim. Biophys. Acta* **271**(2): 436-441.

Kiefer, J. C. (2007) "Back to basics: Sox genes." *Dev. Dyn.* **236**(8): 2356-2366.

Kikukawa, T., Cowan, B. D., Tejada, R. I. y Mukherjee, A. B. (1988) "Partial characterization of a uteroglobin-like protein in the human uterus and its temporal relationship to prostaglandin levels in this organ." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**(2): 315-321.

Kirchner, C. (1972) "Immune histologic studies on the synthesis of a uterine-specific protein in the rabbit and its passage through the blastocyst coverings." *Fertil. Steril.* **23**(2): 131-136.

Kirchner, C. y Schroer, H. G. (1976) "Uterine secretion-like proteins in the seminal plasma of the rabbit." *J. Reprod. Fertil.* **47**(2): 325-330.

Klug, J. y Beato, M. (1996) "Binding of YY1 to a site overlapping a weak TATA box is essential for transcription from the uteroglobin promoter in endometrial cells." *Mol. Cell. Biol.* **16**(11): 6398-6407.

Klug, J., Beier, H. M., Bernard, A., Chilton, B. S., Fleming, T. P., Lehrer, R. I., Miele, L., Pattabiraman, N. y Singh, G. (2000) "Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **923**: 348-354.

Kornberg, R. D. (2005) "Mediator and the mechanism of transcriptional activation." *Trends Biochem. Sci.* **30**(5): 235-239.

Kramer, M. G., Barajas, M., Razquin, N., Berraondo, P., Rodrigo, M., Wu, C., Qian, C., Fortes, P. y Prieto, J. (2003) "In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters." *Mol. Ther.* **7**(3): 375-385.

Kraus, W. L., Montano, M. M. y Katzenellenbogen, B. S. (1993) "Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters." *Mol. Endocrinol.* **7**(12): 1603-1616.

Krishnan, R. S. y Daniel, J. C., Jr. (1967) "'Blastokinin': inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus." *Science* **158**(800): 490-492.

Kumar, N. M., Chandra, T., Woo, S. L. y Bullock, D. W. (1982) "Transcriptional activity of the uteroglobin gene in rabbit endometrial nuclei during early pregnancy." *Endocrinology* **111**(4): 1115-1120.

Kumar, R., Wang, R. A. y Barnes, C. J. (2004) "Coregulators and chromatin remodeling in transcriptional control." *Mol. Carcinogen.* **41**(4): 221-230.

Kundu, G. C., Mantile, G., Miele, L., Cordella-Miele, E. y Mukherjee, A. B. (1996) "Recombinant human uteroglobin suppresses cellular invasiveness via a novel class of high-affinity cell surface binding site." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(7): 2915-2919.

Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Latchman, D. S. (1991). Eukaryotic transcription factors. London, Academic Press Limited.

Lee, T. C. y Schwartz, R. J. (1992) "Differential detection of multiple DNA-binding complexes using dissimilar polyanion competitors." *Nucleic Acids Res.* **20**(1): 140.

- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y. y Pallavi, B.** (2007) "Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors." *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- Leonhardt, S. A., Boonyaratankornkit, V. y Edwards, D. P.** (2003) "Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms." *Steroids* **68**(10-13): 761-770.
- Li, X. T., Lonard, D. M. y O'Malley, B. W.** (2004) "A contemporary understanding of progesterone receptor function." *Mech. Ageing Dev.* **125**(10-11): 669-678.
- López de Haro, M. S., García, C. y Nieto, A.** (1990) "Localization of an estrogen receptor binding site near the promoter of the uteroglobin gene." *FEBS Lett.* **265**(1-2): 20-22.
- López de Haro, M. S. y Nieto, A.** (1986) "Nucleotide and derived amino acid sequences of a cDNA coding for pre-uteroglobin from the lung of the hare (*Lepus capensis*)." *Biochem. J.* **235**(3): 895-898.
- López de Haro, M. S., Pérez Martínez, M., García, C. y Nieto, A.** (1994) "Binding of retinoids to uteroglobin." *FEBS Lett.* **349**(2): 249-251.
- Losel, R. y Wehling, M.** (2003) "Nongenomic actions of steroid hormones." *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**(1): 46-56.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.** (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265-275.
- Lucas, P. C. y Granner, D. K.** (1992) "Hormone response domains in gene transcription." *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1131-1173.
- Mantile, G., Miele, L., Cordella-Miele, E., Singh, G., Katyal, S. L. y Mukherjee, A. B.** (1993) "Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin." *J. Biol. Chem.* **268**(27): 20343-20351.
- Margraf, L. R., Finegold, M. J., Stanley, L. A., Major, A., Hawkins, H. K. y DeMayo, F. J.** (1993) "Cloning and tissue-specific expression of the cDNA for the mouse Clara cell 10 kD protein: comparison of endogenous expression to rabbit uteroglobin promoter-driven transgene expression." *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**(3): 231-238.
- Maxam, A. M. y Gilbert, W.** (1980) "Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages." *Methods Enzymol.* **65**(1): 499-560.
- Mayol, R. F. y Longenecker, D. E.** (1974) "Development of a radioimmunoassay for blastokinin." *Endocrinology* **95**(6): 1534-1542.
- McKenna, N. J. y O'Malley, B. W.** (2002a) "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." *Cell* **108**(4): 465-474.

- McKenna, N. J. y OMalley, B. W.** (2002b) "Minireview: Nuclear receptor coactivators - An update." *Endocrinology* **143**(7): 2461-2465.
- Menne, C., Suske, G., Arnemann, J., Wenz, M., Cato, A. C. y Beato, M.** (1982) "Isolation and structure of the gene for the progesterone-inducible protein uteroglobin." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**(16): 4853-4857.
- Mertin, S., McDowall, S. G. y Harley, V. R.** (1999) "The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins." *Nucleic Acids Res.* **27**(5): 1359-1364.
- Miele, L., Cordella-Miele, E., Mantile, G., Peri, A. y Mukherjee, A. B.** (1994) "Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: the uteroglobin family of proteins." *J. Endocrinol. Invest.* **17**(8): 679-692.
- Misseyanni, A., Klug, J., Suske, G. y Beato, M.** (1991) "Novel upstream elements and the TATA-box region mediate preferential transcription from the uteroglobin promoter in endometrial cells." *Nucleic Acids Res.* **19**(11): 2849-2859.
- Mukherjee, A. B., Kundu, G. C., Mantile-Selvaggi, G., Yuan, C. J., Mandal, A. K., Chattopadhyay, S., Zheng, F., Pattabiraman, N. y Zhang, Z.** (1999) "Uteroglobin: a novel cytokine?" *Cell. Mol. Life Sci.* **55**(5): 771-787.
- Mukherjee, A. B., Laki, K. y Agrawal, A. K.** (1980) "Possible mechanism of success of an allotransplantation in nature: mammalian pregnancy." *Med. Hypotheses* **6**(10): 1043-1055.
- Mukherjee, D. C., Agrawal, A. K., Manjunath, R. y Mukherjee, A. B.** (1983) "Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase in vitro." *Science* **219**(4587): 989-991.
- Muller-Schottle, F., Classen-Linke, I., Alfer, J., Krusche, C., Beier-Hellwig, K., Sterzik, K. y Beier, H. M.** (1999) "Expression of uteroglobin in the human endometrium." *Mol. Hum. Reprod.* **5**(12): 1155-1161.
- Muller, H. y Beato, M.** (1980) "RNA synthesis in rabbit endometrial nuclei. Hormonal regulation of transcription of the uteroglobin gene." *Eur J Biochem* **112**(2): 235-241.
- Murakami, A., Shen, H., Ishida, S. y Dickson, C.** (2004) "SOX7 and GATA-4 are competitive activators of Fgf-3 transcription." *J. Biol. Chem.* **279**(27): 28564-28573.
- Nieto, A. y Beato, M.** (1980) "Synthesis and secretion of uteroglobin in rabbit endometrial explants cultured in vitro." *Mol. Cell. Endocrinol.* **17**(1): 25-39.
- Nieto, A. y Lombardero, M.** (1982) "Uteroglobin-like antigens in species of Lagomorpha." *Comp. Biochem. Physiol.* **71B**(3): 511-514.
- Nordlund-Moller, L., Andersson, O., Ahlgren, R., Schilling, J., Gillner, M., Gustafsson, J. A. y Lund, J.** (1990) "Cloning, structure, and expression of a

rat binding protein for polychlorinated biphenyls. Homology to the hormonally regulated progesterone-binding protein uteroglobin." *J. Biol. Chem.* **265**(21): 12690-12693.

Noske, I. G. y Feigelson, M. (1976) "Immunological evidence of uteroglobin (blastokinin) in the male reproductive tract and in nonreproductive ductal tissues and their secretions." *Biol. Reprod.* **15**(5): 704-713.

Orchard, K. y May, G. E. (1993) "An EMSA-based method for determining the molecular weight of a protein-DNA complex." *Nucleic Acids Res.* **21**(14): 3335-3336.

Ossipow, V., Laemmli, U. K. y Schibler, U. (1993) "A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis." *Nucleic Acids Res.* **21**(25): 6040-6041.

Park, K. S., Wells, J. M., Zorn, A. M., Wert, S. E. y Whitsett, J. A. (2006) "Sox17 influences the differentiation of respiratory epithelial cells." *Dev. Biol.* **294**(1): 192-202.

Perez-Martin, J. y de Lorenzo, V. (1997) "Clues and consequences of DNA bending in transcription." *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 593-628.

Pérez Martínez, M., García, C., López de Haro, M. S. y Nieto, A. (1996) "Interactions of progesterone-dependent endometrial nuclear factors with the promoter of the rabbit uteroglobin gene." *Arch. Biochem. Biophys.* **333**(1): 12-18.

Pevny, L. H. y Lovell-Badge, R. (1997) "Sox genes find their feet." *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**(3): 338-344.

Poon, I. K. y Jans, D. A. (2005) "Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation?" *Traffic* **6**(3): 173-186.

Randall, G. W., Daniel, J. C., Jr. y Chilton, B. S. (1991) "Prolactin enhances uteroglobin gene expression by uteri of immature rabbits." *J. Reprod. Fertil.* **91**(1): 249-257.

Ray, M. K., Magdaleno, S., O'Malley, B. W. y DeMayo, F. J. (1993) "Cloning and characterization of the mouse Clara cell specific 10 kDa protein gene: comparison of the 5'-flanking region with the human rat and rabbit gene." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**(1): 163-171.

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. y Prossnitz, E. R. (2005) "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." *Science* **307**(5715): 1625-1630.

Rider, V. y Peterson, C. J. (1991) "Activation of uteroglobin gene expression by progesterone is modulated by uterine-specific promoter-binding proteins." *Mol. Endocrinol.* **5**(7): 911-920.

- Robinson, G. W., Hennighausen, L. y Johnson, P. F.** (2000) "Side-branching in the mammary gland: the progesterone-Wnt connection." *Genes Dev.* **14**(8): 889-894.
- Rochette, E. C.** (2003) "Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation." *Cell. Signalling* **15**(4): 355-366.
- Sandmoller, A., Voss, A. K., Hahn, J., Redemann-Fibi, B., Suske, G. y Beato, M.** (1991) "Cell-specific, developmentally and hormonally regulated expression of the rabbit uteroglobin transgene and the endogenous mouse uteroglobin gene in transgenic mice." *Mech. Dev.* **34**(1): 57-67.
- Sawaya, P. L., Stripp, B. R., Whitsett, J. A. y Luse, D. S.** (1993) "The lung-specific CC10 gene is regulated by transcription factors from the AP-1, octamer, and hepatocyte nuclear factor 3 families." *Mol. Cell. Biol.* **13**(7): 3860-3871.
- Scholz, A., Truss, M. y Beato, M.** (1998) "Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium." *J. Biol. Chem.* **273**(8): 4360-4366.
- Scholz, A., Truss, M. y Beato, M.** (1999) "Hormone-dependent recruitment of NF-Y to the uteroglobin gene enhancer associated with chromatin remodeling in rabbit endometrial epithelium." *J. Biol. Chem.* **274**(7): 4017-4026.
- Schoneveld, O., Gaemers, I. C. y Lamers, W. H.** (2004) "Mechanisms of glucocorticoid signalling." *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expr.* **1680**(2): 114-128.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. y Schaffner, W.** (1989) "Rapid detection of octamer binding-proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells." *Nucleic Acids Res.* **17**(15): 6419-6419.
- Schule, R., Muller, M., Kaltschmidt, C. y Renkawitz, R.** (1988) "Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors." *Science* **242**(4884): 1418-1420.
- Shen, X. Z., Tsai, M. J., Bullock, D. W. y Woo, S. L.** (1983) "Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription." *Endocrinology* **112**(3): 871-876.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M.** (1996) "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal. Chem.* **68**(5): 850-858.
- Singh, G., Katyal, S. L., Brown, W. E., Phillips, S., Kennedy, A. L., Anthony, J. y Squeglia, N.** (1988) "Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein." *Biochim. Biophys. Acta* **950**(3): 329-337.
- Singh, G., Singh, J., Katyal, S. L., Brown, W. E., Kramps, J. A., Paradis, I. L., Dauber, J. H., Macpherson, T. A. y Squeglia, N.** (1988) "Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein." *J. Histochem. Cytochem.* **36**(1): 73-80.

Sinner, D., Rankin, S., Lee, M. y Zorn, A. M. (2004) "Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes." *Development* **131**(13): 3069-3080.

Slater, E. P., Redeuihl, G., Theis, K., Suske, G. y Beato, M. (1990) "The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element." *Mol. Endocrinol.* **4**(4): 604-610.

Smith, J. M. y Koopman, P. A. (2004) "The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease." *Trends Genet.* **20**(1): 4-8.

Spitz, I. M. (2003) "Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview." *Steroids* **68**(10-13): 981-993.

Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M. P., Walker, J. R. y Hogenesch, J. B. (2004) "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(16): 6062-6067.

Suske, G., Lorenz, W., Klug, J., Gazdar, A. F. y Beato, M. (1992) "Elements of the rabbit uteroglobin promoter mediating its transcription in epithelial cells from the endometrium and lung." *Gene Expr.* **2**(4): 339-352.

Suske, G., Wenz, M., Cato, A. C. y Beato, M. (1983) "The uteroglobin gene region: hormonal regulation, repetitive elements and complete nucleotide sequence of the gene." *Nucleic Acids Res.* **11**(8): 2257-2271.

Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Hache, R. J. y Beato, M. (1995) "Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo." *EMBO J.* **14**(8): 1737-1751.

Vicent, G. P., Koop, R. y Beato, M. (2002) "Complex role of histone H1 in transactivation of MMTV promoter chromatin by progesterone receptor." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **83**(1-5): 15-23.

Walters, M. R. y Nemere, I. (2004) "Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms." *Cell. Mol. Life Sci.* **61**(18): 2309-2321.

Wegner, M. (1999) "From head to toes: the multiple facets of Sox proteins." *Nucleic Acids Res.* **27**(6): 1409-1420.

Wegner, M. (2005) "Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes." *Pigment Cell Res.* **18**(2): 74-85.

Werner, M. H., Huth, J. R., Gronenborn, A. M. y Clore, G. M. (1995) "Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex." *Cell* **81**(5): 705-714.

Wilson, M. y Koopman, P. (2002) "Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators." *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**(4): 441-446.

Wissmuller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M. y Wegner, M. (2006) "The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors." *Nucleic Acids Res.* **34**(6): 1735-1744.

Wolf, M., Klug, J., Hackenberg, R., Gessler, M., Grzeschik, K. H., Beato, M. y Suske, G. (1992) "Human CC10, the homologue of rabbit uteroglobin: genomic cloning, chromosomal localization and expression in endometrial cell lines." *Hum. Mol. Genet.* **1**(6): 371-378.

Yoneda, Y. (2000) "Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function." *Genes Cells* **5**(10): 777-787.

Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, M. W. y Varmus, H. E. (1999) "Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin." *Mol. Cell* **4**(4): 487-498.

10 ANEXO: PUBLICACIONES

Esta memoria de Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente publicación:
“*The transcription factor SOX17 is involved in the transcriptional control of the uteroglobin gene in rabbit endometrium*” JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 102:665-679 (2007), del cual, a continuación, se incluye una copia.

The Transcription Factor SOX17 is Involved in the Transcriptional Control of the Uteroglobin Gene in Rabbit Endometrium

Carlos Garcia,¹ Enrique Calvo,² and Antonio Nieto^{1*}

¹Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

²Unidad de Proteómica, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), 28029 Madrid, Spain

Abstract The transcription of the uteroglobin gene (*ug*) is induced by progesterone in the rabbit endometrium, primarily through the binding of the progesterone receptor to the distal region of the *ug* promoter. However, other transcription factors participate in the progesterone action. The proximal *ug* promoter contains several putative consensus sequences for the binding of various progesterone-dependent endometrial nuclear factors (Perez Martinez et al. [1996] Arch Biochem Biophys 333: 12–18), suggesting that several transcription factors might be implicated in the hormonal induction of *ug*. We report here that one of these progesterone-dependent factors specifically binds to the sequence CACAATG (–183/–177) of the rabbit *ug* promoter. This sequence (hereafter called element G') is very similar to the consensus sequence for binding of the SOX family of transcription factors. Mutation of the element G' reduced transcription from the *ug* promoter in transient expression experiments. The endometrial factor was purified and analyzed by nano-liquid chromatography and ion trap coupled mass spectrometry yielding two partial amino acid sequences corresponding to a region of SOX17 that is highly conserved inter-species. This identification was confirmed by immunological techniques using a specific anti-SOX17 antibody. In agreement with the above findings, overexpression of SOX17 in transfected endometrial cells increased transcription from the *ug* promoter. SOX17 gradually accumulated in the nucleus in vivo concomitant with the induction of *ug* expression by progesterone in the endometrium. Thus, these findings implicate, for the first time, SOX17 in the transcriptional control of rabbit *ug*. J. Cell. Biochem. 102: 665–679, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Uteroglobin; uterus; transcription; progesterone; mass spectrometry; SOX17

This article contains Supplementary Material available at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1545-5009/suppmat>.

Abbreviations used: SR, steroid receptor; HRE, hormone response element; UG, uteroglobin; HMG, high mobility group; EMSA, electromobility shift assay; TBE, Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium; ABC, ammonium bicarbonate; MSDB, Mass Spectrometry DataBase; HCG, human choriogonadotropin; NLS, nuclear localization signal; NES, nuclear export signal.

Grant sponsor: Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT), Spain.; Grant sponsor: Fundación Ramon Areces, Spain.

*Correspondence to: Dr. Antonio Nieto, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM). Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.
E-mail: anieto@cbm.uam.es

Received 8 September 2006; Accepted 7 February 2007

DOI 10.1002/jcb.21324

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

The molecular mechanism of gene regulation by steroid hormones has been studied for several decades as one of the main paradigms of cellular differentiation. Thus, steroid hormones produce in many cases deep modifications in the expression of some specific genes, making these experimental systems relatively simple models for the study of cellular differentiation. As is well known, the basic molecular mechanism of gene regulation by steroid hormones [Beato and Klug, 2000] relies on the interaction of these hormones with specific protein receptors (the steroid receptors, or SRs) which, upon binding of the hormone, become activated and interact with short palindromic DNA sequences of 13–15 bp called hormone response elements (HREs). The HREs are often located within the promoter of steroid-regulated genes at variable distances from the

transcriptional start site. Binding of the activated SRs to the HREs leads to a still partially known mechanism that seems to involve the interaction of bound SRs with components of the transcriptional machinery including other transcription factors and co-activators/co-repressors possessing histone acetylase/deacetylase activities, respectively [Lonard and O'Malley, 2005]. These events appear to result in local alterations of the chromatin structure [Beato and Klug, 2000; Hebbar and Archer, 2003] and, in turn, in the regulation of the transcription of the target genes.

The uteroglobin gene (*ug*) codes for a small secretory protein first discovered in the uterine secretions of the early pregnant rabbits [Krishnan and Daniel, 1967; Beier, 1968]. Uteroglobin (UG) was later characterized in other mammalian species [Miele et al., 1994; Macias et al., 2004] and other names (CCSP or CC10 protein) were then coined for the protein. A recent meeting on related proteins established that UG belongs to the so-called secretoglobin family and the name Secretoglobin 1A1 (SCGB1A1) was accepted for the protein [Klug et al., 2000]. However, the trivial (and most commonly known) name will be retained in this work.

UG and its gene have received considerable attention since the synthesis of the protein is regulated by several steroid hormones in different tissues. Thus, UG is induced by estrogens in the oviduct [Kay and Feigelson, 1972], by androgens in the epididymis [Lopez de Haro et al., 1988], by glucocorticoids in the lung [Fernandez-Renau et al., 1984], and by progesterone in the endometrium [see Miele et al. (1994) for review]. Particularly, the progesterone-induced transcription of *ug* in the endometrium has been a subject of great interest since it appears to be a good model for the molecular mechanisms of action of progesterone in mammals. The hormonal induction of *ug* in the endometrium occurs progressively during early pregnancy (or after progesterone-induced pseudopregnancy) reaching a maximum at day 5 [Krishnan and Daniel, 1967; Nieto and Beato, 1980]. The action of progesterone appears to be mediated through a region of the *ug* promoter, far from the transcriptional start site (about 2.7–2.3 kb), and that contains progesterone/glucocorticoid response elements. This region binds the progesterone receptor in vitro [Bailly et al., 1986] and seems to be functional in vivo as judged by both transient expression experi-

ments in transfected cells [Scholz et al., 1999] and expression in transgenic mice [Gomez Lahoz et al., 1992].

Although the sole presence of a HRE appears to be sufficient to confer hormonal regulation to minimal promoters [Strahle et al., 1987], the involvement of different transcription factors in the gene regulation by steroid hormones is a well-known fact [Schule et al., 1988]. The promoters of the steroid-regulated genes usually contain consensus sequences for the binding of different transcription factors that can help to modulate (or even be indispensable for) the action of the steroid receptor [Lucas and Granner, 1992; Beato and Klug, 2000]. In the case of *ug*, some transcription factors have been shown to be implicated in both its basal transcription and its progesterone-mediated regulation in the rabbit endometrium. These transcription factors include YY1 [Klug and Beato, 1996], members of the Sp family [Dennig et al., 1995; Scholz et al., 1998], NF-Y [Scholz et al., 1999], and RUSH/SMARCA3 [Hayward-Lester et al., 1996]. Other studies, using deletions or mutations of the promoter as well as in vitro analysis of DNAase protection [Misseayanni et al., 1991; Suske et al., 1992] suggested that other not yet identified transcription factors might be implicated in the progesterone-regulated transcription of rabbit *ug* in the endometrium.

Among the numerous transcription factors described so far, the SOX family is a recently characterized group of structurally related proteins which play essential roles in different processes of cellular differentiation. The SOX proteins form a family of more than 20 transcription factors all of them containing a well conserved HMG box through which they bind to DNA. This HMG domain is very similar to that found in the first characterized member of the family, that is, Sry (for sex-determining region of the Y chromosome) [Wegner, 1999]. The HMG box of the different SOX proteins binds to the same consensus sequence 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' through the minor groove of the DNA [Wegner, 1999].

The SOX proteins have been classified into nine subgroups, on the basis of both the homology between the HMG boxes and the presence of different motifs outside this domain [Wegner, 1999; Bowles et al., 2000]. The subgroup F consists of three related proteins called SOX7, SOX17, and SOX18. SOX17 seems

to act as an early inducer of the endodermal tissue [Hudson et al., 1997] and it may also be involved in the pre-meiotic stage of spermatogenesis [Kanai et al., 1996]. Other members of the family are implicated in several processes of cellular differentiation [Bowles et al., 2000]. Thus, the SOX transcription factors appear to be implicated in broad aspects of the development and might also be important for the regulation of a variety of genes activated during the processes of cellular differentiation.

We have previously described footprinting experiments indicating that several progesterone-dependent endometrial nuclear factors bound in vitro to a 404 bp fragment of the rabbit *ug* promoter [Perez Martinez et al., 1996]. In the present study, we have focused on one of those footprints (footprint or element G'). We show here that the element G' participates in the transcriptional control of rabbit *ug* and that its sequence is recognized by a member of the SOX family of transcription factors, namely SOX17. Thus, SOX17 seems to be a transcription factor implicated in the hormonal induction of rabbit *ug*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

New Zealand female rabbits (8–12 months-old) were made pseudopregnant by daily intramuscular injections of progesterone as described previously [Nieto and Beato, 1980]. In some experiments, pseudopregnancy was induced by an intravenous injection of human chorionic gonadotrophin (HCG) (Farma-Lepori, Spain) (50 i.u.). Animals were housed and handled according to the guideline 86/609 for animal research, approved by The European Community Council to fulfill the ethical conditions of animal experimentation.

Preparation of Nuclear Extracts

Uteri were surgically removed, placed on an ice-cooled glass plate and opened longitudinally. The endometrium was obtained by scraping with a micro slide. The endometrial tissue was homogenized in 5 vol. of buffer H [Perez Martinez et al., 1996] containing 50 μ M sodium orthovanadate. The homogenate was filtered through four layers of cheese-cloth and centrifuged at 3,000 \times g for 10 min. The pellet of the 3,000 \times g centrifugation (crude nuclei) was resuspended in 1.9 M sucrose in buffer H and

processed for obtention of purified nuclei and nuclear extracts as described previously [Perez Martinez et al., 1996]. All the above steps were carried out at 0–4°C. Purity of the nuclei was preliminarily assessed by phase contrast microscopy. As an additional control, the purified nuclei were shown to be completely free of cytoplasmic contamination as judged by the total absence of the cytoplasmic marker α -tubulin in Western blot analysis of nuclear extracts.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

A synthetic oligonucleotide (Isogen Biosciences, Maarssen, Holland) (oligo G'wt), containing the sequence of the element G' and flanking sequences (–192/–169) of the rabbit *ug* promoter (see Fig. 1B), was labeled at the 5' end with [γ -³²P] ATP (GE Healthcare, UK) and polynucleotide kinase (Roche Applied Science, Spain) [Sambrook et al., 1989]. The labeled oligonucleotide was annealed to its complementary synthetic strand and purified by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. For the EMSA, the nuclear extracts (5 μ g of protein) were pre-incubated for 10 min at 4°C with 1–2 μ g of poly(dG-dC) (Roche Applied Science) in a final volume of 15–20 μ l of buffer F [Perez Martinez et al., 1996] containing 2% (w/v) CHAPS and 2mg/ml of BSA. After pre-incubation, the labeled oligonucleotide was added either alone or together with the unlabeled competitor oligonucleotides (25-fold in molar excess) and the binding reaction was allowed to proceed for 20 min at 25°C. The samples were analyzed by electrophoresis in 4% or 6% polyacrylamide gels in 0.5 \times TBE buffer. Gels were dried and autoradiographed at –70°C with intensifying screens. When working with purified proteins, the unspecific competitor poly(dG-dC) was either omitted or its amount lowered to 0.1 μ g. For the super-shift mobility assays, the antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA) were added at the pre-incubation step at concentrations ranging from 0.05 to 0.2 mg/ml.

Purification of Proteins that Bound to the Element G'

Endometrial nuclear extracts from 5-day pseudopregnant rabbits were precipitated for 1 h at 0°C with ammonium sulfate at a final concentration of 50%. This step precipitated about 70% of the proteins including most of

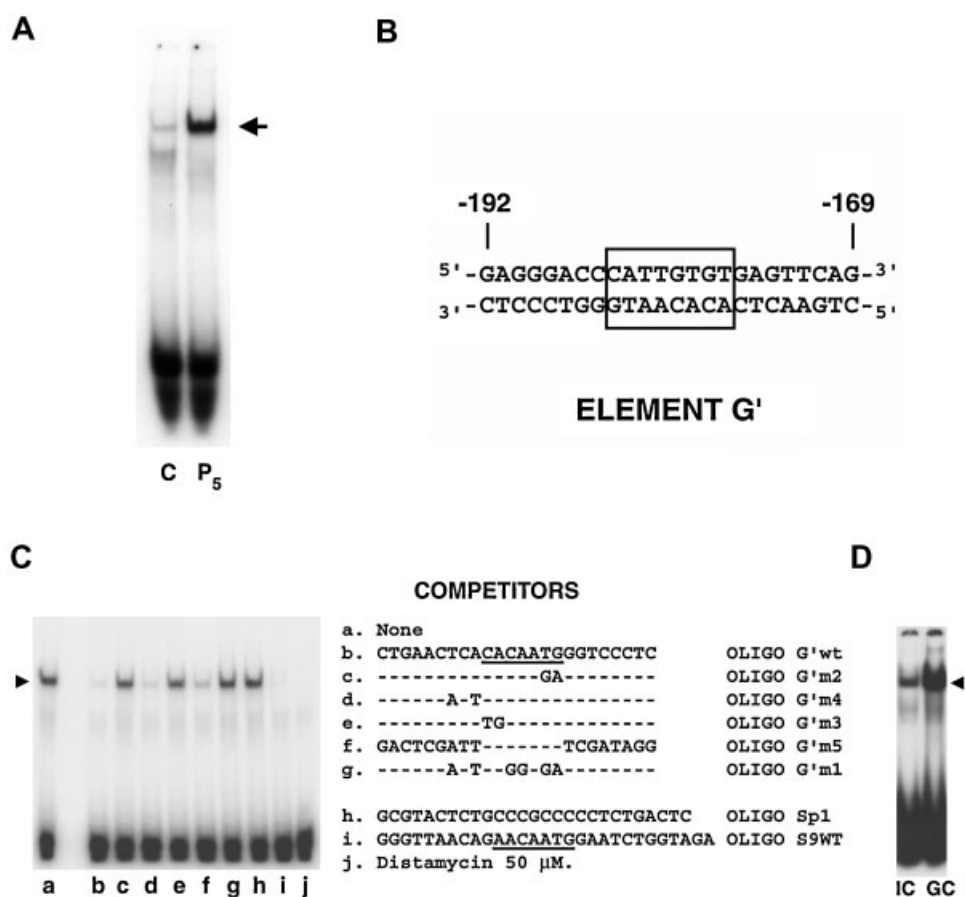


Fig. 1. A progesterone-dependent endometrial nuclear factor binds to a sequence of the rabbit *ug* promoter (element G') that is similar to the consensus binding sequence for the SOX transcription factors. **A:** EMSA of rabbit endometrial nuclear extracts from either control animals (C) or rabbits treated with progesterone for 5 days (P₅). The arrow points to the retarded band increased by the progesterone treatment. **B:** nucleotide sequence of the oligonucleotide G'wt used as the radioactive probe. The sequence corresponds to a region of the rabbit *ug* promoter numbered from the transcription start site. The element G' is boxed. Note that the sequence 5'-ACACAATG-3' is in the lower strand. **C:** competitive EMSA experiments using the oligo G'wt labeled probe and endometrial nuclear extracts from

rabbits treated for 5 days with progesterone. The arrowhead points to the shifted band. The unlabeled competitors used in each lane are indicated on the right. Dashed lines indicate nucleotide sequences identical to the G'wt probe whereas the mutated bases are indicated by their corresponding letters. The oligonucleotide Sp1, containing a consensus-binding motif for the Sp1 transcription factor, was used as an unspecific competitor. The oligo S9WT contained a perfect consensus sequence for the binding of the SOX9 transcription factor. The sequences for the binding of the SOX family of proteins are underlined. **D:** comparison of the effects of the unspecific competitors poly(dI-dC) and poly(dG-dC) on the binding of the endometrial nuclear factor to the labeled G'wt probe.

those binding to the element G'. The pellet of this precipitation was resuspended in buffer F and a 10th volume of 10× sample buffer [Laemmli, 1970] was added. After incubation for 10 min at 37°C [Ossipow et al., 1993] the samples were loaded and run in 8% polyacrylamide slab gels [Laemmli, 1970] with pre-stained molecular mass markers in adjacent lanes. After electrophoresis the gels were cut into fractions which were each extracted for 3 h at 37°C in 10 vol of buffer E (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1 M NaCl, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 μg/ml of each aprotinin and leupeptin, 50 μM sodium

orthovanadate, and 10% (v/v) glycerol). The protein of the extracts were concentrated and equilibrated in buffer F by three successive centrifugations in Ultrafree-MC microfilters (Millipore) with the addition of buffer F before each centrifugation. The extracts were assayed by EMSA to identify the gel fraction(s) containing the binding activity to the element G'. As estimated by EMSA, recovery of binding activity at this step was about 60–70% of the activity initially applied to the gel.

The extracts containing binding activity were applied to a column containing concatemers of the oligonucleotide G'wt covalently linked to an

agarose matrix [Kadonaga and Tjian, 1986] and equilibrated in buffer F. The sample was allowed to interact with the immobilized oligonucleotide during 3 h at 4°C. The column was then washed with 10 vol of buffer F and the bound proteins were eluted with this buffer containing 0.5 M NaCl. The eluted material was subjected to SDS-PAGE and protein bands were stained with a silver-staining method (PlusOne Silver Staining Kit, GE Healthcare, Amersham Biosciences).

Plasmid Constructions, Cell Culture and Assays of Promoter Activity

The construct pUG400/luc-wt, derived from pGL3-Enhancer/luc plasmid, and bearing the luciferase reporter gene under the control of a 404 bp fragment of the rabbit *ug* promoter, has been described previously [Garcia and Nieto, 1999]. This construct served as template for site-directed mutagenesis of the element G' sequence. Mutagenesis was performed using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). The primers used to construct pUG400/luc-m1 were: 5'-CCCGAG-GGACCTCTCCTGAGTGTTTCAGTTTCAATA-GG-3' and 5'-CCTATTGAAACTGAACACTCAGGAGAGGTCCCTCGGG-3'. Primers for the construct pUG400/luc-m4 were: 5'-GAGG-GACCCATTGTGAGTGTTTCAG-3' and 5'-CTGAACACTCACAATGGGTCCCTC-3'. Underlined bases denote changes with respect to the sequence of the element G'. The mutated sequences were identical to that present in the synthetic oligonucleotides G'm1 and G'm4 described in the Fig. 1C. The mutations were confirmed by automatic DNA sequencing. Plasmid pHRE-UG79/luc was prepared in our laboratory by Dr. K. Solorzano (to be published elsewhere). It contained the region from the rabbit *ug* promoter bearing the HREs for progesterone (-2777/-2587) immediately upstream of a minimal rabbit *ug* promoter (-79/+8). These elements were also inserted in the pGL3-Enhancer/luc plasmid.

The HEC-1A endometrial cell line (ATCC, Rockville, MD) was grown in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal calf serum. For assays of promoter activity, cells were plated on P35 dishes at half of maximal density and then transfected with 1 µg of the plasmids using Lipofectamins (Invitrogen Life Technologies, Spain) and following the protocol suggested by the supplier.

Parallel dishes were transfected with the promoterless pGL3-Enhancer plasmid (Promega, Madison, WI), to serve as control of background activity. In assays designed to observe the effect of SOX17 on the activity of the *ug* promoter, cells were co-transfected with the expression vector pCMV-Tag2B/SOX17 [Murakami et al., 2004]. Parallel dishes were co-transfected with the pCMV-Tag2B plasmid (Stratagene) to observe the background activity. In all cases, the cells were co-transfected with 0.5 µg of the pSVβGal plasmid (Promega) to correct for differences in transfection efficiency. After 48–72 h of transfection, cells were lysed and the luciferase and β-galactosidase activities were determined as described previously [Sagal and Nieto, 1998].

In-Gel Tryptic Digestion of Monodimensional SDS-PAGE Gel Bands

Protein bands were excised from the gel and incubated for several minutes in ultra-pure water and digested as described previously [Schevchenko et al., 1996] with some minor variations. Gel pieces were equilibrated in 50 mM ammonium bicarbonate (ABC) prior to reduction with 10 mM DTT and alkylation with 0.1 M iodoacetamide, both in 50 mM ABC. Modified porcine trypsin (sequencing grade, Promega) was added to dried bands at a final concentration of 0.4 µg per reaction in 50 mM ABC and the digestion was allowed to proceed at 37 °C overnight. Finally, tryptic peptides were extracted with 0.5% trifluoroacetic acid. The total digestion solution was vacuum-dried and re-dissolved in 20 µl of a solution containing 5% acetonitrile and 0.5% acetic acid in water.

Nano-Liquid Chromatography and Ion-Trap Tandem Mass Spectrometric Analysis of Tryptic Peptide

The tryptic peptides were online injected onto a C-18 reversed-phase nano-column (Discovery® BIO Wide pore, Supelco, Bellefonte, PA) and analyzed in a continuous acetonitrile gradient consisting of 0–50% B in 45 min, 50–90% B in 1 min. (B: 95% acetonitrile, 0.5% acetic acid). A flow rate of ca. 300 nl/min was used to elute peptides from the reversed-phase nano-column to a PicoTip™ emitter nano-spray needle (New Objective, Woburn, MA) for real-time ionization and peptide fragmentation on an Esquire HCT ion-trap (Bruker-Daltoniks, Bremen, Germany) mass spectrometer. Every 1 s, the instrument

cycled through acquisition of a full-scan mass spectrum and one MS/MS spectrum. A 3 Da window (precursor $m/z \pm 1.5$), an MS/MS fragmentation amplitude of 0.90 V and a dynamic exclusion time of 0.30 min were used for peptide fragmentation. Nano-liquid chromatography was automatically performed on an advanced nano-gradient generator (Ultimate nano-HPLC, LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an autosampler (Famos, LC Packings). The software Hystar 2.3 was used to control the whole analytical process.

Database Analysis

MS/MS spectra were batch-processed by using DataAnalysis 5.1 SR1 and BioTools 2.0 software packages and searched against the MSDB protein database using Mascot software (Matrix Science, London, UK).

UG and UG-mRNA Determinations

The amount of UG in the uterine luminal secretion was determined by a specific radioimmunoassay [Nieto and Beato, 1980]. The relative amount of UG mRNA in the endometrium was evaluated by a quantitative dot-blot hybridization method, as described previously [Fernandez-Renau et al., 1984].

RESULTS

A Progesterone-Dependent Endometrial Nuclear Factor Binds to a Sequence (Element G') of the Rabbit *ug* Promoter

Previous studies from our laboratory indicated that nuclear factors from the endometrium of rabbits treated for 5 days with progesterone (i.e., pseudopregnant) bound several specific sequences along a 400 bp proximal fragment of the *ug* promoter, as judged by in vitro footprinting analysis [Perez Martinez et al., 1996]. One of these prominent footprints occurred over a short sequence of eight nucleotides (ACACAATG, -176/-183) located in the lower strand of the DNA and hereafter called element G' [see Perez Martinez et al. (1996) and Fig. 1B]. To further characterize the binding of the nuclear factor to this element, we performed EMSA experiments using a [³²P]-synthetic oligonucleotide probe and nuclear extracts from either controls or progesterone-stimulated rabbit endometrium. The probe contained the element G' as well as 5' and 3' flanking sequences from the *ug* promoter. The results

of these experiments indicated that a nuclear factor from control rabbit endometrium bound the probe, producing a faint retarded band (Fig. 1A, lane C, arrow). This band reached a great intensity with nuclear extracts from animals stimulated for 5 days with the hormone (lane P₅), a time around which the transcription of *ug* in vivo has been described to reach maximum levels [Kumar et al., 1982; Miele et al., 1994]. Similar results were obtained using endometrial nuclear extracts from rabbits made pseudopregnant by treatment with HCG as described in Materials and Methods (not shown).

Thus, we concluded that the rabbit endometrium contained a nuclear factor that bound to the element G' and whose amount (or binding activity) was increased by progesterone, either exogenously administered or endogenously produced by animals treated with HCG.

The Element G' Contains a Putative Consensus Binding Sequence for the SOX Transcription Factors Family

To further identify the sequence responsible for the binding of the nuclear factor as well as to sustain the specificity of the binding, oligonucleotides containing mutations, either in the core or in the flanking sequences of the element G', were tested as competitors for the binding activity in EMSA experiments.

As shown in Fig. 1C, lane g, extensive mutations in the core sequence (oligo G'm1) completely destroyed the ability to compete for the binding to the natural sequence of the probe. Two point mutations either on the right or the left sides of the core sequence (oligos G'm2 and G'm3, respectively) led to a considerable or complete loss of competition. The single mutation of the first nucleotide of element G' (oligo G'm4) did not affect the ability to compete for binding to the nuclear factor. Moreover, complete changes in the sequences of the 5' and 3' flanking regions did not at all affected the binding of the nuclear factor (oligo G'm5, lane f). On the other hand, an oligonucleotide of non-related sequence (oligo Sp1, lane h) was unable to compete for binding to the nuclear factor. Thus, these experiments indicated that the sequence CACAATG, encompassing the footprint G', was necessary for binding to the nuclear factor. A computer-based comparison of this sequence with those already described for the binding of different transcription factors,

indicated that it was very similar to the consensus sequence (A/T)(A/T)CAA(A/T)G, described for the SOX family of transcription factors [Pevny and Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999] and identical to one described for the binding of SOX17 [Kanai et al., 1996]. Indeed, the oligonucleotide S9WT (containing a perfect consensus sequence for the binding of the SOX family) was an excellent competitor (Fig. 1C, lane i).

Taking into account this first indication, we performed experiments that supported the idea that the endometrial nuclear factor might be a member of the SOX family. Thus, it is known that some polynucleotides (used as general competitors to reduce background) can differentially enhance the shifts produced by different transcription factors in EMSA experiments [Lee and Schwartz, 1992]. In the case of the SOX family, it has been described that the use of the competitor poly(dG-dC) is better than the generally used poly(dI-dC) for revealing the shifts produced by these transcription factors in EMSA experiments [Dailey et al., 1994]. In agreement with this observation, Figure 1D shows that the shift generated by the endometrial nuclear factor was considerably enhanced when poly(dG-dC), instead of poly(dI-dC), was used as unspecific competitor.

Furthermore, most of the transcription factors characterized so far appear to bind to the major groove of DNA. In contrast, the SOX proteins contain a conserved HMG-like domain through which they bind to the minor groove of DNA [Wegner, 1999]. Dystamicin, a drug that binds to the minor groove, competitively inhibits the interaction of DNA with proteins that attach to this groove. Therefore, we tested the effect of distamycin on the *in vitro* binding of the endometrial factor to the oligonucleotide probe. As shown in Figure 1C, lane j, the drug completely inhibited this binding, suggesting that the factor bound to the minor groove of the DNA.

In summary, the above results collectively suggested that the endometrial nuclear factor might belong to the SOX family of transcription factors.

The Element G' is Implicated in the Transcription of the Rabbit *ug*

Since the element G' seemed to bind a nuclear factor that, like the UG gene, was induced by progesterone, we wondered whether this element might be involved in the transcriptional

regulation of *ug*. To investigate this point, we performed transient expression experiments with genetic constructs transfected in HEC-1A cells. In these experiments, we compared three constructs bearing the 400 bp fragment of the *ug* promoter either with its intact sequence (i.e., with the intact element G') or with mutated versions of this element. These promoters controlled the transcription of the luciferase reporter gene. The results of these experiments (Fig. 2) indicated that a mutation of the element G' (pUG400/luc-m1) that abolished the binding of the nuclear factor (see Fig. 1C), decreased the transcriptional activity of the *ug* promoter to about half of that observed using the wild type promoter bearing the intact element G'. As expected, the construct pUG400/luc-m4 (bearing a mutation that did not affect the binding of the factor, see Fig. 1C) conserved the same

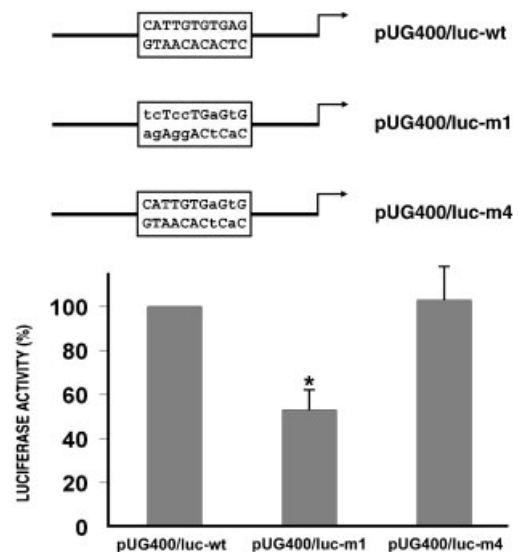


Fig. 2. The element G' is involved in the transcriptional activity of the *ug* promoter. Endometrial HEC-1A cells cultured *in vitro* were transfected with the three constructs shown in the upper part of the figure. The plasmid pUG400/luc-wt bore a 404 bp proximal fragment of the *ug* promoter containing the natural sequence of the element G' (boxed). This promoter drove the transcription of the luciferase reporter gene. The arrow indicates the transcription initiation point. The plasmids pUG400/luc-m1 and pUG400/luc-m4 were identical to the aforementioned but contained mutated versions of the element G' (mutated bases are shown in lower case). These mutated sequences were similar to those of the oligonucleotides G'm1 and G'm4 (see Fig. 1C). Following transient expression, the luciferase activity was measured and expressed as percentage respect to the pUG400/luc-wt. The vertical bar indicates the standard deviation (SD) from the mean obtained from five different experiments each made in duplicate. *, significantly different from pUG400/luc-wt ($P < 0.01$).

activity as that observed for the wild type promoter.

The above experiments indicated that the element G' bound a progesterone-dependent endometrial nuclear factor and that changes in the sequence of this element, that abolished the binding of the factor, concomitantly led to a decreased transcriptional activity of the *ug* promoter.

Thus, the element G' appeared to act as a positive regulator of the transcription from the *ug* promoter.

Purification of the Endometrial Nuclear Factor

To identify the endometrial factor, it was purified by ammonium sulfate fractionation of nuclear extracts followed by semi-preparative SDS-PAGE and DNA sequence-recognition affinity chromatography (see "Materials and Methods" section). Fractionation with ammonium sulfate yielded a very heterogeneous precipitate, as judged by SDS-PAGE (Fig. 3A, lane 1), which contained most of the binding activity and about 70% of the initial protein content (data not shown). The precipitated material was analyzed by SDS-PAGE and the gels were cut into fractions which were extracted (see "Materials and Methods" section) for EMSA analysis of the binding activity. These analyses indicated that the activity was recovered from a zone of the gels corresponding to proteins with molecular mass between 50 and 65 kDa (not shown). Based on these findings, the ammonium sulfate precipitate was subjected to semi-preparative SDS-PAGE and the gel zone containing the binding activity was cut out and extracted as described above. The extracted material contained about 50% of the initial binding activity and several protein bands (Fig. 3A, lane 2). The extract was applied to a column containing the oligonucleotide G'wt immobilized on a Sepharose matrix. The flow-through of the column contained most of the initially applied proteins (Fig. 3A, lane 3) but only small amounts of binding activity (Fig. 3B, lane 2) whereas the high-salt eluate contained almost all of the recovered binding activity (Fig. 3B, lane 3) and was enriched in several proteins, including two closely migrating bands with molecular mass of 58 and 56 kDa, respectively. These two bands, barely observed in the material before affinity chromatography, were named S1 and S2 (Fig. 3A, lane 4). A portion of the high-salt eluate was run in a parallel lane

which was fractionated for determination of binding activity by the EMSA technique. These determinations indicated that the binding activity was associated with bands S1 and S2 whereas other bands did not contain activity (not shown).

The Endometrial Nuclear Factor is the Transcription Factor SOX17

In order to identify the purified nuclear factor(s), we used ion-trap tandem mass spectrometry analysis. The bands S1 and S2, obtained by SDS-PAGE, were individually excised and in-gel digested with trypsin. The resulting tryptic peptides were analyzed by reversed-phase nanoliquid chromatography that was online coupled to an ion-trap mass spectrometer for ion fragmentation and protein identification.

Several proteins were identified within each band, including two heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (K and L), and the HMG-box transcription factor SOX17. MS/MS spectra from triply charged ion at m/z 599.8 Da and doubly charged ion at m/z 566.7 Da, corresponding, respectively, to sequences LAQQNPDLH-NAELSK and RPFVVEEAER, were used to unambiguously identify the HMG-Box transcription factor SOX17 (see Supplementary material: Figs. S1A and S1B). Both ions had exactly the same chromatographic properties in the two bands (S1 and S2) and in two independent experiments (Fig. S1C).

Since the mass spectrometry analysis indicated that the endometrial factor was SOX17, we further supported this finding by immunochemical techniques such as detection of the factor by Western blot analysis and super-shift assays in EMSA experiments. Western blot analysis of the purification steps (see above) showed that crude endometrial nuclear extracts from progesterone-treated rabbits contained two protein bands that reacted with the antibody against SOX17 (Fig. 3C, lane 2). These immunoreactive bands had electrophoretic mobilities (i.e., apparent molecular mass) identical to those observed for the bands S1 and S2 obtained in the affinity-purified material. The two-immunoreactive bands were scarcely detectable in endometrial nuclear extracts from control rabbits (Fig. 3C, lane 1) in agreement with the determinations made by EMSA experiments (see Fig. 1). The flowthrough of the affinity column did not contain appreciable

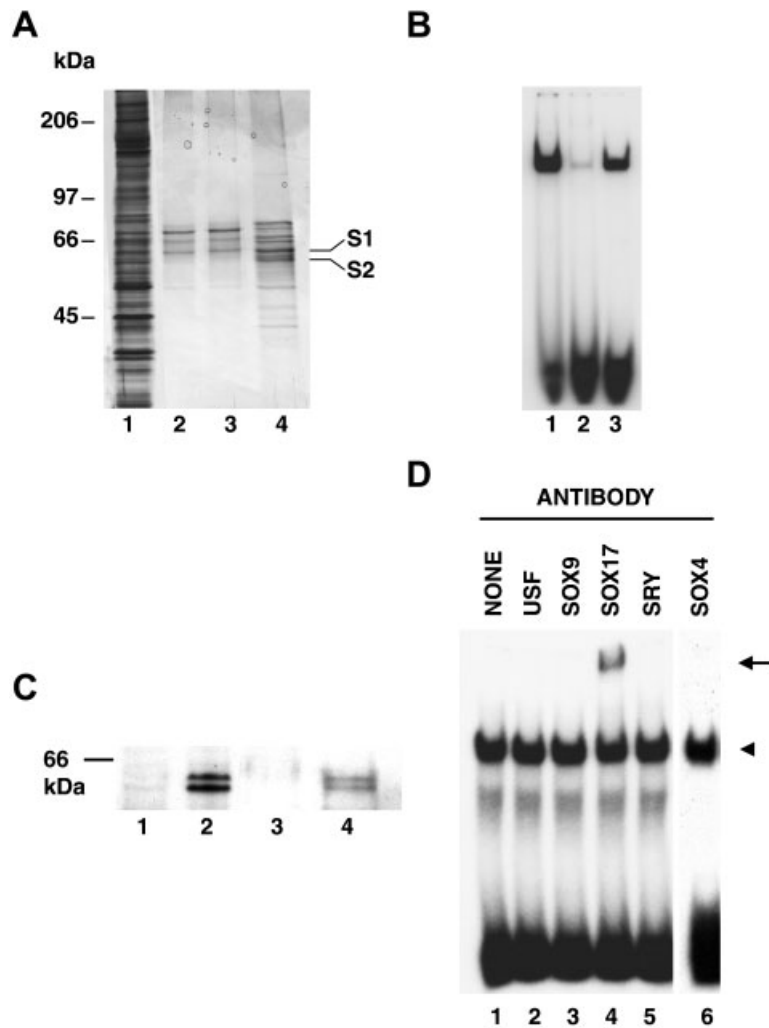


Fig. 3. Purification of the progesterone-dependent nuclear factor from rabbit endometrium and its identification as SOX17 by immunological techniques. **A:** silver-stained SDS-PAGE of the materials from the purification steps. **Lane 1:** starting material (ammonium sulfate precipitate of nuclear extracts); **lane 2:** proteins extracted from the selected zone of a semi-preparative SDS-PAGE of the starting material; **lane 3:** material from the flowthrough of the oligonucleotide-affinity chromatography; **lane 4:** proteins from the high-salt eluate of this chromatography. **S1** and **S2** denote the protein bands with binding activity as analyzed by EMSA. Note that this lane contained material corresponding to about 100-times to that applied to lanes 2 and 3. **B:** EMSA of the materials obtained in the purification steps. **Lane 1:** material from the semi-preparative SDS-PAGE (corresponding to lane 2 in **A**); **lanes 2** and **3:** materials from the flowthrough and eluate of the affinity chromatography, respectively (corresponding to lanes 3 and 4 in **A**, respectively). **C:** Western blot analysis of

different rabbit endometrial materials. **Lanes 1** and **2** correspond to equivalent amounts of endometrial nuclear extract from control and 5 days pseudopregnant rabbits, respectively. **Lanes 3** and **4** correspond, respectively, to equivalent amounts of the flowthrough and the high-salt eluate from the affinity chromatography step. The position of the protein marker of known molecular mass is indicated to the left. Note that the two immunoreactive bands migrated at identical positions as the S1 and S2 bands in **A**. The anti-SOX17 used in the experiment was described to recognize both the human and the mouse proteins. **D:** EMSA of endometrial nuclear extracts from pseudopregnant rabbits pre-incubated with the antibodies indicated in each lane. The band generated by the progesterone-dependent endometrial factor was indicated by an arrowhead whereas the super-shifted band produced by the SOX17 antibody was indicated by an arrow.

immunoreactive bands whereas the purified material eluted from the column contained most of the immunoreactive bands (Fig. 3C, lanes 3 and 4, respectively). These results were also in agreement with those obtained by EMSA

determinations using the corresponding materials from the purification steps (see Fig. 3B). The observation of two SOX17-related immunoreactive bands will be commented in the Discussion.

We also performed super-shift assays with anti-SOX17 using the EMSA technique to assess whether the shifted band observed with this technique was generated by SOX17. As shown in the Fig. 3D (lane 4, arrow), anti-SOX17 produced a super-shifted band using either crude nuclear extracts or affinity-purified material. Furthermore, densitometric analysis of autoradiographies at different exposure times demonstrated that the radioactivity appearing in the super-shifted band exactly correlated with that disappearing in the band produced by the endometrial nuclear factor (data not shown). The specificity of the experiment was indicated by the fact that neither anti-SOX9 nor anti-SRY and anti-SOX4 (three other members of the SOX family) were unable to produce any super-shift (Fig. 3D, lanes 3, 5, and 6). Neither an unrelated antibody (anti-USF) was able to produce any change of the band generated by the endometrial factor (Fig. 3D, lane 2).

SOX17 Stimulates Transcription from the *ug* Promoter

All the above experiments indicated that the element G' of the *ug* promoter was recognized by SOX17 and that mutation of this element reduced the transcription of a reporter gene driven by the *ug* promoter. Therefore, it might be expected that overexpression of SOX17 in cells would lead to a stimulation of the transcription from this promoter. To test this hypothesis, we transfected uterine HEC-1A cells with the pUG400/luc-wt construct either alone or co-transfected with the expression vector pCMV-Tag-SOX17, coding for SOX17 [Murakami et al., 2004]. The void pGL3 plasmid was used as a control. The results of these experiments (Fig. 4A) showed that overexpression of SOX17 stimulated the transcription from the 400 bp *ug* promoter about two to threefold. More importantly, overexpression of SOX17 did not at all stimulate the transcription from the

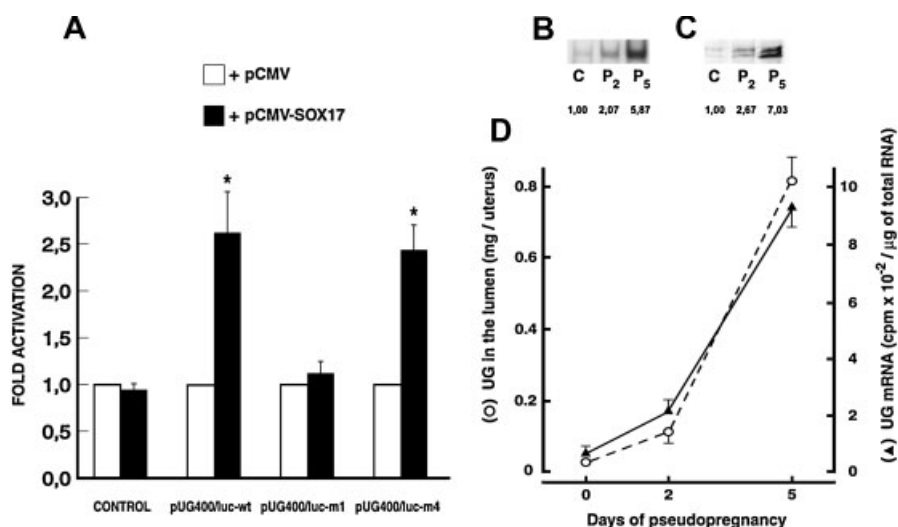


Fig. 4. SOX17 increases the transcription from the rabbit *ug* promoter. **A:** endometrial HEC-1A cells were co-transfected with the plasmids indicated below the histogram and with the expression vectors pCMV (void histogram) or pCMV-SOX17 (black histogram). The control plasmid was the promoterless pGL3 Enhancer/luc used to construct the pUG400/luc series. After 48 h, the cells were lysed and the luciferase activity was determined. This activity was expressed as fold activation of each construct (one for constructs co-transfected with the void expression plasmid pCMV). Vertical bars denote the SD. *, significantly different from its respective couple by Student's *t*-test, $P < 0.01$. The difference between the values for pUG400/luc-wt and pUG400/luc-m4 were not statistically significant. SOX17 increases in the nucleus of endometrial cells in parallel to the hormone-induced expression of the rabbit *ug*. **B:** EMSA determination of the SOX17 content in the nuclear extracts of rabbit endometrial cells at 0 (control, C), 2 (P₂), and 5 days (P₅) of

progesterone treatment. Equivalent amounts of each nuclear extract were used for the assay. The relative amounts of SOX17 (C = 1) were estimated from densitometric analysis of the band generated by SOX17 and shown below each lane. **C:** Western blot determination of SOX17 in nuclear extracts of endometrial cells along the progesterone treatment. The two isoforms of SOX17 were identified in electrophoretic blots with a specific antibody and their relative amounts (determined by densitometry of the autoradiographies) are shown below each corresponding lane as in B. **D:** time-course of the expression of *ug* in the endometrium of progesterone-treated (pseudopregnant) rabbits. The absolute amount of the protein UG secreted into the uterine lumen was measured by radioimmunoassay. The relative amount of UG mRNA was evaluated by dot-blot hybridization with a specific radioactive UG cDNA probe. Vertical bars denote the standard deviations from at least three different experiments.

pUG400/luc-m1 construct that was identical to the 400 bp *ug* promoter but whose element G' was mutated to a sequence that is not recognized by SOX17. Also, in accordance with the results described above, a mutation of the element G' (pUG400/luc-m4) that affected neither the binding of SOX17 nor the basal transcriptional activity (see Figs. 1C and 2) was stimulated at the same extent as the wild type pUG400/luc-wt.

Thus, these findings, together with others above-mentioned results, collectively indicated that SOX17 positively regulated the transcription from the *ug* promoter through binding to the DNA sequence of the element G'.

SOX17 Increases in the Nucleus Concomitantly with the Progesterone-Mediated Induction of *ug*

The results shown in Fig. 1 indicated that the levels of SOX17 in the endometrial nucleus strongly increased at day 5 of pseudopregnancy. However, they did not allow us to conclude whether this increment occurred quickly at an early time or gradually like the hormonal induction of *ug*.

To answer this question, we determined the levels of SOX17 in the nucleus of endometrial cells during the time-course of the hormonal induction of *ug*. SOX17 was measured both by EMSA and Western blot analysis. At the same time, we measured the uterine luminal amounts of UG as well as the levels of UG-mRNA, both of which have been shown to reflect the progesterone-induced transcription of *ug* [Kumar et al., 1982; Miele et al., 1994].

The results obtained by EMSA determinations (Fig. 4B) indicated that the concentration of SOX17 in the endometrial nucleus increased progressively during the pseudopregnancy. Densitometric analysis of the band generated by SOX17 showed that at day 2 of the progesterone treatment the nuclear concentration of SOX17 was increased twofold with respect to the untreated control and that at day 5 of pseudopregnancy this concentration reached about six times that found in the controls. Similar conclusions were obtained from Western blot analysis (Fig. 4C), which unequivocally demonstrated that the absolute amount of SOX17 increased in the nucleus and that the increased band observed in the EMSA was not a progesterone-induced "activation" of a pre-existing fixed amount of the protein. On the other hand, Fig. 4D shows the time-course of the

progesterone-induced accumulation of the protein UG in the uterine lumen as well as of that its mRNA in the endometrium. The concentration of UG in the uterine luminal secretion as well as the amount of UG-mRNA in the endometrial cells were very low in control animals (day 0) and then progressively increased during the progesterone treatment, reaching high levels at day 5. These results are in agreement with previously published observations [Nieto and Beato, 1980; Kumar et al., 1982; Miele et al., 1994].

In summary, these experiments indicated that the amount of SOX17 increased in the nucleus of the endometrium during the progesterone treatment and that the time-course of this increase correlated with that of the induction of *ug* by the hormone.

DISCUSSION

In this study, we describe for the first time the involvement of the transcription factor SOX17 in the transcriptional control of the rabbit UG gene. More importantly, this control by SOX17 appeared to be concomitant with the transcriptional induction of rabbit *ug* by progesterone, suggesting a role of SOX17 in the hormone-induced transcription of this gene. The rabbit *ug* promoter seems to be rather complex encompassing at least 2.7 kb upstream of the transcriptional initiation site. Within this promoter exist HREs for progesterone which appear to be functional both in cultured cells [Scholz et al., 1999] and in transgenic animals [Gomez Lahoz et al., 1992]. In addition to these HREs (essential for progesterone action), the *ug* promoter has been shown to be modulated by several transcription factors, including Sp1 [Dennig et al., 1995; Scholz et al., 1998], RUSH [Hayward-Lester et al., 1996], and YY1 [Klug and Beato, 1996]. The results of this study add SOX17 to the list of transcription factors that modulate *ug* expression, and strengthen the idea that the *ug* promoter is modulated by the combinatorial action of various transcription factors [Dennig et al., 1995]. This complex modulation might be necessary for the cell type-specific and hormone-regulated expression of *ug* observed in various tissues [Miele et al., 1994].

Experiments of in vitro footprinting suggested the involvement of numerous nuclear factors in the control of the *ug* promoter [Perez

Martinez et al., 1996]. Some of the footprints observed in those experiments were later confirmed to be produced by transcription factors actually regulating the transcription from the *ug* promoter [Klug and Beato, 1996; Garcia and Nieto, 1999], which strongly suggests that these footprints truly reflect the binding of different transcription factors rather than being merely artefactual findings. One of these progesterone-dependent footprints, called footprint G' (or element G') was shown in this study to be important for the transcription of rabbit *ug*. Experiments of EMSA further demonstrated that a nuclear factor, strongly induced by progesterone in the rabbit endometrium, specifically bound to the element G'. Purification and characterization of the nuclear factor binding to the element G' demonstrated that it was SOX17. In agreement with the identification of SOX17 as the factor that bound the element G', overexpression of SOX17 in co-transfection experiments demonstrated that it stimulated the transcription from the intact *ug* promoter but not from the same promoter with a mutated element G' (Fig. 4A). As mentioned above, mutation of this element reduced the transcription for the *ug* promoter to half of the normal activity. On the other hand, overexpression of SOX17 stimulated transcription about 2.5-fold. These latter results would suggest that the element G' is a positive, but not indispensable, helper of the transcriptional control of rabbit *ug*.

Mass spectrometry (Fig. S1) as well as immunoblot analysis (Fig. 3C) demonstrated that rabbit SOX17 exists in the endometrium as two isoforms of close but different molecular mass, an observation that has also been described for the mouse SOX17 [Kanai et al., 1996]. The mouse isoforms seem to be produced by the translation starting from different methionines within the open reading frame of the mRNA [Kanai et al., 1996]. It remains to be established whether the two rabbit isoforms are produced by a similar mechanism.

Our results suggest that the effect of SOX17 on the transcription from the *ug* promoter occurs after the increment of this factor in the nucleus of the endometrial cells. There, SOX17 would bind to the element G' to co-operate in the activation of transcription of *ug*. Expression of *ug* in the rabbit endometrium is transient both during the physiological and the progesterone-induced pseudopregnancy. Thus, *ug* is progres-

sively activated in these conditions, reaching maximum levels of expression around day 5, and then progressively declining so that at day 10 its expression is minimal again [Kumar et al., 1982; Miele et al., 1994]. The apparent correlation between the increase of SOX17 in the nucleus and the activation of rabbit *ug* in the endometrium was further strengthened by the fact that at day 10 of progesterone treatment the nuclear amount of SOX17 was also minimal again (data not shown).

Regarding the mechanism(s) of the increase of SOX17 in the endometrial nucleus, two possibilities appear the most likely: (a) it might be a simple consequence of an increased intracellular concentration of the protein due to a progesterone-stimulated de novo synthesis of SOX17; (b) a pre-existing cytoplasmic pool of SOX17 translocates into the nucleus upon stimulation by progesterone. Experiments from our laboratory suggest that both possibilities occur in fact. The progesterone treatment certainly gradually increased the total intracellular amount of endometrial SOX17 but, at the same time, a specific and gradual translocation of the protein from the cytoplasm to the nucleus also occurs (our unpublished results). The traffic of proteins between the cytoplasm and the nucleus is mainly mediated by short amino acid sequences called nuclear localization signals (NLS) and nuclear export signals (NES) that regulate the shuttling of these proteins between both cellular compartments. Both signals have been characterized in SOX9, SOX10, and SRY [reviewed in [Smith and Koopman, 2004] and appear to be conserved in other members of the SOX family, including SOX17 [Argentaro et al., 2003]. Thus, SOX17 is most likely able to translocate to the nucleus after a specific stimulus.

It is worth to mention the slow rate of appearance of SOX17 in the nucleus of rabbit endometrial cells. We observed a gradual increase of SOX17 along a period of 5 days, while the time of appearance in the nucleus (translocation) of many transcription factors, after being activated by a specific stimulus, is usually within the range of minutes or a few hours. However, there are also examples of nuclear translocation needing times of the same order as that observed for SOX17 in the endometrial cells under the stimulus of progesterone. One of these examples is the involvement of SOX9 in the developing mammalian

gonad, where translocation of SOX9 occurs progressively over several days [Morais da Silva et al., 1996; Barbara et al., 2000]. Other similar kinetics of nuclear accumulation has been described for the transcription factor FKHR that is involved in the formation of the skeletal muscle. In this case, the nuclear increase of FKHR occurs gradually during the 3 days period of differentiation [Nishiyama et al., 2004].

As mentioned above, SOX17 gradually increased in the nucleus with kinetics similar to the progesterone induction of rabbit *ug* in the endometrium. Therefore, one can wonder whether this hormone could actually be the primary stimulus for this increment. We assessed this possibility by treating HEC-1A cells, over-expressing SOX17, with progesterone. Then, the kinetics of the possible progesterone-triggered translocation of SOX17 was monitored by Western blot analysis. Unfortunately, we found that the expressed SOX17 was quickly localized exclusively in the nucleus, even in the absence of progesterone (data not shown). A similar quick and exclusive nuclear localization of SOX17 has also been observed in COS cells expressing the protein by transfection with a plasmid for SOX17 [Kanai et al., 1996]. It should be stressed that we obtained evidence for translocation of SOX17 directly from progesterone-treated animals. It would therefore probably be necessary to develop an experimental system reproducing the intracellular conditions of the rabbit endometrial cells *in vivo*. Perhaps, a solution to this problem would be the use of primary cultures of rabbit endometrial cells but, in our hands, this system was very difficult to handle as these cells appear to lose after 1 of 2 days of culture part of their phenotype, including the expression of uteroglobin (our unpublished observations).

It is important to know whether there are others sequences in the distal *ug* promoter that might bind SOX17 and, hence, be functional. This possibility seems to be of relevance, particularly in the region around -2.7 kb, since this region appears to be very important for the progesterone control of *ug* [Scholz et al., 1999]. A computer-based search of the distal *ug* promoter (-2.8 – 0.4 kb) indicated that two non-canonical sequences (CACAAAG, located at -2715 and -2434) might be putative SOX17-binding elements. To test the functional character of these sequences, we performed

experiments similar to that shown in Figure 4A but using the plasmid pHRE-79UG/luc (see Materials and Methods section) bearing a distal fragment of the *ug* promoter that contained one of these putative sequences. These experiments showed that overexpression of SOX17 did not at all increase the transcription of the reporter gene (data not shown). Therefore, only the element G' seems to be functional in the context of the *ug* promoter.

Regarding the mechanism(s) of action of SOX17 on the transcriptional activation of the rabbit *ug*, one can only speculate. It has been postulated that the SOX proteins could function as coupling factors that would interact with others transcription factors bound to different elements of a promoter, even at sites far from the SOX-binding elements. This mechanism would be based, in part, on the well-demonstrated ability of SOX proteins to bend the DNA following their binding to the minor groove [Wegner, 1999]. Bending of DNA has been associated with transcriptional regulation of different genes [Perez-Martin and de Lorenzo, 1997; Alvarez et al., 2003]. On the other hand, it has been shown that the interaction of the steroid hormone receptors with their cognate HREs initiates changes in the chromatin structure which allow the subsequent recruitment of other transcription factors to specific binding sites in the promoters of the steroid hormone-regulated genes [Truss et al., 1995; Scholz et al., 1998, 1999; Vicent et al., 2002]. In the case of the transcriptional regulation of the rabbit *ug* by steroid hormones, this mechanism was observed for the recruitment of transcription factors such as Sp1 [Scholz et al., 1998] and NF-Y [Scholz et al., 1999]. Thus, the gradual decondensation of the chromatin structure of the rabbit *ug*, produced by the binding of the progesterone receptor to the HRE of the promoter, might allow the concomitant and gradual access of SOX17 to the element G' described in this study. Then, binding of SOX17 to this sequence might help to activate the transcription from the *ug* promoter.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. A. Murakami, University of Kyoto, Japan for the generous gift of the plasmid pCMV-Tag2B/SOX17. This work was supported by grants from the DGICYT and the Fundacion Ramon Areces.

REFERENCES

- Alvarez M, Rhodes SJ, Bidwell JP. 2003. Context-dependent transcription: All politics is local. *Gene* 313:43–57.
- Argentaro A, Sim H, Kelly S, Preiss S, Clayton A, Jans DA, Harley VR. 2003. A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem* 278:33839–33847.
- Bailly A, Le Page C, Rauch M, Milgrom E. 1986. Sequence-specific DNA binding of the progesterone receptor to the uteroglobin gene: Effects of hormone, antihormone and receptor phosphorylation. *EMBO J* 5:3235–3241.
- Barbara PD, Moniot B, Poulat F, Berta P. 2000. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn* 217:293–298.
- Beato M, Klug J. 2000. Steroid hormone receptors: An update. *Hum Reprod Update* 6:225–236.
- Beier HM. 1968. Uteroglobin: A hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta* 160:289–291.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227:239–255.
- Dailey L, Yuan H, Basilico C. 1994. Interaction between a novel F9-specific factor and octamer-binding proteins is required for cell-type-restricted activity of the fibroblast growth factor 4 enhancer. *Mol Cell Biol* 14:7758–7769.
- Dennig J, Hagen G, Beato M, Suske G. 1995. Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* 270:12737–12744.
- Fernandez-Renau D, Lombardero M, Nieto A. 1984. Glucocorticoid-dependent uteroglobin synthesis and uteroglobulin mRNA levels in rabbit lung explants cultured in vitro. *Eur J Biochem* 144:523–527.
- Garcia C, Nieto A. 1999. Two progesterone-dependent endometrial nuclear factors bind to an E-box in the rabbit uteroglobin gene promoter: Involvement in tissue-specific transcription. *Arch Biochem Biophys* 362:301–308.
- Gomez Lahoz E, Lopez de Haro MS, Esponda P, Nieto A. 1992. Tissue-specific and hormonally regulated expression of the puromycin N-acetyltransferase-encoding gene under control of the rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. *Gene* 117:255–258.
- Hayward-Lester A, Hewetson A, Beale EG, Oefner PJ, Doris PA, Chilton BS. 1996. Cloning, characterization, and steroid-dependent posttranscriptional processing of RUSH-1 alpha and beta, two uteroglobin promoter-binding proteins. *Mol Endocrinol* 10:1335–1349.
- Hebbar PB, Archer TK. 2003. Chromatin remodeling by nuclear receptors. *Chromosoma* 111:495–504.
- Hudson C, Clements D, Friday RV, Stott D, Woodland HR. 1997. Xsox17alpha and -beta mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell* 91:397–405.
- Kadonaga JT, Tjian R. 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5889–5893.
- Kanai Y, Kanai-Azuma M, Noce T, Saido TC, Shiroishi T, Hayashi Y, Yazaki K. 1996. Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *J Cell Biol* 133:667–681.
- Kay E, Feigelson M. 1972. An estrogen modulated protein in rabbit oviducal fluid. *Biochim Biophys Acta* 271:436–441.
- Klug J, Beato M. 1996. Binding of YY1 to a site overlapping a weak TATA box is essential for transcription from the uteroglobin promoter in endometrial cells. *Mol Cell Biol* 16:6398–6407.
- Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, Miele L, Pattabiraman N, Singh G. 2000. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: Nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci* 923:348–354.
- Krishnan RS, Daniel JC Jr. 1967. “Blastokinin”: Inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science* 158:490–492.
- Kumar NM, Chandra T, Woo SL, Bullock DW. 1982. Transcriptional activity of the uteroglobin gene in rabbit endometrial nuclei during early pregnancy. *Endocrinology* 111:1115–1120.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227:680–685.
- Lee TC, Schwartz RJ. 1992. Differential detection of multiple DNA-binding complexes using dissimilar polyanion competitors. *Nucleic Acids Res* 20:140.
- Lonard DM, O'Malley BW. 2005. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci* 30:126–132.
- Lopez de Haro MS, Alvarez L, Nieto A. 1988. Testosterone induces the expression of the uteroglobin gene in rabbit epididymis. *Biochem J* 250:647–651.
- Lucas PC, Granner DK. 1992. Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem* 61:1131–1173.
- Macias H, Pasapera AM, Perez-Solis MA, Ulloa-Aguirre A, Gutierrez-Sagal R. 2004. cDNA sequence, 5'-flanking region, and promoter activity of the *Neotomodon alstoni* Clara cell secretory protein gene. *Arch Biochem Biophys* 427:170–179.
- Miele L, Cordella-Miele E, Mantile G, Peri A, Mukherjee AB. 1994. Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: The uteroglobin family of proteins. *J Endocrinol Invest* 17:679–692.
- Misseyanni A, Klug J, Suske G, Beato M. 1991. Novel upstream elements and the TATA-box region mediate preferential transcription from the uteroglobin promoter in endometrial cells. *Nucleic Acids Res* 19:2849–2859.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14:62–68.
- Murakami A, Shen H, Ishida S, Dickson C. 2004. SOX7 and GATA-4 are competitive activators of Fgf-3 transcription. *J Biol Chem* 279:28564–28573.
- Nieto A, Beato M. 1980. Synthesis and secretion of uteroglobin in rabbit endometrial explants cultured in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 17:25–39.
- Nishiyama T, Kii I, Kudo A. 2004. Inactivation of Rho/ROCK signaling is crucial for the nuclear accumulation of FKHR and myoblast fusion. *J Biol Chem* 279:47311–47319.

- Ossipow V, Laemmli UK, Schibler U. 1993. A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 21:6040–6041.
- Perez Martinez M, Garcia C, Lopez de Haro MS, Nieto A. 1996. Interactions of progesterone-dependent endometrial nuclear factors with the promoter of the rabbit uteroglobin gene. *Arch Biochem Biophys* 333:12–18.
- Perez-Martin J, de Lorenzo V. 1997. Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu Rev Microbiol* 51:593–628.
- Pevny LH, Lovell-Badge R. 1997. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* 7:338–344.
- Sagal RG, Nieto A. 1998. Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster uteroglobin/Clara cell 10-kDa gene (ug/cc10): Tissue-specific and hormonal regulation. *Arch Biochem Biophys* 350:214–222.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scholz A, Truss M, Beato M. 1998. Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium. *J Biol Chem* 273:4360–4366.
- Scholz A, Truss M, Beato M. 1999. Hormone-dependent recruitment of NF-Y to the uteroglobin gene enhancer associated with chromatin remodeling in rabbit endometrial epithelium. *J Biol Chem* 274:4017–4026.
- Schule R, Muller M, Kaltschmidt C, Renkawitz R. 1988. Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242:1418–1420.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850–858.
- Smith JM, Koopman PA. 2004. The ins and outs of transcriptional control: Nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet* 20:4–8.
- Strahle U, Klock G, Schutz G. 1987. A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc Nat Acad Sci USA* 84:7871–7875.
- Suske G, Lorenz W, Klug J, Gazdar AF, Beato M. 1992. Elements of the rabbit uteroglobin promoter mediating its transcription in epithelial cells from the endometrium and lung. *Gene Expr* 2:339–352.
- Truss M, Bartsch J, Schelbert A, Hache R, Beato M. 1995. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J* 14:1737–1751.
- Vicent GP, Koop R, Beato M. 2002. Complex role of histone H1 in transactivation of MMTV promoter chromatin by progesterone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83: 15–23.
- Wegner M. 1999. From head to toes: The multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27:1409–1420.